

АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

© 2022 г. А. Л. Брюханов^а, А. И. Клишко^{а, *}, А. И. Нетрусов^а^аМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119991 Россия

*e-mail: alenaklimko221@yandex.ru

Поступила в редакцию 18.04.2022 г.

После доработки 27.05.2022 г.

Принята к публикации 30.05.2022 г.

Молочнокислые бактерии (МКБ) широко используют во многих ферментационных процессах при приготовлении разнообразных продуктов питания, включающих в себя не только молочные и мясные, но также и овощные продукты. В ходе промышленных биотехнологических процессов лактобактерии часто подвергаются окислительным стрессам, которые возникают из-за накопления активных форм кислорода (АФК) внутри клеток. АФК образуются в результате неполного восстановления молекулярного кислорода до супероксидного радикала ($O_2^{\cdot-}$), пероксида водорода (H_2O_2) или гидроксильного радикала (OH^{\cdot}) и вызывают серьезные повреждения клеточных макромолекул. У МКБ отсутствует полная электрон-транспортная цепь (ЭТЦ), поэтому ранее считалось, что они не способны к существованию в аэробных условиях. В клетках ряда штаммов МКБ были обнаружены основные ферменты антиоксидантной защиты с высокой специфической активностью: два типа каталазы и НАДН-пероксидазы. Гемовые каталазы присутствуют у многих видов лактобактерий при условии наличия гема или гематина в питательной среде, причем в клетках были найдены как монофункциональные, так и бифункциональные каталазы-пероксидазы. Каталазы второго типа (Mn-содержащие), не требующие наличия гема, также были обнаружены в клетках некоторых лактобацилл, и именно у МКБ наблюдается высокий уровень содержания Mn(II) внутри клеток. Пробиотические культуры МКБ с выраженной антиоксидантной активностью очень востребованы, поскольку они потенциально способны защитить от токсичного воздействия O_2 организм хозяина, и способствуют профилактике сердечно-сосудистых, воспалительных, онкологических заболеваний. В обзоре на основе тщательного анализа известных к настоящему времени научных данных описаны системы антиоксидантной защиты в клетках МКБ – влияние окислительных стрессов на метаболизм лактобактерий, их основные антиоксидантные ферменты (НАДН-оксидазы, НАДН-пероксидазы, каталазы, супероксиддисмутазы, тиоредоксинредуктазы и др.), а также ключевые регуляторные белки и гены, отвечающие за поглощение кислорода, как один из механизмов снижения концентрации АФК.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, активные формы кислорода, супероксиддисмутазы, каталаза, пероксидаза, окислительный стресс, электрон-транспортная цепь

DOI: 10.31857/S0026365622100329

МКБ – микроорганизмы с бродильным типом метаболизма, которые не нуждаются в кислороде для роста. Однако они могут расти и в аэробных условиях, поскольку пируват, образующийся в реакциях пути Эмбдена–Мейергофа–Парнаса или фосфокетотазового пути, может метаболизироваться аэробно, превращаясь в ацетилфосфат и ацетат (Kandler, 1983; Guidone et al., 2013). Так, в присутствии кислорода у *Lactocaseibacillus casei* происходит изменение путей конверсии пирувата с уменьшением синтеза молочной кислоты и образованием ацетата, ацетоина и диацетила для поддержания восстановительного баланса. В условиях поглощения кислорода наблюдалось увеличение экспрессии генов, кодирующих пируватоксидазу, ацетаткиназу, α -ацетолактатдекарбоксилазу, ацетолактатсинтазу и оксалоацетатдекарбоксилазу, в

то время как экспрессия генов, кодирующих L-лактатдегидрогеназу, пируватформатлиазу, пируваткарбоксилазу и фосфатацетилтрансферазу, снижалась (Ricciardi et al., 2019).

Многие виды рода *Lactobacillus* и близкородственных родов (Zheng et al., 2020), традиционно классифицируемых как аэротолерантные анаэробные микроорганизмы, могут использовать кислород в качестве субстрата для реакций, которые катализируются флавиновыми оксидазами, а в ряде случаев способны к синтезу минимальной дыхательной электрон-транспортной цепи. Штаммы таких широко распространенных видов, как *L. casei*, *Lactiplantibacillus plantarum* и *Latilactobacillus sakei*, хорошо приспособлены к аэробно-дыхательному росту (Zotta et al., 2017).

МКБ, нашедшие применение в качестве одного из наиболее распространенных пробиотиков в ферментированных продуктах и напитках, а также используемые в качестве полезных для здоровья пищевых добавок, обладают многочисленными пробиотическими свойствами (Klimko et al., 2020), одними из которых являются аэротолерантность клеток (Брюханов, Нетрусов, 2007) и способность к повышению антиоксидантного статуса организма хозяина (Noureen et al., 2019).

На ряде факультативно анаэробных штаммов *L. plantarum*, *Lactiplantibacillus paraplantarum*, *Lactiplantibacillus pentosus* и *L. casei* было показано (Watanabe et al., 2012; Guidone et al., 2013; Ianniello et al., 2016), что культивирование с аэрацией увеличивает выход биомассы в стационарной фазе роста, особенно в случае внесения в питательную среду гема и менахинона (для формирования дыхательной ЭТЦ, что значительно повышало устойчивость клеток к пероксидному и кислородному стрессам). МКБ образуют H_2O_2 только в аэробных условиях, причем способность к синтезу пероксида водорода является важным пробиотическим свойством, поскольку приводит к гибели патогенной микробиоты, в частности, *Salmonella enterica* (Pridmore et al., 2008).

