

Received: 2012.10.04
Accepted: 2013.02.25
Published: 2013.05.13

Białka powierzchniowe bakterii z rodzaju *Bifidobacterium**

Surface proteins of bacteria of the genus *Bifidobacterium*

Ewa Dylus, Barbara Buda, Sabina Górska-Frączek, Ewa Brzozowska, Andrzej Gamian

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. L. Hirszfelda, Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu

Streszczenie

Poznanie mechanizmów korzystnego działania bakterii probiotycznych z rodzaju *Bifidobacterium* w przewodzie pokarmowym człowieka, wciąż stanowią interesujący przedmiot badań. Dotychczas potwierdzono aktywność tych drobnoustrojów w pobudzaniu układu immunologicznego gospodarza, stymulacji apoptozy komórek nowotworowych, poprawy perystaltyki jelit, łagodzenia objawów nietolerancji laktozy, zdolności obniżania poziomu cholesterolu, zapobieganiu i leczeniu biegunek oraz syndromu jelita drażliwego, łagodzenia alergii czy atopowego zapalenia skóry, utrzymywania homeostazy jelitowej, stymulacji rozwoju prawidłowej mikroflory jelitowej u niemowląt. Mnogość właściwości terapeutycznych skłania badaczy do podejmowania działań mających na celu sprawdzenie możliwości wykorzystania potencjału tych bakterii w profilaktyce i leczeniu innych schorzeń, takich jak reumatoidalne zapalenie stawów czy depresja. Chociaż wiadomo, że ich dobroczynny wpływ jest wynikiem zasiedlania śluzówki jelit przez te bakterie, nie zidentyfikowano jednoznacznie elementów komórek odpowiedzialnych za kolonizowanie nabłonka jelitowego. Oprócz korzystnych skutków podawania probiotyków, zaobserwowano także skutki negatywne mogące wywołać m.in. sepsę. Z tego względu badania naukowców zostały ukierunkowane na zidentyfikowanie konkretnych elementów komórek bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* odpowiedzialnych za działanie probiotyczne. Obecnie uwaga badaczy skupia się na zidentyfikowaniu, otrzymaniu oraz ocenie właściwości białek powierzchniowych, które prawdopodobnie są zaangażowane w adhezję komórek bakteryjnych do nabłonka jelitowego, sprzyjając jego kolonizacji. W pracy omówiono aktualną wiedzę na temat białek powierzchniowych bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*. Przedstawiono sposoby transportu i kotwiczenia białek u bakterii Gram-dodatnich, budowę ich ściany warunkującą sposoby transportu i wiązania białek oraz krótką charakterystykę rodzaju *Bifidobacterium*.

Słowa kluczowe: *Bifidobacterium* • probiotyk • białka • mikroflora jelitowa • stymulacja immunologiczna

Summary

Beneficial effects due to the presence of probiotic bacteria of the genus *Bifidobacterium* in the human intestinal tract are still an interesting object of study. So far activities have been confirmed of bifidobacteria in stimulation of the host immune system, stimulation of tumor cell apoptosis, improvement of bowel motility, alleviation of symptoms of lactose intolerance, cholesterol lowering capacity, prevention and treatment of diarrhea and irritable bowel syndrome, alleviation of allergy or atopic dermatitis, maintenance of homeostasis of the intestine, and stimulation of the

*Praca została wykonana w ramach środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Współpracy Transgranicznej „Republika Czeska – Rzeczpospolita Polska 2007-2013”. Projekt numer CZ.3.22/2.1.00/09.01574 PN: „Probiotyki: współpraca naukowa, transfer wiedzy i edukacji”.

development of normal intestinal microflora in infants. A multitude of therapeutic properties encourages researchers to investigate the possibility of using the potential of *Bifidobacterium* in the prevention and treatment of other conditions such as rheumatoid arthritis and depression. Although it is known that the beneficial effects are due to intestinal mucosal colonization by these bacteria, the cell components responsible for the colonization are still not determined. In addition to the beneficial effects of probiotic administration, there were also negative effects including sepsis. Therefore research has been directed to identify specific components of *Bifidobacterium* responsible for probiotic effects. Currently researchers are focused on identifying, isolating and evaluating the properties of surface proteins that are probably involved in the adhesion of bacterial cells to the intestinal epithelium, improving colonization. This paper is an overview of current knowledge on *Bifidobacterium* surface proteins. The ways of transport and anchoring proteins in Gram-positive bacterial cells, the assembly of cell wall, and a description of the genus *Bifidobacterium* are presented.

Keywords: *Bifidobacterium* • probiotic • proteins • gut microflora • immunological stimulation

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1049285>

Word count: 3940
Tables: 3
Figures: 1
References: 101

Adres autorki: dr inż. Sabina Górska-Frączek, Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L.Hirszfelda, ul. Weigla 12, 53-114 Wrocław; e-mail: sabina.gorska@iitd.pan.wroc.pl.

CHARAKTERYSTYKA RODZAJU *BIFIDOBACTERIUM*

Henry Tissier w 1899 roku po raz pierwszy wyizolował bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* z kału niemowląt, karmionych mlekiem matki [50]. Rodzaj *Bifidobacterium* należy do gromady *Actinobacteria*, klasy *Actinobacteria*, podklasy *Actinobacteridae*, rzędu *Bifidobacteriales*, rodziny *Bifidobacteriaceae*. Do rodzaju *Bifidobacterium* należy obecnie 29 gatunków: *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. animalis* (z dwoma podgatunkami: *B. animalis* subsp. *animalis* i *B. animalis* subsp. *lactis*), *B. asteroides*, *B. bifidum*, *B. boum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. choerinum*, *B. coryneforme*, *B. cuniculi*, *B. dentium*, *B. gallicum*, *B. gallinarum*, *B. indicum*, *B. longum*, *B. magnum*, *B. merycicum*, *B. minimum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. pseudolongum* (z dwoma podgatunkami: *B. pseudolongum* subsp. *pseudolongum* i *B. pseudolongum* subsp. *globosum*), *B. psychraerophilum*, *B. pullorum*, *B. ruminantium*, *B. saeculare*, *B. scardovii*, *B. subtile*, *B. thermacidophilum* (z dwoma podgatunkami *B. thermacidophilum* subsp. *thermacidophilum* i *B. thermacidophilum* subsp. *porcinum*) i *Bifidobacterium thermophilum* [21]. Bakterie te są beztlenowe, przyjmują kształty rozgałęzionych lub zagiętych pałeczek o wymiarach 0,5-1,3 x 1,5-8 µm. Mogą one występować w postaci łańcuszków, dwoinek, jednak najczęściej jako pojedyncze komórki. Stosując metodę Grama komórki barwią się na fioletowo, co kwalifikuje je do grupy bakterii Gram-dodatnich. Optymalny wzrost tych bakterii następuje w temperaturze 36-43°C [50]. Nie mają zdolności ruchu i nie wytwarzają form przetrwalnych, są katalazoujemne. Odznaczają się dużą zawartością reszt G + C w DNA (55-67%) [42,84,98]. Wykazują zdolność do fermentacji sacharydów w szlaku metabolicznym z udziałem enzymu fruktozo-6-fosfoketolazy. Enzym ten katalizuje reakcję przekształcenia fruktozo-6-fosforanu do erytrozo-

-4-fosforanu i acetylofosforanu. W wyniku fermentacji z glukozy wytwarzane są kwasy mlekowy i octowy. Wykazują one także zdolność do tworzenia etanolu i kwasu mrówkowego, natomiast nie tworzą CO₂ [50]. Wykazano zdolność bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* do wytwarzania witamin: *B. adolescentis*, *B. breve*, *B. bifidum*, *B. longum* subsp. *infantis* oraz *B. longum* subsp. *longum* wytwarzają: kwas nikotynowy, kwas foliowy, witaminy B₁, B₁₂, B₆ [17]. Bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* syntetyzują także lantybiotyki, które należą do bakteriocyn o szerokim zakresie działania. Pierwszy z nich został zidentyfikowany u *B. longum* subsp. *longum* DJO10A [47]. Głównym środowiskiem bytowania szczepów *Bifidobacterium* jest przewód pokarmowy ludzi i zwierząt, gdzie liczebność ich komórek zawiera się w przedziale 10⁸-10¹² komórek w jednym gramie treści jelitowej. W tabeli 1 zestawiono podłoża selekcyjne do hodowli bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*.

