

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno – biotehnološki fakultet

Diplomski rad

Zagreb, 17. srpanj 2015.

Marko Marinković, 551/BPI

**Biotehnološka proizvodnja liofiliziranih
sojeva *Propionibacterium freudenreichii***

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo pod stručnim voditeljstvom prof. dr. sc. Jagode Šušković.

Posebno se zahvaljujem mojoj mentorici dr. sc. Jagodi Šušković, red. prof. na stručnom voditeljstvu i svim korisnim savjetima, te i dr. sc. Blaženki Kos, red. prof. na susretljivosti tijekom izrade diplomskog rada, osobito jer su pokazale razumijevanje za moje interese i omogućili mi dodatnu edukaciju na području koje me zanima.

Također, veliko hvala dr. sc. Jasni Novak, izv. prof. na izdvojenom vremenu i strpljenju koje je, nesumnjivo, bilo potrebno tijekom izrade ovog rada. Svojom stalozenošću uvelike je olakšala izradu diplomskog rada te ga je upotpunila svojim idejama i prijedlozima. Bez nje, ovaj rad zasigurno ne bi bio dovoljno dobar za diplomiranje na ovom Fakultetu.

Uz to, puno hvala dr. sc. Andreji Leboš Pavunc i dr. sc. Kseniji Uroić, na ugodnoj atmosferi tijekom izrade eksperimentalnog dijela rada.

Na kraju, hvala i svim profesorima i asistentima ovog Fakulteta koji su mi, svojom posvećenosti i teškim radom, omogućili kvalitetno obrazovanje i osposobili me za rad u struci.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Diplomski rad

Prehrambeno – biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Biotehnološka proizvodnja liofiliziranih sojeva *Propionibacterium freudenreichii*

Marko Marinković, 551/BPI

Sažetak: Cilj ovog diplomskog rada je ispitati funkcionalna svojstva četiri različita soja *Propionibacterium freudenreichii* kako bi se procjenio njihov probiotički potencijal. Ispitana su temeljna funkcionalna svojstva *in vitro*, preživljavanje u prisutnosti različitih koncentracija žučnih soli i u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta (GIT), antimikrobno djelovanje, te mogućnost adhezije bakterijskih stanica *P. freudenreichii* na proteine ekstracelularnog matriksa: kolagen, fibronektin i laminin, te na protein sluznice, mucin. S ciljem procjene bioraznolikosti odabranih sojeva je provedena analiza ukupnih staničnih proteina, a ispitano je i preživljavanje ovih sojeva tijekom liofilizacije uz dodatak različitih lioprotektanata: sirutke, obranog mlijeka i laktoze, što je značajno za optimizaciju biotehnološke proizvodnje probiotičkih sojeva. Određivanje postotka proizvedene kiseline u supernatantima kulture pojedinog soja *P. freudenreichii*, pokazalo je da sva četiri soja proizvode sličnu količinu kiselina. U prisutnosti tri različite koncentracije žučnih soli: 0,3 %, 0,6 % i 1,5 %, uočen je rast biomase svih *P. freudenreichii* sojeva, što ukazuje na dobro podnošenje odabranih koncentracija žučne soli. Bakterijski sojevi najbolje podnose najnižu koncentraciju žučne soli od 0,3 %, a s povećanjem koncentracije na 0,6 %, odnosno 1,5 % preživljavanje sojeva se smanjuje. Ispitani *P. freudenreichii* sojevi uspješno preživljavaju *in vitro* u uvjetima GIT. Analiza antimikrobnog djelovanja četiri bakterijska soja *P. freudenreichii* provedena je s šest test-mikroorganizama, a prema rezultatima određeni postotak supernatanta ispitivane bakterijske kulture *P. freudenreichii* inhibira rast svih test-mikroorganizama. Mogućnosti *in vitro* adhezije odabranih sojeva *P. freudenreichii* na proteine ekstracelularnog matriksa i mucin se međusobno razlikuju. Određeni broj živih bakterijskih stanica (CFU mL⁻¹) *P. freudenreichii* prije i nakon procesa liofilizacije, uz dodatak tri različita lioprotektora, upućuje na najučinkovitije preživljavanje bakterijskih stanica uz dodatak šećera laktoze.

Ključne riječi: Funkcionalnost, probiotici, *Propionibacterium freudenreichii*

Rad sadrži: 51 stranicu, 5 tablica, 13 slika, 51 literaturni navod

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnici Prehrambeno - biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Jagoda Šušković

Pomoć pri izradi: prof. dr. sc. Jasna Novak

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. dr. sc. Blaženka Kos, red. prof.
2. dr. sc. Jagoda Šušković, red. prof.
3. dr. sc. Tonči Rezić, izv. prof.
4. dr. sc. Jadranka Frece, izv. prof. (zamjena)

Datum obrane: 17. srpanj 2015.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory of Antibiotic, Enzyme, Probiotic
and Starter Culture Technologies
Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Graduate Thesis

Biotechnological production of freeze – dried *Propionibacterium freudenreichii* strains *Marko Marinković, 551/BPI*

Abstract: Aim of this thesis was to determine functional characteristics of four different *Propionibacterium freudenreichii* strains in order to evaluate its probiotic effects. Basic functional characteristics, survival of strains in different concentrations of bile salts and in simulated gastrointestinal tract (GIT) conditions, antimicrobial activity and adhesion to extracellular matrix proteins: collagen, fibronectin and laminin, and mucin, were studied *in vitro*. In addition, analysis of whole cell was carried out in order to evaluate the biodiversity of the strains of interest. Additionally strain survival during freeze-drying, using different lyoprotectants: whey, skim milk and lactose were tested, which is important for optimization of biotechnological production of probiotic strains. Determined percentage of acid produced in *P. freudenreichii* supernatants, revealed that all of four strains produced similar amount of acids. In presence of three different concentration of bile salts: 0,3 %, 0,6 % and 1,5 %, the growth of all *P. freudenreichii* strains was observed, which indicates on efficient bile salts tolerance. All bacterial strains tolerated the lowest bile salt concentration of 0,3 %, the best, while tolerance decreased with increase of concentration to 0,6 % and 1,5 %. *P. freudenreichii* strains showed excellent *in vitro* GIT survival. Antimicrobial activity of four *P. freudenreichii* strains was carried out with six test-microorganisms and results show that certain amount of tested *P. freudenreichii* supernatant strains inhibited the growth of all test-microorganisms. Adhesion ability to extracellular matrix proteins and mucin was strain dependend, and implied on the strains potential to adhere to intestinal epithelial cell. Survival rate (CFU mL⁻¹) of selected strains determined, before and after freeze-drying, with three different lyoprotectants, revealed that the best survival rate was achieved with lactose additon.

Keywords: Functionality, probiotic, *Propionibacterium freudenreichii*

Thesis contains: 51 pages, 5 tables, 13 pictures, 51 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: PhD Jagoda Šušková, Full professor

Technical support and assistance: PhD Jasna Novak, Associated professor

Reviewers:

1. PhD Blaženka Kos, Full professor
2. PhD Jagoda Šušková, Full professor
3. PhD Tonči Rezić, Associated professor
4. PhD Jadranka Frece, Associated professor (substitute)

Thesis delivered: 17. July 2015.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Fiziološke karakteristike propionibakterija.....	2
2.1.1. Taksonomija propionibakterija.....	2
2.1.2. Genetička raznolikost <i>P. freudenreichii</i>	3
2.1.3. Sigurnosni aspekti propionibakterija.....	4
2.2. Metabolički putevi <i>P. freudenreichii</i>	5
2.2.1. Propionska fermentacija Wood Werkman-ov ciklus.....	5
2.2.2. Respiracija <i>P. freudenreichii</i>	6
2.2.3. Sinteza vitamina i porfirina pomoću <i>P. freudenreichii</i>	7
2.2.4. Proizvodnja egzopolisaharida pomoću <i>P. freudenreichii</i>	8
2.2.5. Značajke dugoročnog preživljenja <i>P. freudenreichii</i>	8
2.3. Uloga propionibakterija u formiranju arome sira.....	9
2.4. Probiotička svojstva <i>P. freudenreichii</i>	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1. Materijali.....	15
3.1.1. Mikroorganizmi.....	15
3.1.2. Hranjive podloge za čuvanje i uzgoj mikroorganizama.....	15
3.1.3. Kemikalije.....	16
3.1.4. Aparatura i pribor.....	16
3.2. Metode rada.....	17
3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama.....	17
3.2.2. Određivanje pH vrijednosti, stupnja kiselosti i postotka proizvedene kiseline.....	17
3.2.3. Priprema ekstrakta ukupnih staničnih proteina.....	18
3.2.3.1. SDS-PAGE ukupnih staničnih proteina.....	18
3.2.4. Određivanje tolerancije <i>P. freudenreichii</i> na žučne soli.....	18
3.2.5. Preživljavanje <i>P. freudenreichii</i> u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta..	19
3.2.5.1. Priprava simuliranoga želučanog soka i simuliranoga soka tankog crijeva...	19
3.2.5.2. Učinak simuliranog želučanog soka i soka tankoga crijeva na preživljavanje <i>P. freudenreichii</i>	19
3.2.6. Priprava supernatanata <i>P. freudenreichii</i> za određivanje antibakterijske aktivnosti.....	19
3.2.7. Turbidimetrijska metoda za određivanje antimikrobnog djelovanja <i>P. freudenreichii</i>	19
3.2.8. <i>In vitro</i> adhezija <i>P. freudenreichii</i> na proteine ekstracelularnog matriksa.....	20
3.2.9. <i>In vitro</i> adhezija <i>P. freudenreichii</i> na protein mucin.....	21

3.2.10.	Priprema <i>P. freudenreichii</i> za liofilizaciju.....	21
3.2.11.	Određivanje broja živih mikroorganizama indirektnom metodom.....	22
4.	REZULTATI	23
5.	RASPRAVA	40
6.	ZAKLJUČCI	44
7.	LITERATURA	45

1. Uvod

Sve Propionibakterije pripadaju razredu *Actinobacteria* i većinom su bakterijski sojevi izolirani iz mikrokoliša bliskim proizvodnji mlijeka i mliječnih proizvoda. Bakterije iz vrste *Propionibacterium freudenreichii* se koriste u proizvodnji švicarskog tipa sira, a postoji sve veći znanstveni interes za istraživanje probiotičkih učinaka ovih sojeva (Thierry i sur., 2011). Propionibakterije imaju svojstven metabolizam, kojeg karakterizira sinteza propionske kiseline kao glavnog proizvoda metabolizma. Za rast zahtijevaju nekoliko specifičnih hranjivih sastojaka i mogu koristiti različite izvore ugljika. Iz sekvence genoma *P. freudenreichii* CIRM-BIA1^T, mnogi metabolički putevi su rekonstruirani, uključujući Wood-Werkman-ov ciklus, enzime respiratornog lanca, sintezu aminokiselina i mnogih vitamina uključujući vitamin B₁₂. *P. freudenreichii* ima sposobnost dugoročnog preživljavanja. Nakuplja anorganski polifosfat (polyP) kao izvor energije, glikogen kao izvor ugljika i slične topljive tvari poput trehaloze. U siru, *P. freudenreichii* ima ključnu ulogu u proizvodnji različitih spojeva koji doprinose aromi, ne samo propionske kiseline, već i slobodnih masnih kiselina, koje nastaju lipolizom mliječnih glicerida i metil-maslačne kiseline nastale razgradnjom aminokiselina. *P. freudenreichii* može iskazivati zdravstvene učinke poput bifidogenog učinka u crijevima čovjeka ili mogućeg imunomodulacijskog učinka (Cousin i sur., 2010). Mnoga svojstva *P. freudenreichii* koja su uključena u proces dozrijevanja sira, bio-konzerviranje i probiotički učinci značajno se razlikuju ovisno o soju bakterije. Razjašnjavanje molekularnih mehanizama koji su temelj ovih procesa lakše je objasniti primjenom rezultata sekvencioniranih genoma i molekularne metodologije što doprinosi odabiru najpogodnijeg soja za svaku ciljanu primjenu. Upravo cilj ovog diplomskog rada je ispitati funkcionalna svojstva četiri različita soja *Propionibacterium freudenreichii* kako bi se procijenio njihov probiotički potencijal. Pri tome su ispitana temeljna funkcionalna svojstva *in vitro*, koja mogu upućivati na iskazivanje poželjnih zdravstvenih učinaka na domaćina: preživljavanje navedenih sojeva u prisutnosti različitih koncentracija žučnih soli i u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta (GIT), osjetljivost na različite antibiotike, antimikrobno djelovanje, adhezija na proteine ekstracelularnog matriksa. Osim navedenog, s ciljem procjene bioraznolikosti odabranih sojeva je provedena analiza ukupnih staničnih i površinskih proteina te je ispitano preživljavanje ovih sojeva tijekom liofilizacije uz dodatak različitih lioprotektanata: sirutke, obranog mlijeka i laktoze, što je značajno za optimizaciju biotehnološke proizvodnje liofiliziranih probiotičkih sojeva.

2. Teorijski dio

2.1. Fiziološke karakteristike propionibakterija

Propionibakterije su Gram-pozitivne, mezofilne, aerotolerantne, pleomorfne štapićaste bakterije s visokim udjelom G + C% baza u genomu. Imaju karakterističan metabolizam u kojem kao krajnji produkt fermentacije nastaje propionska kiselina. Pokazuju nisku potrebu za hranjivim sastojcima, a odlikuju se sposobnošću dugoročnog preživljenja u različitim mikrookolišima (Thierry i sur., 2011).

P. freudenreichii su prvi puta opisali Orla Jensen i von Freudenreich prije više od 100 godina u švicarskom ementaler siru te su uočili povezanost između sintetizirane propionske kiseline i nastajanja karakterističnih rupa u siru (von Freudenreich i Orla Jensen, 1906).

P. freudenreichii se koristi kao kultura za dozrijevanje švicarskog tipa sira. Također je značajna zbog proizvodnje vitamina B₁₂ i propionske kiseline te se smatra da ima zaštitne učinke u hrani za ljude i stoku (Thierry i sur., 2011). Osim toga, sve se više istražuje obećavajući probiotički učinak *P. freudenreichii* (Cousin i sur., 2010).

2.1.1. Taksonomija propionibakterija

Propionibakterije su Gram-pozitivne bakterije koje pripadaju razredu *Actinobacterium* i sadrže visok udio G + C pb u genomu (Stackebrandt i sur., 1997). Bakterije iz filuma *Actinobacterium* mogu biti različitih morfologija, fiziologije i metaboličkih svojstva te su izolirane iz različitih staništa uključujući zemlju (Ventura i sur., 2007). Rod *Propionibacterium* trenutno uključuje 12 različitih bakterijskih vrsta. Ove bakterije se grupiraju ovisno o mikrookolišu iz kojeg su izolirane, u 'mliječne' ili 'klasične' i 'kožne' propionibakterije (Cummins i Johnson, 1986). Mliječne propionibakterije izolirane su iz mlijeka i mliječnih proizvoda. Opisane su četiri bakterijske vrste iz mliječnih mikrookoliša: *P. freudenreichii*, *P. acidipropionici*, *P. jensenii* i *P. thoenii*. Kožne propionibakterije su u suživotu sa sisavcima, tako i ljudima. *P. acnes* je najistraživanija vrsta ove skupine propionibakterija, a prisutna je u aknama i infekcijama nakon operacije. Opisane su i četiri vrste propionibakterija koje su izolirane iz drugih mikrostaništa, koja nisu mliječni proizvodi ili ljudska koža: *P. cyclohexanicum* je izolirana iz pokvarenog soka od naranče, *P. microaerophilum* iz otpadne vode u proizvodnji maslina, *P. australiense* iz granulomatoznih govedih ozljeda i *P. acidifaciens* izolirana iz usne šupljine čovjeka (Thierry i sur., 2011). Analiza 16S rRNA sekvence gena pokazala je da su *P. cyclohexanicum*, *P. acidifaciens* i *P.*

australiense filogenetski srodni *P. freudenreichii*, dok je bakterija *P. microaerophilum* srodna *P. acidipropionici*. Sojevi izolirani iz mliječnih proizvoda čine većinu (80 do 90 %) *P. freudenreichii* sojeva dostupnih u međunarodnim kolekcijama mikroorganizama (npr. Belgijska koordinirana kolekcija mikroorganizama - BCCM) i preostalim laboratorijskim kolekcijama. Ipak pojedini sojevi *P. freudenreichii* su izolirani iz sijena i slame. Poznata staništa su povezana sa stočnim okolišem, ali potrebna su i dodatna istraživanja pošto nije napravljen sistematski pregled propionibakterija u izvorima različitim od mliječnog i stočnog okoliša. U mnogim sirevima, *P. freudenreichii* i ostale mliječne propionibakterije su prisutne u niskim koncentracijama. U ementaleru i sličnim sirevima, *P. freudenreichii* doseže visoki broj stanica, 10^9 cfu/g sira tijekom cijelog perioda dozrijevanja. U usporedbi s drugim mliječnim vrstama, termorezistentna *P. freudenreichii* prevladava u ementaleru zbog čega se skuta zagrijava na temperaturu od 50 do 55 °C oko 30 minuta.

2.1.2. Genetička raznolikost *P. freudenreichii*

Veličina genoma *P. freudenreichii* je oko 2.6 Mb, a udio G + C pb iznosi 67%. Genom soja *P. freudenreichii* CIRM-BIA1^T je prvi sekvencionirani genom propionibakterija (Falentin i sur., 2010a). Razvoj eksperimentalnih metoda molekularne biologije omogućio je prevladavanje nedovoljne učinkovitosti transformacije *P. freudenreichii* (od 10^3 do 10^8 kolonija (cfu)/ μ g DNA), što je omogućilo istraživanje specifičnih gena ove bakterije (Thierry i sur., 2011).

Spoznaje o genetičkoj raznolikosti bakterijskih sojeva unutar vrste *P. freudenreichii* su oskudni. Metode poput pulsirajuće gel elektroforeze (PFGE) i RAP DNA-PCR omogućuju karakterizaciju *P. freudenreichii* na razini soja (Meile i sur., 2008). MLST (engl. Multi-locus sequence typing) metoda utemeljena na analizi sekvence unutarnjih fragmenata 7 gena, nedavno je razvijena za *P. freudenreichii*. Ovo istraživanje je pokazalo kako jezgra genoma *P. freudenreichii* posjeduje nizak stupanj polimorfizma nukleotida i kako rekombinacija ima značajnu ulogu u distribuciji tih polimorfizma među izolatima (Thierry i sur., 2011).

Bakterije vrste *P. freudenreichii* su ranije se grupirale u dvije podvrste ovisno o načinu fermentacije laktoze i aktivnosti enzima nitrat reduktaze. *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* ne može fermentirati laktozu, ali ima aktivnu nitrat reduktazu, dok *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* pokazuje obrnuta svojstva (Cummins i Johnson, 1986). Također postoje sojevi *P. freudenreichii* koji imaju preostala dva fenotipska obilježja (laktoza

i nitrat reduktaza pozitivni te laktoza i nitrat reduktaza negativni) (Thierry i sur., 2011). Na temelju sekvence genoma *P. freudenreichii* CIRM-BIA1^T ustanovljeno je kako je gen *lacZ* koji je odgovoran za β -galaktozidaznu aktivnost lociran na pokretnom elementu koji ima obilježja slična transpozonu i kako lokus koji je odgovoran za aktivnost nitrat reduktaze sadrži pojedine pseudogene (Falentin i sur., 2010a). Filogenetska analiza *P. freudenreichii* MLST metodom nije potvrdila razlikovanje navedenih podvrsta. Zbog svega navedenog neopravdani su razlozi razdvajanja u podvrste na temelju ova dva fenotipska obilježja (Thierry i sur., 2011).

2.1.3. Sigurnosni aspekti propionibakterija

P. freudenreichii ima dugu povijest sigurne primjene u ljudskoj prehrani i stočnoj hrani. Ovim bakterijama dodijeljen je GRAS status od strane američke Agencije za hranu i lijekove (engl. FDA) (Mogensen i sur., 2002). *P. freudenreichii* i *P. acidipropionici* također pripadaju listi agensa Qualified Presumption of Safety (QPS) od strane europske Agencija za sigurnost hrane (EFSA) (EFSA, 2009). QPS daje opću procjenu rizika predstavljena od strane EFSA za sinkronizaciju procjena zabilježenih bioloških agensa koji se namjeravaju uvesti u prehrambeni lanac.

Neophodno je ispitati mogućnost prisutnosti antibiotske rezistencije sojeva koji se namjeravaju koristiti u hrani i stočnoj hrani. Literaturni podaci od antibiotske rezistenciji *P. freudenreichii* i drugih mliječnih propionibakterija su veoma oskudni. Mliječne propionibakterije pokazuju urođenu rezistenciju na nekoliko antibiotika, uključujući sulfonamide, oksacilin, aminoglikozide, prvu i drugu generaciju kvinolona, kolistin, metronidazol i fosfomicin (Meile i sur., 2008). Nisu ustanovljeni pokretni genetički elementi DNA koji bi bili odgovorni za antibiotsku rezistenciju kod mliječnih propionibakterija. Istraživanja antibiotske rezistencije većinom su usmjerena na propionibakterije koje uzrokuju kožne infekcije koje su od kliničkog značaja, osobito izolati *P. acnes* (Nord i Oprica, 2006). EFSA je predložila minimalne inhibicijske koncentracije (MIC) za pojedine antibiotike, definirana kao najmanja koncentracija antibiotika koja inhibira bakterijski rast, za pojedine bakterije koje se koriste u hrani za stoku pa tako i za bakterije iz roda *Propionibacterium*, ali su ove vrijednosti procijenjene na temelju rezultata istraživanja kožnih propionibakterija (EFSA, 2008).

