

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA

Dipartimento di Scienze Biomediche e Biotecnologiche

**Dottorato di Ricerca Internazionale in
Scienze Microbiologiche e Biochimiche XXVIII ciclo**

Dott.ssa Rosanna Inturri

**Caratterizzazione microbiologica di ceppi di
Bifidobacterium spp. e analisi chimica e biologica di un
esopolisaccaride prodotto**

Tesi di Dottorato

Coordinatore del Corso di Dottorato:

Prof.ssa Adriana Garozzo

Tutor:

Prof.ssa Giovanna Blandino

Triennio 2013-2015

INDICE

RIASSUNTO	5
ABSTRACT	8
I INTRODUZIONE	11
1. Il microbiota intestinale umano	11
2. Il microbiota intestinale dei ruminanti	19
3. Il genere <i>Bifidobacterium</i>	20
3.1 Caratteristiche generali	20
3.2 Isolamento	21
3.3 Tassonomia	22
3.4 Ecologia	26
3.5 Colonizzazione intestinale nell'uomo e meccanismi di adesività	27
4. Gli esopolisaccaridi batterici	31
4.1 Composizione chimica e biosintesi di omopolisaccaridi	34
4.2 Composizione chimica e biosintesi di eteropolisaccaridi	38
4.3 Funzionalità tecnologiche	39
4.4 Funzionalità fisiologiche	43
4.5 L'esopolisaccaride di <i>Bifidobacterium</i> spp.	45
II SCOPO DELLO STUDIO	47
III MATERIALI E METODI	48
5. Isolamento di bifidobatteri da campioni fecali umani e animali	48
5.1 Campionamento	48
5.2 Condizioni di crescita e isolamento	48
6. Caratterizzazione dei ceppi isolati	50
6.1 Caratterizzazione fenotipica mediante analisi del profilo metabolico	50
6.2 Resistenza a pH e sali biliari	51
6.3 Determinazione della Minima Concentrazione Inibente	52
7. Saggi di adesività	53
7.1 Coltivazione <i>in vitro</i> delle cellule HT-29	53
7.2 Saggio di adesione alle cellule HT-29 dei ceppi di nuovo isolamento e dei ceppi probiotici di <i>Bifidobacterium</i> spp. mediante metodo quantitativo colturale	54
7.3 Saggio di adesione alle cellule HT-29 dei ceppi probiotici di <i>Bifidobacterium</i> spp. mediante osservazione al microscopio ottico	56
7.4 Saggio di adesione alle cellule HT-29 del ceppo <i>Bifidobacterium longum</i> W11 mediante osservazione al microscopio elettronico a scansione (SEM)	57

8. Caratterizzazione chimico-fisica dell'esopolisaccaride prodotto dal ceppo <i>Bifidobacterium longum</i> W11	59
8.1 Estrazione dell'esopolisaccaride	59
8.2 Purificazione dell'esopolisaccaride	60
8.3 Idrolisi dell'esopolisaccaride	60
8.4 Analisi cromatografica mediante cromatografia su strato sottile	61
8.5 Analisi cromatografica mediante cromatografia liquida ad alta prestazione	62
9. Caratterizzazione molecolare dei determinanti genetici responsabili della produzione dell'esopolisaccaride nel ceppo <i>Bifidobacterium longum</i> W11	63
9.1 Condizioni di crescita del ceppo <i>Bifidobacterium longum</i> W11	63
9.2 Isolamento e purificazione del DNA	64
9.3 Amplificazione mediante PCR	64
9.4 Analisi bioinformatica del genoma di <i>B. longum</i> W11 per il cluster genico responsabile della produzione di ESP	66
10. Attività biologiche dell'esopolisaccaride prodotto dal ceppo <i>Bifidobacterium longum</i> W11	66
10.1 Attività citotossica sulle linee cellulari umane HF1 e Caco-2	66
10.2 Attività immunomodulante	68
IV RISULTATI	71
11. Isolamento di bifidobatteri da campioni fecali umani e animali	71
12. Caratterizzazione dei ceppi isolati	72
12.1 Caratterizzazione fenotipica mediante analisi del profilo metabolico	72
12.2 Resistenza a basso pH e differenti valori di sali biliari	74
12.3 Determinazione della Minima Concentrazione Inibente	75
13. Saggi di adesività	76
13.1 Saggio di adesione alle cellule HT-29 dei ceppi di nuovo isolamento e dei ceppi probiotici di <i>Bifidobacterium</i> spp. mediante metodo quantitativo colturale	76
13.2 Saggio di adesione alle cellule HT-29 dei ceppi probiotici di <i>Bifidobacterium</i> spp. mediante osservazione al microscopio ottico	77
13.3 Saggio di adesione alle cellule HT-29 del ceppo <i>Bifidobacterium longum</i> W11 mediante osservazione al microscopio elettronico a scansione (SEM)	80
14. Caratterizzazione chimico-fisica dell'esopolisaccaride prodotto dal ceppo <i>Bifidobacterium longum</i> W11	81
14.1 Analisi cromatografica mediante cromatografia su strato sottile	81
14.2 Analisi cromatografica mediante cromatografia liquida ad alta prestazione	82

15. Caratterizzazione molecolare dei determinanti genetici responsabili della produzione dell'esopolisaccaride nel ceppo <i>Bifidobacterium longum</i> W11	83
16. Attività biologiche dell'esopolisaccaride prodotto dal ceppo <i>Bifidobacterium longum</i> W11	85
16.1 Attività citotossica sulle linee cellulari umane HF1 e Caco-2	85
16.2 Attività immunomodulante	88
DISCUSSIONI E CONCLUSIONE	90
BIBLIOGRAFIA	96

RIASSUNTO

Lo scopo della ricerca, durante il triennio del Dottorato in Scienze Microbiologiche e Biochimiche - XXVIII Ciclo, è stato quello di studiare le caratteristiche microbiologiche di ceppi di *Bifidobacterium* spp. isolati da feci umane e animali e di ceppi utilizzati in prodotti probiotici e quello di investigare le proprietà chimico-fisiche e alcune possibili attività biologiche dell'esopolisaccaride (EPS) prodotto da un ceppo di *Bifidobacterium longum*.

Sono stati esaminati 24 campioni di feci da ovini e caprini di allevamenti siciliani, e 15 campioni di feci umane da adulti e bambini.

Gli studi sul profilo metabolico dei ceppi isolati, eseguiti utilizzando sistemi standardizzati (API rapid ID 32 A), confermavano soltanto per 10 ceppi la probabile appartenenza al genere *Bifidobacterium* spp.

I ceppi caratterizzati come probabili bifidobatteri erano saggiati per la capacità di resistere alle condizioni gastrointestinali. I saggi effettuati dimostravano, per i 10 ceppi, un'adeguata resistenza a pH 3 (sopravvivenza $\geq 50\%$) e a differenti concentrazioni di sali biliari (sopravvivenza $\geq 50\%$).

Inoltre, i 10 ceppi di nuovo isolamento venivano esaminati per la loro sensibilità agli antibiotici, mediante la determinazione della Minima Concentrazione Inibente (MIC), effettuata con il metodo della microdiluzione in brodo, in accordo con l'ISO 10932/IDF233 Standard e linee guida stabilite dal Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2013). Tutti i ceppi in esame mostravano delle MIC compatibili con i valori di cut-off riportati dall'EFSA (2012) per il genere *Bifidobacterium* spp.

I ceppi isolati e caratterizzati a livello metabolico come probabili bifidobatteri e i ceppi probiotici di *Bifidobacterium* spp. venivano studiati per la loro capacità di adesione, mediante metodo quantitativo colturale, utilizzando le cellule della linea intestinale umana HT-29 da adenocarcinoma del colon retto. I risultati ottenuti mostravano, dopo due ore di incubazione, per i ceppi di *Bifidobacterium* spp. di nuovo isolamento una percentuale di adesione, alle cellule HT-29, $\leq 4,8\%$ e per i

ceppi probiotici di *Bifidobacterium* spp. una percentuale di adesione compresa tra 4,8% e 6,7%.

Per i ceppi probiotici di *Bifidobacterium* spp. le caratteristiche di adesione venivano osservate mediante microscopio ottico ad immersione. I risultati mostravano differenti caratteristiche di adesione in relazione al ceppo saggiato, ma anche in relazione al tempo di incubazione. La capacità di adesione del ceppo *Bifidobacterium longum* W11 veniva ulteriormente indagata mediante microscopia elettronica a scansione (SEM). La SEM evidenziava la presenza di biopolimeri di probabile natura esopolisaccaridica, organizzati in una complessa struttura 3D e coinvolti nell'adesione del ceppo.

Le successive fasi della ricerca erano, quindi, focalizzate sullo studio approfondito di questo biopolimero di natura esopolisaccaridica.

Dopo l'estrazione, purificazione e idrolisi utilizzando anche metodiche messe a punto da noi, l'esopolisaccaride (EPS) veniva analizzato per la composizione chimica, mediante cromatografia su strato sottile (TLC), utilizzando come fase stazionaria piastre in silice e in cellulosa. In base ai valori del fattore di ritardo (Rf), veniva identificata la presenza di glucosio e galattosio, con entrambi i tipi di piastre utilizzate. Era quindi effettuata una più accurata analisi cromatografica mediante cromatografia, liquida ad alta prestazione (HPLC), utilizzando una metodica messa a punto da noi. L'analisi HPLC confermava la presenza di glucosio e galattosio.

La ricerca dei determinanti genetici responsabili della sintesi dell'EPS del ceppo *B. longum* W11 era effettuata mediante Polymerase chain reaction (PCR) utilizzando coppie di *degenerate primers* in grado di amplificare per ciascuno dei due possibili priming-glycosyltransferase (*p-gtf*) e l'analisi bioinformatica dell'intero genoma. I risultati ottenuti mostravano la presenza del gene *cpsD*, che codifica per la galactosil-transferasi e un *cluster* genico composto da 23 geni, (24,7 kb).

Per quanto riguarda le possibili attività biologiche dell'EPS in esame, la possibile attività citotossica veniva saggiata in vitro su cellule umane sane, fibroblasti gengivali HF1 e cellule intestinali tumorali Caco-2. Il saggio di citotossicità dell'EPS effettuato su fibroblasti non evidenziava alcun effetto citotossico. Le prove di citotossicità su cellule tumorali Caco-2 mostravano una modesta

diminuzione della vitalità cellulare sin dalla più bassa concentrazione saggiata (62,5 µg/mL). Tale decremento, tuttavia non risultava statisticamente significativo. L'eventuale attività immunomodulante dell'EPS veniva verificata *in vitro* valutando gli effetti sulla produzione di citochine utilizzando le cellule mononucleate isolate dal sangue periferico (PBMC) di donatori sani. I risultati ottenuti mostravano un effetto di tipo immunomodulante. L'EPS (100 µg/mL), infatti, era in grado di aumentare significativamente la produzione di IL-6 e IL-10. L'aggiunta di ConA induceva un aumento significativo delle citochine dosate. L'aggiunta di EPS alla dose più alta (200µg/mL), incrementava ulteriormente in maniera significativa i livelli di IL-1, IL-6 e INF-gamma e riduceva significativamente i livelli di IL-10 rispetto ai PBMC trattati solo con ConA. I risultati della ricerca forniscono una buona base sperimentale per ulteriori indagini su altri aspetti non ancora investigati degli EPS, in generale, ed in particolare per l'EPS del ceppo *B. longum* W11, quali altre eventuali proprietà biologiche o protezione del ceppo produttore dalle condizioni intestinali avverse e/o dall'attività inibente degli antibiotici.

ABSTRACT

The principle aim of research carried out over the course of a three-year PhD studies programme in Microbiology and Biochemistry - XXVIII Cycle was to study the microbiological characteristics of *Bifidobacterium* spp. strains isolated from human and animal feces (sheep and goat) as well as those present in commercial probiotic products and investigate the chemical - physical and the genotypic features of *Bifidobacterium longum-eps* clusters and biological properties. Several possible biological activities of the biopolymer produced by a strain of the examined *Bifidobacterium longum* were likewise investigated.

Twenty-four stool samples from animal feces (sheep and goat) farms in Sicily were examined, as well as 15 human stool samples from both infants and adults.

Studies on the metabolic profile of the isolated strains, performed using standardized systems (API rapid ID 32 A), confirmed only 10 strains to likely belong to the *Bifidobacterium* genus. Only those strains that showed the metabolic profile as likely belonging to bifidobacteria were assayed for resistance to gastrointestinal conditions. These ten strains showed an appropriate resistance to both pH 3 (survival $\geq 50\%$) and different concentrations of bile salts ($\geq 50\%$ survival).

In addition, 10 strains of new isolation were analyzed for their sensitivity to antibiotics by determining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) in accordance with the guidelines established by l'ISO 10932/IDF233 Standard and the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2013), as well as the cut-off values reported by the European Food Safety Authority (EFSA 2012) for *Bifidobacterium* spp.. Most of the strains under examination showed MIC compatible with the cut-off values reported by the EFSA (2012) for the genus *Bifidobacterium* spp.

The strains isolated and characterized for the metabolic features such as bifidobacteria and the probiotic strains of *Bifidobacterium* spp. were assayed for adherence using the human intestinal cell line HT-29 from colorectal adenocarcinoma.

For probiotic strains of *Bifidobacterium* spp. the adhesion characteristics were evaluated using a quantitative cultural method and observed using immersed optical microscope. The results showed different adhesion characteristics depending on the strain tested, and incubation. The adhesion capability of the strain *B. longum* W11 was also, investigated by scanning electron microscopy (SEM). The SEM observation showed the presence of biopolymers organized in a complex 3D structure, exopolysaccharides-type, involved in adhesion.

Subsequent phases of the survey, therefore, focused on studying this biopolymer of the exopolysaccharides- type. Following extraction, purification and hydrolysis of the exopolysaccharides (EPS) was analyzed for chemical composition by means of thin layer chromatography (TLC), using silica and cellulose plates using methods developed by us. Based on the values of the retention factor (*R_f*), the presence of glucose and galactose was identified using both silica and cellulose plates. A more accurate chromatographic analysis was therefore carried out using high-performance liquid chromatography (HPLC), by means of a method developed by us. The HPLC analysis confirmed the presence of glucose and galactose in EPS polymer.

The genetic determinants responsible for the synthesis of the EPS from the strain *B. longum* W11 was performed by PCR using degenerate primers designed for each priming-glycosyltransferase genes, *cpsD* and *rfbP*. The results obtained showed the presence of the *cpsD* gene, which encodes galactosyltransferase. The completed genome of *B. longum* NCC2707 was used for comparison with the genome of *B. longum* W11 to search for putative bifido-*eps* cluster. The results obtained showed the presence of a gene cluster responsible for the production of the ESP composed of 23 genes, (24,7 kb).

As regards the possible biological activities of EPS under consideration, the possible cytotoxicity was tested in vitro using healthy human cells, gingival fibroblasts HF1 and cancer cells Caco-2. The cytotoxicity assay performed on fibroblasts did not show any cytotoxic effect. The cytotoxicity assay performed on Caco-2 cells showed a modest decrease in cell viability starting from the lowest concentration tested (62,5 µg/mL). This decrease, however, was not statistically

significant. The possible immunomodulatory activity of the EPS was verified *in vitro* by evaluating the effects on the production of cytokines *in vitro* tests using mononuclear cells isolated from peripheral blood (PBMC) from healthy donors. The results obtained showed an immunomodulating effect. The EPS (100 µg/mL), in fact, was able to significantly increase the production of IL-6 and IL-10. The addition of ConA induced a significant increase of the cytokines assayed. The addition of EPS, at the highest dose (200 µg/mL), led to significant increased levels of IL-1, IL-6 and INF-γ and significantly reduced levels of IL-10 as compared to PBMCs treated only with ConA.

Cytotoxicity tests of EPS of cancer cells Caco-2, showed a modest decrease in cell viability starting from the lowest concentration tested (62,5 µg/mL). This decrease, however, was not statistically significant. The cytotoxicity assay performed on fibroblasts did not show any cytotoxic effect.

The research results provide a good experimental basis for further investigation of general aspects of EPS not yet considered and, in particular, for EPS of *B. longum* W11 specifically for other possible biological properties or protection of the strain producer from adverse intestinal conditions and/or the inhibiting characteristic of antibiotics.

I INTRODUZIONE

1. Il microbiota intestinale umano

Nel corpo umano albergano un gran numero di microrganismi appartenenti prevalentemente a specie non patogene o, più raramente a specie patogene che si sono co-evolute con l'ospite.

I recenti progressi delle tecnologie basate sul sequenziamento genomico, hanno permesso la caratterizzazione di nuove specie batteriche nell'ambito dei phyla già conosciuti e la definizione di geni coinvolti nelle loro funzioni biologiche, in rapporto con la salute dell'ospite.

I numerosi progetti attuati a livello internazionale nell'ultimo decennio (*Human Microbiome Project* e *European Metagenomics of the human Intestinal tract*) hanno come obiettivo quello di caratterizzare abbondanza, diversità e funzionalità dei geni presenti in tutti i microrganismi che vivono permanentemente e non in diversi siti del corpo umano [1-3].

Si definisce **Microbiota umano** *l'insieme di tutti i microrganismi che hanno come habitat il corpo umano* (1300 g e 1,5 l) [4-5]. Il termine recente **Microbioma umano** indica *l'intera collezione di geni dei microrganismi* (circa 8 mln), *che colonizzano il corpo umano*. Il genoma del microbiota (microbioma), contiene un numero di geni pari a 400 volte il totale dei geni che costituiscono il genoma umano (~20.000), fornendo così specifiche caratteristiche genetiche e metaboliche non evolute dall'ospite [4-9].

Le cellule microbiche che colonizzano il corpo umano costituiscono tre quarti delle cellule totali. Queste sono quasi totalmente cellule batteriche, e soltanto in piccolissima parte archaea e funghi; virus e batteriofagi fanno, anch'essi parte del microbiota umano.

La colonizzazione è un processo molto complesso, che inizia immediatamente dopo la nascita. Il neonato, che nasce con parto naturale, viene a contatto con i microrganismi provenienti dal tratto genito-urinario della madre; la fonte successiva di microbi è il latte materno. I neonati da parto naturale e allattati al seno, presentano, nelle prime settimane di vita, un microbiota in cui prevalgono gli

Actinobacteria e in particolare il genere *Bifidobacterium*, dove dominano *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum* e *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* [10]. L'intestino di questi neonati viene colonizzato precocemente anche da specie di *Lactobacillus* spp., prevalentemente *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus gasseri* [11]. Invece, il microbiota intestinale di neonati da parto cesareo e/o nutriti con latte artificiale sarà simile al microbiota cutaneo (*Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium*) [12, 13]. Continuando nello sviluppo, il bambino viene a contatto con i microbi ambientali (suolo, piante, animali domestici) o presenti negli alimenti quando la dieta diventerà più diversificata. La stragrande maggioranza dei microbi ambientali non diventerà parte del microbioma poiché non è in grado di vivere negli *habitat* forniti dal corpo umano. L'insieme di microbi che finirà per costituire il *core* del microbioma umano maturo, non è casuale; durante i primi due anni di vita vi è, infatti, un processo di selezione reciproca tra il bambino e i microbi che incontra. Alla fine del terzo anno di vita, quando il microbioma umano diventa stabile, si verifica una selezione che coinvolge diversi batteri. Il microbiota presente instaura un ambiente appropriato, interagendo con marcatori specifici che sono secreti dalle cellule (**Figura 1**) [7].

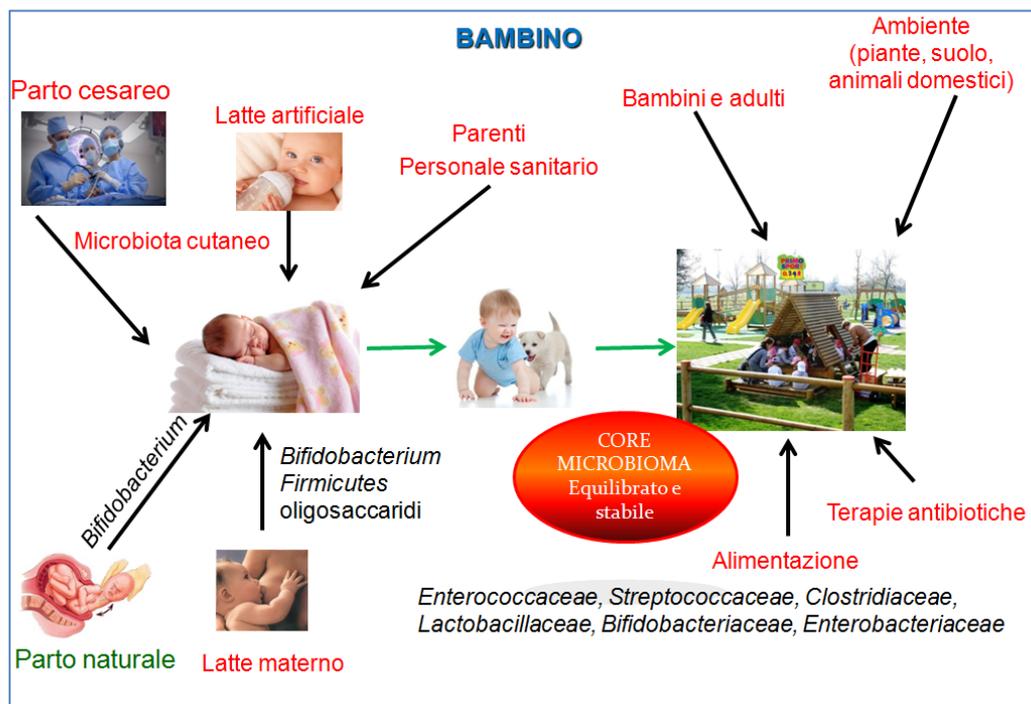


Figura 1 Origini del microbiota intestinale umano.

Il *core* del microbioma umano (**Figura 2:** parte rossa) è costituito dal *set* di geni presenti in un dato *habitat*, ed è presente in tutti o nella maggior parte dei microbiomi umani. L'*habitat* può essere l'intero corpo umano o una parte specifica, per esempio l'intestino o una parte di esso. La parte variabile del microbioma umano (**Figura 2:** parte blu) è il *set* di geni, che costituisce, in un dato *habitat*, la parte variabile del microbiota, differente da una persona all'altra. Questa variazione potrebbe essere determinata da una correlazione di fattori quali il genotipo, lo stato fisiologico, il sistema immunitario, la *patobiologia*, lo stile di vita (incluso la dieta) dell'ospite, l'ambiente in cui vive e la presenza di una popolazione transiente di microrganismi che non possono colonizzare in modo permanente un *habitat*. Nonostante il *core* del microbiota sia abbastanza stabile nel tempo, la gradazione di colore del *core* indica la possibilità che nuovi geni possano essere inseriti nel core del microbioma, ed altri geni possano essere esclusi [7].

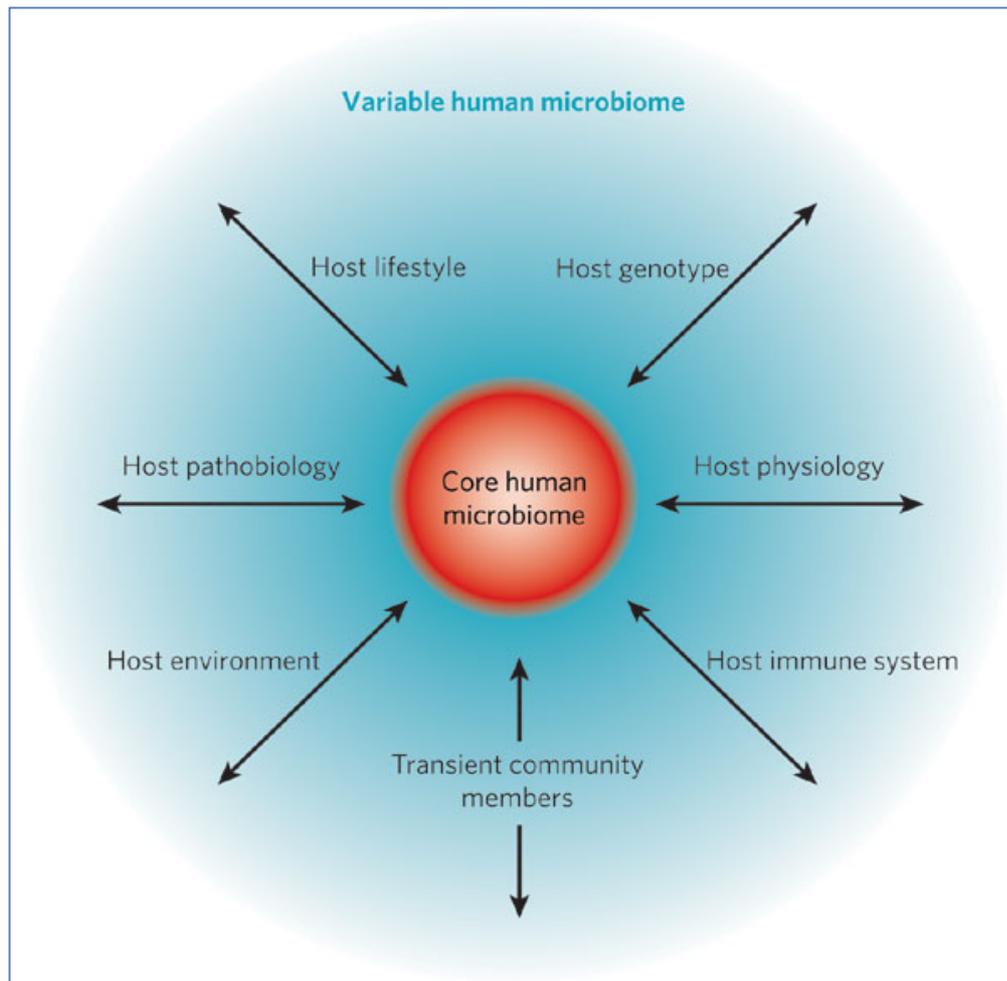


Figura 2 Microbioma umano [7].

Il microbioma è presente in diversi *habitat*. I microbi vivono sulla superficie della pelle, così come nei pori cutanei, nelle ghiandole sudoripare, nei capelli, nella bocca che, come la pelle, contiene molti *micro-habitat* diversi, tra cui denti, lingua, guance, gengive. Inoltre, microbi vivono nell'intestino, che contiene la più grande, densa e diversificata comunità microbica del corpo umano, e nella vagina [7].

Quando i microbiomi umani sono classificati per le specie batteriche che contengono, si osservano molte differenze da persona a persona. Se, invece, i microbiomi sono classificati per le proprie capacità funzionali, come la capacità di

digerire differenti tipi di carboidrati, sintetizzare vitamine, distruggere le tossine, si mostrano molto simili.

In particolare, in tutti i distretti del microbiota intestinale, si ha la predominanza di poche divisioni batteriche, ma altamente differenziate a livello di specie e sottospecie (**Figura 3**) [5]. Studi metagenomici hanno evidenziato, nel microbiota di tutti i distretti intestinali dell'adulto, una predominanza di 5 divisioni batteriche, ossia *Firmicutes*, il *Phylum* predominante, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* e *Fusobacteria* (con differenti rapporti in relazione al pH, ai sali biliari e all'ambiente aerobio/anaerobio), ma altamente differenziate a livello di specie e sottospecie [5, 9, 11, 14]. Nel phylum *Firmicutes*, prevale il *Clostridium coccoides* group a cui appartengono numerose specie coltivabili e specie evidenziate solamente a livello molecolare. Kurakawa *et al.* (2015) [15] hanno dimostrato che cambiamenti nella diversità della popolazione di *Coccoides* group sono correlati all'età e potrebbero condizionare la salute dell'ospite.

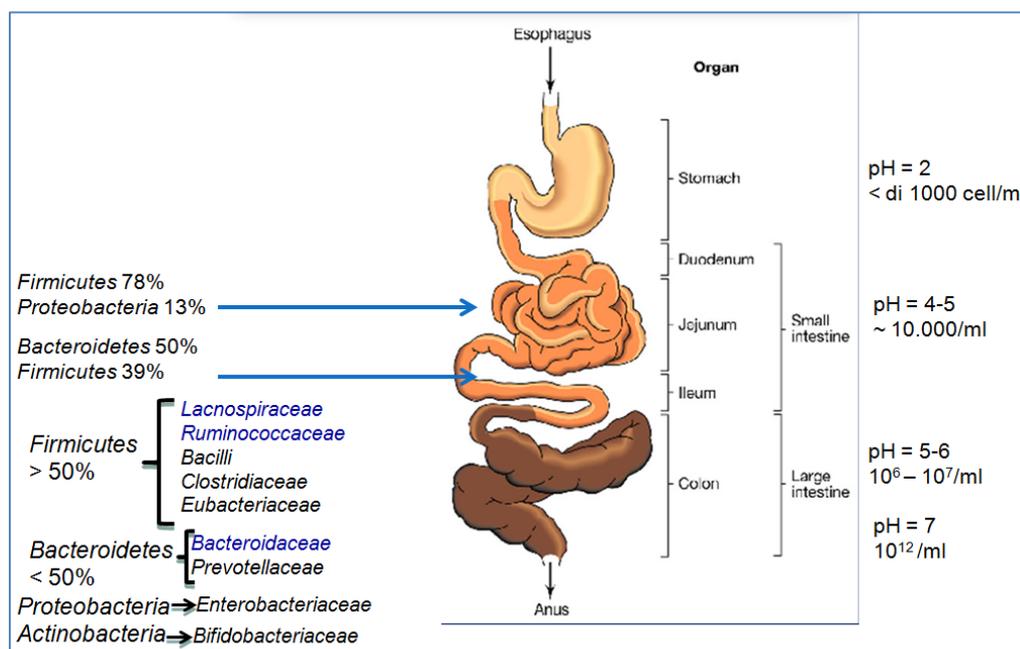


Figura 3 Distretti intestinali e microbiota. Modificata da [5].

