

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

Růst bifidobakterií v přítomnosti rostlinných β -glukosidů

Diplomová práce

Bc. Kateřina Kindlová

Obor studia: Výživa a potraviny

Vedoucí práce: doc. Ing. Věra Neužil Bunešová, Ph.D.

Konzultant: Ing. Nikol Modráčková

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Růst bifidobakterií v přítomnosti rostlinných β -glukosidů" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucí diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 26.4.2021

Poděkování

Ráda bych touto cestou upřímně poděkovala za trpělivost, pečlivost, ochotu a profesionalitu doc. Ing. Věře Neužil Bunešové, Ph.D., jejíž odborné vedení mé bakalářské a diplomové práce mi bylo velkou oporou. Rovněž bych chtěla velmi poděkovat za odborné konzultace, pomoc při práci v laboratoři a motivaci, která mi byla poskytnuta, mé konzultantce Ing. Nikol Modráčkové. Dále bych ráda poděkovala jmenovitě Barbaře Děkanovské za pomoc s technickými problémy. V neposlední řadě děkuji své rodině a blízkým přátelům.

Růst bifidobakterií v přítomnosti rostlinných β -glukosidů

Souhrn

Bifidobakterie patří mezi první kolonizátory gastrointestinálního traktu a mají velký význam pro zdraví člověka v pozdějším životě. Evoluce jejich genomu značně zvýhodnila jejich schopnost využití substrátů ze stravy hostitele. Bifidobakterie mají zakódované velké množství genů podílejících se na metabolismu sacharidů. Velké množství zakódovaných proteinů v genetické informaci se zdá být specializováno na katabolismus oligosacharidů pomocí enzymů glykosylhydroláz, které jsou schopné využít nestravitelné rostlinné polymery. β -glukosidáza je enzym katalyzující hydrolýzu glykosidových vazeb v β -glukosidech za uvolnění glukózy a mohla by hrát významnou roli v probiotickém působení bifidobakterií. β -glukosidy jsou sekundární metabolity rostlin, které se skládají z glukózy a molekuly s alifatickou nebo aromatickou molekulou nazývanou aglykon. Aktivita bifidobakteriálních β -glukosidáz v lidském střevě může změnit biologickou aktivitu a dostupnost rostlinných glukosidů. Cílem této diplomové práce bylo otestovat 115 bifidobakteriálních kmenů patřících do 8 bifidobakteriálních druhů a zjistit jejich potenciál růstu ve fermentačních substrátech tří různých rostlinných β -glukosidů; eskulinu, amygdalinu a arbutinu. Zároveň byla testována aktivita β -glukosidázy pro průkaznost výskytu u jednotlivých kmenů. Užití β -glukosidů se druhově a kmenově lišila. Nejvšestrannější využití měl amygdalin, který dokázalo fermentovat 54 % testovaných kmenů. Druhově pak nejlepší fermentační potenciál mělo *Bifidobacterium dentium*. Aktivita β -glukosidázy byla druhově specifická a její přítomnost zvyšuje dostupnost rostlinných glukosidů uvolňováním aglykonu, který je navíc antimikrobiálně aktivní. Díky tomu může poskytnout lepší přístup ke zdrojům energie a zároveň uvolnit bioaktivní aglykon. Z výsledků vyplývá, že bifidobakterie jsou slibným terapeutickým prostředkem nejen z hlediska širšího využití větších zdrojů energie, ale také jako mikroorganismy, které by se v budoucnu mohly využít pro podporu lékařských účelů.

Klíčová slova: Bifidobakterie, eskulin, arbutin, amygdalin, β -glukosidáza

Bifidobacterial growth in presence of plant β -glucosides

Summary

Bifidobacteria belongs to the first colonizers of the gastrointestinal tract and have substantial importance for human health in later life. The evolution of their genome considerably favored their ability to utilize substrates from the host's diet. Genomic analyzes have shown that these bacteria encode a large number of genes involved in carbohydrate metabolism. A large number of the encoded proteins in the genetic information appear to specialize in the catabolism of oligosaccharides by enzymes glycosylhydrolases, which are able to utilize indigestible plant polymers. β -glucosidase is an enzyme that catalyzes the hydrolysis of glycosidic bonds in β -glucosides to release glucose and could play an essential role in the probiotic action of bifidobacteria. β -glucosides are secondary metabolites of plants that consist of glucose and a molecule with an aliphatic or aromatic molecule called an aglycone. The activity of bifidobacterial β -glucosidases in the human gut may alter the biological activity and availability of plant glucosides. This diploma thesis aimed to test 115 bifidobacterial strains of 8 bifidobacterial species and determine their growth potential in 3 different fermentation plant β -glucosides, such as esculin, amygdalin, and arbutin. At the same time, β -glucosidase activity was tested for evidence of occurrence in individual strains. Utilization of β -glucosides varied by the species and strain level. The most versatile usage was amygdalin, which was fermented by 54 % of the tested strains. *Bifidobacterium dentium* had the best fermentation potential at the species level. The β -glucosidase activity was species-specific, and its presence increases the availability of plant glucosides by releasing antimicrobially active aglycones. As a result, it can provide better access to energy sources while releasing bioactive aglycone. The results show that bifidobacteria are a promising therapeutic tool in terms of the broader use of more significant energy sources and microorganisms that could be used for medical support purposes in the future.

Keywords: Bifidobacteria, esculin, arbutin, amygdalin, β -glucosidase

Obsah

1 Úvod	9
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	10
3 Literární rešerše	11
3.1 Bifidobakterie	11
3.1.1 Kolonizace trávicího traktu	13
3.1.2 Význam pro zdraví člověka	15
3.1.2.1 Kolorektální karcinom	15
3.1.2.2 Průjem.....	16
3.1.2.3 Zánětlivá onemocnění střev	16
3.1.2.4 Kompetitivní vyloučení patogenů	17
3.1.3 Metabolická aktivita	17
3.1.3.1 Glykosylhydrolázy.....	18
3.1.4 Prebiotické substráty pro bifidobakterie	19
3.2 Rostlinné glykosidy	21
3.2.1 Charakteristika.....	21
3.2.2 β -glukosidy	21
3.2.2.1 Eskulin	22
3.2.2.2 Amygdalin.....	25
3.2.2.3 Arbutin	27
4 Metodika	29
4.1 Původ bakteriálních izolátů a ověření jejich identity	29
4.1.1 Bifidobakteriální kultury	29
4.1.2 Kultivace bifidobakterií.....	32
4.1.3 Ověření identity testovaných kmenů	32
4.2 Příprava vzorků pro experiment	32
4.2.1 Postup přípravy média pro kultivaci	32
4.2.2 Kultivace bakteriálních izolátů k testování	32
4.2.3 Kontrola čistoty	33
4.3 Utilizace vybraných β-glukosidů	33
4.3.1 Přehled testovaných substrátů	33
4.4 Měření β-glukosidázové aktivity	34
4.4.1 Enzymaticky	34
4.4.2 Kultivačně pomocí indikátoru	34
5 Výsledky	35

5.1	Utilizace β-glukosidů.....	35
5.2	β-glukosidázová aktivita	42
6	Diskuze	47
7	Závěr.....	52
8	Literatura	53

1 Úvod

Bifidobakterie jsou zdraví prospěšné mikroorganismy, které jako jedny z prvních kolonizují gastrointestinální trakt novorozence a determinují zdravý vývoj jedince prostřednictvím modulace střevní mikrobioty. Kromě člověka jsou přirozenou součástí trávicího traktu také zvířat. Mezi prospěšné vlastnosti bifidobakterií patří například trávení rostlinných sacharidů, produkce mastných kyselin s krátkým řetězcem, zmírnění infekčních průjmů, blokování adheze patogenů na epitel sliznice střev nebo modulace imunitní odpovědi.

Je známo, že evoluční vývoj bifidobakterií umožnil jejich adaptaci na střevní prostředí bohaté na sacharidy. Zdá se, že tato vlastnost je druhově a kmenově specifická. Bifidobakterie mají také genetický potenciál pro expresi širokého spektra glykosidových hydroláz. β -glukosidy se jeví jako potenciálně vhodné substráty, které by mohly mít vliv na biologickou aktivitu bifidobakterií a také ovlivňovat jejich růst v trávicím traktu.

Předmětem diplomové práce bylo zkoumat schopnost vybraných bifidobakteriálních izolátů růst v přítomnosti vybraných β -glukosidů – eskulinu, amygdalinu a arbutinu, otestovat β -glukosidázovou aktivitu bifidobakterií a vyhodnotit výsledky v závislosti na druhu/kmenu a původu testovaných kmenů.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Hypotéza: Předpokládáme, že schopnost bifidobakterií růst v přítomnosti rostlinných β -glukosidů (eskulin, amygdalin, arbutin) souvisí s jejich β -glukosidázovou aktivitou. Tato vlastnost bude druhově či kmenově specifická s možnou kmenovou variabilitou u multihostitelských kmenů.

Cílem této práce je otestovat schopnost β -glukosidázové aktivity vybraných druhů bifidobakterií a sledovat jejich schopnost růst v přítomnosti eskulinu, amygdalinu a arbutinu a vyhodnotit tyto biologické aktivity v závislosti na druhu a původu testovaných kmenů.

3 Literární rešerše

3.1 Bifidobakterie

Bifidobakterie byly poprvé izolovány v roce 1900 Henri Tissierem (Sgrobati a spol.). Jsou charakterizovány jako grampozitivní rozvětvené tyčinky. Mohou se vyskytovat jednotlivě, v řetězcích, nebo shlucích. Nevytváří spory, jsou nepohyblivé a nefilamentární. Jedná se o anaerobní mikroorganismy s fermentačním typem metabolismu (Felis a Dellagio, 2007). Většina z nich jsou obligátními anaeroby avšak některé kmeny mohou tolerovat kyslík za přítomnosti oxidu uhličitého (Simpson et al., 2004).

Ve fylogenetickém stromu rod *Bifidobacterium* (*B.*) spadá do kmene Actinobacteria, který je jeden z nejpočetnějších. Veškeré druhy patřící do tohoto rodu byly identifikovány na základě analýzy genu 16S rRNA a 23S rRNA. Díky této skutečnosti byla vytvořena samostatná fylogenetická větev (Ventura, O'Connell-Motherway, et al., 2007). Dostupnost úplných genomových sekvencí umožnila rekonstrukci fylogeneze jejich genomu (Lugli et al., 2014). Bylo zjištěno, že vývoj bifidobakteriálního genomu je ovlivněn genovým obohacením v průběhu evoluce a tím bifidobakterie předurčil k sacharolytickému životnímu stylu, což v současné době představuje klíčovou genetickou charakteristiku tohoto rodu (Turroni, Milani, Van Sinderen, et al., 2018).

Bifidobakterie se mohou vyskytovat jak v lidském, tak zvířecím těle. Většina v minulosti popsáných druhů byla izolována z lidských výkalů, lidské pochvy, bachoru skotu, odpadních vod, zubního kazu a včelího střeva (Felis & Dellaglio, 2007). Tyto ekologické niky včetně dalších (krev, fermentované potraviny, a další) jsou přímo nebo nepřímo spojeny s intestinálním prostředím člověka/zvířete. Současné znalosti o výskytu a distribuci tohoto rodu nejsou ani zdaleka vyčerpány a stále jsou nacházeny a identifikovány nové druhy (Mattarelli & Biavati, 2018). Bifidobakterie byly izolovány například ze syrového mléka a tepelně neopracovaného sýru – *B. crudilactis* (Delcenserie et al., 2007), z kumysu – *B. mongoliense*, tradičního mongolského kvašeného nápoje z kobyliho mléka (Watanabe et al., 2009) a nebo také i z vodního kefiru – *B. aquikefir* (Laureys et al., 2016). Bifidobakteriální profilování naznačuje podstatný rezervoár dosud neobjevených bakterií hlavně z gastrointestinálního traktu novosvětských opic a popis nově identifikovaných druhů v posledních letech pochází právě z této niky (Lugli et al., 2020) což je zřetelné na obrázku č.1.

Mezi reprezentativní druhy lidského původu patří například *B. longum*, *B. breve*, *B. bifidum*, *B. adolescentis* a *B. pseudocatenulatum*. Druhy živočišného původu jsou *B. pseudolongum*, *B. thermophilus* a *B. animalis*. Další druhy bifidobakterií živočišného původu jsou specifické pro svého hostitele, jako například *B. magnum*, *B. cuniculi*, které byly zatím izolovány pouze ze stolice králíka, *B. pullorum* a *B. galinarum* z kuřecích střev. *B. minium* a *B. subtile* z odpadních vod (Russell et al., 2011).



Obrázek 1: Výskyt bifidobakterií na různých stanovištích a období popisu druhů (upraveno podle (Mattarelli & Blavatí, 2018))

3.1.1 Kolonizace trávicího traktu

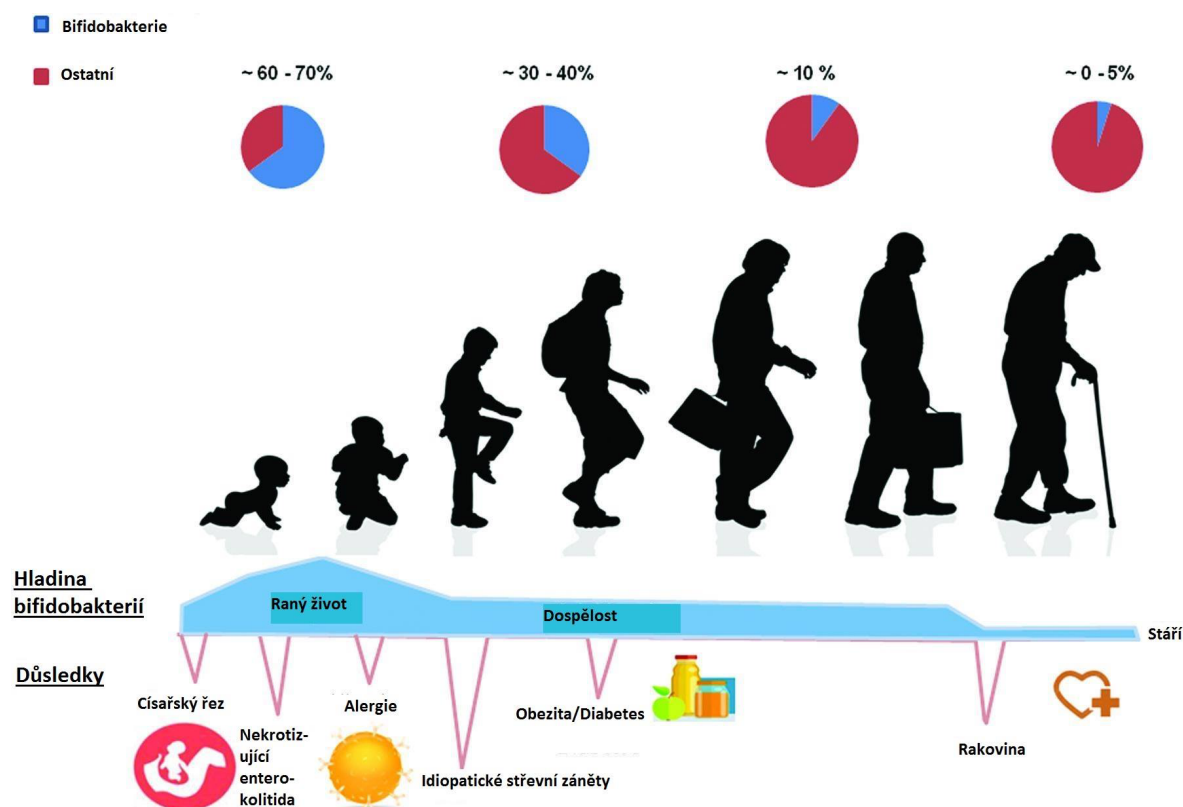
Předpokládá se, že prvotní mikrobiální osídlení střev hraje klíčovou roli pro lidské zdraví a to nejen v dětství, ale i pozdějších fázích života (Turroni, Milani, Duranti, et al., 2018). Rod *Bifidobacterium* patří k dominantní komunitě bakterií, které jako první kolonizují střevo a vyskytuje se u zdravých dětí, které jsou krmeny mateřským mlékem. Kolonizace je ovlivněna převážně dietou, ale zároveň hraje roli i spousta dalších faktorů (Turroni et al., 2012). Výživa kojenců je jeden z podstatných faktorů ovlivňující počáteční kolonizaci. Lidské mléko obsahuje velké množství glykanů působících jako bifidogenní faktory. Díky tomu je podpořen růst konkrétních druhů a zároveň působí jako úložiště bakterií pro přenos z matky na dítě (Milani et al., 2016). Oligosacharidy mateřského mléka jsou také pro člověka specifické tím, že tyto různorodé a komplexní sacharidy jsou rezistentní při průchodu trávicím traktem a dostávají se do dětského tračníku jako první prebiotika. Tyto oligosacharidy jsou pak využívány hlavně bifidobakteriálními druhy (Musilova et al., 2014). U kojených dětí dochází k rapidní kolonizaci trávicího traktu bifidobakteriemi a rozmanitější mikrobiota se začne rozvíjet po zahájení doplňování stravy. Výskyt jednotlivých druhů se mění s věkem. Nejčastěji detekované druhy u kojených dětí jsou *B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum* subsp. *infantis* (Turroni et al., 2012). Oproti tomu děti krmené umělou výživou jsou kolonizovány různými bakteriálními rody zahrnující *Streptococcus*, *Bacteroidetes* a *Clostridium* a dochází u nich k podstatné absenci bifidobakterií. Tato posloupnost pokračuje až do úplného odstavení, kdy se začne tvořit stabilnější a komplexnější mikrobiota podobná mikrobiotě dospělého člověka (Favier et al., 2002). Kromě výživy je kolonizace determinována spoustou dalších faktorů, z nichž nejpodstatnější jsou kromě typu výživy také způsob porodu (vaginální x císařský řez), gestační věk a případná nutnost užívání antibiotik (Penders et al., 2006).

V dospělosti je množství těchto bakterií menší, ale udržují se v určitém množství konstantní (Arbolea et al., 2016). Jejich druhové zastoupení je stabilní, tyto hladiny se pohybují od 2 do 14 % (Odamaki et al., 2016). Pokles hladiny bifidobakterií ve střevě je pravděpodobně způsobem mnoha faktory jako například nižší příjem vlákniny ve stravě, vyšší index tělesné hmotnosti, kouření a věk (Khonsari et al., 2016).

Kmeny izolované od zdravých dospělých se podstatně lépe váží na střevní sliznici než ty izolované od seniorů. Tyto snížené adhezivní schopnosti pravděpodobně způsobují pokles hladiny bifidobakterií v pozdním věku. V neposlední řadě je třeba zmínit, že bifidobakterie jsou mnohem citlivější na antibiotickou léčbu než ostatní (F. He et al., 2001). Pacienti léčení antibiotickou léčbou mají podstatně nižší množství *Bifidobacterium* spp. oproti hladinám *Lactobacillus* spp. a *Enterobacteriaceae*, které zůstávají nezměněny (O'Sullivan et al., 2013). Změny populačního složení nejen bifidobakterií, ale i dalších zdraví prospěšných bakterií nemusí být tedy nutně způsobeny stárnutím, ale mohou být také důsledek dalších faktorů jako je celkový pokles zdravotního stavu, podvýživa nebo zvýšená potřeba podávání léků (Rondanelli, 2015).

Důvod proč bifidobakterie patří mezi první kolonizátory trávicího traktu je pravděpodobně evoluce jejich genomu, která je značně zvýhodnila oproti jiným bakteriálním druhům v prostředí střeva. Dle genomických analýz mají tyto bakterie zakódované velké množství genů podílejících se na metabolismu sacharidů. Dalším z důvodů může být i to, že prostřednictvím vzájemného cross-feedingu nebo sdílení stejných zdrojů svědčícím o tzv. sociálním chování bifidobakterií, zlepšuje jejich přístup k sacharidům ve střevech hostitele (Turroni, Milani, Duranti, et al., 2018). Jedním z takovýchto případů je například růst *B. breve* UCC2003 v médiu na bázi mucinu v přítomnosti *B. bifidum* PRL2010, které jak je známo metabolizuje mucin (Egan et al., 2014). Tento rozdíl je značný při porovnání s bakteriemi žijícími paraziticky nebo symbioticky. Při těchto životních stylech došlo ke značné ztrátě genů. Degradace genomu způsobila, že tyto bakterie jsou téměř absolutně závislé na svém hostiteli (Henrissat et al., 2002). Přehled průměrného bifidobakteriálního složení v lidském gastrointestinálním traktu je zobrazen na obrázku č.2

Zajímavostí oproti člověku je hojně zastoupení bifidobakterií u novosvětských opic, které jsou obsaženy například v trávicím traktu kosmanů ve vysokém množství (zhruba 80 %) i u dospělých jedinců (Brown et al., 2019).



