

УДК 579.61:579.25:577.352.465

ОЦЕНКА АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ПРОБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО ТЕСТА (ОБЗОР)

Емельянцеv Сергей Александрович,

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, ФБУН «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Ростов-на-Дону, Россия.

e-mail: emelyantseff@mail.ru

Аннотация

В последнее десятилетие заметно возрастает интерес к пробиотическим препаратам, созданным на основе классических облигатных симбионтов родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*. Ключевой составляющей их биологической активности считается обеспечение антиоксидантной и антимутагенной защиты организма-хозяина. Окислительный стресс, возникающий из-за дисбаланса между продукцией активных форм кислорода и возможностями эндогенной антиоксидантной системы, рассматривается как один из ведущих факторов патогенеза широкого круга соматических заболеваний, включая сердечно-сосудистые, нейродегенеративные, воспалительные и онкологические патологии. В связи с этим скрининг и отбор эффективных штаммов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* с выраженным антиоксидантным потенциалом представляют собой актуальную научно-практическую задачу для современной биотехнологии и медицины.

Ключевые слова: пробиотики, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, антиоксиданты, биолюминесцентный анализ.

EVALUATION OF THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PROBIOTIC BACTERIA USING A BIOLUMINESCENCE ASSAY (REVIEW)

Emelyantsev Sergey Alexandrovich,

Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher,

«Rostov Research Institute of Microbiology and Parasitology» Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Rostov-on-Don, Russia.

e-mail: emelyantseff@mail.ru

ABSTRACT

Over the past decade, interest in probiotic preparations based on classical obligate symbionts of the genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* has increased markedly. A key component of their biological activity is the provision of antioxidant and antimutagenic protection

to the host organism. Oxidative stress –resulting from an imbalance between the production of reactive oxygen species and the capacity of the endogenous antioxidant system – is regarded as a leading factor in the pathogenesis of a wide range of somatic diseases, including cardiovascular, neurodegenerative, inflammatory, and oncological diseases. Consequently, the screening and selection of effective *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with pronounced antioxidant potential represents an urgent scientific and practical challenge for modern biotechnology and medicine.

Keywords: probiotics, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, antioxidants, bioluminescence assay.

Введение. Согласно определению Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН (ФАО) и Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), «пробиотики – это живые микроорганизмы, которые при применении в адекватных количествах оказывают положительное влияние на здоровье организма-хозяина» [1, 2].

Лактобактерии и бифидобактерии являются важнейшими представителями микробиоты кишечника человека. Их положительное влияние на здоровье не ограничивается поддержанием микробного баланса, модуляцией системного иммунного ответа и сохранением целостности плотных контактов кишечного эпителия [3, 4]. Антиоксидантные и антимуtagenные свойства этих микроорганизмов рассматриваются современными исследователями как перспективные механизмы защиты организма от окислительного стресса и ассоциированных с ним заболеваний, к которым относят онкологические, сердечно-сосудистые и нейродегенеративные патологии [3, 5, 6].

Постбиотики – это вещества, которые высвобождаются или продуцируются вследствие метаболической активности микроорганизмов и оказывают прямое или косвенное благотворное влияние на организм-хозяин [7]. Во многом благоприятные эффекты пробиотиков обусловлены выделением метаболитов во внешнюю среду. Бесклеточные культуральные жидкости, содержащие секретируемые метаболиты, получают центрифугированием бактериальных культур с последующей фильтрационной стерилизацией жидкой фазы [2].

1. Механизмы антиоксидантной защиты пробиотиков. Антиоксидантное действие штаммов рода *Lactobacillus* реализуется через несколько взаимодополняющих механизмов, которые можно разделить на прямое и не прямое воздействие.

Прямые механизмы: инактивация активных форм кислорода. Лактобактерии и их метаболиты способны нейтрализовать активные формы кислорода (АФК). Среди основных механизмов выделяют связывание и хелатирование ионов металлов, что препятствует их участию в реакциях генерации АФК.