Tabella 1 Funzioni della componente batterica del microbiota intestinale [16, 17]

Funzione protettiva nei confronti di batteri patogeni
<ul style="list-style-type: none">▪ Competizione per sostanze nutritive e siti di adesione▪ Produzione di batteriocine
Funzioni metaboliche
<ul style="list-style-type: none">▪ Fermentazione di polisaccaridi di origine vegetale non digeriti dagli enzimi dell'ospite▪ Produzione di acidi grassi a catena corta (acido butirrico, acetico e propionico) che contribuiscono al metabolismo energetico dell'ospite ed hanno effetti sull'epitelio intestinale▪ Sintesi di vitamine (vitamina K e B12, biotina e folati)
Funzioni strutturali
<ul style="list-style-type: none">▪ Regolazione del turnover e promozione della differenziazione delle cellule epiteliali
Principali funzioni immunitarie
<ul style="list-style-type: none">▪ Induzione di IgA secretorie▪ Maturazione delle cellule dendritiche▪ Regolazione dell'equilibrio Th1/Th2

La **Tabella 1** sintetizza le molteplici funzioni della componente batterica del microbiota intestinale [6, 7, 18-20].

Sono stati effettuati molti studi, per chiarire il rapporto tra microbioma, salute e malattia. Tali studi mostrano una correlazione tra alcuni microrganismi e determinate patologie, ma le prove che una determinata comunità microbica, in realtà, possa causare una particolare malattia sono ancora limitate [19].

È chiaro, tuttavia, che il microbioma ha un ruolo importante in molte malattie [21]. Terapie antibiotiche e stress metabolici, citotossici e patogenetici possono determinare un alterato rapporto tra le divisioni *Firmicutes/Bacteroidetes* ed una diminuita variabilità del microbiota a livello di specie. Si determina, quindi, una disbiosi intestinale che sembra avere un ruolo molto importante nelle malattie infiammatorie intestinali ed in altre patologie come celiachia, allergia e altre patologie quali diabete e obesità (**Tabella 1** e **Figura 4**) [14, 19, 22, 23].

Alterazioni nel microbiota intestinale e lievi infiammazioni possono contribuire a determinare un ciclo di eventi che inducono uno stato cronico di malattie mediate dal sistema immunitario (**Figura 4**) [19]. Interventi in grado di modulare il

microbiota intestinale e l'infiammazione possono essere il miglior sistema per controllare tali condizioni [19].

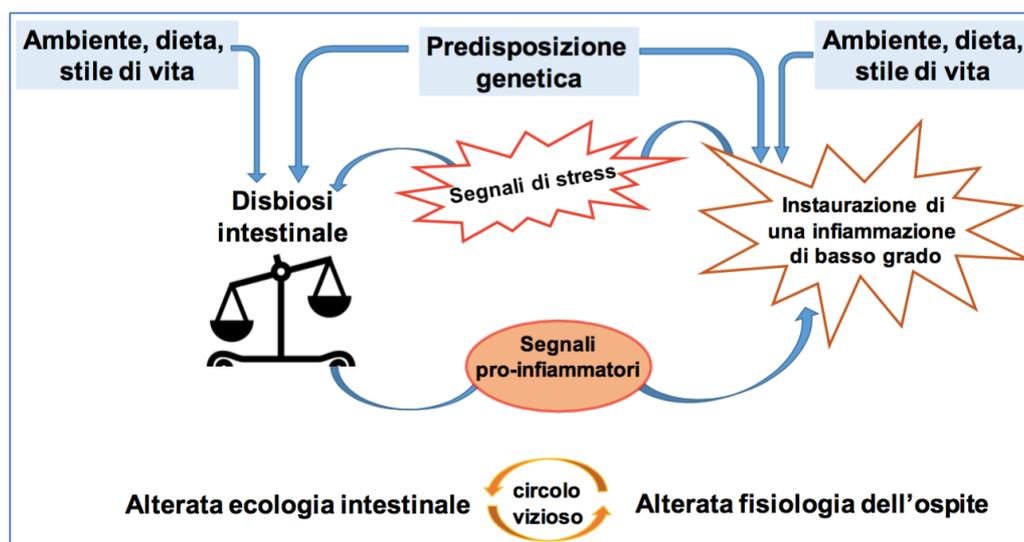


Figura 4 Circolo vizioso tra ecologia intestinale alterata e fisiologia alterata dell'ospite. Modificato da [19].

L'equilibrio del microbiota intestinale può essere mantenuto o ripristinato favorendo i microrganismi già presenti con sostanze prebiotiche, somministrando microrganismi probiotici o grazie ad una strategia simbiotica (somministrazione di probiotici e prebiotici) [24].

I prebiotici sono oligosaccaridi non digeribili ma fermentabili, che hanno un effetto benefico sulla salute dell'ospite attraverso la stimolazione selettiva di specifici membri del microbiota intestinale, quali bifidobatteri e lattobacilli [25, 26].

Il probiotico, secondo la classica definizione di Fuller (1989) è *un integratore alimentare a base di microrganismi vivi e vitali che producono favorevoli effetti sull'organismo animale, migliorandone l'equilibrio microbico intestinale*. Secondo la "United Nations Food and Agricultural Organization" (FAO) e la "World Health Organization" (WHO) la definizione scientifica di probiotici è "*microrganismi vivi*

che, quando somministrati in quantità adeguate, conferiscono un beneficio sulla salute dell'ospite" [27, 28].

Fino ad ora, i ceppi più utilizzati come probiotici appartengono a differenti specie appartenenti al genere *Bifidobacterium* e al genere *Lactobacillus*.

La **Figura 5** mostra le recenti acquisizioni di studi clinici, volti a valutare gli effetti della somministrazione di ceppi probiotici per quanti riguarda la riduzione del rischio di alcune malattie o nella terapia di alcune patologie dell'adulto, bambino e neonato [29].

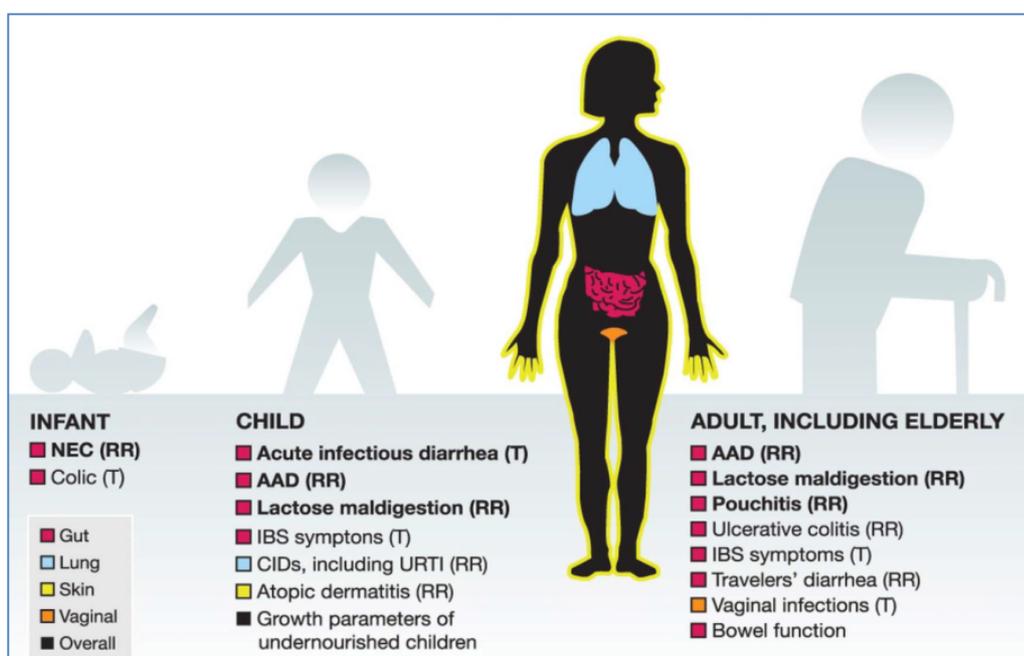


Figura 5 Target di studi effettuati con probiotici in soggetti sani e malati di età differenti [29].

RR = Riduzione del rischio di malattie; T = Terapia di alcune patologie

2. Il microbiota intestinale dei ruminanti

Pochi sono gli studi molecolari in grado di fornire notizie accurate sulle specie coltivabili e non-coltivabili presenti nel microbiota intestinale animale; in particolar modo nel microbiota dei ruminanti. Studi coltura-dipendenti hanno dimostrato una carica batterica di 10^4 - 10^6 per grammo di contenuto, nell'intestino crasso e nel rumine [30]. I generi predominanti nell'intestino dei ruminanti sono: *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Streptococcus*, *Eubacterium*, *Ruminococcus* e *Lactobacillus*. Anche le spirochete del genere *Treponema* sono state osservate frequentemente. I microorganismi predominanti sono batteri anaerobi obbligati.

Studi coltura-dipendenti hanno dimostrato che la popolazione microbica di differenti ruminanti è più omogenea nel rumine rispetto che nell'intestino tenue e crasso, dove viene riscontrata la prevalenza di alcune popolazioni in relazione alle differenti specie animali prese in esame e ad altri fattori quali ad esempio l'alimentazione.

Studi sul microbiota animale hanno preso in esame soprattutto quello di gatti, pollame e bovini. Furet *et al.* (2009) [31] hanno condotto uno studio molecolare comparativo sul microbiota fecale umano e su quello di animali domestici e di allevamento. I risultati hanno evidenziato che un basso contenuto di acqua a livello intestinale può contribuire alla presenza di un'alta carica batterica nelle feci di ovini e caprini. Inoltre, lo studio ha confermato che nel microbiota fecale umano sono presenti prevalentemente le specie appartenenti al *Clostridium coccooides* group e al *Bacteroidetes/Prevotella* group.

Clostridium coccooides group e *Bacteroidetes/Prevotella* group sono entrambi dominanti anche nelle feci di ruminanti quali bovini, ovini e caprini, ma con una carica più alta.

Per il gruppo *Lactobacillus/Leuconostoc/Pediococcus* lo studio non ha evidenziato una differenza significativa tra in microbiota intestinale umano e animale. I risultati, però, hanno evidenziato una carica più elevata di bifidobatteri nel microbiota fecale di pecore e bovini rispetto a quello umano o di caprini.

3. Il genere *Bifidobacterium*

3.1 Caratteristiche generali

Il genere *Bifidobacterium* appartiene al phylum Actinobacteria, classe Actinobacteria, subclasse Actinobacteridae, ordine Bifidobacteriales, famiglia Bifidobacteriaceae [32]. I bifidobatteri sono stati isolati per la prima volta da Tissier nel 1899, dalle feci di un neonato allattato al seno, e furono chiamati *Bacillus bifidus*. Dal latino *bifidus*: bifido e dal greco βακτήριον [bactérion]: bastoncino. I bifidobatteri sono bacilli Gram-positivi pleomorfi, asporigeni, anaerobi obbligati o talvolta aerotolleranti, chemorganotrofi, immobili [33]. I bacilli crescono singolarmente in catene o aggregati e hanno lunghezza variabile mediamente da 2 a 5 µm, presentano spesso estremità rigonfie a forma di clava o di spatola e possono essere più o meno ramificati. Frequenti sono le forme a Y e/o a V, ma non sono insolite forme più regolari e forme coccoidali [33]. I bifidobatteri producono acido, ma non gas da una grande varietà di substrati glucidici. Sono catalasi-negativi con alcune eccezioni (*Bifidobacterium indicum* e *Bifidobacterium asteroides* quando crescono in aerobiosi). Il loro contenuto genomico di GC varia da 42 a 67 mol% [34].

La temperatura ottimale di crescita varia da 37° a 41°C. Non si ha crescita al di sotto di 20°C e al di sopra di 46°C. Anche in questo caso si osservano, però, variazioni in rapporto soprattutto all'*habitat* di provenienza. Il pH ottimale di crescita è compreso tra 6,5 e 7,0. Non si ha crescita a pH inferiori a 4,5 e superiori a 8,5. I bifidobatteri sono microorganismi acido-tolleranti ma non acidofili [33].

La forma delle cellule batteriche dipende in primo luogo dalla specie di appartenenza; tuttavia, anche all'interno di una singola specie, la morfologia cellulare può variare in dipendenza delle condizioni di crescita. Tissier stesso annotò che i ceppi da lui studiati assumevano forme rigonfie in risposta all'acidità, a temperature estreme o a inadeguate fonti di azoto nel mezzo di coltura [35]. La carenza, nel mezzo di coltura, di determinati fattori coinvolti nella sintesi della parete cellulare si traduce in un aumento delle ramificazioni. Tra questi fattori vi sono alcuni amminozuccheri, principalmente *N*-acetilglucosamina [36], e amminoacidi

quali alanina, acido aspartico, acido glutammico e serina [37]. Anche concentrazioni non ottimali di sali di sodio e di ioni calcio influiscono sulla formazione di ramificazioni. Il pleomorfismo, quindi, dipende principalmente da specifici deficit nella sintesi della parete cellulare [38]. Un notevole passo avanti nella conoscenza della morfologia cellulare batterica è stato fatto solo di recente grazie all'utilizzo della Microscopia Elettronica a Scansione (SEM).

Per quanto riguarda la morfologia delle colonie dei ceppi di *Bifidobacterium* spp., queste appaiono generalmente lisce e a margini interi, possono essere opache o brillanti e avere un colore variabile dal bianco al crema. Anche in questo caso la dimensione e la morfologia variano in dipendenza delle condizioni nutrizionali e delle specie di appartenenza [33].

3.2 Isolamento

Numerosi substrati sono stati valutati per l'isolamento e la conta dei bifidobatteri nel loro *habitat* naturale. Dai vari tentativi è emerso che gli ingredienti che assicurano il loro mantenimento in coltura sono *trypticase* e *phytone*. Questi ingredienti fanno parte del terreno non selettivo Trypticase Phytone Yeast (TPY), tuttora utilizzato, come substrato di alcuni terreni selettivi, per l'isolamento dei ceppi provenienti da differenti *habitat*. Per la conta dei bifidobatteri l'agar più frequentemente utilizzato è il de Man, Rogosa & Sharpe (MRS) addizionato a cisteina, un *medium* selettivo privo di antibiotici, come raccomandato per le indagini di routine [39]. Uno dei terreni di coltura più frequentemente utilizzati per l'isolamento dei bifidobatteri è il Bifidobacterium Selective Medium (BSM) [40]. Un altro terreno di coltura che permette l'isolamento dei bifidobatteri è il Transgalacto-Oligosaccharides (TOS) *medium* [41].

Ceppi di *Bifidobacterium bifidum* sono stati isolati da diversi prodotti probiotici, utilizzando come terreno selettivo un agar (MM) contenente mupirocina e mucina come unica fonte di carbonio. L'MM agar ha mostrato una ottima selettività per *B. bifidum*, *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. breve* e *B. longum* subsp. *longum* presenti in prodotti probiotici contenenti anche lattobacilli e streptococchi [42].

3.3 Tassonomia

Secondo lo schema tassonomico dei procarioti, il genere *Bifidobacterium* appartiene al phylum Actinobacteria, classe Actinobacteria, sottoclasse Actinobacteridae, ordine Bifidobacteriales, famiglia Bifidobacteriaceae [43]. Gli altri generi appartenenti a tale famiglia sono: *Aeriscardovia*, *Falcivibrio*, *Gardenerella*, *Parascardovia* e *Scardovia*.

Ad oggi, le specie del gene *Bifidobacterium* sono 29: *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium angulatum*, *Bifidobacterium animalis* (con due sottospecie *B. animalis* subsp. *animalis* and *B. animalis* subsp. *lactis*), *Bifidobacterium asteroides*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium boum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium choerinum*, *Bifidobacterium coryneforme*, *Bifidobacterium cuniculi*, *Bifidobacterium dentium*, *Bifidobacterium gallicum*, *Bifidobacterium gallinarum*, *Bifidobacterium indicum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium magnum*, *Bifidobacterium merycicum*, *Bifidobacterium minimum*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, *Bifidobacterium pseudolongum*, *Bifidobacterium psychraerophilum*, *Bifidobacterium pullorum*, *Bifidobacterium ruminantium*, *Bifidobacterium saeculare*, *Bifidobacterium scardovii*, *Bifidobacterium subtile*, *Bifidobacterium thermacidophilum* e *Bifidobacterium thermophilum*.

L'altro gruppo di generi comprende poche specie: *Aeriscardovia aeriphila* in *Aeriscardovia*, *Gardenerella vaginalis* in *Gardenerella*, *Parascardovia denticollens* in *Parascardovia* e *Scardovia inopinata* in *Scardovia*. Le specie appartenenti al genere *Falcivibrio*, ad esempio *Falcivibrio grandis* e *Falcivibrio vaginalis*, sono stati trasferiti al genere *Mobiluncus*, e cioè alle specie *Mobiluncus mulieris* e *Mobiluncus curtisii* rispettivamente, appartenenti alla famiglia Actinomycetaceae [43, 44].

I rapporti filogenetici tra la famiglia Bifidobacteriaceae e *Mobiluncus* sono raffigurati in **Figura 6**, sulla base dell'analisi della sequenza genetica dell'rRNA 16S.

Per lungo tempo i bifidobatteri sono stati considerati “parenti” dei lattobacilli, e tale correlazione è supportata dall'analisi della struttura della mureina [45]. Tuttavia,

Poupard *et al.*, (1973) [46] è stato il primo ad affermare che i bifidobatteri sono maggiormente correlati agli *Actinomyces*, e ciò è stato confermato dall'analisi della sequenza del gene dell'rRNA 16S [44].

I bifidobatteri degradano gli esosi attraverso una peculiare via metabolica, il cosiddetto *bifid-shunt*, ossia la via della fruttosio-6-fosfato, il cui enzima chiave è il fruttosio-6-fosfochetolasi. Questo enzima è considerato come carattere tassonomico per l'identificazione a livello di genere [34], ma a causa della riclassificazione di alcune specie di *Bifidobacterium* spp. in nuovi generi, può essere considerato un *marker* tassonomico per la famiglia delle *Bifidobacteriaceae*. Uno studio completo dei metodi di identificazione dei bifidobatteri è stato effettuato da Ventura *et al.* (2004) [48]. Per quanto riguarda le diverse analisi filogenetiche, è possibile affermare che, all'interno del genere *Bifidobacterium*, ci sono diverse specie associate in gruppi. Questi sono stati nominati tenendo conto del nome più antico incluso nel gruppo e sono: *B. adolescentis* (che include *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. catenulatum*, *B. dentium*, *B. merycicum*, *B. pseudocatenulatum* e *B. ruminantium*), *B. pullorum* (che include *B. gallinarum*, *B. pullorum* e *B. saeculare*), *B. asteroides* (che include *B. asteroides*, *B. coryneforme*, *B. indicum*), *B. boum* (che include *B. boum*, *B. thermacidophilum*, *B. thermophilum*), *B. pseudolongum* (che include *B. animalis*, *B. choerinum*, *B. cuniculi*, *B. gallicum*, *B. pseudolongum*). Le specie *B. breve* e *B. longum* sono strettamente correlate, così come il *B. minimum* e *B. psychroaerophilum*. Invece, i ceppi *B. bifidum*, *B. magnum*, *B. scardovii* e *B. subtile* appartengono a rami distinti.

Uno schema di classificazione simile è stato ottenuto con l'analisi filogenetica basata sulla sequenza parziale del gene *hsp60* [49]. Recentemente, una ulteriore analisi filogenetica è stata eseguita anche con un approccio *multi locus* e la struttura filogenetica del genere è stata quasi del tutto confermata. Inoltre, con questa tecnica è stato possibile differenziare al meglio le specie affini [50].

Ceppi di bifidobatteri con proprietà probiotiche appartengono alle specie *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis* e *B. longum*. Inoltre, nell'ambito delle specie, le caratteristiche probiotiche sono ceppo-specifiche.

Problemi tassonomici nel genere *Bifidobacterium*, riguardanti le specie *B. longum*

e *B. infantis*, sono stati recentemente risolti tramite tecniche molecolari che hanno permesso la caratterizzazione delle specie *B. longum* con tre biotipi: *infantis*, *longum* e *suis* [51].

Tuttavia Young *et al.* (2004) [52] hanno avuto interessanti risultati riguardo l'interazione di *B. infantis* e *B. longum* con cellule dendritiche: colture ATCC / DSMZ di due specie presentano diverse interazioni con tali cellule e quindi dovrebbero essere considerate specie distinte. Un altro tema dibattuto è il rapporto tra *B. animalis* e *B. lactis*; quest'ultimo è stato recentemente riclassificato come *B. animalis* subsp. *lactis* [54].

Infine, è stata proposta una differenziazione tra *B. indicum*, *B. coryneforme* e *B. asteroides*, per cui *B. indicum* e *B. asteroides* possono essere chiaramente differenziati, al contrario di *B. indicum* e *B. coryneforme* [45]. Uno studio di Temmerman *et al.* (2003) [51] ha confermato, tramite Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE), l'alta correlazione tra le tre specie. Successivamente, l'analisi di sequenza *multi locus*, effettuata da Ventura *et al.* (2006) [50], ha confermato la loro stretta connessione, ma ha anche permesso una chiara differenziazione tra le tre specie.

Il giornale che pubblica ufficialmente articoli tassonomici riguardanti la descrizione di nuove specie e nuovi generi microbici, è l'*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (IJSEM). Le modifiche effettuate dopo la sua pubblicazione vengono pubblicate all'interno di *Issues* supplementari del IJSEM. La nomenclatura batterica aggiornata può essere comunque consultata *on-line* sul sito <http://www.dsmz.de/bactnom/bactname.htm> o sul sito <http://www.bacterio.cict.fr> [55, 56].

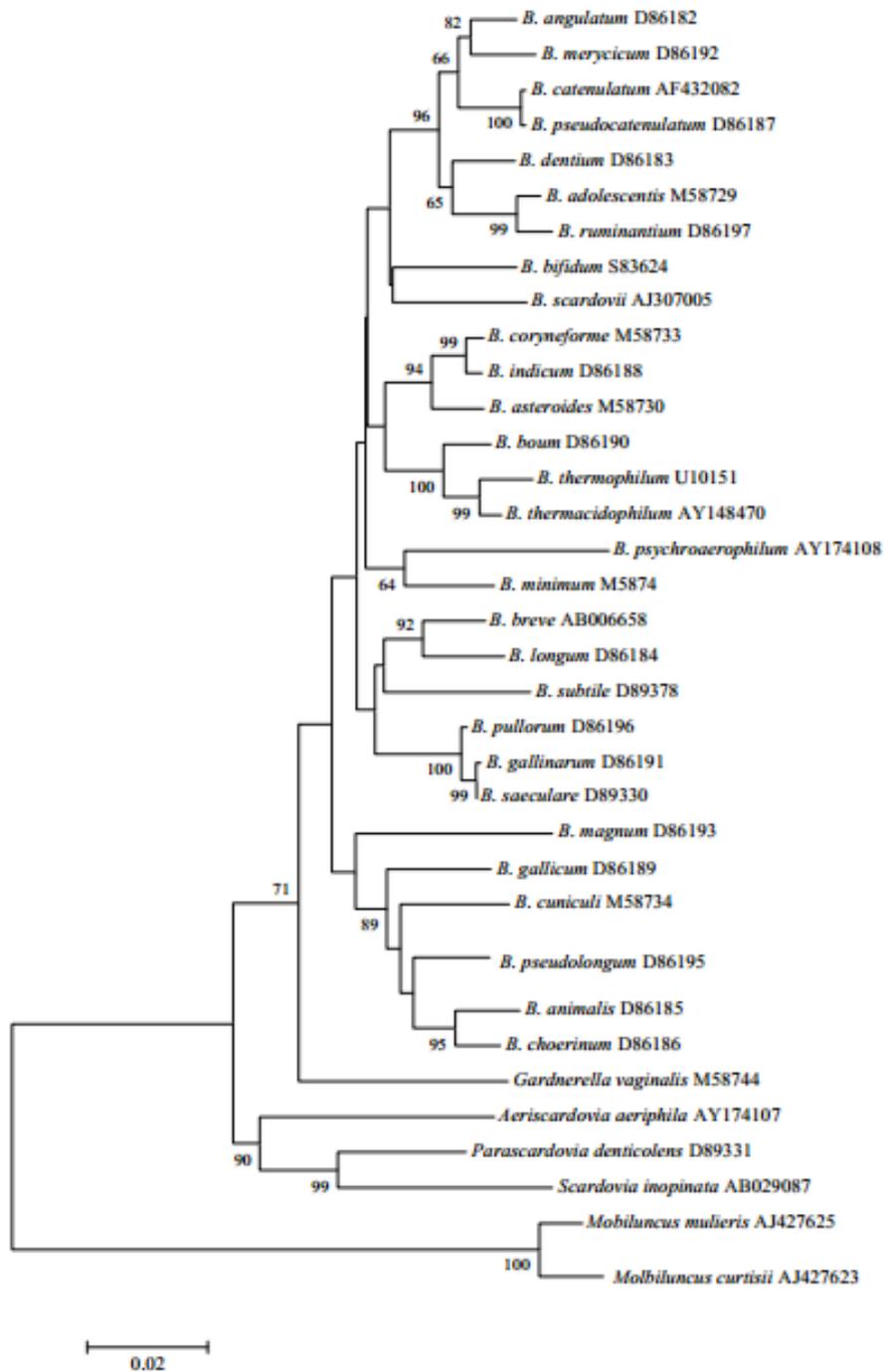


Figura 6 Albero filogenetico basato sull'analisi della sequenza del gene della 16S rRNA che mostra la relazione tra le specie della famiglia delle *Bifidobacteriaceae*. La barra mostra il numero delle sostituzioni nucleotidiche per sito [32].

3.4 Ecologia

I bifidobatteri sono presenti in numerose nicchie ecologiche, in particolare nell'intestino e nella cavità orale dell'uomo e nell'intestino di animali (ovini, caprini, bovini, suini, roditori, conigli, pollame e insetti) (**Figura 7**) [50, 57].

Bifidobacterium bifidum e *Bifidobacterium longum* sono le specie più rappresentative del tratto intestinale di neonati e adulti [58, 59]. Invece, *Bifidobacterium denticolens*, *B. inopinatum* e *B. dentium* sono tipicamente presenti nelle carie dentarie e nell'ipocloridria gastrica [60, 61]. *Bifidobacterium adolescentis*, *B. bifidum*, *B. longum* e *B. breve* si trovano in ambiente vaginale [62]. Inoltre, i bifidobatteri sono stati isolati dall'apparato digerente di diversi vertebrati. Alcune specie sembrano essere specifiche per l'ospite. *Bifidobacterium magnum*, *B. suis* e *B. pullorum* sono stati isolati prevalentemente da feci di coniglio, suino e pollo rispettivamente [63-65]. *Bifidobacterium asteroides*, *B. indicum* e *B. coryneforme* sono le uniche specie isolate dall'intestino delle api [66].

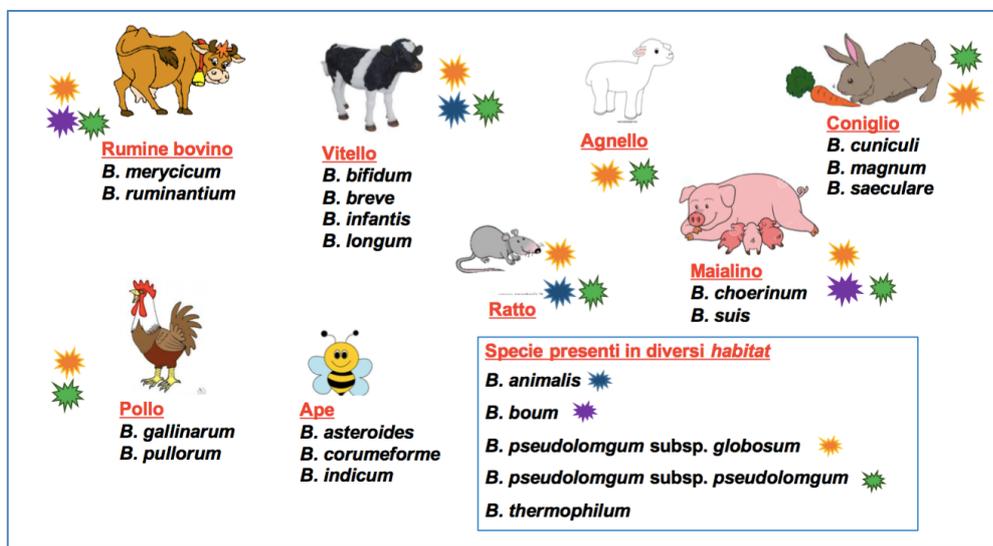


Figura 7 Specie di *Bifidobacterium* spp. presenti nell'animale. Modificata da [57].

La presenza dei bifidobatteri in altre nicchie, quali liquami (*B. minimum* e *B. subtile*) e alimenti, può essere associata all'ambiente intestinale animale/umano [67].

Ricerche sull'ecologia di bifidobatteri associata a feci di animali ha confermato un'ampia distribuzione di bifidobatteri nell'intestino di una grande varietà di animali (uccelli, ungulati e roditori) [68]. Studi hanno dimostrato che alcune specie come *Bifidobacterium animalis*, *B. adolescentis*, *B. dentium* e *B. catenulatum* possono essere presenti in diverse nicchie ecologiche, altre specie sembrano mostrare un adattamento ecologico altamente specializzato per un intestino animale in particolare (*B. cuniculi* nel coniglio, *B. angulatum* nelle mucche e *B. gallinarum* nei polli) [69].

Non è ancora chiaro come possa essersi geneticamente determinata questa differente specializzazione ecologica. Analisi comparative e funzionali dei dati genomici dei bifidobatteri potranno fornire informazioni più precise.

3.5 Colonizzazione intestinale nell'uomo e meccanismi di adesività

I generi *Bifidobacterium* e *Collinsella* costituiscono i due membri principali della classe *Actinobacteria* che colonizzano l'intestino umano [70]. Diversi studi hanno dimostrato che i bifidobatteri possono essere presenti in concentrazioni superiori a 10^{10} cellule per grammo di feci e sono molto abbondanti nei neonati e nei bambini rispetto agli adulti e agli anziani [71]. Un recente studio di Milani *et al.* (2015) [72], ha dimostrato mediante studi di genomica e trascrittomica, che i bifidobatteri rappresentano uno dei gruppi microbici dominanti, particolarmente diffuso durante il periodo di allattamento, di esseri umani e altri mammiferi, per la loro spiccata capacità di competere con altri batteri intestinali. Tale capacità è stata attribuita alle loro caratteristiche saccarolitiche, che permettono l'accessibilità metabolica alla dieta e/o ai glicani derivati dall'ospite. Questa evoluzione nel genoma dei bifidobatteri rappresenta un potente esempio di forza evolutiva di questi microorganismi.