U niemowląt, karmionych mlekiem matki bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* są mikroflorą dominującą [50]. Uwagę zwraca to, że w chwili przyjścia na świat przewód pokarmowy noworodka jest jałowy, a jego kolonizacja rozpoczyna się zaraz po porodzie, a niekiedy już w czasie jego trwania [77]. Jako pierwsze pojawiają się bakterie względnie beztlenowe z rodzajów *Enterobacter*, *Streptococcus* i *Staphylococcus*. Po tygodniu jelita zasiedlane są przez bakterie z rodzajów *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, które stopniowo tworzą mikroflorę dominującą w tym odcinku układu pokarmowego [56]. Do szybkiego rozwoju bakterii probiotycznych przyczynia się karmienie piersią, zalecane przez

Tabela 1. Podłoża selekcyjne do hodowli i określania liczebności bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*

Podłoże	Czynnik selekcyjny	Literatura
Z dodatkiem antybiotyku		
BIM-25	polimyksyna B, kwas naldyksowy, kwas jodooctowy, chlorek 2,3,5-trifenyloctanowy	[60]
BL-OG	żółć wołowa, gentamycyna	[52]
BSM	mupirocyna	[49]
MRS (TPY) + Dic	dikloksacylina	[91]
NPNL	neomycyna, paromomycyna, kwas naldyksowy, LiCl	[92]
RMS	neomycyna, paromomycyna, LiCl, propionian sodu	[80]
Bez dodatku antybiotyków		
BFM	LiCl, propionian sodu, błękit metylenowy	[65]
LP	LiCl, propionian sodu	[46]
mCABa	kwas propionowy	[4]
RCA- aniline blue	kwas propionowy, błękit anilinowy	[53]
TP	propionian sodu, transgalakto-oligosacharyd	[36]

pediatrów, ponieważ mleko matki bogate jest w prebiotyki, m.in. GOS (galaktooligosacharydy) i FOS (fruktooligosacharydy), usprawniające proces kolonizacji [44,67,93]. Bakterie te zapobiegają namnażaniu się patogenów w wyniku blokowania potencjalnych miejsc receptorowych w nabłonku jelit oraz przez wydzielanie substancji hamujących wiązanie się patogenów do błony śluzowej, a także przez wzmacnianie bariery nabłonkowej [59]. Dane literaturowe potwierdzają, że dominujący udział bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* oraz *Lactobacillus* w mikroflorze jelitowej, odgrywa główną rolę w wykształceniu odporności na bytujące w jelitach patogeny, m.in. szczepy *Salmonella*, *Escherichia coli* czy *Campylobacter* [25]. Catala i wsp. w badaniach prowadzonych na modelach zwierzęcych ocenili, iż podawanie FOS powoduje wzrost populacji bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* w jelitach, a w konsekwencji prowadziło do hamowania patogenów odpowiedzialnych za rozwój NEC (necrotising enterocolitis) u noworodków, zwłaszcza tych urodzonych przedwcześnie, które są bardziej narażone na jej wystąpienie ze względu na późniejsze w stosunku do dzieci urodzonych w terminie, kształtowanie prawidłowej mikroflory jelit [11]. W ludzkim przewodzie pokarmowym występuje 14 gatunków z rodzaju *Bifidobacterium*, spośród których *B. adolescentis* i *B. longum* są najczęściej spotykane u osób dorosłych, a *B. breve*, *B. infantis* i *B. longum* u dzieci. Właściwości probiotyczne, wywołujące korzystny efekt w organizmie gospodarza sprawiają, że bakterie klasy-

fikowane jako *Bifidobacterium* są wykorzystywane w produkcji mlecznych napojów fermentowanych, mieszanek mlecznych przeznaczonych dla dzieci oraz jako składniki szczepionek [50].

PROBIOTYCZNE SZCZEPY *BIFIDOBACTERIUM*

Według definicji FAO/WHO probiotyki to żywe mikroorganizmy, które podawane w odpowiednich ilościach korzystnie działają na organizm gospodarza [20]. W 2009 roku do grupy probiotyków zaliczano osiem gatunków spośród rodzaju *Bifidobacterium*: *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. lactis*, *B. longum* i *B. subtilis* [101]. Szczepy *B. longum* BB536 i *B. breve* M-16V są szeroko wykorzystywane w produktach spożywczych. Pierwszy z nich jest stosowany w Japonii jako składnik żywności funkcjonalnej FOSHU (foods for specified health use) o specjalnym przeznaczeniu [87]. Szczep *B. animalis* DN173010 został zakwalifikowany jako probiotyk polecany do wykorzystywania w żywieniu ludzi starszych. Z kolei gatunek *B. bifidum* wskazany jest w biegunkach wywołanych przez rotawirusy. Dwa uprzednio wymienione szczepy wraz z *B. lactis* Bb-12 są często wykorzystywane do utrzymywania homeostazy mikroflory jelitowej, a także w celu skrócenia pasaży jelitowego [51]. Mieszaniny kultur bakterii z rodzajów *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* i *Streptococcus* są wykorzystywane profilaktycznie w celu zmniejszenia ryzyka występowania biegunek podróży [55]. W Polsce jednym z dostępnych produktów tego typu jest Trilac®.

Zainteresowanie możliwościami powszechnego wykorzystania bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* w profilaktyce i leczeniu schorzeń układu jest naukowo uzasadnione. Badania potwierdzają, iż syntetyzowane przez nie metabolity np. fruktany, korzystnie wpływają na zdrowie gospodarza [35]. Wśród probiotycznych aktywności bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* wyróżnić można ich udział w prewencji procesu kancerogenezy. Sekine i wsp., w przeprowadzonych na myszach doświadczeniach wykazali, że wstrzykiwanie w obszar guzów zawiesiny inaktywowanych termicznie komórek *B. infantis* lub preparatów uzyskanych na bazie ścian komórkowych tych bakterii, zmniejszało częstości występowania guzów oraz zwiększało liczbę wyleczonych zwierząt [86]. Rafter i wsp. w 2007 roku dostarczyli informacji o antynowotworowym działaniu podawanej pacjentom chorującym na raka jelita grubego, mieszaniny *B. animalis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus rhamnosus* oraz inuliny. Po przeprowadzonej kuracji zaobserwowano u nich poprawę funkcjonowania nabłonkowej bariery jelitowej [76]. Udowodniony został także korzystny wpływ bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* na poprawę perystaltyki jelit. Agrawal i wsp. w badaniach klinicznych dowiedli, iż suplementacja mieszanką kultur *B. animalis* subsp. *lactis* i bakterii jogurtowych, cierpiącym na zespół jelita drażliwego, powodowała zredukowanie czasu pasaży jelitowego przez poprawę perystaltyki jelit [1]. Ataie-Jafari i wsp. testowali w 2009 roku wpływ spożywania jogurtów probiotycznych zawierających kultury *Lactobacillus acidophilus* i *B. animalis* subsp. *lactis*, na obniżenie stężenia

nia cholesterolu. Grupą kontrolną byli pacjenci, którym podawano zwykły jogurt. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, iż spożywanie mlecznych produktów fermentowanych z udziałem wymienionych kultur probiotycznych wpływa na obniżenie stężenia cholesterolu we krwi w przypadku pacjentów z hipercholesterolemią [2]. Kiessling i wsp. oceniali wpływ długoterminowego włączenia do codziennej diety jogurtów wzbogaconych w kultury *Lactobacillus acidophilus* 145 i *B. longum* 913. Badania przeprowadzono w dwóch grupach kobiet: z hipercholesterolemią oraz z poziomem cholesterolu utrzymującym się w normie. Wykazano, iż codzienne spożywanie 300 g jogurtu przez ponad 21 tygodni, powoduje zwiększenie poziomu cholesterolu HDL w surowicy, co z kolei prowadzi do pożądanego zmniejszenia stosunku cholesterolu LDL/HDL [39].

Znane są także doniesienia dotyczące stymulacji układu odpornościowego przez bakterie z rodzaju *Bifidobacterium*. McCarthy i wsp. badali wpływ podawania fermentowanych produktów mlecznych zawierających kultury bakterii *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* 433118 (w liczbie 10^9 jtk/ml) (jednostek tworzących kolonie) i *Bifidobacterium infantis* 35624 (10^8 jtk/ml) na przebieg zapalenia okrężnicy. Doświadczenie przeprowadzono na myszach z modyfikacją genu, odpowiadającą za wyłączenie genu IL-10. Wyniki badań wykazały znaczne złagodzenie stanu zapalnego okrężnicy, które było związane ze stymulacją układu odpornościowego wywołującą zahamowanie odpowiedzi komórkowej typu Th1. Podawanie *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* obniżało poziomy prozapalnych cytokin: IFN- γ , TNF- α i IL-12 [58]. O'Mahony i wsp. w 2005 roku udowodnili immunomodulatoryjne działanie probiotyków w łagodzeniu objawów IBS (irritable bowel syndrome). Suplementacja słodowanymi napojami mlecznymi wzbogaconymi w kultury *Bifidobacterium infantis* 35624, normalizowała stosunek cytokin przeciwzapalnych IL-10 do prozapalnych IL-12, zaburzonego u pacjentów cierpiących na IBS [71]. Jak wykazali Kim i wsp., pobudzanie aktywności układu odpornościowego przez probiotyki związane jest także z ochroną przed alergiami pokarmowymi, czy atopowym zapaleniem skóry. Badania przeprowadzono na myszach, u których wywołano alergię indukowaną owoalbuminą. Podawanie wraz z pokarmem kultur *L. acidophilus* AD031 i *B. lactis* AD011 przed wywołaniem alergii znacząco zmniejszyło wytwarzanie przeciwciał związanych z odpowiedzią układu immunologicznego na podawany następnie antygen [40].