Непрямые механизмы: модуляция клеточных сигнальных путей хозяина. Более сложный системный механизм связан с воздействием *Lactobacillus* spp. на внутриклеточные сигнальные пути организма-хозяина. Согласно данным современных обзоров, пробиотические штаммы способны модулировать ключевые сигнальные каскады, ответственные за реакцию на окислительный стресс:

- активация пути Nrf2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2). Белок Nrf2 – главный регулятор экспрессии генов антиоксидантных ферментов и белков детоксикации. Метаболиты *Lactobacillus* spp. активируют этот путь, что приводит к усилению эндогенной антиоксидантной защиты клеток хозяина [5];

- повышение экспрессии гена *muc2*, кодирующего муцин 2 – основной компонент слизистой оболочки кишечника [2, 13, 14].

Представители рода *Lactobacillus* также могут снижать индукцию окислительного стресса ингибированием пути NF-κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells). NF-κB — центральный регулятор воспалительных процессов. Снижение его активности приводит к уменьшению синтеза провоспалительных цитокинов (TNF-α, IFN-γ, IL-6), связанных с индукцией окислительного стресса [9];

2. Биолюминесцентный тест: принцип и преимущества. Для оценки антиоксидантной активности пробиотических штаммов традиционно используются разнообразные химические и биохимические методы. Однако, главный недостаток химических методов оценки антиоксидантной активности заключается в том, что они не учитывают биодоступность антиоксидантов и их влияние на образование активных форм кислорода и стимуляцию продукции антиоксидантов бактериальными клетками [15]. Для высокопроизводительного, чувствительного и биологически релевантного скрининга антиоксидантной активности культуральной жидкости пробиотических штаммов был предложен биолюминесцентный тест на основе рекомбинантных штаммов *Escherichia coli*, несущих гибридные плазмиды с репортёрными генами *luxCDABE* и геном устойчивости к ампициллину *bla* [3, 15].

Принцип метода. Рекомбинантные штаммы *E. coli* MG1655 содержат плазмиды, в которых оперон *luxCDABE* *Photobacterium luminescens*, обеспечивающий биолюминесценцию, помещён под контроль промоторов *E. coli* и несёт репортёрную функцию. Гены *luxAB* кодируют субъединицы, а гены *luxCDE* кодируют редуктазу, необходимую для продукции субстрата люциферазы [16]. Штаммы *E. coli* MG1655 (pKatG) и *E. coli* MG1655 (pSoxS) детектируют окислительный стресс, вызванный пероксидами и супероксидом соответственно [17, 18]. Протоколы оценки осветлённой культуральной жидкости культур пробиотиков [19] и изолятов кишечной микрофлоры с использованием биолюминесцентных штаммов *E. coli* MG1655 были подробно описаны ранее [20]. Данный протокол учитывает влияние культуральной жидкости и индукторов на кривые роста биосенсоров *E. coli* MG1655 нормализацией биолюминесценции по оптической плотности культуры на длине волны 600 нм (OD600) [20]. Кратко: после добавления к культуре соответствующего штамма-биосенсора индукторов окислительного стресса – пероксида водорода (для пероксидного стресса), параквата (метилвиологен, для индукции супероксидного стресса) – происходит индукция целевых промоторов. Это приводит к повышению экспрессии *lux*-генов и увеличению интенсивности биолюминесценции. При предварительном добавлении тестируемого образца, обладающего антиоксидантной активностью, например бесклеточной среды после роста культуры лактобацилл, интенсивность индуцированной биолюминесценции снижается вследствие уменьшения уровня окислительного или генотоксического стресса в тест-системе.

Нормализованная по оптической плотности культуры на длине волны 600 нм (OD600) люминесценция вычисляется по формуле:

$$L_s = \frac{L_{rs}}{OD_s - OD_m} \quad (1)$$

где: L_{rs} — интенсивность ненормализованной люминесценции биосенсора с тестируемым образцом (sample) и индуктором (в условных единицах); OD_s — оптическая плотность культуры биосенсора с тестируемым образцом (sample) и индуктором, OD_m — оптическая плотность питательной среды биосенсора.