Inoltre, gli attuali studi metagenomici supportano l'ipotesi che i bifidobatteri costituiscono una delle principali popolazioni batteriche in soggetti sani. La loro somministrazione è stata associata a effetti benefici sulla salute, come la prevenzione della diarrea e la normalizzazione delle disfunzioni intestinali. Pertanto, alcuni ceppi di *Bifidobacterium* spp. sono stati classificati come probiotici [70].

Per produrre i loro effetti, i bifidobatteri devono persistere per un certo periodo di tempo nell'intestino [73]. Un fattore importante per la colonizzazione intestinale è la capacità dei ceppi di interagire con l'ospite e quindi di aderire alla mucosa intestinale; per cui l'adesione alla mucosa è frequentemente utilizzata come principale criterio per la selezione di ceppi probiotici [74]. Sebbene il ruolo dell'adesività nella funzione probiotica è ancora controverso, alcuni studi sostengono un rapporto tra adesione *in vitro*, adesione alla mucosa intestinale e colonizzazione *in vivo*. La capacità di adesione dei ceppi sembra anche essere importante per l'immunomodulazione e per l'esclusione competitiva di microorganismi patogeni [18, 74, 75]. La regione esterna della mucosa intestinale è costituita da uno strato di muco, che ricopre le cellule epiteliali, ricco di glicoproteine e glicolipidi che rappresentano diversi *target* per l'adesione batterica (es. porzioni di carboidrati) [76]. Alcuni ceppi di *Bifidobacterium* spp. hanno in comune con ceppi enteropatogeni specifici siti glucidici di legame e forniscono un chiaro razionale per l'utilizzo di questi ceppi come probiotici, in grado di prevenire le infezioni batteriche intestinali attraverso un meccanismo competitivo. Il muco intestinale umano e/o linee cellulari epiteliali intestinali umane sono pertanto modelli comunemente usati per valutare l'adesione batterica. Numerosi studi hanno dimostrato l'abilità di alcuni ceppi di bifidobatteri di escludere competitivamente enteropatogeni dalle cellule e dal muco intestinale umano [74].

I meccanismi di adesione batterica alla mucosa gastrointestinale sono complessi e coinvolgono sia fenomeni aspecifici, come forze elettrostatiche e interazioni idrofobiche, che specifici fenomeni legati alla presenza di adesine batteriche e recettori mucosali. In tal modo, fattori quali le proprietà della parete cellulare e la presenza di adesine, costituiscono il principale fattore determinante della capacità

del singolo ceppo di aderire alla mucosa. L'adesione dei bifidobatteri alla mucosa intestinale umana è un processo complesso in cui giocano un ruolo fondamentale molecole di diversa natura tra cui: proteine, lipidi e carboidrati. Tuttavia, alcuni studi dimostrano che le componenti proteiche sono maggiormente coinvolte nell'adesione dei bifidobatteri [32, 74, 77]. Inoltre, è stato anche dimostrato che le condizioni fisiologiche intestinali quali pH, sali biliari, enzimi digestivi, influenzano l'adesione alle cellule epiteliali [78]. È stato dimostrato che le proteine extracellulari svolgono un ruolo centrale nei meccanismi di adesione; esse comprendono sia proteine legate alla superficie cellulare che rilasciate nell'ambiente. Ad alcune di queste proteine è stata attribuita la capacità di interagire direttamente con l'epitelio e le cellule immunitarie, da cui potrebbero dipendere gli effetti benefici esercitati dai batteri probiotici nei confronti della salute umana. Questi effetti includono: antagonismo competitivo con gli agenti patogeni, aumento della barriera mucosale e immunomodulazione [18, 74]. Alcuni studi recenti hanno chiarito il meccanismo d'azione dei recettori a livello molecolare [18, 74, 79].

Tra le proteine extracellulari, associate alla superficie cellulare batterica, vi sono le adesine, alcune delle quali possono essere rilasciate nel mezzo extracellulare. Le adesine possono essere classificate in due gruppi: adesine con un peptide segnale all'interno della loro sequenza amminoacidica, sintetizzate nel citoplasma e dirette verso organismi di trasporto proteico, e adesine che non possiedono la sequenza segnale e sono trasportate, nella maggior parte dei casi, da meccanismi non ancora chiariti.

Tra le adesine dei bifidobatteri contenenti un peptide segnale, la *BopA* è la più espressa. Essa è stata la prima adesina scoperta nei bifidobatteri, è una lipoproteina, con omologia di sequenza di molte peptidasi, implicata nei meccanismi di adesione di *Bifidobacterium bifidum* alle cellule Caco-2 [80]. Inoltre, ceppi *Bifidobacterium bifidum* e *B. longum* che over-esprimono *BopA* mostrano una maggiore adesione alle cellule epiteliali intestinali, dimostrando un ruolo del *BopA* nell'adesione intestinale [81]. Un altro gruppo di proteine associate a specifici meccanismi di trasporto verso l'ambiente extracellulare sono proteine *pili-like* recentemente scoperte in *B. breve* [82].

L'analisi del genoma di *Bifidobacterium breve* in un modello murino ha rivelato una differente espressione del gene IVb a stretta aderenza (Tad) codificante il cluster genico per un *pilus* essenziale per una efficiente colonizzazione intestinale. Nonostante lo specifico legame di *B. breve* agli enterociti o al muco intestinale, le proteine Tad non sono state ancora caratterizzate. È stato suggerito un possibile ruolo di queste nel favorire l'adesione all'epitelio intestinale [82]. Il gene *Tad* è conservato nel genoma di diverse specie di bifidobatteri, il che indica un ruolo chiave delle proteine di adesione Tad. Ulteriori studi potrebbero chiarire come i bifidobatteri colonizzano e persistono, in maniera transitoria, nel tratto gastrointestinale dell'uomo.

Un secondo gruppo di adesine è stato riscontrato sulla superficie batterica, apparentemente privo di sequenze segnale e domini di legame. Questo gruppo include proteine glicolitiche ribosomiali altamente conservate, alcune delle quali, esposte sulla superficie, svolgono altre funzioni. Per questa ragione, esse sono denominate proteine *moonlight* e sono coinvolte nei processi di adesione e legame alle componenti mucosali [83, 84]. Le proteine *moonlight* hanno mostrato funzioni di adesione, inclusa la capacità di legame al muco e affinità per differenti matrici correlate alla cellula ospite (esempio plasminogeno e fibronectina), incluse DnaK, glutammina sintetasi, enolasi, idrolasi dei sali biliari e fosfoglicerato mutasi in *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, e transaldolasi in *B. bifidum* [83, 85-87]. Gli esopolissaccaridi (EPS) sono polisaccaridi presenti sulla superficie di molti microrganismi tra cui i bifidobatteri. Il ruolo degli EPS nell'adesione alla mucosa intestinale o nella colonizzazione dell'intestino è stato dimostrato usando modelli *in vitro* e *in vivo* [88].

4. Gli esopolisaccaridi batterici

I batteri sono presenti in molti ecosistemi terrestri, dagli ambienti più estremi al corpo umano. L'intestino umano è uno degli ecosistemi più densamente popolati, tra quelli descritti fino ad ora [89]. Questi microorganismi devono far fronte a una grande varietà di condizioni ambientali avverse e la maggior parte di essi sono ricoperti da un involucro cellulare che agisce anche da barriera fisica in grado di migliorare la loro sopravvivenza [90]. Dal punto di vista strutturale, gli esopolisaccaridi (EPS) batterici sono polimeri di carboidrati che, in alcuni casi, possono formare uno strato altamente idrato attorno alle cellule e possono essere legati a differenti componenti strutturali della cellula.

I carboidrati sono di norma naturalmente organizzati come sostanze organiche polioidrossiliche rappresentate chimicamente dalla formula $(\text{CH}_2\text{O})_n$. Gli zuccheri negli alimenti possono essere presenti come monosaccaridi a basso peso molecolare e costituiti da singole unità di zuccheri, o come zuccheri complessi (oligosaccaridi e polisaccaridi). Gli oligosaccaridi sono saccaridi complessi con un grado di polimerizzazione (DP) da 2 a 9 e un peso molecolare intermedio, in cui le unità monosaccaridiche sono legate da legami glicosidici. I polisaccaridi sono saccaridi complessi con un alto peso molecolare, contenenti un grande numero di unità monosaccaridiche (polimeri) legate attraverso legami glicosidici ($\text{DP} > 10$). La composizione chimica, il grado di polimerizzazione, il numero di legami glicosidici determinano le proprietà fisiologiche di questi biopolimeri [91].

In generale, nelle cellule batteriche, i polisaccaridi possono essere capsulari (CPS), cioè strettamente associati alla superficie cellulare mediante legami covalenti, oppure esopolisaccaridi mucosi (*slimy*, EPS), che sono debolmente legati alla superficie cellulare. Questi ultimi possono anche essere rilasciati nell'ambiente circostante [92, 93].

Gli oligosaccaridi bioattivi sono uno speciale gruppo di carboidrati classificati come "ingredienti alimentari non digeribili". Questi composti, sono anche utilizzati come prebiotici, soprattutto i fruttoligosaccaridi (FOS) e i galatto-oligosaccaridi (GOS), che resistono all'idrolisi da parte degli enzimi salivari ed enzimi digestivi intestinali di uomini e alcuni animali. Per questa ragione, non essendo assorbiti né

metabolizzati a livello del tratto digestivo, possono raggiungere inalterati il colon, dove vengono rapidamente fermentati da un grande numero di batteri intestinali. Successivamente, questi processi portano alla produzione di acidi grassi a catena corta (SCFA), soprattutto acido acetico, ma anche acido propionico e butirrico, che sono necessari per il rinnovamento del rivestimento cellulare del grande intestino [91].

Gli EPS batterici, quindi, non sono usati come fonti di energia da parte del microorganismo produttore che, invece, investe gran parte della sua energia nella loro biosintesi [90]. Gli EPS hanno inoltre, per il ceppo produttore, una funzione protettiva dalle condizioni ambientali, ad esempio contro l'essiccazione, la fagocitosi e la predazione da parte di protozoi, l'attacco da parte di fagi, antibiotici o composti tossici e dallo stress osmotico. L'aggiunta di una limitata quantità di oligosaccaridi bioattivi ai generi alimentari può rappresentare un fattore inibente per la crescita di batteri patogeni e avere un effetto positivo sulla digestione, l'assorbimento dei nutrienti e la sintesi di vitamine indispensabili per il metabolismo (ad es. acido folico) [91].

Inoltre, gli EPS hanno un ruolo importante nel riconoscimento cellulare, nell'adesione alle superfici e nella formazione di biofilm, facilitando la colonizzazione di vari ecosistemi [94, 95].

Molti dei ceppi appartenenti alle specie *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp., spesso utilizzati in formulazioni o integratori alimentari, sono produttori di EPS.

La prima descrizione della formazione degli EPS da parte dei batteri acidi lattici (LAB) risale a Pasteur, il quale ipotizzò che il deterioramento del vino veniva causato da attività microbiche [96]. Orla-Jensen *et al.* (1943) [97], descrivendo la capacità dei LAB di formare polisaccaridi dal saccarosio, indicarono il ruolo dei polisaccaridi nel deterioramento degli alimenti.

I batteri lattici produttori di EPS giocano un ruolo rilevante nel settore lattiero-caseario grazie al loro contributo al miglioramento della consistenza e delle proprietà reologiche dei prodotti fermentati. I polimeri esopolisaccaridici possono essere prodotti *in situ* dai LAB-starter generalmente riconosciuti come sicuri (General Recognised As Safe status, GRAS) e vengono, quindi, considerati bio-

addensanti naturali.

L'efficienza viscosizzante degli EPS è dovuta alle loro specifiche caratteristiche chimico-fisiche. Pertanto, la conoscenza del rapporto struttura-funzione di questi biopolimeri è fondamentale al fine di progettare e scegliere una loro specifica applicazione tecnologica. Inoltre, ad alcuni EPS prodotti da batteri lattici e bifidobatteri sono state riconosciute attività benefiche per la salute, in particolare attività antitumorale e immunomodulatoria [80, 98-101]. La funzionalità ecologica degli EPS prodotti dai LAB è alquanto complessa e non è chiaramente definita, ma sembra essere correlata all'adesione e alla protezione cellulare in differenti ambienti (**Figura 8**) [99].

La crescita del mercato degli alimenti funzionali e degli integratori alimentari, contenenti bifidobatteri e batteri lattici come componente probiotica, ha aumentato l'interesse per il potenziale effetto benefico degli EPS sulla salute umana, anche se gli studi condotti in questo senso sono ancora poco numerosi e limitati in termini di esperimenti *in vitro*.

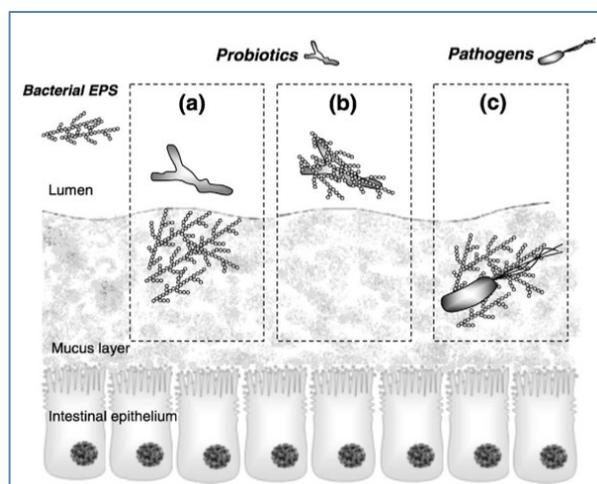


Figura 8 Ruolo degli EPS nell'adesione cellulare [99]

Spiegazione probabile del ruolo degli EPS nell'adesione cellulare di probiotici e agenti patogeni a muco intestinale. Diminuzione dell'adesione del probiotico: (a) l'EPS potrebbe aderire direttamente al muco e quindi inibire competitivamente l'adesione di probiotici o (b) potrebbe aderire alla superficie del probiotico e quindi mascherare i siti batterici di adesione. Aumento dell'adesione del patogeno: (c) i componenti della superficie del patogeno potrebbero legare specifici EPS in grado di aderire al muco [99].

4.1 Composizione chimica e biosintesi di omopolisaccaridi

Gli esopolisaccaridi (EPS) prodotti da bifidobatteri e batteri lattici possono essere classificati in base alla composizione chimica e al meccanismo di biosintesi in omopolisaccaridi (HoPS) ed eteropolisaccaridi (HePS). Il meccanismo della sintesi EPS nei bifidobatteri non è ancora chiaro, anche se in questi ultimi anni diversi studi hanno fornito maggiori informazioni, mediante la caratterizzazione di geni coinvolti nella sintesi EPS in alcune specie batteriche [102-104]. Dal punto di vista fenotipico, i ceppi di bifidobatteri e batteri lattici produttori di EPS possono essere distinti in mucoidi, che hanno un aspetto luccicante e viscido su piastre di agar, ma non sono in grado di produrre fili quando vengono estesi con un'ansa da inoculo e *ropy* in grado di formare, invece, un filamento lungo con questo metodo (**Figura 9**) [105].

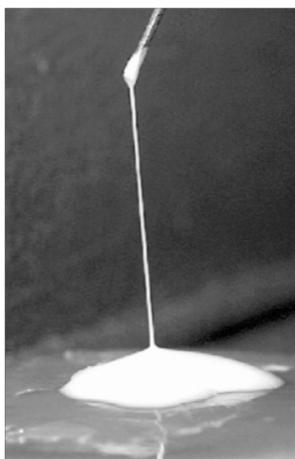


Figura 9 Aspetto macroscopico di un filamento *ropy*, formato dalla massa cellulare di un ceppo LAB commerciale produttore di EPS cresciuto sulla superficie di piastre contenenti de Man, Rogosa & Sharpe (MRS) agar [106].

In generale, i componenti più frequentemente presenti sono: pentosi (ribosio e arabinosio), esosi (glucosio, mannosio, galattosio, fruttosio), deossizuccheri (fucosio e ramnosio), acidi uronici (acido glucuronico e galatturonico), aminozuccheri (glucosamine, galattosamine ed *N*-acetilati) [93].

La sintesi di HoPS richiede la presenza di saccarosio che è il substrato maggiormente usato dall'enzima glucansucrasi (GS). La glucansucrasi è un enzima specifico per la sintesi di HoPS che catalizza il trasferimento della corrispondente porzione glicosidica al polimero in formazione e comprendere quattro domini: un peptide segnale con un dominio extracellulare; una porzione *N*-terminale variabile; un dominio catalitico altamente conservato; un dominio *C*-terminale di legame.

In base all'accettore molecolare e all'uso dello zucchero come substrato, l'enzima glucansucrasi può catalizzare diversi tipi di reazioni: polimerizzazione di α - glucani e β -fruttani; idrolisi del saccarosio; glicosilazione o fruttosilazione [107].

Gli HoPS hanno un alto peso molecolare, ma alcuni valori riportati in letteratura risultano essere sovrastimati per la presenza di aggregati nelle soluzioni acquose. Le differenze ceppo-specifiche dipendono dal grado di ramificazione e dai diversi tipi di legame [108].

La **Tabella 2** mostra alcuni tipi di HoPS prodotti da diverse specie di batteri lattici. La produzione di omopolisaccaridi richiede, quindi, la presenza di un substrato specifico, come il saccarosio, e l'assemblaggio delle unità monosaccaridiche ha luogo all'esterno della cellula batterica [109, 110]. Questi biopolimeri sono prodotti in grandi quantità solo da alcune specie. Il ceppo di *L. reuteri* (*L. reuteri* 121 LB), ad esempio, è in grado di produrre quasi 10 g/L di due diversi tipi di HoPS costituiti principalmente da D-glucosio e D-fruttosio [110, 111].

Tabella 2 Omopolisaccaridi prodotti da batteri lattici [110]

EPS	Strain	Linkage ^a
α -D-glucans		
Dextran	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	α -D-Glcp ^d (1→6)
	subsp. <i>mesenteroides</i>	
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	
	subsp. <i>dextranicum</i>	
Mutan	<i>Streptococcus mutans</i>	α -D-Glcp ^d (1→3)
	<i>Streptococcus sobrinus</i>	
Alteran	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	α -D-Glcp (1→3)/(1→6)
β -D-glucans	<i>Pediococcus</i> spp.	β -D-Glcp (1→3)
	<i>Streptococcus</i> spp.	
Fructans		
Levans	<i>Streptococcus salivarius</i>	β -D-Frup (2→6)
Inuline-like	<i>Streptococcus mutans</i>	β -D-Frup (2→1)
Polygalactan	<i>L. lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> H414	α -D-Galp/ β -D-Galp ^e

Note: ^aGlc: glucosio; Gal galattosio; Fru: fruttosio^d. Agli ultimi 50% dei rispettivi linkage^c. L'omopolisaccaride contiene un'unità pentamerica ripetuta di glucosio

Determinanti genici responsabili della sintesi di HoPS

I ceppi produttori di HoPS maggiormente studiati si trovano spesso nelle specie dei lattobacilli associate a ecosistemi gastrointestinali quali *L. acidophilus*, *L. animalis*, *L. crispatus*, *L. johnsonii*, *L. mucosae*, *L. panis*, *L. pontis* e *L. reuteri* [112-115]. Inoltre, è stata osservata la formazione di glucano o fruttano nelle specie *L. sanfranciscensis*, *L. sakei*, *L. parabuchneri* e *L. curvatus* [113, 114].

Uno dei primi studi effettuati, per verificare l'ipotesi che la formazione di HoPS potrebbe essere un tratto metabolico comunemente presente nei lattobacilli intestinali, ha investigato la presenza di geni codificanti per glicosiltransferasi su

tutti gli isolati del genere *Lactobacillus* spp. (42 ceppi) di un campione intestinale ottenuto da feci di anatre e di suini. Durante la crescita su terreno de Man Rogosa & Sharpe (MRS) addizionato con saccarosio (MRS-S), più del 25% degli isolati producevano HoPS e oligosaccaridi dal saccarosio, e geni codificanti glicosiltransferasi sono stati rilevati nella maggior parte dei ceppi produttori di HoPS. Ticking *et al.* (2005) [115] hanno esaminato, per una seconda proiezione, 30 dei 42 ceppi utilizzando un *set* di *primer* in grado di rilevare geni codificanti le glicosiltransferasi, correntemente descritti nel genere *Lactobacillus* spp.. Tutti i ceppi detenevano almeno un gene codificante una glicosiltransferasi, indipendentemente dalla loro capacità di produrre HoPS durante la crescita nel terreno MRS-S. Nel *L. reuteri* in particolare, la presenza di numerose glicosiltransferasi in un unico ceppo è frequente e questo evidenzia la diversità metabolica di questa specie. Da tutti i ceppi di *L. reuteri*, un frammento di DNA di dimensione appropriata è stato amplificato con *primer* marcati.

Nello studio effettuato, i *primer* utilizzati per ottenere, tramite PCR il gene glicosiltrasferasi, sono stati **Inu2F/Inu3R**, CTATAATTCTACCGCGGTTTC, GTATAACTCTGCCACCTTAG, **GlcV/GlcR**, CAGAGCTAATGCCTGTTAAGG, CTTSCGTGGTTGACCACTTG, **FtfV/FtfR**, GAATGGCTATCAACTTCTG, CTTCTACTACTTGCGGGTTC, **LevV/LevR**, CAGCYGCTACTCAAGC, CTGAAGCAAAGTCCTVG.

Circa il 50% dei ceppi ha mostrato un gene correlato a glicosiltrasferasi (*gtf-A*) codificante il reuteransaccarosio di *L. reuteri* 121, e ciascun ceppo ha mostrato geni relativi a *ftfA* e geni *lev* dei ceppi di *L. reuteri*.

Questi dati indicano che i lattobacilli intestinali possono potenzialmente produrre HoPS, ma la maggior parte dei ceppi non manifestano questa attività metabolica durante la crescita nei terreni di laboratorio. Una transposasi e una sequenza di inserzione (IS) sono stati trovati accanto ai geni che codificano per la sintesi dell'enzima levansucrasasi rispettivamente di *L. reuteri* 121 e *L. sanfranciscensis* TMW1392 [115-117]. Questi elementi genetici mobili potrebbero spiegare la rapida perdita di espressione di glicosiltransferasi osservata in *L. reuteri* 121 dopo diverse generazioni di crescita nel terreno MRS [111]. Inoltre, studi condotti sulla

regolazione della glicosiltransferasi, hanno indicato che, in condizioni standard, i fattori di stress chimici e fisici possono indurre la sua espressione nei ceppi di *L. reuteri* con fenotipo HoPS-negativo [117].

4.2 Composizione chimica e biosintesi di eteropolisaccaridi

Gli HePS sono polimeri costituiti da unità ripetute di monosaccaridi, i più frequenti sono D-glucosio, D-galattosio, L-ramnosio ed anche monosaccaridi *N*-acetilati come: *N*-acetil glucosamina (GlcNAc) ed *N*-acetil galattosamina (GalNAc), acido glucuronico (GlcA), fucosio, mannosio e/o monosaccaridi sostituiti (fosfato e glicerolo-fosfato). La sintesi degli eteropolisaccaridi differisce da quella degli omopolisaccaridi perché il precursore delle unità ripetute è formato a livello intracellulare e, nel processo, sono coinvolti i lipidi trasportati da glicosil-isoprenoide [109]. Le unità ripetute sono traslocate in tutta la membrana e successivamente polimerizzate a livello extracellulare. La quantità di EPS prodotto varia considerevolmente, in relazione alla specie e al ceppo, e può essere influenzata dal metodo impiegato per l'isolamento. La massa molare degli eteropolisaccaridi varia, a seconda del ceppo produttore, da $4,0 \times 10^4$ a $6,0 \times 10^5$ Da.

Determinanti genici responsabili della sintesi di HePS

È stato dimostrato, per alcune specie di batteri lattici, che i geni coinvolti nella sintesi EPS sono situati in *cluster* genico con un'organizzazione strutturale-funzionale altamente conservata. Questi geni possono essere suddivisi in quattro gruppi: (1) geni regolatori; (2) proteine coinvolte nella polimerizzazione e nella determinazione della lunghezza della catena; (3) glicosiltransferasi; (4) geni coinvolti nel trasporto e polimerizzazione. Per quanto riguarda i bifidobatteri, sono ancora pochi gli studi sulla organizzazione genica responsabile della sintesi di esopolisaccaridi. Recentemente, Hidalgo-Cantabrana *et al.* (2015) [118] hanno

dimostrato, sulla base di studi di omologia, che i geni coinvolti nella sintesi di EPS, in alcuni ceppi di *Bifidobacterium* spp., presentano funzioni simili nonostante l'organizzazione all'interno dei *cluster* sia sostanzialmente diversa. Uno di questi geni codifica per una specifica glicosiltransferasi (GTF) che trasferisce uno zucchero-1-fosfato ad una molecola lipofilica vettore che è ancorata alla membrana batterica. Questo è il primo passo della sintesi EPS. L'eliminazione, o inattivazione, del gene codificante per la sintesi di questa specifica GTF, riduce drasticamente la sintesi di EPS. Per i bifidobatteri, i geni *priming*-GTF sono annotati nelle banche dati genomiche come “undecaprenyl-phosphate sugar phospho-transferase” (*rfbP*) o “galactosyl-transferase” (*cpsD*). Sia *rfbP* e *cpsD* si trovano in sequenze altamente conservate fra le specie *Bifidobacterium* spp.. Alcuni genomi di più bifidobatteri presentano solo uno di questi geni, mentre altri ceppi entrambi [118].

4.3 Funzionalità tecnologiche

Gli EPS prodotti dai batteri lattici hanno un rilevante significato tecnologico soprattutto nella produzione di diversi prodotti lattiero-caseari fermentati. Le caratteristiche strutturali più significative dello yogurt sono: la sua compattezza e capacità di trattenere l'acqua. Queste proprietà sono relative alla struttura gelatinosa e potrebbero essere influenzate dal tipo di coltura. I batteri lattici sono utilizzati in tutto il mondo per migliorare la conservazione, le caratteristiche sensoriali e i valori nutrizionali di una vasta gamma di prodotti, come il latte, la carne e le verdure. La solidità e la coesione degli yogurt prodotti con ceppi *ropy* decrescono in funzione della presenza di una maggiore quantità di EPS [119, 120]. Gli HePS trovano quindi applicazione soprattutto in colture *starter ropy*, utilizzate per migliorare la consistenza dello yogurt e altri prodotti lattiero-caseari fermentati aventi differenti sapori, consistenza e proprietà salutari [121]. Le più importanti caratteristiche di uno *starter* sono: rapida acidificazione, conservazione microbica, formazione di sapori tipici, caratteristica consistenza e benefici per la salute. La fermentazione lattica del latte è quella più conosciuta e studiata. La fermentazione del lattosio, nel

corso della crescita batterica, provoca l'acidificazione del latte e quindi protegge contro la proliferazione di agenti patogeni e di microrganismi responsabili dell'alterazione del prodotto. Un altro effetto dell'acidificazione è la neutralizzazione delle cariche negative presenti sulle proteine del latte, con conseguente coagulazione. L'acidità, quindi, dà origine a prodotti fermentati, come yogurt e formaggi, e al loro fresco e delicato sapore acido dovuto alla conversione, ad opera dei batteri lattici, di zuccheri, acidi organici, proteine o grassi, nei componenti tipici dell'aroma e del sapore. Gli EPS prodotti da batteri lattici potrebbero interferire con l'associazione tra le micelle di caseina in un coagulo che risulta meno consistente. Studi condotti sulla microstruttura degli yogurt [122, 123], tramite micrografie confocali a scansione laser, hanno mostrato spazi vuoti intorno ai batteri produttori di EPS in grado di influenzare l'integrità della matrice proteica. Gli yogurt, realizzati con culture *ropy*, hanno evidenziato un'elevata capacità di trattenere acqua [120], che riduce la suscettibilità alla sineresi. L'uso di *starter ropy*, contenenti *S. thermophilus* e *L. delhruueckii* subsp. *bulgaricus* produttori di EPS, è una pratica ormai comune nella produzione di yogurt per migliorare la struttura, evitare la sineresi e aumentare la viscosità dello yogurt. Nei prodotti lattiero-caseari scandinavi, come i viili, sono utilizzati ceppi di specie *Lactococcus* spp. in grado di formare EPS [124].

Van Marle e Zoon (1995) [125] hanno dimostrato che colture di yogurt LL non-*ropy*, hanno prodotto quasi la stessa quantità di polimero (90 mg/L) delle colture RR *ropy* (101 mg/L). Tuttavia, è stata trovata una enorme differenza riguardo la viscosità dei due tipi di yogurt. Sulla base di misure di permeabilità e di micrografie confocali a scansione laser, è stato supposto che la struttura spaziale della rete proteica influenza l'apparente viscosità dello yogurt mescolato, anche se questo non è l'unico fattore.