Obrázek 2: Přítomnost bifidobakterií v průběhu lidského života [upraveno dle (Arbolea et al., 2016), vytvořeno na základě literatury citované (Voreades et al., 2014)]

3.1.2 Význam pro zdraví člověka

Bifidobakterie patří mezi první kolonizátory lidského gastrointestinálního traktu a předpokládá se, že mají příznivé účinky na lidské zdraví, mezi které patří například produkce antimikrobiálních látek na ochranu proti patogenům, blokování adheze patogenů na sliznici střeva nebo modulace imunitní odpovědi (Pokusaeva et al., 2011). Díky těmto schopnostem na imunitní systém jsou schopné předcházet nebo zmírňovat infekční průjmy a zvyšují odolnost organismu proti kolonizaci patogeny (Picard et al., 2005). Kromě tohoto udržování zdraví ve střevech pomocí konkurenčního vylučování patogenů jsou schopné produkce základních vitamínů a poskytování živin tělu prostřednictvím odbourávání nestravitelných sacharidů (O'Callaghan & van Sinderen, 2016). Bylo také popsáno, že pomáhají zmírňovat intoleranci laktózy a snižovat hladinu cholesterolu v krvi (Russell et al., 2011).

Dle Arboleya et al., (2016) může silná asociace bifidobakterií spojená s lidským zdravím poskytnout takzvaný biomarker, kterým by jejich absence v budoucnu indikovala určitá onemocnění. Ve studii Golfetto et al. (2014) bylo zjištěno, že koncentrace fekálních bifidobakterií u zdravých pacientů je podstatně vyšší oproti pacientům s celiakií. Tato nerovnováha přetrvávala i po dobu léčby celiakie.

Dopad antibiotické léčby na střevní mikrobiotu má dlouhodobý vliv na zdraví zejména u starších pacientů, kde je třeba mnohem pečlivěji zvážit vhodnou formu léčby (O'Sullivan et al., 2013). Díky vlastnostem modulujícím zdraví člověka jsou bifidobakterie začleněny do široké škály funkčních potravin jakožto aktivní složka (O'Callaghan & van Sinderen, 2016).

Další z velkých možností, jak prozkoumat a zlepšit vlastnosti bifidobakterií podporující zdraví se zdá být genetická manipulace. Genetickými modifikacemi by se mohlo docílit zlepšení účinků *in vivo* nebo umožnit sledování požitých probiotických kmenů v modelech nemocí lidí a zvířat. Zvyšující se množství sekvencí genomů poskytuje příležitost pro lepší analýzu metabolismu, fyziologie, genetiky a její role při udržování zdraví v trávicím traktu. Velkou překážkou je však nedostatek znalostí o molekulárních mechanismech. Zvyšující se dostupnost sekvencí genomu a genetických nástrojů by v budoucnu mohla znamenat významný pokrok v používání těchto bakterií pro lékařské účely (Cronin et al., 2011).

3.1.2.1 Kolorektální karcinom

Kolorektální karcinom je jedna z nejčastěji postihovaných nemocí západní civilizace a představuje celosvětově značnou zátěž. Anatomicky je tlusté střevo místem, kde se také vyskytuje nejvíce mikroorganismů a proto lze předpokládat, že složení mikrobioty je spojováno s kolorektální karcinogenezí (Sears & Garrett, 2014). Důkazy naznačují složité souvislosti mezi mikrobiotou, charakterizací nádoru a imunitou hostitele v mikroprostředí nádoru. Bifidobakterie jsou těmi, které zvyšují protinádorovou imunitu a účinnost imunoterapie. Souvislosti mezi množstvím bifidobakterií ve tkáni kolorektálního karcinomu a množstvím signetových prstenčitých buněk má přímou souvislost. V budoucnu by tak bylo možné tyto bakterie využít jako indikátor dysfunkční slizniční bariéry v důsledku jejich absence (Kosumi et al., 2018). Je prokázáno, že symbiotická kombinace *B. animalis* subsp. *lactis* spolu s rezistentním škrobem významně chrání před rozvojem kolorektálního karcinomu u krys,

kterým byl indukován azoxymethan pro indukci tohoto karcinomu. Avšak tato skutečnost nebyla potvrzena při aplikaci těchto dvou látek samostatně. Obecně tedy lze říci, že synbiotická kombinace probiotika a prebiotika je z preventivního hlediska mnohem účinnější, než kdyby tyto látky působily v organismu samostatně (Le Leu et al., 2010).

3.1.2.2 Průjem

Dysbalance střevní mikrobioty často způsobují chorobné metabolické poruchy (Russell et al., 2011). I přes značný vývoj vědy průjem zůstává i nadále významným zdrojem nemocí a smrti ve světě. Důvodem je i skutečnost existence široké škály příčin vzniku a symptomů, které znesnadňují diagnózu a tím i výběr vhodné léčby (Tremaine, 2011). Jedna z častých příčin průjmu mohou být idiopatické střevní záněty. Tyto chronická autoimunitní onemocnění postihují zažívací trakt a řadí se mezi ně například Crohnova choroba či ulcerózní kolitida. Probiotika naznačují velký potenciál pro budoucí podporu léčby těchto zánětlivých onemocnění (Guandalini, 2010). Klinická studie zkoumající perorální podávání probiotického přípravku, který obsahoval *B. animalis* subsp. *lactis* a *Streptococcus thermophilus* podstatně snížil průjmy u dětí léčených antibiotickou terapií (Corrêa et al., 2005). Kojenecká výživa s přídavkem *B. longum* subsp. *infantis* CECT7210 pomáhá snížit průjmy u dětí a zároveň předchází vzniku zácpy (Escribano et al., 2018). Mezi hlavní bifidobakterie používané k léčbě průjmu patří *B. animalis* subsp. *animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum* subsp. *infantis*, *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. longum* subsp. *longum* (Guandalini, 2010).

3.1.2.3 Zánětlivá onemocnění střev

Patogeneze těchto zánětů není zcela objasněna, ale zdá se, že jejich příčinou je nesprávná aktivace slizniční bariéry. Důvodem toho by mohl být bakteriální obsah ve střevech (Seksik, 2010). Změny mikrobiálního složení a funkce mikrobioty při zánětlivých střevních onemocněních způsobují zvýšenou imunitní stimulaci, epiteliální dysfunkci, nebo zvýšenou permeabilitu sliznice. Přestože obvykle se vyskytující patogeny pravděpodobně nejsou zodpovědné za tyto poruchy, tak zvýšené množství některých komenzálních druhů bakterií jako například *Escherichia coli* podporují rozvoj patogenní mikrobioty a tím i stimulaci patogenní odpovědi organismu (Sartor, 2008). Předpokládá se, že rod *Bacteroides*, převládající komenzální bakterie ve střevech, je zodpovědný za vývoj zánětlivých střevních onemocnění. *B. longum* subsp. *infantis* 1222 je schopný inhibovat růst *Bacteroides vulgatus* pomocí chránění střevní epiteliální vrstvy. Bifidobakterie mohou být použity jako probiotika ke zlepšení idiopatických střevních zánětů pro potlačení růstu bakteroidů ve střevech (Shiba et al., 2003). Další z příkladů může být *B. longum* subsp. *infantis*, který v myším modelu idiopatických střevních zánětů byl schopný zmírňovat poškození střevního epitelu a tudíž má také značnou terapeutickou hodnotu pro léčbu tohoto onemocnění (L. Zhou et al., 2019). Potenciál využití bifidobakterií jako probiotik pro léčbu je závislý na konkrétním kmeni bakterie, protože každý kmen vykazoval jinou účinnost na konkrétní onemocnění a tudíž je nutná strategie umožňující zvolit kmen s nejvyšším protizánětlivým účinkem (Alard et al., 2018).

Nekrotizující enterokolitida (NEC) je závažná, život ohrožující porucha adaptace trávicího systému novorozence (většinou nedonošeného) na extrauterinní život. Jde

o postnatálně získané akutní onemocnění charakterizované hemoragicko-nekrotizujícím, ulcerujícím zánětem střeva. Typicky postihuje terminální ileum, cékum a další části tlustého střeva. Rutinní probiotická suplementace *Bifidobacterium breve* M-16V snižuje výskyt NECu novorozenců narozených před 34. týdnem těhotenství (Patole et al., 2016). Další ze studií na myším modelu prokázala, že *B. adolescentis* je také schopen prevence NEC změnou exprese určitých receptorů (Wu et al., 2017). Metaanalýza NECu potvrzuje domněnku, že bifidobakterie mohou snižovat její výskyt a hlavně nezvyšují výskyty sepsí u předčasně narozených dětí a byla by bezpečnou formou prevence (Zhu et al., 2019).

3.1.2.4 Kompetitivní vyloučení patogenů

In vitro studie naznačují, že bifidobakterie mohou sloužit k zabránění rozvoje gastrointestinálních infekcí. Pomocí kompetitivní inhibice dochází k zabránění navázání patogenů na epitelové buňky střevního hlenu (Gueimonde et al., 2007). Zdá se, že tato inhibice je variabilní a závislá na určitém kmeni. Obecně lze říci, že bifidobakterie živočišného původu jsou schopny lépe vytlačovat patogeny než ty lidské (Collabo et al., 2005). Schopnost takto konkurovat jiným střevním bakteriím je do velké míry přičítána jejich sacharolytickým vlastnostem (Milani et al., 2016).

3.1.3 Metabolická aktivita

Jakožto sacharolytické mikroorganismy, neboli mikroorganismy schopné hydrolyzy či jiné metabolizace molekul cukru vedoucí k produkci energie, závisí kolonizace trávicího traktu bifidobakteriemi na jejich schopnosti využít komplexní sacharidy vyskytující se v prostředí. Termín sacharid zahrnuje jednu z nejrozsáhlejších skupin organických látek, skládajících se z uhlíku, kyslíku a vodíku. Rozdělují se do skupin na základě jejich stupně polymerace na monosacharidy, disacharidy, oligosacharidy a polysacharidy (Allen-Blevins et al., 2018).

Charakteristickou metabolickou dráhou bifidobakterií je katabolizace hexóz pomocí enzymu fruktóza-6-fosfoketoláza. Tento enzym je považován jako taxonomický marker pro celou čeleď *Bifidobacteriaceae* (Russell et al., 2011). Tento enzym charakteristický pro bifidobakterie umožňuje produkci laktátu, acetátu a ATP pomocí „bifid shunt pathway“. Fruktóza-6-fosfoketoláza štěpí fruktózu-6-fosfát na erytrózu-4-fosfát a acetyl-1-fosfát. Z konečných produktů štěpení je teoretický výtěžek 1 mol laktátu, 1,5 molu acetátu a 2,5 molekuly ATP z jednoho molu glukózy (de Vries & Stouthamer, 1967). Poměry vytvořeného laktátu a acetátu se reálně mohou lišit a to v závislosti na zdroji a druhu metabolizovaného sacharidu nebo kmenové příslušnosti dané bakterie (Palframan et al., 2003; McLaughlin et al., 2015). Katabolismus pomocí této dráhy umožňuje vyšší energetický výtěžek a odlišné konečné produkty oproti jiným fermentačním dráhám (Pokusaeva et al., 2011).

Gastrointestinální trakt savců je dobře vybaven k adsorpci jednoduchých cukrů, mezi které patří glukóza, galaktóza a fruktóza (Sonnenburg et al., 2005). Také produkuje širokou škálu enzymů schopných hydrolyzovat převážně disacharidy (sacharóza, laktóza a maltóza)

a určité polysacharidy (škrob, pektin). Většinou jim však chybí enzymy, kterým jsou schopny trávit oligo a polysacharidy odvozené od vlákniny (Ventura, O'Connell-Motherway, et al., 2007). Nestravitelnost těchto sacharidů poukazuje na nedostatek hostitelských enzymů potřebných k jejich degradaci (Sonnenburg et al., 2005). Každý den distální částí gastrointestinálního traktu prochází velké množství nestrávených sacharidů. Patří mezi ně převážně polysacharidy vyskytující se v buněčných stěnách rostlin (celulóza, xylan, pektin), ale i nestrávený škrob a sloučeniny od něj odvozené. Získáváním nutričních látek z těchto sloučenin je možné pomocí mikrobiální populace schopné degradovat tyto biomolekuly, které by jinak pro hostitele byly zcela bezcenné (Hooper et al., 2002).

Důležitým znakem genetické adaptace bifidobakterií na lidské střevo je jejich specifické využití různých komplexních sacharidů, jako je například rezistentní škrob, který nepodléhá trávení lidského trávicího traktu (Berman, 2012). Hybnou silou pro evoluci bifidobakteriálního genomu byl především genový zisk způsoben horizontálním přenosem genů z jiných bakterií. Naproti tomu genomy jiných střevních bakterií prošly podstatně větší ztrátou genů, genomových rozpadů či genovým zjednodušením. Předpokládá se, že tyto genový dárci jsou bakterie vyskytující se také běžně ve střevním prostředí, převážně z kmene Actinobacteria (Milani et al., 2016). Bifidobakterie patří tedy k těm, které poskytují svému hostiteli mnoho zdravotních přínosů pomocí svých metabolických aktivit (O'Callaghan & van Sinderen, 2016).

Dalším důležitým metabolickým znakem bifidobakterií je existence komenzálních vztahů mezi nimi a sdílení stejných zdrojů (Egan et al., 2014). *B. bifidum* je zatím jediný o kterém je známo jeho schopnost odbourávat mucin a uvolňovat tak monosacharidy, které mohou být dále využity jinými střevními mikroby (Bunesova et al., 2018). Tato schopnost svědčí o metabolické adaptabilitě, která umožňuje využití jinak nedostupných zdrojů sacharidů (Egan et al., 2014).

3.1.3.1 Glykosylhydrolázy

Rozmanitou škálu sacharidů, která nepodléhá trávení v horní části střeva jsou mnohé oligo a polysacharidy rostlinného původu. Různé bifidobakteriální kmeny mohou disponovat různými schopnostmi využití sacharidů, jak již prokázala řada studií (Pokusaeva et al., 2011). Jejich enzymy působí jako biologické katalyzátory se schopností katalyzovat určité chemické reakce za běžných podmínek převládajících ve většině živých organismů (Wilson & Walker, 2005). Většina enzymů jako jsou například transferázy, hydrolázy, lyázy nebo izomerázy je schopná modifikace oligo a polysacharidů. Pro mikroorganismy osidlující střevní trakt jsou nejdůležitější skupinou enzymů glykosyl hydrolázy, které jsou schopné degradovat oligo a polysacharidy na fermentovatelné cukry (Van Den Broek & Voragen, 2008). Mezi organismy mající nejvíce genů kódujících enzymy pro degradaci sacharidů patří *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides fragilis* NCTC 9343 a *Bifidobacterium longum* NCTC 9343 (Davies et al., 2005).

Genom bifidobakterií kóduje enzymy nezbytné pro metabolismus komplexních sacharidů. Schopnost utilizace těchto polysacharidů je závislá na druhu a původu bifidobakterií (Bunešová et al., 2017). Prvním bifidobakteriálním genomem, který byl sekvenován, je *B. longum* NCC2705, izolovaný z kojence. Tato analýza odhalila několik znaků, které by mohly částečně vysvětlit adaptaci této bakterie v tlustém střevě. Velké množství zakódovaných

proteinů v genetické informaci *B. longum* se zdá být specializováno na katabolismus oligosacharidů pomocí glykosylhydroláz, které jsou schopné využít nestravitelné rostlinné polymery. Tato schopnost využití živin i z nestravitelných částí potravy by mohla být důvodem konkurenceschopnosti a perzistence bifidobakterií v tlustém střevě (Schell et al., 2002). Kompletní sekvence dalších genomů *B. longum* vedly k většímu pochopení vývoje druhů *Bifidobacterium* a pomohly sestavit základní genetickou páteř bifidobakterií. Oblasti variabilní sekvenace DNA určují kmenovou specifitu a umožňují adaptaci na konkrétní prostředí. Tato specifita lze určit komparativní analýzou s již publikovanými genomy (Russell et al., 2011). Mezi enzymy degradující sacharidy patří kromě glykosylhydroláz také glykosyltransferázy a sacharidové esterázy. Rod *Bifidobacterium* neobsahuje žádné geny kódující lyázu. Enzymy této rodiny katalyzují hydrolytické aktivity široké škály komplexních sacharidů jako škrob, glykogen a jim příbuzné substráty jako amyulóza, amylopektin, maltodextrin a další (Lombard et al., 2014).

Obecně lze říci, že střevní bakterie degradují polysacharidy na oligosacharidy, které mohou být následně degradovány na monosacharidy pomocí širokého spektra enzymů. Tyto glykosidázy jsou extracelulární i intracelulární (Van Den Broek et al., 2008). Významnou roli v probiotickém působení bifidobakterií mohou hrát také β -glukosidázy katalyzující hydrolýzu glykosidových vazeb v neredukujících zbytcích β -glukosidů a oligosacharidů za uvolnění glukózy (O'Callaghan & van Sinderen, 2016).

3.1.4 Prebiotické substráty pro bifidobakterie

Prebiotika jsou definována jako „substráty, které jsou selektivně využívány hostitelskými mikroorganismy a poskytují zdravotní přínos“ (Gibson et al., 2017). Bylo prokázáno v mnoha studiích, že prebiotika (a probiotika) pozitivně ovlivňují lidskou střevní mikrobiotu. Příznivé účinky prebiotik umožňují ovlivňovat složení střevní mikrobioty a své schopnosti vytvářet mastné kyseliny s krátkým řetězcem (Laparra & Sanz, 2010). Předpokládá se, že jejich přítomnost vyrovnává bakteriální osídlení v trávicím traktu ve prospěch zdravých prospěšných rodů jako jsou bifidobakterie a laktobacily (Van Den Broek & Voragen, 2008). Schopnost utilizace těchto sacharidů může být využita ke zvýšení četnosti nebo metabolické aktivity konkrétních bakteriálních kmenů či druhů (Gibson et al., 2004). Některé druhy sacharidů, které unikají trávení enzymy hostitele se považují za prebiotické sloučeniny. Tyto sloučeniny zahrnují fruktooligosacharidy, galaktooligosacharidy, glukooligosacharidy, xylooligosacharidy, laktulózu, rafinózu a další. Všechny tyto nutrienty by byly ztraceny, kdyby distální část střeva nebyla kolonizována směsí anaerobních bakterií mezi které patří například rody *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, a *Enterobacterium*. Díky tomuto symbiotickému vztahu získává hostitel absorpci kyselin s krátkým řetězcem energii a uhlík, jakožto konečné produkty mikrobiální fermentace (Ventura, O'Connell-Motherway, et al., 2007). Lidské střevo je hustě osídleno řadou bakteriálních druhů, které mají vliv na důležité imunitní a metabolické funkce. Tyto účinky značně ovlivňují zdravotní stav hostitele (člověka) a jeho schopnost využití potravy. Druh přijímané stravy nad rámec základní výživy spolu s prebiotickými substráty umožňuje vývoj funkčních potravin a případně i nutraceutik (Laparra & Sanz, 2010). Pro pochopení principu růstu těchto bakterií na uhlíkatých zdrojích je důležitá znalost enzymů modifikujících tyto substráty (Van Den Broek & Voragen, 2008). Kromě

příznivých účinků pro gastrointestinální trakt se prebiotikům přisuzují i další pozitivní efekty na lidské zdraví. Mezi ty můžeme zařadit prevenci proti kardiometabolickým dysfunkcím, zlepšení citlivosti na inzulín, zlepšení psychického zdraví (produkce metabolitů, které ovlivňují funkci mozku), nebo zlepšení kvality kostí díky lepší biodostupnosti minerálů (Światkiewicz et al., 2010; Mitchell et al., 2015; Gibson et al., 2017). *Bifidobacterium* spp. mají různé preference k fermentaci sacharidů, které jak již bylo řečeno. Například *B. adolescentis* a *B. longum* jsou schopné fermentovat arabinoxylan. Oproti tomu *B. breve* tento oligosacharid schopný fermentovat není (Van Den Broek & Voragen, 2008). Pro dosažení prebiotického účinku je nutná i charakterizace glykosidových hydroláz, protože rostlinné polysacharidy mohou mít jemné strukturální rozdíly. Tato struktura určuje, zdali je *Bifidobacterium* spp. schopné je degradovat a využít cukr jako substrát pro svůj růst (Van Den Broek & Voragen, 2008).