Znane są także doniesienia o wpływie bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*, na łagodzenie objawów nietolerancji laktozy. Potwierdzają to m.in. badania He i wsp. z 2008 roku, w których odnotowano wpływ podawania kultury *B. longum* w postaci kapsułek oraz jogurtu wzbogaconego w *B. animalis* na mikroflorę jelitową pacjentów z nietolerancją laktozy. Stwierdzono, że suplementacja powoduje modyfikację składu i metaboliczną aktywność drobnoustrojów końcowego odcinka układu pokarmowego oraz łagodzi objawy nietolerancji laktozy [31].

Bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* wykazują antagonizm wobec patogenów układu pokarmowego oraz chronią przed biegunkami wywołanymi przez rotawirusy. Potwierdziły to m.in. badania Qiao i wsp. przeprowadzone na myszach. Uzyskane wyniki ujawniają ochronny efekt, wywołany doustnym podawaniem niemowlętom kultur *B. bifidum* i *B. longum* subsp. *infantis*. Wykazano, iż wymienione bakterie mogą działać jako czynnik wspomagający łagodzenie ciężkich biegunek, ze względu na zdolność modulowania wczesnej odpowiedzi śluzówkowej i humoralnej układu immunologicznego, swoistej dla rotawirusów [75]. Przeprowadzone przez Saavedra i wsp. badania kliniczne potwierdzają skuteczność stosowania preparatów u niemowląt oraz preparatów następnym z dodatkiem *Bifidobacterium lactis* i *Streptococcus thermophilus* w zmniejszaniu ryzyka występowania biegunki szpitalnej. Podawanie testowanej mieszanki o składzie: *B. lactis* $1,9 \times 10^9$ jtk/g preparatu i *S. thermophilus* $0,14 \times 10^8$ jtk/g preparatu zmniejszyło częstość występowania zapalenia jelit oraz biegunek wywołanych przez rotawirusy [78].

Przypuszcza się, że bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* stymulują szybki rozwój prawidłowej mikroflory jelitowej u wcześniaków, która odgrywa istotną rolę w ochronie śluzówki oraz zapobieganiu zakażeniom [15]. Na rynku dostępne jest mleko modyfikowane dla niemowląt, zawierające kultury probiotyczne. W Polsce dostępne są jedynie takie preparaty, które wzbogacone są w mieszaninę kultur *Bifidobacterium lactis* Bb-12 i *Streptococcus thermophilus*. Stosowanie ich jest uzasadnione badaniami klinicznymi. W czasie eksperymentu niemowlętom podawano dwa rodzaje mleka następnego, pierwsze z nich z dodatkiem kultury *B. lactis* Bb-12 w dawce 10^7 jtk na jeden gram mieszanki, drugie z dodatkiem *Lactobacillus reuteri* w takiej samej dawce. Grupą kontrolną były dzieci, którym podawano standardowe mleko modyfikowane. Wyniki tych badań potwierdzają skuteczność działania preparatów wzbogaconych kulturami probiotycznymi w zmniejszaniu częstości występowania gorączki i biegunek u zdrowych niemowląt, narażonych na występowanie zakażeń układu pokarmowego i oddechowego, ze względu na uczęszczanie do żłobka [45]. Kitajima i wsp. dowiedli, iż podawanie pokarmu wzbogaconego w *B. breve* (10^9 jtk/dzień), niemowlętom o małej masie urodzeniowej, działa korzystnie na układ pokarmowy, poprawia tolerancję karmienia oraz usprawnia przyrost masy ciała [41]. W tabeli 2 zestawiono preparaty dla niemowląt zawierające bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* oraz inne źródła tych bakterii dostępne w Polsce.

Bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* biorą również udział w trawieniu oligosacharydów, które nie są rozkładane przez enzymy gospodarza [89]. Usprawnianie procesów trawiennych jest możliwe, dzięki ich zdolności do wytwarzania enzymów o dużej aktywności. Są to m.in.: dehydrogenaza mleczanowa, glukozo-6-fosfoizomeraza oraz ksylozo-5-fosfoketolaza [5].

Tabela 2. Preparaty zawierające w składzie bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* [14,35]

Preparat	Nazwa handlowa	Literatura
Mleko początkowe	Nan Pro 1	[35]
	Nan Pro H.A. 1	[35]
	Nan Pro 2	[35]
	Nan Pro 2R	[35]
	Nan Pro Dobranoc	[35]
Mleko dla dzieci >1 roku życia	Nan Pro H.A.2	[35]
	Nan Pro 3	[35]
	Nan Pro H. A. 3	[35]
Mleko dla dzieci >2 roku życia	Nestle Junior	[35]
	Nan Pro 4	[35]
Kaszka manna	Nestle – kaszka mleczna manna	[35]
	Nestle – kaszka mleczno-zbożowa	[35]
	Nestle – kaszka „Dzień Dobry”	[35]
	Nestle – kaszka mleczno-ryżowa „Na Dobranoc”	[35]
	Nestle – kaszka „Zdrowy Brzuszek”	[35]
	Nestle – kaszka ryżowa bezmleczna	[35]
Kleik	Nestle – kleik kukurydzaniny	[35]
	Nestle – kleik ryżowy	[35]
Jogurt probiotyczny	Danone – activia	[14]
	Medana – acidolac	[14]
Suplementy diety/leki	Ferrosan – ido form kid	[14]
	IBSS Biomed – lactoral	[14]
	Krotek – trilac	[14]

Uważa się, że preparaty skomponowane na bazie *Bifidobacterium* powinny być również zalecane do stosowania w ochronie przed ksenobiotykami pochodzącymi z żywności. Uzasadnia się to tym, że mechanizm ich działania jest oparty głównie na oddziaływaniach słabych, m.in. interakcjach hydrofobowych oraz elektrostatycznych między komponentami osłon komórkowych mikroorganizmów i elementami obecnymi w środowisku zewnętrznym. Badacze podejmują działania mające na celu stosowanie szczepów probiotycznych w terapii schorzeń, takich jak: zespół jelita drażliwego, reumatoidalne zapalenie stawów, celiakia, depresja, histeria, CMA (cow milk allergy), autyzm, ból, stres. Istotne jest, iż skuteczne działanie probiotyków uzależnione jest nie tylko od składu mieszanin, ale także od wielkości stosowanych dawek [55].

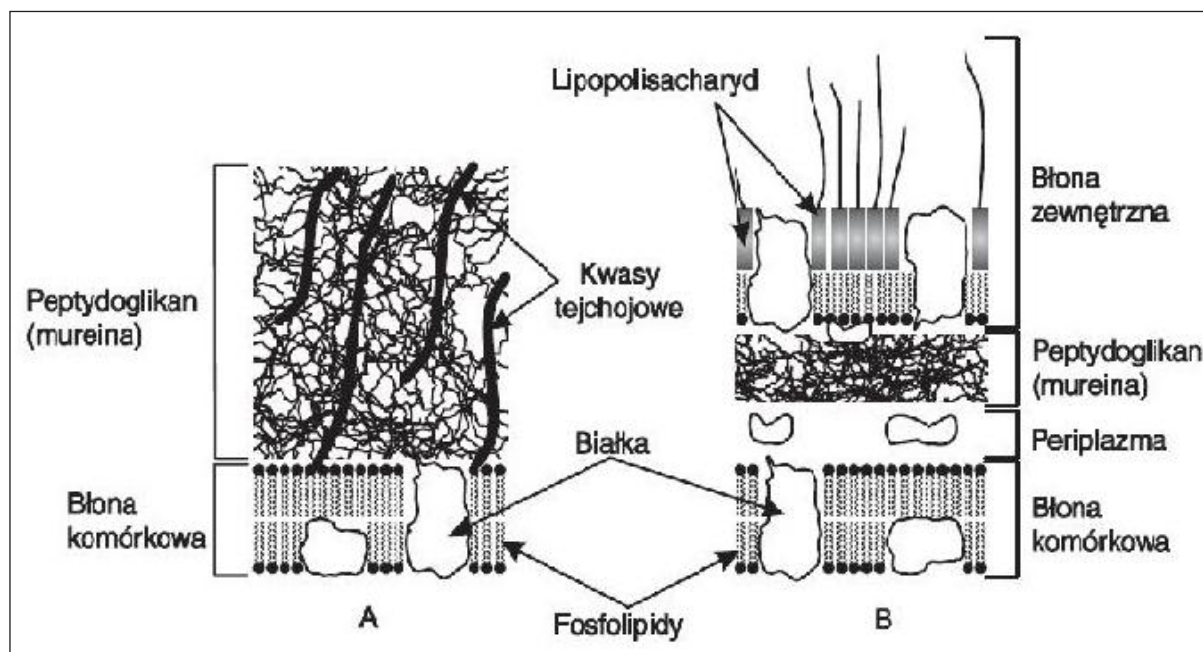
Aktywne biologicznie białka jako składniki osłon komórkowych będą omówione po krótkim przedstawieniu budowy ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich.