2.2. Metabolički putevi *P. freudenreichii*

Propionibakterije imaju karakteristične metaboličke puteve koji su vrlo kompleksni zbog nekoliko međusobno povezanih puteva koji se odvijaju usporedno. Propionibakterije su anaerobne, ali i aerotolerantne. Zahtijevaju malo hranjivih sastojaka te su u mogućnosti preživjeti i ostati aktivne pri različitim uvjetima.

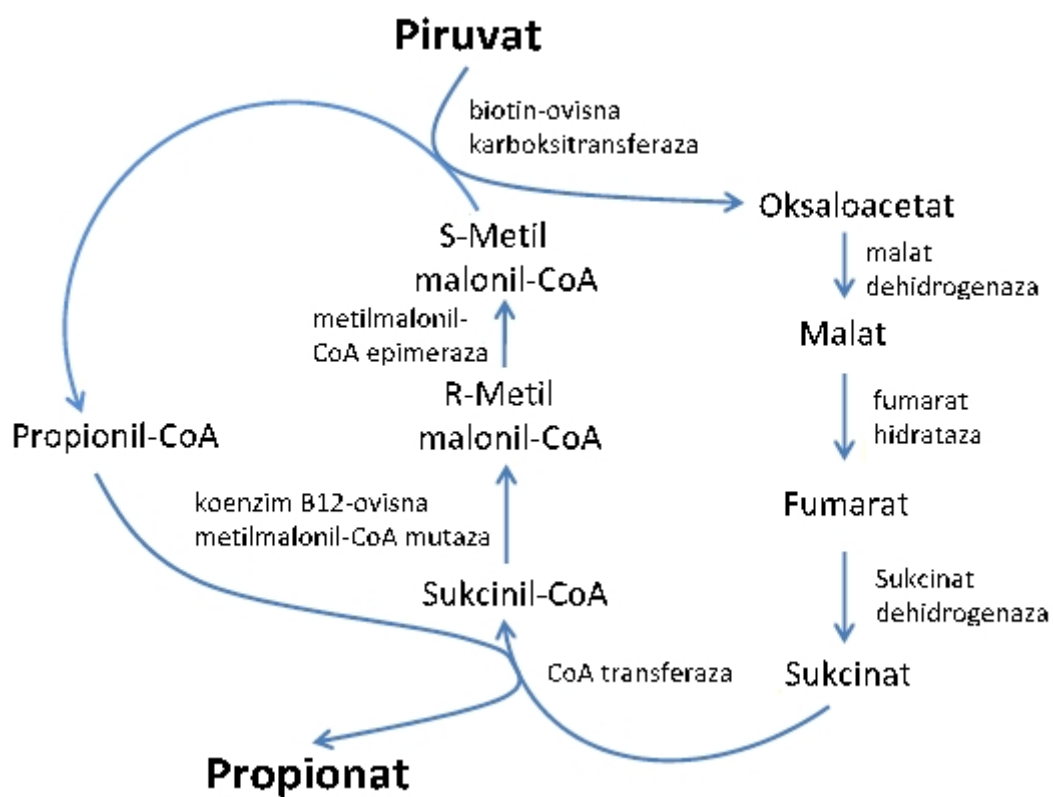
2.2.1. Propionska fermentacija Wood Werkman-ov ciklus

P. freudenreichii fermentira različite supstrate, uključujući ugljikohidrate, poliole poput glicerola, eritritola i adonitola te organske kiseline poput mliječne i glukonske kiseline (Cummins i Johnson, 1986). Glavni produkti fermentacije su propionska, octena i jantarna kiselina i CO₂. Supstrati se prvo oksidiraju do piruvata glikolizom ili pentoza fosfatnim putem stvarajući ATP i reducirane koenzime. Piruvate se zatim oksidira do acetata i CO₂ ili reducira do propionata.

Redukcija piruvata do propionata odvija se specifičnim ciklusom zvanim transkarboksilazni ili Wood-Werkman-ov ciklus (Thierry i sur., 2011) (Slika 1). Ovaj ciklus koristi NADH nastao tijekom glikolize i oksidacije piruvata te nastaje dodatni ATP. Sve reakcije transkarboksilaznog puta su reverzibilne. Transkarboksilacija je ključna reakcija u kojoj se karboksilna grupa prenosi sa metilmalonil-CoA na piruvat pri čemu nastaje oksaloacetat i propionil-CoA bez utroška ATP-a. Enzimski kompleks koji katalizira ovu reakciju je biotin-ovisna karboksitransferaza, sastavljena od tri podjedinice. Oksaloacetat se zatim prevodi u sukcinat enzimima citratnog ciklusa. Redukciju fumarata u sukcinat katalizira membranska sukcinat dehidrogenaza uključujući anaerobni transport elektrona preko citokroma b uz nastajanje ATP. Sukcinat se zatim prevodi u sukcinil-CoA uz istovremenu konverziju propionil-CoA u propionat što katalizira enzim CoA-transferaza. Sukcinil-CoA se na kraju izomerizira u metilmalonil-CoA u reakciji koju katalizira metilmalonil-CoA mutaza. Ovaj koenzim B₁₂-ovisan enzim je karakterističan za propionibakterije. Put proizvodnje propionata je jedinstven za propionibakterije, funkcionira kao kružni ciklus, spojen je s oksidativnom fosforilacijom i prinos ATP-a je veći u odnosu na ostale bakterije koje proizvode propionsku kiselinu.

Stanice moduliraju udio piruvata koji se ili reducira do propionata ili oksidira do acetata i CO₂ te na taj način održavaju redoks potencijal. Koliko će se piruvata utrošiti za

određen put ovisi o korištenom supstratu, izvanstaničnim uvjetima i svojstvima soja. Npr. oksidacijom glukoze i mliječne kiseline postiže se molarni udio propionata i acetata oko 2 (2 mola piruvata se reducira u propionat, a 1 mol piruvata se oksidira u acetat i CO₂), nasuprot oksidacije glicerola gdje nastaje samo propionat. *P. freudenreichii* može kometabolizirati aspartat i druge supstrate poput laktata, ovisno o soju. Aspartat se deaminira u fumarat koji se dalje reducira u sukcinat uz istovremeno nastaje NAD i ATP. Sojevi koji koriste aspartat zajedno s laktatom prevode manje piruvata do propionata i oksidiraju više piruvata do acetata + CO₂, kako bi očuvali stanični redoks potencijal, u usporedbi s pregradnjom samog laktata.



Slika 1. Shematski prikaz Wood-Werkman-ovog ciklusa *P. freudenreichii*. Temelji se na proizvodnji propionata, sve reakcije su reverzibilne (Preuzeto od Thierry i sur., 2011).

2.2.2. Respiracija *P. freudenreichii*

Sojevi *P. freudenreichii* mogu rasti u anaerobnim ili mikroaerofilnim uvjetima, stoga se smatraju anaerobnim bakterijama. Međutim ranija su istraživanja također pokazala

oksidativnu aktivnost sa slobodnim kisikom na različitim supstratima kod propionibakterija (Vorobjeva, 1999). U skladu s tim, svi geni potrebni za aerobnu respiraciju su okarakterizirani unutar genoma *P. freudenreichii*: geni koji kodiraju NADH dehidrogenazu, sukcinat dehidrogenazu, citokrom bd kompleks, ATPaze i cijeli put biosinteze hema (Falentin i sur., 2010a). Pri visokim koncentracijama kisika, sinteza citokroma pa tako i rast *P. freudenreichii* je inhibiran. Prebacivanje s anaerobnih u aerobne uvjete inducira potrošnju propionata dobivenog u anaerobnim uvjetima. Takav prijelaz se koristi za povećanje prinosa tijekom proizvodnje vitamina B₁₂ i 1,4-dihidroksi-2-naftoične kiseline (Furuichi i sur., 2007). Tijekom anaerobnih uvjeta, elektron akceptor kod *P. freudenreichii* može biti sulfat, fumarat, nitrat, menakvinon (vitamin K₂) ili ioni željeza i humična kiselina iz tla.

2.2.3. Sinteza vitamina i porfirina pomoću *P. freudenreichii*

P. freudenreichii može sintetizirati sve aminokiseline i nekoliko vitamina. Stoga, *P. freudenreichii* raste na kemijski definiranom mediju koji sadrži izvor ugljika kao izvor energije, izvor dušika iz NH₄ te minerale i vitamine (pantotemat, biotin, tiamin). *P. freudenreichii* sintetizira vitamin B₁₂ (kobalamin) koji je kofaktor metilmalonil-CoA mutaze koja sudjeluje u anaerobnom putu, bilo da se radi o aerobnim ili anaerobnim uvjetima inkubacije (Iida i sur., 2007). Vitamin B₁₂ već se duže vrijeme industrijski proizvodi, a njegova sinteza pomoću bakterija predstavlja najkompleksniju sintezu vitamina. Više od 20 različitih reakcija je uključeno u sintezu ove molekule koja sadrži kobalt. Biosintetski put vitamina B₁₂ kod *P. freudenreichii* dobro je istražen te je nedavno upotpunjen zahvaljujući kompletno sekvencioniranom genomu (Falentin i sur., 2010a). Razvijeni su genetički modificirani sojevi *P. freudenreichii* koji proizvode povećane koncentracije vitamina B₁₂ (Murooka i sur., 2005), zatim 5-aminolevulinske kiseline, prvog intermedijera u sintezi porfirina (Kiatpapan i Panbangred, 2008), porfirina (Piao i sur., 2004a) i riboflavina (vitamin B₂) (Burgess i sur., 2009). Genetički modificirani sojevi konstruirani su elektroporacijom *P. freudenreichii* IFO12426 s vektorom pPK705 *E. coli* koji sadrži jedan do tri gena odgovarajućih metaboličkih puteva. Proizvodnja vitamina B₂, B₁₂ i porpirogena povećala se 2 puta, 1.9 puta i 33 puta kod genetički modificiranih sojeva u odnosu na sojeve divljeg tipa (Burgess i sur., 2009; Piao i sur., 2004a).

2.2.4. Proizvodnja egzopolisaharida pomoću *P. freudenreichii*

P. freudenreichii proizvodi egzopolisaharide (EPS), uključujući i hetero- i homopolisaharide. Do sada su opisane dvije primarne EPS strukture u različitim sojevima: heteropolisaharid sastavljen od D-glukoze, D-manoze i D-glukuronske kiseline u molarnim omjerima 2:2:1 i (1→3, 1→2)-β-d-glukan homopolisaharid (Deutsch i sur., 2010). Polisaharid tog tipa koji je povezan sa staničnom stijenkom je identificiran u 35 % sojeva *P. freudenreichii* (Deutsch i sur., 2010). Zanimljivo je kako je jedan gen (*gtf*) odgovoran za sintezu ovog površinskog polisaharida, što je pokazano eksperimentima inaktivacije i heterologne ekspresije kod *Lactococcus lactis* (Deutsch i sur., 2010). Korištenjem kvantitativne reverzne transkripcije PCR, pokazano je kako je sinteza ovog površinskog polisaharida u korelaciji sa razinom ekspresije *gtf* gena; potreban je minimalna transkripcija za sintezu detektabilne količine polisaharida. Prisustvo IS elementa u *gtf* promotorskoj regiji može objasniti nezavisnost soja za ekspresijom *gtf* gena (Deutsch i sur., 2010).

2.2.5. Značajke dugoročnog preživljenja *P. freudenreichii*

Bakterijske kulture mliječnih propionibakterija mogu preživjeti mjesecima pri sobnoj temperaturi. *P. freudenreichii* može preživjeti i zadržati metaboličku aktivnost u različitim okolišnim uvjetima, uključujući sir, ali i probavni trakt (Hervé i sur., 2007). Ova značajka se može pripisati sposobnošću *P. freudenreichii* da nakuplja različite izvore ugljika i energije. *P. freudenreichii* nakuplja polifosfate (polyP) kao izvor energije. Prisutnost polyP uočena je korištenjem elektronskog mikroskopa kao elektron-guste granule u stanicama (Vorobjeva, 1999). PolyP su linearni polimeri koji sadrže desetak ili stotinjak ortofosfatnih ostataka povezanih visokoenergetskim fosfoanhidridnim vezama. Njihovu sintezu katalizira polifosfat kinaza (PPK) koja prenosi terminalni fosfat ATP-a do polyP. Polifosfati omogućuju mikroorganizmima da reagiraju i toleriraju stresne uvjete. Također se smatra da mogu biti modulatori *quorum sensing*-a i razvoja biofilmova (Seufferheld i sur., 2008). Nakupljanje polyP također regulira aktivnost RNA polimeraze RpoS i sintezu ppGpp, važne signalne molekule stroge kontrole (Seufferheld i sur., 2008). Enzimi koji koriste polyP umjesto ATP-a kataliziraju reverzibilne reakcije, kao na primjer pirofosfat fosfofruktokinaza *P. freudenreichii* koja sudjeluje u glikolizi i glukoneogenezi (Meurice i sur., 2004). *P. freudenreichii* također ima glukokinazu koja koristi polyP ili ATP kao donor fosfata (Phillips i sur., 1993).

Glikogen je α -1,4 povezan i α -1,6 razgranat polimer glukoze koji se koristi za dugoročno čuvanje energije kod životinja, gljiva, bakterija i arheobakterija. Prvi eksperimentalni dokaz sposobnosti *P. freudenreichii* da sintetizira glikogen ustanovljen je *in vivo* ^{13}C NMR analizom bakterijskih stanica *P. freudenreichii* koje su rasle u prisutnosti ^{13}C glukoze (Meurice i sur., 2004). Nedavno su svi geni koji su potencijalno povezani sa sintezom glikogena okarakterizirani unutar genoma istog soja (CIRM-BIA1^T = CIP103027^T) (Falentin i sur., 2010a).

Trehaloza je nereducirajući disaharid pronađen u mnogim organizmima, u kojima ima različite funkcije povezane s prilagodbom na stres zbog fizikalnih karakteristika. Kod bakterija, trehaloza može poslužiti kao izvor ugljika i energije te se nakuplja kao kompatibilna otopljena tvar. Sintetiziraju je mliječne propionibakterije i nakuplja se u različitim stresnim uvjetima. Geni koji sudjeluju u sintezi treholaze kod *P. freudenreichii* nedavno su opisani (Cardoso i sur., 2007).

P. freudenreichii ima mogućnost prilagodbe raznim stresnim uvjetima koji se pojavljuju tijekom fermentacijskih procesa i u promjenjivom okolišu. Industrijske starter kulture koje se dodaju mlijeku u proizvodnji sira su liofilizati te se moraju prilagoditi na osmotski stres. Tijekom proizvodnje sira ementalera, *P. freudenreichii* treba podnijeti nekoliko uzastopnih stresova: grijanje iznad 50 °C, acidifikaciju skute na pH 5.2, osmotski stres zbog dodatka NaCl tijekom salamurenja i nisku temperaturu (od 4 do 12 °C) tijekom zrenja sira. Neki sojevi mogu podnijeti stresne uvjete prisutne u probavnom traktu, što je preduvjet za njihovu uporabu kao probiotičkog soja. Proces uključeni tijekom prilagodbe na stres kod *P. freudenreichii* su kodirani suvišnim kopijama gena (Falentin i sur., 2010a) što je u skladu s mogućnostima *P. freudenreichii* da se efikasnije prilagodi različitim uvjetima.

2.3. Uloga propionibakterija u formiranju arome sira

P. freudenreichii je glavna *Propionibacterium* vrsta koja se koristi u proizvodnji sira. Koristi se kod švicarskog tipa sira kod kojeg je odgovorna za dobivanje karakterističnih rupa zbog proizvodnje CO₂ koji se javlja tijekom rasta *P. freudenreichii*. No, značajna je jer *P. freudenreichii* ima glavnu ulogu i u formiranju arome švicarskog tipa sira. Komponente koje čine aromu proizvodi putem tri glavna puta: fermentacije laktata i aspartata, katabolizma aminokiselina i hidroliza masti (Thierry i sur., 2004). Mnoga svojstva ovise o soju. U Tablici 1 prikazani su primjeri fenotipskih obilježja *P. freudenreichii* značajna za proces dozrijevanja

sira. Sposobnost rasta i brze propionske fermentacije u siru jako variraju. Sposobnost preživljenja u uvjetima povećane koncentracije soli također ovisi o soju *P. freudenreichii* (Thierry i sur., 2011).

Tablica 1. Primjeri fenotipske bioraznolikosti povezani s primjenom *P. freudenreichii* tijekom dozrijevanja sira i kao probiotičkog soja (Preuzeto od Thierry i sur., 2011).

Cilj	Ekperimentalni uvjeti	Raspon
Nakupljanje trehaloze	Kemijski definiran medij, pH 7.0 i 30 °C, nakupljanje stanica tijekom srednje-eksponencijalne faze rasta	0 - 132 mg trehaloze/g staničnog proteina
Rezistencija na sol u siru	Švicarski tip sira sa 1, 2 i 3% soli u vlazi (S/V)	Potrošen laktat nakon 14 dana dozrijevanja u toploj sobi: 12 do 13 g/kg pri 1% S/V; 7 do 13 g/kg pri 2% S/V
Liza	Kalij fosfatni pufer, pH 6.2 24 h pri 37 °C. Kalij fosfatni pufer, pH 7.0 48 h pri 33 °C Uzorak autoliziranih enzima nakon renaturacije PAGE	Povećanje optičke gustoće: 24 na 96% Povećanje optičke gustoće: 24 na 62% Slični uzorci enzima
Metilmaslačne kiseline	Ementaler sir, 8 sojeva 40 sojeva raslo u laktat bujonu, pH 5.4, 21 g/L NaCl pri 24 °C	19 do 114 mg/kg sira 6 do 57 mg/L kulture supernatanta
Slobodne masne kiseline (SMK) iz lipolize	Ementaler sir, 5 sojeva Laktat bujon u prisutnosti emulzije od mliječne masti	1.8 do 5.2 mg SMK/kg sira Proizvodnja 0.8 do 3 mg SMK/kg masti
Aktivnost aspartaze	Inkubacija ekstrakta bez stanica (12 sojeva) u prisutnosti aspartaze – kvantifikacija proizvodnje fumarata	<0.5 - 35 mmol/min/mg proteina
Rast pri niskim temperaturama	Laktat bujon, pH 5.5, inkubiran pri 11 °C	<0.1 - 2.0 jedinice optičke gustoće (OD ₅₇₈) nakon 24 dana
Tolerancija na kiselinu i žuč	Kiselina + žuč	povećanje cfu od 0.5 do 4 log
Proizvodnja propionata	Medij koji simulira uvjete u GIT ljudi	0.4 do 1.4 g/L
Površinski polisaharidi	Agglutinacijski testovi (anti- <i>S. pneumoniae</i> ser 37 antiserum)	Pozitivno/negativno
IL-10 indukcija	ELISA na stimuliranim perifernim jednostaničnim krvnim stanicama	1500 do 5500 pg/mL

Fermentacijom laktata kod *P. freudenreichii* nastaje propionat, acetat (i CO₂), a obje se ove kiseline smatraju tvarima arome u siru. Metabolizam aspartata propionibakterija tijekom fermentacije laktata uzrokuje dodatnu proizvodnju CO₂. Ravnoteža produkata fermentacije *P. freudenreichii* ima važnu ulogu u dozrijevanju sira. Intenzitet metabolizma aspartata kod *P. freudenreichii* ovisi o soju. Sojevi s visokom sposobnošću metaboliziranja aspartata pokazuju veću brzinu fermentacije i proizvode više CO₂ po molu potošenog laktata (Wyder i sur., 2001). Također se mogu utjecati i na nepoželjnu kasniju fermentaciju u Ementaler siru, što rezultira stvaranjem proreza i pukotina. To se može dogoditi i tijekom zrenja švicarskog Ementaler sira koje traje nekoliko mjeseci pri temperaturi od 10 do 12 °C (Fröhlich-Wyder i Bachmann, 2004). Specifična aktivnost aspartaze (L-aspartat amonijačna-liaza) uspoređivana je u ekstraktima bez stanica 12 sojeva *P. freudenreichii*, a dobivene vrijednosti su varirale od manje od 0.5 do 35 mmol/min/mg proteina (Tablica 1).

P. freudenreichii katabolizira razgranate lance aminokiselina u razgranate lance hlapljivih tvari aroma. Glavne razgranate komponente koje *P. freudenreichii* proizvodi su 2-metilmaslačna kiselina i 3-metilmaslačna kiselina (stvarna izovalerijanska kiselina) koje nastaju razgradnjom izoleucina i leucina (Thierry i sur., 2011). Ove dvije kiseline važne su tvari arome u mnogim sirevima, a povezuju se sa tipičnim notama 'starih sireva' ili 'znojnih čarapa'. *P. freudenreichii* je presudna bakterijska vrsta za sintezu metilmaslačne kiseline u švicarskom siru (Thierry i sur., 2004). Proizvodnja metilmaslačnih kiseline kod *P. freudenreichii* je povezana sa sintezom dugolančanih masnih kiseline koje čine više od 80% stanične membrane masnih kiseline (Dherbécourt i sur., 2008b). Sinteza metilmaslačnih kiseline odvija se transaminacijom razgranatih lanaca aminokiselina što uzrokuje nastajanje ketokiseline koje se dalje prevode u kiseline oksidativnom dekarboksilacijom. Metilmaslačna kiselina se proizvodi i s kulturama *P. freudenreichii* koje rastu u optimalnoj podlozi i u siru. Odabir sojeva *P. freudenreichii* sa sposobnošću proizvodnje metilmaslačnih kiseline dao je slične rezultate u *in vitro* uvjetima i u švicarskom tipu sira.