Diversi studi hanno riportato che i valori di viscosità di latte fermentato con ceppi termofili di batteri lattici non sono correlati alla quantità di EPS presenti. È stato dimostrato che un ceppo di *S. thermophilus* è in grado di aumentare la produzione di EPS quando si aggiunge del peptone al latte; inoltre, è stato osservato un concomitante aumento della viscosità del prodotto. Si suppone che differenze in

termini di aumento della viscosità da parte dei vari ceppi utilizzati, siano dovute a differenze in termini di viscosità intrinseca degli EPS. Studi condotti sull'EPS prodotto da *L. lactis* subsp. *cremoris* B40 hanno dimostrato che la viscosità intrinseca, come pure la concentrazione di tutti i biopolimeri avvolti casualmente, può essere predetta dalla massa molare e dal raggio idrodinamico del polimero. Queste caratteristiche possono essere misurate con tecniche di disseminazione della luce. Il raggio (una misura della dimensione del polimero) dipende dalla massa molare (lunghezza del polimero) e dalla flessibilità della catena polimerica [126, 127]. Risultati simili sono stati ottenuti da studi sulle proprietà fisiche di soluzioni acquose di EPS prodotti da *L. lactis* subsp. *cremoris* SBT0495, che presentava nel suo EPS le stesse unità ripetitive dell'EPS prodotto da *L. lactis* subsp. *cremoris* B40 [128, 129]. Per ottenere una elevata viscosità, la massa molare dovrebbe essere elevata e la catena polisaccaridica dovrebbe essere relativamente rigida. La massa molare media degli EPS prodotti da *Lb. sake* 0-1 (6×10^6 Da) è risultata essere dello stesso ordine di grandezza di quella della *xanthan gum* (tra 14×10^6 e 9×10^6 Da), ma la sua viscosità intrinseca è risultata superiore. Anche se la relazione tra le proprietà chimiche del polisaccaride e la rigidità della catena è complessa, è possibile distinguere alcune caratteristiche generali. È noto che monosaccaridi collegati da legami $\beta(1 \rightarrow 4)$ presentano catene più rigide rispetto a quelli collegati da legami $\alpha(1 \rightarrow 4)$ o $\alpha(1 \rightarrow 3)$ [130]. Anche le ramificazioni e i gruppi laterali svolgono un ruolo importante riguardo la rigidità della catena. Tuinier *et al.* (2001) [131] hanno mostrato che la rimozione di residui galattosilici legati a livello terminale (sulle catene laterali) degli EPS prodotti da *L. lactis* subsp. *cremoris* B39 e B891, hanno portato a una diminuzione della rigidità della catena e quindi all'efficienza di addensamento. La rimozione del gruppo acetile presente nell'EPS prodotto da *L. lactis* subsp. *cremoris* B891 non ha influenzato significativamente la rigidità della catena. La presenza di cariche, come la carica negativa del gruppo fosfato degli EPS prodotti da *Lb. Sake* 0-1 e da *L. lactis* subsp. *cremoris* B40, ha generato, a seconda della forza ionica, un aumento della forza di repulsione intramolecolare della catena polimerica, portando a un aumento del volume idrodinamico e della viscosità intrinseca. Anche il particolare modello di ramificazione sulla struttura dell'EPS,

prodotto da *Lb. helveticus* K16, potrebbe spiegare l'elevata viscosità degli EPS in soluzione acquosa [132] e supportare l'effetto dei gruppi laterali sulle proprietà viscosizzanti degli EPS. Alcuni studi indicano chiaramente che sia la conoscenza delle proprietà chimico-fisiche degli EPS sia le loro interazioni con gli altri componenti dei prodotti alimentari sono cruciali per la scelta dei biopolimeri più adatti a determinate applicazioni. La sintesi di EPS funzionali può essere ottenuta con il controllo delle condizioni di coltura o attraverso l'ingegneria metabolica. Looijesteijn *et al.* (2001) [94] hanno riscontrato che il tipo di substrato utilizzato ha influenzato la massa molare di EPS prodotto da *L. lactis* subsp. *cremoris* NIZO B40 e *L. lactis* subsp. *cremoris* NIZO B591. In condizioni di limitazione del glucosio, è stata riscontrata una riduzione di massa molare, ma non è stata riscontrata alcuna variazione in termini di composizione chimica di EPS. Qualche successo è stato riportato in termini di sovra-espressione di EPS mediante approcci molecolari. Il gene *epsD*, codificante per un *primer lactococal-glucosiltransferasi* e parte dell'operone dell'EPS localizzato sul plasmide, è stato posto sotto il controllo del sistema NICE (espressione nisina-controllata). Dopo l'induzione con nisina A, la produzione di EPS da parte di un ceppo di *L. lactis* trasformato, è risultata superiore a quella dei ceppi nativi [133]. È stata altresì riportata la possibilità di produzione di strutture eterologhe o di nuove strutture EPS. Il trasferimento di un *cluster* di geni codificanti EPS prodotti da *S. thermophilus* Sfi6 in un ceppo di *L. lactis* MG1363 non produttore di EPS, ha portato alla produzione di EPS con una struttura diversa dagli EPS nativi [134]. L'*N*-acetilgalattosamina, presente nella struttura portante della *S. thermophilus* Sfi6 nativo, è stata sostituita da galattosio negli EPS ricombinanti di *L. lactis* ed è risultato assente anche il galattosio in posizione 6 del gruppo della ramificazione laterale del residuo glucosidico. Anche se questi risultati offrono buone prospettive per una incrementata produzione di EPS e il loro potenziale utilizzo come addensanti, la maggior parte dei batteri lattici non sono risultati idonei a una valida produzione di EPS, a causa dei bassi livelli prodotti. Questi batteri sembrerebbero più appropriati come *starter* funzionali.

4.4 Funzionalità fisiologiche

Effetti fisiologici positivi sulla salute umana di prodotti lattiero-caseari fermentati e di integratori alimentari contenenti ceppi probiotici, produttori di EPS, appartenenti al genere *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp., potrebbero essere attribuiti alle attività biologiche di questi biopolimeri. Gli EPS, sia HoPS che HePS, potrebbero contribuire alla salute umana come prebiotici o per la loro attività antitumorale, antiossidante, antiulcera, immunomodulante, antinfiammatoria, anti-ipertensiva, antivirale o per la capacità di abbassare il colesterolo [110, 135].

“Un prebiotico è un componente alimentare non vitale che conferisce un beneficio alla salute dell’ospite correlato alla modulazione del microbiota” [136]. Per poter essere classificato come prebiotico un EPS deve:

1. non essere né idrolizzato né assorbito nella porzione superiore del tratto gastrointestinale;
2. essere un substrato selettivo per un numero limitato di batteri commensali benefici del colon, stimolati a crescere e/o attivati metabolicamente;
3. essere in grado di influenzare positivamente il microbiota intestinale;
4. indurre effetti luminali o sistemici utili alla salute dell’organismo ospitante.

I carboidrati non digeribili in generale, e in particolare i fruttoligosaccaridi (ad esempio, inulina) sono i prebiotici più comuni. Gli EPS suscettibili di digestione potrebbero costituire un’importante caratteristica per un possibile ruolo prebiotico, ma pochi studi sono stati condotti su questa possibilità.

Per quanto riguarda la possibile attività antitumorale, alcuni studi hanno trovato che l’iniezione intraperitoneale di cellule liofilizzate della *L. lactis* subsp. *cremoris* KVS20, nei topi ha portato alla inibizione della crescita di forme tumorali di Sarcoma-180, ma il ceppo non ha mostrato citotossicità in studi *in vitro* contro le cellule tumorali S-180. Questo suggerisce che l’efficacia di questo ceppo nella prevenzione della proliferazione tumorale è mediata attraverso l’attività immunitaria. È stato ipotizzato che i biopolimeri prodotti da *L. lactis* subsp. *cremoris* KVS20 possano essere la componente principale dell’effetto antitumorale di questo ceppo. Uno studio successivo [137] ha registrato un aumento significativo dell’attività mitogenica dipendente dalle cellule B indotta dai materiali limosi

prodotti da *L. lactis* subsp. *cremoris* KVS20. Inoltre, è stato dimostrato che gli EPS prodotti da *L. lactis* subsp. *cremoris* SBT0495 somministrati per via intraperitoneale, nei topi, migliorano la produzione di anticorpi specifici, indicando che questi EPS possono agire come adiuvanti. È stato riportato che, lo *starter* per yogurt, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL1073R-1, produttore di un EPS, è in grado di esercitare un'attività antitumorale mediata dall'ospite [110]. L'EPS isolato è stato frazionato in due componenti: un polisaccaride neutro e un polisaccaride acido (APS). È stato trovato che la frazione APS-1073 era un fosfopolisaccaride con attività mitogenica efficace principalmente per linfociti B murini e che il gruppo fosfato ha dimostrato di agire come un *trigger* di induzione mitogenica di questo EPS [110].

Per quanto riguarda l'attività immunomodulante, studi condotti su EPS prodotti da *L. lactis* subsp. *cremoris* KVS20 ed *L. helveticus* WT-2B hanno dimostrato che la somministrazione orale, nei ratti, di questi biopolimeri aumenta il numero di IgA nel piccolo intestino.

Un valore leggermente più alto di IL-10⁻; IL-6 e di cellule IL-12 positive è stato rilevato rispetto al gruppo controllo; invece, i valori di INF- γ^+ e TNF- α^+ sono risultati invariati. Questi effetti sul sistema immunitario, sono stati maggiormente rilevanti a livello del grande intestino. Nei fluidi intestinali, invece, solo le citochine IL-4 e IL-12 risultano incrementate. Inoltre, il *pattern* delle citochine nel siero sanguigno è simile a quello trovato nel piccolo intestino; questo indica che le citochine prodotte sono rilasciate nel sangue [110]. Lo studio ha confermato anche l'importanza del siero come strumento per lo studio della immunomodulazione attraverso gli antigeni somministrati oralmente in modelli animali. I polisaccaridi extracellulari prodotti dai batteri lattici hanno dimostrato di migliorare altre funzioni immunologiche come la proliferazione dei linfociti T, l'attivazione dei macrofagi e l'induzione della produzione di citochine. Gli effetti sul sistema immunitario dell'EPS idrosolubile (KGF-C), ricavato da grani di kefir, hanno mostrato la capacità di ritardare lo sviluppo del tumore quando somministrato per via orale. Questi effetti sembrano essere dovuti ad una attività sulle cellule T e sembrano non coinvolgere le cellule B [138]. Tuttavia, sono necessarie ulteriori

ricerche su questo tema, come premessa per l'impiego degli EPS negli alimenti funzionali [110].

4.5 L'esopolisaccaride di *Bifidobacterium* spp.

Il rinnovato interesse per lo studio della sintesi di EPS nei bifidobatteri è dovuto al ruolo che tali biopolimeri potrebbero avere sulla salute umana. Alcuni studi *in vitro* hanno suggerito che specifici EPS possono svolgere un ruolo chiave in tal senso. Tuttavia, vale la pena sottolineare la chiara necessità di ulteriori ricerche su questo argomento, per la dimostrazione *in vivo* di tali attività.

Studi recenti sono stati focalizzati sulla capacità di questi biopolimeri, prodotti da batteri lattici, di modulare la risposta immunitaria [139]. Questa è anche una caratteristica comune che si trova in alcuni EPS prodotti da bifidobatteri, ma solo pochi studi hanno trattato questo tema di ricerca. Utilizzando un approccio *in vitro*, López *et al.* (2012) [140] hanno analizzato l'attività immunitaria di EPS purificati da 13 ceppi appartenenti a tre specie di *Bifidobacterium* (*B. animalis* subsp. *lactis*, *B. longum*, e *B. pseudocatenulatum*) e hanno dimostrato che la capacità *in vitro* degli EPS di indurre la differenziazione delle cellule T rispetto a Th1 o Th2 è fortemente dipendente dal tipo di biopolimero, ed in particolare che i biopolimeri ad alto peso molecolare, prodotti da un ceppo di *B. animalis* subsp. *lactis*, non sono molto efficaci nell'indurre una risposta immunitaria. Fanning *et al.* (2012) [141] hanno riportato risultati simili per il ceppo *B. breve* UCC2003. Wu *et al.* (2010) [142] hanno dimostrato per un EPS prodotto dal ceppo *B. longum* BCRC 1464 attività antimicrobica contro diversi agenti patogeni intestinali. Hidalgo-Cantabrana *et al.* 2014 [143] hanno dimostrato che alcuni EPS sono in grado di contrastare l'effetto citotossico di tossine batteriche (da *Bacillus cereus* e *Streptococcus pyogenes*), valutato *in vitro* su cellule Caco-2 e su eritrociti da coniglio [144]. In entrambi i casi l'EPS potrebbe agire come uno scudo protettivo sulla superficie delle cellule eucariotiche, ostacolando l'accesso del patogeno, o il legame delle tossine batteriche a specifici recettori di membrana.

Per lo studio delle possibili attività degli EPS prodotti da ceppi di *Bifidobacterium* spp., e quindi della loro applicabilità in campo tecnologico e/o biologico, è necessario conoscere la loro composizione chimica ma soprattutto la genetica del ceppo produttore.

II SCOPO DELLO STUDIO

Lo scopo della ricerca, durante il triennio del Dottorato in Scienze Microbiologiche e Biochimiche - XXVIII Ciclo, è stato quello di studiare alcune caratteristiche microbiologiche di ceppi di *Bifidobacterium* spp. isolati da feci umane e animali o presenti in prodotti probiotici, e quello di investigare alcune proprietà chimico-fisiche e la presenza di determinanti genetici per un esopolisaccaride prodotto da un ceppo di *Bifidobacterium longum*, coinvolto nei meccanismi di adesione.

Le fasi di studio e di ricerca, nel corso del triennio, sono state le seguenti:

1. Isolamento e tipizzazione fenotipica, mediante metodiche microbiologiche standardizzate e analisi del profilo metabolico ottenuto attraverso reazioni biochimiche.
2. Caratterizzazione di alcune proprietà probiotiche, quali resistenza alle condizioni gastrointestinali, sensibilità agli antibiotici e capacità di adesione dei ceppi di nuovo isolamento da feci umane e animali.
3. Studio delle capacità di adesione mediante microscopia ottica ad immersione di ceppi probiotici di *Bifidobacterium* spp..
4. Analisi delle caratteristiche di adesione mediante osservazione al microscopio elettronico a scansione di un ceppo di *Bifidobacterium longum* W11 e del suo esopolisaccaride (EPS), coinvolto nell'adesione.
5. Studio delle caratteristiche chimico-fisiche e caratterizzazione del *cluster* genico responsabile della sintesi dell'EPS prodotto dal ceppo *Bifidobacterium longum* W11.
6. Studi preliminari di alcune attività biologiche dell'EPS prodotto dal ceppo *Bifidobacterium longum* W11.

III MATERIALI E METODI

5. Isolamento di bifidobatteri da campioni fecali umani e animali

5.1 Campionamento

Ceppi da feci umane

Per l'isolamento dei bifidobatteri venivano selezionati 15 campioni di feci umane raccolti da soggetti che non avevano ricevuto recenti terapie antibiotiche né assunto integratori alimentari a base di *Bifidobacterium* spp. Per lo studio sono stati esaminati 5 campioni di feci da adulti volontari di età compresa tra 25 e 60 anni e 10 campioni di feci da neonati, allattati al seno, di età compresa tra 1 e 9 mesi, per i quali era stato ottenuto il consenso dei genitori.

Ceppi da animali di allevamento

Per l'isolamento di bifidobatteri sono stati esaminati 24 campioni di feci di ovini e caprini provenienti da allevamenti siciliani: 20 campioni di feci di pecora e 4 di capra. I campioni venivano prelevati in appositi contenitori sterili, direttamente nelle fattorie. Per lo studio, sono stati selezionati animali sani di età inferiore ad 1 anno, vaccinati e tutti allevati a pascolo, senza uso di mangimi artificiali.

5.2 Condizioni di crescita e isolamento

Un grammo di feci è stato omogeneizzato in 10 ml di tampone fosfato salino (PBS, 100mM di Na_2HPO_4 e NaH_2PO_4 , pH 7,4, Sigma-Aldrich), in modo tale da ottenere una concentrazione di materiale fecale del 10% sul volume totale. I campioni fecali omogeneizzati venivano diluiti in un mezzo riducente contenente Brain Heart

Infusion brodo (**BHI**, Oxoid Italia) addizionato con glucosio (0,5%, Sigma Aldrich, Italia), estratto di lievito (0,5%, Oxoid Italia), cisteina-HCl (0,25%, Sigma Aldrich, Italia), vitamina K1 (10 mg/L, Sigma Aldrich, Italia) e emina (0,02 g/L, Sigma Aldrich, Italia) [145]. Dopo opportune diluizioni seriali in tampone PBS, 100 µl di sospensione batterica erano seminati in piastre di Bifidobacterium Selective medium (**BSM**, Sigma Aldrich) agar, terreno che inibisce la crescita di ceppi di *Lactobacillus* spp. e *Streptococcus* spp.. In questo terreno le colonie di *Bifidobacterium* spp. appaiono di colore viola/marrone (**Figura 10**) [40]. Inoltre, per la crescita dei bifidobatteri veniva usato il terreno de Man Rogosa & Sharpe agar (**MRS**, Sigma Aldrich, Italia) addizionato con 0,25% di cisteina-HCl (Sigma Aldrich, Italia) (**MRS-C**). Quindi le piastre venivano incubate a 37°C, per 48-72 h, in condizioni di anaerobiosi. L'anaerobiosi era creata, in apposite giare, mediante una bustina di AnaeroGen (Oxoid, Italia) che porta, entro 30 minuti, il livello di ossigeno ad una concentrazione inferiore all'1% (concentrazione di CO₂ compresa tra 9% e 13%).

Dopo l'incubazione, per ciascun campione, le colonie che presentavano caratteristiche morfologiche compatibili con quelle delle colonie di *Bifidobacterium* spp., venivano sottoposte ad un esame microscopico a fresco e alla colorazione di Gram. Per lo studio, erano prese in considerazione le colonie positive alla colorazione di Gram e che mostravano morfologia bacillare, uniforme oppure ramificata, a forma di Y o V o a clava.

Le colonie ottenute in coltura pura sono state conservate a -80°C in MRSc brodo e glicerolo (Sigma Aldrich, Italia) al 20% (v/v) fino ad ulteriore analisi [145].



Figura 10 Colonie di *Bifidobacterium* spp. su BSM agar come indicate dal fornitore.

6. Caratterizzazione dei ceppi isolati

6.1 Caratterizzazione fenotipica mediante analisi del profilo metabolico

Una prima identificazione di genere, dei ceppi isolati da campioni fecali umani e animali, veniva effettuata in base all'attività biochimica, utilizzando il kit API rapid ID 32 A (Biomérieux, Italia), che fornisce informazioni sull'attività metabolica dei carboidrati. L'API rapid ID 32 A è un sistema standardizzato, basato su 29 test biochimici, che consente lo studio del metabolismo dei carboidrati da parte dei microrganismi (**Figura 11**).

Per il saggio, i batteri mantenuti a -80°C venivano ripristinati in de Man Rogosa & Sharpe brodo (**MRS**, Sigma Aldrich, Italia) addizionato con 0,25% di cisteina-HCl (Sigma Aldrich, Italia) (**MRS-C**) e, quindi, seminati su MRS-C agar e incubati a 37°C in condizioni di anaerobiosi. L'anaerobiosi era creata, in apposite giare, mediante una bustina di AnaeroGen (Oxoid, Italia) che porta, entro 30 minuti, il livello di ossigeno ad una concentrazione inferiore all'1% (concentrazione di CO_2 compresa tra 9% e 13%).

I ceppi coltivati su MRS-C, venivano inoculati in apposite fiale di Suspension Medium (Biomérieux, Italia) e aggiunti ai substrati della galleria API rapid ID 32 A, che veniva, quindi, incubata a 37°C in aerobiosi.

Il profilo biochimico dei ceppi in esame era analizzato dopo 4 h di incubazione. Le reazioni ottenute venivano confrontate con quelle del genere *Bifidobacterium* spp. indicati dal fornitore e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12, *Bifidobacterium longum* ATCC15707, *Bifidobacterium bifidum* ATCC29521.



Figura 11 Galleria Api rapid ID 32A (Biomérieux, Italia)

6.2 Resistenza a pH e sali biliari

La resistenza *in vitro* a basso pH e a concentrazioni diverse di sali biliari (Oxgall, Sigma-Aldrich, Italia) dei ceppi isolati, caratterizzati in base al profilo biochimico come presunti bifidobatteri, veniva valutata mediante monitoraggio della sopravvivenza batterica come descritto da Muñoz-Quezada *et al.* (2013) [146].

Per il saggio, i ceppi mantenuti a -80°C venivano ripristinati in de Man Rogosa & Sharpe brodo (**MRS**, Sigma Aldrich, Italia), addizionato con 0,25% di cisteina-HCl (Sigma Aldrich, Italia) (**MRS-C**) e, quindi, coltivati su MRS-C agar.

Dalle colonie, venivano allestite delle brodoculture in **MRS-C** brodo. L'incubazione veniva effettuata in condizioni di anaerobiosi a 37°C per 48 h. L'anaerobiosi era creata, in apposite giare, mediante una bustina di AnaeroGen (Oxoid, Italia) che porta, entro 30 minuti, il livello di ossigeno ad una concentrazione inferiore all'1% (concentrazione di CO_2 compresa tra 9% e 13%).

Le brodoculture di una notte erano quindi sottoposte a tre lavaggi con tampone fosfato (**PBS**, Sigma Aldrich, Italia) mediante centrifugazione a 8000 rpm per 5 min. Venivano, quindi, allestite per ciascun ceppo in esame delle sospensioni batteriche, alla concentrazione di 0,5 McFarland. Novecento microlitri di una soluzione di tampone PBS, che era stata precedentemente regolata per ottenere delle soluzioni a differenti pH (pH 2,0, 2,5 e 3,0) aggiungendo acido cloridrico (HCl, Sigma-Aldrich, Italia) o integrata con 0,3; 0,5; o 0,7 (v/v) Oxgall (Sigma-Aldrich, Italia), venivano inoculati con 100 μl di sospensione batterica di ciascun ceppo in esame. Come controllo venivano utilizzati i ceppi *Bifidobacterium longum* BB536 e *Bifidobacterium bifidum* ATCC29521.

Dopo 3 h di incubazione a 37°C , in condizioni di anaerobiosi, 100 μl di ciascuna sospensione batterica, dopo una serie di diluizioni scalari, veniva seminata su piastre di MRS-C agar e incubata in anaerobiosi a 37°C per 48-72 h. Veniva, quindi, effettuata la conta delle colonie e calcolata la percentuale di batteri vitali [(CFU di batteri inoculati/CFU di batteri vitali dopo il trattamento) $\times 100$]. I valori ottenuti venivano espressi come una media dei risultati delle diverse prove effettuate. I saggi venivano eseguiti in doppio e in tre esperimenti indipendenti [41, 146, 147].

6.3 Determinazione della Minima Concentrazione Inibente

I ceppi HI1, H2, HI3, HI4, HA1, HA2, HA3, G1, G2 e S1, che presentavano un profilo metabolico compatibile con quello ottenuto del genere *Bifidobacterium* spp., venivano esaminati per la loro sensibilità agli antibiotici, mediante la determinazione della Minima Concentrazione Inibente (MIC). La determinazione della sensibilità agli antibiotici veniva effettuata con il metodo della microdiluzione in brodo utilizzando Corning CellBIND 96 well plates (Sigma Aldrich, Italia), in accordo con l'ISO 10932/IDF233 Standard [148] e le linee guida stabilite dal Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2013) [149].

Per il saggio, i batteri mantenuti a -80°C venivano ripristinati in de Man Rogosa & Sharpe brodo (**MRS**, Oxoid, Italia) addizionato con 0,25% di cisteina-HCl (Sigma Aldrich, Italia) (**MRS-C**) e, quindi, coltivati in **LSM-C** agar. Questo terreno è costituito da 90% di Isosensitest brodo (IST), 10% di MRS e 1,5% di Agar Bacteriological (Oxoid, Italia) supplementato con 0,3g/L di cisteina-HCl. Per l'inoculo, colonie dei singoli ceppi, provenienti dalle piastre incubate per 48 h, venivano sospese in 10 ml di soluzione salina (0,85%, NaCl) fino alla concentrazione di 1 McFarland (equivalente spettrofotometrico = 3×10^8 CFU/ml; $\text{OD}_{625} = 0,16 - 0,2$) [148, 150]. La sospensione batterica era quindi diluita 1:500 in LSM-C brodo. Cento microlitri della sospensione batterica di ciascun ceppo in esame venivano aggiunti in ogni pozzetto della micropiastra per ottenere una concentrazione finale di 5×10^5 CFU/ml.

Come suggerito dall'EFSA Journal (2012) [151] sono stati saggiati antibiotici appartenenti a differenti classi: ampicillina, vancomicina, gentamicina, eritromicina, clindamicina, tetraciclina e cloramfenicolo (Sigma Aldrich, Italia). Per ogni antibiotico, secondo le linee guida del CLSI (2013) [149], veniva preparata una *stock-solution*, a una concentrazione di 512 mg/L, dalla quale venivano effettuate diluizioni scalari al raddoppio in LSM-C brodo per ottenere un *range* di concentrazioni compreso tra 0,25 mg/L e 256 mg/L. Come controllo positivo venivano utilizzati 100 μl di terreno senza antibiotico. Le diluizioni scalari degli antibiotici da saggiare venivano effettuate utilizzando LSM-C brodo.

Tutte le incubazioni venivano effettuate a 37°C per 48 h in ambiente anaerobico, ottenuto utilizzando una bustina di AnaeroGen (Oxoid, Italia) che porta, entro 30 minuti, il livello di ossigeno ad una concentrazione inferiore all'1% (concentrazione di CO₂ compresa tra 9% e 13%).

Gli esperimenti venivano replicati tre volte per verificare la riproducibilità della metodologia [149]. Per l'interpretazione dei valori di MIC (sensibilità/resistenza) venivano utilizzati i valori microbiologici di cut-off suggeriti dall'EFSA Journal (2012) per *Bifidobacterium* spp. [151] e stabiliti analizzando la distribuzione delle MICs di determinati antibiotici in popolazioni batteriche appartenenti a un genere.

7. Saggi di adesività

7.1 Coltivazione *in vitro* delle cellule HT-29

Per i saggi di adesione, venivano utilizzate cellule in linea continua HT-29 (Human Colorectal Adenocarcinoma, American Type Culture Collection HTB-38™) (**Figura 12**). Le cellule HT-29 sono state scelte come modello *in vitro* per la loro capacità di differenziarsi spontaneamente in cellule intestinali polarizzate con orletto apicale a spazzola e giunzioni serrate. Per l'esperimento, erano state mantenute in terreno RPMI (Sigma Aldrich, Italia) arricchito con L-glutammina (2 mM, Sigma Aldrich, Italia), streptomycina (200 µg/ml, Sigma Aldrich, Italia), penicillina G (200 UI/ml, Sigma Aldrich, Italia) e siero bovino fetale inattivato (2%, FBS, Sigma Aldrich, Italia). Le cellule HT-29 venivano seminate in piastre a 24 pozzetti e incubate in presenza di 5% di CO₂ a 37°C per 48 h, fino alla concentrazione di 1x10⁷ cellule/ml. Per le prove di adesione, prima dell'inoculo batterico, le cellule HT-29 venivano sottoposti ad opportuni lavaggi con tampone fosfato (PBS, pH 7,4 - Sigma Aldrich, Italia) per allontanare l'antibiotico [147].

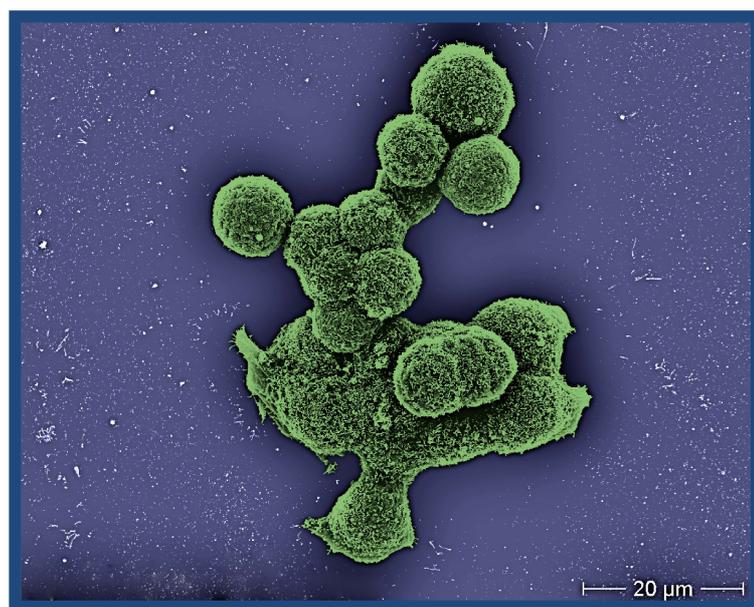


Figura 12 Cellule HT-29 al microscopio elettronico a scansione

7.2 Saggio di adesione alle cellule HT-29 dei ceppi di nuovo isolamento e dei ceppi probiotici di *Bifidobacterium* spp. mediante metodo quantitativo colturale

I ceppi di *Bifidobacterium* spp. di nuovo isolamento HI1, HI2, HI3, HI4, HA1, HA1, HA2, HA3, S1, S2, G1 e, in paragone, i ceppi probiotici *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12, *Bifidobacterium longum* BB536 e *Bifidobacterium longum* W11, venivano saggiati per la loro capacità di adesione utilizzando la metodica descritta da de los Reyes Gavillant *et al.* (2011) modificata [78].

Per il saggio venivano utilizzate le cellule HT-29, seminate in una piastra a 24 pozzetti ed incubate fino a raggiungere una concentrazione di circa 1×10^7 cellule (14 ± 1 giorni), a 37°C , in presenza di 5% di CO_2 .

Per il saggio, i batteri mantenuti a -80°C venivano ripristinati in de Man Rogosa & Sharpe brodo (**MRS**, Sigma Aldrich, Italia) addizionato con 0,25% di cisteina-HCl (Sigma Aldrich, Italia) (**MRS-C**) e, quindi, coltivati su MRS-C agar.

Ciascun ceppo in esame veniva coltivato in piastre di MRS-C agar in anaerobiosi a 37°C per 24 h. L'anaerobiosi era creata, in apposite giare, mediante una bustina di AnaeroGen (Oxoid, Italia) che porta, entro 30 minuti, il livello di ossigeno ad una concentrazione inferiore all'1% (concentrazione di CO₂ compresa tra 9% e 13%). Per l'inoculo sulle cellule HT-29, le colonie venivano sospese in DMEM privo di antibiotici fino ad una concentrazione di circa 1x10⁸, calcolata spettrofotometricamente (Spettrofotometro Bio-Rad model 680) mediante lettura della OD₆₀₀.

Un millilitro della sospensione di ciascun ceppo in esame veniva inoculato in un rapporto 10:1 (cellule batteriche : cellule eucariote) in ciascun pozzetto contenente le cellule HT-29, precedentemente lavato con tampone (PBS, Sigma Aldrich, Italia) per allontanare l'antibiotico. Le piastre erano, quindi, incubate in aerobiosi a 37°C per 2 h in un termostato Jouan.