Коэффициент индукции промотора биосенсора вычисляется по формуле:

$$I = \frac{L_s}{L_c} - 1 \quad (2)$$

где: L_s — интенсивность люминесценции тестируемого образца (sample) с индуктором (в условных единицах); L_c — интенсивность люминесценции контрольной пробы (отрицательного контроля, содержащего питательную среду) (в условных единицах).

$$A = \left(1 - \frac{I_s}{I_{pc}}\right) \times 100\% \quad (3)$$

где: I_s и I_{pc} — коэффициенты индукции люминесценции в присутствии тестируемой культуральной жидкости и индуктора, а также в положительном контроле, содержащем питательную среду и индуктор, соответственно.

В работе [15] описывается первое применение биолюминесцентного анализа для высокопроизводительного скрининга антиоксидантной активности культуральных жидкостей штаммов рода *Lactobacillus*, изолированных из различных биотопов макроорганизма (кишечник, ротовая полость, влагалище). В рамках исследования была проведена оценка представителей видов *L. brevis*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. helveticus*, *L. plantarum* и *L. rhamnosus*.

3.1. Преимущества биолюминесцентного подхода Применение указанного метода обладает рядом существенных достоинств:

Биологическая адекватность: в отличие от бесклеточных химических моделей (*in vitro*), метод позволяет оценивать способность антиоксидантных метаболитов нейтрализовать активные формы кислорода (АФК) непосредственно в клеточной системе, что обеспечивает более высокую предиктивную ценность.

Высокая чувствительность: использование люциферазных репортерных систем обеспечивает детекцию даже незначительных колебаний уровня окислительного стресса.

Высокая производительность: формат 96-луночных планшетов в сочетании с автоматизированным считыванием сигнала оптимизирует процесс скрининга обширных коллекций штаммов.

3.2. Ограничения метода и факторы, влияющие на воспроизводимость результатов Наряду с преимуществами, применение биолюминесцентного тестирования сопряжено с рядом методологических ограничений, требующих учета при интерпретации данных.

Видовая специфичность тест-объекта. Фундаментальным ограничением является использование в качестве тест-системы рекомбинантных штаммов *Escherichia coli* (прокариот). Как справедливо отмечают Nowak и соавт. (2019), метаболические пути и механизмы антиоксидантной защиты прокариот и эукариот имеют существенные различия, что может обуславливать нестрогую корреляцию результатов, полученных на бактериальной модели, с эффектами в клетках млекопитающих [21]. Кроме того, антиоксиданты, демонстрирующие эффективность на прокариотической модели, могут обладать иной биодоступностью и профилем метаболизма в организме человека.

Необходимость строгой стандартизации. Результаты анализа критически зависят от параметров культивирования лактобацилл. Марсова и соавт. [20] подчеркивают, что антиоксидантный потенциал культуральной жидкости вариабелен и определяется фазой роста культуры, условиями анаэробнозиса, составом питательной среды и протоколом получения бесклеточных супернатантов. Особое внимание уделяется необходимости нейтрализации pH образца до нейтральных значений (с помощью 0,1 М раствора NaOH или буферных систем) для исключения артефактного влияния кислотности на люминесцентный сигнал [20]. Указанные факторы усложняют межлабораторное сравнение данных и диктуют необходимость разработки унифицированных протоколов культивирования и пробоподготовки.

Заключение Изучение механизмов действия метаболитов пробиотических микроорганизмов остается одним из приоритетных направлений современной биотехнологии и биомедицины. Биолюминесцентный анализ на основе рекомбинантных штаммов *E. coli* зарекомендовал себя как высокоэффективный инструмент скрининга антиоксидантного потенциала пробиотиков. Данная методология обеспечивает объективную количественную оценку способности метаболитов элиминировать АФК и минимизировать окислительные повреждения ДНК, позволяя проводить строгую

верификацию свойств штаммов в стандартизованных условиях. Интеграция люминесцентного экспресс-анализа в алгоритм первичного отбора существенно оптимизирует временные и экономические затраты, ускоряя идентификацию перспективных продуцентов для разработки инновационных пробиотических и постбиотических препаратов.

