



Znaczenie aktywności hydrolazy soli żółci u bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*

Małgorzata Ziarno

Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności,
Wydział Technologii Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego,
Warszawa

The significance of bile salts hydrolase activity of bacteria of *Bifidobacterium* genus

Summary

The objective of this article was to review the existing literature concerning the function and appearance of bile salts hydrolase (BSH) activity in bacteria of *Bifidobacterium* genus. Although bile salts hydrolase activity is common in intestinal tract, current knowledge on the influence of BSH activity on bile metabolism and cholesterol level in human organism is insufficient. BSH activity of bifidobacteria enhances production of deconjugated bile acids which are not well absorbed by the gut and are excreted. This action is contributing to the decrease of cholesterol level in human organism because cholesterol, as a precursor of bile acids, is utilized for *de novo* bile acids synthesis.

Key words:

Bifidobacterium, BSH, deconjugation, bile salt hydrolase, bile salts.

Adres do korespondencji

Małgorzata Ziarno,
Katedra Biotechnologii,
Mikrobiologii
i Oceny Żywności,
Wydział Technologii
Żywności,
Szkoła Główna
Gospodarstwa Wiejskiego,
ul. Nowoursynowska 159c,
02-787 Warszawa;
e-mail:
ziarno@alpha.sggw.waw.pl

1. Wstęp

Rodzaj *Bifidobacterium* obejmuje 32 gatunki, pogrupowane na bazie cech genetycznych, metabolicznych oraz naturalnego środowiska występowania. Bakterie z tego rodzaju są głównym składnikiem mikroflory jelitowej ludzi i zwierząt [1]. W układzie pokarmowym człowieka naturalnie występuje 14 gatunków tych pałeczek, w tym m.in. *B. bifidum*, *B. gallicum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. lactis*, *B. adolescentis*, *B. catenulatum*, *B. pseudocatenulatum* [2-7].

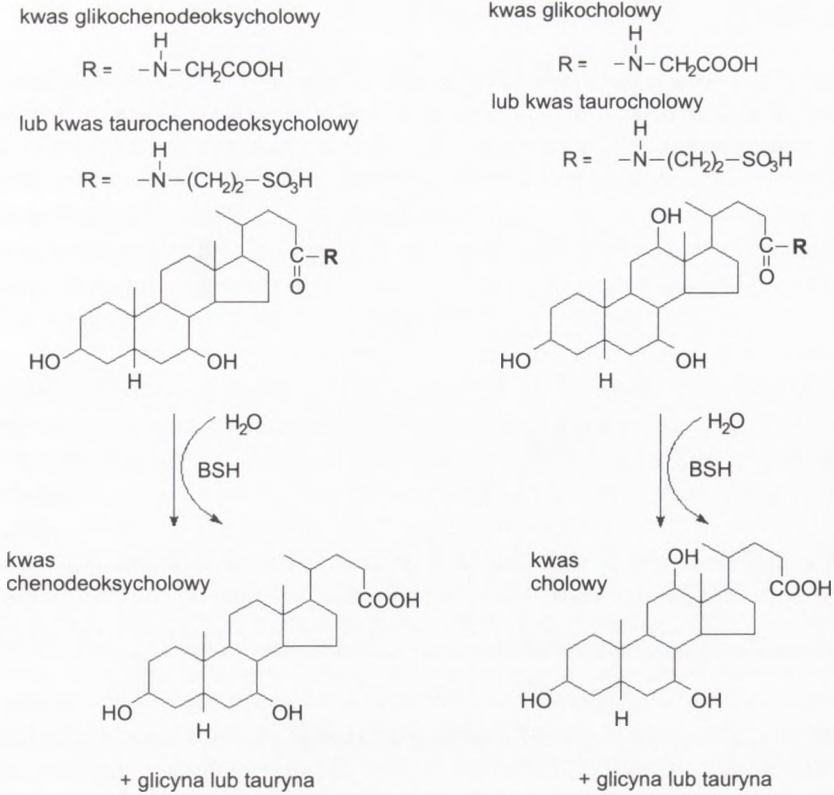
Stanowią one główną, a czasami jedyną mikroflorę jelit niemowląt karmionych tylko mlekiem matki i znaczną częścią mikroflory zasiedlającej jelita człowieka dorosłego [6,8]. Natomiast w przewodzie pokarmowym zwierząt i w otoczeniu ich bytowania stwierdzone są: *B. animalis*, *B. pseudolongum*, *B. ruminale*, *B. boum* [5].

Bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* mogą dostawać się do organizmu wraz z pokarmem lub mikrobiologicznymi preparatami farmaceutycznymi. W żywieniu ludzi lub zwierząt najczęściej stosowane są gatunki wyizolowane z przewodu pokarmowego [4,8-10]. Uważa się, że bytowanie *Bifidobacterium* w układzie pokarmowym może wiązać się ze zdolnością do wytwarzania enzymu hydrolazy soli żółci, co również decyduje o właściwościach probiotycznych tych bakterii [1,7,9,11,12].

2. Charakterystyka hydrolazy soli żółci

Hydrolaza soli żółci nazywana również hydrolazą choliloglicyny EC.3.5.1.24 (BSH, *bile salts hydrolase*) katalizuje hydrolizę (określaną także mianem dekoniugacji) wiązania amidowego w kwasach żółciowych skoniugowanych z tauryną lub glicyną, z uwolnieniem pierwotnych kwasów żółciowych oraz wolnej aminy – tauryny lub aminokwasu – glicyny [13-16]. Hydroliza soli kwasów żółciowych, skoniugowanych z tauryną lub glicyną, jest jedną z najbardziej znanych mikrobiologicznych biotransformacji soli żółciowych (rys. 1).