Dopo l'incubazione, i batteri non adesi erano rimossi mediante 3 lavaggi con tampone PBS. Il monostrato di HT-29 era, quindi, trattato a temperatura ambiente con 200 µl di una soluzione allo 0.25% di tripsina-EDTA, per 15 min.

La conta dei batteri adesi veniva effettuata dopo semina su piastre di MRS-C agar ed incubazione a 37°C per 48 h in anaerobiosi.

Il saggio veniva eseguito in doppio con tre esperimenti differenti. I risultati sono espressi come percentuale di adesione, data dal rapporto tra la media dei valori di CFU/ml dei batteri adesi e la media dei valori di CFU/ml dei batteri inoculati.

$$\% \text{ Adesione} = \frac{\text{C. F. U. batteri adesi}}{\text{C. F. U. batteri inoculati}} \times 100$$

La riproducibilità media dei dati, determinata calcolando il coefficiente di variazione [(SD × 100) / media], era del 20%.

7.3 Saggio di adesione alle cellule HT-29 dei ceppi probiotici di *Bifidobacterium* spp. mediante osservazione al microscopio ottico

I ceppi probiotici *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12, *Bifidobacterium longum* BB536 e *Bifidobacterium longum* W11 già esaminati per la loro capacità di aderire alle cellule intestinali umane HT-29, venivano ulteriormente studiati mediante osservazione al microscopio ottico.

Per il saggio, le cellule HT-29 venivano seminate in piastre a 24 pozzetti, ciascuno dei quali conteneva appositi vetrini, e incubate in presenza di 5% di CO₂ a 37°C per 48 h, fino a confluenza.

Per il saggio, i batteri mantenuti a – 80°C venivano ripristinati in de Man Rogosa & Sharpe brodo (**MRS**, Sigma Aldrich, Italia) addizionato con 0,25% di cisteina-HCl (Sigma Aldrich, Italia) (**MRS-C**) e, quindi, coltivati su MRS-C agar. Ciascun ceppo probiotico veniva sospeso in MRS-C brodo e incubato per 18 h a 37°C in anaerobiosi. L'anaerobiosi era creata, in apposite giare, mediante una bustina di AnaeroGen (Oxoid, Italia) che porta, entro 30 minuti, il livello di ossigeno ad una concentrazione inferiore all'1% (concentrazione di CO₂ compresa tra 9% e 13%). Ciascuna brodocoltura era centrifugata a 8000 rpm per 10 minuti; dopo aver eliminato il surnatante, le cellule batteriche venivano lavate con tampone fosfato (**PBS**, Sigma Aldrich, Italia) e risospese in PBS (pH 7,4), fino ad una concentrazione di circa 2×10^8 , calcolata spettrofotometricamente mediante lettura della OD₆₀₀ (Spettrofotometro Bio-Rad model 680).

Un millilitro di sospensione batterica di ciascun ceppo in esame, veniva inoculato nei pozzetti della piastra contenenti le cellule HT-29, dopo opportuni lavaggi con tampone PBS, per eliminare i residui di antibiotico, e incubato a 37°C a tempi differenti (30 e 60 minuti).

La sospensione, contenente le cellule non adese, veniva aspirata e, successivamente venivano effettuati tre lavaggi con PBS.

Le cellule adese venivano, quindi, fissate utilizzando 1 ml di metanolo (95% v/v) per ciascun pozzetto (per 8 minuti a temperatura ambiente). Il metanolo era, quindi, rimosso e le cellule venivano colorate utilizzando il colorante Giemsa (Sigma

Alcrich, Italia) in soluzione con metanolo (in rapporto 30:70, v/v) per 15 min. a temperatura ambiente. Il colorante in eccesso veniva, quindi, eliminato lavando ogni pozzetto con acqua. I vetrini erano asciugati a temperatura ambiente e poi osservati al microscopio ottico ad immersione Leica DMLB (ingrandimento 100×). La conta dei batteri adesi era effettuata calcolando la media dei batteri adesi contati su 10 campi microscopici, scelti in modo random.

I risultati venivano espressi come indice di adesione (ADI), calcolato come il numero di batteri adesi in 100 cellule, secondo la metodica descritta da Guglielmetti *et al.* (2010) [152]. A seconda dei valori espressi come indice di adesione, i ceppi venivano definiti come segue in **Tabella 3**.

Tabella 3 Criteri di classificazione dei ceppi in esame secondo i valori di indice di adesione (ADI)

Valore di adesione	Classificazione	Valore di ADI
+++	Molto aderenti	1200<ADI<2500
++	Aderenti	400<ADI<1200
+	Poco aderenti	100<ADI<400
±	Molto poco aderenti	50<ADI<100

7.4 Saggio di adesione alle cellule HT-29 del ceppo *Bifidobacterium longum* W11 mediante osservazione al microscopio elettronico a scansione (SEM)

Per l'osservazione al microscopio elettronico a scansione (SEM), le cellule HT-29 venivano disposte su appositi vetrini (diametro 13 mm), in piastre a 24 pozzetti, e amplificate fino a una concentrazione di 2×10^5 cellule/ml.

Per il saggio, il ceppo *Bifidobacterium longum* W11 mantenuto a -80°C veniva

ripristinato in de Man Rogosa & Sharpe brodo (**MRS**, Sigma Aldrich, Italia) addizionato con 0,25% di cisteina-HCl (Sigma Aldrich, Italia) (**MRS-C**) e quindi coltivato su MRS-C agar.

Il ceppo *B. longum* W11 veniva inoculato in MRS-C brodo e incubato per 18 h a 37°C in anaerobiosi. L'anaerobiosi era creata, in apposite giare, mediante una bustina di AnaeroGen (Oxoid, Italia) che porta, entro 30 minuti, il livello di ossigeno ad una concentrazione inferiore all'1% (concentrazione di CO₂ compresa tra 9% e 13%).

La brodocoltura era centrifugata a 8000 rpm per 10 minuti e le cellule batteriche sedimentate venivano opportunamente lavate con tampone Sodio Cacodilato (Sigma Aldrich, Italia). Per il saggio di adesione, le cellule batteriche erano risospese in DMEM supplementato con siero e L-glutammina, senza antibiotico, fino ad ottenere una torbidità pari allo 0.5 MacFarland (carica microbica di $\sim 1 \times 10^8$ CFU/ml), calcolata spettrofotometricamente mediante lettura della OD₆₀₀ (Spettrofotometro Bio-Rad model 680).

Un millilitro di sospensione batterica del ceppo in esame veniva inoculato nei pozzetti della piastra contenenti le cellule HT-29 e incubato a 37°C a tempi diversi (30, 60, 120 minuti), dopo opportuni lavaggi del monostrato cellulare di HT-29, con DMEM privo di antibiotico. La sospensione, contenente le cellule batteriche non adese, veniva aspirata e, successivamente, venivano effettuati tre lavaggi (ca. 5 min. ciascuno) con tampone Sodio Cacodilato 0.1 M (pH 7.4), opportunamente filtrato (filtri da 0.22 µm).

Per la fissazione delle proteine i vetrini con le cellule adese venivano trattati con glutaraldeide (2 % p/v, Sigma Aldrich, Italia) in tampone Sodio Cacodilato (0.1 M, pH 7,4) per 12 h a 4°C. La glutaraldeide era poi allontanata con due lavaggi in tampone Sodio Cacodilato.

Per la fissazione dei lipidi, i vetrini con le cellule adese venivano trattate con tetrossido di osmio (OsO₄ 1 %) in tampone Sodio Cacodilato (0,1 M, pH 7,4) per 1 h a 4°C al buio, in modo da evitare le reazioni di ossidoriduzione a carico dell'osmio. L'osmio era poi allontanato con due lavaggi in tampone Sodio Cacodilato. Successivamente, veniva eseguita una disidratazione utilizzando

gradazioni crescenti di etanolo (35% v/v, 50% v/v, 75% v/v). I vetrini erano, quindi, preparati per il Critical Point Drying (CPD). Con l'aiuto di apposite pinzette, i vetrini venivano trasferiti nel cestello del CPD immerso in alcool assoluto. Le cellule erano essiccate in essiccatore Balzers CPDO30 e rivestite di oro. I vetrini venivano poi esaminati mediante microscopio a scansione elettronica (Hitachi S 4000) secondo la tecnica eseguita da Ali *et al.* (2009) [153].

8. Caratterizzazione chimico-fisica dell'esopolisaccaride prodotto dal ceppo *Bifidobacterium longum* W11

8.1 Estrazione dell'esopolisaccaride

Per l'estrazione dell'esopolisaccaride (EPS) prodotto dal ceppo di *Bifidobacterium longum* W11 era utilizzata la metodica descritta da Ruas-Madiedo *et al.* (2006) [99]. La biomassa cellulare è stata raccolta da piastre di MRS-C utilizzando 2 ml di acqua bidistillata (Biospa, Italia) e anse sterili a forma di L (Copan, Italia). Per il rilascio dell'EPS dalla superficie cellulare, alla sospensione batterica raccolta veniva aggiunto un volume di NaOH 2M e la miscela veniva mescolata per 24 h a temperatura ambiente. Le cellule sono state quindi rimosse per centrifugazione e l'EPS presente nel surnatante veniva precipitato utilizzando due volumi di etanolo assoluto per 48 h a 4°C. L'EPS era raccolto per centrifugazione, risospeso in acqua bidistillata (Biospa, Italia) e dializzato (per 3 giorni a 4°C), utilizzando tubi di dialisi un taglio molecolare compreso tra 12 e 14 kDa (Sigma Aldrich, Italia). L'acqua di dialisi veniva cambiata due volte al giorno.

8.2 Purificazione dell'esopolisaccaride

L'esopolisaccaride estratto è stato quindi purificato utilizzando tecniche chimiche. La separazione della componente proteica è stata effettuata per precipitazione in una miscela di cloroformio ed n-butanolo (CHCl_3 : n-ButOH in rapporto 4:1). Successivamente, la separazione della componente saccaridica è stata effettuata mediante una resina a scambio ionico (Dowex 500, Sigma Aldrich, Italia).

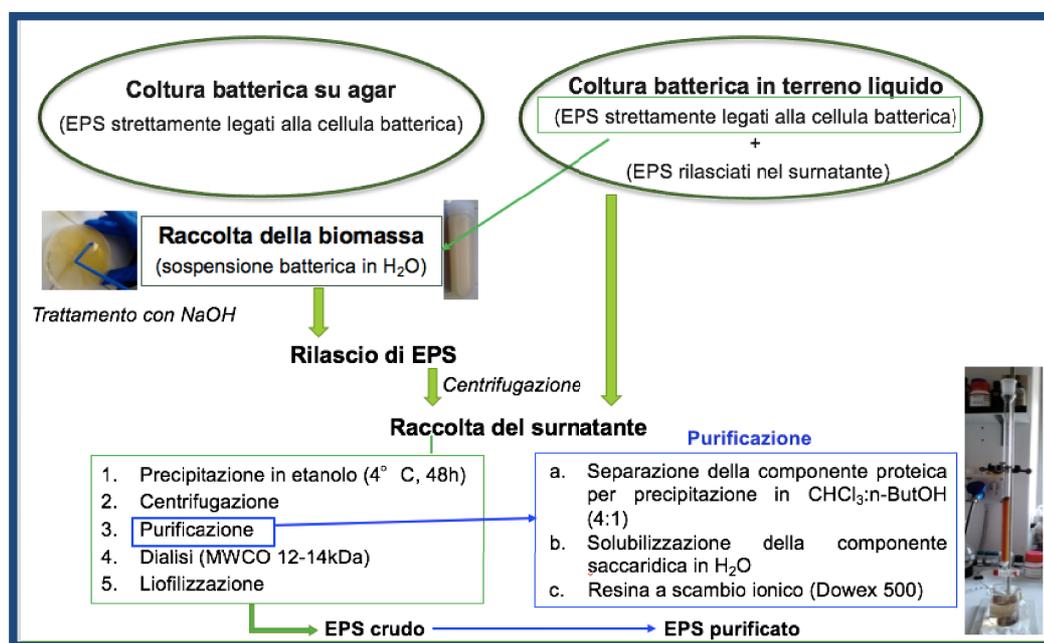


Figura 13 Schema riassuntivo delle tecniche di estrazione e purificazione dell'EPS estratto

8.3 Idrolisi dell'esopolisaccaride

L'idrolisi dell'EPS per determinare la composizione monosaccaridica del polimero in esame, era effettuata secondo la metodica descritta da Yang *et al.* (2010) [154]. L'EPS (2 mg) estratto e purificato, era idrolizzato utilizzando 1 ml di acido trifluoroacetico (TFA) 2 M per 8 h a 100°C. Successivamente, il TFA veniva evaporato sotto flusso di azoto a 60°C.

Questo saggio è stato effettuato presso l'*Istituto di Chimica Biomolecolare del Consiglio Nazionale delle Ricerche di Catania* (CNR), sotto la supervisione del Dott. Raffaele Morrone.

8.4 Analisi cromatografica mediante cromatografia su strato sottile

Una prima determinazione degli zuccheri presenti nell'esopolisaccaride prodotto dal ceppo *Bifidobacterium longum* W11, estratto, purificato e idrolizzato, era effettuata mediante cromatografia su strato sottile (Thin-Layer Chromatography, TLC) [91, 155]

Per l'analisi venivano utilizzate piastre in silice come fase stazionaria e acetato di etile-acido acetico-metanolo-acqua (60:15:15:10, v/v) come fase eluente. Il reagente cromogeno utilizzato era una soluzione di p-anisalaldeide e acido solforico (2:1, v/v) in acido acetico. Per evidenziare i monosaccaridi, la piastra veniva successivamente riscaldata a 100°C per 10 min.

Venivano utilizzate, inoltre, piastre in cellulosa, impiegando come eluente acetato di etile-piridina-acqua (40:20:30, v/v). Il reagente cromogeno utilizzato era una soluzione di acido p-anisidinptalico (0.1M) in etanolo (96%). Per evidenziare i monosaccaridi, la piastra era riscaldata a 100°C per 10 min. Gli zuccheri utilizzati come standard in entrambe le determinazioni erano: arabinosio, fruttosio, fucosio, galattosio, glucosio, mannosio e xilosio.

I monosaccaridi presenti venivano individuati in base ai valori del fattore di ritardo (R_f) calcolato come il rapporto tra la distanza dalla base della lastrina percorsa dall'analita e la distanza dalla base della lastrina percorsa dall'eluente ($R_f = d_{\text{analita}}/d_{\text{eluente}}$).

Questo saggio è stato effettuato presso l'*Istituto di Chimica Biomolecolare del Consiglio Nazionale delle Ricerche di Catania* (CNR), sotto la supervisione del Dott. Raffaele Morrone.

8.5 Analisi cromatografica mediante cromatografia liquida ad alta prestazione

Una analisi più accurata dei monomeri presenti nell'esopolisaccaride (EPS), estratto, purificato e idrolizzato, era effettuata mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (High Performance Liquid Chromatography, HPLC).

Per l'analisi venivano iniettati 20 μ l di una soluzione di EPS (0,1mg/mL), e una colonna polimerica, Prevail Carbohydrate ES di 5 mm di diametro (250 x 4,6 mm) costituita da particelle di forma sferica del diametro di (5 μ m) [156]. Come fase mobile veniva utilizzata una soluzione di acetonitrile-acqua (70:30, v/v) ad un flusso di 0.8 ml/min. Durante l'analisi, la composizione della fase mobile era mantenuta costante (eluizione isocratica).

Come *detector* veniva utilizzato un rivelatore universale, *Evaporative Light Scattering Detector* (ELSD, **Figura 14**), che permette di rivelare qualunque sostanza, presente nel campione in esame, che sia poco volatile o comunque meno volatile della fase mobile impiegata. La combinazione di una colonna ES e un *detector* ELSD permetteva di ridurre i tempi di esecuzione delle analisi, aumentava l'efficienza termica e migliorava la sensibilità del rivelatore.

Questo saggio è stato effettuato presso l'**Istituto di Chimica Biomolecolare del Consiglio Nazionale delle Ricerche di Catania** (CNR), sotto la supervisione del Dott. Raffaele Morrone.

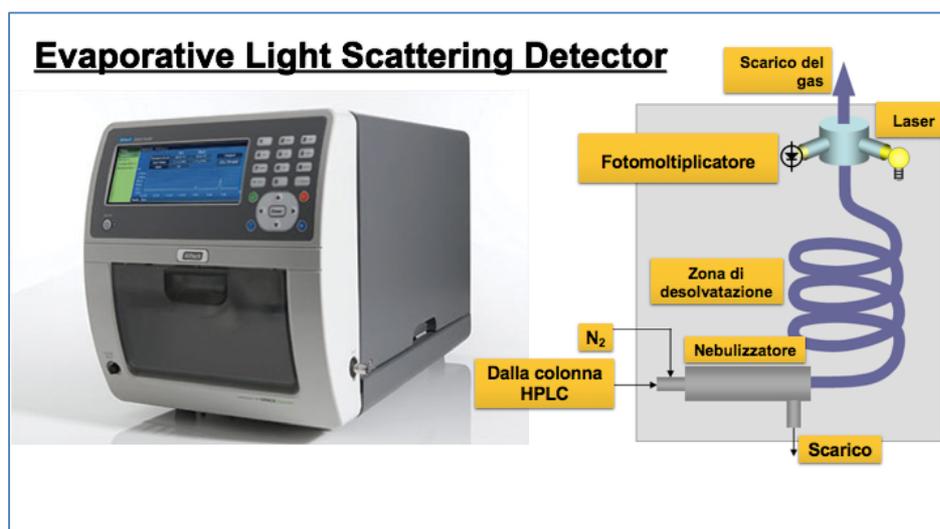


Figura 14 Detector ELSD e schema di funzionamento

9. Caratterizzazione molecolare dei determinanti genetici responsabili della produzione dell'esopolisaccaride nel ceppo *Bifidobacterium longum* W11

9.1 Condizioni di crescita del ceppo *Bifidobacterium longum* W11

Per la ricerca dei determinanti genetici responsabili della sintesi dell'esopolisaccaride nel ceppo *Bifidobacterium longum* W11, il ceppo era coltivato in de Man Rogosa & Sharpe (**MRS**, Sigma Aldrich, Italia) addizionato con 0,25% di cisteina-HCl (Sigma Aldrich, Italia) (**MRS-C**) a 37°C, per 48 h in condizioni anaerobiche (80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂) in una camera MG500 (Don Whitley Scientific, Shipley, UK). Come controllo positivo era utilizzato il ceppo *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* DSM10140, della collezione di bifidobatteri del Laboratorio di Microbiologia dell'Istituto dei Prodotti Lattiero-caseari delle Asturie (IPLA, Asturias, Spagna).

Per il saggio, i batteri mantenuti a -80°C venivano ripristinati in MRS-C brodo e, quindi, coltivati su MRS-C agar. Dopo 48 h di incubazione una singola colonia era inoculata in 10 ml di MRS-C brodo e incubata in condizioni anaerobiche (80% N_2 , 10% CO_2 , 10% H_2) a 37°C per una notte. Per l'estrazione del DNA, 1 ml della brodocoltura era inoculato in 10 ml di MRS-C brodo (1:10), per 18 h in condizioni ottimali [118].

9.2 Isolamento e purificazione del DNA

Le cellule batteriche, raccolte da 1,5 ml di brodocoltura mediante centrifugazione ($6000 \times g$ per 10 min.), venivano lavate una volta con tampone fosfato salino (AMRESCO, Solon, OH, USA) e centrifugate ($6000 \times g$ per 10 min.). Il DNA cromosomiale delle cellule batteriche veniva isolato utilizzando il kit 'GenElute batterica DNA genomico' (Sigma-Aldrich). Per i bifidobatteri, veniva utilizzato il metodo suggerito dal manuale del kit, modificato per il primo *step* aggiungendo lisozima (10 mg/ml, Merck, Darmstadt, Germania) e mutanolisina (5 U, Sigma-Aldrich) e incubando il campione a 37°C per 1 h. Il DNA estratto era visualizzato mediante corsa elettroforetica su gel (1%) e la concentrazione del DNA veniva misurata in Gen5™ Teck3 Module (BioTek, Winooski, VT, USA) [118].

9.3 Amplificazione mediante PCR

Per l'amplificazione mediante *Polymerase Chain Reaction* (PCR) erano scelte 4 coppie di *degenerate primers* in grado di amplificare per ciascuno due possibili *priming-glycosyltransferase (p-gtf) genes*, annotati come “galactosyl-transferase” (*cpsD*) e “undecaprenyl-phosphate sugar phosphotransferase” (*rfbP*) (**Tabella 4**) [118]. In un volume di 25 μl , la miscela di reazione conteneva 2 μl di DNA estratto dal ceppo in esame, 0,2 μM di ciascun primer, 200 μM dNTP (Amersham

Bioscience, Uppsala, Svezia), e 2,5 U Taq DNA-polimerasi (Eppendorf, Amburgo, Germania).

Le reazioni di PCR venivano effettuate in duplicato in un termociclatore UnoCycler (VWR International Eurolab SL, Barcelona, Spagna). Il programma di amplificazione utilizzato era il seguente: incubazione iniziale a 95°C per 5 minuti, 35 cicli di amplificazione di uno step di denaturazione a 95°C per 1 min, *annealing* a 56°C per 60 s per le coppie di *primers cpsD_F1/cpsD_R2* e *cpsD_F4/cpsD_R4*, 50°C per 60 s per la coppia di primers *rfbP_F3/rfbP_R4* e 60°C per 60 s per la coppia di primers *rfbP_F5/rfbP_R5*. Il programma di amplificazione prevedeva, inoltre, uno step di allungamento passo di 68°C per 1-1,3 min, e uno step di allungamento finale di 68°C per 10 min. Gli amplificati venivano conservati a 4°C e visualizzati sotto UV dopo elettroforesi in gel agarosio (1-1,5%) e colorazione con bromuro di etidio [118]. Gli amplificati venivano inviati, insieme alle coppie di *primers* utilizzate per la PCR, a Macrogen (Seoul, Repubblica di Corea) per la purificazione e sequenziamento di ogni filamento di DNA. Come controllo positivo era utilizzato il ceppo *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* DSM10140; nel controllo negativo il DNA batterico era sostituito con acqua distillata sterile.

Tabella 4 Degenerate primers utilizzati per amplificare mediante PCR i possibili geni *priming*-GTF [118].

Primer	Sequenza (5'→3')	Sito target (5'→3')*
<i>cpsD_F1</i>	GGCRTKTAYCAYCGBCATGT	271-290
<i>cpsD_R2</i>	KCGGRTCRBCTTSAKCTTG	1216-1197
<i>cpsD_F4</i>	YGGCAAGTCGTTYWAKATS	1092-1110
<i>cpsD_R4</i>	CRGTRATRCCRGGCTTVAC	1393-1375
<i>rfbP_F3</i>	CTSAAGGTGWTKCCRYTSAA	871-890
<i>rfbP_R4</i>	CCGGAMAYCTGCCAHGGWCC	1589-1570
<i>rfbP_F5</i>	ATGTAYAARTTCCGYTCCATG	1285-1305
<i>rfbP_R5</i>	AGAATGRCRAWRTCSCCHG	1676-1658

*La posizione di ciascun *primer* (5'→3') indicata è basata sulla sequenza nucleotidica di *cpsD* e *rfbP* dal ceppo di *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* NCC2705 [118].

9.4 Analisi bioinformatica del genoma di *B. longum* W11 per il cluster genico responsabile della produzione di ESP

Per individuare nel genoma di *Bifidobacterium longum* W11 il cluster genico responsabile della produzione di EPS, la sequenza dell'intero genoma del ceppo era confrontata con quella del ceppo *Bifidobacterium longum* NCC2705 di cui era noto il cluster genico responsabile della produzione di EPS. L'analisi bioinformatica dei dati veniva effettuata utilizzando il software Chromas 1.45 (Technelysium Pty Ltd., South Brisbane, Australia). I dati venivano, quindi, confrontati con quelli presenti nel database GenBank utilizzando BLAST_N [118].

Questo studio è stato effettuato durante uno *stage* presso il Laboratorio di Microbiologia dell'*Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA)*, Department of Microbiology and Biochemistry of Dairy Products, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IPLA-CSIC), Asturias, Spain, sotto la supervisione della Dott.ssa Patricia Ruas-Madiedo.

10. Attività biologiche dell'esopolisaccaride prodotto dal ceppo *Bifidobacterium longum* W11

10.1 Attività citotossica sulle linee cellulari umane HF1 e Caco-2

La possibile attività citotossica dell'EPS, estratto e purificato, veniva saggiata *in vitro* su cellule umane sane, fibroblasti gengivali HF1 (American Type Culture Collection HF1, Manassas, VA) e cellule intestinali tumorali Caco-2 da adenocarcinoma del colon retto (American Type Culture Collection HTB-37™). La citotossicità era valutata utilizzando il saggio con MTT (bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio) [157, 158]. Questo saggio colorimetrico standard permette la misurazione dell'attività dell'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi, presente solamente nelle cellule vitali, che riducono l'MTT a formazano, conferendo alla sostanza un colore blu/violaceo. L'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi ha la funzione di tagliare l'anello tetrazolico dell'MTT (colore giallo) con la formazione di formazano (sale di colore blu formazano) (Figura 15).

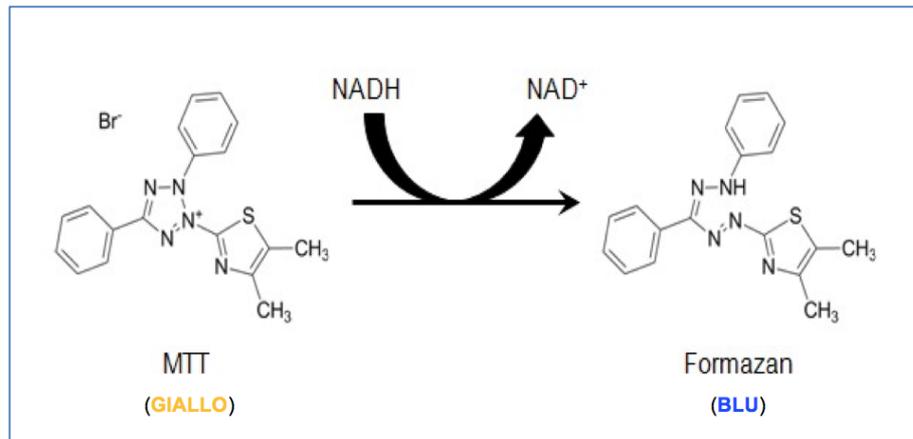


Figura 15 Reazione di riduzione da MTT a formazano ad opera della succinato deidrogenasi mitocondriale

Le cellule HF1 venivano sospese in terreno Dulbecco (GIBCO BRL, Life Technologies) integrato con 10% di siero fetale bovino inattivato, 1 mM sodio piruvato, L-glutamina (2 mM, Sigma Aldrich, Italia), streptomicina (50 µg/ml, Sigma Aldrich, Italia) e penicillina (50 U/ml, Sigma Aldrich, Italia), e in presenza di 5% di CO₂.

Le cellule Caco-2 erano mantenute in terreno EMEM (Eagle's minimal essential medium, Sigma Aldrich, Italia) arricchito con L-glutamina (2 mM, Sigma Aldrich, Italia), streptomicina (200 µg/ml, Sigma Aldrich, Italia), penicillina G (200 UI/ml, Sigma Aldrich, Italia) e 10% di siero bovino fetale inattivato (FBS, Sigma Aldrich, Italia).

Per l'esperimento, le cellule HF1 e/o Caco-2 venivano piastrate in piastre a 96 pozzetti alla densità di 3x10³ cellule/pozzetto, e incubate in presenza di 5% di CO₂ a 37 °C. Dopo incubazione a 37°C per 24 h, le cellule HF1 venivano trattate con differenti concentrazioni di EPS (500, 1000 e 2000 µg/mL) e incubate per 12 e 24 h. Le cellule Caco-2, invece, venivano trattate con differenti concentrazioni di EPS (62,5, 125, 250, 500, 1000 µg/mL) e incubate per 72 h. I tempi di trattamento e le concentrazioni erano scelti in base all'analisi di dati bibliografici, considerando le differenze tra le due linee cellulari.

Come controllo negativo venivano utilizzate cellule senza trattamento.

Il surnatante era quindi sostituito con 100 μ l di EMEM fresco in cui era stato disciolto l'MTT (0,5 mg/ml). Dopo 2 h di incubazione, per lo sviluppo della reazione colorimetrica, venivano aggiunti 100 μ l di una soluzione di isopropanolo acido (50 ml di isopropanolo + 167 μ l di HCl concentrato), la piastra veniva quindi agitata fino a completa dissoluzione dei sali di formazano. Tale reazione avviene solo ad opera delle cellule vitali ed è proporzionale al numero di cellule presenti nel pozzetto. La lettura spettrofotometrica della densità ottica di ogni pozzetto della piastra veniva effettuata alle lunghezze d'onda di 550 nm (OD_{550}) e di 630 nm (OD_{630}). Quindi l'assorbanza (A) di ciascun pozzetto era calcolata come la differenza tra OD_{550} e OD_{630} . Sono state eseguite tre prove differenti, ciascuna in quadruplicato.

I risultati erano espressi come percentuale di inibizione, calcolata come rapporto tra la media dell'assorbanza (A_t) \pm coefficiente di variazione (CV) dei pozzetti contenenti le cellule Caco-2, trattate con EPS, e la media dell'assorbanza (A_b) \pm CV dei pozzetti contenenti il controllo negativo, non trattato per 100.

$$\% \text{ di Inibizione} = \frac{A_t \pm CV}{A_b \pm CV} \times 100$$

L'analisi statistica dei dati era effettuata mediante T-test.

10.2 Attività immunomodulante

L'eventuale attività immunomodulante dell'EPS estratto e purificato, veniva verificata *in vitro* valutando i suoi effetti sulla produzione di citochine da parte delle cellule mononucleate isolate da sangue periferico (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC) di donatori sani [159-161].

Il sangue veniva diluito con un uguale volume di tampone fosfato Dulbecco (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, DPBS - Sigma Aldrich, Italia) e 6 ml della sospensione così preparata erano aggiunti, accuratamente, su 3 ml di Ficoll

(Histopaque-1077, Sigma Aldrich, Italia). Il gradiente di sedimentazione era ottenuto per centrifugazione ($500 \times g$, 30 min). L'anello contenente i PBMC veniva prelevato delicatamente con una pipetta Pasteur sterile (**Figura 16**).