Využití prebiotických substrátů je závislé na hostiteli, druhu a kmeni konkrétní bifidobakterie. Kmeny živočišného původu jsou schopné využít značně širší škálu substrátů oproti kmenům lidského původu. Jedním z nejzákladnějších substrátů by mohl být škrob vzhledem k hojnému výskytu v lidské stravě. Pro jeho aplikaci by bylo vhodné zvolit modifikované a rezistentní formy, které by nepodporovaly růst nežádoucích bakterií (Modrackova et al., 2019). Na tuto problematiku poukazuje studie Bunešové et al. (2012), kde bylo testováno na běžně dostupných prebiotických substrátech, galaktosacharidů a fruktooligosacharidů, růst bakterií. Použitá prebiotika stimulovala růst jak žádoucích, tak nežádoucích bakterií. Nevhodně zvolená prebiotika mohou být neselektivní a stimulovat růst obou skupin. Z tohoto důvodu není vhodné doplňování prebiotik u jedinců s deficitem bifidobakterií, zejména u kojenců, jelikož by mohlo dojít k podpoře růstu klostridií a jiných bakterií s negativním vlivem a mikrobiální vývoj (Rada et al., 2008).

3.2 Rostlinné glykosidy

3.2.1 Charakteristika

Glykosidy jsou charakterizovány jako sekundární metabolity rostlin, které tvoří strukturně rozmanitou skupinu cukerných derivátů (Bartnik & Facey, 2017). Vznikají spojením cukerné (sacharidové) molekuly s alifatickou nebo aromatickou molekulou nazývanou aglykon. Aglykon je chemická sloučenina necukerné povahy. Glykosidická vazba mezi těmito sloučeninami vzniká náhradou poloacetalové nebo poloketalové skupiny na molekule sacharidu (Brito-Arias, 2007).

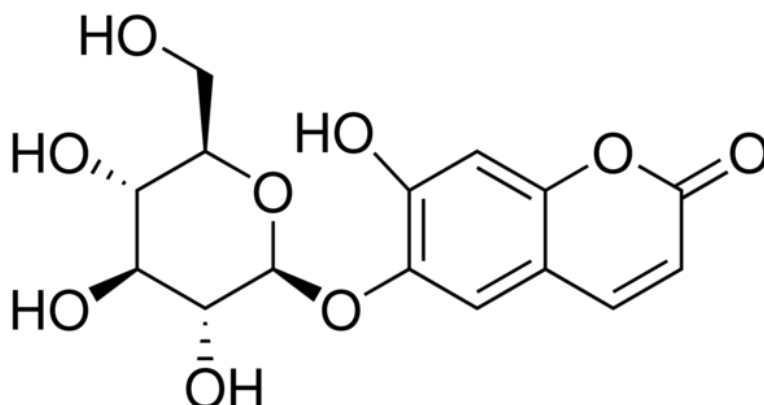
Z dostupných zdrojů lze vyvodit, že za biologickou aktivitu glykosidů není zodpovědná jejich glykosidová forma nýbrž jejich aglykon (Modrackova et al., 2020). Po konzumaci mohou být absorbovány v tenkém střevě a následně metabolizovány v játrech, nebo jsou hydrolyzovány střevní mikrobiální aktivitou (De Arriba et al., 2013).

3.2.2 β -glukosidy

Glykosidy jsou obecně látky rostlinného původu, které se skládají ze dvou složek – cukru a necukerné části, tzv. aglykonu. Necukernou složkou aglykonu bývají nejčastěji fenoly, alicyklické triterpenové alkoholy případně jimi může být i jiná hydroxylsloučenina. V případě reakce s jiným cukrem vznikají tzv. homoglykosidy, pokud není reagující složka hydroxylového původu vznikají tzv. heteroglykosidy. Glykosidy mající jako základ své sloučeniny glukózu se nazývají glukosidy. Vzhledem k tomu, že vznikají náhradou poloacetalové hydroxylové skupiny jiným cukerným či necukerným zbytkem mohou vzniknout dvě možné prostorové orientace α a β (Hajšlová & Velíšek, 2009).

Prostorová orientace β je štěpena pomocí enzymu β -glukosidázy. Tento enzym štěpí β -D-glykosidické vazby za uvolnění glukózy a aglykonu. Bylo prokázáno, že tyto aglykony jsou antimikrobiálně aktivní (Jurica et al., 2017). β -glukosidázová aktivita byla detekována v několika bakteriálních kmenech přičemž většina bifidobakterií vykazovala aktivitu tohoto enzymu (Dabek et al., 2008). Aktivita bifidobakteriálních β -glukosidáz v lidském střevě může změnit biologickou aktivitu a dostupnost rostlinných glukosidů (Modrackova et al., 2020). Absence aktivity β -glukosidázy v některých mikroorganismech je pravděpodobně zodpovědná za antimikrobiální vlastnosti (Jurica et al., 2017). Příkladem β -glukosidů jsou eskulin, amygdalin a arbutin.

3.2.2.1 Eskulin



Obrázek 3: Chemický vzorec eskulinu (www.sigmaaldrich.com)

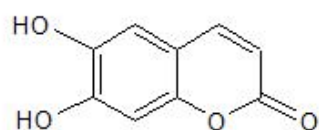
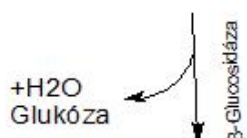
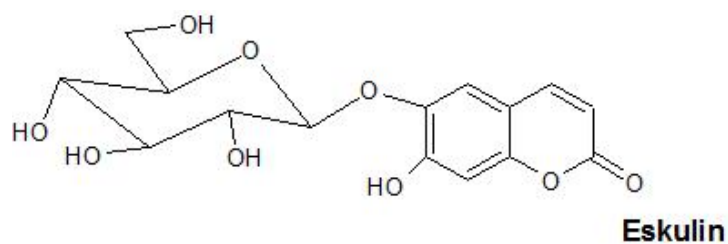
Eskulin (6,7-dihydroxykumarin-6-o-glukosid), viz obrázek č. 3, je kumarinový derivát nacházející se v *Aesculus hippocastanum* (kaštan koňský) a jsou mu přisuzovány silné protizánětlivé vlastnosti. Eskulinu se v poslední době přisuzuje stále více biologických aktivit. Semena této rostliny se již dlouho využívaly k léčbě cévních onemocnění a zánětů (Niu et al., 2015). V brazilském lidovém léčitelství se čaj ze semen této rostliny k ochraně před ledvinovými kameny a bolestmi žaludku (Rios et al., 2010).

Eskulin může vylučovat hydroxylové radikály a inhibovat peroxidaci lipidů v játrech potkanů (Kaneko et al., 2007). Preventivní podávání eskulinu poskytuje významný gastroprotektivní a antioxidační účinek, tudíž značně snižuje poškození žaludku. Mechanismy na kterých jsou založeny tyto účinky jsou například modulace antioxidačních enzymových systémů, redukce volných radikálů, syntéza oxidu dusnatého nebo stimulace endogenních prostaglandinů (Rios et al., 2010).

Nedávná studie Wang et al. (2016) zkoumala metabolický profil eskulinu na myších. Byly identifikovány hlavní metabolity eskulinu a navrženy jeho potenciální metabolické cesty *in vivo*. Po orálním podání eskulinu může být eskulin metabolizován na eskuletin pomocí deglykosylace. Nabízí se možnost, že eskulin by mohl být vhodným kandidátem pro případná protizánětlivá léčiva, léčbu poškození ledvin a rakoviny. roblémem zůstává, že tento glykosid je v kyselém prostředí labilní a při průchodu horní částí gastrointestinálního traktu v nechráněné formě může na místo účinku dorazit v pozmeněné/vysrážené/degradované formě a nedosáhnout cíle účinku. Jako vhodný mikronosič při orální aplikaci by tedy mohla být enkapsulace do matrixu z alginátu sodného spolu s chitosanem, která by zabránila předčasně metabolizaci v žaludku (Tsirigotis-Maniecka et al., 2016).

Eskulin je potenciální látka pro vývoj gastroprotektivní terapie. V budoucnu by mohl být využit k výzkumu léčby nemocí jako je Alzheimerova nebo Parkinsonova choroba (Rios et al., 2010).

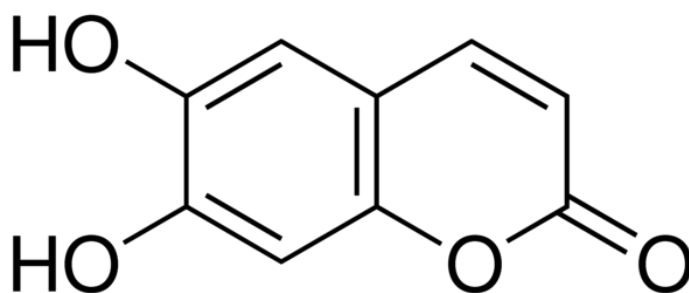
Působením β -glukosidázy dochází k rozštěpení eskulinu na glukózu a jeho aglykon eskuletin (Salazar & Furlan, 2007). Schéma je zobrazené na obrázku č. 4.



Eskuletin

Obrázek 4: Hydrolyza eskulinu pomocí betaglukosidázy

3.2.2.1.1 Eskuletin



Obrázek 5: Chemický vzorec eskuletinu (www.sigmaaldrich.com)

Eskuletin (6,7-dihydroxykumarin), viz obrázek č. 5, je hlavní účinná látka *Fraxinus chinensis* (jasan čínský), který se využívá zejména v tradiční čínské medicíně (Liang et al., 2017). Eskuletin stejně jako eskulin vykazuje antioxidační a protizánětlivé účinky (Chu et al., 2001). Tato sloučenina byla navržena jako potenciální antikarcinogen vzhledem ke své antiproliferační aktivitě (Jiménez-Orozco et al., 2011). Zdá se, že antiproliferační aktivita je závislá na dávce (J. Wang et al., 2015). Data naznačují, že indukuje apoptózu v buňkách zodpovědných za vývoj leukémie (Chu et al., 2001).

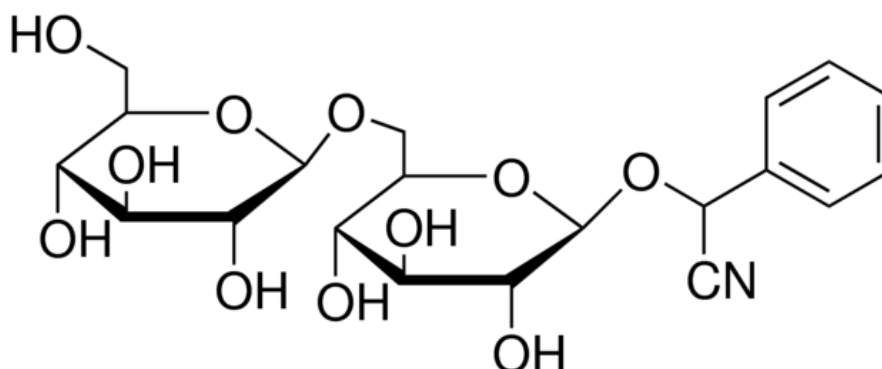
Eskulin a jeho derivát 4-methyleskuletin mohou být účinné při léčbě zánětlivých střevních onemocnění (Witaicenis et al., 2010). Léčba eskulinem a 4-methyleskulinem prokazatelně zabraňovala poškození tlustého střeva u potkanů, kterým byla indikována trinitrobenzensulfonová kyselina, přičemž 4-methyleskuletin vykazoval ještě lepší aktivitu než eskuletin. Jakožto silný antioxidant, který má protizánětlivý a neuroprotektivní účinek byla zkoumána jeho patofyziologie na úzkosti a deprese způsobené oxidačním stresem. Eskuletin prokazatelně zabránil vyvolanému úzkostnému chování u myší, kterým byly indikovány lipopolysacharidy (Sulakhiya et al., 2016).

Eskuletin je také schopný procházet hematoencefalitickou bariérou a tato schopnost naznačuje, že má potenciál chránit před neurodegenerativními onemocněními jako je Parkinsonova choroba (Subramaniam & Ellis, 2013).

Léčba eskuletinem má u diabetu ochranný účinek pomocí oslabení hyperglykemie způsobené oxidačním stresem, tím pádem je schopný chránit hepatocyty a ledviny (Prabakaran & Ashokkumar, 2013).

Eskuletin potlačuje proliferaci buněk rakoviny tlustého střeva. Mohl by být využit jako potenciální terapeutický prostředek potlačující růst nádorů tlustého střeva, ale i jako bezpečný a preventivní prostředek (S. Y. Lee et al., 2013). Kromě toho se jeví jako efektivní sloučenina pro podporu léčby metastatického kolorektálního karcinomu (W. K. Kim et al., 2018). Byl zkoumán také vliv na hormonální karcinogenezi. Na androgenně dependentní nádory se zdá být eskuletin terapeuticky aktivní (Turkekul et al., 2018). Jeho využití jako protinádorového činidla je však limitující pro nádory závislých na estrogeneru (Jiménez-Orozco et al., 2011). Eskuletin tlumí kožní léze u myší podobné psoriáze. Mohl by být vhodným kandidátem pro léčbu i v klinické praxi. Přesný mechanismus redukce prozánětlivých cytokinů není ještě přesně definován (Chen et al., 2018).

3.2.2.2 Amygdalin



Obrázek 6: Chemický vzorec amygdalinu (www.sigmaaldrich.com)

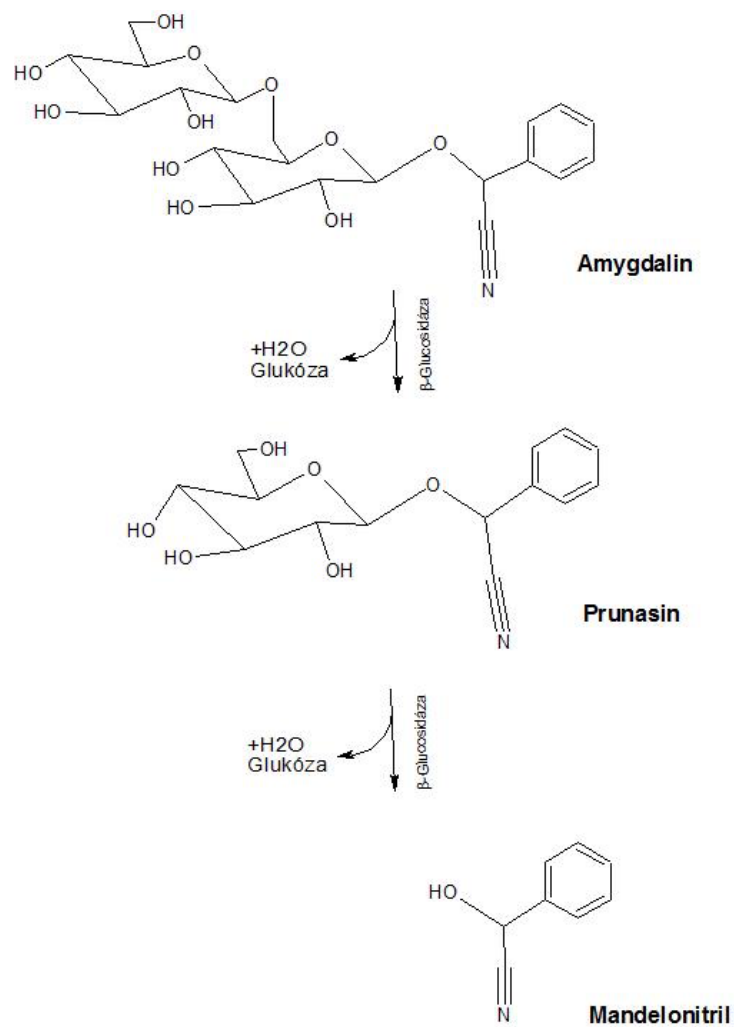
Amygdalin (D-mandelonitril- β -gentiobisid), viz obrázek č. 6, je rostlinný glykosid obsažený v semenech rostlin z čeledi *Rosaceae* (růžovité), kam patří například mandloň obecná (*Prunus dulcis*), meruňka obecná (*Prunus armeniaca*) nebo jabloň domácí (*Malus domestica*). Tato kyanogenní sloučenina se používala v Evropě či Asii jako alternativní léčba různých nemocí jako například astma, kašel, lepra nebo leukoderma (X. Y. He et al., 2020). Tradičně byl používán jako protinádorový lék, avšak z důvodu nedostatku důkazů bylo toto používání zakázáno Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (Qadir & Fatima, 2017). Avšak jeho protinádorový účinek je stále zkoumán a je mu věnována stále větší pozornost (X. Y. He et al., 2020).

Amygdalin vykazuje antikarcinogenní, antifibrotické, protizánětlivé, analgetické, imunomodulační a antiaterosklerotické účinky. Kromě toho všeho napomáhá zlepšení trávicího a reprodukčního systému, předchází neurodegenerativním onemocněním, hypertrofii myokardu a v neposlední řadě snižuje glukózu v krvi (X. Y. He et al., 2020). Hlavním mechanismem antikarcinogenních účinků je inhibice proliferace karcinogenních buněk a indukce jejich apoptózy jako je tomu například u rakoviny prsu (H. M. Lee & Moon, 2016).

Amygdalin navzdory svým příznivým účinkům může způsobit mnoho vedlejších účinků a vést k toxicitě (Salama et al., 2019). Analýza údajů potvrdila, že jeho toxicita byla způsobena produkty rozkladu benzaldehydu a kyanovodíku po orálním požití. Tomuto jevu lze předcházet například intravenózním podáním (X. Y. He et al., 2020).

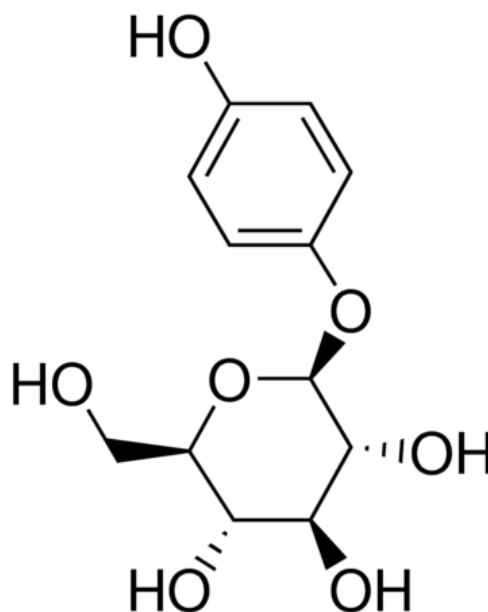
Amygdalin aktivovaný β -D-glukosidázou vykazoval vyšší inhibiční schopnost na proliferaci buněčné linie hepatocelulárního karcinomu HepG2 a tato kombinovaná strategie by mohla umožnit jeho nižší dávkování (C. Zhou et al., 2012). Amygdalin často bývá ztotožňován s laetrem, což je sloučenina příbuzná amygdalinu, nikoliv však totožná. Laetril byl jedním z nejpoužívanějších alternativních způsobů pro léčbu rakoviny, ale zatím stále neexistují spolehlivé důkazy o jeho účinnosti a především kolují značné pochybnosti o jeho bezpečnosti (Milazzo et al., 2007).

Schéma je zobrazené na obrázku č. 7.



Obrázek 7: Hydrolyza amygdalinu pomocí β -glukosidázy

3.2.2.3 Arbutin



Obrázek 8: Chemický vzorec arbutinu (www.sigmaaldrich.com)

Arbutin (4-hydroxyfenyl- β -D-glukopyranosid), viz obrázek č. 8, je glykosylovaný hydrochinon extrahovaný z rostlin, převážně z čeledi *Ericaceae* (vřesovcovité) jako je například medvědice lékařská (*Arctostaphylos uva-ursi*), brusnice brusinka (*Vaccinium vitis-idaea*), hrušeň obecná (*Pyrus communis*) nebo bergénie tučnolistá (*Bergenia crassifolia*). Byl také identifikován v listech planiky velkoplodé (*Arbutus unedo*) jako hlavní bioaktivní látka (Oliveira et al., 2011).