Pomimo szerokiego rozpowszechnienia aktywności BSH wśród bifidobakterii, jak dotąd, tylko nieliczne z tych enzymów zostały wyizolowane i zbadane [17,18]. Z danych literaturowych wynika, że BSH jest enzymem wewnątrzkomórkowym, umiejscowionym w błonie cytoplazmatycznej [18,19]. Potwierdzają to badania, w których nie stwierdzano aktywności tego enzymu w supernatantach uzyskanych z młodych hodowli bakteryjnych. Aktywność była wykrywana dopiero po dezintegracji komórek i uwolnieniu ich zawartości do środowiska. W stanie natywnym enzym ma masę od 125 do 250 kDa, przy czym masa cząsteczkowa podjednostki wynosi zwykle około 35-40 kDa. Oznacza to, że postać natywna enzymu jest heksamerem, jak u *B. longum* BB 536, tetramerem, jak u *B. longum* SBT 2928, lub może składać się z trzech podjednostek, jak u *B. bifidum* ATCC 11863, *B. infantis* KL 412, *B. longum* ATCC 15708, *B. longum* KL 507 i *B. longum* KL 515 [17-19]. Optymalne pH dla aktywności wyizolowanych enzymów mieściło się w zakresie 5-7 [18,19]. Wartość punktu izoelektrycznego określona dla enzymów wyizolowanych przez Kima i in. [17] wynosiła: 4,45 (u *B. bifidum* ATCC 11863) i około 4,65 (u *B. infantis* KL 412, *B. longum* ATCC 15708, *B. longum* KL 507 i *B. longum* KL 515). Optymalna temperatura działania badanych enzymów wynosiła 40°C, zaś w temperaturze 60°C malała o połowę [18,19]. Grill i in. [19] wskazali na istotne znaczenie wolnej grupy sulfhydrylowej w centrum aktywnym enzymu. Z kolei enzym wyizolowany przez Tanakę i in. [18] był silnie hamowany przez inhibitory enzymów tiolowych; co sugeruje, że w jego centrum aktywnym znajdowała się reszta cysteinowa.



Rys. 1. Hydroliza soli kwasów żółciowych z uwolnieniem pierwotnych kwasów chenodeoksycholowego i cholowego oraz glicyny lub tauryny [19,24,40,44].

Aktywność BSH u bakterii mlekowych, takich jak *Bifidobacterium*, można stwierdzić metodą płytkową na pożywce agarowej, np. MRS lub Rogosa SL, z dodatkiem 0,5% jednego lub kilku skoniugowanych kwasów żółciowych (np. taurodeoksycholowego, taurocholowego lub taurochenodeoksycholowego). Inkubację posiewów prowadzi się w warunkach beztlenowych w temperaturze optymalnej dla wzrostu bakterii. Należy pamiętać, że optymalna temperatura wzrostu bakterii często nie pokrywa się z optymalną temperaturą aktywności enzymu, jednak sprzyja wytwarzaniu tej substancji przez komórki bakteryjne. Aktywność BSH objawia się tworzeniem wokół kolonii bakterii otoczki (halo) wytrąconych uwolnionych kwasów żółciowych lub tworzeniem białych nieprzejrzystych ziarnistych kolonii [20,21]. Innym sposobem pomiaru aktywności tego enzymu jest hodowla bakterii w pożywce płynnej z dodatkiem skoniugowanych kwasów żółciowych, ale przy wartościach pH zapobiegających precypitacji kwasów żółciowych oraz późniejsze jakościowe lub ilościowe oznaczenie wolnych kwasów żółciowych lub uwolnionych tauryny lub glicyny [21-23].

3. Występowanie BSH u *Bifidobacterium*

Dane literaturowe wskazują na zdolność większości pałeczek *Bifidobacterium*, izolowanych z przewodu pokarmowego ludzi lub zwierząt, czyli środowisk bogatych w skoniugowane kwasy żółciowe, do hydrolizy tych soli [9,13,18,19,21,24-27]. Prawdopodobnie hydroliza soli kwasów żółciowych, katalizowana przez BSH, jest mechanizmem ochrony przed toksycznym działaniem tych soli, obecnych w naturalnym środowisku bytowania *Bifidobacterium* [10,21,25,28-30]. Wsuwana jest również hipoteza, że aktywność BSH u bifidobakterii może być jednym ze sposobów pozyskiwania azotu, podobnie jak stwierdzono to u bakterii z rodzaju *Clostridium* [14,31].

Interesujące jest to, że wiele szczepów bifidobakterii posiada aktywność BSH wyższą niż ta stwierdzana u niektórych innych pałeczek występujących w przewodzie pokarmowym, w tym u *Lactobacillus* [19,32]. Tanaka i in. [21] na podstawie otrzymanych wyników wykazali, że prawie wszystkie badane szczepy bifidobakterii posiadały aktywną BSH, podczas gdy u innych rodzajów pałeczek mlekowych, izolowanych z przewodu pokarmowego, ta aktywność była stwierdzana tylko u wybranych ich gatunków. Aktywność BSH obserwowana jest rzadziej u bifidobakterii pochodzących ze środowisk, w których brak obecności soli żółciowych, takich jak mleko lub rośliny [21].