Список литературы:

1. Araya M. et al.. Guidelines for the evaluation of probiotics in food // London: world Health organization, on, canada: food and agriculture organization. 2002.
2. Корниенко Е.А. Пробиотики, постбиотики и парaproбиотики // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2022. No. 9 (205). С. 240-250. <https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-205-9-240-250>
3. Averina O. V, Poluektova E.U., Marsova M. V, Danilenko V.N. Biomarkers and utility of the antioxidant potential of probiotic Lactobacilli and Bifidobacteria as representatives of the human gut microbiota // Biomedicines. 2021. Vol. 9. №. 10. P. 1340.
4. Голобородько Е.В., Кретов А.С., Макаров Д.Ю. Немедикаментозные методы повышения радиорезистентности (обзор литературы) // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2026. Т. 71. No. 3.
5. Gao Y., Liang Q., Sun J., Wu X., Song Y., Xu Y., Nie H., Huang J., Mu G. Probiotic potential of lactic acid bacteria with antioxidant properties in modulating health: Mechanisms, applications, and future directions // Food Bioscience. 2025. Vol. 66. P. 106181.
6. Łepecka A., Kołożyn-Krajewska D. Antioxidant Properties of Food-Derived Lactic Acid Bacteria: A Review // Microbial Biotechnology. 2025. Vol. 18. No. 9. P. e70229.
7. Tsilingiri K., Rescigno M. Postbiotics: what else? // Beneficial microbes. 2013. Vol. 4. № 1. P. 101-107.
8. Ijiri M., Fujiya M., Konishi H., Tanaka H., Ueno N., Kashima S., Moriichi K., Sasajima J., Ikuta K., Okumura T. Ferrichrome identified from Lactobacillus casei ATCC334 induces apoptosis through its iron-binding site in gastric cancer cells // Tumor Biology. 2017. Vol. 39. № 6. P. 1010428317711311.
9. Aboubaker D.H. Lactobacillus in cancer therapy: A critical mechanistic review // Journal of Agriculture and Food Research. 2025. Vol. 23. P. 102256.
10. Alcántara C., Crespo A., Solís C.L.S., Devesa V., Vélez D., Monedero V., Zúñiga M. Lipoteichoic acid depletion in Lactobacillus impacts cell morphology and stress response but does not abolish mercury surface binding // Beneficial microbes. 2020. Vol. 11. № 8. P. 791-802.
11. Bhattacharyya M., Easmin S., Sharma D., Porasar P., Karmakar T., Dutta K.N., Sahu R., Nandi G., Paul P., Dua T.K. Exploring the potential of probiotics in mercury detoxification: a systemic review // Medicine in Omics. 2026. P. 100054.
12. Chin Y., Huang C.-C., Hsu I.-L., Tsai W.-H., Chou C.-H., Fang Y., Su J., Yeh Y.-T., Tsai H.-Y., Huang C.-H. Lactobacillus protects against lead-induced hepatotoxicity by preserving the gut barrier and microbiota remodeling // BMC microbiology. 2026. Vol. 26. № 1. P. 396.