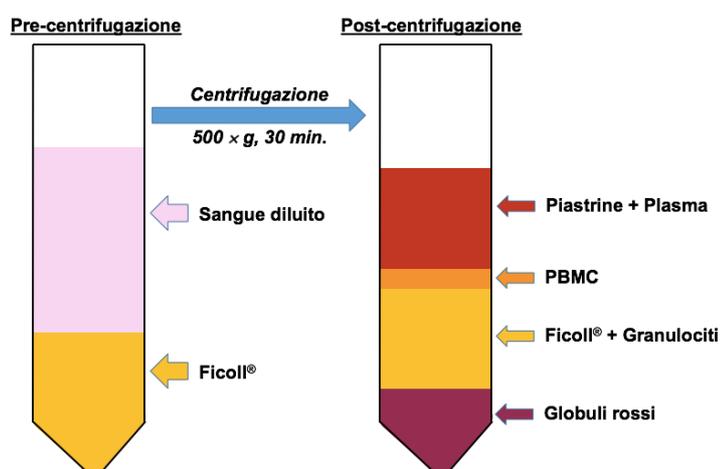


Figura 16 Isolamento dei PBMC dal sangue umano periferico utilizzando Ficoll (Histopaque-1077, Sigma Aldrich, Italia)

I PBMC isolati venivano lavati con PBS (Sigma Aldrich, Italia), contati in una camera di Burker e risospesi in RPMI-1640 (Sigma Aldrich, Italia), supplementato con L-glutamina (2 mM, Sigma Aldrich, Italia), penicillina (100 U/ml, Sigma Aldrich, Italia), streptomina (100 $\mu\text{g/ml}$, Sigma Aldrich, Italia), e integrato con 10% di siero fetale bovino inattivato (FBS), ad una concentrazione di circa 2×10^6 cellule/mL.

I PBMC così ottenuti venivano piastrati, ad una concentrazione di ~ 500 $\mu\text{l/pozzetto}$, in piastre a 24-pozzetti (Nunclon Surface).

Due differenti concentrazioni di EPS (100 $\mu\text{g/mL}$ e 200 $\mu\text{g/mL}$) venivano aggiunte ai PBMC sia in presenza che in assenza di concanavina A (ConA, 4 $\mu\text{g/ml}$), per valutare rispettivamente le proprietà immunomodulanti dell'EPS sugli effetti indotti dalla ConA o le sue eventuali capacità intrinseche di interferire con il sistema

immunitario. Come controllo positivo era utilizzata la ConA da sola e come controllo negativo il terreno da solo. Ogni singolo trattamento è stato fatto in duplicato. Dopo 48 ore di incubazione a 37°C in atmosfera di CO₂ al 5% i surnatanti sono stati raccolti, e conservati a -80°C fino al dosaggio delle citochine. Per il presente studio venivano analizzate citochine sia pro-infiammatorie (IFN γ , IL-1 β e IL-6) che anti-infiammatorie (IL-10). Le concentrazioni delle citochine nei surnatanti erano determinate mediante metodica immunoenzimatica a sandwich utilizzando il protocollo del fornitore del kit ELISA (eBiosciences, Prodotti Gianni, Italia).

La lettura della piastra è stata effettuata mediante lo spettrofotometro a 450 nm (Sirio S).

L'analisi statistica dei dati è stata effettuata mediante T-test.

IV RISULTATI

11. Isolamento di bifidobatteri da campioni fecali umani e animali

La **Tabella 5** mostra i ceppi selezionati dai campioni esaminati mediante tecniche colturali e osservazione al microscopio.

Le colonie selezionate su BSM agar erano di forma convessa, a margini definiti, di diametro di circa 2-4 mm e di consistenza cremosa (**Figura 17**). L'aspetto della crescita in brodo era mucoso e filamentoso.

La colorazione di Gram, permetteva di osservare al microscopio ottico, per i ceppi selezionati, bacilli Gram positivi di dimensioni variabili, alcuni dei quali curvi, altri con le tipiche biforcazioni a forma di Y. Inoltre, nella porzione centrale della cellula batterica, si riscontrava, talvolta, anche la presenza di granuli.

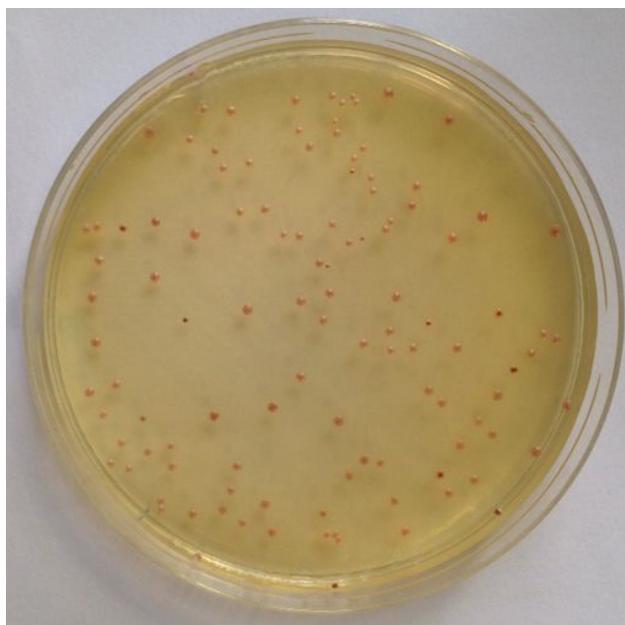


Figura 17 Esempio di colonie cresciute su BSM agar come possibili *Bifidobacterium* spp.

Tabella 5 Ceppi selezionati in coltura pura come possibili *Bifidobacterium* spp.

Umani	Numero campioni fecali esaminati	Numero di ceppi selezionati
Neonati	10	10
Adulti	5	4

Specie animale	Numero campioni fecali esaminati	Numero di ceppi selezionati
Pecora	20	14
Capra	4	4

12. Caratterizzazione dei ceppi isolati

12.1 Caratterizzazione fenotipica mediante analisi del profilo metabolico

In **Tabella 6** sono riportati i risultati delle reazioni metaboliche per i ceppi (n. 10) che mostravano un profilo biochimico compatibile con quelle previsto per il genere *Bifidobacterium* e quindi possibili bifidobatteri.

Questi ceppi mostravano reazioni negative alla ureasi, arginina deidrolasi, β -glucuronidasi, acido glutammico decarbossilasi e riduzione dei nitrati. Inoltre, i ceppi HI4, HA3, S2 e G1 presentavano reazione negativa anche per β -glucosidasi; i ceppi HI1, S1 e G1 presentavano reazione negativa anche per la fermentazione del mannosio; i ceppi HI2, HI3 ed HA3 presentavano reazione negativa anche per arginina arilaminidasi; i ceppi HI1, HI2, HI3 presentavano reazione negativa anche per leucil-glicina arilaminidasi; i ceppi HI2, HI3 ed S1 presentavano reazione negativa anche per tirosina arilaminidasi; il ceppo HI1 presentava reazione negativa anche per istidina arilaminidasi; il ceppo HA2 presentava reazione negativa anche per serina arilaminidasi. Tutti i ceppi presentavano, invece, reazione positiva alla α -galattosidasi; i ceppi HI1, HI2, HI3, HA3, β -galattosidasi, α -glucosidasi, prolina arilaminidasi e glicina arilaminidasi; i ceppi HI4, HA1 ed S2 presentavano reazione

positiva anche per α -fucosidasi; i ceppi HA1 ed HA2 presentavano reazione positiva anche per la produzione di indolo; i ceppi HI4, HA1 ed HA2 presentavano reazione positiva anche per la fosfatasi alcalina.

Tabella 6 Reazioni metaboliche e fermentative dei ceppi isolati che mostravano un profilo compatibile con il genere *Bifidobacterium*

Reazioni/Enzimi	HI1	HI2	HI3	HI4	HA1	HA2	HA3	S1	S2	G1	<i>Bifidobacterium</i> spp.
Ureasi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%
Arginina deidrolasi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%
α -galattosidasi	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100%
β -galattosidasi	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100%
α -glucosidasi	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100%
β -glucosidasi	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	91%
α -arabinosidasi	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	45%
β -glucuronidasi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%
Fermentazione del mannosio	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	99%
Acido glutammico decarbossilasi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%
α -fucosidasi	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	9%
Riduzione dei nitrati	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%
Produzione di indolo	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	1%
Fosfatasi alcalina	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	5%
Arginina arilamidasi	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	100%
Prolina arilamidasi	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	99%
Leucil-glicina arilamidasi	-	-	±	±	±	±	-	-	-	-	27%
Leucina arilamidasi	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	91%
Acido piroglutammico arilamidasi	-	-	±	±	-	±	-	-	-	-	9%
Tirosina arilamidasi	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	99%
Glicina arilamidasi	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	99%
Istidina arilamidasi	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	91%
Acido glutamil glutammico arilaminidasi	-	-	-	+	-	±	-	-	-	-	1%
Serina arilaminidasi	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	91%

Per le successive prove, i ceppi isolati e classificati come possibili bifidobatteri venivano nominati come segue in **Tabella 7**.

Tabella 7 Nomenclatura assegnata ai ceppi isolati e classificati come possibili *Bifidobacterium* spp.

Sigla assegnata	Campione fecale di isolamento
HI1 (Human Infant)	Neonato
HI2 (Human Infant)	Neonato
HI3 (Human Infant)	Neonato
HI4 (Human Infant)	Neonato
HA1 (Human Adult)	Adulto
HA2 (Human Adult)	Adulto
HA3 (Human Adult)	Adulto
S1 (Sheep)	Pecora
S2 (Sheep)	Pecora
G1 (Goat)	Capra

12.2 Resistenza a basso pH e differenti valori di sali biliari

La **Tabella 8** mostra le percentuali di sopravvivenza dei ceppi selezionati come bifidobatteri a bassi pH e differenti concentrazioni di sali biliari. Tutti i ceppi di nuovo isolamento, mostravano delle percentuali di sopravvivenza $\geq 60\%$ a pH 3,0. Per i ceppi HI4 e S2, la percentuale di sopravvivenza a pH 3,0 era $>80\%$, cioè uguale a quella dei ceppi *Bifidobacterium longum* BB536 e *Bifidobacterium bifidum* ATCC29521, utilizzati come controllo.

A pH 2,5 i ceppi HI3, HI4, S1, S2 e G1 presentavano una percentuale di sopravvivenza compresa tra 20-40%, compatibile con il ceppo *Bifidobacterium bifidum* ATCC29521 utilizzato come controllo. A pH 2,0 solamente i ceppi HI4 e S2 mostravano una sopravvivenza compresa tra 20-40%, compatibile con il ceppo *Bifidobacterium bifidum* ATCC29521 utilizzato come controllo.

Tabella 8 Sopravvivenza dei ceppi di nuovo isolamento a differenti pH e concentrazioni di sali biliari

Ceppi	Sopravvivenza					
	pH			Sali biliari		
	2,0	2,5	3,0	0,3%	0,5%	0,7%
HI1	-	-	++	++	++	++
HI2	-	-	++	++	++	++
HI3	-	±	++	++	++	++
HI4	±	±	+++	++	++	++
HA1	-	-	++	++	++	++
HA2	-	-	++	++	++	++
HA3	-	-	++	++	++	++
S1	-	±	++	++	++	++
S2	±	±	+++	++	++	++
G1	-	±	++	++	++	++
<i>B. longum</i> BB536	-	-	+++	+++	+++	+++
<i>B. longum</i> ATCC 15707	-	-	++	++	++	++
<i>B. bifidum</i> ATCC29521	±	±	+++	++	++	++

Nota: +++>80%; ++ 60-80%; +40-60%; ± 20-40%; - <20%.

12.3 Determinazione della Minima Concentrazione Inibente

I valori delle Minime Concentrazioni Inibenti (MIC), ottenute per i 10 ceppi di nuovo isolamento venivano interpretati sulla base dei valori di cut-off suggeriti dall'EFSA (**Tabella 9**).

In base ai valori di cut-off stabiliti dall'EFSA i ceppi saggiati risultavano sensibili a tutti gli antibiotici saggiati.

Un ceppo isolato da un campione di feci di pecora (S1) presentava, però, MIC più alte degli altri ceppi per ampicillina, tetraciclina e cloramfenicolo.

Tabella 9 Minima Concentrazione Inibente ottenuta per i ceppi di *Bifidobacterium* spp. isolati da campioni di feci umane e animali

Ceppi	MIC (mg/L)						
	ampicillina	vancomicina	gentamicina	eritromicina	clindamicina	tetraciclina	cloramfenicolo
HI1	≤0,25	≤0,25	8	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25
HI2	≤0,25	≤0,25	16	≤0,25	≤0,25	0,5	0,5
HI3	≤0,25	0,5	16	≤0,25	≤0,25	0,5	0,5
HI4	≤0,25	≤0,25	16	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25
HA1	≤0,25	0,5	32	≤0,5	≤0,5	2	1
HA2	≤0,25	0,5	32	≤0,25	≤0,25	1	0,5
HA3	≤0,25	0,5	32	≤0,25	≤0,25	0,5	0,5
S1	≤0,5	0,5	64	≤0,5	≤0,5	8	4
S2	≤0,25	0,5	32	≤0,25	≤0,25	2	1
G1	≤0,25	0,5	32	≤0,25	≤0,25	2	0,5
Valore di cut-off (mg/L)	2	2	64	1	1	8	4

Nota: Un ceppo è definito sensibile quando è inibito ad una concentrazione di un determinato antibiotico uguale o più bassa del corrispondente valore di cut-off [151]

13. Saggi di adesività

13.1 Saggio di adesione alle cellule HT-29 dei ceppi di nuovo isolamento e dei ceppi probiotici di *Bifidobacterium* spp. mediante metodo quantitativo culturale

I risultati ottenuti mostravano che i ceppi probiotici di *Bifidobacterium* spp. saggiati avevano, dopo due ore di incubazione, delle percentuali di adesione alle cellule HT-29 comprese tra 5,3% e 6,7% (**Figura 18**).

Per i ceppi di *Bifidobacterium* spp. di nuovo isolamento la percentuale di adesione era ≤ 4,8%. Il ceppo HI4, mostrava la più alta percentuale di adesione (4,8%). Il ceppo HA2 e il ceppo S1 mostravano delle buone percentuali di adesione, rispettivamente del 3,8% e del 3,7%. I ceppi di nuovo isolamento che mostravano le percentuali di adesione ≤ 3,2% erano i ceppi HA1, S2, HI1, HI3, HA2, HI4 e S1.

La capacità di adesione dei ceppi probiotici era più alta per il ceppo *Bifidobacterium longum* BB536 che mostrava una percentuale di cellule adese del 5,6% rispetto all'inoculo iniziale e il ceppo *Bifidobacterium longum* W11 che mostrava una percentuale di cellule adese del 5,3%.

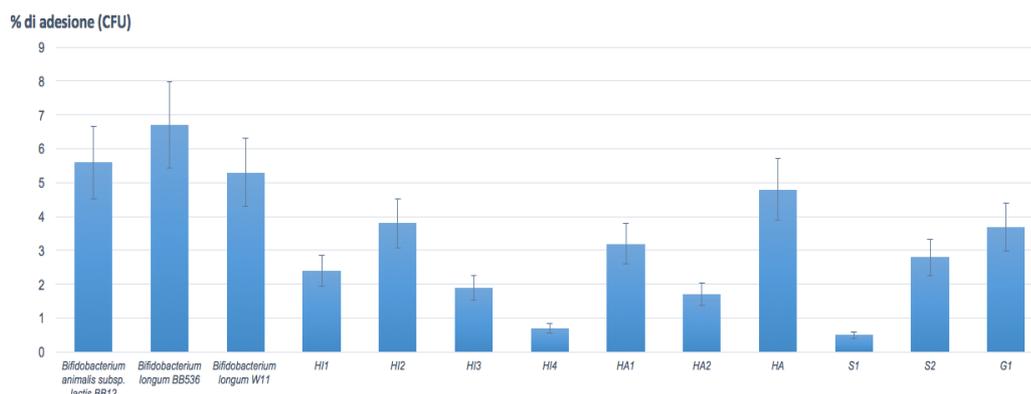


Figura 18 Percentuale di adesione dei ceppi probiotici di *Bifidobacterium* spp. alle cellule HT-29

13.2 Saggio di adesione alle cellule HT-29 dei ceppi probiotici di *Bifidobacterium* spp. mediante osservazione al microscopio ottico

Mediante osservazione al microscopio ad immersione, si osservavano differenti capacità di adesione a seconda del ceppo saggiato (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12, *Bifidobacterium longum* BB536, *Bifidobacterium longum* W11), ma anche in relazione al tempo di incubazione (30 e 60 minuti) e quindi di contatto dei ceppi con le cellule HT-29 (**Tabella 10** e **Figura 19**).

Dopo 30 min. di incubazione tutti i ceppi in esame mostravano una bassa capacità di adesione alle cellule HT-29 ($50 < ADI < 100$). Dopo 60 min. di incubazione si osservava un aumento dei batteri adesi per tutti i ceppi in esame, in particolare per i ceppi *B. animalis* subsp. *lactis* BB12 e *B. longum* BB536 ($400 < ADI < 1200$).

Tabella 10 Indice di adesione dei ceppi di *Bifidobacterium* in esame alle cellule HT-29

Ceppo	Adesione dopo 30 min di incubazione	Adesione dopo 60 min di incubazione
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB12	+	+++
<i>B. longum</i> BB536	±	++
<i>B. longum</i> W11	±	+

(±) = 50<ADI<100; (+) = 100<ADI<400; (++) = 400<ADI<1200; (+++) = 1200<ADI<2500.

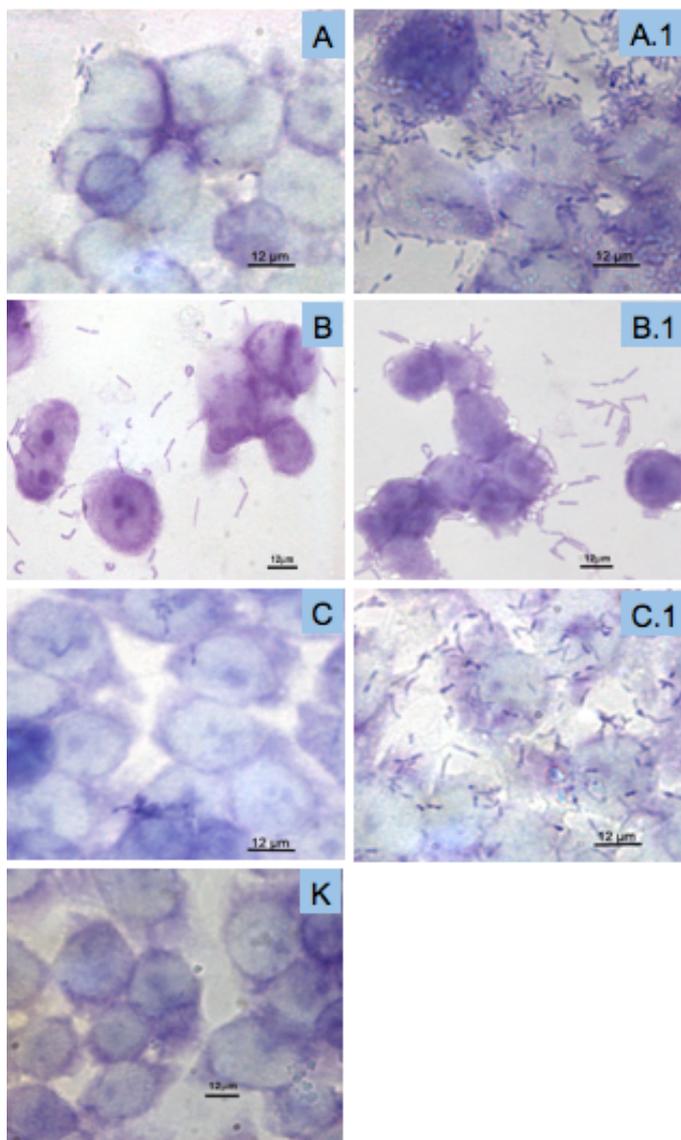


Figura 19 (A) Cellule HT-29 con *B. animalis* subsp. *lactis* BB12 dopo 30 min di incubazione; (A.1) Cellule HT-29 con *B. animalis* subsp. *lactis* BB12 dopo 60 min di incubazione; (B) Cellule HT-29 con *B. longum* BB536 dopo 30 min di incubazione; (B.1) Cellule HT-29 con *B. longum* BB536 dopo 60 min di incubazione; (C) Cellule HT-29 con *B. longum* W11 dopo 30 min di incubazione; (C.1) Cellule HT-29 con *B. longum* W11 dopo 60 min di incubazione; (K) Controllo negativo: Cellule HT-29 senza batteri dopo 60 min di incubazione.

13.3 Saggio di adesione alle cellule HT-29 del ceppo *Bifidobacterium longum* W11 mediante osservazione al microscopio elettronico a scansione (SEM)

La Microscopia a Scansione Elettronica (SEM) permetteva di evidenziare meglio le caratteristiche di adesione del ceppo *Bifidobacterium longum* W11 (**Figura 20**). Già dopo 30 minuti di incubazione si osservavano cellule di *B. longum* W11 adese alle cellule HT-29, soprattutto sull'orlo (**Figura 20A**). Dopo 60 min. di incubazione, il numero di cellule batteriche adese incrementava leggermente (**Figura 20A.1**). Un ulteriore lieve incremento del numero delle cellule adese veniva osservato dopo 120 min. di incubazione (dati non mostrati).

La Microscopia a Scansione Elettronica metteva in evidenza anche la presenza di strutture biopolimeriche organizzate in una complessa struttura 3D, sia dopo 30 min (dati non mostrati) di incubazione che dopo 60 min. e 120 min. di incubazione (**Figura 20**).

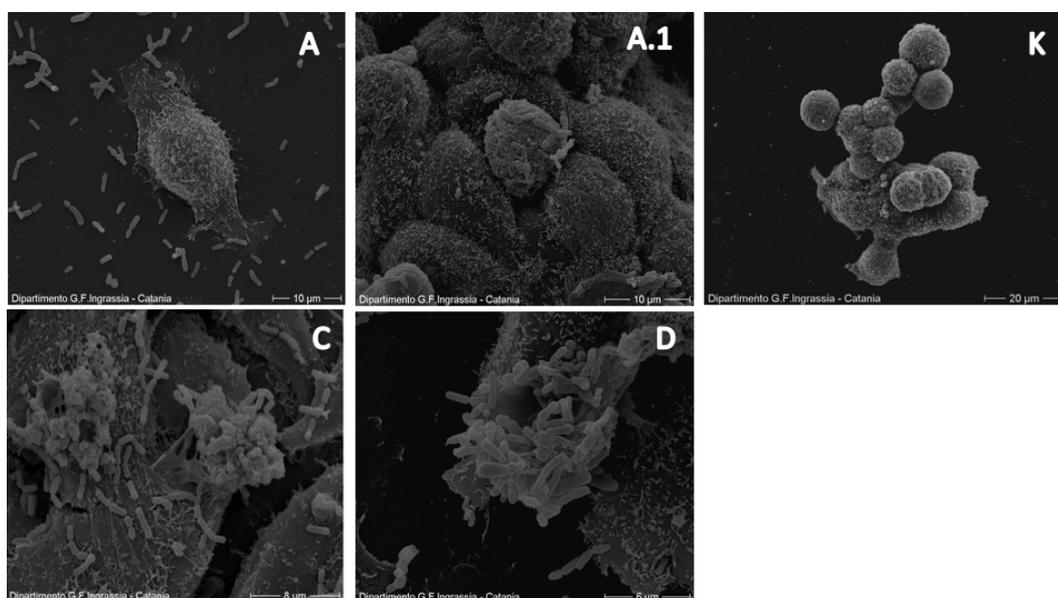


Figura 20 (A) Cellule HT-29 con *B. longum* W11 dopo 30 min. di incubazione (ingrandimento 2500x); (A.1) Cellule HT-29 con *B. longum* W11 dopo 60 min. di incubazione (ingrandimento 2500x); (K) Controllo negativo: cellule HT-29 senza batteri dopo 120 min. di incubazione (ingrandimento 1300x); (C) Cellule HT-29 con *B. longum* W11 e il suo biopolimero dopo 60 min. (ingrandimento 5000x); (D) Cellule HT-29 con *B. longum* W11 e il suo biopolimero dopo 60 min. dopo 120 min. (ingrandimento 4000x).

14. Caratterizzazione chimico-fisica dell'esopolisaccaride prodotto dal ceppo *Bifidobacterium longum* W11

14.1 Analisi cromatografica mediante cromatografia su strato sottile

Dall'analisi effettuata mediante cromatografia su strato sottile (TLC) dell'esopolisaccaride (EPS) estratto, purificato e idrolizzato, per paragone con valori del fattore di ritardo (R_f) degli standard, era possibile individuare gli zuccheri presenti. La **Figura 21** mostra i risultati ottenuti sulla lastrina in silice. Dai valori di R_f della macchia centrale, del campione in esame (delimitata in giallo) per paragone con i valori di R_f degli standard, era possibile indentificare come zuccheri presenti nell'EPS, glucosio e galattosio (**Figura 21**). Questo risultato era confermato utilizzando piastre in cellulosa (dati non mostrati). Inoltre, l'analisi TLC metteva in evidenza anche la presenza di tracce di altre sostanze che non era possibile identificare.



Figura 21 Lastrina in silice con TLC dell'EPS in esame. Standard: GLU (glucosio), GAL (galattosio).

14.2 Analisi cromatografica mediante cromatografia liquida ad alta prestazione

Una analisi più dettagliata dell'esopolisaccaride (EPS), estratto, purificato e idrolizzato, effettuata mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (High Performance Liquid Chromatography, HPLC), confermava i risultati precedentemente ottenuti mediante Thin-Layer Chromatography (TLC).

La **Figura 22** mostra il cromatogramma ottenuto mediante HPLC per l'EPS in esame (a sinistra). A destra vengono riportati, per confronto, i cromatogrammi ottenuti per gli standard, rispettivamente galattosio e glucosio.

Inoltre, da una analisi dei picchi era possibile dedurre la presenza nel campione di galattosio e glucosio in un rapporto di circa 1:1.

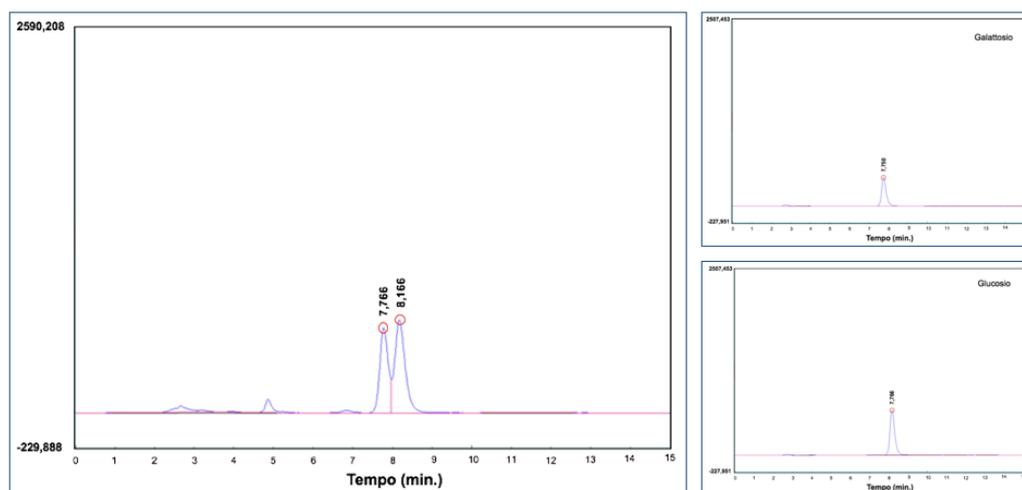


Figura 22 Cromatogramma HPLC dell'EPS purificato e idrolizzato

15. Caratterizzazione molecolare dei determinanti genetici responsabili della produzione dell'esopolisaccaride nel ceppo *Bifidobacterium longum* W11

La **Figura 23** mostra la corsa elettroforetica degli amplificati di PCR del ceppo *Bifidobacterium longum* W11 in paragone con il ceppo *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* DSM10140, utilizzato come controllo positivo.

L'amplificazione genica, ottenuta utilizzando le coppie di *primers* *cpsD_F1/cpsD_R2* e *cpsD_F4/cpsD_R4*, produceva amplimeri di ~ 759 bp e l'amplificazione genica, ottenuta utilizzando le coppie di *primers* *rfbP_F3/rfbP_R4* e *rfbP_F5/rfbP_R5*, produceva amplimeri di ~ 301 bp. Dalla corsa elettroforetica era possibile evidenziare, per il ceppo *Bifidobacterium longum* W11, solamente la presenza del gene *cpsD*.