Przypuszcza się, że hydroliza soli kwasów żółciowych może być obroną przed toksycznym działaniem tych soli na komórkę bakteryjną. Oddziaływanie żółci na powierzchnię komórek bakteryjnych może spowodować zmiany w metabolizmie i budowie ściany komórkowej, w tym indukować zmiany w profilu lipidowym błony komórkowej [24,33-35]. Takie zmiany zaobserwowano nie tylko u *Bifidobacterium*, ale również u *Lactobacillus*, u których obecność soli żółciowych w środowisku bytowania bakterii wpływała na przepuszczalność błony komórkowej oraz interakcje między błoną i środowiskiem bytowania komórki [36,37]. Niektórzy badacze uważają jednak, że kwasy żółciowe, uwolnione przez BSH, są nawet bardziej toksyczne dla komórek bakteryjnych niż ich formy skoniugowane z tauryną lub glicyną [17,21, 28-30,38,39].

Szczepy poszczególnych gatunków *Bifidobacterium* mogą wykazywać różnice między sobą pod względem aktywności BSH [10,21,25,26,32,40]. Wyniki uzyskiwane przez badaczy zależą nie tylko od zastosowanych gatunków z rodzaju *Bifidobacterium*, ale również od warunków inkubacji, rodzaju i stężenia użytych soli żółciowych oraz procedury badawczej. Poziom aktywności enzymu BSH *Bifidobacterium* wzrasta w logarytmicznej fazie wzrostu. Natomiast w fazie stacjonarnej, obserwuje się tylko nieznaczny wzrost tej aktywności lub jej brak [19,38]. Najczęściej obserwuje się zjawisko większej aktywności BSH wobec soli żółciowych zawierających glicynę niż wobec kwasów żółciowych skoniugowanych z tauryną [17-19,25]. Może to być potwierdzeniem przypuszczenia, że aktywność BSH jest mechanizmem obrony komórek bakterii przed niekorzystnymi warunkami środowiska, gdyż kwasy żółciowe

skoniugowane z glicyną dominują w solach żółciowych. Zjawisko wybiórczej dekonjugacji soli żółciowych można wytłumaczyć również w inny sposób. Substraty reakcji katalizowanych przez BSH muszą być dostarczane do wnętrza komórki, gdyż jest to enzym wewnątrzkomórkowy. Ponieważ kwasy skoniugowane z glicyną są słabymi kwasami (np. pK kwasu glikodeoksycholowego wynosi około 3,8, a kwasu taurodeoksycholowego około 1), zatem przy wartościach pH równych wartości pK kwasy te znajdują się prawie w 50% w postaci niezjonizowanej i w 50% w formie zjonizowanej. Natomiast przy wartościach pH wyższych od wartości pKa stają się donorami protonów i przechodzą w formę zjonizowaną (anionową). Wiadomo, że formy niezjonizowane słabych elektrolitów łatwiej ulegają dyfuzji biernej przez błony komórkowe niż formy zjonizowane. Prawdopodobnie dlatego w warunkach wysokiej kwasowości kwasy sprzężone z glicyną mają ułatwiony transport do wnętrza komórek bakteryjnych [23,41,42].

Interesującego spostrzeżenia dokonali Grill i in. [19,25] badając tempo hydrolizy soli kwasów żółciowych trihydroksylowych (taurocholowego i glikocholowego) i dihydroksylowych (taurodeoksycholowego, glikodeoksycholowego, taurochenodeoksycholowego i glikochenodeoksycholowego) przez bifidobakterie. Wykazali, że skoniugowane kwasy dihydroksylowe były szybciej dekonjugowane niż skoniugowane kwasy trihydroksylowe.