Bakterija *P. freudenreichii* također ima značajnu ulogu tijekom lipolize sira Ementaler. Odgovorna je za skoro svo otpuštanje slobodnih masnih kiseline tijekom zrenja švicarskog sira (Dherbécourt i sur., 2010). Slobodne masne kiseline su važne tvari arome sireva. Lipolitička aktivnost *P. freudenreichii* ovisi o soju. Esteraze potencijalno uključene u lipolizu sira okarakterizirane u genomu *P. freudenreichii* (Dherbécourt i sur., 2008a). Transformirani mutanti koji pokazuju povećanu aktivnost ovog enzima pokazali su i nekoliko

puta veću lipolitičku aktivnost na mliječnoj masti nego sojevi divljeg tipa (Dherbécourt i sur., 2010). Ovi rezultati ukazuju kako ovaj enzim igra važnu ulogu u lipolizi sira.

P. freudenreichii ima vrlo nisku kazeinolitičku aktivnost. Posjeduje razne unutarstanične peptidaze, uključujući nekoliko enzima specifičnih za peptide koji sadrže prolin. *P. freudenreichii* ima ograničenu ulogu u sekundarnoj proteolizi sira u usporedbi s bakterijama mliječne kiseline jer stanice ne liziraju u siru ili samo kasnije (Tablica 1).

Razvoj komponenata arome zbiva se tijekom rasta *P. freudenreichii* u sirevima pri temperaturama oko 24 °C i nastavlja se tijekom skladištenja sireva pri nižim temperaturama kada se propionska fermentacija značajno usporava. Na primjer, oko 60% metilmaslačne kiseline iz katabolizma aminokiselina i 40% masnih kiselina iz lipolize se proizvode tijekom hladnijeg skladištenja eksperimentalnih švicarskih sireva, dok samo 20% propionske kiseline nastane tijekom istog perioda (Thierry i sur., 2005b). Nedavno je korištenjem kvantitativne reverzne transkripcije PCR (RT-qPCR) pokazano kako *P. freudenreichii* zadržava svoju aktivnost do kraja zrenja sira (Falentin i sur., 2010b). Sposobnost rasta pri nižim temperaturama ovisi o soju (Tablica 1). Ovo svojstvo, kao i visoka aktivnost aspartaze, je presudno za sposobnost sojeva *P. freudenreichii* koje se primjenjuju kao dodane kulture u švicarskim sirevima što bi omogućilo da ostanu dominantna populacija tijekom dužeg vremenskog perioda zrenja.

2.4. Probiotička svojstva *P. freudenreichii*

P. freudenreichii i *P. acidipropionici* se istražuju zbog potencijalnog probiotičkog učinka kod životinja i ljudi. Mliječne propionibakterije se istražuju zbog blagotvornog učinka na intestinalnu mikrobiotu i specifične metaboličke aktivnosti. Istražuje se i učinak *P. freudenreichii* na funkciju i fiziologiju crijeva.

Istraživan je i bifidogeni učinak odabranih sojeva *P. freudenreichii* u nezavisnim studijama na volonterima (Hojo i sur., 2002). Uočeno je da grupa volontera koji su konzumirali propionibakterije sadrže veći udio bifidobakterijske populacije u intestinalnoj mikrobioti. Aktivna tvar 1,4-dihidroksi-2-naftoinska kiselina (DHNA) je prisutna u propionibakterijskim supernatantima (Isawa i sur., 2002). Ta molekula je predzadnji intermedijer biosintetskog puta vitamina K₂. *P. freudenreichii* sintetizira vitamin K₂ (Falentin i sur., 2010a). DHNA se sintetizira iz 2-sukcinilbenzoil-CoA što katalizira naftoat sintaza te se izlučuje iz propionibakterije bez lize stanica. Pretpostavka je da DHNA i njezin derivat 2-

amino-3-karboksi-1,4-naftokvinon (ACNQ) služe kao elektron transportni medijatori za regeneraciju NADP u bifidobakterijama (Yamazaki i sur., 1999) i tako pospješuju rast bifidobakterija. Osim autohtone mikrobiote, metaboličkom aktivnost propionibakterija također doprinosi nastajanju korisnih metabolita.

P. freudenreichii također ima mogućnost proizvodnje korisne konjugirane linolne kiseline. Osim bioloških učinaka konjugirane linolne kiseline, obećavajuća su i antikancerogena svojstva rumeinske kiseline i cis-9-trans-11 stereoizomera. *P. freudenreichii* prevodi slobodnu linolnu kiselinu u rumeinsku kiselinu, a mehanizam stvaranja konjugirane linolne kiseline kod *P. freudenreichii* identificiran je označavanjem deuterijem i masenom spektrometrijom (McIntosh i sur., 2009). Geni koji kodiraju enzime koji sudjeluju u tom putu još nisu razjašnjeni i sposobnost *P. freudenreichii* da proizvodi značajan udio rumeinske kiseline *in situ* u fermentiranim proizvodima ili unutar crijevnog sadržaja potrebno je još istražiti.

Djelotvorna metabolička aktivnost mliječnih propionibakterija je uglavnom ograničena zbog prilagodbe stresnim uvjetima. *P. freudenreichii* se može prilagoditi na nepogodne uvjete bilo tijekom industrijskih procesa ili unutar probavnog trakta (Suomalainen i sur., 2008). Proteini za prilagodbu na stresne uvjete su posebno istraženi kod *P. freudenreichii* i prisutna je podudarnost unutar staničnih mehanizma uključenih u stresnim uvjetima, adaptaciji, detoksifikaciji i obnovi makromolekula (Falentin i sur., 2010a). Mogućnost prilagodbe i održavanja aktivnosti metabolizma unutar intestinalne mikrobiote ovisi o soju (Hervé i sur., 2007). (Tablica 1). To ilustrira značajnu fenotipsku bioraznolikost među sojevima. Unutar crijeva, odabrani sojevi su pokazali ekspresiju operona za transkarboksilazu specifičnog za propionsku fermentaciju i proizvodnju propionata. Propionat ima ulogu u modulaciji ravnoteže između proliferacije i apoptoze. Najobećavajući soj odabran u *in vivo* i *in vitro* uvjetima reducira proliferaciju uz istovremeno povećanje apoptoze epitelnih stanica crijeva štakora koji su mutirani karcinogenom dimetilhidrazinom (Lan i sur., 2008). Zanimljivo, prisutnost propionibakterija nije imala učinka na ove parametre kod zdravih štakora. Odgovarajući apoptotični mehanizam dobro je opisan *in vitro* na uzgojenim humanim karcinogenim stanicama crijeva i pokazano je da je pojačan u kiselom okruženju (Lan i sur., 2008). Ovo apoptotično svojstvo moglo bi se pokazati korisnim u kontekstu prevencije i/ili tretmana karcinoma debelog crijeva. Mogućnost *P. freudenreichii* da veže karcinogeni aflatoksin B-1 iz hrane *in vitro* je potvrđena u humanim kliničkim istraživanjima (El-Nezami i sur., 2006). Kronična izloženost volontera ovom karcinogenu je pokazala

smanjeno biološko i urinarno izlučivanje aflatoksina, kao rezultat konzumacije probiotika. Probiotik je sadržavao *Lactobacillus rhamnosus* i *P. freudenreichii*, a njihovu specifičnu ulogu teško je odrediti.

Pojedina istraživanja upućuju i na imunomodulacijske učinke mliječnih propionibakterija kod ljudi. Volonteri koji su konzumirali *P. freudenreichii* JS pokazali su smanjenu razinu CRP u serumu, što ukazuje na protuupalno djelovanje (Kekkonen i sur., 2008). Imunomodulacijsko djelovanje je također ovisno o soju propionibakterije (Foligné i sur., 2010). Odabrani sojevi inducirali su visoke koncentracije regulatornih protuupalnih citokina u ljudskim perifernim krvnim mononuklearnim stanicama (engl. PBMCs) i bili su efikasni kod miševa s upalom debelog crijeva. Površinski antigeni propionibakterija imaju ključnu ulogu u takvoj modulaciji (Foligné i sur., 2010). To je u skladu s prijašnjim istraživanjima koja pokazuju imunomodulacijska svojstva *P. freudenreichii* soja JS (Kekkonen i sur., 2008).

Antimikrobna aktivnost *P. freudenreichii* protiv patogene bakterije *Helicobacter pylori* također je nedavno istražena. *In vitro*, *P. freudenreichii* smanjuje adheziju *H. pylori* na stanice crijeva i istjecanje sadržaja stanične membrane koje je inducirano djelovanjem *H. pylori* (Myllyluoma i sur., 2008). Inhibira otpuštanje induciranih *H. pylori* IL-8 i PGE2 stanica crijeva. U kliničkim ispitivanjima, nadopuna smjesom probiotika koja sadrži *P. freudenreichii* poboljšala je toleranciju na tretmane infekcije *H. pylori* (Myllyluoma i sur., 2007a) što je dovelo do poboljšanja želučane sluznice kod inficiranih pacijenta (Myllyluoma i sur., 2007b). Bifidogeni stimulator rasta DHNA kojeg proizvodi *P. freudenreichii* inhibirao je rast *H. pylori* inhibirajući staničnu respiraciju (Nagata i sur., 2010). Ova istraživanja ukazuju da *P. freudenreichii* može biti korisna u suzbijanju *H. pylori*.

Neke mliječne propionibakterije također mogu sintetizirati antifungalne i antikvasne spojeve te pokazuju potencijal kao mogući biokonzervansi u hrani (Ho i sur., 2009). *P. freudenreichii* izlučuje i bateriocine poput antimikrobnih peptida (PAMP antimikrobni peptid i propionicini T1 i F) (Faye i sur., 2010). U *P. jensenii*, nekoliko antimikrobnih organskih kiselina koji djeluju sinergistički su nedavno identificirane, uključujući ne samo octenu, propionsku, jantarnu i mliječnu kiselinu, već i 2-pirolidon-5-karboksilnu kiselinu, 3-fenilmliječnu kiselinu, hidroksifenil mliječnu kiselinu i 3-fenilmliječnu kiselinu (Schwenninger i sur., 2008).

3. Eksperimentalni dio

3.1. Materijali

3.1.1. Mikroorganizmi

Pri izradi eksperimentalnog dijela ovog diplomskog rada korišteni su bakterijski sojevi:

- *Propionibacterium freudenreichii* NRLL B-3523
- *Propionibacterium freudenreichii* ATCC 9614
- *Propionibacterium freudenreichii* PM 54
- *Propionibacterium freudenreichii* mješovita kultura

Ispitivanje antimikrobnog djelovanja četiri različita bakterijska soja *Propionibacterium freudenreichii* provedeno je s test-mikroorganizmima: *Staphylococcus aureus* 3048, *Staphylococcus aureus* K-144, *Escherichia coli* 3014, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FP1, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 i *Bacillus cereus* TM2. Navedene bakterijske kulture dio su Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (ZBMK). Svi test-mikroorganizmi su čuvani pri -80 °C u hranjivom bujonu uz dodatak 15% (v/v) glicerola. Neposredno prije izvođenja eksperimenta, sojevi su inokulirani u svježju tekuću hranjivu podlogu te inkubirani prekononočno pri optimalnoj temperaturi rasta.

3.1.2. Hranjive podloge za čuvanje i uzgoj mikroorganizama

Za čuvanje i uzgoj sojeva *P. freudenreichii* korištene su hranjive podloge čiji je sastav prikazan u Tablici 2.

Tablica 2. Sastav hranjivih podloga korištenih za čuvanje i uzgoj *P. freudenreichii*.

Tekući medij VG1 (g/L)	Kruti medij S2A (g/L)
50 % Na-laktat 20	Sirutka u prahu 50
Kvašćev ekstrakt 20	Kvašćev ekstrakt 10
Podesiti pH 7.2, autoklavirati 45 min pri 121 °C	CoCl ₂ 0.01 (dodati nakon autoklavanja)
Autoklavirati 45 min pri 121 °C	Ca-pantotenat 0.02 (dodati nakon autoklavanja)
	Podesiti pH 7.2 (prije autoklavanja npr s 3 M NaOH)
	Tehnički agar 20
	Autoklavirati 20 min pri 121 °C

Hranjive podloge za čuvanje i održavanje test mikroorganizama:

- hranjivi agar, sastava (g/L destilirane vode): pepton 15 g/L; mesni ekstrakt 3 g/L; NaCl 5 g/L; kalijev fosfat 0,3 g/L; agar 18 g/L. pH podloge je 7,3, a sterilizacija se provodi pri 121 °C tijekom 15 minuta.
- hranjivi bujon je jednakog sastava kao hranjivi agar, ali bez dodatka agara.

3.1.3. Kemikalije

U ovom radu korištene su slijedeće kemikalije:

- etanol, „Kemika“, Hrvatska
- natrijev klorid, „Kemika“, Hrvatska
- natrijev hidroksid, „Kemika“, Hrvatska
- pepsin (P-700), „Sigma“, SAD
- goveđa žuč (oxgall), „Difco“, SAD
- pankreatin (165 U/mg) iz svinjske gušterače, „BioChemika“, Fluka, Švicarska
- fosfatni pufer, „Kemika“, Hrvatska
- kalijev acetat, „Kemika“, Hrvatska
- sumporna kiselina, „Kemika“, Hrvatska
- ledena octena kiselina, „Kemika“, Hrvatska
- kloridna kiselina, „Kemika“, Hrvatska
- Tween 20, „Sigma“, SAD
- etil-acetat, „Kemika“, Hrvatska
- natrijev taurodeoksikolat, „Sigma“, SAD
- laktoza
- obrano mlijeko u prahu, „Dukat“, Hrvatska
- sirutka
- fenilmetilsulfonil fluorid, „Sigma-Aldrich“, SAD
- kristal violet, „Darmstadt“, Njemačka
- standard proteina niskih molekulskih masa

3.1.4. Aparatura i pribor

U ovom radu korištene su slijedeće aparature i pribor:

- autoklav, „Sutjeska“, Jugoslavija
- pH-metar, „Metrohm“, Švicarska
- termostat, „Instrumentarija“, Hrvatska
- vodena kupelj, „Sutjeska“, Jugoslavija
- vibro-mješač EV-100, „Kartell“, Italija
- vaga, „Tehtnica“, Slovenija
- centrifuga CENTAUR 2, „Sanyo“, Engleska
- centrifuga Centric, „Tehtnica“, Slovenija
- čitač mikrotitarskih pločica LKB 5060-006, „GDV“, Italija
- denzimater, „BioMerieux“, Francuska
- magnetska miješalica, „Tehtnica“, Slovenija
- Petrijeve zdjelice
- Anaerocult®, „Merck“, Njemačka
- automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- mikrotitarske ploče ravnog dna s 96 jažica, „Nunc“, Danska

3.2. Metode rada

3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama

Sojevi *P. freudenreichii* čuvani su na -80 °C u VG1 tekućoj podlozi s 15 % (v/v) glicerola, a test-mikroorganizmi su čuvani na -80 °C u hranjivom bujonu s 15 % (v/v) glicerola.

3.2.2. Određivanje pH vrijednosti, stupnja kiselosti i postotka proizvedene kiseline

Supernatantu, dobivenom centrifugiranjem 4 dana inkubiranih bakterijskih kultura *P. freudenreichii*, se izmjeri pH vrijednost te se 1 mL supernatanta razrijedi s 19 mL destilirane vode u Erlenmeyerovoj tikvici od 100 mL. Razrijeđeni uzorak se titrira s 0,1 M NaOH uz fenolftalein kao indikator, do pojave blijedo ružičaste boje. Broj mililitara 0,1 M NaOH utrošenih za neutralizaciju, pomnožen s dva predstavlja kiselost u stupnjevima Soxhlet-Henkela (°SH).

$$^{\circ}SH = a \times 20 \times f_{NaOH} \cdot 2$$

$$\% \text{ proizvedene kiseline} = ^{\circ}SH \cdot 0,0225$$

a = mL 0,1 M NaOH

(1°SH ~ 0,0225 g kiseline (%))

3.2.3. Priprema ekstrakta ukupnih staničnih proteina

Bakterijske kulture *P. freudenreichii* inokulirane su u 10 mL VG1 tekuće hranjive podloge i inkubirane pri 37 °C tijekom 4 - 5 dana. Zatim su kulture bakterijskih centrifugirane su pri 9 000 g tijekom 15 min. Slijedilo je ispiranje biomase stanica dva puta sa 0,9 %-tnom sterilnom otopinom natrijeva klorida. Bakterijske stanice su nakon toga mehanički razbijene tako što je u mikroepruvete s bakterijskim stanicama dodano 1 g staklenih kuglica, (r = 2 mm, VidraFOC), a zatim je suspenzija miješana na vibromješaču tijekom 4 min i to naizmjenično 30 s uz miješanje, 30 s hlađenjem u ledu, pri maksimalnoj brzini. Određena je koncentracija proteina u supernatantima. U suspenziju je dodano 1 mL otopine SDS-a (0,0625 M Tris-HCL, pH 6,8; 2 % (w/v) SDS; 10 % (v/v) glicerol). Uzorci su prokuhani 10 min, a potom ohlađeni u ledu i centrifugirani na 9 000 g, 15 min te je provedena SDS-poliakrilamid gel elektroforeza.

3.2.3.1. SDS-PAGE ukupnih staničnih proteina

Ekstrakti ukupnih staničnih proteina razdvojeni su pomoću SDS-PAGE prema metodi opisanoj po Laemmli (1970.). U 15 µL svakog od priređenih uzoraka dodano je 5 µL reducirajućeg reagensa te su prokuhani 2 - 3 min. Nakon kuhanja ukupni volumen uzorka je nanesen na poliakrilamidni gel. SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza (4 % gel za sabijanje i 12 % gel za razdvajanje) se provodi u kadici za elektroforezu pri konstantnom naponu od 200 V kroz 45 min. Nakon završene elektroforeze, gel se boji u 0,1 %-tnom metilenskom modrilu R-250 s 50 % metanola i 7 % octene kiseline kroz najmanje 3 sata. Nakon bojanja, gel je odbojavan u 7 %-tnoj octenoj kiselini. SDS-PAGE proteinski gel je skeniran (Scanjet 3800; Hewlett Packard, CA, SAD) te je slika spremljena u TIFF formatu.

3.2.4. Određivanje tolerancije *P. freudenreichii* na žučne soli

Tolerancija *P. freudenreichii* sojeva na žučne soli je ispitana na dva načina. Prvom metodom se 5 dana stari bakterijski sojevi inokuliraju u mikrotitarske pločice s 96 jažica koje sadrže 200 µL VG1+0.3% ili VG1+0.6% konjugiranih žučnih soli natrija u tri paralele. Rast inokuliranih sojeva se prati kroz 6 sati mjerenjem optičke gustoće pri 620 nm (OD₆₂₀). Rast *P.*

freudenreichii sojeva u VG1 tekućoj hranjivoj podlozi je kontrola rasta. Drugom metodom se prati rast *P. freudenreichii* sojeva u 5 mL tri prethodno navedena tekuća medija. Svaki sat vremena se mjeri OD₆₂₀ te određuje broj poraslih bakterijskih kolonija (CFU/ml) na S2A agaru u anaerobnim uvjetima pri 37 °C nakon 96 sati inkubacije.

3.2.5. Preživljavanje *P. freudenreichii* u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta

3.2.5.1. Priprava simuliranoga želučanog soka i simuliranoga soka tankog crijeva

Simulirani želučani sok je pripremljen suspendiranjem pepsina (3 g/L) u 0,5 %-tnoj otopini natrijevog klorida, kojoj je pH podešen na 2,0 s koncentriranom klorovodičnom kiselinom. Simulirani sok tankoga crijeva je pripremljen suspendiranjem pankreatina (1 g/L), samog ili/i žučnih soli (3,0 mg/mL goveđe žuči) u 0,5 %-tnoj otopini natrijeva klorida, kojoj je pH podešen na 8,0 s natrijevom lužinom (Kos, 2001).

3.2.5.2. Učinak simuliranog želučanog soka i soka tankoga crijeva na preživljavanje *P. freudenreichii*

Suspencije stanica odabranih bakterijskih kultura *P. freudenreichii* su izložene djelovanju želučanog soka (pH = 2) 2 sata, a zatim su centrifugirane pri 3500 o/min i resuspendirane u simuliranom soku tankoga crijeva (3 mg/mL goveđe žuči) tijekom 3 sata (Kos, 2001). Broj poraslih živih stanica određivan je indirektnom metodom.