ŚCIANA KOMÓRKOWA BAKTERII GRAM-DODATNICH

Ściana komórkowa jest jednym z najbardziej skomplikowanych pod względem budowy składnikiem komórki prokariotycznej. Stanowi zewnętrzną osłonę protoplastu i ma to zasadnicze znaczenie dla komórki. Tworzony przez nią sztywny egzoszkielet nadaje kształt i chroni przed uszkodzeniami wywołanymi przez czynniki mechaniczne oraz zmianami ciśnienia, mogącymi prowadzić do szoku osmotycznego, a w konsekwencji do lizy komórki. Budowa ściany komórkowej bakterii stanowi podstawę ich podziału na bakterie Gram-ujemne oraz Gram-dodatnie. Pierwsza grupa charakteryzuje się bardziej złożoną budową ściany komórkowej oprócz błony cytoplazmatycznej, peptydoglikanu czyli mureiny oraz białek występujących w ścianie komórkowej obu grup, wyróżnia się w niej elementy charakterystyczne wyłącznie dla bakterii Gram-ujemnych lub tylko dla Gram-dodatnich. Dla przedstawicieli pierwszej z nich charakterystyczna jest głównie obecność błony zewnętrznej, w której zakotwiczone są lipopolisacharydy (LPS). Występują w niej również lipoproteiny, a także poryny. Bakterie Gram-dodatnie cechuje natomiast znacznie wyższa w porównaniu do Gram-ujemnych, zawartość peptydoglikanu oraz obecność kwasów teichojowych i teichuronowych [79]. W obrębie bakterii Gram-dodatnich struktura ściany komórkowej jest zróżnicowana, gdyż niektóre z nich wytwarzają otoczkę polisacharydową, a inne krystaliczną, białkową warstwę powierzchniową [89]. Z kolei w przypadku gatunków przetrwalnikujących np. *Bacillus subtilis* wytwarzane są morfologicznie odrębne komórki potomne w wyniku asymetrycznego podziału komórki [54]. U bakterii Gram-dodatnich wyróżnia się także takie, które po podziale komórkowym pozostają złączone ścianą komórkową, a efektem jest wzrost w postaci łańcuszka sąsiadujących komórek, których ściany komórkowe nie są odseparowane. Dotyczy to np. bakterii z rodzaju *Streptococcus* lub wzrastających w postaci grona bakterii z rodzaju *Staphylococcus* [63]. Bakterie Gram-dodatnie odznaczają się prostą budową ściany komórkowej, o jednolitej strukturze i grubości w granicach 20-40 nm. Oprócz białek jej najważniejszym składnikiem jest peptydoglikan - heteropolimer składający się z podjednostek disacharydowych. Są one tworzone przez naprzemiennie połączone wiązaniem β -1,4-glikozydowym, cząsteczki N-acetyloglukozaminy i kwasu N-acetylmuraminowego, do którego podłączone są podjednostki tetrapeptydu [26]. Łańcuchy glikanowe są zróżnicowane pod względem długości, mogą zawierać 5-30 podjednostek, w zależności od gatunku [27]. Tetrapeptyd zbudowany jest z połączonych ze sobą kolejno aminokwasów: L-alaniny, D-glutaminy, L-lizyny i D-alaniny. Tetrapeptydy są krzyżowo połączone z innymi peptydami związanymi z sacharydowym łańcuchem, w wyniku czego powstaje otaczająca komórkę trójwymiarowa sieć tworząca egzoszkielet [26]. Dodatkowe elementy ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich to kwasy teichojowe, lipoteichojowe i teichuronowe, polifosforany oraz węglowodany [30]. Kwasy teichojowe i teichuronowe to anionowe polimery. Składają się z cząsteczek fosforanów: poliglicerolu, polirybitolu lub poliglukozy. Mogą być glikozylowane i/lub estryfikowane aminokwasami [22]. Kwasy

teichojowe to struktury, w których zakotwiczone są białka enzymatyczne [32]. Kwasy lipoteichojowe są anionowymi polimerami, zakotwiczone w zewnętrznej warstwie membrany cytoplazmatycznej poprzez fragment lipidowy. Przechodzą przez mureinę, prezentując się na

zakotwiczone w mureinie kwas lipoteichojowy jest powszechnym antygenem występującym u rodzaju *Bifidobacterium*. Na powierzchni ściany komórkowej występują także białkowe ligandy zaangażowane w adhezję komórek [6]. Oprócz nich występują także



Ryc. 1. Budowa ściany komórkowej bakterii; A – Gram-dodatnich, B – Gram-ujemnych (na podstawie [18] zmodyfikowano)

powierzchni komórek. Ich funkcja nie jest dokładnie znana [22]. U wszystkich bakterii Gram-dodatnich, z wyjątkiem gatunku *Streptococcus pneumoniae*, struktura chemiczna kwasów lipoteichojowych i teichojowych jest zawsze różna [81]. Na ryc. 1 przedstawiono schemat budowy ściany komórkowej.

W wielu bakteriach Gram-dodatnich występują modyfikacje w ich ścianie komórkowej. Mogą dotyczyć m.in. O-acetylacji cząsteczek kwasu N-acetylmuraminowego w pozycji C-6 [94]. Mechanizm tej reakcji nie jest znany, jednak wiadomo, że nadaje oporność komórkom bakterii Gram-dodatnich na lizozym [8].

ŚCIANA KOMÓRKOWA BAKTERII Z RODZAJU *BIFIDOBACTERIUM*

Ściana komórkowa *Bifidobacterii* ma budowę charakterystyczną dla bakterii Gram-dodatnich, ponieważ jej podstawą jest gruba warstwa peptydoglikanu. Jej struktura zbudowana jest z kwasu muraminowego, N-acetylo-D-glukozaminy, ornityny, kwasu asparaginowego, kwasu glutaminowego, alaniny i seryny, które występują w określonym stosunku 1:1:1:1:3:2:1 [48]. Nagaoka i wsp. (1995) wskazują, że dodatkowym komponentem zewnętrznej osłony komórki jest także L-ramnoza [61]. Oceniono, iż ściana komórkowa tych bakterii zawiera znaczące ilości polisacharydów, zbudowanych zwykle z galaktozy i glukozy, często w połączeniu z ramnozą. W badaniach wykazano, iż

białkowe czynniki odpowiedzialne za autoagregację komórek [10].

BIAŁKA ZWIĄZANE Z OSŁONAMI KOMÓRKOWYMI BAKTERII GRAM-DODATNIH ORAZ ICH FUNKCJE

Bakterie Gram-dodatnie syntetyzują różnorodne białka, z których część ulega translokacji przez błonę cytoplazmatyczną i jest wydzielana poza komórkę. Białka, które w ten sposób opuszczają protoplast są znakowane za pomocą peptydów sygnałowych [7]. Zazwyczaj te peptydy składają się z 15-30 aminokwasów hydrofobowych, a terminalna sekwencja ich N-końca jest oznaczona przez reszty naładowane dodatnio [19,88]. Po translokacji przez membranę cytoplazmatyczną, element sygnałowy jest degradowany przez odpowiednie enzymy – peptydazy sygnałowe [16]. Białka ulegające sekrecji na zewnątrz komórki są zaangażowane m.in. w komunikację międzykomórkową, eliminację szczepów konkurencyjnych, pozyskiwanie składników odżywczych, usuwanie związków toksycznych ze środowiska czy determinowanie wirulencji [95]. Pod koniec lat 80 ub.w. wykazano, że bakterie Gram-dodatnie wykształciły unikalne mechanizmy, dzięki którym mogą wiązać białka na powierzchni osłony zewnętrznej. Białka oddziałują za pośrednictwem wiązań kowalencyjnych, niekowalencyjnych z peptydoglikanem oraz innymi polimerami ściany komórkowej, takimi jak np. kwasy teichojowe [63].