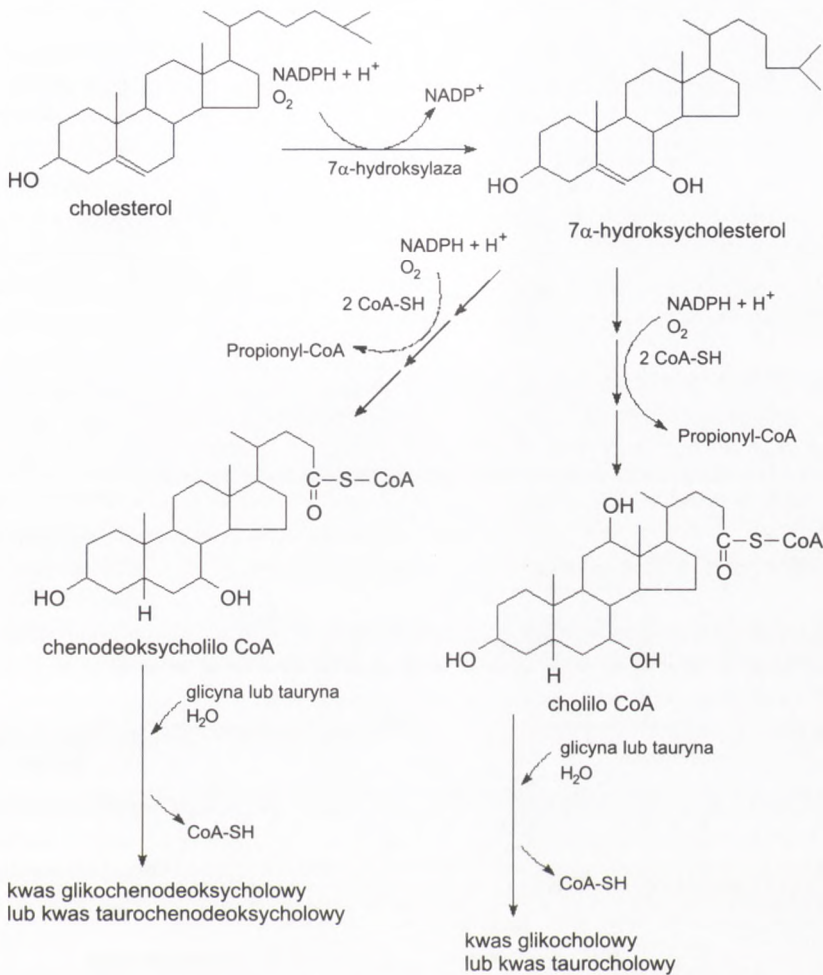
Pomimo powszechnej wśród bifidobakterii aktywności BSH, w danych literaturowych podaje się liczne przykłady niskiej oporności tych pałeczek na stosunkowo wysokie stężenia soli żółciowych [25,29,43,44]. Badania oporności bakterii na sole żółciowe mogą być realizowane na dwa sposoby: określając stopień przeżycia lub stopień rozwoju bakterii podczas hodowli w pożywce zawierającej dodatek soli żółciowych. Lankaputhra i Shah [40] przetrzymując szczepy *Bifidobacterium* w roztworach soli żółciowych o stężeniu 0-1,5% przez czas do 3 godzin wykazali, że ich przeżywalność zależała m.in. od rodzaju szczepu oraz stężenia i czasu działania soli żółciowych na komórki bakteryjne. Zavaglia i in. [7] stwierdzili, że spośród izolatów bifidobakterii pobranych od niemowląt jedynie 25% było opornych na 0,5% stężenie żółci. Również Kociubinski i in. [26] zaobserwowali, że większość badanych przez nich szczepów *Bifidobacterium* była wrażliwa na zastosowane stężenia żółci. Być może jest to potwierdzeniem hipotezy, że kwasy żółciowe, uwolnione podczas hydrolizy, silniej hamują rozwój bifidobakterii, niż ich formy skoniugowane z glicyną lub tauryną. Dekonjugacja kwasów żółciowych i ich akumulacja w środowisku rozwoju bakterii wykazujących aktywność BSH, może prowadzić do zahamowania wzrostu tych bakterii. Z kolei inni badacze stwierdzili, że niektóre bifidobakterie są zdolne do przeżycia w obecności soli żółciowych o stężeniu nawet wyższym niż spotykane w układzie pokarmowym [10].

4. Wpływ aktywności BSH na przemiany żółci

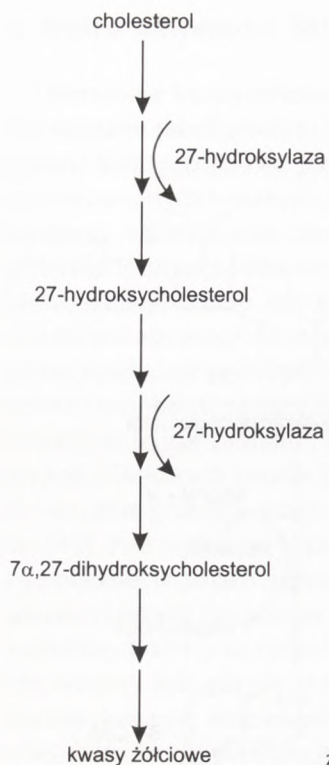
Pierwotne kwasy żółciowe są syntetyzowane w wątrobie z cholesterolu i następnie wiązane (koniugowane) z glicyną lub tauryną. W połączeniu z jonami sodu lub potasu kwasy żółciowe tworzą łatwo rozpuszczalne sole żółciowe. Żółć, oprócz skoniugowanych i wolnych kwasów żółciowych, barwników żółciowych (głównie bilirubiny), białek i soli nieorganicznych zawiera również cholesterol, fosfolipidy (głównie lecytynę) i inne lipidy [16,45-47]. Wydzielana z wątroby odplywa do jelita (dwunastnicy), gdzie ma za zadanie brać udział w trawieniu pokarmów (w celu ułatwienia absorpcji tłuszczu pokarmowego, cholesterolu, hydrofobowych witamin i innych składników rozpuszczalnych w tłuszczach) oraz zubożać kwaśną miazgę pokarmową opuszczającą żołądek [45,47]. Około 97% soli żółciowych jest reabsorbowana w jelicie cienkim i zwracana do wątroby przez żyłę wrotną. Niewielka frakcja soli żółciowych (około 250-400 mg), która nie została zaabsorbowana, przechodzi do jelita grubego, gdzie ulega degradacji bakteryjnej i dalej wydalaniu z organizmu [46]. Pod wpływem hydrolazy soli żółciowych, kwasy taurocholowy i glikocholowy, obecne w solach żółciowych, są hydrolizowane do kwasu cholowego i odpowiednio tauryny lub glicyny. Natomiast kwasy taurochenodeoksycholowy i glikochenodeoksycholowy są hydrolizowane do kwasu chenodeoksycholowego i odpowiednio tauryny lub glicyny [18,19,25,29,42,46]. Po hydrolizie właściwości fizykochemiczne kwasów żółciowych zmieniają się, m.in. obniża się ich rozpuszczalność w wodzie, szczególnie przy niskich wartościach pH oraz pogarszają się ich zdolności emulgujące [16,22,41,42,45,46].