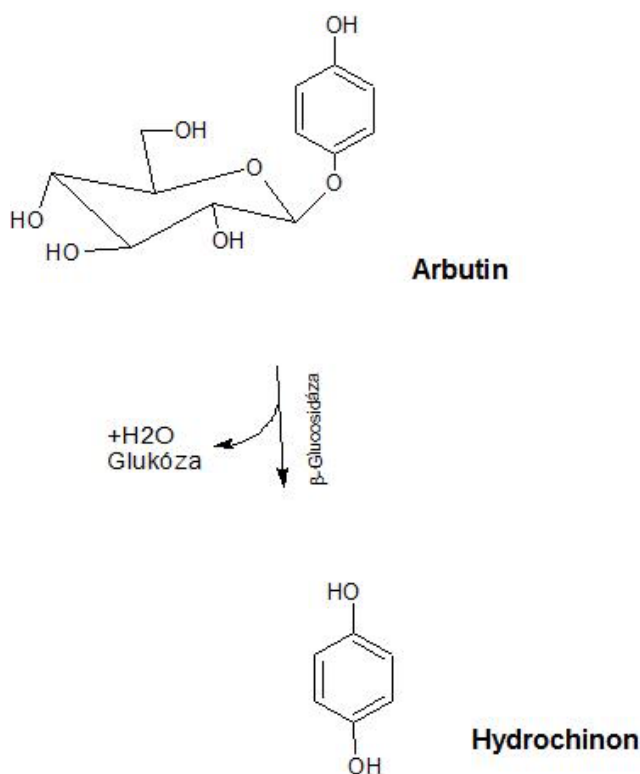
In vitro a *in vivo* studie naznačují širokou škálu aplikací arbutinu a jeho derivátů. Jedna z těchto alternativ by mohlo být například vnější použití při léčbě hyperpigmentace (Migas & Krauze-Baranowska, 2015). Tato depigmentační schopnost arbutinu tkví v v inhibici tyrozinázy, enzymu, který katalyzuje tvorbu melaninu v těle (Pop et al., 2009). Kromě toho je využíván pro své dezinfekční vlastnosti k léčbě infekcí urogenitálního traktu (Migas & Krauze-Baranowska, 2015).

Rostoucí využití v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu podněcuje k hledání nových zdrojů arbutinu. Rostliny i bakterie jsou schopné jeho produkce v *in vitro* podmínkách syntetizovat arbutin i jeho deriváty. Biotransformace je však možná pouze doplněním kultivačního média obsahující hydrochinon. Výhodou je, že tato metabolická cesta není omezena pouze na čeleď *Ericaceae* (Migas & Krauze-Baranowska, 2015).

Arbutin nepodléhá hydrolýze v kyselém prostředí, a proto je schopen se neporušený dostat ze žaludku do tenkého střeva. V tenkém střevě se dobře vstřebává a metabolizací v játrech uvolňuje hydrochinonové konjugáty (De Arriba et al., 2013). Hydrochinonové metabolity jsou právě těmi, které vykazují silnou antimikrobiální aktivitu vůči uropatogenům. Schopnost metabolizace arbutinu na hydrochinon je pravděpodobně spojena s mikrobiální aktivitou β -glukosidázy (Jurica et al., 2017). Proto je také účinek arbutinu přímo závislý na β -

glukosidázové aktivitě (committee on herbal medicinal products (HMPC) & European Medicines Agency, 2012).

V *in vitro* studii vykazoval arbutin protinádorovou aktivitu v důsledku inhibice proliferace rakovinových buněk močového měchýře (Li et al., 2011). Hydrochinon, aglykon arbutinu je považován za mutagenní a karcinogenní (Blaut et al., 2006). V případě konzumace doporučené denní dávky nehrozí žádné nebezpečí hepatotoxicity, nefrotoxicity či prorakovinné aktivity u lidí (De Arriba et al., 2013). Schéma je zobrazené na obrázku č. 9.



Obrázek 9: Hydrolyza arbutinu pomocí β -glukosidázy

4 Metodika

4.1 Původ bakteriálních izolátů a ověření jejich identity

Cílem tohoto laboratorního experimentu mé diplomové práce bylo podílet se na testování schopnosti bifidobakterií využít testované β -glukosidy a zjistit, zda je tato vlastnost druhově specifická.

4.1.1 Bifidobakteriální kultury

K pokusu bylo vybráno celkem 115 kmenů bifidobakterií, ve kterých byly zahrnuty typové kmeny z Německé sbírky mikroorganismů a buněčných kultur (DMS; Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig) a kmeny ze sbírky bifidobakterií Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky na České zemědělské univerzitě v Praze. Pro testování byly použity druhy *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. dentium*, *B. longum*, *B. catenulatum* a *B. pseudocatenulatum* (viz tabulka č. 1).

Tabulka 1: SEZNAM POUŽITÝCH VZORKŮ

DRUH	KMEN	PŮVOD VZORKU
<i>B. adolescentis</i>	DMS 20083	střevo dospělého
<i>B. adolescentis</i>	B34	stolice kojence
<i>B. adolescentis</i>	B35	stolice kojence
<i>B. adolescentis</i>	B36	stolice kojence
<i>B. adolescentis</i>	B38	stolice kojence
<i>B. adolescentis</i>	B2	stolice dospělého
<i>B. adolescentis</i>	B9	stolice dospělého
<i>B. adolescentis</i>	B30	stolice dospělého
<i>B. adolescentis</i>	B39	stolice dospělého
<i>B. adolescentis</i>	B41	stolice dospělého
<i>B. adolescentis</i>	B56	stolice dospělého
<i>B. adolescentis</i>	PEG038	stolice dospělého
<i>B. adolescentis</i>	10/6d	fekální vzorek psa
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	DMS 20104	fekální vzorek krysy
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	805P4	fekální vzorek telete
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	012II1	fekální vzorek telete
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	023II	fekální vzorek telete
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	J1 (L1)	fekální vzorek jehněte
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	J5 (L4)	fekální vzorek jehněte
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	J6 (L3)	fekální vzorek jehněte
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	DMS 10140	jogurt
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	BB12	probiotický produkt

<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	Dan	probiotický produkt
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	Nestlé	dětská výživa
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	S7	ovčí sýr
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	B22	stolice kojence
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	B25	stolice kojence
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	PEG042	stolice dospělého
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	PEG084	stolice dospělého
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	P2N1	fekální vzorek psa
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	43/7nb	fekální vzorek psa
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	11/6a	fekální vzorek psa
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	ZDK1	fekální vzorek kamerunské ovce
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	ZDK4	fekální vzorek paovce hřivnaté
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	ZDK7	fekální vzorek okapi
<i>B. bifidum</i>	DSM 20456	stolice kojence
<i>B. bifidum</i>	DSM 20239	stolice kojence
<i>B. bifidum</i>	B6	stolice kojence
<i>B. bifidum</i>	B33	stolice kojence
<i>B. bifidum</i>	B10	stolice dospělého
<i>B. bifidum</i>	B29	stolice dospělého
<i>B. bifidum</i>	B40	stolice dospělého
<i>B. bifidum</i>	B55	stolice dospělého
<i>B. breve</i>	DSM 20213	střevo kojence
<i>B. breve</i>	BR03	probiotický produkt
<i>B. breve</i>	B13	stolice kojence
<i>B. breve</i>	B14	stolice kojence
<i>B. breve</i>	B37	stolice kojence
<i>B. breve</i>	B42	stolice kojence
<i>B. breve</i>	B43	stolice kojence
<i>B. breve</i>	B50	stolice kojence
<i>B. breve</i>	B57	stolice kojence
<i>B. breve</i>	PEG010	stolice dospělého
<i>B. breve</i>	PEG064	stolice dospělého
<i>B. breve</i>	PEG071	stolice dospělého
<i>B. breve</i>	PEG074	stolice dospělého
<i>B. catenulatum</i>	DSM 16992	fekální vzorek dospělého
<i>B. catenulatum</i> subsp. <i>kashiwanohense</i>	DSM 21854	stolice kojence
<i>B. pseudocatenulatum</i>	DSM 20438	stolice kojence
<i>B. catenulatum/pseudocatenulatum</i>	B12	stolice kojence
<i>B. catenulatum/pseudocatenulatum</i>	B46	stolice kojence
<i>B. catenulatum/pseudocatenulatum</i>	B48	stolice kojence
<i>B. catenulatum/pseudocatenulatum</i>	B23	stolice dospělého

<i>B. catenulatum/pseudocatenulatum</i>	B32	stolice dospělého
<i>B. catenulatum/pseudocatenulatum</i>	B51	stolice dospělého
<i>B. catenulatum/pseudocatenulatum</i>	B52	stolice dospělého
<i>B. catenulatum/pseudocatenulatum</i>	B53	stolice dospělého
<i>B. catenulatum/pseudocatenulatum</i>	22/4nb	fekální vzorek psa
<i>B. dentium</i>	DSM 20436	zubní kaz
<i>B. dentium</i>	FD1	stolice kojence
<i>B. dentium</i>	TH1	stolice kojence
<i>B. dentium</i>	VOK II	stolice kojence
<i>B. dentium</i>	PEG020	stolice dospělého
<i>B. dentium</i>	A1/5A	fekální vzorek opice
<i>B. dentium</i>	N12	fekální vzorek opice
<i>B. dentium</i>	N21	fekální vzorek opice
<i>B. dentium</i>	N23	fekální vzorek opice
<i>B. dentium</i>	N26	fekální vzorek opice
<i>B. dentium</i>	N77	fekální vzorek opice
<i>B. dentium</i>	N79	fekální vzorek opice
<i>B. dentium</i>	N105	fekální vzorek opice
<i>B. dentium</i>	N109	fekální vzorek opice
<i>B. dentium</i>	N110	fekální vzorek opice
<i>B. dentium</i>	N111	fekální vzorek opice
<i>B. dentium</i>	N112	fekální vzorek opice
<i>B. longum</i> subps. <i>infantis</i>	DSM 20088	stolice kojence
<i>B. longum</i> subps. <i>longum</i>	DSM 20219	střevo dospělého
<i>B. longum</i> subps. <i>suillum</i>	DSM 28597	fekální vzorek selat
<i>B. longum</i> subps. <i>suis</i>	DSM 20211	fekální vzorek prasete
<i>B. longum</i> subps. <i>suis</i>	5/9	fekální vzorek jehněte
<i>B. longum</i>	INFNUT	probiotický produkt
<i>B. longum</i>	B3	stolice kojence
<i>B. longum</i>	B4	stolice kojence
<i>B. longum</i>	B7	stolice kojence
<i>B. longum</i>	B8	stolice kojence
<i>B. longum</i>	B11	stolice kojence
<i>B. longum</i>	B16	stolice kojence
<i>B. longum</i>	B17	stolice kojence
<i>B. longum</i>	B19	stolice kojence
<i>B. longum</i>	B20	stolice kojence
<i>B. longum</i>	B27	stolice kojence
<i>B. longum</i>	B28	stolice kojence
<i>B. longum</i>	B44	stolice kojence
<i>B. longum</i>	B49	stolice kojence
<i>B. longum</i>	B1	stolice dospělého

<i>B. longum</i>	B26	stolice dospělého
<i>B. longum</i>	PEG057	stolice dospělého
<i>B. longum</i>	PEG059	stolice dospělého
<i>B. longum</i>	PEG080	stolice dospělého
<i>B. longum</i>	PEG104	stolice dospělého
<i>B. longum</i>	022II	fekální vzorek jehněte
<i>B. longum</i>	10/6b	fekální vzorek psa
<i>B. longum</i>	32/3na	fekální vzorek psa
<i>B. longum</i>	33/5nb	fekální vzorek psa
<i>B. longum</i>	33/4nc	fekální vzorek psa

4.1.2 Kultivace bifidobakterií

Kmeny byly kultivovány anaerobně ve Wilkins-Chalgren bujónu (OXOID, UK) obohaceného o 5 g/L sojového peptonu (OXOID, UK), 0,5 g/L L-cysteinu (Sigma-Aldrich, USA) a 1 ml/L Tweenu 80 (Sigma-Aldrich, USA) po dobu 24 hodin při 37 °C (WSP bujón). Zásobní kultury byly uchovány s 30 % přídavkem glycerolu (WVR, ČR) při -80°C. Pracovní kultury byly znovu aktivovány ve WSP bujónu za stejných podmínek kultivace.

4.1.3 Ověření identity testovaných kmenů

Před samotným testováním byla čistota čerstvě narostlých kultur vždy zkontrolována pomocí fázově kontrastní mikroskopie a jejich identita byla potvrzena pomocí hmotnostní spektrometrie s laserovou desorcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem MALDI TOF MS (BRUKER, Německo; Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization + Time Of Flight). Spektra druhů *B. catenulatum* a *B. pseudocatenulatum* získaná pomocí MALDI TOF MS byla tak podobná, že nebylo možné jejich rozlišení na druhové úrovni pomocí této metody, a proto byla vytvořena skupina *B. catenulatum/pseudocatenulatum* pro jejich identifikaci.

4.2 Příprava vzorků pro experiment

4.2.1 Postup přípravy média pro kultivaci

Všechny složky WSP média byly promíchány v Erlenmeyerově baňce. Suspenze byla vařena ve vodní lázni 10 minut. Vše se krokovým dávkovačem napipetovalo do penicilinových lahvíček a vložilo do vodní lázně o teplotě 100°C. Po vyndání se každá lahvíčka probublala oxidem uhličitým pro zajištění anaerobního prostředí. Vše se uzavřelo gumovými zátkami a aplikovala se hliníková krytka. Médium se následně sterilovalo v autoklávu.

4.2.2 Kultivace bakteriálních izolátů k testování

Po potvrzení správnosti identity se uchované kultury rozmrazily a přeočkovaly. Přeočkování bylo provedeno do penicilinových lahvíček obsahující anaerobně připravený WSP bujón. Z každé kultury pro přeočkování bylo odebráno 0,5 ml, které bylo inokulováno do média a kultivováno při 37 °C.

4.2.3 Kontrola čistoty

Bakterie byly kultivovány po dobu 24 hodin při 37 °C v anaerobním prostředí. Čistota byla ověřena pomocí světelné fázově kontrastní mikroskopie (zvětšení 400x; Nikon). Bifidobakterie se vyznačují pleomorfním tvarem buněk, od krátkých až po dlouhé tyčinky s různým typem zakončení (nejtypičtěji do tvaru písmene Y). Vyskytují se jednotlivě, nebo vytváří agregáty. Injekční stříkačkou byla odebrána malá část vzorku, která byla aplikována na podložní sklíčko a přikryta krycím sklíčkem. Každý izolát byl prohlédnut pod světelným mikroskopem s fázovým kontrastem. Dle morfologie byla potvrzena či vyvrácena čistota izolátu. Kontaminované vzorky byly vyloučeny.

4.3 Utilizace vybraných β -glukosidů

Schopnost utilizace β -glukosidů bifidobakteriemi byla testována v 96 jamkových mikrotitračních destičkách s použitím modifikovaného API 50 CHL média (BioMérieux, Francie). Z tohoto média byly připraveny zásobní roztoky eskulinu, amygdalinu a arbutinu v koncentraci 28 mM. Jako pozitivní kontrola byla použita glukóza ve stejné koncentraci a negativní kontrolou bylo samotné API 50 CHL médium. Každý bifidobakteriální kmen byl testovaný ve dvou kopiích. Takto připravené destičky byly inkubovány za anaerobních podmínek (GENBag, Anaear, BioMérieux, Francie) při 37 °C po dobu 72 hodin, po které byla změřena absorbance při 434 nm a 588 nm na přístroji Tecan Infinite M200 (Tecan Group AG) a byl kalkulován poměr naměřených absorbancí. Výsledky měření pak byly rozřazeny do kategorií:

Žádný růst	(<2)	-
Špatný růst	(2,1-2,4)	+
Růst	(2,5-3,4)	++
Dobrý růst	(>3,5)	+++

4.3.1 Přehled testovaných substrátů

Pro experiment byly použity následující substráty:

Eskulin:	7-hydroxykumarin-6-glukosid (Sigma-Aldrich)
Amygdalin:	D-mandelonitril- β -gentibiosid (Sigma-Aldrich)
Arbutin:	hydrochinon- β -D-glukopyranosid (Alfa Aesar)

Zásobní roztoky byly připravené v koncentraci 28 mM odpovídající 5 g/L glukózy (Penta, Česká republika) v API 50 CHL médiu (BioMérieux, Francie). Jako indikátor pH byla přidána bromkresolová violet a roztoky byly poté filtračně sterilizovány. Do mikrotitračních destiček bylo napipetováno 180 μ L roztoku konkrétního testovaného substrátu (glukóza, eskulin, amygdalin, arbutin, API 50 CHL) a 20 μ L bifidobakteriálního kmenu. Barevná změna z fialové na žlutou indikovala pozitivní reakci.

4.4 Měření β -glukosidázové aktivity

4.4.1 Enzymaticky

β -glukosidázová aktivita byla měřena enzymaticky pomocí 4-nitrofenyl- β -D-glukopyranosidu (PNP-G; Sigma-Aldrich, USA), což je β -glukosidázovým substrátem. Vzorky byly testovány nejméně ve dvou kopiích. Byl odebrán jeden mililitr narostlé kultury a centrifugován. Byl odstraněn supernatant a takto připravené buněčné pelety byly zmrazeny na -20°C . Poté byly pelety rozmrazeny a resuspendovány ve 20 μL Bifipufu (1,2 g/L hydrogenfosforečnan draselný, 0,333 g/L dihydrogenfosforečnan draselný; Lachner, Česká republika). Jeden μL suspenze Bifipufu s buněčnými peletami byl přidán do 99 μL PNP-G roztoku (20 mM v Bifipufu). Vše bylo pipetováno do mikrotitračních destiček pomocí sterilních jednokanálových pipet. β -glukosidázová aktivita byla měřena při absorpenci 405 nm po napipetování a 4 hodiny po inkubaci při 37°C . Měření proběhlo na přístroji Tecan Infinite M200 (Tecan Group AG). Rozdíl naměřených absorbancí více než 0,1 jednotky se považoval za pozitivní reakci.

4.4.2 Kultivačně pomocí indikátoru

Uvolňování eskuletinu z eskulinu bylo testováno pomocí citronanu amonno-železitého (Sigma-Aldrich, USA). Eskuletin reaguje s železitými ionty a dochází k barevné změně z fialové na neprůhlednou černou. Zásobní roztok byl připraven přidáním 10,2 g/L eskulinu (Sigma-Aldrich) do API 50 CHL média (BioMérieux) a 1 g/L citronanu amonno-železitého (Esc+Fe). Výsledná koncentrace byla 28 mM. 20 μL bifidobakteriálního kmenu bylo inokulováno do 180 μL zásobního roztoku Esc+Fe. Takto připravené mikrotitrační destičky byly inkubovány za anaerobních podmínek (GEN bag anaer) při 37°C po dobu 72 hodin. Změna barvy byla hodnocena vizuálně a každý kmen byl testován dvakrát.

5 Výsledky

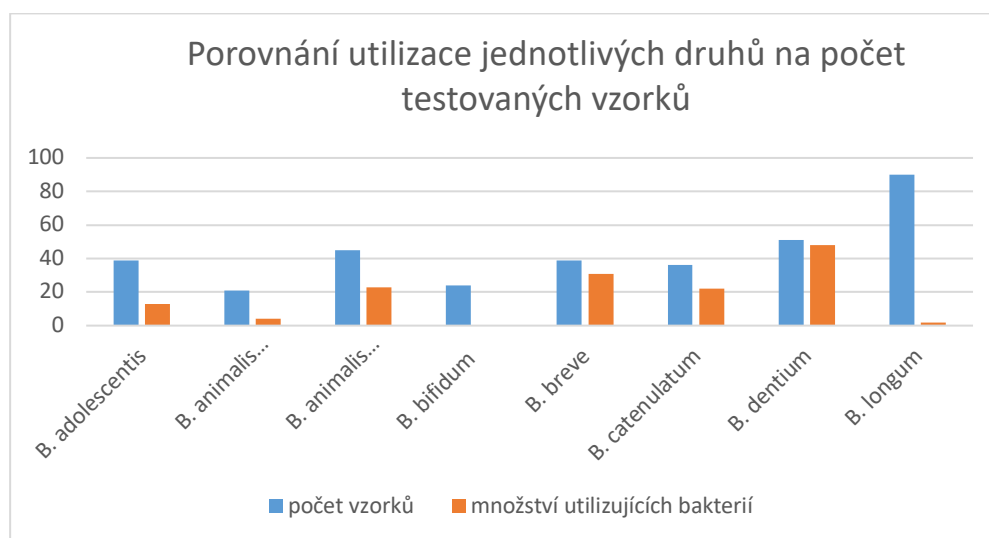
Celkem bylo testováno 115 bifidobakteriálních kmenů pocházejících z různých ekologických nik (trávicí trakt člověka, trávicí trakt zvířete, potravinové výrobky, lidská ústní dutina). Výsledky detekované β -glukosidázová aktivity byly taktéž u některých kmenů potvrzeny pomocí testovacích souprav ANAERO 23 a RAPID ID 32 A (data KMVD z předchozích experimentů).