Białka powierzchniowe są związane na powierzchni membrany cytoplazmatycznej lub ściany komórkowej. Za kotwiczenie w pierwszej z nich odpowiadają segmenty transmembranowe lub modyfikacje lipidowe katalizowane przez transferazę diacyloglicerolową Lgt i jest to tzw. „lipbox”. Inne elementy są odpowiedzialne za kotwiczenie w ścianie komórkowej. Są to, wykazujące duże powinowactwo do peptydoglikanu, C-końcowe sekwencje wiążące [96]. Przykładem jest białko A, występujące u gronkowców, które ma sekwencję sygnałową kierującą białka do ściany komórkowej. Jest zbudowane z peptydu zawierającego 35 reszt aminokwasowych i motyw LPXTG, domenę hydrofobową i dodatnio naładowany łańcuch [85]. Motyw ten jest również charakterystyczny dla bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* [29,48]. Sekwencje sygnałowe bakterii Gram-dodatnich mają oprócz wspomnianego, także inne motywy różniące się sekwencją (tabela 3) [97]. Białka powierzchniowe mają także N-końcową sekwencję sygnałową, umożliwiającą im transport przez błonę komórkową [3]. Wtórne polimery ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich, takie jak kwasy teichojowe, lipoteichojowe i teichuronowe funkcjonują jako struktury kotwiczące białka w warstwie powierzchniowej, określonej jako warstwa S (S-layer) [82,83].

Tabela 3. Przykłady występujących u bakterii Gram-dodatnich sekwencji sygnałowych biorących udział w translokacji białek [97]

Mikroorganizm	C-końcowa sekwencja sygnałowa
<i>Actinomyces naeslundii</i>	LPLTG
<i>Bacillus anthracis</i>	NPKTG
<i>Clostridium diphtheriae</i>	LPLTG
<i>C. diphtheriae</i>	LAFTG
<i>C. diphtheriae</i>	LALTG
<i>C. diphtheriae</i>	LGNTG
<i>Listeria monocytogenes</i>	LPTTG
<i>L. monocytogenes</i>	LPEAG
<i>Streptococcus pyogenes</i>	LPASG
<i>S. aureus</i>	LPKTG
<i>S. aureus</i>	NPQTN

KOTWICZENIE BIAŁEK POWIERZCHNIOWYCH W OSŁONACH KOMÓRKOWYCH

Obecnie znanych jest sześć mechanizmów kotwiczenia białek w osłonach komórkowych bakterii Gram-dodatnich [12,13]. Pierwszy z nich polega na sortazozależnym wiązaniu białek powierzchniowych z sygnałem sortowania, do osłon komórkowych [85]. Drugi, to mechanizm obserwowany u *Streptococcus pneumoniae*, polegający na łączeniu białek powierzchniowych z choliną, wchodzącą w skład kwasów teichojowych [97]. Trzeci, sprowadza się do wiązania białek powierzchniowych do kwasów

lipoteichojowych [37]. Cztery, polega na ulokowaniu białek powierzchniowych w błonie cytoplazmatycznej za pośrednictwem α -helikalnej membranowej struktury kotwiczącej. Dwa ostatnie mechanizmy są charakterystyczne głównie dla *Listeria monocytogenes* [43], przy czym piąty sposób występujący też u *Staphylococcus aureus*, prezentuje umiejscowienie białek powierzchniowych w błonie plazmatycznej poprzez zmodyfikowaną N-terminalną cząsteczkę diacyloglicerolu [64,68], natomiast szósty sposób opisuje reasocjację adhezyn także u *Streptococcus pyogenes* [72]. Wiedza na temat kotwiczenia białek w osłonach komórkowych u bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* jest ograniczona. Badania wskazują na kotwiczenie białek za pomocą sekwencji N- i C-końcowych [99].

Funkcje białek związanych z powierzchnią ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich są bardzo zróżnicowane. Niektóre z nich są zaangażowane w syntezę i modyfikowanie peptydoglikanu podczas wzrostu i podziału komórki [33]. Są to m.in. białka wiążące penicylinę, oznaczane też jako PBPs. Wiążą one łańcuchy peptydoglikanu, a tym samym uczestniczą w syntezie ściany komórkowej [74]. Białka powierzchniowe patogenów Gram-dodatnich umożliwiają im zasiedlanie organizmu gospodarza [90]. Niektóre należące do grupy bakteryjnych adhezyn białka powierzchniowe mogą oddziaływać ze składnikami macierzy zewnątrzkomórkowej, w tym z lamininą, fibronektyną, kolagenem i uczestniczyć w adhezji do komórek gospodarza [73]. Są to występujące u *Enterococcus faecium* białko Acm, u *Enterococcus faecalis* białko Ace, u *Staphylococcus aureus* białko Cna [62]. Zidentyfikowane zostały także białka, które przyczyniają się do eliminowania patogenów z organizmu gospodarza. Szczep *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4365 syntetyzuje białko, zakotwiczone w warstwie S, które ma zdolność do hamowania infekcji wywołanej przez wirusa JUNV. Białko to ma status GRAS (generally recognized as safe) i jest uznawane za czynnik mogący hamować kilka rodzajów wirusów [57]. Część białek powierzchniowych ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich pełni funkcje enzymatyczne, m.in. enolaza [9], receptorowe, w tym receptory penicyliny i innych antybiotyków β -laktamowych [50], a także immunomodulujące [100].

BIAŁKA POWIERZCHNIOWE WYSTĘPUJĄCE U BAKTERII Z RODZAJU BIFIDOBACTERIUM

Komponenty związane z powierzchnią osłon komórkowych bakterii Gram-dodatnich są w istotny sposób zaangażowane w oddziaływanie z innymi komórkami, a także ze składnikami środowiska, w którym bytują. Elementem charakterystycznym dla grupy białek zakotwiczonych w obrębie ściany komórkowej, mogących wchodzić w takie interakcje, jest motyw LPXTG [97]. Sekwencja ta oraz lipoproteina BopA są zaangażowane w utrzymywanie bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* w naturalnym środowisku bytowania [29,48]. Większość białek z motywem LPXTG, zakodowanych w genomach *Bifidobacterium*, nie została poznana. Zidentyfikowano natomiast w niewiel-

kim stopniu konserwatywny homolog białka FimA [47], a także kilka wysoce konserwatywnych genów kodujących sortazy oraz analogi genów *tadABC*, które mogą być zaangażowane w składanie pilusów odpowiadających za adhezję. Odpowiednik genu *tadA* koduje enzym, który prawdopodobnie bierze udział w sekrecji prepiliny FimA, a geny *tadBC* systemy jej transportu [38].

Badania przeprowadzone przez Fujiwara i wsp. dostarczyły informacji o antyadhezyjnych właściwościach zewnątrzkomórkowego białka syntetyzowanego przez *Bifidobacterium longum* SBT 2928. Zidentyfikowane białko BIF hamuje wiązanie enterotoksycznych bakterii *Escherichia coli* Pb176 do komórek linii komórkowej ludzkiego nabłonka jelitowego HCT-8 w sposób zależny od stężenia białka. Mechanizm reakcji sprowadza się do blokowania receptora GA1, ekspresjonowanego na powierzchni komórek pochodzących z badanej linii komórkowej, przez frakcję białek zawierającą czynnik BIF. Dzięki temu następuje inhibicja interakcji między CFA-II (czynnik kolonizacji – fimbrie) prezentowanym na powierzchni badanego szczepu *E. coli* z receptorem GA1, co prowadzi do zahamowania wiązania patogenu z komórkami nabłonka jelitowego [23].

Badania w kierunku analizy funkcjonalnej genomu *Bifidobacterium breve* UCC2003, dostarczają dalszych informacji. Zlokalizowano białka z C-końcowym motywem LPXTG, który warunkuje biosyntezę pilusów lub sortazo-zależne kotwiczenie białek w warstwach peptydoglikanu. Siedem spośród należących do tej grupy białek, zostało zakwalifikowanych jako potencjalne podjednostki pilin, a dwa inne ApuB oraz GalA jako zewnątrzkomórkowe enzymy o charakterze glikozydaz zaangażowanych w hydrolizę polisacharydów zawierających glukozę i galaktozę [69,70]. Zidentyfikowano także serynowy inhibitor proteaz – serpinę, która prawdopodobnie oddziałuje na przewód pokarmowy ssaków [34].