W wielu badaniach wykazano, że hydroliza soli żółciowych wzmacnia wydalanie uwolnionych kwasów żółciowych z układu pokarmowego, gdyż są one gorzej absorbowane w jelicie cienkim niż formy związane i szybciej wydalane z organizmu [6,46,48,49]. Taka sama ilość kwasów żółciowych, jaka zostaje tracona z kałem, jest syntetyzowana w wątrobie z cholesterolu (co przedstawiono na rysunkach 2 i 3, ale ze względu na wieloetapowość syntezy kwasów żółciowych zamieszczone rysunki są pewnym uproszczeniem).

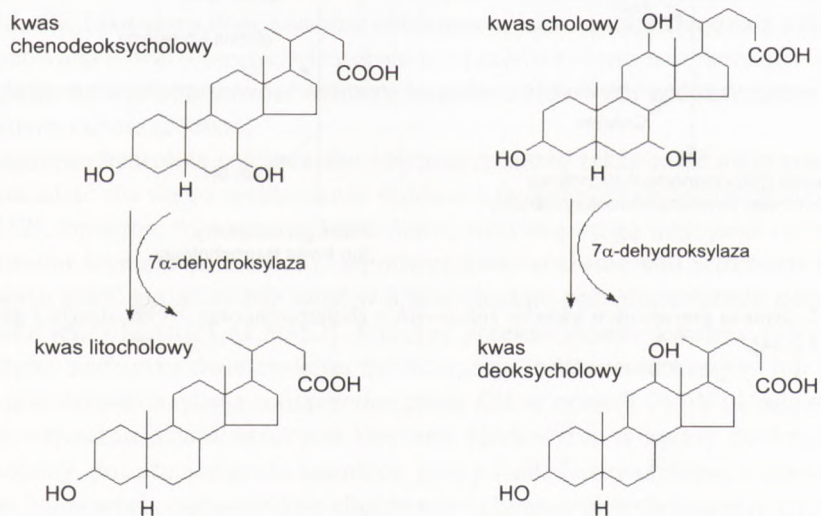
Nadmierna hydroliza soli kwasów żółciowych może także mieć efekt patogeny lub prowadzić do złego wchłaniania lipidów i witamin rozpuszczalnych w tłuszczach [12]. Ponadto, BSH wraz z 7-alfa-dehydroksylazą mogą odgrywać istotną rolę w tworzeniu kamieni żółciowych, a podwyższone stężenie soli wtórnych kwasów żółciowych (SBS, *secondary bile salts*) w jelicie cienkim prawdopodobnie podnosi ryzyko raka jelit [12,16,21,41,50-53]. Podczas przekształcania kwasów pierwotnych we wtórne, zachodzą dwie reakcje: dekoniugacja (odłączenie tauryny lub glicyny) oraz 7-alfa-dehydroksylacja (odłączenie grupy OH w pozycji 7). W układzie pokarmowym najważniejszymi wtórnymi kwasami żółciowymi są kwasy deoksycholowy i lithocholowy, powstające przez usunięcie grupy 7-alfa-hydroksylowej z pierwotnych kwasów żółciowych, odpowiednio cholowego i chenodeoksycholowego, co schematycznie przedstawiono na rysunku 4.



Rys. 2. Synteza pierwotnych kwasów żółciowych z cholesterolu oraz ich koniugacja z glicyną lub tauryną [1,2,44].



Rys. 3. Inny możliwy mechanizm syntezy pierwotnych kwasów żółciowych z cholesterolu [1,2,44].



Rys. 4. Przekształcenie pierwotnych kwasów żółciowych do wtórnych [1,44].

Wtórne kwasy żółciowe, podobnie jak pierwotne kwasy żółciowe, są koniugowane z glicyną lub tauryną [41,50]. Ponieważ żółć zawiera znaczne ilości jonów sodowych i potasowych, a jej pH jest alkaliczne, kwasy te tworzą z wymienionymi jonami sole, odpowiednio deoksycholan i lithocholan. Chociaż aktywność 7-alfa-dehydroksylazy została stwierdzona u niektórych gatunków należących do rodzajów *Eubacterium* i *Clostridium*, to przypisuje się ją większości mikroorganizmom jelitowym, w tym pałeczkom mlekowym i bifidobakteriom [52,54-56]. Badania nad związkiem między aktywnością BSH i 7-alfa-dehydroksylacją oraz nad zdolnością pałeczek mlekowych, w tym *Bifidobacterium* do 7-alfa-dehydroksylacji trwają od dawna. W danych piśmiennictwa zawarte są liczne dowody naukowe na to, że bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* nie przyczyniają się bezpośrednio do przekształcania pierwotnych kwasów żółciowych we wtórne kwasy żółciowe [46,51,53].

Z piśmiennictwa wynika, że pałeczki z rodzaju *Bifidobacterium* mogą wręcz przyczyniać się do ochrony organizmu gospodarza przed powstawaniem toksycznych wtórnych kwasów żółciowych. Kurdi i in. [39] wykazali, że 9 szczepów *Bifidobacterium* akumulowało kwas cholowy w komórkach, zaś mechanizm akumulacji opierał się na dyfuzji biernej kwasu przez błonę komórkową. Podobne zjawisko zaobserwowano u pałeczek *Lactobacillus*. Boever i wsp. [48] stwierdzili, że szczep *L. reuteri* wiązał cząsteczki uwolnionych przez BSH kwasów żółciowych do swoich komórek, przez co były one mniej biodostępne dla pozostałej mikroflory jelitowej. Bakterie mlekowe, w tym bifidobakterie nie metabolizują kwasu cholowego, jednak ich zdolność do akumulacji tego kwasu w warunkach *in vivo*, jak się wydaje, jest istotnym zagadnieniem w odniesieniu do biotransformacji kwasów żółciowych w organizmie człowieka [39].