5.1 Utilizace β -glukosidů

Všechny testované kmeny byly schopné růst v přítomnosti glukózy, čímž byla potvrzena pozitivní kontrola, a naopak žádný z testovaných kmenů nerostl v API médiu bez přidaného substrátu (negativní kontrola). Celkem 47 % kmenů bylo schopno využít jako substrát eskulin (54 kmenů), 54 % amygdalin (63 kmenů) a 24 % arbutin (28 kmenů). Z těchto čísel vyplývá, že nejpreferovanějším substrátem byl amygdalin, následovaný eskulinem a nejméně preferovaným substrátem byl arbutin.

Kmeny *B. dentium* se ukázaly jako nejvšestrannější a byly schopné růst v 94 % případů viz graf č. 1. Pouze tři kmeny (DMS 20436, TH1 a VOK II) nebyly schopné růst v přítomnosti arbutinu. Hned za nimi *B. breve* (79 % testovaných kmenů), kde pouze jeden kmen nerostl v přítomnosti eskulinu (B43) a 7 kmenů v arbutinu. Kmeny těchto dvou druhů byly všechny schopné růst v přítomnosti amygdalinu. Velmi podobné výsledky jako u *B. breve* jsme získali i u *B. catenulatum/pseudocatenulatum*. Nejmenší schopnost prokázalo *B. bifidum*, u kterého nebyl zaznamenán růst v žádném z testovaných substrátů a *B. longum*, kde pouze dva kmeny (DMS 20211, PEG 080) rostly v přítomnosti amygdalinu.

B. animalis subsp. *lactis* měl pouze jeden kmen schopný růst v přítomnosti všech testovaných substrátů (PEG 084), 66 % kmenů bylo schopné růst v přítomnosti eskulinu a 80 % v přítomnosti amygdalinu. *B. adolescentis* utilizoval převážně amygdalin (69 %), pouze 3 kmeny eskulinu a jeden kmen arbutinu. *B. animalis* subsp. *animalis* byl jediným druhem, který utilizoval pouze eskulin (57 % testovaných kmenů).



Graf 1: Porovnání utilizace jednotlivých druhů

B. bifidum a *B. longum* nevykazovaly téměř žádný růst v testovaných substrátech. Naopak růst *B. breve* vykazovala dobré utilizační schopnosti. Substrát, ve kterém došlo k nejmenšímu růstu byl arbutin.

B. adolescentis, *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. catenulatum*, *B. pseudocatenulatum* a *B. dentium* jsou vše multihostitelské druhy bakterií. *B. adolescentis* je běžně zastoupen v trávicím traktu dospělých, avšak část našich vzorků byla izolována z dětské stolice a jeden kmen ze psích výkalů. Všechny kmeny utilizovaly hlavně amygdalin a pouze dva kmeny (B35 z dětské stolice a B39 ze stolice dospělého) rostly v přítomnosti všech substrátů. *B. animalis* subsp. *lactis* byl izolovaný z probiotických produktů, potravin, dětské výživy, zvířat, kojenecké stolice a stolice dospělého. Kromě kmene PEG084 z dospělého nebyl žádný kmen schopen využít arbutin. Ostatní kmeny utilizovaly jak eskulin, tak arbutin s výjimkou kmenů izolovaných ze psa. *B. catenulatum* a *B. pseudocatenulatum* vykazovaly podobný růst v substrátech nezávisle na původu izolátu. *B. dentium* izolovaná ze zubního kazu a dětské stolice vykazovala stejnou utilizační aktivitu kromě kmene FD1, který byl schopný jako jediný z nich růst v arbutinu. Vzorky *B. dentium* izolované z opic se ukázaly jako nejvšestrannější a dobrý růst prokázaly na všech testovaných substrátech.

Tabulka 2: Přehled utilizace jednotlivých substrátů

DRUH	KMEN	PŮVOD VZORKU	GLUKÓZA	ESKULIN	AMYGDALIN	ARBUTIN	API
<i>B. adolescentis</i>	DMS 20083	střevo dospělého	+++	-	-	-	-
<i>B. adolescentis</i>	B34	stolice kojence	+++	-	+++	-	-
<i>B. adolescentis</i>	B35	stolice kojence	+++	++	+++	+	-
<i>B. adolescentis</i>	B36	stolice kojence	+++	-	-	-	-
<i>B. adolescentis</i>	B38	stolice kojence	+++	+	-	-	-
<i>B. adolescentis</i>	B2	stolice dospělého	++	-	++	-	-
<i>B. adolescentis</i>	B9	stolice dospělého	++	-	++	-	-
<i>B. adolescentis</i>	B30	stolice dospělého	+++	-	+++	-	-
<i>B. adolescentis</i>	B39	stolice dospělého	+++	++	+++	+++	-
<i>B. adolescentis</i>	B41	stolice dospělého	+++	-	+++	-	-
<i>B. adolescentis</i>	B56	stolice dospělého	++	-	-	-	-
<i>B. adolescentis</i>	PEG038	stolice dospělého	+++	-	+++	-	-
<i>B. adolescentis</i>	10/6d	fekální vzorek psa	+++	-	+++	-	-
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	DMS 20104	fekální vzorek krysy	+++	-	-	-	-
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	805P4	fekální vzorek telete	+++	+++	-	-	-
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	012II1	fekální vzorek telete	+++	+	-	-	-
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	023II	fekální vzorek telete	+++	-	-	-	-
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	J1 (L1)	fekální vzorek jehněte	++	-	-	-	-
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	J5 (L4)	fekální vzorek jehněte	+++	+	-	-	-
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	J6 (L3)	fekální vzorek jehněte	+++	++	-	-	-
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	DMS 10140	jogurt	+++	-	+++	-	-
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	BB12	probiotický produkt	++	++	++	-	-

<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	Dan	probiotický produkt	++	+	+++	-	-
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	Nestlé	dětská výživa	+++	++	++	-	-
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	S7	ovčí sýr	++	++	++	-	-
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	B22	stolice kojence	+++	++	+++	-	-
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	B25	stolice kojence	+++	+	+++	-	-
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	PEG042	stolice dospělého	+++	-	+++	-	-
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	PEG084	stolice dospělého	++	+	++	+++	-
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	P2N1	fekální vzorek psa	+++	-	-	-	-
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	43/7nb	fekální vzorek psa	+++	-	-	-	-
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	11/6a	fekální vzorek psa	++	-	-	-	-
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	ZDK1	fekální vzorek kamerunské ovce	+++	++	+++	-	-
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	ZDK4	fekální vzorek paovce hřivnaté	++	++	++	-	-
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	ZDK7	fekální vzorek okapi	+++	++	+++	-	-
<i>B. bifidum</i>	DSM 20456	stolice kojence	+++	-	-	-	-
<i>B. bifidum</i>	DSM 20239	stolice kojence	+++	-	-	-	-
<i>B. bifidum</i>	B6	stolice kojence	+++	-	-	-	-
<i>B. bifidum</i>	B33	stolice kojence	+++	-	-	-	-
<i>B. bifidum</i>	B10	stolice dospělého	+++	-	-	-	-
<i>B. bifidum</i>	B29	stolice dospělého	+++	-	-	-	-
<i>B. bifidum</i>	B40	stolice dospělého	+++	-	-	-	-
<i>B. bifidum</i>	B55	stolice dospělého	+++	-	-	-	-
<i>B. breve</i>	DSM 20213	střevo kojence	+++	++	+++	+++	-
<i>B. breve</i>	BR03	probiotický produkt	++	++	+++	-	-
<i>B. breve</i>	B13	stolice kojence	+++	+++	+++	++	-
<i>B. breve</i>	B14	stolice kojence	+++	++	+++	+++	-
<i>B. breve</i>	B37	stolice kojence	+++	+++	+++	-	-

<i>B. breve</i>	B42	stolice kojence	++	++	++	+++	-
<i>B. breve</i>	B43	stolice kojence	+++	-	++	-	-
<i>B. breve</i>	B50	stolice kojence	+++	+++	+++	+++	-
<i>B. breve</i>	B57	stolice kojence	+++	+++	+++	-	-
<i>B. breve</i>	PEG010	stolice dospělého	++	++	+++	-	-
<i>B. breve</i>	PEG064	stolice dospělého	+++	+++	+++	-	-
<i>B. breve</i>	PEG071	stolice dospělého	+++	++	+++	-	-
<i>B. breve</i>	PEG074	stolice dospělého	+++	+++	+++	++	-
<i>B. catenulatum</i>	DSM 16992	fekální vzorek dospělého	+++	+++	+++	+++	-
<i>B. catenulatum</i> subsp. <i>Kashiwanohense</i>	DSM 21854	stolice kojence	+++	-	+++	+	-
<i>B. pseudocatenulatum</i>	DSM 20438	stolice kojence	+++	+++	+++	+++	-
<i>B. catenulatum/pseudocatenulatum</i>	B12	stolice kojence	+++	-	+++	-	-
<i>B. catenulatum/pseudocatenulatum</i>	B46	stolice kojence	+++	++	+++	+++	-
<i>B. catenulatum/pseudocatenulatum</i>	B48	stolice kojence	+++	+++	-	-	-
<i>B. catenulatum/pseudocatenulatum</i>	B23	stolice dospělého	+++	++	+++	-	-
<i>B. catenulatum/pseudocatenulatum</i>	B32	stolice dospělého	+++	++	+++	-	-
<i>B. catenulatum/pseudocatenulatum</i>	B51	stolice dospělého	++	-	+++	-	-
<i>B. catenulatum/pseudocatenulatum</i>	B52	stolice dospělého	+++	+	-	+++	-
<i>B. catenulatum/pseudocatenulatum</i>	B53	stolice dospělého	+++	-	+++	-	-
<i>B. catenulatum/pseudocatenulatum</i>	22/4nb	fekální vzorek psa	+++	++	+++	-	-
<i>B. dentium</i>	DSM 20436	zubní kaz	+++	+++	+++	-	-
<i>B. dentium</i>	FD1	stolice kojence	+++	++	+++	+++	-
<i>B. dentium</i>	TH1	stolice kojence	+++	+++	+++	-	-
<i>B. dentium</i>	VOK II	stolice kojence	+++	++	+++	-	-
<i>B. dentium</i>	PEG020	stolice dospělého	+++	++	+++	+++	-
<i>B. dentium</i>	A1/5A	fekální vzorek opice	+++	+++	+++	+++	-

<i>B. dentium</i>	N12	fekální vzorek opice	+++	+++	+++	+++	-
<i>B. dentium</i>	N21	fekální vzorek opice	+++	+++	+++	+++	-
<i>B. dentium</i>	N23	fekální vzorek opice	+++	+++	+++	+++	-
<i>B. dentium</i>	N26	fekální vzorek opice	+++	+++	+++	+++	-
<i>B. dentium</i>	N77	fekální vzorek opice	+++	+++	+++	+++	-
<i>B. dentium</i>	N79	fekální vzorek opice	+++	+++	+++	+++	-
<i>B. dentium</i>	N105	fekální vzorek opice	+++	+++	+++	+++	-
<i>B. dentium</i>	N109	fekální vzorek opice	+++	+++	+++	+++	-
<i>B. dentium</i>	N110	fekální vzorek opice	+++	+++	+++	+++	-
<i>B. dentium</i>	N111	fekální vzorek opice	+++	+++	+++	+++	-
<i>B. dentium</i>	N112	fekální vzorek opice	+++	+++	+++	+++	-
<i>B. longum</i> subps. <i>infantis</i>	DSM 20088	stolice kojence	+++	-	-	-	-
<i>B. longum</i> subps. <i>longum</i>	DSM 20219	střevo dospělého	+++	-	-	-	-
<i>B. longum</i> subps. <i>suillum</i>	DSM 28597	fekální vzorek selat	+++	-	-	-	-
<i>B. longum</i> subps. <i>suis</i>	DSM 20211	fekální vzorek prasete	+++	-	+++	-	-
<i>B. longum</i> subps. <i>suis</i>	5/9	fekální vzorek jehněte	+++	-	-	-	-
<i>B. longum</i>	INFNUT	probiotický produkt	++	-	-	-	-
<i>B. longum</i>	B3	stolice kojence	+++	-	-	-	-
<i>B. longum</i>	B4	stolice kojence	++	-	-	-	-
<i>B. longum</i>	B7	stolice kojence	+++	-	-	-	-
<i>B. longum</i>	B8	stolice kojence	+++	-	-	-	-
<i>B. longum</i>	B11	stolice kojence	+++	-	-	-	-
<i>B. longum</i>	B16	stolice kojence	+++	-	-	-	-
<i>B. longum</i>	B17	stolice kojence	+++	-	-	-	-
<i>B. longum</i>	B19	stolice kojence	+++	-	-	-	-
<i>B. longum</i>	B20	stolice kojence	++	-	-	-	-
<i>B. longum</i>	B27	stolice kojence	++	-	-	-	-
<i>B. longum</i>	B28	stolice kojence	+++	-	-	-	-

<i>B. longum</i>	B44	stolice kojence	+++	-	-	-	-
<i>B. longum</i>	B49	stolice kojence	+++	-	-	-	-
<i>B. longum</i>	B1	stolice dospělého	+++	-	-	-	-
<i>B. longum</i>	B26	stolice dospělého	+++	-	-	-	-
<i>B. longum</i>	PEG057	stolice dospělého	+++	-	-	-	-
<i>B. longum</i>	PEG059	stolice dospělého	+++	-	-	-	-
<i>B. longum</i>	PEG080	stolice dospělého	++	-	++	-	-
<i>B. longum</i>	PEG104	stolice dospělého	+++	-	-	-	-
<i>B. longum</i>	022II	fekální vzorek jehněte	+++	-	-	-	-
<i>B. longum</i>	10/6b	fekální vzorek psa	+++	-	-	-	-
<i>B. longum</i>	32/3na	fekální vzorek psa	+++	-	-	-	-
<i>B. longum</i>	33/5nb	fekální vzorek psa	++	-	-	-	-
<i>B. longum</i>	33/4nc	fekální vzorek psa	++	-	-	-	-

5.2 β -glukosidázová aktivita

β -glukosidázová aktivita byla testována enzymaticky pomocí 4-nitrofenyl- β -D-glukopyranosidu. Bifidobakteriální druhy *B. adolescentis*, *B. animalis* subsp. *animalis*, *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. breve*, *B. catenulatum/pseudocatenulatum* a *B. dentium* indikovaly pozitivní reakci. U *B. bifidum* nebyla naměřena žádná β -glukosidázová aktivita a podobně na tom byl i druh *B. longum*, avšak zde se našlo pár výjimek. Čtyři kmeny pocházející ze psích výkalů (10/6b, 32/3na, 33/5nb, 33/4nc), dva z lidské stolice (B1, PEG 080) a jeden z prasečích výkalů (DMS 20211). U vybraných kmenů byla β -glukosidázová aktivita potvrzena pomocí testovacích souprav ANAERO test 23 a RAPID ID 32 A. Všechny kmeny, které byly otestovány testovacími soupravami korespondovaly s výsledky enzymatického měření.

Schopnost uvolňování eskuletinu z eskulinu bylo měřeno kolorimetricky pomocí citronanu amonno-železitého jako indikátoru barevné změny. V 94 % případů, kde byla detekována aktivita β -glukosidázy došlo zároveň i k uvolnění eskuletinu, který tedy potvrzuje β -glukosidázovou aktivitu. Pouze pár kmenů *B. longum*, jmenovitě DMS 20211, B1, 32/3na, 33/5nb, 33/4nc u kterých byla β -glukosidáza naměřena nedošlo k barevné změně na indikátoru a aktivita β -glukosidázy tudíž nebyla potvrzena.

Tabulka 3: β -glukosidázová aktivita jednotlivých kmenů

DRUH	KMEN	PŮVOD VZORKU	β -glukosidázová aktivita	uvolnění eskuletinu
<i>B. adolescentis</i>	DMS 20083	střevo dospělého	+	+
<i>B. adolescentis</i>	B34	stolice kojence	+	+
<i>B. adolescentis</i>	B35	stolice kojence	+	+
<i>B. adolescentis</i>	B36	stolice kojence	+	+
<i>B. adolescentis</i>	B38	stolice kojence	+ [ⓐ]	+
<i>B. adolescentis</i>	B2	stolice dospělého	+	+
<i>B. adolescentis</i>	B9	stolice dospělého	+ [ⓐ]	+
<i>B. adolescentis</i>	B30	stolice dospělého	+ [ⓐ]	+
<i>B. adolescentis</i>	B39	stolice dospělého	+ [ⓐ]	+
<i>B. adolescentis</i>	B41	stolice dospělého	+	+
<i>B. adolescentis</i>	B56	stolice dospělého	+	+
<i>B. adolescentis</i>	PEG038	stolice dospělého	+	+
<i>B. adolescentis</i>	10/6d	fekální vzorek psa	+	+
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	DMS 20104	fekální vzorek krysy	+	+

<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	805P4	fekální vzorek telete	+Ⓐ	+
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	012III	fekální vzorek telete	+Ⓐ	+
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	023II	fekální vzorek telete	+Ⓐ	+
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	J1 (L1)	fekální vzorek jehněte	+Ⓐ	+
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	J5 (L4)	fekální vzorek jehněte	+Ⓐ	+
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	J6 (L3)	fekální vzorek jehněte	+	+
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	DMS 10140	jogurt	+	+
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	BB12	probiotický produkt	+	+
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	Dan	probiotický produkt	+	+
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	Nestlé	dětská výživa	+	+
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	S7	ovčí sýr	+	+
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	B22	stolice kojence	+	+
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	B25	stolice kojence	+	+
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	PEG042	stolice dospělého	+	+
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	PEG084	stolice dospělého	+	+
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	P2N1	fekální vzorek psa	+	+
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	43/7nb	fekální vzorek psa	+	+
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	11/6a	fekální vzorek psa	+	+
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	ZDK1	fekální vzorek kamerunské ovce	+	+
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	ZDK4	fekální vzorek paovce hřivnaté	+	+
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	ZDK7	fekální vzorek okapi	+	+
<i>B. bifidum</i>	DSM 20456	stolice kojence	-	-
<i>B. bifidum</i>	DSM 20239	stolice kojence	-	-
<i>B. bifidum</i>	B6	stolice kojence	-Ⓘ	-
<i>B. bifidum</i>	B33	stolice kojence	-Ⓘ	-
<i>B. bifidum</i>	B10	stolice dospělého	-Ⓘ	-
<i>B. bifidum</i>	B29	stolice dospělého	-Ⓘ	-
<i>B. bifidum</i>	B40	stolice dospělého	-	-
<i>B. bifidum</i>	B55	stolice dospělého	-	-
<i>B. breve</i>	DSM 20213	střevo kojence	+	+
<i>B. breve</i>	BR03	probiotický produkt	+	+

<i>B. breve</i>	B13	stolice kojence	+Ⓡ	+
<i>B. breve</i>	B14	stolice kojence	+Ⓡ	+
<i>B. breve</i>	B37	stolice kojence	+	+
<i>B. breve</i>	B42	stolice kojence	+	+
<i>B. breve</i>	B43	stolice kojence	+	+
<i>B. breve</i>	B50	stolice kojence	+	+
<i>B. breve</i>	B57	stolice kojence	+	+
<i>B. breve</i>	PEG010	stolice dospělého	+	+
<i>B. breve</i>	PEG064	stolice dospělého	+	+
<i>B. breve</i>	PEG071	stolice dospělého	+	+
<i>B. breve</i>	PEG074	stolice dospělého	+	+
<i>B. catenulatum</i>	DSM 16992	fekální vzorek dospělého	+	+
<i>B. catenulatum</i> subsp. <i>Kashiwanohense</i>	DSM 21854	stolice kojence	+	+
<i>B. pseudocatenulatum</i>	DSM 20438	stolice kojence	+	+
<i>B. catenulatum/pseudocatenulatum</i>	B12	stolice kojence	+Ⓡ	+
<i>B. catenulatum/pseudocatenulatum</i>	B46	stolice kojence	+	+
<i>B. catenulatum/pseudocatenulatum</i>	B48	stolice kojence	+	+
<i>B. catenulatum/pseudocatenulatum</i>	B23	stolice dospělého	+Ⓡ	+
<i>B. catenulatum/pseudocatenulatum</i>	B32	stolice dospělého	+Ⓡ	+
<i>B. catenulatum/pseudocatenulatum</i>	B51	stolice dospělého	+	+
<i>B. catenulatum/pseudocatenulatum</i>	B52	stolice dospělého	+	+
<i>B. catenulatum/pseudocatenulatum</i>	B53	stolice dospělého	+	+
<i>B. catenulatum/pseudocatenulatum</i>	22/4nb	fekální vzorek psa	+	+
<i>B. dentium</i>	DSM 20436	zubní kaz	+	+
<i>B. dentium</i>	FD1	stolice kojence	+ⓐ	+
<i>B. dentium</i>	TH1	stolice kojence	+ⓐ	+
<i>B. dentium</i>	VOK II	stolice kojence	+ⓐ	+
<i>B. dentium</i>	PEG020	stolice dospělého	+	+
<i>B. dentium</i>	A1/5A	fekální vzorek opice	+ⓐ	+
<i>B. dentium</i>	N12	fekální vzorek opice	+ⓐ	+
<i>B. dentium</i>	N21	fekální vzorek opice	+ⓐ	+