3.2.6. Priprava supernatanta *P. freudenreichii* za određivanje antibakterijske aktivnosti

Prekonoćne kulture *P. freudenreichii* sojeva su centrifugirane pri 9000 o/min tijekom 5 minuta te je dobiveni supernatant korišten za ispitivanje antibakterijske aktivnosti turbidimetrijskom metodom (3.2.8.).

3.2.7. Turbidimetrijska metoda za određivanje antimikrobnog djelovanja *P. freudenreichii*

U jažice mikrotitarske pločice dodano je 100 µL supernatanta ispitivane bakterijske kulture *P. freudenreichii* i 10 µL prekonoćne kulture pojedinog test-mikroorganizma

razrijeđene u 90 μL hranjivog bujona. Antibakterijsko djelovanje ispitivane bakterijske kulture prema test-mikroorganizmima tijekom 24 sata uzgoja pri 37 °C određeno je spektrofotometrijskim mjerenjem prividne apsorbancije pri valnoj duljini 620 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica. Razlika u prividnoj apsorbanciji kontrole (nacijepljen hranjivi bujon bez dodanog supernatanta ispitivane bakterije) i uzoraka s dodanim supernatantom mjera je inhibicije rasta test-mikroorganizma. Apsorbancija VG1 hranjive podloge predstavlja slijepu probu.

3.2.8. *In vitro* adhezija *P. freudenreichii* na proteine ekstracelularnog matriksa

Adhezija bakterijskih stanica *P. freudenreichii* na imobilizirani humani fibronektin (Sigma) je provedena s Polysorp mikrotitarskim pločama ravnog dna s 96 jažica (Nunc, Danska), nakon 4 - 5 dana uzgoja bakterijskih sojeva pri optimalnim uvjetima inkubacije. Mikrotitarske ploče su presvučene s 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fibronektina (laminina ili kolagena) u karbonatnom/bikarbonatnom puferu 50 mmol/L, pH 9,6, nakon čega je sadržaj jažica mikrotitarskih ploča ispran tri puta s fosfatnim puferom, a zatim tijekom 1 h inkubiran s 1 % otopina Tween 20 u fosfatnom puferu. 100 μL bakterijske suspenzije pojedinog *Propionibacterium* soja je dodano u jažicu mikrotitarske pločice (prethodno je podešena vrijednost gustoće bakterijskih stanica na $\text{OD}_{620\text{nm}}$ na 1,0) te je slijedila inkubacija bakterijskih stanica s fibronektinom, odnosno kolagenom ili lamininom u mikrotitarskim pločicama tijekom 24 sata pri 4 °C. Nakon uklanjanja bakterijskih stanica koje se nisu adhezirale, trostrukim ispiranjem s 200 μL fosfatnog pufera koji sadrži Tween 20, mikrotitarske ploče su osušene pri sobnoj temperaturi (tijekom cca. 1 h) te su adhezirane bakterijske stanice obojane s kristal violetom (1 mg/mL tijekom 45 min, pH 4,0) i očitana je apsorbancija pri 620 nm u čitaču mikrotitarskih ploča LKB 5060-006 („GDV“, Rim, Italija).

Učinak tretmana bakterijskih stanica s proteinazom na njihovu adheziju *in vitro* ispitan je inkubiranjem bakterijskih stanica sojeva *P. freudenreichii* ($\text{OD}_{620\text{nm}}$ od 1,0) sa 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ proteinaze K (Roche) pri 37 °C tijekom 1 h. Nakon inkubacije, aktivnost proteinaze K je inaktivirana dodatkom 1 mmol/L fenilmetilsulfonil fluorida. Bakterijske stanice su bile resuspendirane u fosfatnom puferu ($\text{OD}_{620\text{nm}}$ od 1,0) i korištene za testove adhezije. Kao kontrola poslužile su bakterijske stanice koje su bile tretirane na isti način kao što je prethodno opisano, uz iznimku dodatka proteinaze K. Prazne jažice koje ne sadrže vezani fibronektin su korištene kao kontrole u svim eksperimentima i njihove vrijednosti

apsorbancije su oduzete od vrijednosti očitane u jažicama koje sadrže fibronektin. Svi eksperimenti su ponovljeni tri puta kako bi se izračunala srednja vrijednost i standardna devijacija.

3.2.9. *In vitro* adhezija *P. freudenreichii* na protein mucin

Ispitivanje vezanja bakterijskih stanica *P. freudenreichii* na imobilizirani mucin je provedeno na mikrotitarskim pločicama s 96 jažica. U jažice mikrotitarskih pločica se prethodno, dakle prije dodatka suspenzija bakterijskih stanica, dodani glikoprotein mucin u koncentraciji od 50 µg/mL u karbonantnom/bikarbonantnom puferu (50 mmol/L, pH 9,6) te je slijedila inkubacija preko noći pri 4 °C. Potom se jažice isperu tri puta s fosfatnim puferom te se provodi imobilizacija mucina tijekom sat vremena dodatkom 1 %-tne otopine Tween 20 u fosfatnom puferu. 100 µL suspenzije svakog soja, kojoj je podešena OD₆₂₀ na 1 u fosfatnom puferu, se doda u svaku jažicu mikrotitarske pločice koje se zatim inkubiraju preko noći pri 37 °C. Nakon uklanjanja neadsorbiranih odnosno nevezanih stanica (tri uzastopna ispiranja s 200 µL 0.05% Tween 20 u fosfatnom puferu) mikrotitarske pločice se suše pri sobnoj temperaturi i vezane (adhezirane) stanice se detektiraju bojanjem kristal violetom. Potom se sadržaj jažica mikrotitarske pločice ispere s 100 µL citratnog pufera (50 mmol/L, pH 4,0) i određuje se adsorbancija na čitaču mikrotitarskih pločica LKB 5060-006, „GDV“ pri 620 nm.

Također je ispitana i *in vitro* adhezija propionibakterijskih sojeva na mikrotitarskim pločicama s 96 jažica koje ne sadrže vezani mucin kao kontrola u svim eksperimentima. Eksperimenti su ponovljeni tri puta kako bi se izračunala srednja vrijednost i standardna devijacija.

3.2.10. Priprema *P. freudenreichii* za liofilizaciju

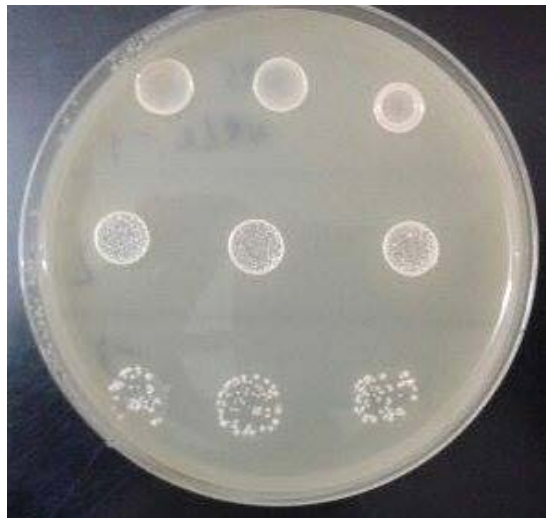
4 odabrana soja *P. freudenreichii* su inokulirani u 5 mL VG1 tekuće hranjive podloge te inkubirani 4 dana pri optimalnim uvjetima rasta. Nakon toga kulture bakterijskih stanica su centrifugirane pri 3300 okretaja/10 min kako bi se uklonio višak hranjive podloge, a biomasa stanica je potom isprana sterilnom destiliranom vodom 2 puta. Biomasa stanica svakog pojedinog soja je resuspendirana u 1 mL fiziološke otopine (0,9 % NaCl). S ciljem ispitivanja zaštitnog učinka različitih lioprotektanata, priređene su suspenzije biomase bakterijskih stanica svakog pojedinog *P. freudenreichii* soja u tri različite otopine, u obranom mlijeku,

sirutki (5 % m/v) i laktozi (5 % m/v) kako bi se usporedili njihovi zaštitni učinci nakon procesa liofilizacije, dok su suspenzije bakterijskih stanica u fosfatnom puferu pH 7,2 poslužile kao kontrolni uzorak.

Tako priređene suspenzije bakterijskih stanica zamrznute su pri -20 °C preko noći, a zatim su liofilizirane tijekom 18 sati u liofilizatoru (model Christ Alpha 1-2 LD plus, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH). Broj živih bakterijskih stanica (CFU ml⁻¹) određen je, prije i nakon liofilizacije, indirektnom metodom kako je opisano u poglavlju 3.2.12. *Određivanje broja živih mikroorganizama indirektnom metodom.*

3.2.11. Određivanje broja živih mikroorganizama indirektnom metodom

Iz uzorka koji sadrži bakterijske stanice priređena su odgovarajuća decimalna razrjeđenja u sterilnoj destiliranoj vodi te je potom S2A hranjiva podloga u Petrijevoj zdjelici naciepljena sa 10 µL odgovarajućeg decimalnog razrjeđenja u tri paralele, kao što je prikazano na Slici 2. te su naciepljeni hranjivi agari inkubirani pri optimalnim uvjetima rasta sojeva.



Slika 2. Bakterijske kolonije *P. freudenreichii* ATCC 9614 porasle na S2A hranjivom agaru nakon inkubacije u anaerobnim uvjetima pri 37 °C tijekom 4 dana.

4. Rezultati

Osim primjene za proizvodnju biotehnoški specifičnih proizvoda, sojevi *P. freudenreichii* se sve intenzivnije istražuju kao probiotici. Bakterije iz roda *Propionibacterium* se odlikuju s nekoliko metaboličkih funkcija koje mogu doprinijeti mogućoj probiotičkoj aktivnosti ovih bakterija, poput sinteze bakteriocina i vitamina B12. Štoviše, glavni proizvod metabolizma propionbakterija, propionat, može poboljšati apsorpciju kalcija i željeza u GIT čovjeka, a prema istraživanjima ima moguću ulogu u induciranju apoptoze kancerogenih stanica *in vitro* (Suomalainen i sur., 2008). Upravo zato je određen postotak proizvedene kiseline u supernatantima kulture svakoj pojedinog soja *P. freudenreichii*, kako bi se ustanovilo da li zakiseljavaju tekuću hranjivu podlogu nakon inkubacije bakterijskih stanica do stacionarne faze rasta pri optimalnim uvjetima (4-5 dana, anaerobno pri 37 °C). U Tablici 3 prikazan je postotak proizvedene kiseline izračunat na temelju volumena natrijeve lužine utrošene za titraciju supernatanta bakterijskih kultura 4 soja *P. freudenreichii* nakon uzgoja u VG1 hranjivoj tekućoj podlozi. Za svaki bakterijski soj provedena su tri paralelna mjerenja kako bi se izračunala srednja vrijednost te se iz dobivenih rezultata može zaključiti kako svi navedeni sojevi uspješno zakiseljavaju hranjivu podlogu te proizvode sličnu količinu kiseline, izraženu u postocima ($0,75 \pm 0,15$ do $0,81 \pm 0,19$).

U Tablici 4 prikazane su pH-vrijednosti određene u supernatantu kulture 4 različita soja *P. freudenreichii*. Na temelju izmjerenih pH-vrijednosti međusobnom usporedbom rezultata za četiri različita soja može se zaključiti da supernatant bakterijskog soja *P. freudenreichii* ATCC 9614 ima najnižu pH-vrijednost (6,11), a supernatant mješovite kulture *P. freudenreichii* najvišu pH-vrijednost (6,26). Početna pH-vrijednost medija VG1 korištenog za uzgoj bakterijskih stanica je bila 7,07, a MRS medija 5,68.

Zatim su priređeni ekstrakti ukupnih topljivih staničnih proteina pojedinih bakterijskih kultura *P. freudenreichii*, koji su razdvojeni SDS-poliakrilamid gel elektroforezom, kako bi se procijenila bioraznolikost četiri soja, a rezultati analize prikazani su na Slici 3.

Mliječne propionibakterije mogu pokazivati probiotička svojstva za što je, prema definiciji probiotika, potreban visoki broj živih i metabolički aktivnih bakterijskih stanica u GIT čovjeka. U GIT su prisutni nepovoljni uvjeti, poput niskih pH vrijednosti, brzog protoka odnosno peristaltike, različitih probavnih enzima i visokih koncentracija toksičnih žučnih soli (Šušković i sur., 2009). Da bi iskazali svoje funkcionalne učinke na zdravlje domaćina, probiotički sojevi moraju preživjeti te prisutne nepovoljne uvjete. Stoga je u ovom diplomskom radu ispitana toleranciju 4 različita soja *P. freudenreichii* na žučne soli, jer je to karakteristika koja može upućivati na mogućnost adaptacije bakterijskih sojeva na uvjete GIT.

Na Slici 4 prikazane su krivulje rasta bakterijskih kultura *P. freudenreichii* tijekom 6 sati pri tri različite koncentracije konjugiranih žučnih soli natrija: 0,3 %, 0,6 % i 1,5 %, određivanjem optičke gustoće pri 620 nm svaki sat vremena. Rezultati su u skladu s očekivanjima jer je kod većine bakterijskih sojeva *P. freudenreichii* uočen gotovo porast biomase stanica tijekom vremena, što ukazuje na dobro podnošenje odabranih koncentracija žučne soli. Svi bakterijski sojevi najbolje podnose najnižu koncentraciju žučne soli od 0,3 % te se s povećanjem koncentracije na 0,6 %, odnosno na 1,5 %, preživljavanje sojeva smanjuje, a pri 1,5 % je potrebno neko vrijeme prilagodbe na novonastale uvjete, povećanja koncentracije žučnih soli, prije sinteze biomase stanica. Najuspješniji rast pokazao je soj *P. freudenreichii* NRLL B-3523, a najslabiji soj *P. freudenreichii* ATCC 9614.

Osjetljivost *P. freudenreichii* sojeva na niske pH vrijednosti i enzime probavnog trakta, ispitana je izlaganjem njihovih bakterijskih stanica simuliranim uvjetima GIT trakta. Priređeni su simulirani želučani sok i sok tankoga crijeva te je ispitan njihov učinak na preživljavanje 4 različita soja *P. freudenreichii*, tako što smo odabrane sojeve izložili djelovanju prethodno pripremljenom želučanom soku i soku tankog crijeva kroz sveukupno 5 sati. Slika 5 pokazuje broj preživjelih stanica (logCFU/mL) u ovisnosti o vremenu. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti kako je tijekom vremena kod svih bakterijskih sojeva *P. freudenreichii* rast inhibiran simuliranim uvjetima GIT. Koncentracija bakterijskih stanica sojeva *P. freudenreichii* ATCC 9614 i *P. freudenreichii* PM 54 nakon trećeg sata naglo opada, dok je koncentracija bakterijskih stanica sojeva *P. freudenreichii* NRLL B-3523 i *P. freudenreichii* mješovite kulture nakon drugog sata počela opadati, ali se ustalila nakon četvrtog sata što pokazuje potencijal za daljnju uporabu kao probiotičkih sojeva. U šestom satu, broj živih bakterijskih stanica *P. freudenreichii* soja NRLL B-3523 iznosio je 8,35 logCFU/mL, soja mješovite kulture 8,0 logCFU/mL, soja PM 54 7,40 logCFU/mL, a soja ATCC 9614 6,40 logCFU/mL. Ovo su visoke vrijednosti te zadovoljavaju kriterij postavljen za probiotičke sojeve, prema kojem je minimalna preporučena doza bakterijskih stanica, potrebna za iskazivanje poželjnih učinaka na zdravlje domaćina, iznosi 10^6 CFU/mL u proizvodu. Na početku izloženosti djelovanju želučanog soka i soka tankog crijeva kod svih je sojeva *P. freudenreichii* zabilježen blagi porast koncentracije živih stanica. Ovaj rad je pokazao uspješno *in vitro* preživljenje sojeva *P. freudenreichii* u uvjetima GIT.

Antimikrobno djelovanje prema nepoželjnim i patogenim mikroorganizmima je poželjno svojstvo probiotičkih bakterija (Šušković i sur., 2010). Ispitivanje antimikrobnog djelovanja četiri različita bakterijska soja *P. freudenreichii* provedeno je s test-

mikroorganizmima: *Staphylococcus aureus* 3048, *Staphylococcus aureus* K-144, *Escherichia coli* 3014, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FP1, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 i *Bacillus cereus* TM2. Cilj je ustanoviti da li će odabrani sojevi *P. freudenreichii* pokazati antibakterijsko djelovanje prema navedenim test-mikroorganizmima. Prema rezultatima, određeni postotak supernatanta ispitivane bakterijske kulture *P. freudenreichii* inhibira rast svih test-mikroorganizama. 75 %-tni ili 100%-tni supernatant kulture svih odabranih sojeva *P. freudenreichii* iskazuju najveću inhibiciju rasta *Staphylococcus aureus* 3048 što je u skladu s očekivanjima (Slika 6). Već pri 50 %-tnom dodatku supernatanta kulture sojeva *P. freudenreichii* NRLL B-3523 i *P. freudenreichii* ATCC 9614, najveću inhibiciju rasta pokazuje test-mikroorganizam *Staphylococcus aureus* K-144 (Slika 7). Pri 50 %-tnom dodatku supernatanta kulture soja *P. freudenreichii* PM 54, najveću inhibiciju rasta pokazuje test-mikroorganizam *Bacillus subtilis* ATCC 6633, dok s druge strane navedeni test-mikroorganizam najveći prirast biomase bilježi pri 50 %-tnom dodatku supernatanta kulture soja *P. freudenreichii* mješovita kultura (Slika 10). 75 %-tni supernatant soja *P. freudenreichii* NRLL B-3523 pokazuje najveću inhibiciju rasta test-mikroorganizma. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FP1, dok je inhibicija rasta spomenutog mikroorganizma najmanja pri 75 %-tnom dodatku supernatanta kulture soja *P. freudenreichii* PM 54 (Slika 8). Pri 25 %-tnom dodatku supernatanta svih odabranih sojeva *P. freudenreichii* test-mikroorganizam *Bacillus cereus* TM2 dobro podnosi njihovu prisutnost jer pokazuje veći prirast biomase nego kontrolni uzorak, što bi moglo značiti da prevlada u navedenoj mikrobnoj zajednici (Slika 9). 25 %-tni supernatant kulture soja *P. freudenreichii* NRLL B-3523, najmanju inhibiciju pokazuje i test-mikroorganizam *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Test-mikroorganizam *Escherichia coli* 3014 podložan je inhibitornom djelovanju svih odabranih sojeva *P. freudenreichii* pri različitim razrjeđenjima supernatanta kultura (Slika 11).

Osim preživljavanja u uvjetima GIT, poželjno svojstvo probiotičkih sojeva je i kolonizacija, kojoj doprinosi adhezija na intestinalne epitelne stanice. Stoga je ispitana mogućnost adhezije bakterijskih stanica *P. freudenreichii* na proteine ekstracelularnog matriksa te na protein sluznice, mucin *in vitro*. Na Slici 12 prikazana je *in vitro* adhezija 4 različita soja *P. freudenreichii* na proteine ekstracelularnog matriksa: kolagen, fibronektin i laminin te na protein sluznice, mucin. Mucini su glikoproteini sluznice i dio su dinamičnog, interaktivnog obrambenog sustava sluznice GIT, gdje su prisutni na površini te predstavljaju mukozalnu barijeru između lumena i intestinalnih epitelnih stanica. Dobiveni rezultati ukazuju da svi sojevi *P. freudenreichii* pokazuju najbolju adheziju na protein sluznice, mucin.

Mogućnost adhezije odabranih bakterijskih sojeva također je moguća na ispitivane proteine ekstracelularnog matriksa, ali je ona nešto manja u odnosu na protein sluznice.

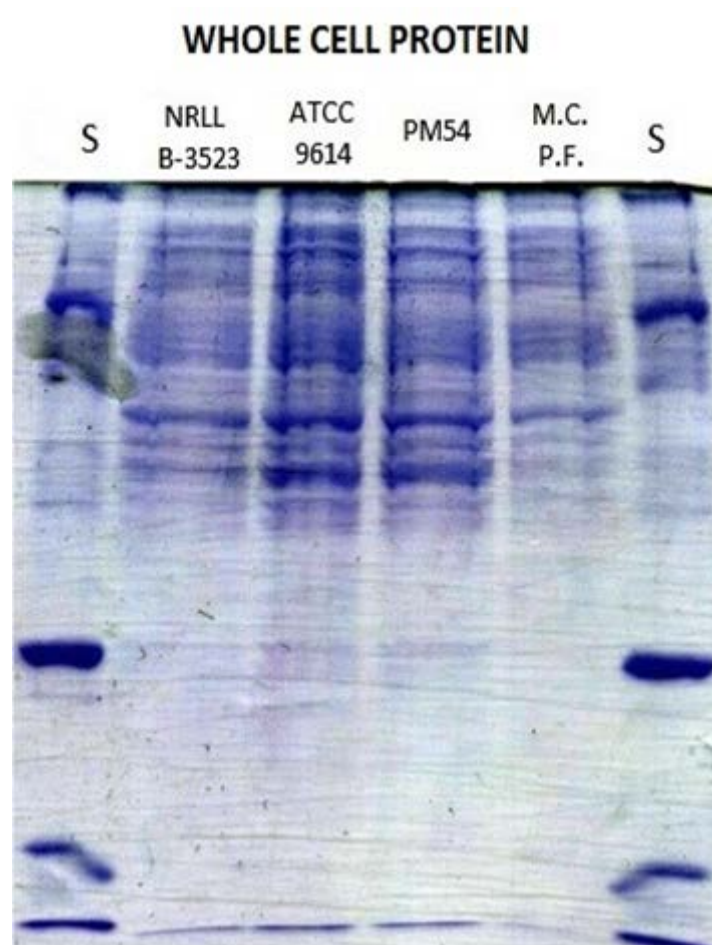
Kako se probiotički pripravci većinom priređuju u obliku koncentriranih liofiliziranih bakterijskih kultura provedena je liofilizacija 4 različita soja *P. freudenreichii*. Pri tome su biomase stanica svakog od četiri bakterijska soja liofilizirane u tri različita lioprotektora, kako bi se usporedio njihov zaštitni učinak s krajnim ciljem optimiranja biotehnoške proizvodnje liofiliziranih probiotičkih kultura. Kao lioprotektanti su korištene otopine sirutke (5 % m/v), obranog mlijeka i laktoze (5 % m/v), a suspenzija bakterijskih stanica u fosfatnom puferu je poslužila kao kontrolni uzorak (Slika 13). Zatim je određen broj živih bakterijskih stanica (CFU ml⁻¹) odabranih sojeva prije i nakon procesa liofilizacije. U Tablici 5 dan je prikaz broja živih bakterijskih stanica (logCFU/mL) 4 različita soja *P. freudenreichii* određen prije i nakon liofilizacije te stopa smrtnosti određena za svaki od tri različita lioprotektanata te u fosfatnom puferu. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti kako najbolje preživljavanje pokazuju bakterijske stanice uz dodatak šećera laktoze kao lioprotektora. Najmanja vrijednost smrtnost je određena kod soja *P. freudenreichii* PM 54 nakon liofilizacije u laktozi.