5. Wpływ aktywności BSH na poziom cholesterolu

Obserwowany w ostatnich latach wzrost zainteresowania hydrolizą soli kwasów żółciowych przez bakterie kwasu mlekowego związany jest również z możliwością wykorzystania tego zjawiska do obniżania poziomu cholesterolu we krwi ludzi z hipercholesterolemią lub zapobieganiem hipercholesterolemii u osób zdrowych [9, 37,38,57-60].

Proponowane są trzy mechanizmy wpływu aktywności BSH na poziom cholesterolu w organizmie. Pierwszy mechanizm sugeruje, że zwiększenie tempa hydrolizy soli żółciowych przyczynia się do większego wydalania uwolnionych kwasów żółciowych z przewodu pokarmowego, co stymuluje syntezę nowych kwasów żółciowych z dostępnego cholesterolu, a to z kolei prowadzi do obniżenia jego poziomu w organizmie [46,49]. Drugi możliwy mechanizm tłumaczący efekt obniżania poziomu cholesterolu w organizmie, to zmniejszanie ilości cholesterolu pokarmowego absorbowanego przez organizm z pokarmu [12,49]. Trzecia możliwość wpływu aktywności BSH na obniżanie poziomu cholesterolu, to wywołanie jego wytrącenia

z uwolnionymi kwasami żółciowymi w niskim pH środowiska [15,26,60,61]. Inni badacze sugerują, że usuwanie cholesterolu w warunkach *in vitro* z podłoża hodowlanego przez bifidobakterie jest powodowane nie tylko jego wytrąceniem wraz ze zhydrolizowanymi kwasami żółciowymi. Możliwa jest także adsorpcja cząsteczek cholesterolu (określana w piśmiennictwie mianem *asymilacji cholesterolu*) do powierzchni komórek bakteryjnych [38,59]. W celu oznaczenia warunków asymilacji cholesterolu, Tahri i in. [60] hodowali różne szczepy *Bifidobacterium* w obecności cholesterolu i kwasów żółciowych. Stwierdzili, że w pH poniżej 6 szczep *B. breve* ATCC 15700 asymilował cholesterol w ilości do 51% początkowego stężenia, gdy był hodowany w obecności kwasu taurocholowego (skoniugowanego kwasu żółciowego) oraz w ilości około 13% początkowego stężenia, gdy był hodowany w obecności kwasu cholowego (zdekoniugowanego kwasu żółciowego). Ponadto zauważyli, że bifidobakterie nie posiadające aktywności BSH (np. szczepy z gatunków *B. asteroides*, *B. indicum*, *B. coryneforme*) wykazały zdolność do asymilacji cholesterolu podobną do stwierdzanej u bifidobakterii posiadających aktywność BSH, ale hodowanych w warunkach bez dodatku soli kwasów żółciowych [59].

W badaniach wskazuje się, że jednym z warunków wymaganych do asymilacji cholesterolu jest to, aby komórki bifidobakterii były żywe, ponieważ nie stwierdzono asymilacji u komórek nie wykazujących rozwoju [59]. Interesujący jest, jak się wydaje, wpływ rodzaju kwasów żółciowych na asymilację cholesterolu przez bakterie. Okazuje się, że bifidobakterie asymilują więcej cholesterolu w obecności soli kwasów żółciowych trihydroksylowych (taurocholowego lub glikocholowego) niż soli kwasów dihydroksylowych (taurodeoksycholowego, glikodeoksycholowego, taurochenodeoksycholowego lub glikochenodeoksycholowego) [60]. Wynika z tego, że nie ma korelacji między asymilacją cholesterolu i wydajnością hydrolizy soli kwasów żółciowych, gdyż sole kwasów żółciowych dihydroksylowych są szybciej hydroлизованe niż sole kwasów trihydroksylowych [24,25].

6. Czynniki genetyczne aktywności BSH

W literaturze dostępne są nieliczne przykłady badań dotyczących kodowania BSH u bifidobakterii [17,18,27]. Pierwszy zsekwencjonowano i zbadano gen kodujący BSH (*bsh*) u szczepu *B. longum* SBT 2928 [18]. Tanaka i in. [18] stwierdzili, że *bsh* jest częścią operonu zawierającego co najmniej dwa geny: *bsh* i *glnE*. Gen *glnE* koduje enzym GlnE (adenylylotransferazę modyfikującą syntetazę glutaminową), który przenosi reszty adenylylowe z ATP na syntetazę glutaminową i jest częścią kaskadowej regulacji azotowej u *E. coli*, prawdopodobnie u *Haemophilus influenzae* oraz różnych gatunków bakterii z rodzajów *Mycobacterium* i *Pseudomonas* [62,63]. Region operonu między *bsh* i *glnE* jest krótki i brak mu silnego sygnału kończącego, co sugeruje, że transkrypcja obydwu genów zachodzi pod kontrolą wspólnego promotora poprzedzającego gen *bsh*. Ponieważ brak funkcjonalnych związków między enzy-