Badania prowadzone przez Gonzalez-Rodriguez i wsp., poszerzają wiedzę na temat występujących u *Bifidobacterium bifidum* cząsteczek powierzchniowych zaangażowanych w adhezję do komórek ludzkiego nabłonka jelitowego. W eksperymencie przebadano dwanaście szczepów tego gatunku. Cztery spośród nich to jest: *B. bifidum* A8, LMG13195, DSM20456, DSM20239, wykazywały zdolność do agregacji. Czynnikiem umożliwiającym wystąpienie reakcji była transaldolaza, ulokowana na powierzchni komórek bakteryjnych. Wyniki doświadczenia wskazują, iż związany z osłonami komórkowymi

enzym może odgrywać istotną rolę w kolonizacji nabłonka jelit [28].

Candela i wsp. wykazali oddziaływanie między bakteryjną enolazą zakotwiczoną w warstwach powierzchniowych komórek testowanych bifidobakterii, a ludzkim plazminogenem. Stwierdzono, że ten podstawowy enzym szlaku glikolizy, eksponowany na powierzchni komórek jest także receptorem prekursora plazminy u ludzi. Zaangażowane we wspomnianą reakcję były gatunki *B. bifidum*, *B. breve*, *B. lactis* i *B. longum*. Wiązanie plazminogenu przez enolazę na powierzchni komórek bakteryjnych oraz zmienienie go w postać aktywną – plazminę, stanowi mechanizm usprawniający ich migrację w organizmie gospodarza oraz wspomagający kolonizację tkanek [9].

W badaniach prowadzonych przez Wang i wsp. zidentyfikowano bakteryjny czynnik, który najprawdopodobniej jest zaangażowany w stymulowanie odpowiedzi immunologicznej w organizmie gospodarza. Doświadczenia prowadzone na linii ludzkich komórek nabłonka jelitowego Caco-2. W czasie eksperymentu oceniano przeciwzapalne efekty uzyskiwane po zaaplikowaniu szczepu *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12. Badania ujawniły obecność czynnika mogącego odpowiadać za tę reakcję, wydzielanego przez testowany szczep. Charakterystycznymi cechami tego czynnika są rozpuszczalność, białkowy charakter, masa cząsteczkowa 50 kDa, stabilność w różnych warunkach (temperatura i pH) [100].

Garrido i wsp. wykorzystali technikę macierzy, do zidentyfikowania u gatunku *Bifidobacterium infantis*, dziesięciu spośród dwudziestu białek należących do F1SBPs (Family 1 of solute binding proteins), które są odpowiedzialne za import oligosacharydów. Poznane białka wykazywały powinowactwo do swoistych oligosacharydów występujących w ludzkim mleku (HMO – human milk oligosaccharides) i jelitach. Wykazano, że F1SBPs indukowane HMO wiązały się do komórek nabłonka jelitowego, warunkując tym samym adhezję bakterii *B. infantis* [24].

Bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* mają korzystny wpływ na organizm ludzki, znajdują się w jelitach i stanowią naturalną mikroflorę jelit. Namnażaniu ich sprzyja spożywanie mlecznych produktów fermentowanych. Przedstawione wyniki badań, które dotyczą wielokierunkowego działania tych bakterii. Mechanizm działania bifidobakterii musi być dokładnie zbadany. Wydaje się, że wykorzystanie ich stanowi obiecującą perspektywę w profilaktyce i leczeniu schorzeń układu pokarmowego człowieka.

PISMIENICTWO

- [1] Agrawal A., Houghton L.A., Morris J., Reilly B., Guyonnet D., Goupil Feuillerat N., Schlumberger A., Jakob S., Whorwell P.J.: Clinical trial: the effects of a fermented milk product containing *Bifidobacterium lactis* DN-173 010 on abdominal distension and gastrointestinal transit in irritable bowel syndrome with constipation. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 2008; 29: 104-114
- [2] Ataie-Jafari A., Larijani B., Majd H.A., Tahbaz F.: Cholesterol-lowering effect of probiotic yogurt in comparison with ordinary yogurt in mildly to moderately hypercholesterolemic subjects. *Ann. Nutr. Metab.*, 2009; 54: 22-27
- [3] Bae T., Schneewind O.: The YSIRK-G/S motif of staphylococcal protein A and its role in efficiency of signal peptide processing. *J. Bacteriol.*, 2003; 185: 2910-2919
- [4] Beerens H.: Detection of bifidobacteria by using propionic acid as a selective agent. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1991; 57: 2418-2419
- [5] Bezkorovainy A.: Ecology of Bifidobacteria. W: *Biochemistry and Physiology of Bifidobacteria*, red.: A. Bezkorovainy, R. Miller-Catchpole., CRC Press Inc, Boca Raton, Florida, 1989, 29-72
- [6] Bivati B., Mattarelli P.: Genus I *Bifidobacterium*. W: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, t.5, red.: W.B. Whitman, M. Goodfellow, P. Kämpfer, H.J. Busse, M.E. Trujillo, W. Ludwig, K. Suzuki, A. Parte. Springer, New York 2009, 171-176
- [7] Blobel G.: Intracellular protein topogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980; 77: 1496-1500
- [8] Brumfitt W., Wardlaw A.C., Park J.T.: Development of lysozyme-resistance in *Micrococcus lysodeikticus* and its association with increased O-acetyl content of the cell wall. *Nature*, 1958; 181: 1783-1784
- [9] Candela M., Biagi E., Centanni M., Turrone S., Vici M., Musiani F., Vitali B., Bergmann S., Hammerschmidt S., Brigidi P.: Bifidobacterial enolase, a cell surface receptor for human plasminogen involved in the interaction with the host. *Microbiology*, 2009; 155: 3294-3303
- [10] Canzi E., Guglielmetti S., Mora D., Tamagnini I., Parini C.: Conditions affecting cell surface properties of human intestinal bifidobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2005; 88: 207-219
- [11] Catala I., Butel M.J., Bensaada M., Popot F., Tessedre A.C., Rimbault A., Szylit O.: Oligofructose contributes to the protective role of bifidobacteria in experimental necrotising enterocolitis in quails. *J. Med. Microbiol.*, 1999; 48: 89-94
- [12] Chhatwal G.S.: Anchorless adhesins and invasins of Gram-positive bacteria: a new class of virulence factors. *Trends Microbiol.*, 2002; 10: 205-208
- [13] Cossart P., Jonquieres R.: Sortase, a universal target for therapeutic agents against gram-positive bacteria? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000; 97: 5013-5015
- [14] Czerwionka-Szaflarska M., Romańczuk B.: Probiotyki w profilaktyce i leczeniu wybranych schorzeń przewodu pokarmowego u dzieci. *Forum Medycyny Rodzinnej*, 2010; 4: 135-140
- [15] Dai D., Walker W.A.: Protective nutrients and bacterial colonization in the immature human gut. *Adv. Pediatr.*, 1999; 46: 353-382
- [16] Dalbey R.E., Lively M.O., Bron S., van Dijk J.M.: The chemistry and enzymology of the type I signal peptidases. *Protein Sci.*, 1997; 6: 1129-1138
- [17] Deguchi Y., Morishita T., Mutai M.: Comparative studies on synthesis of water-soluble vitamins among human species of bifidobacteria. *Agric. Biol. Chem.*, 1985; 49: 13-19
- [18] Drzewiecki A.: Morfologia i fizjologia bakterii. W: *Mikrobiologia: podręcznik dla pielęgniarzek położnych i ratowników medycznych*, red. P.B. Heczko. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2006, 88-90
- [19] Emr S.D., Hedgpeth J., Clément J.M., Silhavy T.J., Hofnung M.: Sequence analysis of mutations that prevent export of lambda receptor, an *Escherichia coli* outer membrane protein. *Nature*, 1980; 285: 82-85
- [20] FAO/WHO: Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, (Canada), 2002. <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/dockets/95s0316/95s-0316-rpt0282-tab-03-ref-19-joint-faowho-vol219.pdf> (01.09.2012)
- [21] Felis G.E., Dellaglio F.: Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. *Curr. Issues Intest. Microbiol.*, 2007; 8: 44-61
- [22] Fischer W.: Lipoteichoic acids and lipoglycans. W: *Bacterial cell wall*, red.: J.M. Ghuyssen, R. Hakenbeck. Elsevier Science Publishing B.V., Amsterdam 1994, 199-216
- [23] Fujiwara S., Hashiba H., Hirota T., Forstner J.F.: Inhibition of the binding of enterotoxigenic *Escherichia coli* Pb176 to human intestinal epithelial cell line HCT-8 by an extracellular protein fraction containing BIF of *Bifidobacterium longum* SBT2928: suggestive evidence of blocking of the binding receptor ganglioside GM1 on the cell surface. *Int. J. Food Microbiol.*, 2001; 67: 97-106
- [24] Garrido D., Kim J.H., German J.B., Raybould H.E., Mills D.A.: Oligosaccharide binding proteins from *Bifidobacterium longum* subsp. infantis reveal a preference for host glycans. *PLoS One*, 2011; 6: e17315
- [25] Gibson G.R., Wang X.: Enrichment of bifidobacteria from human gut contents by oligofructose using continuous culture. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1994; 118: 121-127
- [26] Giesbrecht P., Kersten T., Maidhof H., Wecke J.: Staphylococcal cell wall: morphogenesis and fatal variations in the presence of penicillin. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 1998; 62: 1371-1414
- [27] Glauner B., Höltje J.V., Schwarz U.: The composition of the murein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 1988; 263: 10088-10095
- [28] González-Rodríguez I., Sánchez B., Ruiz L., Turrone F., Ventura M., Ruas-Madiedo P., Gueimonde M., Margolles A.: Role of extracellular transaldolase from *Bifidobacterium bifidum* in mucin adhesion and aggregation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2012; 78: 3992-3998
- [29] Guglielmetti S., Tamagnini I., Mora D., Minuzzo M., Scarafoni A., Arioli S., Hellman J., Karp M., Parini C.: Implication of an outer surface lipoprotein in adhesion of *Bifidobacterium bifidum* to Caco-2 cells. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2008; 74: 4695-4702
- [30] Hancock I.C.: Bacterial cell surface carbohydrates: structure and assembly. *Biochem. Soc. Trans.*, 1997; 25: 183-187
- [31] He T., Priebe M.G., Zhong Y., Huang C., Harmsen H.J., Raangs G.C., Antoine J.M., Welling G.W., Vonk R.J.: Effects of yogurt and bifidobacteria supplementation on the colonic microbiota in lactose-intolerant subjects. *J. Appl. Microbiol.*, 2008; 104: 595-604
- [32] Herbold D.R., Glaser L.: Interaction of N-acetylmuramic acid L-alanine amides with cell wall polymers. *J. Biol. Chem.*, 1975; 250: 7231-7238
- [33] Höltje J.V.: Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 1998; 62: 181-203
- [34] Ivanov D., Emonet C., Foata F., Affolter M., Delley M., Fisseha M., Blum-Sperisen S., Kochhar S., Arigoni F.: A serpin from the gut bacterium *Bifidobacterium longum* inhibits eukaryotic elastase-like serine proteases. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 17246-17252
- [35] Jędrzejczak-Krzepkowska M., Bielecki S.: Bifidobakterie i stymulujące ich wzrost fruktany typu inuliny. *Postępy Bioch.*, 2011; 57: 1-9
- [36] Ji G.E., Lee S.K., Kim I.H.: Improved selective medium for isolation and enumeration of *Bifidobacterium* sp. *Kor. J. Food Sci. Technol.*, 1994; 26: 526-531