Tablica 3. Postotak kiseline određen titracijom supernatanta iz bakterijskih kultura 4 različita soja *P. freudenreichii*.

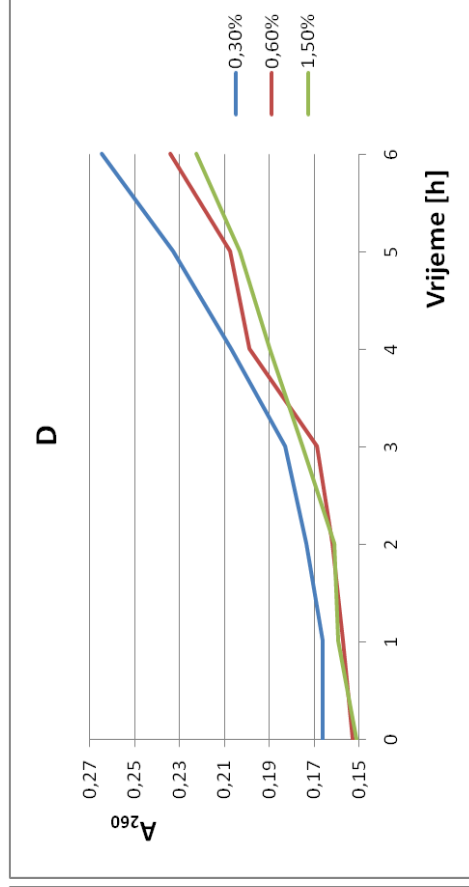
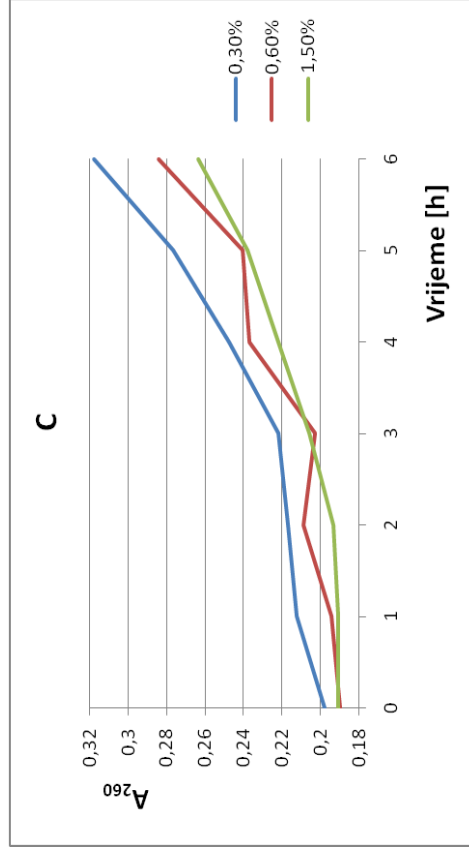
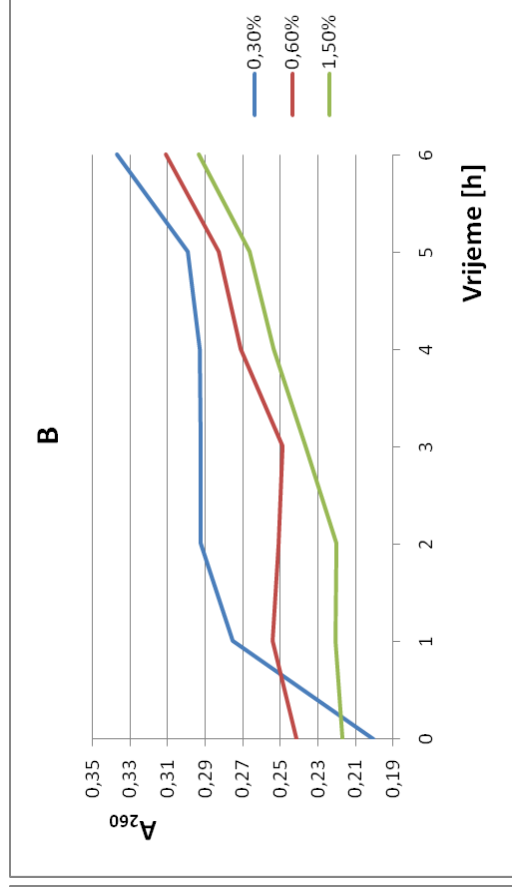
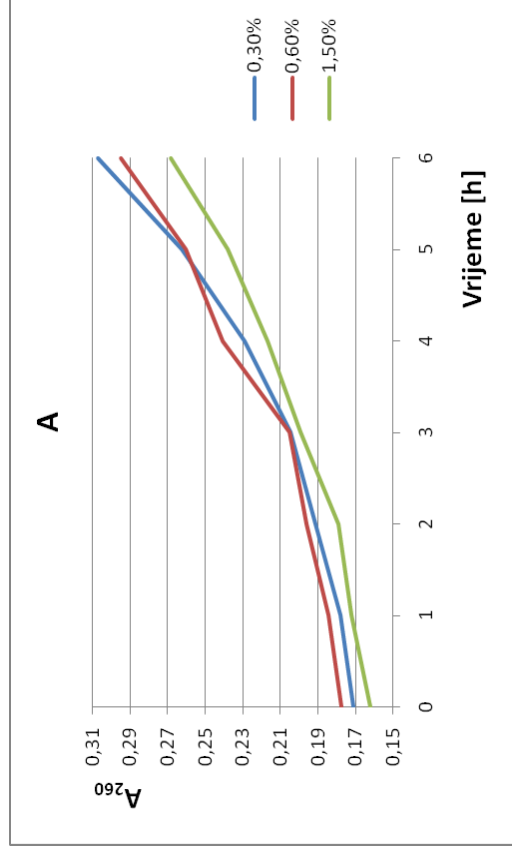
Kiselina (%)						
Soj	VG1 1	VG1 2	VG1 3	Srednja vrijednost 3 mjerenja	st. dev. VG1	MRS
NRL B-3523	0,54	0,99	0,90	0,81	0,19	3,96
ATCC 9614	0,54	0,81	0,90	0,75	0,15	1,08
PM 54	0,72	0,72	0,99	0,81	0,13	1,26
Mješovita kultura	0,72	0,72	0,90	0,78	0,08	2,61

Tablica 4. pH-vrijednost određena u supernatantu kulture 4 različita soja *P. freudenreichii*.

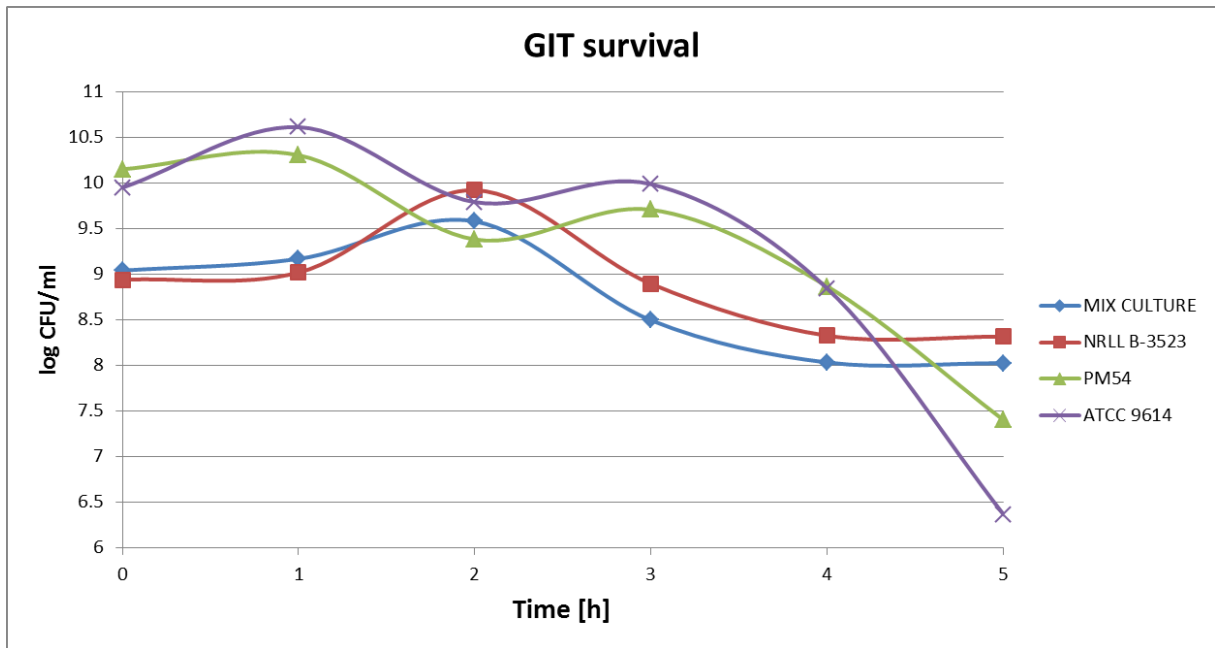
pH medija nakon uzgoja						
Soj	VG1 1	VG1 2	VG1 3	Srednja vrijednost 3 mjerenja	st. dev. VG1	MRS
NRL B-3523	6,11	6,10	6,34	6,18	0,14	4,97
ATCC 9614	5,96	6,13	6,24	6,11	0,14	4,91
PM 54	6,22	6,06	6,21	6,16	0,09	4,79
Mješovita kultura	6,11	6,18	6,48	6,26	0,20	5,21



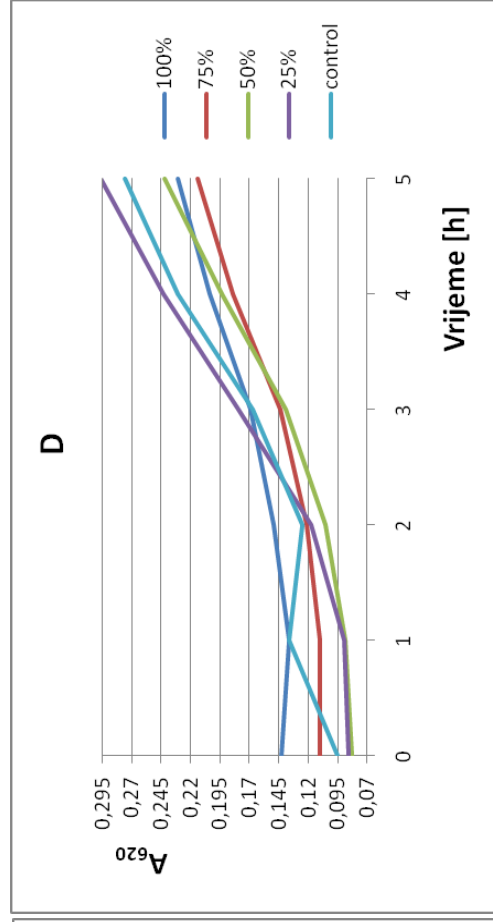
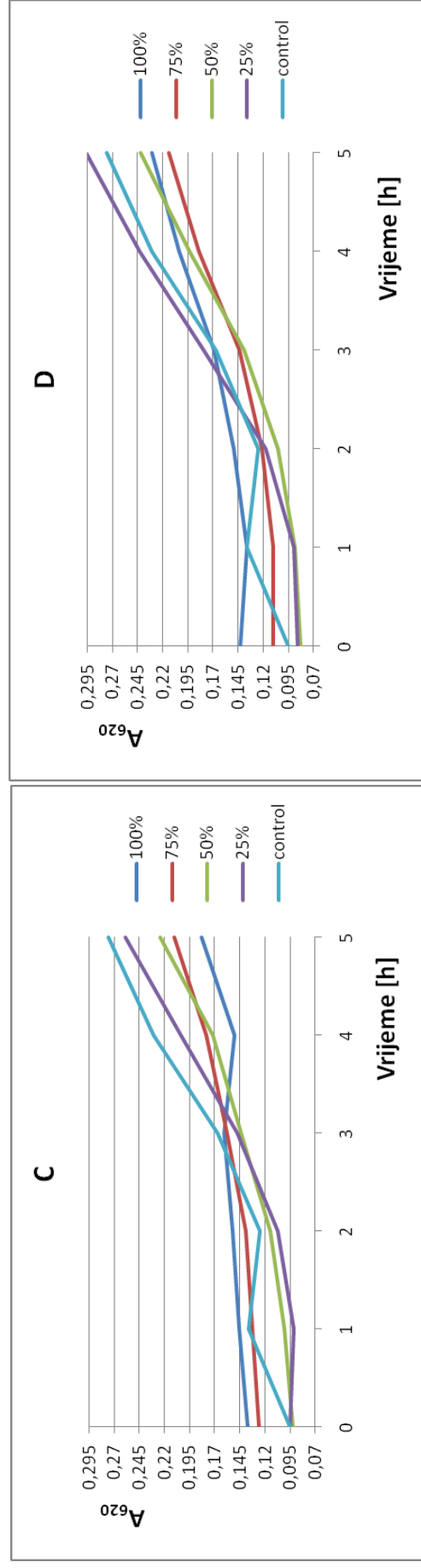
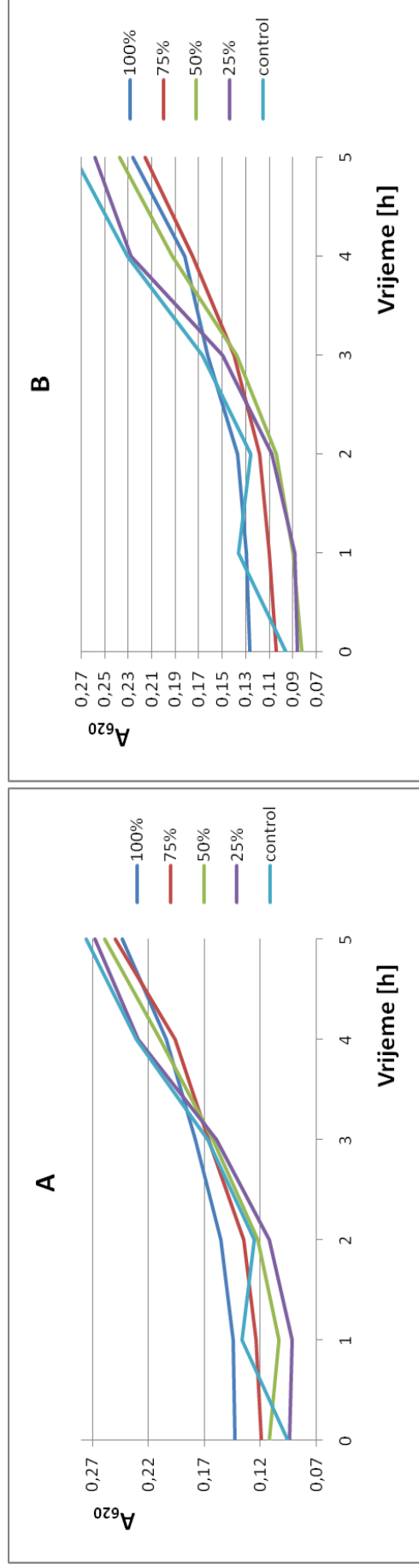
Slika 3. SDS-PAGE elektroforeza ekstrahiranih ukupnih topivih staničnih proteina 4 sojeva *P. freudenreichii*: NRLL B-3523, ATCC 9614, PM 54 i mješovita kultura; S = standard proteina niskih molekulskih masa.



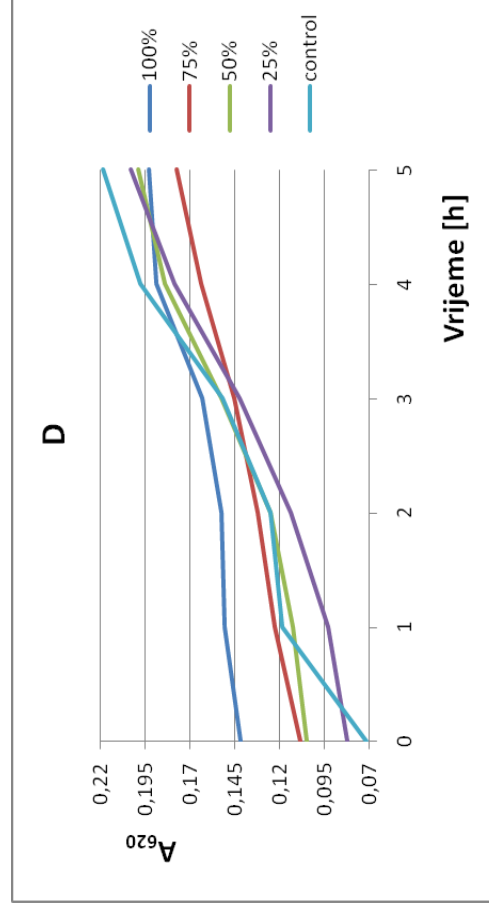
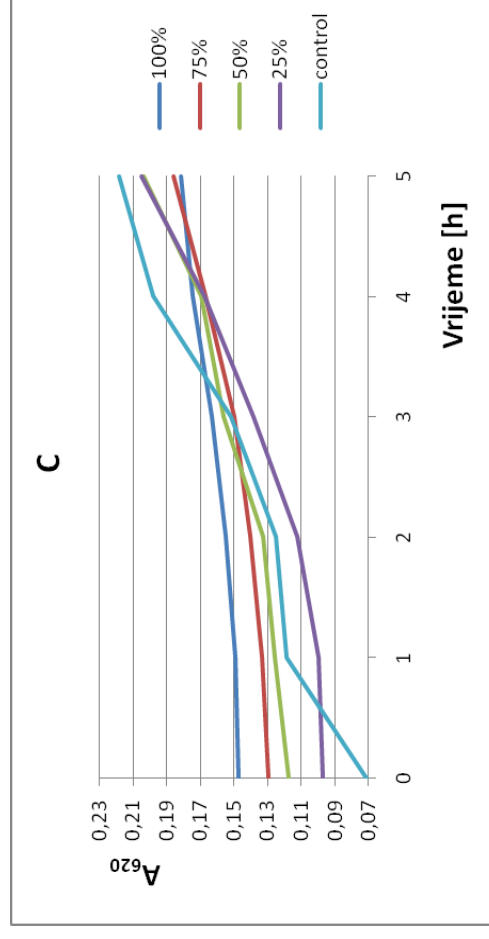
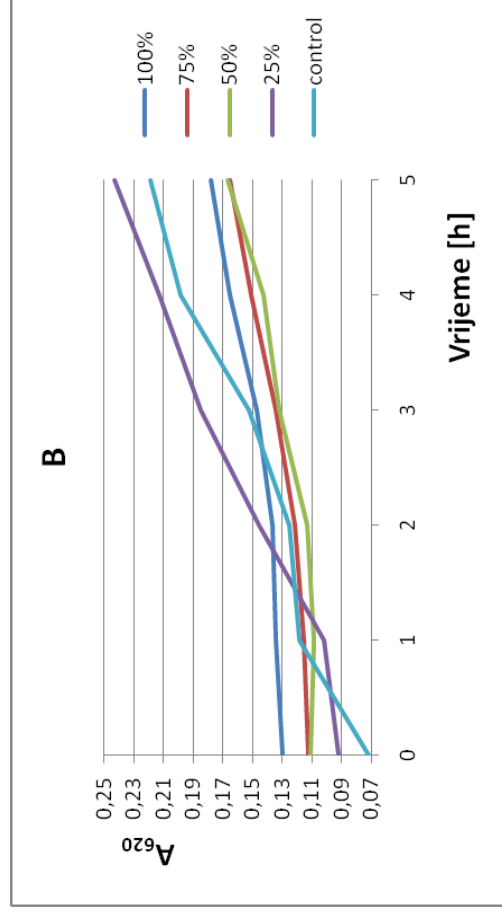
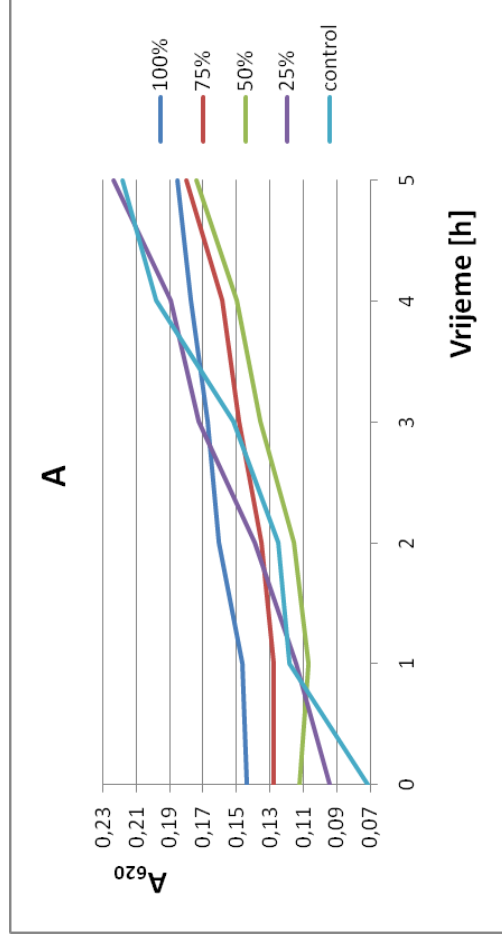
Slika 4. Rast 4 soja *P. freudenreichii* pri tri različite koncentracije žučnih soli (0,3 %, 0,6 % i 1,5 %): A = PM 54, B = NRLL B-3523, C = mješovita kultura *P. freudenreichii*, D = ATCC 9614.