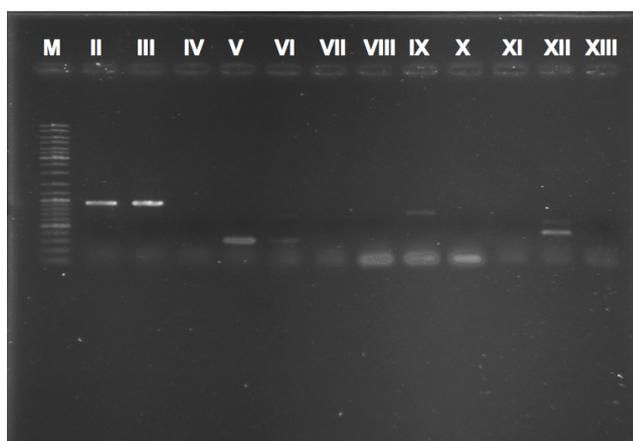


Figura 23 Corsa elettroforetica degli amplificati di PCR ottenuta utilizzando *degenerat primers* per amplificare i geni *p-gtf*

Primo pozzetto: DNA Ladder (Marker, M). **Secondo pozzetto:** amplificato ottenuto utilizzando la coppia di *primers cpsD_F1/cpsD_R2* dal DNA del ceppo *Bifidobacterium longum* W11. **Terzo pozzetto:** amplificato ottenuto dal DNA del ceppo *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* DSM10140 (controllo positivo) utilizzando la stessa coppia di *primers*. **Quarto pozzetto:** controllo negativo. **Quinto pozzetto:** amplificato ottenuto utilizzando la coppia di *primers cpsD_F4/cpsD_R4* dal DNA del ceppo di *B. longum* W11. **Sesto pozzetto:** amplificato ottenuto dal DNA del ceppo *B. animalis* subsp. *lactis* DSM10140 (controllo positivo) utilizzando la stessa coppia di *primers*. **Settimo pozzetto:** controllo negativo. **Ottavo pozzetto:** amplificato ottenuto utilizzando la coppia di *primers rfbP_F3/rfbP_R4* dal DNA del ceppo di *B. longum* W11. **Nono pozzetto:** amplificato ottenuto dal DNA del ceppo *B. animalis* subsp. *lactis* DSM10140 (controllo positivo) utilizzando la stessa coppia di *primers*. **Decimo pozzetto:** controllo negativo. **Undicesimo pozzetto:** amplificato ottenuto utilizzando la coppia di *primers rfbP_F5/rfbP_R5* dal DNA del ceppo di *B. longum* W11. **Dodicesimo pozzetto:** amplificato ottenuto dal DNA del ceppo *B. animalis* subsp. *lactis* DSM10140 (controllo positivo) utilizzando la stessa coppia di *primers*. **Tredicesimo pozzetto:** controllo negativo.

Mediante analisi bioinformatica dei dati, dal confronto del genoma del ceppo *Bifidobacterium longum* W11 in esame con il genoma del ceppo *Bifidobacterium longum* NCC2705, era possibile individuare nel genoma del primo, il *cluster* genico responsabile della produzione di EPS (**Figura 24**). Il *cluster* era composto da 23 geni ed era costituito da 24,7 kb. Sembra che la sintesi di EPS da parte di questo ceppo potrebbe essere unidirezionale, producendo quindi probabilmente un solo polisaccaride. Nel *cluster* erano presenti geni probabilmente coinvolti nella sintesi e nella polimerizzazione di polisaccaridi, e geni coinvolti nel metabolismo e trasporto dei carboidrati. Inoltre, era presente una breve sequenza di geni, che sintetizzano per precursori del ramnosio affiancata da una sequenza di geni che sintetizzano per transposasi (**Figura 24**). La presenza di questi geni aumentava il contenuto di GC nel *cluster* dell'EPS, e suggeriva che questi geni non erano stati

acquisiti per trasferimento orizzontale; pertanto, essi potrebbero essere coinvolti nel metabolismo del ramnosio in maniera indipendentemente dal loro ruolo nella sintesi di EPS.

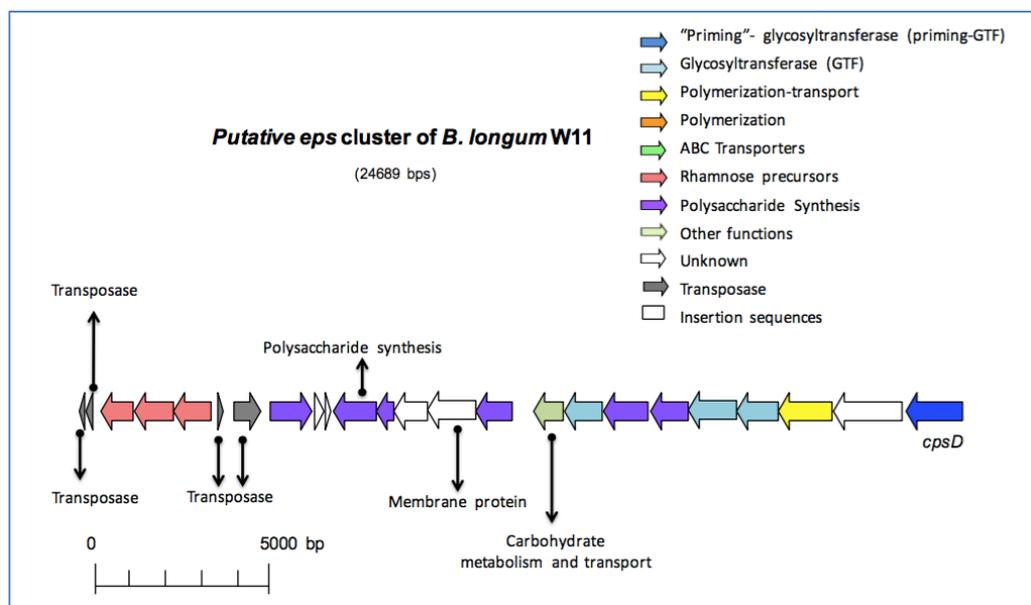


Figura 24 Mappe fisiche dei possibili cluster dell'eps dal ceppo di *Bifidobacterium longum* W11. I geni sono stati classificati in base alle loro potenziali funzioni, che sono indicate con le frecce colorate in figura.

16. Attività biologiche dell'esopolisaccaride prodotto dal ceppo *Bifidobacterium longum* W11

16.1 Attività citotossica sulle linee cellulari umane HF1 e Caco-2

La **Figura 25** mostra i risultati ottenuti dal saggio di citotossicità dell'EPS, prodotto da *B. longum* W11, valutata *in vitro* mediante un saggio di vitalità cellulare utilizzando MTT.

La **Figura 25A** mostra l'inibizione percentuale della vitalità cellulare delle cellule HF1 (fibroblasti gengivali umani) a differenti concentrazioni (500, 1000 e 2000

$\mu\text{g/mL}$) dopo 12 e 24 h di incubazione. Dalla **Figura 25A** si evidenzia che il trattamento con EPS a tutte le concentrazioni saggiate non modifica la vitalità cellulare dei fibroblasti gengivali umani HF1 sia dopo 12 h che dopo 24 h rispetto al controllo (K). La figura **Figura 25B** mostra l'inibizione percentuale della vitalità cellulare delle cellule Caco-2 a differenti concentrazioni (62,5, 125, 250, 500, 1000 $\mu\text{g/mL}$) dopo 72 h di incubazione, espressa come media dei risultati ottenuti da tre prove differenti. Dalla **Figura 25B** si evidenzia che già alla minima concentrazione di EPS saggiata (62,5 $\mu\text{g/mL}$) si osservava un leggero decremento della vitalità cellulare delle cellule tumorali Caco-2 rispetto al controllo (K). Tuttavia, tale decremento rimaneva pressoché costante a tutte le concentrazioni di EPS saggiate (62,5, 125, 250, 500, 1000 $\mu\text{g/mL}$). Inoltre, dall'analisi statistica dei dati mediante T-test, il decremento osservato a tutte le concentrazioni di EPS saggiate non era significativo rispetto al controllo (K).

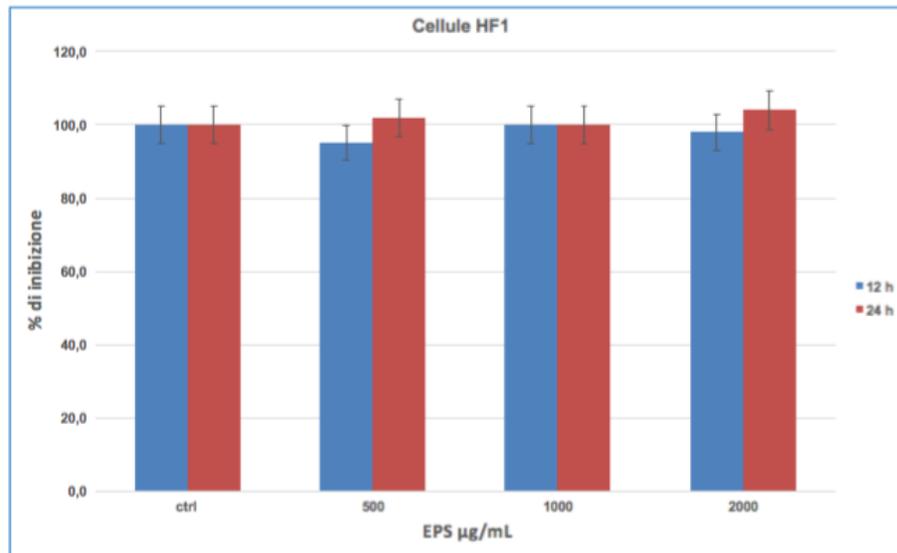
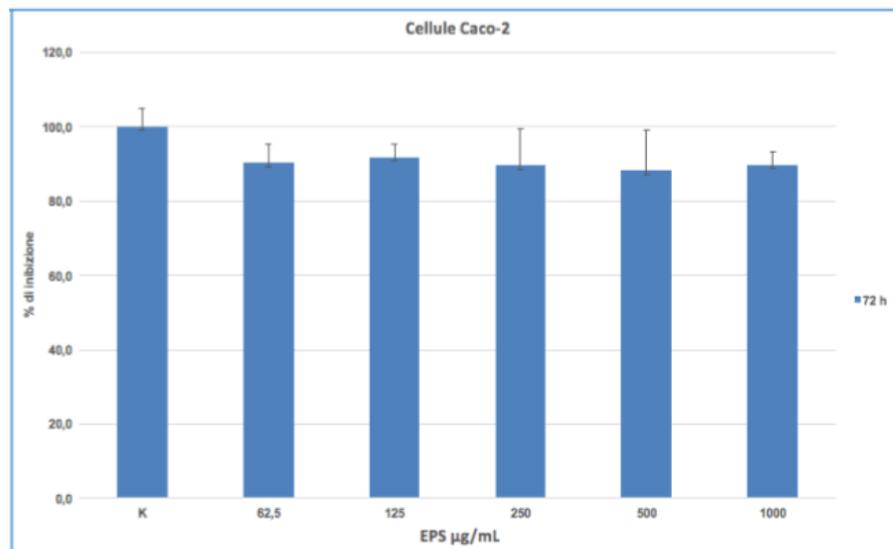
A**B**

Figura 25 (A) Effetto citotossico *in vitro* dell'EPS prodotto dal ceppo *B. longum* W11 sulle cellule HF1 a differenti concentrazioni (500, 1000 e 2000 µg/mL) dopo 12 e 24 h di incubazione; (B) Effetto citotossico *in vitro* dell'EPS prodotto dal ceppo *B. longum* W11 sulle cellule Caco-2 a differenti concentrazioni (62,5, 125, 250, 500, 1000 µg/mL) dopo 72 h di incubazione.

16.2 Attività immunomodulante

La **Figura 26** mostra la risposta immunitaria indotta dall'EPS prodotto dal ceppo *B. longum* W11, analizzata *in vitro* attraverso lo studio del *pattern* di citochine prodotte da cellule immunitarie isolate da PBMC.

I risultati mostravano che l'EPS era in grado di aumentare significativamente la produzione di IL-6 e IL-10. In un secondo *set* di esperimenti, come atteso, l'aggiunta di ConA ha indotto un aumento significativo delle citochine dosate. L'aggiunta di EPS, alla dose più alta di 200 µg/mL, incrementava ulteriormente, in maniera significativa i livelli di IL-1, IL-6 ed interferone e riduceva significativamente i livelli di IL-10 rispetto ai PBMC trattati solo con ConA. I risultati ottenuti in questo studio mostrano un effetto dell'EPS di tipo immunomodulante.

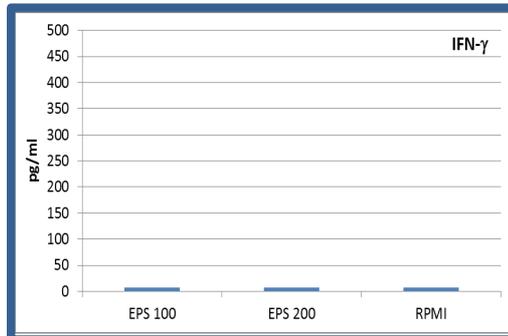
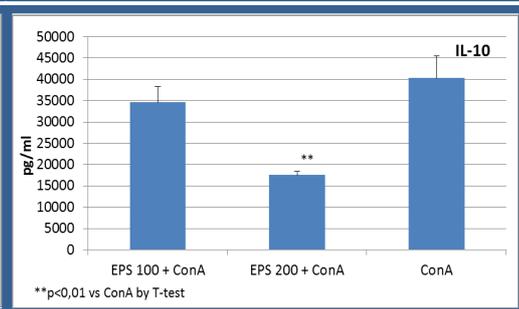
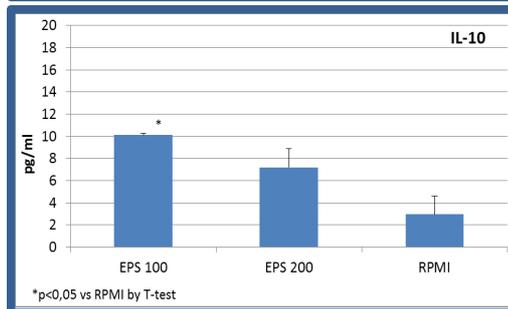
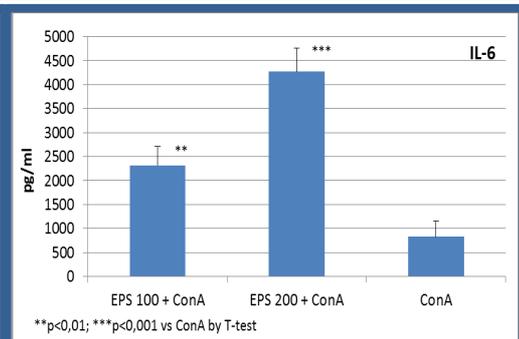
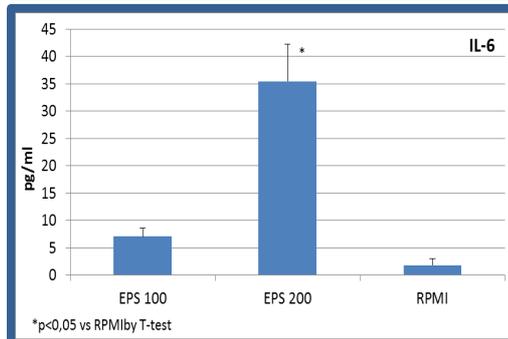
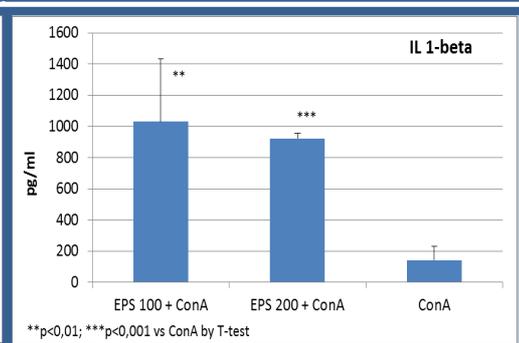
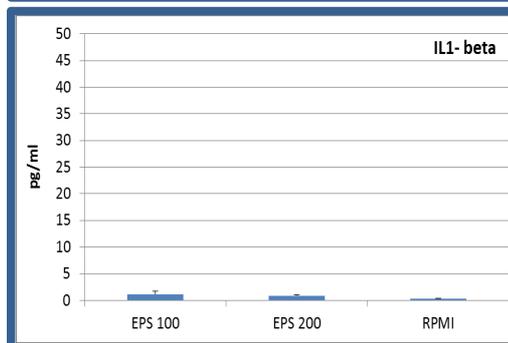
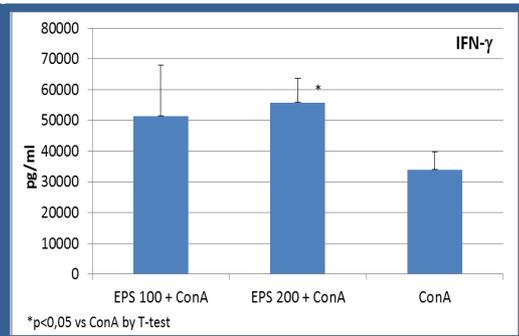
A**B**

Figura 26 Citochine prodotte dalle cellule PBMC dopo 3 giorni di incubazione con EPS a differenti concentrazioni, sia da solo (A) che in combinazione con ConA (B)

DISCUSSIONI E CONCLUSIONE

I recenti progressi nelle tecnologie di sequenziamento genomico, hanno permesso di conoscere il microbioma umano. I numerosi progetti attuati a livello internazionale nell'ultimo decennio (*Human Microbiome Project* ed *European Metagenomics of the Human Intestine tract*) hanno rivelato l'elevata complessità delle comunità microbiche in vari siti del corpo umano [1-7].

Studi metagenomici hanno evidenziato, nel microbiota di tutti i distretti intestinali dell'adulto, una predominanza di 5 divisioni batteriche: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* e *Fusobacteria* [8-10].

Il genere *Bifidobacterium* costituisce il 4% del microbiota fecale del colon dell'adulto ed è naturalmente presente nell'intestino umano sin dall'infanzia. Molti dei ceppi sviluppati commercialmente come probiotici provengono dall'isolamento umano o animale [11-13].

Il microbiota intestinale ha funzione protettiva nei confronti di batteri patogeni, e funzioni metaboliche, strutturali e immunomodulanti. Alterazioni del microbiota intestinale e lievi infiammazioni possono contribuire a determinare un ciclo di eventi che induce uno stato cronico mediate dal sistema immunitario [19]. L'equilibrio del microbiota intestinale può essere mantenuto o ripristinato favorendo i microrganismi già presenti con sostanze prebiotiche, somministrando microrganismi probiotici o grazie ad una strategia simbiotica (somministrazione di probiotici e prebiotici) [24]. I probiotici utilizzano prevalentemente ceppi appartenenti ai generi *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. In accordo con le linee guida per la valutazione dei probiotici riportate dalla "Food and Agricultural Organization" (FAO) e la "World Health Organization" (WHO) i ceppi devono essere ben caratterizzati con metodi molecolari a livello di specie e di ceppo e mostrare resistenza alle condizioni gastrointestinali [136]. Altre proprietà usate per caratterizzare un ceppo probiotico sono l'adesione alle cellule intestinali e la produzione di sostanze antimicrobiche. Inoltre, i ceppi probiotici dovrebbero essere saggiati per valutare la presenza di determinanti genetici responsabili di antibiotico

resistenza trasferibile e per l'attività antagonista nei confronti di patogeni intestinali [151, 162-164].

Questo studio descrive l'isolamento da feci umane e animali e la preliminare caratterizzazione microbiologica di ceppi probabilmente appartenenti al genere *Bifidobacterium*. Le tecniche classiche hanno permesso di caratterizzare alcuni ceppi isolati come bacilli Gram-positivi, asporigeni, di dimensioni variabili, alcuni dei quali curvi, altri con le tipiche biforcazioni a forma di Y o di V. Per una prima identificazione dei ceppi sulla base del profilo metabolico, sono state analizzate le reazioni previste dal kit API rapid ID 32 A [165]. L'analisi morfologica e del profilo metabolico ha permesso di individuare soltanto 10 dei ceppi come possibili membri del genere *Bifidobacterium*.

I ceppi probiotici, devono essere in grado di sopravvivere al passaggio attraverso il tratto gastrointestinale [146]. Quindi, per selezionare i ceppi più resistenti ad un ambiente a basso pH, i presunti ceppi di *Bifidobacterium* spp. isolati sono stati esposti per 3 h a pH 3,0, 2,5, 2,0. Le prove di sopravvivenza *in vitro* alle condizioni gastrointestinali, hanno dimostrato che i ceppi esaminati hanno una buona resistenza a pH 3,0 (con una percentuale di sopravvivenza compresa tra 60-80%). In particolare, un ceppo isolato da feci di neonato (HI4) e un ceppo isolato da feci di pecora (S2) presentavano a pH 3,0 una percentuale di sopravvivenza superiore a 80%. Il saggio è stato effettuato utilizzando un tempo di esposizione di 3 h, sebbene di norma 2 h sono sufficienti per il passaggio dei batteri ingeriti attraverso lo stomaco [146]. Inoltre, i ceppi probiotici, essendo probabilmente tamponati nello stomaco da cibo o da altri eccipienti del prodotto, probabilmente, durante il consumo non vengono esposti a pH estremi ($\text{pH} < 3$). I sali biliari giocano un ruolo molto importante nei meccanismi di difesa a livello intestinale. Le concentrazioni fisiologiche rilevanti di bile nell'uomo variano da 0,3 a 0,5%. Per il genere *Bifidobacterium* la resistenza ai sali biliari varia tra specie e ceppi. In questo studio i ceppi isolati mostravano una resistenza ai sali biliari inferiore rispetto ai ceppi controllo. L'adattamento dei ceppi batterici ai sali biliari è, infatti, correlato a diversi fattori, quali: i cambiamenti nella fermentazione dei carboidrati, l'attività

glicosidasi, la produzione esopolisaccaridi, la composizione delle proteine di membrana e la maggiore capacità di aderire al muco.

Dal momento che i ceppi isolati hanno presentato delle buone capacità di resistenza *in vitro* alle condizioni gastro-intestinali, i ceppi sono stati saggiati anche per altre caratteristiche probiotiche quali la resistenza agli antibiotici e la capacità di adesione alle cellule intestinali della linea HT-29. Tutti i ceppi saggiati presentavano valori di MIC inferiori o uguali ai cut-off previsti dalle linee guida dell'EFSA [151].

Un'altra importante caratteristica di un buon ceppo probiotico è la capacità di aderire all'epitelio intestinale. L'adesione, infatti, è un prerequisito importante per la colonizzazione e gioca un ruolo fondamentale nell'esclusione competitiva di patogeni intestinali [74, 78, 146]. In questo studio, l'abilità dei ceppi in esame di aderire alle cellule intestinali è stata valutata con modelli cellulari *in vitro* utilizzando le cellule epiteliali intestinali HT-29. I ceppi isolati mostravano, dopo 2 h, una percentuale di adesione $\leq 4,8\%$ leggermente inferiore rispetto a quella dei ceppi probiotici di *Bifidobacterium* spp. saggiati in paragone che arrivava fino a 6,7%.

L'osservazione più accurata mediante microscopia ottica e microscopia a scansione, delle caratteristiche di adesione dei ceppi probiotici di *Bifidobacterium* spp. ha evidenziato, in particolare, per il ceppo *Bifidobacterium longum* W11, la presenza di un biopolimero, ben organizzato in una complessa struttura 3D. Questo risultato ha orientato le successive fasi della ricerca sulla caratterizzazione di questo biopolimero di probabile natura esopolisaccaridica.

Gli esopolisaccaridi (EPS) prodotti da *Bifidobacterium* spp. variano per composizione chimica e struttura, da queste caratteristiche scaturiscono le proprietà chimico-fisiche e quindi le possibili applicazioni [102-106]. L'utilizzo di ceppi "ropy" produttori di EPS è comune nel latte fermentato e nella produzione di yogurt per ottenere una giusta consistenza. La produzione *in situ* di questi biopolimeri è impiegata come alternativa all'aggiunta di stabilizzatori derivati dalle piante o di origine microbica non GRAS (additivi non consentiti in diversi Paesi) [98-101]. Recentemente, è stato dimostrato che alcuni EPS, sia HoPS che HePS, hanno effetti

benefici sulla salute dell'ospite, come prebiotici o per la loro attività antitumorale, antiossidante, antiulcera, immunomodulante, antinfiammatoria, anti-ipertensiva, antivirale o per la capacità di abbassare il colesterolo [110, 135].

La composizione della struttura primaria dell'EPS, dal punto di vista chimico, ne determina le caratteristiche fisiche e, quindi, le possibili proprietà biologiche. In questo studio, pertanto, è stata chiarita, in primo luogo, la natura dei monosaccaridi che compongono l'EPS prodotto dal ceppo *B. longum* W11. Dopo estrazione e purificazione, mediante metodiche chimiche, è stata effettuata una prima analisi mediante cromatografia su strato sottile (TLC) [101]. Si tratta di una tecnica analitica classica che, però, fornisce utili indicazioni sulla natura chimica degli analiti di un dato campione in esame. Studi bibliografici, riportano l'uso di questa tecnica per l'analisi di oligosaccaridi di origine naturale. In questo studio, l'uso di questa tecnica è stato adattato all'analisi dell'EPS in esame, mediante una accurata scelta della fase stazionaria più adeguata (silice e/o cellulosa) e, soprattutto, della fase eluente in grado di offrire la più alta risoluzione possibile degli analiti del campione in esame (rispettivamente: acetato di etile – acido acetico – metanolo – acqua 60:15:15:10 v/v, e acetato di etile – piridina – acqua 40:20:30 v/v) [101]. L'analisi TLC rilevava chiaramente la presenza di glucosio e galattosio. Tuttavia, per una analisi più accurata, è stato necessario utilizzare una metodica cromatografica più precisa: la cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC). Per questa tecnica, i pochi studi presenti in letteratura riguardano soprattutto l'analisi di oligosaccaridi origine naturale. Vista la complessità della tecnica, lo scopo dello studio è stato quello di mettere a punto una metodica semplice di analisi. A tal fine dopo varie prove, è stato scelto di utilizzare una colonna Prevaril Carbohydrate ES, come fase mobile acetonitrile – acqua (70:30, v/v) e una eluizione isocratica. Questa tecnica più accurata, ha confermato la presenza di glucosio e galattosio, come evidenziato mediante TLC.

Tecniche molecolari, potrebbero aumentare le conoscenze sulla struttura primaria degli EPS prodotti da LAB e *Bifidobacterium* spp. permettendo la selezione di ceppi produttori e ottimizzando la produzione attraverso la modulazione della via metabolica di sintesi di EPS. Inoltre, l'ingegneria molecolare potrebbe consentire

la costruzione di ceppi modificati in grado di produrre elevati livelli di EPS o nuovi biopolimeri [110, 118].

Inoltre, questo studio ha permesso di individuare, nel genoma del ceppo di *B. longum* W11, i determinati genetici responsabile della sua produzione. La conoscenza dell'intero genoma del ceppo *B. longum* W11, da noi sequenziato, ha permesso di confrontare, mediante analisi bioinformatica dei dati, il genoma del ceppo in esame con quello noto di un ceppo di *B. longum* NCC2705. Dal confronto è stato possibile individuare il *cluster* genetico responsabile della produzione di EPS nel ceppo *B. longum* W11. Studi hanno dimostrato alcune funzionalità in campo tecnologico e biologico degli ESP prodotti da *Bifidobacterium* spp. [139-144]. Questo studio ha valutato la citotossicità dell'EPS prodotto dal ceppo *B. longum* W11 sia su linee cellulari umane sane che su linee cellulari tumorali. Lo studio ha dimostrato che non esiste alcun effetto citotossico dell'EPS in esame verso le linee cellulare sane (fibroblasti gengivali HF1); tuttavia l'EPS, dopo 72 h di incubazione, può indurre una riduzione statisticamente non significativa della vitalità delle cellule tumorali Caco-2.

Infine, l'attività immunomodulante del EPS è stata analizzata attraverso lo studio del *pattern* di citochine quali IL-1, IL-6, IL-10 e IFN- γ prodotte da cellule immunitarie isolate da PBMC di donatori volontari. I risultati hanno dimostrato per l'EPS in esame un effetto di tipo immunomodulante. Un risultato interessante di questo studio, quando l'EPS veniva saggiato in combinazione con ConA è l'incremento significativo dei livelli di IL-1, IL-6 e IFN- γ e la riduzione significativa dei livelli di IL-10 rispetto ai PBMC trattati solo con ConA. L'interleuchina-6 è una proteina multifunzionale che riveste un ruolo importante nella risposta infiammatoria acuta, nell'emopoiesi e nella risposta immunitaria; in particolare, tra questi effetti, la IL-6 è in grado di stimolare la proliferazione dei linfociti B e, quindi, la secrezione di immunoglobuline. L'IFN-gamma è un potente immunoregolatore della risposta cellulo-mediata, ed inoltre, possiede un'attività anti-virale aspecifica, inclusa quella verso i virus respiratori e contro vari patogeni intracellulari. La modulazione di queste due citochine da parte dell'EPS necessita comunque ulteriori indagini per investigare l'eventuale meccanismo d'azione.

In conclusione, i risultati della ricerca forniscono una buona base sperimentale per ulteriori indagini su altri aspetti non ancora investigati degli EPS in generale ed in particolare per l'EPS del ceppo *B. longum* W11, quali altre eventuali proprietà biologiche o protezione del ceppo produttore dalle condizioni intestinali avverse e/o dall'attività inibente degli antibiotici.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Belizário JE and Napolitano M. Human microbiomes and their roles in dysbiosis, common diseases, and novel therapeutic approaches. *Front Microbiol.* 6:1050, 2015. Review.
- [2] Website: <http://hmpdacc.org>
- [3] Website: <http://www.metahit.eu>
- [4] Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL et al. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science.* 307(5717):1915-20, 2005.
- [5] Lozupone CA, Stombaugh J, Gonzalez A et al. Meta-analyses of studies of the human microbiota. *Genome Res.* 23:1704-1714, 2013.
- [6] Gill SR, Pop M, Deboy RT et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science.* 312:1355-1359, 2006.
- [7] Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M et al. The human microbiome project. *Nature.* 18;449(7164):804-10, 2007.
- [8] Quin J, Li R, Raes J et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature.* 464:59-67, 2010.
- [9] Kim B, Jeon Y and Chin J. Current status and future promise of human micro- biome pediatric gastroenterol. *Hepatol Nutr.* 16:71-79, 2013.
- [10] Blandino G and Inturri R (2014). Dialogo tra microbiota intestinale umano e ospite: ruolo dei ceppi probiotici di *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp.. *NPT.* 2/2014: 1- 8, 2014. ISSN: 1122-2557
- [11] Turrone F, Duranti S, Bottacini F et al. *Bifidobacterium bifidum* a sane example of a specialized human gut commensal. *Front Microbiol* 5:1-8, 2014.
- [12] Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(26):11971-5, 2010.
- [13] Mueller NT, Bakacs E, Combellick J et al. The infant microbiome development: mom matters. *Trends Mol Med.* 21(2):109-17, 2015.
- [14] Hakansson A and Molin G. Gut microbiota and inflammation. *Nutrients.* 3(6):637-682, 2011.
- [15] Kurakawa T, Ogata K, Matsuda K et al. Diversity of Intestinal Clostridium coccoides Group in the Japanese Population, as Demonstrated by Reverse Transcription-Quantitative PCR. *PLoS One.* 10(5):e0126226, 2015.
- [16] Chia-Hui Yu L. Intestinal epithelial Barrier Dysfunction in Food Hypersensitivity. *J of Allergy.* 2012: 1-11, 2012.
- [17] Ghoshal UC, Shukla R, Ghoshal U et al. The gut microbiota and Irritable Bowel Syndrome: Friend or Foe. *Int J Inflamm* 2012: 1-13, 2012.
- [18] Yu LC, Wang JT, Wei SC et al. Host-microbial interactions and regulation of intestinal epithelial barrier function: From physiology to pathology. *World J Gastrointest Pathophysiol* 3:27-43, 2012.
- [19] Petschow B, Doré J, Hibberd P et al. Probiotics, prebiotics, and the host microbiome: the science of translation. *Ann N Y Acad Sci.* 1306:1-17, 2013. Review.