<i>B. dentium</i>	N23	fekální vzorek opice	+ ^(a)	+
<i>B. dentium</i>	N26	fekální vzorek opice	+ ^(a)	+
<i>B. dentium</i>	N77	fekální vzorek opice	+ ^(a)	+
<i>B. dentium</i>	N79	fekální vzorek opice	+ ^(a)	+
<i>B. dentium</i>	N105	fekální vzorek opice	+ ^(a)	+
<i>B. dentium</i>	N109	fekální vzorek opice	+ ^(a)	+
<i>B. dentium</i>	N110	fekální vzorek opice	+ ^(a)	+
<i>B. dentium</i>	N111	fekální vzorek opice	+ ^(a)	+
<i>B. dentium</i>	N112	fekální vzorek opice	+ ^(a)	+
<i>B. longum</i> subps. <i>infantis</i>	DSM 20088	stolice kojence	-	-
<i>B. longum</i> subps. <i>longum</i>	DSM 20219	střevo dospělého	-	-
<i>B. longum</i> subps. <i>suillum</i>	DSM 28597	fekální vzorek selat	-	-
<i>B. longum</i> subps. <i>suis</i>	DSM 20211	fekální vzorek prasete	-	-
<i>B. longum</i> subps. <i>suis</i>	5/9	fekální vzorek jehněte	-	-
<i>B. longum</i>	INFNUT	probiotický produkt	-	-
<i>B. longum</i>	B3	stolice kojence	- ^(r)	-
<i>B. longum</i>	B4	stolice kojence	- ^(r)	-
<i>B. longum</i>	B7	stolice kojence	-	-
<i>B. longum</i>	B8	stolice kojence	-	-
<i>B. longum</i>	B11	stolice kojence	-	-
<i>B. longum</i>	B16	stolice kojence	-	-
<i>B. longum</i>	B17	stolice kojence	- ^(r)	-
<i>B. longum</i>	B19	stolice kojence	- ^(r)	-
<i>B. longum</i>	B20	stolice kojence	- ^(r)	-
<i>B. longum</i>	B27	stolice kojence	-	-
<i>B. longum</i>	B28	stolice kojence	-	-
<i>B. longum</i>	B44	stolice kojence	- ^(a)	-
<i>B. longum</i>	B49	stolice kojence	-	-
<i>B. longum</i>	B1	stolice dospělého	+	-
<i>B. longum</i>	B26	stolice dospělého	- ^(r)	-
<i>B. longum</i>	PEG057	stolice dospělého	-	-
<i>B. longum</i>	PEG059	stolice dospělého	-	-

<i>B. longum</i>	PEG080	stolice dospělého	+	+
<i>B. longum</i>	PEG104	stolice dospělého	-	-
<i>B. longum</i>	022II	fekální vzorek jehněte	-(F)	-
<i>B. longum</i>	10/6b	fekální vzorek psa	+	+
<i>B. longum</i>	32/3na	fekální vzorek psa	+	-
<i>B. longum</i>	33/5nb	fekální vzorek psa	+	-
<i>B. longum</i>	33/4nc	fekální vzorek psa	+	-

6 Diskuze

Bifidobakterie pocházejí z různých ekologických nik, avšak většina z nich pochází z lidského, nebo zvířecího těla (Felis & Dellaglio, 2007). V posledních letech bylo popsáno velké množství nových druhů bifidobakterií pocházejících z trávicího traktu primátů (Neuzil-Bunesova et al., 2021). Jejich konkurenceschopnost a perzistence v trávicím traktu je z velké části přičítána sacharolytickým vlastnostem (Milani et al., 2016). β -glukosidy rostlinného původu jsou strukturně rozmanité a po konzumaci se mohou dostat do tlustého střeva a být enzymaticky modifikovány (Modrackova et al., 2020). Pochopením metabolických aktivit bifidobakterií, zejména jejich schopnosti utilizace komplexních oligosacharidů nám dává možnost jejich zvýhodnění oproti jiným střevním konkurenčním bakteriím či patogenům. Důkladná analýza jejich adaptivních reakcí by také mohla pomoci zlepšit životaschopnost, funkčnost, skladovatelnost a v neposlední řadě zdokonalit jejich dodávání jakožto probiotik do organismu (Ventura et al., 2007). Skutečností, že se jedná o druhově specifické, případně multihostitelské vlastnosti, napovídá fakt, že bifidobakterie izolované z primátů nebo lidí mohou například produkovat různé množství folátů, zatímco bakterie izolované z jiných zvířat mimo primáty tuto schopnost nemají. Produkce těchto folátů je také závislá na druhu a kmeni konkrétní bifidobakterie. Fylogenetická linie bifidobakterií hraje pravděpodobně mnohem větší roli pro produkci konkrétních látek než hostitelská strava (D'Aimmo et al., 2014). Evoluční příbuznost a genetický zisk v průběhu evoluce by mohly být determinanty určující schopnost bifidobakterií k produkci a expresi konkrétních látek (D'Aimmo et al., 2014; Milani et al., 2016). Předpokládá se, že události získávání genů v průběhu evoluce usnadnily adaptaci na konkrétní ekologickou niku a nebo zvýšily konkurenceschopnost ve stávající nise (Ventura et al., 2006; Ventura, Canchaya, et al., 2007).

Cílem diplomové práce bylo otestovat β -glukosidázovou aktivitu vybraných druhů bifidobakterií a sledovat jejich schopnost růstu v přítomnosti tří β -glukosidázových substrátů. Bylo testováno celkem 115 kmenů bifidobakterií náležející druhům *Bifidobacterium adolescentis*, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. dentium*, *B. longum*, *B. catenulatum* a *B. pseudocatenulatum*.

Rostlinné glukosidy jsou biologicky aktivní látky v rostlinách a jejich aktivitu a dostupnost lze ovlivnit či upravit glukosilhydrolázovou aktivitou (Modrackova et al., 2020). β -glukosidáza je zásadním enzymem katalyzujícím glykosidové vazby v β -glukosidech za uvolnění glukózy (Jurica et al., 2017). Přítomnost β -glukosidázy byla potvrzena u konkrétních kmenů již v předešlé studii (Dabek et al., 2008). Konkrétně se jednalo o *B. adolescentis* DMS 20083, *B. breve* DMS 20213 a *B. pseudocatenulatum* DMS 20438. A stejně tak jako u námi testovaných kmenů se tato enzymatická aktivita nepotvrdila u *B. bifidum* DMS 20456 a *B. longum* DMS 20219.

B. bifidum je podstatnou součástí dětské střevní mikrobioty. Dle sekvence jejich bakteriálního pangenomu byl odhalen gen přítomný pouze v tomto bifidobakteriálním taxonu a podtrhuje strategii získávání živin kojenců z hostitelských glykanů (Duranti et al., 2015). Tato bakterie se zdá být specializovaná na degradaci oligosacharidů mateřského mléka, ale dále již meziproducty nemetabolizuje. Zdá se, že tyto metabolity jsou ponechávány jiným bifidobakteriálním komunitám v rámci cross-feedingu (Gotoh et al., 2018). *B. bifidum* pravděpodobně postrádá β -glukosidázovou aktivitu vzhledem ke své adaptaci na počáteční

degradaci mateřského mléka. Kromě *B. bifidum* jsou v trávicím traktu novorozence nejčastěji detekovány ještě *B. breve* a *B. longum*. Dle fylogeneze těchto tří druhů bakterií se zdá, že mají společného předka (Lugli et al., 2014; Kwak et al., 2016). Metabolismus sacharidů mateřského mléka není pravděpodobně jediným faktorem odpovědným za adaptaci bifidobakterií v lidském střevě. Genom *B. longum* subsp. *infantis*, který je typicky přítomný ve střevech kojených dětí, například kóduje proteiny pro určité druhově-specifické metabolické cesty jako je metabolismus močoviny a biosyntézy riboflavinu a lantibiotik (Kwak et al., 2016).

B. breve jako jediný z bakterií zapojujících se do metabolismu mateřského mléka vykazoval také pozitivní přítomnost β -glukosidázy a zároveň byl schopný fermentovat velké množství β -glukosidů. Genom *B. breve* UCC2003 obsahuje širokou škálu α -glukosidáz. Geny kódující čtyři hlavní funkčně aktivní α -glukosidázy jsou schopny hydrolyzovat téměř všechny α -glukosidové vazby očekávatelné v glykanových substrátech v nižší části gastrointestinálního traktu (Kelly et al., 2016). Druhou nejčastěji identifikovanou skupinou aktivních enzymů jsou právě β -glukosidázy (Youn et al., 2012), následované β -galaktosidázami (James et al., 2016). Toto množství glukosidáz poskytuje *B. breve* adaptivní schopnost a metabolickou všestrannost pro přechodnou povahu růstových substrátů v gastrointestinálním traktu (Kelly et al., 2016).

B. adolescentis je dominantní bakterie nacházející se v dospělém tlustém střevě a kromě toho byla také izolována z tuřího bachoru, stolice kojence nebo orangutana (D'Aimmo et al., 2014; Mattarelli & Biavati, 2018). Analýza publikovaných genomů *B. adolescentis* pocházejících z různých prostředí umožnila lepší identifikaci jejich pangenomu a porovnání genetické rozmanitosti. *B. adolescentis* je obohacen o geny, u nichž se předpokládá účast na metabolismu dietních sacharidů z rostlin, a to především škrobu a jemu podobných oligo a polysacharidů s výjimkou dvou kmenů 703 B a JMC 15918. Oproti druhům *B. bifidum*, *B. longum* a *B. breve* postrádá geny pro utilizaci hostitelských glykanů jako jsou oligosacharidy mateřského mléka nebo mucin. U *B. adolescentis* se také u žádného z testovaných kmenů neprokázala schopnost využití fukózy, N-acetylglukosaminu a N-acetylgalaktosaminu. Je tedy pravděpodobné, že schopnost utilizace mono a oligosacharidů hostitelských glykanů je u tohoto druhu omezena (Duranti et al., 2016). V našem experimentu většina kmenů *B. adolescentis* byla schopná využít amygdalinu a pouze kmeny B35 a B39 byly schopné fermentovat všechny substráty. Schopnost růstu v substrátech nevykazovala značné rozdíly mezi původy jednotlivých kmenů. Ač β -glukosidázová aktivita byla pozitivně testována u všech kmenů, pouze část z nich vykazovala růst na testovaných substrátech.

B. animalis a *B. lactis* byly překlasifikovány v roce 2004 do dvou nových poddruhů *B. animalis* subsp. *animalis* a *B. animalis* subsp. *lactis* vzhledem ke své příbuznosti, ale odlišným podmínkám růstu a různým původům, ze kterých byly izolovány. Zástupci těchto poddruhů sdílí více než 70 % stejné DNA, a proto v minulosti byly považovány za jediný druh (Masco et al., 2004). *B. animalis* subsp. *animalis* zahrnuje kmeny izolované z krys a dalších zvířat (Mattarelli & Biavati, 2018). Drtivá většina kmenů tohoto druhu není schopná využívat laktózu jako jediný zdroj uhlíku (Egan et al., 2018). *B. animalis* subsp. *lactis* byl izolován ze vzorků fermentovaného mléka, lidské a kojenecké stolice, kuřecích a králičích výkalů a z odpadních vod (Masco et al., 2004). Probiotické kmeny této bakterie byly začleněny do lidské stravy začleněním do široké škály potravin a doplňků stravy (Barrangou et al., 2009). Zakódované biologické funkce v kmeni AD011, který byl izolován z kojence, patří k nejmenším ze sekvenovaných bakteriálních genomů (J. F. Kim et al., 2009). Intenzivní

kultivace v nutričně bohatých médiích může být odrazem ztráty genů v důsledku adaptace na fermentační prostředí čisté kultury (J. H. Lee et al., 2008). Za odolnost v lidském organismu mohou tedy dva faktory, přičemž jedním z nich je odolnost vůči žluči a kyselinám a druhým je katabolismus rostlinných sacharidů. Sekvence kmenů DMS 10140 a BI-04 podporuje tvrzení, že je jedná o genomicky monomorfní poddruh (Barrangou et al., 2009). Genetická analýza AD011 odhalila existenci celkem 35 genů majících souvislost s glykosyl hydrolázami, konkrétně tři z nich pro β -glukosidázu (J. F. Kim et al., 2009). Všechny tyto geny byly úspěšně klonovány a exprimovány v jiných organismech, přičemž rekombinantní gen BLA_0141 vykazoval širokou škálu enzymatických aktivit (J. Y. Kim et al., 2012). *B. animalis* subsp. *animalis* měl značně nižší utilizační schopnost oproti *B. animalis* subsp. *lactis*. Oba druhy až na jednu výjimku (PEG084, stolice dospělého) nerostly v přítomnosti arbutinu. V případě *B. animalis* subsp. *animalis* byly testovány kmeny izolované ze zvířat. Kromě kmenu izolovaného z křavy pocházely další vzorky z telat a jehňat. Je možné, že důvodem špatného růstu může být skutečnost, že strategie získávání živin je podobná jako u lidí a mláďata jsou primárně zaměřená na mléčný typ stravy a jejich trávicí trakt se teprve přizpůsobuje trávení ostatních druhů sacharidů. *B. animalis* subsp. *lactis* vykazoval mnohem větší růst oproti poddruhu *animalis*. Pouze jeden kmen však byl schopen využít arbutin (PEG084, stolice dospělého). Obecně lze říct, že mezi vzorky nebyl rozdíl mezi izoláty pocházející z potravin, probiotických produktů, zvířat či dětské nebo dospělé stolice. Ale všechny kmeny izolované ze psích výkalů nevykazovaly žádný růst ani v jednom ze substrátů, ačkoliv β -glukosidáza byla detekována. Také ve studii publikované Stropfová & Lauková (2014) u psích bifidobakteriálních izolátů byla pozorována slabá až střední aktivita β -glukosidáz. Enzymy nebyly s největší pravděpodobností exprimovány také za našich testovacích podmínek, nebo byly obsaženy v nedostatečném množství.

Jako jeden z nejčastěji izolovaných druhů z lidské stolice je *B. catenulatum*. Tento druh vykazuje vysoké hodnoty genetické podobnosti s *B. pseudocatenulatum*. Rozdílů mezi nimi je více. *B. catenulatum* není schopen fermentovat manózu a škrob a také nikdy nebyl izolován z telecích výkalů. Oba tyto druhy také patří k nejčastěji detekovaným v lidské stolici (Mattarelli & Biavati, 2018). U obou druhů byla identifikována přítomnost β -glukosidáz (Pokusaeva et al., 2011). V našem experimentu kmeny izolované z člověka i dítěte nevykazovaly značné rozdíly v enzymatické aktivitě a ani tyto druhy mezi sebou nenaznačovaly různé substrátové preference. Důvodem je pravděpodobně právě jejich vysoká genetická podobnost. S čím souvisí i nemožnost tyto kmeny spolehlivě odlišit pomocí MALDI TOF hmotnostní spektrometrie.

Studie dle Raimondi et al., (2009) zkoumala biokonverzi sojových isoflavonů daidzinu a daidzeinu pomocí enzymatické aktivity bifidobakteriálních kmenů. Dva kmeny druhu *B. longum* (MB 220 a MB224) nevykazovaly využití těchto isoflavonů a stejně tak přítomnost β -glukosidázy nebyla detekována. V našem experimentu *B. longum* také vykazoval nízkou aktivitu tohoto enzymu a neuvolnění eskuletinu. Souvislosti naznačují, že četnost výskytu β -glukosidázové aktivity není zdaleka tak početná jako u jiných druhů. Dále také kmeny, u kterých byla detekována nejvyšší aktivita patřily k druhům *B. adolescentis* a *B. pseudocatenulatum*. V našem případě oba tyto druhy bakterií vykazovaly β -glukosidázovou aktivitu u všech kmenů. Dabek et al., (2008) detekovaly nejvyšší aktivitu právě u těchto druhů. Důvodem pro β -glukosidázovou aktivitu *B. longum* nevykazovala uniformní výsledky, jako

tomu bylo u ostatních bakterií, může být skutečnost, že tato bakterie má nejmenší jadrový genom obsahující asi 868 genů, ale zároveň obsahuje největší pangenom s téměř 4035 geny. V porovnání s *B. animalis* mající pangenom zhruba poloviční než *B. longum*. a *B. animalis*, který je většinou izolován z fermentovaných potravin se pravděpodobně přizpůsobil uniformnímu prostředí zatímco *B. longum* získal během svého vývoje řadu genů potřebných k přežití (Kwak et al., 2016).

Ačkoli jsou bifidobakterie všeobecně považovány za zdraví prospěšné, *B. dentium* je považován za patogen pro svou kariogenní aktivitu (Mattarelli & Biavati, 2018). Sekvence kmenu Bd1 odhalila předpovězenou škálu metabolických schopností získávání živin, obrany proti antimikrobiálním látkám a konkurenceschopnosti v ústní dutině. Tyto geny jsou vysoce exprimovány za fyziologických podmínek. Genom se pravděpodobně vyvinul omezeným počtem událostí získávání horizontálních genů a naznačuje úzkou hranici oddělující komenzální bakterie a podmíněné patogeny (Ventura et al., 2009). Kromě zubního kazu a ústních dutin byla tato bakterie také izolována z lidské stolice a vagíny a z výkalů šimpanze (D'Aimmo et al., 2014; Mattarelli & Biavati, 2018). Podle našich výsledků se *B. dentium* projevil jako nejvšestrannější. Pouze tři kmeny *B. dentium* nebyly schopné růst v přítomnosti arbutinu. Na rozdíl od ostatních bifidobakterií využívá pravděpodobně jedinečnou konkurenční strategii, za kterou je odpovědná právě adaptace na niku. Jelikož ústní dutina obsahuje mikrobiální společenství se složitými fyzikálními a biochemickými interakcemi, přežití, kolonizace a růst této bakterie v polymikrobiálním prostředí je poměrně jedinečné (Ventura et al., 2009).

Ač velké množství kmenů prokázalo přítomnost β -glukosidázy a následné uvolnění eskuletinu, ne všechny z těchto kmenů dokázaly růst v přítomnosti eskulinu. Je možné, že důvodem by mohla být vysoká antimikrobiální aktivita (Yang et al., 2016). V neposlední řadě je důležité zmínit, že kromě *B. breve* všechny bifidobakteriální kmeny, které vykazovaly růst v jednom nebo více substrátech se považují za kosmopolitní či multihostitelské, a tudíž jejich přítomnost je možná u více různých hostitelů. Konkrétně jsou to *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. catenulatum* a *B. dentium* (Lamendella et al., 2008; Turroni et al., 2014).

Korejská studie z roku 1996 zabývající se enzymatickou aktivitou β -glukosidázy kvůli domnělé mutagenní aktivaci β -glukosidů naznačila teorii prevalence této enzymatické aktivity. Ač značná část jejich testovaných kmenů vykazovala β -glukosidázovou aktivitu, testované kmeny pocházející z dospělých jedinců projevily tuto aktivitu značně vyšší (Choi et al., 1996).