13. Khodaii Z., Ghaderian S.M.H., Natanzi M.M. Probiotic bacteria and their supernatants protect enterocyte cell lines from enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) invasion // International journal of molecular and cellular medicine. 2017. Vol. 6. No. 3. P. 183.
14. Бец В.Д., Ачасова К.М., Борисова М.А. Роль гликопротеина муцин и L-фукозы во взаимодействии иммунитета и микрофлоры на примере экспериментальной модели воспалительных заболеваний кишечника // Биохимия. 2022. Т. 87. №. 3. P. 356-375.
15. Marsova M., Abilev S., Poluektova E., Danilenko V. A bioluminescent test system reveals valuable antioxidant properties of lactobacillus strains from human microbiota // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2018. Vol. 34. № 2. P. 27.
16. Котова В.Ю., Манухов И.В., Завильгельский Г.Б. Лух-биосенсоры для детекции SOS-ответа, теплового шока и окислительного стресса // Биотехнология. 2009. № 6. С. 16-25.
17. Bazhenov S. V, Novoyatlova U.S., Scheglova E.S., Prazdnova E. V, Mazanko M.S., Kessenikh A.G., Kononchuk O. V, Gnuchikh E.Y., Liu Y., Al Ebrahim R., Zavilgelsky G.B., Chistyakov V.A., Manukhov I. V Bacterial lux-biosensors: Constructing, applications, and prospects // Biosensors and Bioelectronics: X. 2023. Vol. 13. P. 100323.
18. Mazanko M.S., Mazanko E. V, Emelyantsev S.A., Chikindas M.L., Rudoy D. V Lactobacilli and gut pH: features of correlation in model experiments//Brazilian Journal of Microbiology, 2025, Vol. 56, No. 3, P. 1471-1481.
19. Mazanko M.S., Prazdnova E. V, Kulikov M.P., Maltseva T.A., Rudoy D. V, Chikindas M.L. Antioxidant and antimutagenic properties of probiotic Lactobacilli determined using LUX-biosensors // Enzyme and Microbial Technology. 2022. Vol. 155. P. 109980.
20. Popov I. V, Emelyantsev S.A., Popov I. V, Prazdnova E. V, Berezinskaia I.S., Koroleva I.B., Gorobets V.E., Tsurkova I.S., Aleshukina A. V, Tverdokhlebova T.I. Seasonal Variation in the Mutagenic and Oxidative Properties of Gut Microbiota in Active and Hibernating Common Noctules (*Nyctalus noctula*) // Current Microbiology. 2026. Vol. 83. No. 3. P. 148.
21. Nowak A., Paliwoda A., Błasiak J. Anti-proliferative, pro-apoptotic and anti-oxidative activity of Lactobacillus and Bifidobacterium strains: A review of mechanisms and therapeutic perspectives // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2019. Vol. 59. № 21. P. 3456-3467.

References:

1. Araya M. et al.. Guidelines for the evaluation of probiotics in food // London: world Health organization, on, canada: food and agriculture organization. 2002.
2. Kornienko E.A. Probiotics, postbiotics, and paraprobiotics // Experimental and Clinical Gastroenterology. 2022. No. 9 (205). P. 240–250. <https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-205-9-240-250>
3. Averina O. V, Poluektova E.U., Marsova M. V, Danilenko V.N. Biomarkers and utility of the antioxidant potential of probiotic Lactobacilli and Bifidobacteria as representatives of the human gut microbiota // Biomedicines. 2021. Vol. 9. №. 10. P. 1340.