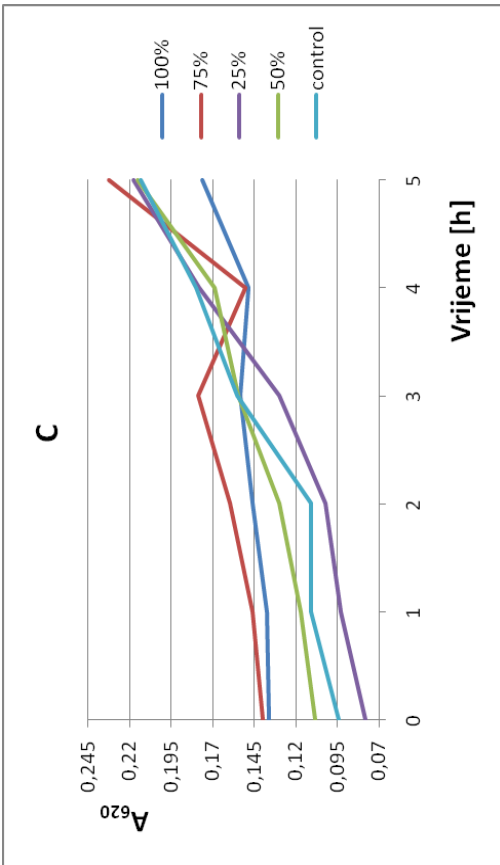
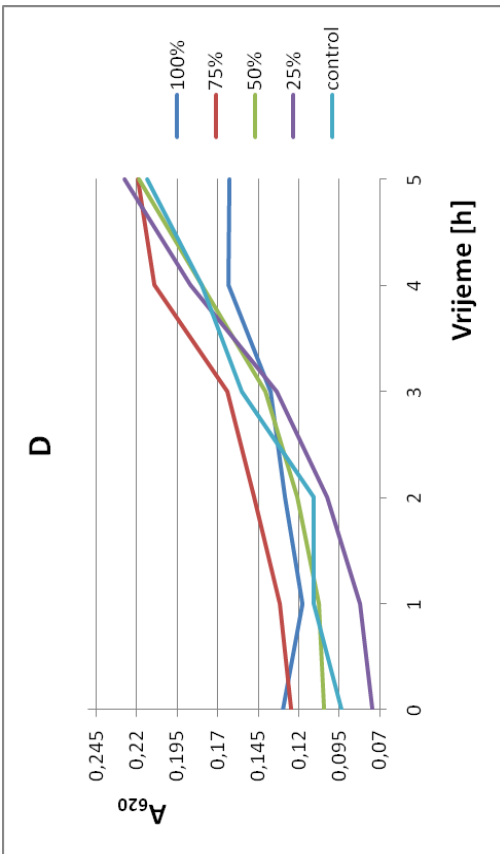
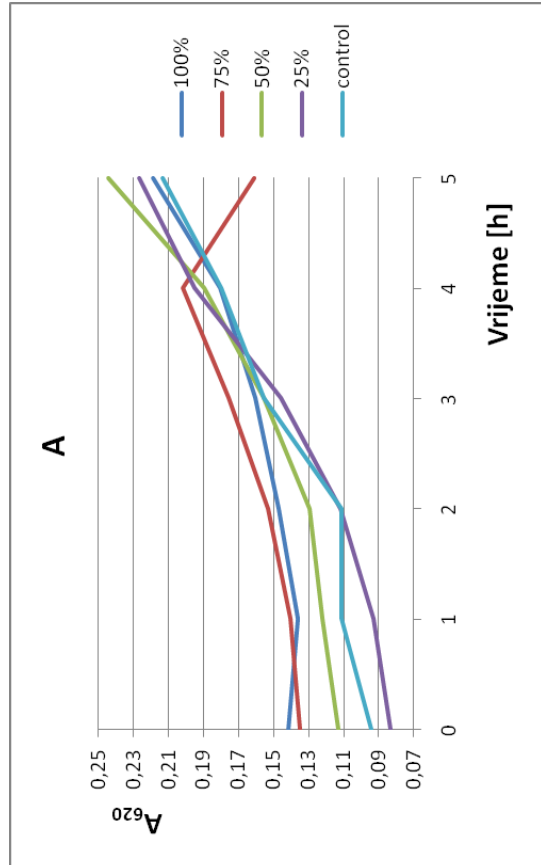
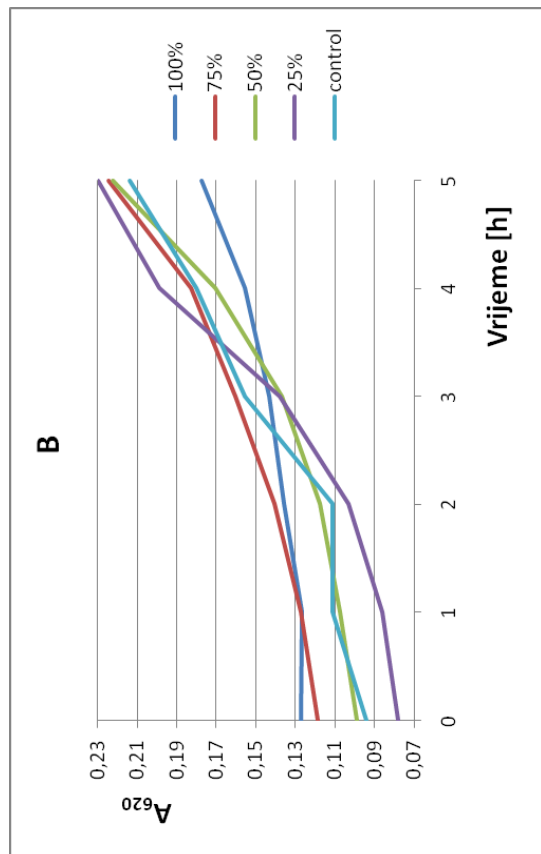
Slika 5. Prikaz preživljavanja izražen kao logCFU/mL 4 različita soja *P. freudenreichii* u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta.



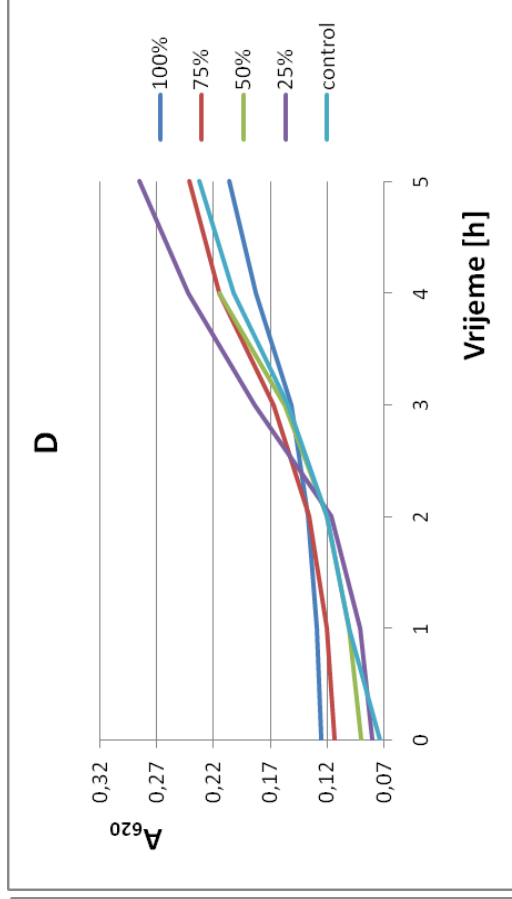
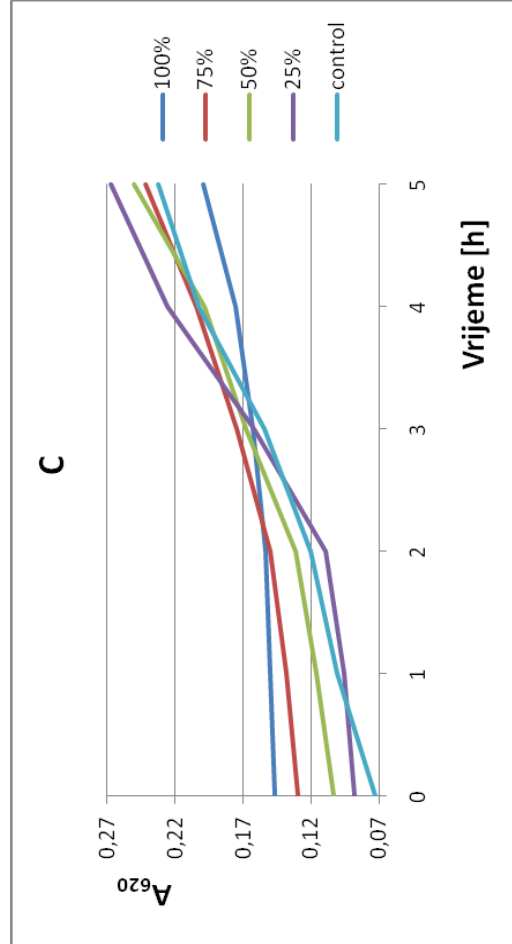
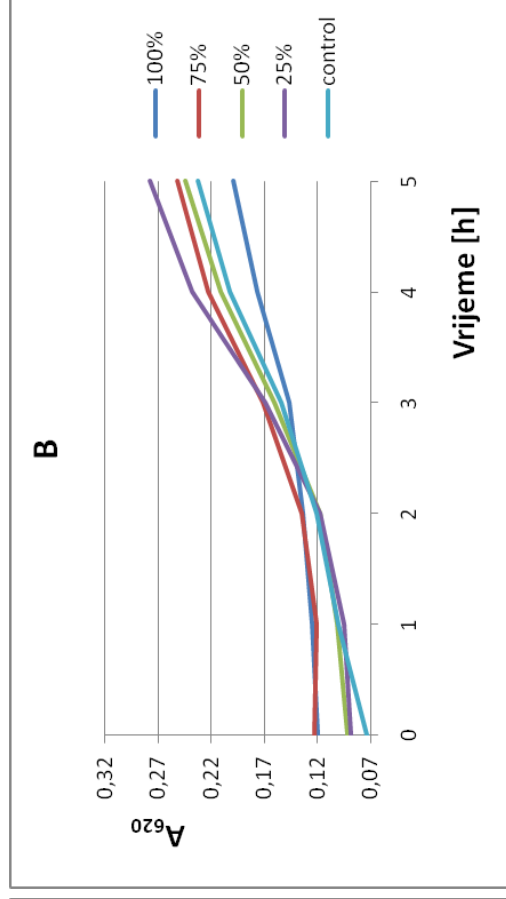
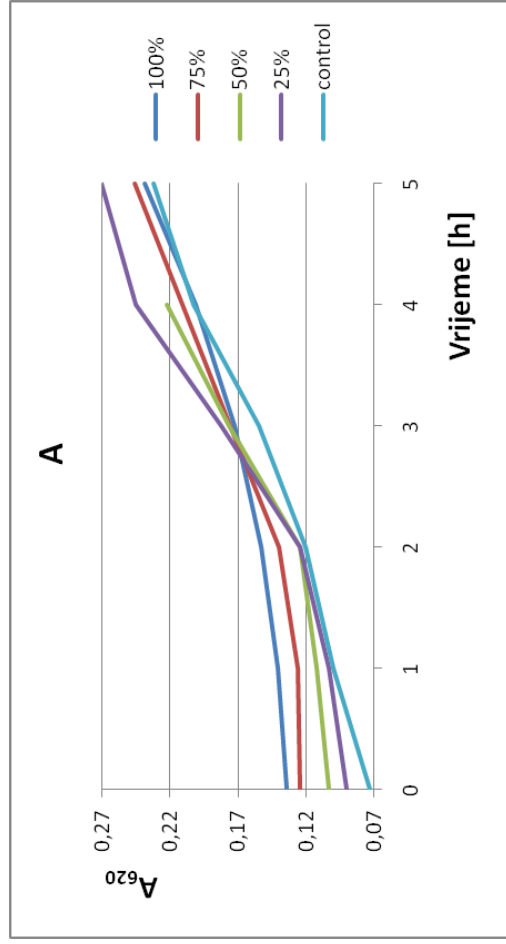
Slika 6. Inhibicija rasta *Staphylococcus aureus* 3048 supernatantima kulture 4 soja *P. freudenreichii*: A - NRLL B-3523; B - ATCC 9614; C - PM 54; D - mješovita kultura *P. freudenreichii*.



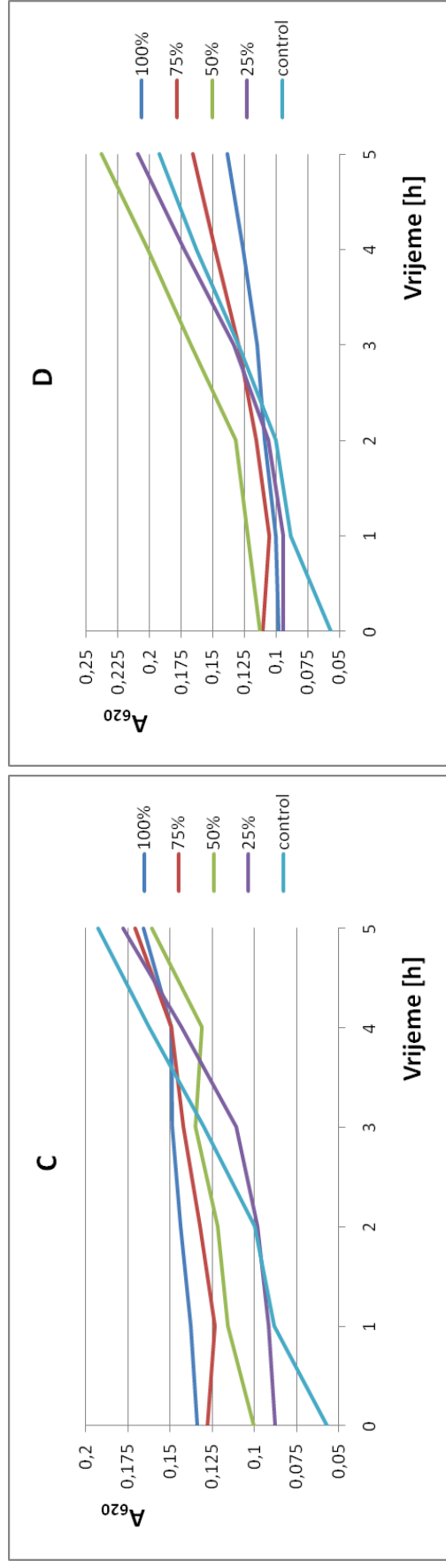
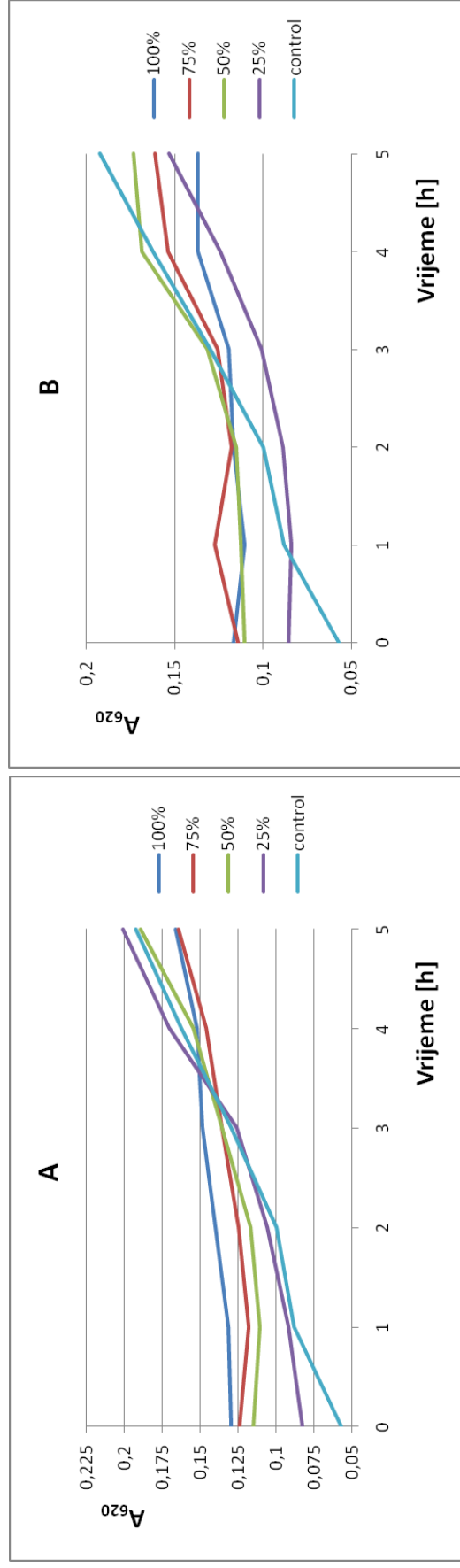
Slika 7. Inhibicija rasta *Staphylococcus aureus* K-144 supernatantima kulture 4 soja *P. freudenreichii*: A - NRLL B-3523; B – ATCC 9614; C – PM 54; D – mješovita kultura *P. freudenreichii*.