Existuje několik experimentálních důkazů, že určité bifidobakterie mohou chránit hostitele před karcinogenní aktivitou střevní mikrobioty. Vykazováním ochranných účinků střevního prostředí různými mechanismy by mohlo znamenat pokrok v oblasti profylaxe a terapie (Picard et al., 2005). Dle Arboleya et al. (2016) by se bifidobakterie daly využít jako potenciální biomarkery sloužící k indikaci určitých onemocnění. Kromě toho by použití bifidobakterií jako nosičů pro terapeutické látky cílené na nádory bylo slibné vzhledem k jejich anaerobní povaze a mohlo by zajistit bezpečnou formu podpory léčby tohoto stavu. Bylo prokázáno, že sacharidy rostlinného původu stimulují růst některých druhů bifidobakterií. K získání veškerých znalostí o genech, které se podílejí na degradaci a využití sacharidů je nutná však charakterizace a mutagenese vybraných kmenů (O'Callaghan & van Sinderen, 2016). Tato genetická manipulace představuje příležitost zlepšení účinků *in vivo* a zároveň by umožnila lepší pochopení molekulárních mechanismů a jejich interakce s lidským hostitelem

(Cronin et al., 2011; O'Callaghan & van Sinderen, 2016). Chromozomální integrace a exprese vložených genů by razantně usnadnila výběr vhodných kmenů a mohla poskytnou genetickou stabilitu nutnou pro biomedicínskou, nebo potravinářskou aplikaci. Tím by se dala snížit omezení, které mají konvenční probiotické kmeny (Zuo et al., 2020). Další z možností genetické manipulace může být aplikace metody CRISPR/Cas9, kterou lze modifikovat genomy živých organismů. Tato metoda již byla použita u určitých bakterií mléčného kvašení a brzy by se mohla adaptovat i na bifidobakterie (Roberts & Barrangou, 2020). Průchod trávicím traktem lze také značně vylepšit zavedením genů z patogenních bakterií. Transportér glycin betainu z *Listeria monocytogenes* zavedený do *B. breve* UCC2003 značně zlepšil průchod trávicím traktem a perzistenci ve střevech. Avšak zavedení genů z patogenních organismů do probiotických kultur pravděpodobně nebude schváleno (Sheehan et al., 2007).

Porovnaná data s dostupnými studiemi dokazují, že β -glukosidáza je druhově specifický enzym umožňující bifidobakteriím růst v přítomnosti β -glukosidů. Přítomnost tohoto enzymu je závislá na jeho genetickém základu, který se pravděpodobně vyvinul s adaptací na konkrétní ekologickou niku. Růst bifidobakterií ale závisí na substrátové preferenci a rezistenci proti antimikrobiálním látkám produkovanými β -glukosidovými aglykony.

7 Závěr

Cílem mé diplomové práce bylo otestovat schopnost β -glukosidázové aktivity vybraných druhů bifidobakterií a sledovat jejich schopnost růst v přítomnosti eskulinu, amygdalinu a arbutinu a vyhodnotit tyto biologické aktivity v závislosti na druhu a původu testovaných kmenů. Předpokládali jsme, že schopnost bifidobakterií růst v přítomnosti zvolených rostlinných β -glukosidů souvisí s jejich β -glukosidázovou aktivitou a že tato vlastnost bude druhově či kmenově specifická. Prozatím existuje velmi málo studií, které by zkoumaly bifidobakteriální využití β -glukosidů a jejich vlivu na biologickou aktivitu a zároveň dopad na růst těchto bakterií.

Zjistili jsme, že aktivita β -glukosidázy je druhově specifická. Tento enzym byl detekován u druhů charakteristických pro gastrointestinální trakt zvířat a lidí. Druhy dominující ve střevech kojenců postrádají tento enzym pravděpodobně v důsledku adaptace na mléčný typ stravy. Její přítomnost je zachována u druhů, které se adaptovaly ke konkrétní ekologické nise. Růst bifidobakterií v testovaných substrátech byl převážně druhově specifický pro konkrétní glukosid s odlišnostmi u multihostitelských kmenů. Z výsledků je také patrné, že aktivita β -glukosidázy může ovlivnit přístup ke zdrojům energie a zároveň uvolnit antibakteriální aglykony.

8 Literatura

- Alard, J., Peucelle, V., Boutillier, D., Breton, J., Kuylle, S., Pot, B., Holowacz, S., & Grangette, C. (2018). New probiotic strains for inflammatory bowel disease management identified by combining in vitro and in vivo approaches. *Beneficial Microbes*, 9(2). <https://doi.org/10.3920/BM2017.0097>
- Allen-Blevins, C. R., Andlid, T. A., Biavati, B., Callegari, M. L., Castro-Bravo, N., D'Aimmo, M. R., Delgado, S., Egan, M., Fukiya, S., Hevia, A., Jastrebova, J., Kawasaki, S., Lawson, P. A., Levantovsky, R., Lewis, Z. T., Margolles, A., Mattarelli, P., Milani, C., Mills, D. A., ... Yokota, A. (2018). Contributors. In *The Bifidobacteria and Related Organisms*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-805060-6.00022-3>
- Arbolea, S., Watkins, C., Stanton, C., & Ross, R. P. (2016). Gut bifidobacteria populations in human health and aging. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 7, Issue AUG). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01204>
- Barrangou, R., Briczinski, E. P., Traeger, L. L., Loquasto, J. R., Richards, M., Horvath, P., Coûté-Monvoisin, A. C., Leyer, G., Rendulic, S., Steele, J. L., Broadbent, J. R., Oberg, T., Dudley, E. G., Schuster, S., Romero, D. A., & Roberts, R. F. (2009). Comparison of the complete genome sequences of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* DSM 10140 and BI-04. *Journal of Bacteriology*, 191(13). <https://doi.org/10.1128/JB.00155-09>
- Bartnik, M., & Facey, P. C. (2017). Chapter 8. Glycosides. In *Pharmacognosy*.
- Berman, J. J. (2012). Taxonomic Guide to Infectious Diseases. In *Taxonomic Guide to Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1016/C2011-0-04443-5>
- Blaut, M., Braune, A., Wunderlich, S., Sauer, P., Schneider, H., & Glatt, H. (2006). Mutagenicity of arbutin in mammalian cells after activation by human intestinal bacteria. *Food and Chemical Toxicology*, 44(11). <https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.06.015>
- Brito-Arias, M. (2007). Synthesis and characterization of glycosides. In *Synthesis and Characterization of Glycosides*. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-70792-1>
- Brown, C. J., Mtui, D., Oswald, B. P., Van Leuven, J. T., Vallender, E. J., Schultz-Darken, N., Ross, C. N., Tardif, S. D., Austad, S. N., & Forney, L. J. (2019). Comparative genomics of *Bifidobacterium* species isolated from marmosets and humans. *American Journal of Primatology*, 81(10–11). <https://doi.org/10.1002/ajp.22983>
- Bunešová, V., Joch, M., Musilová, S., & Rada, V. (2017). Bifidobacteria, Lactobacilli, and Short Chain Fatty Acids of Vegetarians and Omnivores. *Scientia Agriculturae Bohemica*, 48(1). <https://doi.org/10.1515/sab-2017-0007>
- Bunesova, V., Lacroix, C., & Schwab, C. (2018). Mucin Cross-Feeding of Infant Bifidobacteria and *Eubacterium hallii*. *Microbial Ecology*, 75(1). <https://doi.org/10.1007/s00248-017-1037-4>
- Bunešová, V., Vlková, E., Rada, V., Kňazovická, V., Ročková, Š., Geigerová, M., & Božik, M. (2012). Growth of infant fecal bacteria on commercial prebiotics. *Folia Microbiologica*, 57(4). <https://doi.org/10.1007/s12223-012-0123-8>
- Chen, Y., Zhang, Q., Liu, H., Lu, C., Liang, C. L., Qiu, F., Han, L., & Dai, Z. (2018). Esculetin Ameliorates Psoriasis-like skin disease in mice by inducing CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. *Frontiers in Immunology*, 9(SEP). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02092>
- Choi, Y. J., Kim, C. J., Park, S. Y., Ko, Y. T., Jeong, H. K., & Ji, G. E. (1996). Growth and β -

- glucosidase activity of Bifidobacterium. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 6(4).
- Chu, C. Y., Tsai, Y. Y., Wang, C. J., Lin, W. L., & Tseng, T. H. (2001). Induction of apoptosis by esculetin in human leukemia cells. *European Journal of Pharmacology*, 416(1–2). [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(01\)00859-7](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(01)00859-7)
- Collabo, M. C., Gueimonde, M., Hernández, M., Sanz, Y., & Salminen, S. (2005). Adhesion of selected Bifidobacterium strains to human intestinal mucus and the role of adhesion in enteropathogen exclusion. *Journal of Food Protection*, 68(12). <https://doi.org/10.4315/0362-028x-68.12.2672>
- committee on herbal medicinal products (HMPC), & European Medicines Agency. (2012). Assessment report on *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng., folium. *Comitee on Herbal Medicinal Products*, 44(January).
- Corrêa, N. B. O., Péret Filho, L. A., Penna, F. J., Lima, F. M. L. S., & Nicoli, J. R. (2005). A randomized formula controlled trial of Bifidobacterium lactis and Streptococcus thermophilus for prevention of antibiotic-associated diarrhea in infants. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 39(5). <https://doi.org/10.1097/01.mcg.0000159217.47419.5b>
- Cronin, M., Ventura, M., Fitzgerald, G. F., & Van Sinderen, D. (2011). Progress in genomics, metabolism and biotechnology of bifidobacteria. In *International Journal of Food Microbiology* (Vol. 149, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.019>
- D'Aimmo, M. R., Modesto, M., Mattarelli, P., Biavati, B., & Andlid, T. (2014). Biosynthesis and cellular content of folate in bifidobacteria across host species with different diets. *Anaerobe*, 30. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.09.018>
- Dabek, M., McCrae, S. I., Stevens, V. J., Duncan, S. H., & Louis, P. (2008). Distribution of β -glucosidase and β -glucuronidase activity and of β -glucuronidase gene gus in human colonic bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 66(3). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00520.x>
- Davies, G. J., Gloster, T. M., & Henrissat, B. (2005). Recent structural insights into the expanding world of carbohydrate-active enzymes. In *Current Opinion in Structural Biology* (Vol. 15, Issue 6). <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2005.10.008>
- De Arriba, S. G., Naser, B., & Nolte, K. U. (2013). Risk assessment of free hydroquinone derived from arctostaphylos uva-ursi folium herbal preparations. In *International Journal of Toxicology* (Vol. 32, Issue 6). <https://doi.org/10.1177/1091581813507721>
- de Vries, W., & Stouthamer, A. H. (1967). Pathway of glucose fermentation in relation to the taxonomy of bifidobacteria. *Journal of Bacteriology*, 93(2). <https://doi.org/10.1128/jb.93.2.574-576.1967>
- Delcenserie, V., Gavini, F., Beerens, H., Tresse, O., Franssen, C., & Daube, G. (2007). Description of a new species, Bifidobacterium crudilactis sp. nov., isolated from raw milk and raw milk cheeses. *Systematic and Applied Microbiology*, 30(5). <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2007.01.004>
- Duranti, S., Milani, C., Lugli, G. A., Mancabelli, L., Turrone, F., Ferrario, C., Mangifesta, M., Viappiani, A., Sanchez, B., Margolles, A., Van Sinderen, D., & Ventura, M. (2016). Evaluation of genetic diversity among strains of the human gut commensal Bifidobacterium adolescentis. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep23971>
- Duranti, S., Milani, C., Lugli, G. A., Turrone, F., Mancabelli, L., Sanchez, B., Ferrario, C., Viappiani, A., Mangifesta, M., Mancino, W., Gueimonde, M., Margolles, A., van

- Sinderen, D., & Ventura, M. (2015). Insights from genomes of representatives of the human gut commensal *Bifidobacterium bifidum*. *Environmental Microbiology*, *17*(7). <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12743>
- Egan, M., Bottacini, F., O'Connell Motherway, M., Casey, P. G., Morrissey, R., Melgar, S., Faurie, J. M., Chervaux, C., Smokvina, T., & van Sinderen, D. (2018). Staying alive: growth and survival of *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* under in vitro and in vivo conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *102*(24). <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9413-7>
- Egan, M., O'Connell Motherway, M., Kilcoyne, M., Kane, M., Joshi, L., Ventura, M., & Van Sinderen, D. (2014). Cross-feeding by *Bifidobacterium breve* UCC2003 during co-cultivation with *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 in a mucin-based medium. *BMC Microbiology*, *14*(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-014-0282-7>
- Escribano, J., Ferré, N., Gispert-Llaurado, M., Luque, V., Rubio-Torrents, C., Zaragoza-Jordana, M., Polanco, I., Codoñer, F. M., Chenoll, E., Morera, M., Moreno-Muñoz, J. A., Rivero, M., & Closa-Monasterolo, R. (2018). *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CECT7210-supplemented formula reduces diarrhea in healthy infants: A randomized controlled trial. *Pediatric Research*, *83*(6). <https://doi.org/10.1038/pr.2018.34>
- Favier, C. F., Vaughan, E. E., De Vos, W. M., & Akkermans, A. D. L. (2002). Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(1). <https://doi.org/10.1128/AEM.68.1.219-226.2002>
- Felis, G. E., & Dellaglio, F. (2007). Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. In *Current Issues in Intestinal Microbiology* (Vol. 8, Issue 2).
- Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K. S., Cani, P. D., Verbeke, K., & Reid, G. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. In *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 14, Issue 8). <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>
- Gibson, G. R., Probert, H. M., Loo, J. Van, Rastall, R. A., & Roberfroid, M. B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, *17*(2). <https://doi.org/10.1079/nrr200479>
- GOLFETTO, L., SENNA, F. D. de, HERMES, J., BESERRA, B. T. S., FRANÇA, F. da S., & MARTINELLO, F. (2014). LOWER BIFIDOBACTERIA COUNTS IN ADULT PATIENTS WITH CELIAC DISEASE ON A GLUTEN-FREE DIET. *Arquivos de Gastroenterologia*, *51*(2). <https://doi.org/10.1590/s0004-28032014000200013>
- Gotoh, A., Katoh, T., Sakanaka, M., Ling, Y., Yamada, C., Asakuma, S., Urashima, T., Tomabechi, Y., Katayama-Ikegami, A., Kurihara, S., Yamamoto, K., Harata, G., He, F., Hirose, J., Kitaoka, M., Okuda, S., & Katayama, T. (2018). Sharing of human milk oligosaccharides degradants within bifidobacterial communities in faecal cultures supplemented with *Bifidobacterium bifidum*. *Scientific Reports*, *8*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32080-3>
- Guandalini, S. (2010). Update on the role of probiotics in the therapy of pediatric inflammatory bowel disease. In *Expert Review of Clinical Immunology* (Vol. 6, Issue 1). <https://doi.org/10.1586/eci.09.70>

- Gueimonde, M., Margolles, A., G. de los Reyes-Gavilán, C., & Salminen, S. (2007). Competitive exclusion of enteropathogens from human intestinal mucus by Bifidobacterium strains with acquired resistance to bile - A preliminary study. *International Journal of Food Microbiology*, 113(2). <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.05.017>
- He, F., Ouwehand, A. C., Isolauri, E., Hosoda, M., Benno, Y., & Salminen, S. (2001). Differences in composition and mucosal adhesion of bifidobacteria isolated from healthy adults and healthy seniors. *Current Microbiology*, 43(5). <https://doi.org/10.1007/s002840010315>
- He, X. Y., Wu, L. J., Wang, W. X., Xie, P. J., Chen, Y. H., & Wang, F. (2020). Amygdalin - A pharmacological and toxicological review. In *Journal of Ethnopharmacology* (Vol. 254). <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112717>
- Henrissat, B., Deleury, E., & Coutinho, P. M. (2002). Glycogen metabolism loss: A common marker of parasitic behaviour in bacteria? In *Trends in Genetics* (Vol. 18, Issue 9). [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(02\)02734-8](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(02)02734-8)
- Hooper, L. V., Midwedt, T., & Gordon, J. I. (2002). How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. In *Annual Review of Nutrition* (Vol. 22). <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.22.011602.092259>
- James, K., Motherway, M. O. C., Bottacini, F., & Van Sinderen, D. (2016). Bifidobacterium breve UCC2003 metabolises the human milk oligosaccharides lacto-N-tetraose and lacto-N-neo-tetraose through overlapping, yet distinct pathways. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep38560>
- Jiménez-Orozco, F. A., Rosales, A. A. R., Vega-López, A., Domínguez-López, M. L., García-Mondragón, M. J., Maldonado-Espinoza, A., Lemini, C., Mendoza-Patiño, N., & Mandoki, J. J. (2011). Differential effects of esculetin and daphnetin on in vitro cell proliferation and in vivo estrogenicity. *European Journal of Pharmacology*, 668(1–2). <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.06.024>
- Jurica, K., Gobin, I., Kremer, D., Čepo, D. V., Grubešić, R. J., Karačonji, I. B., & Kosalec, I. (2017). Arbutin and its metabolite hydroquinone as the main factors in the antimicrobial effect of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaves. *Journal of Herbal Medicine*, 8. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2017.03.006>
- Kaneko, T., Tahara, S., & Takabayashi, F. (2007). Inhibitory effect of natural coumarin compounds, esculetin and esculin, on oxidative DNA damage and formation of aberrant crypt foci and tumors induced by 1,2-dimethylhydrazine in rat colons. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30(11). <https://doi.org/10.1248/bpb.30.2052>
- Kelly, E. D., Bottacini, F., O’Callaghan, J., Motherway, M. O. C., O’Connell, K. J., Stanton, C., & van Sinderen, D. (2016). Glycoside hydrolase family 13 α -glucosidases encoded by Bifidobacterium breve UCC2003; A comparative analysis of function, structure and phylogeny. *International Journal of Food Microbiology*, 224. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.02.014>
- Khonsari, S., Suganthi, M., Burczynska, B., Dang, V., Choudhury, M., & Pachenari, A. (2016). A comparative study of bifidobacteria in human babies and adults. In *Bioscience of Microbiota, Food and Health* (Vol. 35, Issue 2). <https://doi.org/10.12938/bmfh.2015-006>
- Kim, J. F., Jeong, H., Yu, D. S., Choi, S. H., Hur, C. G., Park, M. S., Yoon, S. H., Kim, D. W.,

- Ji, G. E., Park, H. S., & Oh, T. K. (2009). Genome sequence of the probiotic bacterium *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* AD011. *Journal of Bacteriology*, *191*(2). <https://doi.org/10.1128/JB.01515-08>
- Kim, J. Y., Wang, Y., Park, S. J., Ji, G. E., & Park, M. S. (2012). Cloning and expression of β -glucosidases from *Bifidobacterium lactis* ADO 11. *Food Science and Biotechnology*, *21*(3). <https://doi.org/10.1007/s10068-012-0095-0>
- Kim, W. K., Byun, W. S., Chung, H. J., Oh, J., Park, H. J., Choi, J. S., & Lee, S. K. (2018). Esculetin suppresses tumor growth and metastasis by targeting Axin2/E-cadherin axis in colorectal cancer. *Biochemical Pharmacology*, *152*. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.03.009>
- Kosumi, K., Hamada, T., Koh, H., Borowsky, J., Bullman, S., Twombly, T. S., Nevo, D., Masugi, Y., Liu, L., da Silva, A., Chen, Y., Du, C., Gu, M., Li, C., Li, W., Liu, H., Shi, Y., Mima, K., Song, M., ... Ogino, S. (2018). The Amount of *Bifidobacterium* Genus in Colorectal Carcinoma Tissue in Relation to Tumor Characteristics and Clinical Outcome. *American Journal of Pathology*, *188*(12). <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2018.08.015>
- Kwak, M. J., Kwon, S. K., Yoon, J. K., Song, J. Y., Seo, J. G., Chung, M. J., & Kim, J. F. (2016). Evolutionary architecture of the infant-adapted group of *Bifidobacterium* species associated with the probiotic function. *Systematic and Applied Microbiology*, *39*(7). <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2016.07.004>
- Lamendella, R., Santo Domingo, J. W., Kelty, C., & Oerther, D. B. (2008). *Bifidobacteria* in feces and environmental waters. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*(3). <https://doi.org/10.1128/AEM.01221-07>
- Laparra, J. M., & Sanz, Y. (2010). Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. In *Pharmacological Research* (Vol. 61, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2009.11.001>
- Laureys, D., Cnockaert, M., De Vuyst, L., & Vandamme, P. (2016). *Bifidobacterium aquikefiri* sp. nov., isolated from water kefir. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *66*(3). <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000877>
- Le Leu, R. K., Hu, Y., Brown, I. L., Woodman, R. J., & Young, G. P. (2010). Synbiotic intervention of *Bifidobacterium lactis* and resistant starch protects against colorectal cancer development in rats. *Carcinogenesis*, *31*(2). <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp197>
- Lee, H. M., & Moon, A. (2016). Amygdalin regulates apoptosis and adhesion in Hs578T triple-negative breast cancer cells. *Biomolecules and Therapeutics*, *24*(1). <https://doi.org/10.4062/biomolther.2015.172>
- 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. (2008). Comparative genomic analysis of the gut bacterium *Bifidobacterium longum* reveals loci susceptible to deletion during pure culture growth. *BMC Genomics*, *9*. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-247>
- Lee, S. Y., Lim, T. G., Chen, H., Jung, S. K., Lee, H. J., Lee, M. H., Kim, D. J., Shin, A., Lee, K. W., Bode, A. M., Surh, Y. J., & Dong, Z. (2013). Esculetin suppresses proliferation of human colon cancer cells by directly targeting β -catenin. *Cancer Prevention Research*, *6*(12). <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-13-0241>
- Li, H., Jeong, Y. M., Kim, S. Y., Kim, M. K., & Kim, D. S. (2011). Arbutin inhibits TCCSUP