- [20] Turróni F, Ventura M, Buttó LF et al. Molecular dialogue between the human gut microbiota and the host: a *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* perspective. *Cell Mol Life Sci* 71:183-203, 2014.
- [21] Proctor L, Ravel J, and Turnbaugh P. The Human microbiome. American Academy of Microbiology. Report 2014.
- [22] Frank DN and Pace NR. Gastrointestinal microbiology enters the metagenomics era. *Curr Opin Gastroenterol* 24:4-10, 2008.
- [23] Major G and Spiller R. Irritable bowel syndrome, inflammatory bowel disease and the microbiome. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 21:15-21, 2014.
- [24] Vandenas Y, Huys G and Daube G. Probiotics an update. *J Pediatr* 91(1):6-21, 2015. Review.
- [25] Gibson GR, Probert HM, Loo JV et al. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr Res Rev.* 17(2):259-75, 2004.
- [26] Icaza-Chávez ME. Gut microbiota in health and disease. *Rev Gastroenterol Mex.* 78(4):240-8, 2013. Review.
- [27] Fuller RP. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol.* 66 (5): 365-78, 1989.
- [28] Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. FAO/WHO, Cordoba, Argentina, 2001.
- [29] Sanders EM, Guarner F, Guerrant R et al. An update on the use and investigation of probiotics in health and disease. *Gut* 62 (5): 787-796, 2013.
- [30] Piccione G. Microrganismi del rumine, dell'intestino tenue e dell'intestino crasso. In *Fisiologia dukes degli animali domestici*. SWENSON ML, REECE WO. pp. 13 Napoli Federico Chiesa. Gruppo Ed by Idelson-Gnocchi 2002.
- [31] Furet JP, Firmesse O, Gourmelon M et al. Comparative assessment of human and farm animal faecal microbiota using real-time quantitative PCR. *FEMS Microbiol Ecol.* 68(3):351-62, 2009.
- [32] Felis GE and Dellaglio F. Taxonomy of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. *Curr Issues Intest Microbiol* 8: 44-61, 2007.
- [33] Nicolosi VM and Nicoletti G. Dizionario di batteriologia umana normale e patologica. 4 Ed. Firenze: Menarini, 2002.
- [34] Biavati B and Mattarelli P. The Family *Bifidobacteriaceae*. In: *The Prokaryotes*, Release 3: 7, 2001.
- [35] Tissier. Recherches sur la flore intestinale normale et pathologique du nourrisson. Thesis, University of Paris, Paris, France, 1900.
- [36] O'Brien PJ, Glick MC, Zilliken F, et al. Acidic aminosugars from bacteria. Incorporation of [1-14C]-alpha, beta-methyl-N-acetyl-D-glucosaminide into muramic acid. *Biochim Biophys Acta* 37: 357-60, 1960.
- [37] Husain I, Poupard JA and Norris RF. Influence of nutrition on the morphology of a strain of *Bifidobacterium bifidum*. *J Bacteriol* 111:841- 844, 1972.
- [38] Kojima M, Suda S, Hotta S, et al. Necessity of calcium ion for cell division in *Lactobacillus bifidus*. *J Bacteriol* 104:1010-1013, 1970.

- [39] Leuschner RGK, Bew J, Simpson P, et al. A collaborative study of method for the enumeration of probiotic bifidobacteria in animal feed. *Int J of food Microbiol* 83:161-170, 2003.
- [40] Simpson JP, Fitzgerald GF, Stanton C et al. The evaluation of a mupirocin-based selective medium for the enumeration of bifidobacteria for probiotic animal feed. *J of Microbiological Methods*. 57:9-16, 2004
- [41] Milazzo I, Speciale A, Blandino G, et al. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products available in Italy. *New Microbiologica* 29:281-291, 2006.
- [42] Pechar R, Rada V, Parafati L, et al. Mupirocin-mucin agar for selective enumeration of *Bifidobacterium bifidum*. *Int J Food Microbiol* 191C: 32- 35, 2014.
- [43] Garrity GM, Bell JA and Lilburn TG. Taxonomic Outline of the Procaryotes. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd edition. Springer, Verlag New York. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/bergeysoutline200405>, 2004.
- [44] Hoyles L, Collins MD, Falsen E et al. Transfer of members of the genus *Falcivibrio* to the genus *Mobiluncus*, and emended description of the genus *Mobiluncus* system. *Appl Microbiol*. 27: 72–83, 2004.
- [45] Kandler O and E Lauer. Neuere Vorstellungenzur Taxonomic der Bifidobacterien. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1, Orig. Reihe A*228: 29–45, 1974.
- [46] Poupard JA, Husain I and Norris RF. Biology of the bifidobacteria. *Bacteriol Rev*. 37: 136–165, 1973.
- [47] Woese CR. Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 51: 221–271, 1987.
- [48] Ventura M, Van Sinderen D, Fitzgerald GF et al. Insights into the taxonomy, genetics and physiology of *bifidobacteria*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 86: 205–223, 2004.
- [49] Jian W, Zhu L and Dong X. New approach to phylogenetic analysis of the genus *Bifidobacterium* based on partial HSP60 gene sequences *Int J Syst Evol Microbiol*. 51: 1633–1638, 2001.
- [50] Ventura M, Canchaya C, Del Casale A et al. Analysis of bifidobacterial evolution using a multilocus approach. *Int J Syst Evol Microbiol*. 56: 2783–2792, 2006.
- [51] Sakata S, Kitahara M, Sakamoto M et al. Unification of *Bifidobacterium infantis* and *Bifidobacterium suis* as *Bifidobacterium longum*. *Int J Syst Evol Microbiol* 52: 1945–1951, 2002.
- [52] Young SL, Simon MA, Baird MA et al. Bifidobacterial species differentially affect expression of cell surface markers and cytokines of dendritic cells harvested from cord blood. *Clin Diagn Lab Immunol*. 11: 686–690, 2004.
- [53] Masco L, Ventura M, Zink R et al. 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. *Int J Syst Evol Microbiol*. 54: 1137–1143, 2004.

- [54] Temmerman R, Masco L, Vanhoutte T et al. Development and validation of a nested-PCR-denaturing gradient gel electrophoresis method for taxonomic characterization of bifidobacterial communities. *Appl Environ Microbiol* 69: 6380–6385, 2003.
- [55] Website: <http://www.dsmz.de/bactnom/bactname.htm>
- [56] Website: <http://www.bacterio.cict.fr>
- [57] Biavati B, Mattarelli P. The Family of *Bifidobacteriaceae*. In *The Prokaryotes*. Vol 3: Archea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes. Ed by Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E. Third Edition 2006. ISBN: 978-0-387-25493-7 (Print) 978-0-387-30743-5 (Online).
- [58] Biavati B, Castagnoli P, Crociani F *et al.* Species of the *Bifidobacterium* in the feces of infants. *Microbiologica*. 7: 341-345, 1984.
- [59] Biavati B, Castagnoli P and Travatelli D. Species of the genus *Bifidobacterium* in the feces of human adults. *Microbiologica*. 9:39-45, 1986.
- [60] Scardovi V and Crociani F. *Bifidobacterium catanulatum*, *Bifidobacterium dentium* and *Bifidobacterium angulatum*: three new species and their deoxyribonucleic acid homology relationships. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 24:6-20, 1974.
- [61] Crociani F, Biavati B, Alessandrini A *et al.* *Bifidobacterium inopinatum* sp. nov. and *Bifidobacterium denticolens* sp. nov., two new species isolated from human dental caries. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46:564-571, 1996.
- [62] Crociani F, Matteuzzi D and Ghazvinizadeh H. Species of the genus *Bifidobacterium* found in human vagina. *Zentralb. Bakteriologie. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg Abt. 1. Orig. Reihe A.* 223:298-302, 1973.
- [63] Scardovi V and Zani G. *Bifidobacterium magnum* sp. nov., a large, acidophilic *Bifidobacterium* isolated from rabbit feces. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 24:29-34, 1974.
- [64] Matteuzzi D, Crociani F, Zani G *et al.* *Bifidobacterium suis* n.sp.: a new species of the genus *Bifidobacterium* isolated from pig feces. *Allg. Mikrobiol.* 11:387-395, 1971.
- [65] Trovatelli LD, Crociani F, Pedinotti M *et al.* *Bifidobacterium pullorum* sp. nov. A new species isolated from chicken feces and related group of bifidobacteria isolated from rabbit feces. *Arch. Mikrol.* 98:187-198, 1974.
- [66] Scardovi V and Trovatelli LD. New species of bifidobacteria from *Apis mellifica* L. and *Apis indica* F. A contribution to the taxonomy and biochemistry of the genus *Bifidobacterium*. *Zentralb. Bakteriologie. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg Abt. 2.* 123:64-88, 1969.
- [67] Biavati B, Scardovi V and Moore WEC. Electrophoretic patterns of proteins in the genus *Bifidobacterium* and proposal of four new species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32:358-373, 1982.
- [68] Lamendella R, Santo Domingo JW, Kelty C *et al.* *Bifidobacteria* in feces and environmental waters. *Appl Environ Microbiol.* 74: 575-584, 2008.

- [69] Turróni F, van Sinderen D and Ventura M. Genomics and ecological overview of the genus *Bifidobacterium*. *Int. J. Food Microbiol.* 149: 37-44, 2011.
- [70] Qin J, Li R, Raes J et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature.* 464:59-65, 2010.
- [71] Arboleya S, Ruas-Madiedo P, Margolles A et al. Characterization and in vitro properties of potentially probiotic *Bifidobacterium* strains isolated from breast-milk. *Int J Food Microbiol* 149:28-36, 2011.
- [72] Milani C, Turróni F, Duranti S et al. Genomics of the genus *Bifidobacterium* reveals species-specific adaptation to the glycan-rich gut environment. *Appl Environ Microbiol.* 20. pii: AEM.03500-15, 2015
- [73] González-Rodríguez I, Ruiz L, Gueimonde M et al. Factors involved in the colonization and survival of bifidobacteria in the gastrointestinal tract. *FEMS Microbiol Lett* 340:1-10, 2013.
- [74] Serafini F, Strati F, Ruas-Madiedo P et al. Evaluation of adhesion properties and antibacterial activities of the infant gut commensal *Bifidobacterium bifidum* PRL2010. *Anaerobe* 21: 9-17, 2013.
- [75] Castagliuolo I, Galeazzi F, Ferrari S et al. Beneficial effect of auto-aggregating *Lactobacillus crispatus* on experimentally induced colitis in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 43: 197-204, 2005.
- [76] Ventura M, Turróni F, Motherway MO, MacSharry J and van Sinderen D. Host-microbe interactions that facilitate gut colonization by commensal bifidobacteria. *Trends Microbiol.* 10: 467-476, 2012.
- [77] Gueimonde M, Margolles A, de los Reyes-Gavilán CG et al. Competitive exclusion of enteropathogens from human intestinal mucus by *Bifidobacterium* strains with acquired resistance to bile - a preliminary study. *Int J Food Microbiol.* 113:228-32, 2007.
- [78] de los Reyes-Gavilán CG, Suárez A, Fernández-García M et al. Adhesion of bile-adapted *Bifidobacterium* strains to the HT29-MTX cell line is modified after sequential gastrointestinal challenge simulated in vitro using human gastric and duodenal juices. *Res Microbiol.* 162: 514-9, 2011.
- [79] Sánchez B, Urdaci MC and Margolles A. Extracellular proteins secreted by probiotic bacteria as mediators of effects that promote mucosa-bacteria interactions. *Microbiology* 156: 3232-3242, 2010.
- [80] Guglielmetti S, Tamagnini I, Mora D et al. Implication of an outer surface lipoprotein in adhesion of *Bifidobacterium bifidum* to Caco-2 cells. *Appl Environ Microbiol.* 74: 4695-4702, 2008.
- [81] Gleinser M, Grimm V, Zhurina D et al. Improved adhesive properties of recombinant bifidobacteria expressing the *Bifidobacterium bifidum* specific lipoprotein BopA. *Microb Cell Fact.* 11: 80-3, 2012.
- [82] O'Connell, Motherway M, Zomer A et al. Functional genome analysis of *Bifidobacterium breve* UCC2003 reveals type IVb tight adherence (Tad) pili as an essential and conserved host-colonization factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 11217-11222, 2011.

- [83] Candela M, Bergmann S, Vici M et al. Binding of human plasminogen to *Bifidobacterium*. *J Bacteriol.* 189: 5929-36, 2007.
- [84] Ruiz L, Couté Y, Sánchez B et al. The cell-envelope proteome of *Bifidobacterium longum* in an *in vitro* bile environment. *Microbiology* 155: 957-67, 2009.
- [85] Candela M, Biagi E, Centanni M et al. Bifidobacterial enolase, a cell surface receptor for human plasminogen involved in the interaction with the host. *Microbiology* 155: 3294-3303, 2009.
- [86] Candela M, Centanni M, Fiori J et al. DNA-K from *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* is a surface-exposed human plasminogen receptor up-regulated in response to bile salts. *Microbiology.* 156:1609-1618, 2010.
- [87] González-Rodríguez I, Sánchez B, Ruiz L et al. Role of extracellular transaldolase from *Bifidobacterium bifidum* in mucin adhesion and aggregation. *Appl Environ Microbiol.* 78:3992-3998, 2012.
- [88] Fanning S, Hall LJ, Cronin M et al. Bifidobacterial surface-exopolysaccharide facilitates commensal-host interaction through immune modulation and pathogen protection. *ProcNatlAcadSci USA* 109:2108-2113, 2012.
- [89] Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL et al. in Host-bacterial mutualism in the human intestine 307(5717):1915-20, 2005. Review.
- [90] Ruas-Madiedo 2014 in Food oligosaccharides Biosynthesis and Bioactivity of Exopolysaccharides produced by probiotic bacteria. 1st Ed. by Javier Moreno A, Luz Sanz M, ISBN: 978-1-118-42649-4, 2014 .
- [91] Reffová K. Analysis of food bioactive oligosaccharides by Thin-Layer Chromatography. In Food oligosaccharides: production, analysis and bioactivity, first edition. Ed by Moreno FJ and Sanz ML. 2014 John Wiley & Sons, Ltd. 2014.
- [92] Kumar AS, Mody K, and Jha B in Bacterial exopolysaccharides-a perception. *J of Basic Microbiol:* 47, 103-117, 2007.
- [93] Cescutti P, Moran A, Holst O et al. in Bacterial capsular polysaccharides and exopolysaccharides. *Microbial Glycobiology. Structures, Relevance and Applications:* 93-108, 2009.
- [94] Looijesteijn PJ, Trapet L, de Vries E et al. In Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*. *Int J Food Microbiol.* 64(1-2): 71-80, 2001.
- [95] Ruas-Madiedo P, Abraham A, Mozzi F et al. Functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. In *Molecular aspects of lactic acid bacteria for traditional and new applications.* Ed by Mayo B., Lopez P and Pérez Martínez G: 137-166, 2008.
- [96] Leathers T, Steinbuchel S, Baets D et al. Dextran in Biopolymers. Ed Wiley VCH: 299-322, 2002
- [97] Orla-Jensen S. The Lactic Acid Bacteria. Copenhagen: Det Kongelige Danske Videnskabernes Selskab. Biologiske Skrifter Bind II Nr3, 1943
- [98] Gill SH and Rutherford KJ. Probiotic supplementation to enhance natural immunity in the elderly: effects of a newly characterized immunostimulatory strain

- Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20TM) on leucocyte phagocytosis. *Nutr Res* 21:183-9, 2001
- [99] Ruas-Madiedo P, Gueimonde M, Margolles A et al. Exopolysaccharides produced by probiotic strains modify the adhesion of probiotics and enteropathogens to human intestinal mucus. *J Food Prot* 69: 2011-5, 2006
- [100] Inturri R, Tiralongo A, Tempera G et al. Study on the Adhesion Characteristics of *Bifidobacterium* spp. strains on HT-29 Human Epithelial Cell Line. Proceedings of the 113th General meeting American Society for Microbiology; 2013 May 18-21; Denver, Colorado, U.S.
- [101] Inturri R, Stivala A, Sinatra F et al. Scanning electron microscopy observation of adhesion properties of *Bifidobacterium longum* W11 and chromatographic analysis of its exopolysaccharide. *Food and Nutr Sci.* 5:1787-92, 2014.
- [102] Broadbent JR, McMahon DJ, Welker DL et al. Biochemistry, genetics, and applications of exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*: a review. *J Dairy Sci.* 86(2):407-23, 2003
- [103] Denou E, Pridmore RD, Berger B et al. Identification of genes associated with the long-gut-persistence phenotype of the probiotic *Lactobacillus johnsonii* strain NCC533 using a combination of genomics and transcriptome analysis. *J Bacteriol.* 190(9):3161-8, 2008
- [104] Dertli E, Colquhoun IJ, Gunning AP et al. Structure and biosynthesis of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus johnsonii* FI9785. *J Biol Chem.* 288(44):31938-51, 2013
- [105] Dierksen KP, Sandine WE, Trempey JE. Expression of ropy and mucoid phenotypes in *Lactococcus lactis*. *J Dairy Sci.* 80(8):1528-36, 1997 .
- [106] Ruas-Madiedo P and de los Reyes-Gavilán CG. Invited review: methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *J Dairy Sci.* 88(3):843-56, 2005.
- [107] Ruas-Madiedo P, Salazar N and de los Reyes-Gavilán CG. Biosynthesis and chemical composition of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria in *Bacterial Polysaccharides: Current Innovations and Future Trends*. Ed Matthias Ullrich School of Engineering and Science 2009. ISBN:978-1-904455-45-5
- [108] De Vuyst L and Degeest B. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 23(2):153-77. Review. 1999.
- [109] Cerning J. Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 87: 113-130, 1990.
- [110] Ruas-Madiedo P, Hugenholtz J, Zoon P. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Int Dairy J* 12: 163-17, 2002
- [111] Van Geel-Schutten GH, Faber EJ, Smit E et al. Biochemical and structural characterization of the glucan and fructan exopolysaccharides synthesized by the *Lactobacillus reuteri* wild-type strain and by mutant strains. *Appl Environ Microbiol* 65(7):3008-14, 1999
- [112] Dubock P & Pridmore RD. Levansucrase of *Lactobacillus johnsonii*. European patent EP 1 357 18 A1, 2003.

- [113] Tieking M, Korakli M, Ehrmann MA et al. In situ production of exopolysaccharides during Sourdough fermentation by cereal and intestinal isolates of lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 69(2):945-52, 2003.
- [114] Kralj S, van Geel-Schutten GH, Dondorff MM et al. Glucan synthesis in the genus *Lactobacillus*: isolation and characterization of glucansucrase genes, enzymes and glucan products from six different strains. *Microbiology* 150:3681-90, 2004
- [115] Tieking M, Kaditzky S, Valcheva R et al. Extracellular homopolysaccharides and oligosaccharides from intestinal lactobacilli. *J Appl Microbiol* 99(3):692-702, 2005.
- [116] van Hijum SA, van Geel-Schutten GH, Rahaoui H et al. Characterization of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* that synthesizes high-molecular weight inulin and inulin oligosaccharides. *Appl Environ Microbiol* 68(9):4390-8, 2002
- [117] Tieking M, Ehrmann MA, Vogel RF et al. Molecular and functional characterization of a levansucrase from the sourdough isolate *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW 1.392. *Appl Microbiol Biotechnol* 66(6):655-63, 2005.
- [118] Hidalgo-Cantabrana C, Ordoñez I, Ruas-Madiedo P et al. Degenerate PCR primers for detecting putative priming glycosyltransferase genes in Bifidobacterium strains. *Benef Microbes.* 6(4):553-62, 2015
- [119] Hassan AN, Frank JF, Schmidt KA et al. Textural properties of yogurt made with encapsulated non-ropy lactic cultures. *J Dairy Sci* 79 (12): 2098- 2103, 1996
- [120] Marshall Valerie M and Rawson HL. Effects of exopolysaccharide-producing strains of thermophilic lactic acid bacteria on the texture of stirred yoghurt. *Int J Food Sci & Technol* 34:137–143, 1999.
- [121] Laws A, Marshall VM. The relevance of exopolysaccharides to the rheological properties in milk fermented with ropy strains of lactic acid bacteria. *Int Dairy J* 11: 709-722, 2001.
- [122] Hassan AN, Frank JF, Farmer MA et al. Yogurt Microstructure and Three-Dimensional Visualization as Determined by Confocal Scanning Laser Microscopy. *J of Dairy Sci* 78: 2629–2636, 1995.
- [123] Van Marle M. Structure and rheological properties of yoghurt gels and stirred yoghurts. Ph.D. Thesis, University of Twente, The Netherlands, 1998.
- [124] Kitazawa H, Harata T, Uemura J et al. Phosphate group requirement for mitogenic activation of lymphocytes by an extracellular phosphopolysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Int J Food Microbiol*, 40(3):169-75, 1998.
- [125] Van Marle ME, Zoon P. Permeability and rheological properties of microbially and chemically acidified skim-milk gels. *Netherlands Milk and Dairy J* 49: 47-65, 1995.
- [126] Tuinier R, Zoon P, Olieman C et al. Isolation and physical characterization of an exocellular polysaccharide. *Biopolymers* 49(1):1-9, 1999.
- [127] Ganzle MG and Scwab C. Exopolysaccharides production by intestinal lactobacilli in probiotics & prebiotics scientific aspects. Ed. Tannock GW ISBN: 1-904455-01-8, 2005.

- [128] Obaa T, Higashimuraa M, Iwasakia T et al. Viscoelastic properties of aqueous solutions of the phosphopolysaccharide “viilian” from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SBT 0495. *Carbohydrate Polymers* 39: 275–281, 1999
- [129] Higashimura M, Mulder-Bosman BW, Reich R et al. Solution properties of viilian, the exopolysaccharide from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SBT 0495. *Biopolymers* 54(2):143-58, 2000.
- [130] Tuiner R. A exocellular polysaccharide and its interactions with proteins. PhD. Thesis, University of Utrecht, The Netherlands, 1999.
- [131] Tuinier R, van Casteren WH, Looijesteijn PJ et al. Effects of structural modifications on some physical characteristics of exopolysaccharides from *Lactococcus lactis*. *Biopolymers* 59(3):160-6, 2001.
- [132] Yang Z, Staaf M, Huttunen E et al. Structure of a viscous exopolysaccharide produced by *Lactobacillus helveticus* K16. *Carbohydr Res.* 329(2):465-9, 2000.
- [133] van Kranenburg R, van Swam II, Marugg JD et al. In Exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis* NIZO B40: functional analysis of the glycosyltransferase genes involved in synthesis of the polysaccharide backbone. *J Bacteriol.* 181(1):338-40, 1999.
- [134] Stingele F, Vincent SJ, Faber EJ et al. Introduction of the exopolysaccharide gene cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6 into *Lactococcus lactis* MG1363: production and characterization of an altered polysaccharide. *Mol Microbiol.* 32(6):1287-95, 1999.
- [135] Madhuri KV and Vidya Prabhakar K. Microbial Exopolysaccharides: Biosynthesis and Potential Applications in Orient. *J. Chem.* 30(3): 1401-1410, 2014.
- [136] FAO 2008, FAO Technical Meeting on Probiotics. Roma, Italia.
- [137] Kitazawa H, Yamaguchi T and Itoh T. B-cell mitogenic activity of slime products produced from slime-forming, encapsulated *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. *J Dairy Sci.* 75(11):2946-51, 1992.
- [138] Zubillaga M, Ricardo W, Postaire E et al. Effect of probiotics and functional foods and their use in different diseases. *Nutr Res.* 21: 569–579, 2001
- [139] Hidalgo-Cantabrana C, López P, Gueimonde M et al. Immune modulation capability of exopolysaccharides synthesised by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 4:227–237, 2012.
- [140] López P, Monteserín DC, Gueimonde M et al. Exopolysaccharide producing *Bifidobacterium* strains elicit different *in vitro* responses upon interaction with human cells. *Food Res. Int.* 46:99 –107, 2012.
- [141] Fanning S, Hall LJ, Cronin M et al. Bifidobacterial surface-exopolysaccharide facilitates commensal-host interaction through immune modulation and pathogen protection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109:2108 –2113, 2012.
- [142] Wu MH, Pan TM, Wu YJ et al. Exopolysaccharide activities from probiotic *Bifidobacterium*: immunomodulatory effects (on J774A. 1 macrophages) and antimicrobial properties. *Int. J. Food Microbiol.* 144:104–110, 2010.

- [143] Hidalgo-Cantabrana C, Sánchez B, Milani C et al. Genomic overview and biological functions of exopolysaccharide biosynthesis in *Bifidobacterium* spp. *Appl Environ Microbiol.* 80(1):9-18, 2014.
- [144] Ruas-Madiedo P, Medrano M, Salazar N et al. Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains abrogate in vitro the cytotoxic effect of bacterial toxins on eukaryotic cells. *J. Appl. Microbiol.* 109:2079–2086, 2010
- [145] Delgado S, Suárez A and Mayo B. Identification of dominant bacteria in feces and colonic mucosa from healthy Spanish adults by culturing and by 16S rDNA sequence analysis. *Dig Dis Sci.* 51(4):744-51, 2006.
- [146] Muñoz-Quezada S, Chenoll E, Vieites JM et al. Isolation, identification and characterisation of three novel probiotic strains (*Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 and *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036) from the faeces of exclusively breast-fed infants. *Br J Nutr.* 109(2):S51-62, 2013
- [147] Inturri R, Stivala A and Blandino G. Microbiological characteristics of *Bifidobacterium longum* BB536 and *Lactobacillus rhamnosus* HN001 used in combination. *Minerva Gastroenterologica*. Accepted July 2015. Article in press
- [148] ISO (International Organization for Standardization), “Milk and milk products determination of the minimal inhibitory concentration (MIC) of antibiotics applicable to bifidobacteria and non-enterococcal lactic acid bacteria (LAB),” ISO 10932/IDF 233 standard, 2010.
- [149] Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement*. CLSI document M100-S23 (ISBN 1-56238-865-7 [Print]; ISBN 1-56238-866-5 [Electronic]). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2013.
- [150] Website: <http://www.quelab.com/htmleng/2900a.html>
- [151] EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP); Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA Journal* 2012;10(6):2740. [10 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2012.2740. Available online: www.efsa.europa.eu/efsajournal
- [152] Guglielmetti S, Taverniti V, Minuzzo M et al. Oral bacteria as potential probiotics for the pharyngeal mucosa. *Appl Environ Microbiol.* 76(12):3948-58, 2010.
- [153] Ali QS, Farid AJ, Kabeir BM et al. Adhesion Properties of *Bifidobacterium Pseudocatenulatum* G4 and *Bifidobacterium Longum* BB536 on HT-29 Human Epithelium Cell Line at Different Times and pH WASET 49: 149-153, 2009.
- [154] Yang Z, Li S, Zhang X et al. Capsular and slime-polysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* JAAS8 isolated from Chinese sauerkraut: potential application in fermented milk products. *J Biosci Bioeng.* 110(1):53-7, 2010.
- [155] Stahl, Egon. "Thin-layer chromatography. A laboratory handbook." *Thin-layer chromatography. A laboratory handbook*. Springer Berlin Heidelberg 2nd edition (1967). ISBN: 978-3-642-88490-0 (Print) 978-3-642-88488-7 (Online).

- [156] Lv GP, Hu DJ, Cheong KL et al. Decoding glycome of *Astragalus membranaceus* based on pressurized liquid extraction, microwave-assisted hydrolysis and chromatographic analysis. *J Chromatogr A*. 28;1409:19-29, 2015.
- [157] Russo A, La Fauci L, Acquaviva R et al. Ochratoxin A-induced DNA damage in human fibroblast: protective effect of cyanidin 3-O-beta-d-glucoside. *J Nutr Biochem*. 16(1):31-7, 2005.
- [158] Wang J, Zhao X, Yang Y et al. Characterization and bioactivities of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW32. *Int J Biol Macromol*. 74:119-26, 2015.
- [159] Nicoletti F, Di Marco R, Sacerdote P et al. Prevention and treatment of lethal murine endotoxemia by the novel immunomodulatory agent MFP-14. *Antimicrob Agents Chemother*. 45(5):1591-4, 2001.
- [160] Mangano K, Quattrocchi C, Aiello C et al. Immunomodulatory properties of cefaclor: in vivo effect on cytokine release and lymphoproliferative response in rats. *J Chemother*. 18(6):641-7, 2006.
- [161] Hidalgo-Cantabrana C, Nikolic M, López P et al. Exopolysaccharide-producing *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* strains and their polymers elicit different responses on immune cells from blood and gut associated lymphoid tissue. *Anaerobe*. 26:24-30, 2014.
- [162] Moubareck C, Gavini F, Vaugien L et al. Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria. *J Antimicrob Chemother*. 55(1):38-44, 2005.
- [163] Zhou JS, Pillidge CJ, Gopal PK et al. Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Int J Food Microbiol*. 98(2):211-7, 2005.
- [164] D'Aimmo MR, Modesto M, Biavati B. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* spp. isolated from dairy and pharmaceutical products. *Int J Food Microbiol*. 115(1):35-42, 2007.
- [165] Inturri R, Santagati M, Scillato M et al. Caratterizzazione molecolare a profilo biochimico di ceppi di *Bifidobacterium* spp. utilizzati in prodotti probiotici. X Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia Farmaceutica. 6-7 Giugno, 2014, Chieti, Italia