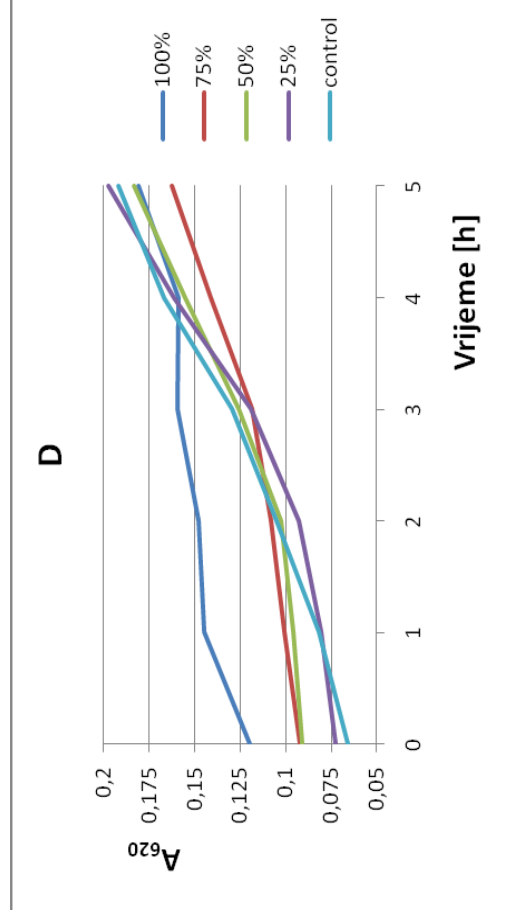
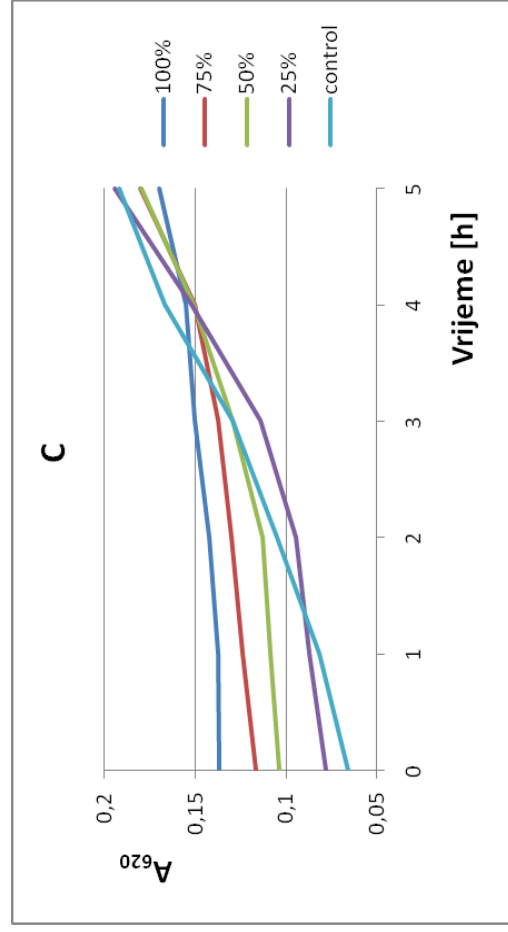
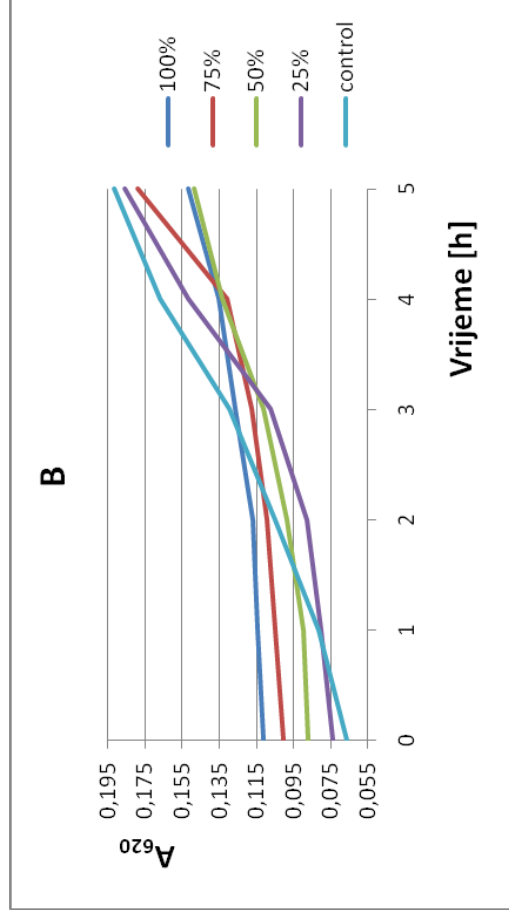
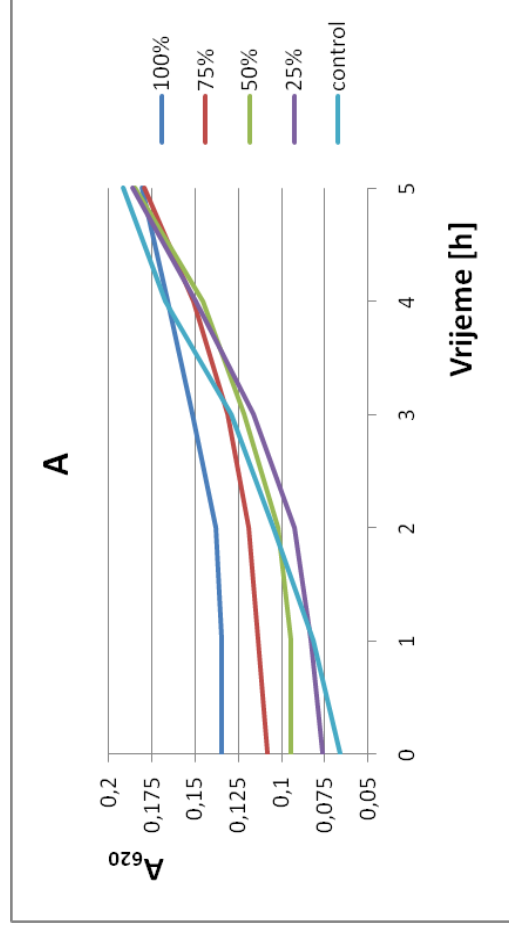
Slika 8. Inhibicija rasta *Salmonella enterica* FP1 supernatantima kulture 4 soja *P. freudenreichii*: A - NRL B-3523; B - ATCC 9614; C - PM 54; D - mješovita kultura *P. freudenreichii*.



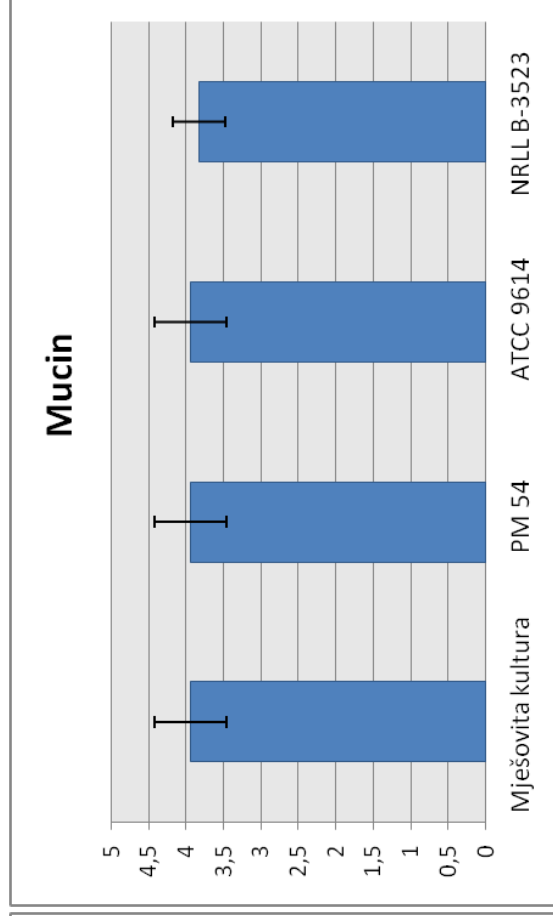
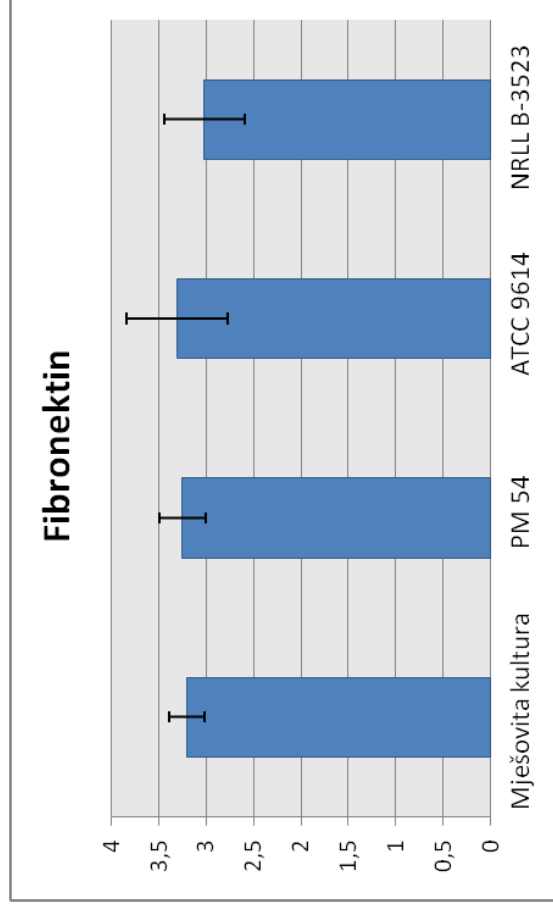
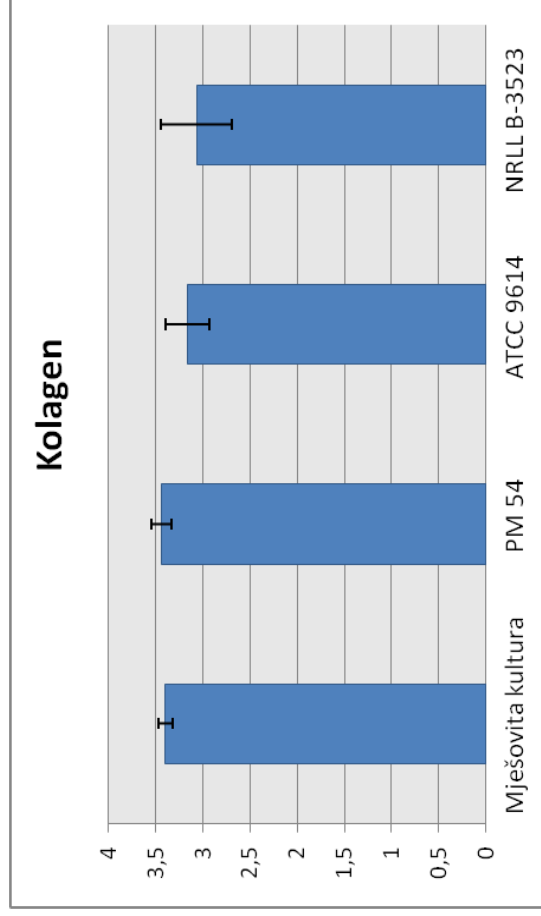
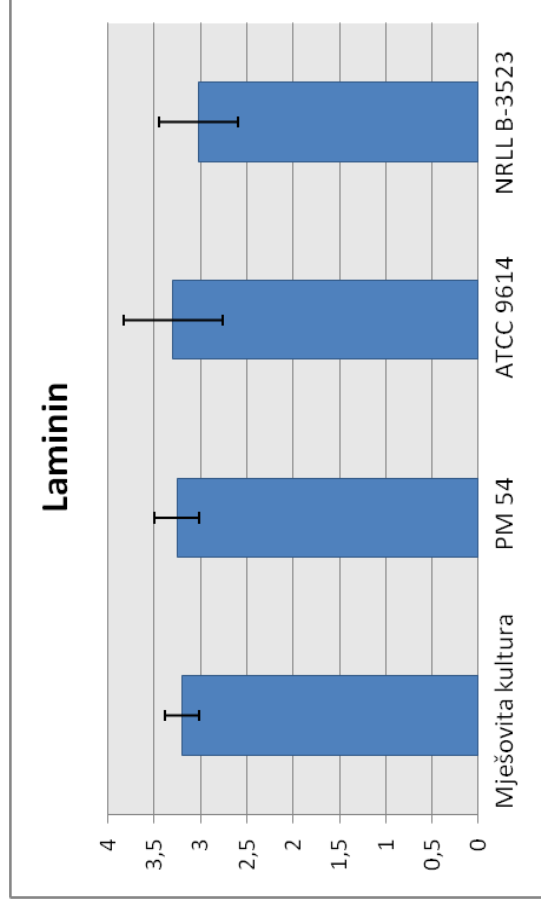
Slika 9. Inhibicija rasta *Bacillus cereus* TM2 supernatantima kulture 4 soja *P. freudenreichii*: A - NRLL B-3523; B – ATCC 9614; C – PM 54; D – mješovita kultura *P. freudenreichii*.



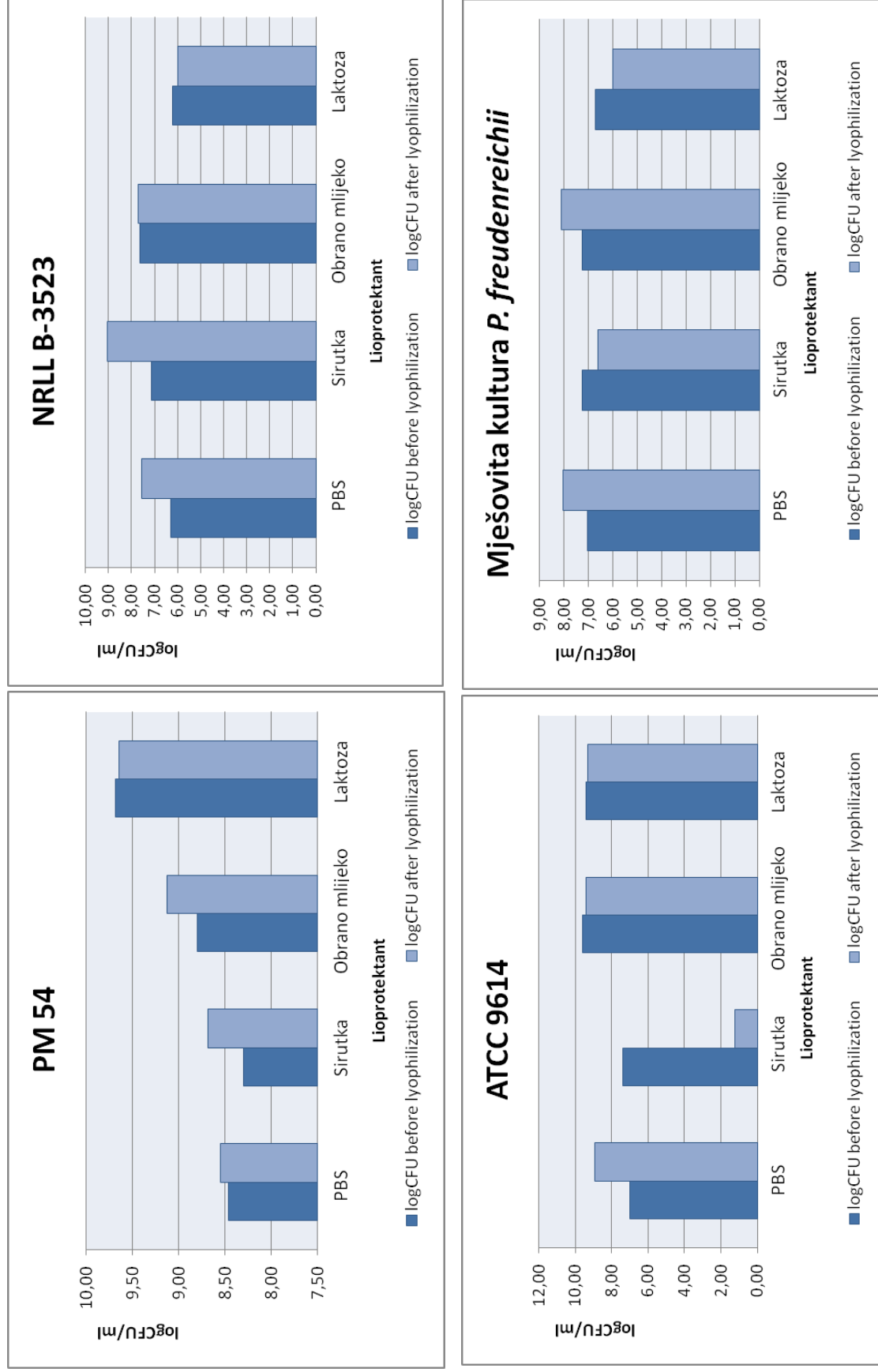
Slika 10. Inhibicija rasta *Bacillus subtilis* ATCC 6633 supernatantima kulture 4 soja *P. freudenreichii*: A - NRLL B-3523; B - ATCC 9614; C - PM 54; D - mješovita kultura *P. freudenreichii*.



Slika 11. Inhibicija rasta *Escherichia coli* 3014 supernatantima kulture 4 soja *P. freudenreichii*: A - NRLL B-3523; B - ATCC 9614; C - PM 54; D - mješovita kultura *P. freudenreichii*.



Slika 12. *In vitro* adhezija 4 različita soja *P. freudenreichii* na proteine ekstracelularnog matriksa: laminin, kolagen, fibronektin te na protein sluznice mucin.



Slika 13. Prikaz broja živih bakterijskih stanica (logCFU/mL) 4 različita soja *P. freudenreichii* određen prije i nakon liofilizacije u 4 različita lioprotektanata.

Tablica 5. Broj živih bakterijskih stanica (logCFU/mL) 4 različita soja *P. freudenreichii* određen prije i nakon liofilizacije te vrijednost izražena kao smrtnosti stanica u 3 različita lioprotektanata i fosfatnom puferu. * oznaka ↑ upućuje na rezultat da je broj poraslih kolonija (CFU/mL) nakon liofilizacije povećan u usporedbi s početnim brojem bakterijskih stanica.

PM 54	logCFU prije liofilizacije	logCFU nakon liofilizacije	Smrtnost
Fosfatni pufer	8,46	8,55	0,095 ↑
Sirutka	8,30	8,68	0,377 ↑
Obrano mlijeko	8,80	9,12	0,322 ↑
Laktoza	9,69	9,64	0,044
NRL B-3523			
NRL B-3523	logCFU prije liofilizacije	logCFU nakon liofilizacije	Smrtnost
Fosfatni pufer	6,30	7,55	1,25 ↑
Sirutka	7,12	9,06	1,93 ↑
Obrano mlijeko	7,65	7,69	0,043 ↑
Laktoza	6,22	6,00	0,222
Mješovita kultura			
Mješovita kultura	logCFU prije liofilizacije	logCFU nakon liofilizacije	Smrtnost
Fosfatni pufer	6,99	8,91	1,93 ↑
Sirutka	7,37	1,25	6,12
Obrano mlijeko	9,61	9,43	0,183
Laktoza	9,41	9,32	0,087
ATCC 9614			
ATCC 9614	logCFU prije liofilizacije	logCFU nakon liofilizacije	Smrtnost
Fosfatni pufer	7,05	8,04	0,987 ↑
Sirutka	7,25	6,60	0,645
Obrano mlijeko	7,26	8,11	0,859 ↑
Laktoza	6,73	6,00	0,727

5. Rasprava

Bakterija iz vrste *P. freudenreichii*, izolirane iz mliječnih mikrookoliša, su važni industrijski mikroorganizmi, koje se u biotehnološkoj industriji koristi kao proizvođač vitamina, kao biokonzervans te kao starter kultura za dozrijevanje sireva. Iako su predstavnici ove bakterijske vrste znatno manje proučavani u usporedbi s bakterijama iz roda *Lactobacillus* ili *Bifidobacterium*, sve je veći broj znanstvenih istraživanja usmjerenih na definiranje probiotičkih potencijala mliječnih propionibakterija. Glavni funkcionalni učinci bakterija iz vrste *P. freudenreichii* opisanih u znanstvenoj literaturi odnose se na povećane razine crijevnih bifidobakterija mikrobiote ljudi, inhibiciju nepoželjne mikroflore, korisne modifikacije aktivnosti enzima u crijevima i terapiju intolerancije na šećer laktozu (Thierry i sur., 2011). Probiotički učinak se razlikuje s obzirom na bakterijski soj pa je potrebno utvrditi funkcionalne karakteristike za svaki pojedinačni soj prije nego postane dostupan potrošaču kao probiotik (Cousin i sur., 2010).

Bakterija *P. freudenreichii* je osobito značajna zbog proizvodnje bakteriocina i vitamina B12. Štoviše, glavni proizvod metabolizma propionbakterija, propionat, može poboljšati apsorpciju kalcija i željeza u GIT čovjeka. Prema istraživanjima ovaj metabolit, zajedno s acetatom ima moguću ulogu u induciranju apoptoze kancerogenih stanica čovjeka *in vitro*, što može doprinijeti sprječavanju razvoja raka kolona (Suomalainen i sur., 2008). Navedeni učinci proizlaze iz metaboličke aktivnosti *P. freudenreichii* te su značajni jer mogu doprinijeti mogućoj probiotičkoj aktivnosti ovih bakterija. Upravo zato je određena pH vrijednost i postotak proizvedene kiseline u supernatantima kulture svakoj pojedinog soja *P. freudenreichii* te prema rezultatima sva 4 soja proizvode visoke koncentracije kiseline i u skladu s tim snižavaju pH vrijednost podloge, što proizlazi iz sinteze propionata.

Kritični parametar prilikom iskazivanja probiotičke učinkovitosti je sposobnost bakterijskih sojeva da uspješno preživljavaju u stresnim uvjetima unutar probavnog trakta i pri tome zadrže metaboličku aktivnost u crijevima (Šušćković i sur., 2009). Tolerancija na nepoželjne uvjete unutar GIT, što se prije svega odnosi na niske pH-vrijednosti, visoke koncentracije žučnih soli i aktivnost probavnih enzima, predstavlja usko grlo probiotičke učinkovitosti.

Cilj ovog diplomskog rada je ispitati funkcionalna svojstva četiri različita soja *Propionibacterium freudenreichii* kako bi se procijenio njihov probiotički potencijal. Ispitana su temeljna funkcionalna svojstva *in vitro*, koja mogu upućivati na iskazivanje poželjnih zdravstvenih učinaka na domaćina: preživljavanje u prisutnosti različitih koncentracija žučnih

soli i u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta (GIT), antimikrobno djelovanje, adhezija na proteine ekstracelularnog matriksa.

U ovom radu stoga je ispitana tolerancija na stresne uvjete izazvane visokim koncentracijama žučnih soli te je uspoređeno preživljavanje 4 različita soja propionibakterija. Rezultati su u skladu s rezultatima koje su dobili Hervé i sur., (2007), koji su pokazali da neki sojevi *P. acidipropionici* i *P. freudenreichii* uspješno toleriraju koncentraciju žučne soli od 0.3 % i preživljavaju u simuliranim gastrointesinalnim sokovima. Adaptacija na žučne soli temelji se na indukciji proteina uključenih u uvjetima stresa i prijenosa signala, u oksidativnom stresu remedijacije i detoksifikacije (enzimi superoksid dismutaza, cistein sintaza, ABC transporteri) te u Wood-Werkman-ovom ciklusu (Falentin i sur., 2010a).