4. Goloborodko E.V., Kretov A.S., Makarov D.Yu. Non-pharmacological methods for increasing radioresistance (literature review) // Medical Radiology and Radiation Safety. 2026. Vol. 71. No. 3.
5. Gao Y., Liang Q., Sun J., Wu X., Song Y., Xu Y., Nie H., Huang J., Mu G. Probiotic potential of lactic acid bacteria with antioxidant properties in modulating health: Mechanisms, applications, and future directions // Food Bioscience. 2025. Vol. 66. P. 106181.
6. Łepecka A., Kołożyn-Krajewska D. Antioxidant Properties of Food-Derived Lactic Acid Bacteria: A Review // Microbial Biotechnology. 2025. Vol. 18. No. 9. P. e70229.
7. Tsilingiri K., Rescigno M. Postbiotics: what else? // Beneficial microbes. 2013. Vol. 4. № 1. P. 101-107.
8. Ijiri M., Fujiya M., Konishi H., Tanaka H., Ueno N., Kashima S., Moriichi K., Sasajima J., Ikuta K., Okumura T. Ferrichrome identified from *Lactobacillus casei* ATCC334 induces apoptosis through its iron-binding site in gastric cancer cells // Tumor Biology. 2017. Vol. 39. № 6. P. 1010428317711311.
9. Aboubaker D.H. *Lactobacillus* in cancer therapy: A critical mechanistic review // Journal of Agriculture and Food Research. 2025. Vol. 23. P. 102256.
10. Alcántara C., Crespo A., Solís C.L.S., Devesa V., Vélez D., Monedero V., Zúñiga M. Lipoteichoic acid depletion in *Lactobacillus* impacts cell morphology and stress response but does not abolish mercury surface binding // Beneficial microbes. 2020. Vol. 11. № 8. P. 791-802.
11. Bhattacharyya M., Easmin S., Sharma D., Porasar P., Karmakar T., Dutta K.N., Sahu R., Nandi G., Paul P., Dua T.K. Exploring the potential of probiotics in mercury detoxification: a systemic review // Medicine in Omics. 2026. P. 100054.
12. Chin Y., Huang C.-C., Hsu I.-L., Tsai W.-H., Chou C.-H., Fang Y., Su J., Yeh Y.-T., Tsai H.-Y., Huang C.-H. *Lactobacillus* protects against lead-induced hepatotoxicity by preserving the gut barrier and microbiota remodeling // BMC microbiology. 2026. Vol. 26. № 1. P. 396.
13. Khodaii Z., Ghaderian S.M.H., Natanzi M.M. Probiotic bacteria and their supernatants protect enterocyte cell lines from enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) invasion // International journal of molecular and cellular medicine. 2017. Vol. 6. No. 3. P. 183.
14. Bets V.D., Achasova K.M., Borisova M.A. Role of mucin glycoprotein and L-fucose in the interaction between immunity and microflora: an experimental model of inflammatory bowel disease // Biochemistry (Moscow). 2022. Vol. 87. No. 3. P. 356–375.
15. Marsova M., Abilev S., Poluektova E., Danilenko V. A bioluminescent test system reveals valuable antioxidant properties of *Lactobacillus* strains from human microbiota // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2018. Vol. 34. № 2. P. 27.
16. Kotova V.Yu., Manukhov I.V., Zavilgelsky G.B. Lux-biosensors for the detection of SOS response, heat shock, and oxidative stress // Biotechnology. 2009. No. 6. P. 16–25.
17. Bazhenov S. V, Novoyatlova U.S., Scheglova E.S., Prazdnova E. V, Mazanko M.S., Kessenikh A.G., Kononchuk O. V, Gnuchikh E.Y., Liu Y., Al Ebrahim R., Zavilgelsky G.B., Chistyakov V.A., Manukhov I. V Bacterial lux-biosensors: Constructing, applications, and prospects // Biosensors and Bioelectronics: X. 2023. Vol. 13. P. 100323.

18. Mazanko M.S., Mazanko E. V, Emelyantsev S.A., Chikindas M.L., Rudoy D. V Lactobacilli and gut pH: features of correlation in model experiments//Brazilian Journal of Microbiology, 2025, Vol. 56, No. 3, P. 1471-1481.
19. Mazanko M.S., Prazdnova E. V, Kulikov M.P., Maltseva T.A., Rudoy D. V, Chikindas M.L. Antioxidant and antimutagenic properties of probiotic Lactobacilli determined using LUX-biosensors // Enzyme and Microbial Technology. 2022. Vol. 155. P. 109980.
20. Popov I. V, Emelyantsev S.A., Popov I. V, Prazdnova E. V, Berezinskaia I.S., Koroleva I.B., Gorobets V.E., Tsurkova I.S., Aleshukina A. V, Tverdokhlebova T.I. Seasonal Variation in the Mutagenic and Oxidative Properties of Gut Microbiota in Active and Hibernating Common Noctules (*Nyctalus noctula*) // Current Microbiology. 2026. Vol. 83. No. 3. P. 148.
21. Nowak A., Paliwoda A., Błasiak J. Anti-proliferative, pro-apoptotic and anti-oxidative activity of Lactobacillus and Bifidobacterium strains: A review of mechanisms and therapeutic perspectives // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2019. Vol. 59. № 21. P. 3456-3467.