- human bladder cancer cell proliferation via up-regulation of p21. *Pharmazie*, 66(4). <https://doi.org/10.1691/ph.2011.0785>
- Liang, C., Ju, W., Pei, S., Tang, Y., & Xiao, Y. (2017). Pharmacological activities and synthesis of esculetin and its derivatives: A mini-review. *Journal of Lipid Research*, 58(3). <https://doi.org/10.3390/molecules22030387>
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., & Henrissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research*, 42(D1). <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1178>
- Lugli, G. A., Alessandri, G., Milani, C., Mancabelli, L., Ruiz, L., Fontana, F., Borragán, S., González, A., Turróni, F., Ossiprandi, M. C., Margolles, A., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2020). Evolutionary development and co-phylogeny of primate-associated bifidobacteria. *Environmental Microbiology*, 22(8). <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15108>
- Lugli, G. A., Milani, C., Turróni, F., Duranti, S., Ferrario, C., Viappiani, A., Mancabelli, L., Mangifesta, M., Taminiau, B., Delcenserie, V., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2014). Investigation of the evolutionary development of the genus bifidobacterium by comparative genomics. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(20). <https://doi.org/10.1128/AEM.02004-14>
- Masco, L., Ventura, M., Zink, R., Huys, G., & Swings, J. (2004). Polyphasic taxonomic analysis of *Bifidobacterium animalis* and *Bifidobacterium lactis* reveals relatedness at the subspecies level: Reclassification of *Bifidobacterium animalis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* subsp. nov and *Bifidobacterium lactis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(4). <https://doi.org/10.1099/ijs.0.03011-0>
- Mattarelli, P., & Biavati, B. (2018). Species in the Genus *Bifidobacterium*. In *The Bifidobacteria and Related Organisms*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-805060-6.00002-8>
- McLaughlin, H. P., Motherway, M. O. C., Lakshminarayanan, B., Stanton, C., Paul Ross, R., Brulc, J., Menon, R., O'Toole, P. W., & van Sinderen, D. (2015). Carbohydrate catabolic diversity of bifidobacteria and lactobacilli of human origin. *International Journal of Food Microbiology*, 203. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.008>
- Migas, P., & Krauze-Baranowska, M. (2015). The significance of arbutin and its derivatives in therapy and cosmetics. In *Phytochemistry Letters* (Vol. 13). <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2015.05.015>
- Milani, C., Turróni, F., Duranti, S., Lugli, G. A., Mancabelli, L., Ferrario, C., Van Sinderen, D., & Ventura, M. (2016). Genomics of the genus *Bifidobacterium* reveals species-specific adaptation to the glycan-rich gut environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(4). <https://doi.org/10.1128/AEM.03500-15>
- Milazzo, S., Lejeune, S., & Ernst, E. (2007). Laetrile for cancer: A systematic review of the clinical evidence. In *Supportive Care in Cancer* (Vol. 15, Issue 6). <https://doi.org/10.1007/s00520-006-0168-9>
- Mitchell, C. M., Davy, B. M., Halliday, T. M., Hulver, M. W., Neilson, A. P., Ponder, M. A., & Davy, K. P. (2015). The effect of prebiotic supplementation with inulin on cardiometabolic health: Rationale, design, and methods of a controlled feeding efficacy

- trial in adults at risk of type 2 diabetes. *Contemporary Clinical Trials*, 45. <https://doi.org/10.1016/j.cct.2015.10.012>
- Modrackova, N., Makovska, M., Mekadim, C., Vlkova, E., Tejnecky, V., Bolechova, P., & Bunesova, V. (2019). Prebiotic potential of natural gums and starch for bifidobacteria of variable origins. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 20. <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2019.100199>
- Modrackova, N., Vlkova, E., Tejnecky, V., Schwab, C., & Neuzil-Bunesova, V. (2020). Bifidobacterium β -glucosidase activity and fermentation of dietary plant glucosides is species and strain specific. *Microorganisms*, 8(6). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060839>
- Musilova, S., Rada, V., Vlkova, E., & Bunesova, V. (2014). Beneficial effects of human milk oligosaccharides on gut microbiota. In *Beneficial Microbes* (Vol. 5, Issue 3). <https://doi.org/10.3920/BM2013.0080>
- Niu, X., Wang, Y., Li, W., Zhang, H., Wang, X., Mu, Q., He, Z., & Yao, H. (2015). Esculin exhibited anti-inflammatory activities in vivo and regulated TNF- α and IL-6 production in LPS-stimulated mouse peritoneal macrophages in vitro through MAPK pathway. *International Immunopharmacology*, 29(2). <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.08.041>
- O'Callaghan, A., & van Sinderen, D. (2016). Bifidobacteria and their role as members of the human gut microbiota. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 7, Issue JUN). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00925>
- O'Sullivan, Ó., Coakley, M., Lakshminarayanan, B., Conde, S., Claesson, M. J., Cusack, S., Fitzgerald, A. P., O'Toole, P. W., Stanton, C., & Ross, R. P. (2013). Alterations in intestinal microbiota of elderly irish subjects post-antibiotic therapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(1). <https://doi.org/10.1093/jac/dks348>
- Odamaki, T., Kato, K., Sugahara, H., Hashikura, N., Takahashi, S., Xiao, J. Z., Abe, F., & Osawa, R. (2016). Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: A cross-sectional study. *BMC Microbiology*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0708-5>
- Oliveira, I., Baptista, P., Bento, A., & Pereira, J. A. (2011). Arbutus unedo L. and its benefits on human health. In *Journal of Food and Nutrition Research* (Vol. 50, Issue 2).
- Palframan, R. J., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2003). Carbohydrate preferences of Bifidobacterium species isolated from the human gut. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 4(2).
- Patole, S. K., Rao, S. C., Keil, A. D., Nathan, E. A., Doherty, D. A., & Simmer, K. N. (2016). Benefits of bifidobacterium breve M-16V Supplementation in preterm neonates -A retrospective cohort study. *PLoS ONE*, 11(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150775>
- Penders, J., Thijs, C., Vink, C., Stelma, F. F., Snijders, B., Kummeling, I., Van Den Brandt, P. A., & Stobberingh, E. E. (2006). Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics*, 118(2). <https://doi.org/10.1542/peds.2005-2824>
- Picard, C., Fioramonti, J., Francois, A., Robinson, T., Neant, F., & Matuchansky, C. (2005). Review article: Bifidobacteria as probiotic agents - Physiological effects and clinical benefits. In *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 22, Issue 6). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2005.02615.x>

- Pokusaeva, K., Fitzgerald, G. F., & Van Sinderen, D. (2011). Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria. In *Genes and Nutrition* (Vol. 6, Issue 3). <https://doi.org/10.1007/s12263-010-0206-6>
- Pop, C., Vlase, L., & Tamas, M. (2009). Natural resources containing arbutin. Determination of arbutin in the leaves of *Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch. acclimated in Romania. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 37(1). <https://doi.org/10.15835/nbha3713108>
- Prabakaran, D., & Ashokkumar, N. (2013). Protective effect of esculetin on hyperglycemia-mediated oxidative damage in the hepatic and renal tissues of experimental diabetic rats. *Biochimie*, 95(2). <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.10.008>
- Qadir, M., & Fatima, K. (2017). Review on Pharmacological Activity of Amygdalin. *Archives in Cancer Research*, 05(04). <https://doi.org/10.21767/2254-6081.100160>
- Rada, V., Nevoral, J., Trojanová, I., Tománková, E., Šmehilová, M., & Killer, J. (2008). Growth of infant faecal bifidobacteria and clostridia on prebiotic oligosaccharides in in vitro conditions. *Anaerobe*, 14(4). <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2008.05.003>
- Raimondi, S., Roncaglia, L., De Lucia, M., Amaretti, A., Leonardi, A., Pagnoni, U. M., & Rossi, M. (2009). Bioconversion of soy isoflavones daidzin and daidzein by Bifidobacterium strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(5). <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1719-4>
- Rios, E. R. V., Rocha, N. F. M., Venâncio, E. T., Moura, B. A., Feitosa, M. L., Cerqueira, G. S., Soares, P. M. G., Woods, D. J., de Sousa, F. C. F., Leal, L. K. A. M., & Fonteles, M. M. de F. (2010). Mechanisms involved in the gastroprotective activity of esculin on acute gastric lesions in mice. *Chemico-Biological Interactions*, 188(1). <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.07.020>
- Roberts, A., & Barrangou, R. (2020). Applications of CRISPR-Cas systems in lactic acid bacteria. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 44, Issue 5). <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa016>
- Rondanelli, M. (2015). Review on microbiota and effectiveness of probiotics use in older. *World Journal of Clinical Cases*, 3(2). <https://doi.org/10.12998/wjcc.v3.i2.156>
- Russell, D. A., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2011). Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. In *International Journal of Food Microbiology* (Vol. 149, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.06.003>
- Salama, R. H., Ramadan, A. E. R. G., Alsanory, T. A., Herdan, M. O., Fathallah, O. M., & Alsanory, A. A. (2019). Experimental and Therapeutic Trials of Amygdalin. *International Journal of Biochemistry and Pharmacology*, 1(1). <https://doi.org/10.18689/ijbp-1000105>
- Salazar, M. O., & Furlan, R. L. E. (2007). A rapid TLC autographic method for the detection of glucosidase inhibitors. *Phytochemical Analysis*, 18(3). <https://doi.org/10.1002/pca.971>
- Sartor, R. B. (2008). Microbial Influences in Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*, 134(2). <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.11.059>
- Schell, M. A., Karmirantzou, M., Snel, B., Vilanova, D., Berger, B., Pessi, G., Zwahlen, M. C., Desiere, F., Bork, P., Delley, M., Pridmore, R. D., & Arigoni, F. (2002). The genome sequence of Bifidobacterium longum reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(22). <https://doi.org/10.1073/pnas.212527599>

- Sears, C. L., & Garrett, W. S. (2014). Microbes, microbiota, and colon cancer. In *Cell Host and Microbe* (Vol. 15, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.02.007>
- Seksik, P. (2010). Gut microbiota and IBD. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*, 34. [https://doi.org/10.1016/s0399-8320\(10\)70020-8](https://doi.org/10.1016/s0399-8320(10)70020-8)
- Sheehan, V. M., Sleator, R. D., Hill, C., & Fitzgerald, G. F. (2007). Improving gastric transit, gastrointestinal persistence and therapeutic efficacy of the probiotic strain *Bifidobacterium breve* UCC2003. *Microbiology*, 153(10). <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/006510-0>
- Shiba, T., Aiba, Y., Ishikawa, H., Ushiyama, A., Takagi, A., Mine, T., & Koga, Y. (2003). The suppressive effect of bifidobacteria on *Bacteroides vulgatus*, a putative pathogenic microbe in inflammatory bowel disease. *Microbiology and Immunology*, 47(6). <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2003.tb03368.x>
- Simpson, P. J., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2004). *Bifidobacterium psychraerophilum* sp. nov. and *Aeriscardovia aeriphila* gen. nov., sp. nov., isolated from a porcine caecum. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(2). <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02667-0>
- Sonnenburg, J. L., Xu, J., Leip, D. D., Chen, C. H., Westover, B. P., Weatherford, J., Buhler, J. D., & Gordon, J. I. (2005). Glycan foraging in vivo by an intestine-adapted bacterial symbiont. *Science*, 307(5717). <https://doi.org/10.1126/science.1109051>
- Strompfová, V., & Lauková, A. (2014). Isolation and characterization of faecal bifidobacteria and lactobacilli isolated from dogs and primates. *Anaerobe*, 29. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.10.007>
- Subramaniam, S. R., & Ellis, E. M. (2013). Neuroprotective effects of umbelliferone and esculetin in a mouse model of Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience Research*, 91(3). <https://doi.org/10.1002/jnr.23164>
- Sulakhiya, K., Keshavlal, G. P., Bezbaruah, B. B., Dwivedi, S., Gurjar, S. S., Munde, N., Jangra, A., Lahkar, M., & Gogoi, R. (2016). Lipopolysaccharide induced anxiety- and depressive-like behaviour in mice are prevented by chronic pre-treatment of esculetin. *Neuroscience Letters*, 611. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.11.031>
- Światkiewicz, S., Koreleski, J., & Arczewska, A. (2010). Effect of organic acids and prebiotics on bone quality in laying hens fed diets with two levels of calcium and phosphorus. *Acta Veterinaria Brno*, 79(2). <https://doi.org/10.2754/avb201079020185>
- Tremaine, W. J. (2011). Diarrhea: Diagnostic and Therapeutic Advances. *Gastroenterology*, 141(4). <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.08.021>
- Tsirigotis-Maniecka, M., Gancarz, R., & Wilk, K. A. (2016). Preparation and characterization of sodium alginate/chitosan microparticles containing esculin. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 510. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.08.029>
- Turkecul, K., Colpan, R. D., Baykul, T., Ozdemir, M. D., & Erdogan, S. (2018). Esculetin Inhibits the Survival of Human Prostate Cancer Cells by Inducing Apoptosis and Arresting the Cell Cycle. *Journal of Cancer Prevention*, 23(1). <https://doi.org/10.15430/jcp.2018.23.1.10>
- Turroni, F., Duranti, S., Bottacini, F., Guglielmetti, S., Van Sinderen, D., & Ventura, M. (2014). *Bifidobacterium bifidum* as an example of a specialized human gut commensal. *Frontiers in Microbiology*, 5(AUG). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00437>

- Turroni, F., Milani, C., Duranti, S., Mahony, J., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2018). Glycan Utilization and Cross-Feeding Activities by Bifidobacteria. In *Trends in Microbiology* (Vol. 26, Issue 4). <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.10.001>
- Turroni, F., Milani, C., Van Sinderen, D., & Ventura, M. (2018). Bifidobacteria: Ecology and Coevolution With the Host. In *The Bifidobacteria and Related Organisms*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-805060-6.00012-0>
- Turroni, F., Peano, C., Pass, D. A., Foroni, E., Severgnini, M., Claesson, M. J., Kerr, C., Hourihane, J., Murray, D., Fuligni, F., Gueimonde, M., Margolles, A., de Bellis, G., O'Toole, P. W., van Sinderen, D., Marchesi, J. R., & Ventura, M. (2012). Diversity of bifidobacteria within the infant gut microbiota. *PLoS ONE*, 7(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036957>
- Van Den Broek, L. A. M., Hinz, S. W. A., Beldman, G., Vincken, J. P., & Voragen, A. G. J. (2008). Bifidobacterium carbohydrases-their role in breakdown and synthesis of (potential) prebiotics. In *Molecular Nutrition and Food Research* (Vol. 52, Issue 1). <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700121>
- Van Den Broek, L. A. M., & Voragen, A. G. J. (2008). Bifidobacterium glycoside hydrolases and (potential) prebiotics. In *Innovative Food Science and Emerging Technologies* (Vol. 9, Issue 4). <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.12.006>
- Ventura, M., Canchaya, C., Del Casale, A., Dellaglio, F., Neviani, E., Fitzgerald, G. F., & van Sinderen, D. (2006). Analysis of bifidobacterial evolution using a multilocus approach. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(12). <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64233-0>
- 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 Phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(3). <https://doi.org/10.1128/mmbr.00005-07>
- Ventura, M., O'Connell-Motherway, M., Leahy, S., Moreno-Munoz, J. A., Fitzgerald, G. F., & van Sinderen, D. (2007). From bacterial genome to functionality; case bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 120(1–2). <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.011>
- Ventura, M., Turroni, F., Zomer, A., Foroni, E., Giubellini, V., Bottacini, F., Canchaya, C., Claesson, M. J., He, F., Mantzourani, M., Mulas, L., Ferrarini, A., Gao, B., Delledonne, M., Henrissat, B., Coutinho, P., Oggioni, M., Gupta, R. S., Zhang, Z., ... Van Sinderen, D. (2009). The bifidobacterium dentium Bd1 genome sequence reflects its genetic adaptation to the human oral cavity. *PLoS Genetics*, 5(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000785>
- Voreades, N., Kozil, A., & Weir, T. L. (2014). Diet and the development of the human intestinal microbiome. *Frontiers in Microbiology*, 5(SEP). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00494>
- Wang, J., Lu, M. L., Dai, H. L., Zhang, S. P., Wang, H. X., & Wei, N. (2015). Esculetin, a coumarin derivative, exerts in vitro and in vivo antiproliferative activity against hepatocellular carcinoma by initiating a mitochondrial-dependent apoptosis pathway. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 48(3). <https://doi.org/10.1590/1414-431X20144074>

- Wang, Y., Zhao, M., Ou, Y., Zeng, B., Lou, X., Wang, M., & Zhao, C. (2016). Metabolic profile of esculin in rats by ultra high performance liquid chromatography combined with Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1020. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.03.027>
- Watanabe, K., Makino, H., Sasamoto, M., Kudo, Y., Fujimoto, J., & Demberel, S. (2009). *Bifidobacterium mongoliense* sp. nov., from airag, a traditional fermented mare's milk product from Mongolia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(6). <https://doi.org/10.1099/ijs.0.006247-0>
- Wilson, K., & Walker, J. (2005). Principles and techniques of biochemistry and molecular biology, sixth edition. In *Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology, Sixth Edition*. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511813412>
- Witaicenis, A., Seito, L. N., & Di Stasi, L. C. (2010). Intestinal anti-inflammatory activity of esculetin and 4-methylesculetin in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. *Chemico-Biological Interactions*, 186(2). <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.03.045>
- Wu, W., Wang, Y., Zou, J., Long, F., Yan, H., Zeng, L., & Chen, Y. (2017). *Bifidobacterium adolescentis* protects against necrotizing enterocolitis and upregulates TOLLIP and SIGIRR in premature neonatal rats. *BMC Pediatrics*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12887-016-0759-7>
- Yang, L., Ding, W., Xu, Y., Wu, D., Li, S., Chen, J., & Guo, B. (2016). New insights into the antibacterial activity of hydroxycoumarins against *Ralstonia solanacearum*. *Molecules*, 21(4). <https://doi.org/10.3390/molecules21040468>
- Youn, S. Y., Park, M. S., & Ji, G. E. (2012). Identification of the β -Glucosidase gene from *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* and its expression in *B. bifidum* BGN4. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(12). <https://doi.org/10.4014/jmb.1208.08028>
- Zhou, C., Qian, L., Ma, H., Yu, X., Zhang, Y., Qu, W., Zhang, X., & Xia, W. (2012). Enhancement of amygdalin activated with β -d-glucosidase on HepG2 cells proliferation and apoptosis. *Carbohydrate Polymers*, 90(1). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.05.073>
- Zhou, L., Liu, D., Xie, Y., Yao, X., & Li, Y. (2019). *Bifidobacterium infantis* Induces Protective Colonic PD-L1 and Foxp3 Regulatory T Cells in an Acute Murine Experimental Model of Inflammatory Bowel Disease. *Gut and Liver*, 13(4). <https://doi.org/10.5009/gnl18316>
- Zhu, X. L., Tang, X. G., Qu, F., Zheng, Y., Zhang, W. H., & Diao, Y. Q. (2019). *Bifidobacterium* may benefit the prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants: A systematic review and meta-analysis. In *International Journal of Surgery* (Vol. 61). <https://doi.org/10.1016/j.ijssu.2018.11.026>
- Zuo, F., Chen, S., & Marcotte, H. (2020). Engineer probiotic bifidobacteria for food and biomedical applications - Current status and future prospective. In *Biotechnology Advances* (Vol. 45). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107654>