Za adaptaciju bakterijskih stanica na visoke koncentracije kiselina potrebna je indukcija enzima uključenih u sintezu i popravak DNA, središnji metabolizam ugljika, uključujući transkarboksilazni ciklus karakterističan za propionsku fermentaciju kod propionibakterija te u metabolizam polipeptida (ClpB i ClpC) kao i univerzalnih proteina stresa GroEL i GroES. Preživljavanje nepovoljnih uvjeta u GIT neophodna je karakteristika probiotičkih sojeva. Glavnu prepreku njihovom preživljavanju osim kisele pH vrijednosti u želucu, čine i probavni enzimi poput pepsina ili pankreatina (Kos i sur., 2003). Stoga je kao bitno funkcionalno svojstvo, ispitana sposobnost preživljavanja *P. freudenreichii* sojeva u simuliranim uvjetima GIT. Odnosno praćeno je njihovo preživljavanje u simuliranom želučanom soku, pri pH vrijednosti 2,0 te u simuliranom soku tankog crijeva gdje se izlučuje sok gušterače i žuč. Adhezija na stanice domaćina i sluz, preživljenje unutar crijeva i interakcija (engl. *cross-talk*) sa domaćinom su ključne karakteristike probiotičkih bakterija koje mogu biti povezane.

Pri izboru sojeva za probiotičku upotrebu, jedan od važnih kriterija je mogućnost adhezije za crijevni epitel (Kos i sur., 2003; Šušković i sur., 2009). Adhezija na površinu epitelnih stanica bitan je preduvjet za kolonizaciju probiotičkih sojeva u GIT i omogućava djelovanje probiotika na crijevnu mikrofloru i imunološki sustav domaćina (Kos i sur., 2003), stoga je ispitana *in vitro* adhezija na glikoprotein mucin. Mucin je prisutan kao jedna od strukturnih komponenta na površini sluznice GIT, gdje čini dio intestinalne barijere te postoji mogućnost da ova molekula ima ulogu receptora za adhezine probiotičke bakterije.

Slijedeće svojstvo ispitano u ovom radu je antagonistično djelovanje *P. freudenreichii* prema 6 različitim test-mikroorganizama, koji su predstavnici gram pozitivnih, sporogenih i gram negativnih bakterija te su učestali kontaminanti hrane i potencijalni uzročnici infekcija.

Inhibicija rasta nepoželjnih mikroorganizama je osobito značajno svojstvo probiotičkih bakterija, jer može doprinijeti kompetitivnoj ekskluziji patogena u GIT te time smanjiti mogućnost infekcije. Myllyluoma i sur. (2008) su ispitali antimikrobna aktivnost *P. freudenreichii* prema patogenoj bakteriji *H. pylori* te su ustanovili da uzrokuje smanjenje adhezije *H. pylori* na stanice crijeva i istjecanje sadržaja stanične membrane koje je inducirano djelovanjem *H. pylori*. Pojedine propionibakterije sintetiziraju antifungalne i antikvasne spojeve te se mogu primijeniti kao mogući biokonzervansi u hrani (Ho i sur., 2009). *P. freudenreichii* proizvodi i bakteriocine (Faye i sur., 2010). Bakterija *P. jensenii*, proizvodi antimikrobne organske kiseline koje imaju sinergistički učinak. Radi se o octenoj, propionskoj, sukcijskoj i mliječnoj kiselini te o specifičnijim metabolitima poput 2-pirolidon-5-karboksilne kiseline, hidroksifenil i 3-fenil mliječne kiseline (Schwenninger i sur., 2008). Stoga, antimikrobno djelovanje sojeva *P. freudenreichii* prema ispitanim test-mikroorganizmima u ovom radu, prvenstveno proizlazi iz inhibicijskog djelovanja propionata, no potrebno je provesti analizu komponenata u supernatantu kulture, kako bi se ustanovili koji drugi metaboliti *P. freudenreichii* imaju antimikrobnim učinak. Industrijska primjena *P. freudenreichii* u prehrambenoj biotehnologiji, na primjer kao probiotik, je isključivo povezana s tehnologijom očuvanja kako bi se očuvale stabilne kulture u smislu preživljavanja, bakterijskog metabolizma i tehnoloških svojstva. Liofilizacije je jedna od najčešćih metoda koja se koristi za proizvodnju velikih količina koncentriranih mikrobioloških kultura. Tijekom tog procesa, bakterijske stanice su izložene nepovoljnim uvjetima poput kristalizacije vode i niskih temperatura, što u određenoj mjeri uzrokuje denaturaciju proteina i oštećenja membrane bakterija te posljedično smanjenje preživljavanja, veću osjetljivost u prisutnosti zraka i nemogućnost razmnožavanja. U svrhu sprječavanja ili smanjenja navedenih štetnih utjecaja, mnoge tvari se koriste kao lioprotektori. U ovom radu kao lioprotektori su korištene otopine sirutke (5 % m/v), obranog mlijeka i laktoze (5 % m/v), a suspenzija bakterijskih stanica *P. freudenreichii* u fosfatnom puferu je poslužila kao kontrolni uzorak te je provedena liofilizacija bakterijskih stanica svakog od četiri soja, kako bi se usporedio zaštitni učinak odabranih lioprotektora s ciljem optimiranja biotehnološke proizvodnje liofiliziranih probiotičkih kultura. Svi korišteni lioprotektanti pokazali su zaštitni učinak na preživljavanje bakterijskih stanica u usporedbi s liofilizacijom biomase provedenom u izotoničnoj otopini, fosfatnim puferom. Nakon provedenog procesa liofilizacije ($\Delta \log$ CFU/mL između 1,25 i 9,64), iako je svaki soj pokazao različitu osjetljivosti, između korištenih lioprotektanta, laktoza se pokazala kao najučinkovitiji u očuvanju preživljavanja bakterija. Zbog svoje

kemijske inertnosti i niske cijene, laktoza bi se mogla koristiti kao šećer koji štiti bakterijske stanice, za poboljšanje preživljavanja starter kultura i što može omogućiti njihovu probiotičku aktivnost te poboljšanje otpornosti na različite stresne uvjete.

Istraživanja *P. freudenreichii* su u fazi postgenomičke ere što će doprinijeti biotehnološkoj primjeni ovog mikroorganizma producenta u raznim područjima. Bakterije iz vrste *P. freudenreichii* odavno su predmet istraživanja zbog karakterističnih svojstva i nekoliko korisnih primjena. Suvremene metode molekularne biologije uz primjenu spoznaja stečenim klasičnim mikrobiološkim metoda omogućuju detaljnu karakterizaciju molekularnih mehanizma koji su temelj za moguću biotehnološku primjenu ove bakterije. Javno dostupna potpuna sekvenca genoma, kao i razvijene molekularne tehnike, doprinose novim perspektivama u njenoj primjeni. Molekularni mehanizmi uključeni u ključnim putevima za adaptaciju, dozrijevanje sira, biokonzerviranje i probiotički učinci sada mogu biti objašnjeni. To će omogućiti selekciju najprikladnijih sojeva za određenu primjenu i iskorištenje izvanredne bioraznolikosti *P. freudenreichii* sojeva.

6. Zaključci

1. Pojedini sojevi *P. freudenreichii* proizvode visoke koncentracije kiseline i u skladu s tim snižavaju pH vrijednost podloge, što proizlazi iz sinteze propionata kao primarnog proizvoda metabolizma ovih bakterija.
2. U prisutnosti tri različite koncentracije žučnih soli: 0,3 %, 0,6 % i 1,5 %, uočen je porast biomase svih bakterijski sojeva, što ukazuje na dobro podnošenje odabranih koncentracija žučne soli. Svi bakterijski sojevi očekivano najbolje podnose najnižu koncentraciju žučne soli od 0,3 %, a s povećanjem koncentracije na 0,6 %, odnosno 1,5 % preživljavanje se smanjuje.
3. Odabrani sojevi *P. freudenreichii* uspješno preživljavaju *in vitro* uvjete GIT. Mogućnosti *in vitro* adhezije odabranih sojeva *P. freudenreichii* na proteine ekstracelularnog matriksa i glikoprotein mucin se međusobno razlikuju.
4. Analiza antimikrobnog djelovanja četiri bakterijska soja *P. freudenreichii* provedena je s šest test-mikroorganizama, a prema rezultatima određeni postotak supernatanta ispitivane bakterijske kulture *P. freudenreichii* inhibira rast svih test-mikroorganizama.
5. Nakon provedenog procesa liofilizacije odabranih sojeva *P. freudenreichii* uz dodatak tri različita lioprotektora, najučinkovitije preživljavanje bakterijskih stanica je postignuto uz dodatak šećera laktoze kao lioprotektora.

7. Literatura

Burgess, C. M., Smid, E. J., Van Sinderen, D. (2009) Bacterial vitamin B2, B11 and B12 overproduction: an overview. *Int. J. Food Microbiol.* **133**, 1-7.

Cardoso, F. S., Castro, R. F., Borges, N., Santos, H. (2007) Biochemical and genetic characterization of the pathways for trehalose metabolism in *Propionibacterium freudenreichii*, and their role in stress response. *Microbiology.* **153**, 270-280.

Cousin, F., Mater, D. D. G., Foligné, B., Jan, G. (2010) Dairy propionibacteria as human probiotics: a review of recent evidence. *Dairy Sci. Technol.* **91**, 1-26.

Cummins, C. S., Johnson, J. L. (1986) Genus I. *Propionibacterium* Orla-Jensen 1909. In: Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., Holt, J. G. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore, 1346-1353.

Deutsch, S. M., Le Bivic, P., Herve, C., Madec, M. N., LaPointe, G., Jan, G., Le Loir, Y., Falentin, H. (2010) Correlation of the capsular phenotype in *Propionibacterium freudenreichii* with the level of expression of *gtf*, a unique polysaccharide synthase encoding gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 2740-2746.

Dherbécourt, J., Falentin, H., Canaan, S., Thierry, A. (2008a) A genomic search approach to identify esterases in *Propionibacterium freudenreichii* involved in the formation of flavour in Emmental cheese. *Microb. Cell Factor.* **7**, 16.

Dherbécourt, J., Maillard, M. B., Catheline, D., Thierry, A. (2008b) Production of branched chain aroma compounds by *Propionibacterium freudenreichii*: links with the biosynthesis of membrane fatty acids. *J. Appl. Microbiol.* **105**, 977-985.

Dherbécourt, J., Falentin, H., Jardin, J., Maillard, M. B., Baglinière, F., Barloy-Hubler, F., Thierry, A. (2010) Identification of a secreted lipolytic esterase in *Propionibacterium freudenreichii*, a ripening process bacterium involved in Emmental cheese lipolysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 1181-1188.

EFSA (2008) Technical guidance update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. *The EFSA J.* **732**, 1-15.

EFSA (2009) Scientific opinion of the panel on biological hazards on the maintenance of the list of QPS microorganisms intentionally added to food or feed. *The EFSA J.* **7**, 1-93.

El-Nezami, H. S., Polychronaki, N. N., Ma, J., Zhu, H., Ling, W., Salminen, E. K., Juvonen, R. O., Salminen, S. J., Poussa, T., Mykkanen, H. M. (2006) Probiotic supplementation reduces a biomarker for increased risk of liver cancer in young men from Southern China. *The Am. J. Clin. Nutr.* **83**, 1199-1203.

Falentin, H., Deutsch, S. M., Jan, G., Loux, V., Thierry, A., Parayre, S., Maillard, M. B., Dherbecourt, J., Cousin, F. J., Jardin, J., Siguier, P., Couloux, A., Barbe, V., Vacherie, B., Wincker, P., Gibrat, J. F., Gaillardin, C., Lortal, S. (2010a) The complete genome of *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA1, a hardy actinobacterium with food and probiotic applications. *PloS One.* **5**, e11748.

Falentin, H., Postollec, F., Parayre, S., Henaff, N., Le, B. P., Richoux, R., Thierry, A., Sohier, D. (2010b) Specific Metabolic Activity of Ripening Bacteria Quantified by Real-time Reverse Transcription PCR throughout Emmental Cheese Manufacture. *Int. J. Food Microbiol.* **144**, 10-19.

Faye, T., Holo, H., Langsrud, T., Nes, I. F., Brede, D. A. (2010) The Unconventional Antimicrobial Peptides of the Classical Propionibacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **89**, 549-554.

Foligné, B., Deutsch, S. M., Breton, J., Cousin, F. J., Dewulf, J., Samson, M., Pot, B., Jan, G. (2010) Promising immunomodulatory effects of selected strains of dairy propionibacteria evidenced in vitro and in vivo. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 8259-8264.

Fröhlich-Wyder, M. T., Bachmann, H. P. (2004) Cheeses with propionic acid fermentation. In: Fox, P. F., McSweeney, P. L. H., Cogan, T. M., Guinee, T. P. (Eds.), *Cheese. Chemistry, Physics and Microbiology*. Elsevier, London, 141-156.

Furuichi, K., Katakura, Y., Ninomiya, K., Shioya, S. (2007) Enhancement of 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid production by *Propionibacterium freudenreichii* ET-3 fed-batch culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 3137-3143.

Hervé, C., Fondrevez, M., Chéron, A., Barloy-Hubler, F., Jan, G. (2007) Transcarboxylase mRNA: a marker which evidences *P. freudenreichii* survival and metabolic activity during its transit in the human gut. *Int. J. Food Microbiol.* **113**, 303-314.

Ho, P. H., Luo, J. B., Adams, M. C. (2009) *Lactobacilli* and dairy *Propionibacterium* with potential as biopreservatives against food fungi and yeast contamination. *Appl. Biochem. Microbiol.* **45**, 414-418.

Hojo, K., Yoda, N., Tsuchita, H., Ohtsu, T., Seki, K., Taketomo, N., Murayama, T., Iino, H. (2002) Effect of ingested culture of *Propionibacterium freudenreichii* ET-3 on fecal microflora and stool frequency in healthy females. *Biosci. Microflora.* **21**, 115-120.

Iida, K., Ohtaka, K., Kajiwara, M. (2007) Mechanism of the ring contraction process in vitamin B-12 biosynthesis by the anaerobe *Propionibacterium shermanii* under aerobic conditions. *The FEBS J.* **274**, 3475-3481.

Isawa, K., Hojo, K., Yoda, N., Kamiyama, T., Makino, S., Saito, M., Sugano, H., Mizoguchi, C., Kurama, S., Shibasaki, M., Endo, N., Sato, Y. (2002) Isolation and identification of a new bifidogenic growth stimulator produced by *Propionibacterium freudenreichii* ET-3. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**, 679-681.

Kekkonen, R. A., Lummela, N., Karjalainen, H., Latvala, S., Tynkkynen, S., Jarvenpaa, S., Kautiainen, H., Julkunen, I., Vapaatalo, H., Korpela, R. (2008) Probiotic intervention has strain-specific anti-inflammatory effects in healthy adults. *World J. Gastroenterol.* **14**, 2029-2036.

Kiatpapan, P., Panbangred, W. (2008) Production of 5-aminolevulinic acid by propionibacteria. *The FEBS J.* **275**, 407.

Kos, B. (2001) Probiotički koncept: *in vitro* istraživanja s odabranim bakterijama mliječne kiseline. Disertacija, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**, 680-685.

Lan, A., Bruneau, A., Bensaada, M., Philippe, C., Bellaud, P., Rabot, S., Jan, G. (2008) Increased induction of apoptosis by *Propionibacterium freudenreichii* TL133 in colonic mucosal crypts of human microbiota-associated rats treated with 1,2-dimethylhydrazine. *The Brit. J. Nutri.* 1-9.

McIntosh, F. M., Shingfield, K. J., Devillard, E., Russell, W. R., Wallace, R. J. (2009) Mechanism of conjugated linoleic acid and vaccenic acid formation in human faecal suspensions and pure cultures of intestinal bacteria. *Microbiology-Sgm.* **155**, 285-294.

Meile, L., Le Blay, G., Thierry, A. (2008) Contribution to the safety assessment of technological microflora found in fermented dairy products Part IX. *Propionibacterium* and *Bifidobacterium*. *Int. J. Food Microbiol.* **126**, 316-320.

Meurice, G., Deborde, C., Jacob, D., Falentin, H., Boyaval, P., Dimova, D. (2004) In silico exploration of the fructose-6-phosphate phosphorylation step in glycolysis: genomic evidence of the coexistence of an atypical ATP-dependent along with a PPi-dependent phosphofructokinase in *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*. *In Silico Biology.* **4**, 0043.

Mogensen, G., Salminen, S., O'Brien, J., Ouwehand, A., Holzapfel, W., Shortt, C., Fonden, R., Miller, G. D., Donohue, D., Playne, M., Crittenden, R., Salvadori, B. B., Zink, R. (2002) Inventory of microorganisms with a documented history of use in food. *Bulletin Int. Dairy Feder.* 10-19.

Murooka, Y., Piao, Y., Kiatpapan, P., Yamashita, M. (2005) Production of tetrapyrrole compounds and vitamin B12 using genetically engineering of *Propionibacterium freudenreichii* An overview. *Le Lait*. **85**, 9-22.

Myllyluoma, E., Ahlroos, T., Veijola, L., Rautelin, H., Tynkkynen, S., Korpela, R. (2007a) Effects of anti-*Helicobacter pylori* treatment and probiotic supplementation on intestinal microbiota. *Int. J. Antimicrob. Agents*. **29**, 66-72.

Myllyluoma, E., Kajander, K., Mikkola, H., Kyronpalo, S., Rasmussen, M., Kankuri, E., Sipponen, P., Vapaatalo, H., Korpela, R. (2007b) Probiotic intervention decreases serum gastrin-17 in *Helicobacter pylori* infection. *Digest. Liver Dis*. **39**, 516-523.

Myllyluoma, E., Ahonen, A.M., Korpela, R., Vapaatalo, H., Kankuri, E. (2008) Effects of multispecies probiotic combination on *Helicobacter pylori* infection *in vitro*. *Clin. Vaccine Immunol*. **15**, 1472-1482.

Nord, C. E., Oprica, C. (2006) Antibiotic resistance in *Propionibacterium acnes* microbiological and clinical aspects. *Anaerobe*. **12**, 207-210.

Phillips, N. F. B., Horn, P. J., Wood, H. G. (1993) The polyphosphate-dependent and ATPdependent glucokinase from *Propionibacterium shermanii*—both activities are catalyzed by the same protein. *Arch. Biochem. Biophys*. **300**, 309-319.

Piao, Y., Kiatpapan, P., Yamashita, M., Murooka, Y. (2004a) Effects of expression of hema and hemB genes on production of porphyrin in *Propionibacterium freudenreichii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **70**, 7561-7566.

Schwenninger, S. M., Lacroix, C., Truttmann, S., Jans, C., Spordli, C., Bigler, L., Meile, L. (2008) Characterization of low-molecular-weight antiyeast metabolites produced by a food-protective *Lactobacillus-Propionibacterium* coculture. *J. Food Protect*. **71**, 2481-2487.

Seufferheld, M. J., Alvarez, H. M., Farias, M. E. (2008) Role of polyphosphates in microbial adaptation to extreme environments. *Appl. Environm. Microbiol*. **74**, 5867-5874.

Stackebrandt, E., Rainey, A., Ward-Rainey, N. L. (1997) Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 479-491.

Suomalainen, T., Sigvart-Mattila, P., Matto, J., Tynkkynen, S. (2008) *In vitro* and *in vivo* gastrointestinal survival, antibiotic susceptibility and genetic identification of *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* JS. *Int. Dairy J.* **18**, 271-278.

Šušković, J., Kos, B., Frece, J., Beganović, J., Leboš Pavunc, A. (2009) Probiotički koncept - probiotici kao dodaci hrani i probiotici kao bioterapeutici. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam.* **4**, 77-84.

Šušković, J., Kos, B., Beganović, J., Leboš Pavunc, A., Habjanič, K., Matošić, S. (2010) Antimicrobial Activity - The Most Important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria. *Food Technol. Biotechnol.* **48**, 296-307.

Thierry, A., Maillard, M. B., Hervé, C., Richoux, R., Lortal, S. (2004) Varied volatile compounds are produced by *Propionibacterium freudenreichii* in Emmental cheese. *Food Chem.* **87**, 439-446.

Thierry, A., Maillard, M. B., Richoux, R., Kerjean, J. R., Lortal, S. (2005b) *Propionibacterium freudenreichii* strains quantitatively affect production of volatile compounds in Swiss cheese. *Le Lait.* **85**, 57-74.

Thierry, A., Deutsch, S. M., Falentin, H., Dalmasso, M., Cousin, F. J., Jan, G. (2011) New insights into physiology and metabolism of *Propionibacterium freudenreichii*. *Int. J. Food Microbiol.* **149**, 19-27.

Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G. F., Chater, K. F., Van Sinderen, D. (2007) Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylura. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**, 495-548.

von Freudenreich, E., Orla-Jensen, O. (1906) Über die in Emmentalerkäse stattfindene Propionsäure-gärung. *Zentralbl. Bakteriol.* **17**, 529-546.

Vorobjeva, L.I. (1999) Propionibacteria. Dordrecht, Kluwer Academic, 1-291.

Wyder, M. T., Bosset, J. O., Casey, M. G., Isolini, D., Sollberger, H. (2001) Influence of two different propionibacterial cultures on the characteristics of Swiss-type cheese with regard to aspartate metabolism. *Milchwissenschaft.* **56**, 78-81.