- [37] Jonquières R., Bierre H., Fiedler F., Gounon P., Cossart P.: Interaction between the protein InlB of *Listeria monocytogenes* and lipoteichoic acid: a novel mechanism of protein association at the surface of gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.*, 1999; 34: 902-914
- [38] Kachlany S.C., Planet P.J., DeSalle R., Fine D.H., Figurski D.H.: Genes for tight adherence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: from plaque to plague to pond scum. *Trends Microbiol.*, 2001; 9: 429-437
- [39] Kiessling G., Schneider J., Jahreis G.: Long-term consumption of fermented dairy products over 6 months increases HDL cholesterol. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 2002; 56: 843-849
- [40] Kim J.Y., Choi Y.O., Ji G.E.: Effect of oral probiotics (*Bifidobacterium lactis* AD011 and *Lactobacillus acidophilus* AD031) administration on ovalbumin-induced food allergy mouse model. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2008; 18: 1393-1400
- [41] Kitajima H., Sumida Y., Tanaka R., Yuki N., Takayama H., Fujimura M.: Early administration of *Bifidobacterium breve* to preterm infants: randomised controlled trial. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.*, 1997; 76: F101-F107
- [42] Klijn A., Mercenier A., Arigoni F.: Lessons from the genomes of bifidobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2005; 29: 491-509
- [43] Kocks C., Gouin E., Tabouret M., Berche P., Ohayon H., Cossart P.: *L. monocytogenes*-induced actin assembly requires the actA gene product, a surface protein. *Cell*, 1992; 68: 521-531
- [44] Kunz C., Rudloff S.: Biological function of oligosaccharides in human milk. *Acta Paediatr.*, 1993; 82: 903-912
- [45] Kwinta P., Dubiel B.: Ocena skuteczności probiotyków w zapobieganiu chorobom infekcyjnym u dzieci uczęszczających do żłobka. <http://www.mp.pl/artykuly/?aid=26724> (01.08.2012)
- [46] Lapiere L., Undeland P., Cox L.J.: Lithium chloride-sodium propionate agar for the enumeration of bifidobacteria in fermented dairy products. *J. Dairy Sci.*, 1992; 75: 1192-1196
- [47] Lee J.H., Karamychev V.N., Kozyavkin S.A., Mills D., Pavlov A.R., Pavlova N.V., Polouchine N.N., Richardson P.M., Shakhova V.V., Slesarev A.I., Weimer B., O'Sullivan D.J.: Comparative genomic analysis of the gut bacterium *Bifidobacterium longum* reveals loci susceptible to deletion during pure culture growth. *BMC Genomics*, 2008; 9: 247
- [48] Lee J.H., O'Sullivan D.J.: Genomic insights into bifidobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2010; 74: 378-416
- [49] Leuschner R.G., Bew J., Simpson P., Ross P.R., Stanton C.: A collaborative study of a method for the enumeration of probiotic bifidobacteria in animal feed. *Int. J. Food Microbiol.*, 2003; 83: 161-170
- [50] Libudzisz Z.: Bakterie fermentacji mlekowej. W: *Mikrobiologia techniczna. Mikroorganizmy w biotechnologii, ochronie środowiska i produkcji żywności*, t.2, red.: Z. Libudzisz, K. Kowal, Z. Żakowska. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2000, 25-58
- [51] Libudzisz Z.: Ekosystem jelitowy a probiotyki. Bakterie fermentacji mlekowej. *Metabolizm, genetyka, wykorzystanie*. W: *Materiały Naukowe Sympozjum*, 2003: 76
- [52] Lim K.S., Huh C.S., Baek Y.J., Kim H.U.: A selective enumeration medium for bifidobacteria in fermented dairy products. *J. Dairy Sci.*, 1995; 78: 2108-2112
- [53] Locascio M., Holgado A.P., Perdigon G., Oliver G.: Enteric bifidobacteria: isolation from human infants and challenge studies in mice. *Can. J. Microbiol.*, 2001; 47: 1048-1052
- [54] Losick R., Stragier P.: Crisscross regulation of cell-type-specific gene expression during development in *B. subtilis*. *Nature*, 1992; 355: 601-604
- [55] Madsen K.L.: The use of probiotics in gastrointestinal disease. *Can. J. Gastroenterol.*, 2001; 15: 817-822
- [56] Mariat D., Firmesse O., Levenez F., Guimaraes V., Sokol H., Doré J., Corthier G., Furet J.P.: The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol.*, 2009; 9: 123
- [57] Martínez M.G., Prado Acosta M., Candurra N.A., Ruzal S.M.: S-layer proteins of *Lactobacillus acidophilus* inhibits JUNV infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2012; 422: 590-595
- [58] McCarthy J., O'Mahony L., O'Callaghan L., Sheil B., Vaughan E.E., Fitzsimons N., Fitzgibbon J., O'Sullivan G.C., Kiely B., Collins J.K., Shanahan F.: Double blind, placebo controlled trial of two probiotic strains in interleukin 10 knockout mice and mechanistic link with cytokine balance. *Gut*, 2003; 52: 975-980
- [59] Moro G., Arslanoglu S.: Reproducing the bifidogenic effect of human milk in formula-fed infants: why and how? *Acta Paediatr.*, 2005; 94 (Suppl. s449): 14-17
- [60] Munoa F.J., Pares R.: Selective medium for isolation and enumeration of *Bifidobacterium* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1988; 54: 1715-1718
- [61] Nagaoka M., Shibata H., Kimura I., Hashimoto S., Kimura K., Sawada H., Yokokura T.: Structural studies on a cell wall polysaccharide from *Bifidobacterium longum* YIT4028. *Carbohydr. Res.*, 1995; 274: 245-249
- [62] Nallapareddy S.R., Weinstock G.M., Murray B.E.: Clinical isolates of *Enterococcus faecium* exhibit strain-specific collagen binding mediated by Acm, a new member of the MSCRAMM family. *Mol. Microbiol.*, 2003; 47: 1733-1747
- [63] Navarre W.W., Daefler S., Schneewind O.: Cell wall sorting of lipoproteins in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, 1996; 178: 441-446
- [64] Navarre W.W., Schneewind O.: Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 1999; 63: 174-229
- [65] Nebra Y., Blanch A.R.: A new selective medium for *Bifidobacterium* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999; 65: 5173-5176
- [66] Nestlé NAN Pro. <http://www.mleko-nan.pl> (01.09.2012)
- [67] Newburg D.S.: Oligosaccharides in human milk and bacterial colonisation. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 2000; 30 (Suppl. 2): S8-S17
- [68] Nielsen J.B., Lampen J.O.: Glyceride-cysteine lipoproteins and secretion by Gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.*, 1982; 152: 315-322
- [69] O'Connell-Motherway M., Fitzgerald G.F., Neiryneck S., Ryan S., Steidler L., van Sinderen D.: Characterization of ApuB, an extracellular type II amylopullulanase from *Bifidobacterium breve* UCC2003. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2008; 74: 6271-6279
- [70] O'Connell Motherway M., Fitzgerald G.F., van Sinderen D.: Metabolism of a plant derived galactose-containing polysaccharide by *Bifidobacterium breve* UCC2003. *Microb. Biotechnol.*, 2011; 4: 403-416
- [71] O'Mahony L., McCarthy J., Kelly P., Hurley G., Luo F., Chen K., O'Sullivan G.C., Kiely B., Collins J.K., Shanahan F., Quigley E.M.: *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in irritable bowel syndrome: symptom responses and relationship to cytokine profiles. *Gastroenterology*, 2005; 128: 541-551
- [72] Pancholi V., Fischetti V.A.: Regulation of phosphorylation of human pharyngeal cell proteins by group A streptococcal surface dehydrogenase: signal transduction between streptococci and pharyngeal cells. *J. Exp. Med.*, 1997; 186: 1633-1643
- [73] Patti J.M., Allen B.L., McGavin M.J., Höök M.: MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu. Rev. Microbiol.*, 1994; 48: 585-617
- [74] Popham D.L., Young K.D.: Role of penicillin-binding proteins in bacterial cell morphogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2003; 6: 594-599
- [75] Qiao H., Duffy L.C., Griffiths E., Dryja D., Leavens A., Rossman J., Rich G., Riepenhoff-Talty M., Locniskar M.: Immune responses in rhesus rotavirus-challenged BALB/c mice treated with bifidobacteria and prebiotic supplements. *Pediatr. Res.*, 2002; 51: 750-755
- [76] Rafter J., Bennett M., Caderni G., Clune Y., Hughes R., Karlsson P.C., Klinder A., O'Riordan M., O'Sullivan G.C., Pool-Zobel B., Rech-