mami BSH i *GlnE*, dlatego powiązanie *bsh* i *glnE* w jednym operonie może być zaskoczeniem. Jednocześnie, sprzężenie *bsh* z genem kaskadowej regulacji azotowej przypomina hipotezę, że hydroliza soli żółciowych ma ułatwić pozyskiwanie azotu przez komórki bakteryjne [18,54,64]. Taka genetyczna organizacja jest inna od stwierdzonej dotychczas u bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. U *L. plantarum* *bsh* jest genem monocistronowym. Natomiast *cbsHb* wykryty u *L. johnsonii* 100-100 oraz u *L. acidophilus* KS-13 jest genem policistronowym, gdyż poprzedzają go dwa geny kodujące system transportu kwasów żółciowych (*cbsT1* i *cbsT2*) [65,66]. Podobnych sekwencji nie stwierdzono w przypadku genu *bsh* kodowanego u *Clostridium perfringens* [67]. Z kolei Shuhaimi i in. [27] badając gen kodujący BSH u *B. longum* BB 536 stwierdzili jego podobieństwo do genu występującego u bakterii z rodzaju *Lactobacillus* na poziomie 42%. Trwają dalsze badania nad molekularną charakterystyką genów kodujących u bifidobakterii enzymy BSH typu A, B, C [17].

7. Podsumowanie

Wiedza o aktywności BSH u bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* może ułatwić poznanie ich oddziaływania na organizm człowieka lub zwierząt. Jest to szczególnie istotne w odniesieniu do bifidobakterii obecnych w fermentowanych produktach spożywczych czy biopreparatach farmaceutycznych spożywanych przez ludzi lub zwierzęta. Szczegółowe informacje na temat aktywności BSH u bifidobakterii mogą być w przyszłości wykorzystane do badania zdolności bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* do zasiedlania układu pokarmowego. Mogą również pomóc w opracowaniu metod regulowania poziomu cholesterolu u ludzi z hipercholesterolemią lub zapobiegania powstawaniu kamieni żółciowych. Nie mniej ważne jest dokładne poznanie genotypu bifidobakterii, sposobu kodowania BSH i stabilności tej cechy u konkretnych szczepów. Do zdobycia pełnej informacji o aktywności BSH u bifidobakterii potrzebne są podstawowe szczegółowe badania *in vitro* i *in vivo* z tego zakresu.

Literatura

1. O'Sullivan D. J., Kullen M. J., (1998), *Int. Dairy J.*, 8(5-6), 513-525.
2. Biavati B., Castagnoli P., Trovatelli L. D., (1986), *Microbiologica*, 9 (1), 39-45.
3. Holzapfel W. H., Haberer P., Snel J., Schillinger U., Huis in't Veld J. H. J., (1998), *Int. J. Food Microbiol.*, 41, 85-101.
4. Mitsuoka T., (1996), *Asia Pacific J. Clin. Nutr.*, 5(1), 2-9.
5. Romond M. B., Romond C., Izard D., (1992), *Les Bifidobacterium*, in: *Les groupes microbiens d'intérêt laitier*, Eds. Hermier J., Lenoir J., Weber F. CEPIL, Paryż, 61-84.
6. Tannock G. W., (1995), *Int. Dairy J.*, 5(8), 1059-1070.
7. Zavaglia A. G., Kociubinski G., Perez P., de Antoni G., (1998), *J. Food Prot.*, 7, 865-873.
8. Socha J., Stolarczyk A., Socha P., (2002), *Pediatrics Współczesna, Gastroenterologia, Hepatologia i Żywnienie Dziecka*, 4 (1), 43-47.
9. Gomes A. M. P., Malcata F. X., (1999), *Trends Food Sci. Technol.*, 10, 139.