- kemmer G., Roller M., Rowland I., Salvadori M., Thijs H., Van Loo J., Watzl B., Collins J.K.: Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2007; 85: 488-496
- [77] Ramakrishna B.S.: The normal bacterial flora of the human intestine and its regulation. *J. Clin. Gastroenterol.*, 2007; 41 (Suppl. 1): S2-S6
- [78] Saavedra J.M., Bauman N.A., Oung I., Perman J.A., Yolken R.H.: Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *Lancet*, 1994; 344: 1046-1049
- [79] Salton M.R.: The bacterial cell envelope - a historical perspective. W: *Bacterial cell wall*, red.: J.M. Ghuysen, R. Hakenbeck. Elsevier Science Publishing B.V., Amsterdam 1994, 1-22
- [80] Samona A., Robinson R.K.: Enumeration of bifidobacteria in dairy products. *J. Soc. Dairy Technol.*, 1991; 44: 64-66
- [81] Sanderson A.R., Strominger J.L., Nathenson S.G.: Chemical structure of teichoic acid from *Staphylococcus aureus*, strain Copenhagen. *J. Biol. Chem.*, 1962; 237: 3603-3613
- [82] Sára M.: Conserved anchoring mechanisms between crystalline cell surface S-layer proteins and secondary cell wall polymers in Gram-positive bacteria? *Trends Microbiol.*, 2001; 9: 47-49
- [83] Sára M., Sleytr U.B.: S-layer proteins. *J. Bacteriol.*, 2000; 182: 859-868
- [84] Schneewind O., Fowler A., Faull K.F.: Structure of the cell wall anchor of surface proteins in *Staphylococcus aureus*. *Science*, 1995; 268: 103-106
- [85] Schneewind O., Mihaylova-Petkov D., Model P.: Cell wall sorting signals in surface proteins of gram-positive bacteria. *EMBO J.*, 1993; 12: 4803-4811
- [86] Sekine K., Toida T., Saito M., Kuboyama M., Kawashima T., Hashimoto Y.: A new morphologically characterized cell wall preparation (whole peptidoglycan) from *Bifidobacterium infantis* with a higher efficacy on the regression of an established tumor in mice. *Cancer Res.*, 1985; 45: 1300-1307
- [87] Shortt C.: The probiotic century: historical and current perspectives. *Trends Food Sci. Technol.*, 1999; 10: 411-417
- [88] Silhavy T.J., Benson S.A., Emr S.D.: Mechanisms of protein localization. *Microbiol. Rev.*, 1983; 47: 313-344
- [89] Sleytr U.B.: Basic and applied s-layer research: an overview. *FEMS Microbiol. Rev.*, 1997; 20: 5-12
- [90] Sonnenburg J.L., Chen C.T., Gordon J.I.: Genomic and metabolic studies of the impact of probiotics on a model gut symbiont and host. *PLoS Biol.*, 2006; 4: e413
- [91] Sozzi T., Brigidi P., Mignot O., Matteuzzi D.: Use of dicloxacillin for the isolation and counting of *Bifidobacteria* from dairy products. *Lait*, 1990; 70: 357-361
- [92] Teraguchi S., Uehara M., Ogasa K., Mitsuoka T.: Enumeration of bifidobacteria in dairy products. *Nihon Saikingaku Zasshi*, 1978; 33: 753-761
- [93] Thurl S., Muller-Werner B., Sawatzki G.: Quantification of individual oligosaccharide compounds from human milk using high-pH anion-exchange chromatography. *Anal. Biochem.*, 1996; 235: 202-206
- [94] Tipper D.J., Strominger J.L.: Isolation of 4-O- β -N-acetylmuramyl-N-acetylglucosamine and 4-O- β -N, 6-O-diacetylmuramyl-N-acetylglucosamine and the structure of the cell wall polysaccharide of *Staphylococcus aureus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1966; 22: 48-56
- [95] Tjalsma H., Antelmann H., Jongbloed J.D., Braun P.G., Darmon E., Dorenbos R., Dubois J.Y., Westers H., Zanen G., Quax W.J., Kuipers O.P., Bron S., Hecker M., van Dijk J.M.: Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: separating the „secrets” of the secretome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2004; 68: 207-233
- [96] Tjalsma H., Bolhuis A., Jongbloed J.D., Bron S., van Dijk J.M.: Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2000; 64: 515-547
- [97] Ton-That H., Marraffini L.A., Schneewind O.: Protein sorting to the cell wall envelope of Gram-positive bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, 2004; 1694: 269-278
- [98] Ventura M., van Sinderen D., Fitzgerald G.F., Zink R.: Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2004; 86: 205-223
- [99] Wada J., Ando T., Kiyohara M., Ashida H., Kitaoka M., Yamaguchi M., Kumagai H., Katayama T., Yamamoto K.: *Bifidobacterium bifidum* lacto-N-biosidase, a critical enzyme for the degradation of human milk oligosaccharides with a type 1 structure. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2008; 74: 3996-4004
- [100] Wang Z., Wang J., Cheng Y., Liu X., Huang Y.: Secreted factors from *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* inhibit NF- κ B-mediated interleukin-8 gene expression in Caco-2 cells. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2011; 8171-8174
- [101] Weichselbaum E.: Probiotics and health: a review of the evidence. *Nutr. Bull.*, 2009; 34: 340-373

Autorzy deklaruja brak potencjalnych konfliktow interesow.