10. Ibrahim S. A., Bezkorovainy A., (1993), *J. Sci. Food Agric.*, 62, 351-354.
11. Kailasapathy K., Chin J., (2000), *Immun. Cell Biol.*, 78, 80-88.
12. Marteau, P., Gerhardt M. F., Myara A., Bouvier E., Trivin F., Rambaud J. C., (1995), *Microb. Ecol. Health Dis.*, 8, 151-157.
13. Ferrari A., Pacini N., Canzi E., (1980), *J. Appl. Bacteriol.*, 49, 193-197.
14. Gopal-Srivastava R., Hylemon P. B., (1988), *J. Lipid Res.*, 29, 1079-1085.
15. Klaver F. A. M., Meer R. V., van der, (1993), *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 1120-1124.
16. Macdonald I. A., Bokkenheuser V. D., Winter J., McLernon A. M., Mosbach E. H., (1983), *J. Lipid Res.*, 24, 675-700.
17. Kim G. B., Yi S.-H., Lee B. H., (2004), *J. Dairy Sci.*, 87, 258-266.
18. Tanaka H., Hashiba H., Kok J., Mierau I., (2000), *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 2502-2512.
19. Grill J.P., Schneider F., Crociani J., Ballongue J., (1995), *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 2577-2582.
20. Dashkevics M. P., Feighner S. D., (1989), *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 11-16.
21. Tanaka H., Doesburg K., Iwasaki T., Mireau I., (1999), *J. Dairy Sci.*, 82, 2530-2535.
22. Corzo G., Gilliland S. E., (1999), *J. Dairy Sci.*, 82, 466-471.
23. Grill J. P., Cayuela C., Antoine J. M., Schneider F., (2000), *J. Appl. Microbiol.*, 89, 553-563.
24. Dambekodi P. C., Gilliland S. E., (1998), *J. Dairy Sci.*, 81, 1818-1824.
25. Grill J. P., Manginot-Durr C., Schneider F., Ballongue J., (1995), *Curr. Microbiol.*, 31 (1), 23-27.
26. Kociubinski G., Pérez P., de Antoni G., (1999), *J. Food Prot.*, 8, 905-912.
27. Shuhaimi M., Ali A. M., Saleh N. M., Yazid A. M., (2001), *Biotechnol. Lett.*, 23, 1775-1780.
28. Clark P. A., Cotton L. N., Martin J. H., (1993), *Cult. Dairy Prod.*, J. 9, 11-14.
29. Clark P. A., Martin J. H., (1994), *Cult. Dairy Prod.*, J. 29, 18-21.
30. Gunn J. S., (2000), *Microbes Infect.*, 2, 907-913.
31. Eldere van J., Celis P., de Pauw G., Lesaffre E., Eyssen H., (1996), *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 656-661.
32. Marteau P., Minekus M., Havenaar R., Huis in't Veld J. H. J., (1997), *J. Dairy Sci.*, 80, 1031-1037.
33. Perez P. F., Minnaard Y., Disalvo E. A., de Antoni G. L., (1998), *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 21-26.
34. Perrin S., Grill J.P., Schneider F., (2000), *J. Appl. Microbiol.*, 88, 968-974.
35. Zavaglia A. G., Kociubinski G., Perez P., Disalvo E., de Antoni G., (2002), *J. Appl. Microbiol.*, 93, 794-799.
36. Taranto M. P., Murga M. L. F., Lorca G., Valdez G. F., (2003), *J. Appl. Microbiol.*, 95, 86-91.
37. Usman B., Hosono A., (1999), *Milchwissenschaft.*, 54, 495-498.
38. Gopal A., Shah N. P., Roginski H., (1996), *Milchwissenschaft.*, 51, 619-623.
39. Kurdi P., Tanaka H., van Veen H. W., Asano K., Tomita F., Yokota A., (2003), *Microbiol.*, 149, 2031-2037.
40. Lankaputhra W. E. V., Shah N. P., (1995), *Cult. Dairy Prod. J.*, 30, 2-7.
41. Batta A. K., Salen G., Arora R., (1990), *J. Biol. Chem.*, 265, 10925-10928.
42. Fini A., Roda A., (1987), *J. Lipid Res.*, 28, 755-759.
43. Charteris W. P., Kelly P. M., Morelli L., Collins J. K., (1998), *J. Appl. Microbiol.*, 84, 759-768.
44. Chung H. S., Kim Y. B., Chun S. L., Ji G. E., (1999), *Int. J. Food Microbiol.*, 47, 25-32.
45. Batta A. K., Salen G., (1999), *J. Chromatogr. B.*, 723, 1-16.
46. Chikai T., Nakao H., Uchida K., (1987), *Lipids*, 22, 669-671.
47. Hofmann A. F., Roda A., (1984), *J. Lipid Res.*, 25, 1477-1489.
48. Boever de P., Wouters R., Verschaeve L., Berckmans P., Schoeters G., Verstraete W., (2000), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53, 709-714.
49. Hosono A., Otani H., Yasui H., Watanuki M., (2002), *Anim. Sci. J.*, 73, 241-256.
50. Cheah P. Y., (1990), *Nutr. Cancer*, 14, 5.
51. Hirano S., Nakama R., Tamaki M., Masuda N., Oda H., (1981), *Appl. Environ. Microbiol.*, 47, 737-745.
52. Masuda N., Oda H., Hirano S., Masuda M., Tanaka H., (1984), *Appl. Environ. Microbiol.*, 47, 735.
53. Takahashi T., Morotomi M., (1994), *J. Dairy Sci.*, 77, 3275-3286.
54. Huijghebaert S. M., Mertens J. A., Eyssen H. J., (1982), *Appl. Environ. Microbiol.*, 43, 185-192.
55. Hylemon P. B., Cacciapuoti A. F., White B. A., Whitehead T. R., Fricke R. J., (1980), *Am. J. Clin. Nutr.*, 33, 2507.

56. Stellwag E. J., Hylemon P. B., (1979), *J. Lipid Res.*, 20, 325.
57. Gilliland S. E., (1990), *FEMS Microbiol. Rev.*, 87, 175-188.
58. Hosono A., Tono-oka T., (1995), *Milchwissenschaft.*, 50, 556-560.
59. Tahri K., Grill J. P., Schneider F., (1996), *Curr. Microbiol.*, 33, 187-193.
60. Tahri K., Grill J. P., Schneider F., (1997), *Curr. Microbiol.*, 34, 79-84.
61. Rasic J. L., Vujicic I. F., Skrinjar M., Vulic M., (1992), *Biotechnol. Lett.*, 14, 39-44.
62. Heeswijk van W. C., Rabenberg M., Westerhoff H. V., Kahn D., (1993), *Mol. Microbiol.*, 9, 443-457.
63. Magasanik B., (1993), *J. Cell. Biochem.*, 51, 34-40.
64. Eldere van J., Robben J., de Pauw G., Merckx R., Eyssen H., (1988), *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 2112-2117.
65. Christiaens H., Leer R. J., Pouwels P. H., (1992), *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 3792-3798.
66. Elkins C. A., Moser S. A., Savage D. C., (2001), *Microbiology*, 147, 3403-3412.
67. Coleman J. P., Hudson L. L., (1995), *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 2514-2520.
68. Agellon L. B., Torchia E. C., (2000), *Bioch. Bioph. Acta*, 1486, 198-209.