МКБ подразделяют на гомоферментативные и гетероферментативные виды. Среди гомоферментативных лактобацилл способность расти аэробно была обнаружена у *Lactobacillus johnsonii* и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. У *L. johnsonii* отсутствуют пируватдегидрогеназа и пируват-формиатлиаза, а CO_2 образуется через пируват-оксидазный и ацетат-киназный пути (Zotta et al., 2017).

Среди представителей МКБ, осуществляющих гетероферментативное молочнокислое брожение, были также обнаружены лактобациллы, способные расти в присутствии кислорода. К ним относят *Fructilactobacillus sanfranciscensis*, *Limosilactobacillus panis*, *Lentilactobacillus buchneri*, *Limosilactobacillus reuteri* и *Levilactobacillus spicheri*. У *F. sanfranciscensis* и *L. panis*, применяемых в производстве заквасок, аэробный рост увеличивал энергетический выход метаболических процессов и продукцию биомассы, тогда как активность НАДФН-оксидазы и NPR (non-expressor pathogen-related genes – регуляторный белок, содержащий тиоловые группы) влияла на клеточный баланс НАДН/НАД⁺ и устойчивость к окислительным стрессам (Zotta et al., 2017).

В клетках молочнокислых бактерий НАДН-оксидазная/НАДН-пероксидазная система является альтернативным путем для регенерации НАД⁺, наряду с конверсией пирувата в лактат и этанол. Пируват затем конвертируется в ацетат, что выражается в дополнительном моле АТФ. Оксидазные активности приводят к образованию токсичных для клетки АФК. Поэтому наличие кислорода

индуцирует специфические клеточные ответы. Микроорганизмы могут использовать ферментативные (супероксиддисмутаза, каталаза, НАДН-оксидаза, НАДН-пероксидаза) или неферментативные (Mn^{2+} , аскорбат, токоферолы, глутатион) механизмы для удаления кислородных радикалов (De Angelis, Gobbetti, 2004).

Некоторые штаммы *L. reuteri* способны расти в условиях пероксидного стресса за счет активности 1,3-пропандиол: НАД⁺ оксидоредуктазы, кодируемой геном *dhaT* и способной к инактивации H_2O_2 в присутствии НАДН (Arcanjo et al., 2019).

Необходимо отметить, что отношение МКБ к воздействию активных форм кислорода, которые образуются в ходе промышленных процессов или во время прохождения клеток по желудочно-кишечному тракту, очень часто является штаммоспецифическим свойством, что выражается в различной экспрессии генов, кодирующих белки метаболизма, окислительных стрессов, транскрипции, формирования клеточной стенки и др. (Marques Da Silva et al., 2019). Были показаны значительные штаммовые различия между представителями родов *Lactobacillus* и *Lactococcus* в отношении их антиоксидантных свойств: способности к элиминации свободных радикалов, ингибирования окисления аскорбиновой и линолевой кислот, внутриклеточного содержания супероксиддисмутазы (СОД) и глутатиона (Amaretti et al., 2013; Choork et al., 2017). Штаммы *Limosilactobacillus fermentum*, *Lactocaseibacillus paracasei* и *Lactocaseibacillus rhamnosus* с наиболее высокими антиоксидантными активностями обладали и хорошей устойчивостью к окислительным стрессам (8-ч инкубации с 1 мМ H_2O_2 или 1-ч инкубации с 1 мМ OH^{\cdot}) (Choork et al., 2017). Также хорошим антиоксидантным потенциалом в качестве пробиотических культур обладали некоторые штаммы *Lactobacillus acidophilus* и *Levilactobacillus brevis* (Amaretti et al., 2013). Улучшение антиоксидантных свойств штаммов (например, наличие в клетках ферментов окислительного стресса с высокими активностями, а также тиолов), в том числе и с помощью методов геной инженерии, представляет собой очень эффективный подход к повышению выживаемости штаммов МКБ в окружающей среде.

ЭЛЕКТРОН-ТРАНСПОРТНЫЕ ЦЕПИ, УЧАСТВУЮЩИЕ В ПОГЛОЩЕНИИ КИСЛОРОДА КЛЕТКАМИ МКБ

Восстановление кислорода в электрон-транспортной цепи *Lactiplantibacillus plantarum*. Электрон-транспортная цепь (ЭТЦ) клеток *L. plantarum* WCFS1, формируемая в аэробных дыхательных условиях (после добавления в среду гема и менахинона) содержит НАДН-дегидрогеназу (Ndh1), пул менахинонов (витамин K_2) и цитохромов *bd*-ти-

па. Данный участок ЭТЦ способен активироваться и восстанавливать низкие концентрации кислорода. Однако следует подчеркнуть, что оксидаза *bd*-типа из клеток *L. plantarum* WCFS1 не была выделена и очищена для сравнения ее свойств с классическими цитохромоксидазами *bd* (рис. 1; Brooijmans et al., 2009a).

Одной из предложенных классификаций МКБ (табл. 1) является ранжирование видов по их способности к восстановлению кислорода в зависимости от наличия или отсутствия генов *cydABCD*, кодирующих синтез цитохром *bd*-оксидазного комплекса (Pedersen et al., 2012). Те МКБ, которые не способны к внутриклеточному восстановлению кислорода, не имеют генов *cyd*. Необходимо отметить, что близкородственные виды не обязательно находятся в одной категории по наличию ферментов восстановления O_2 .

Анализ данных, приведенных в табл. 1, показывает, что для восстановления кислорода представителям семейства *Streptococcaceae* необходим экзогенный гем в питательной среде, тогда как для основного пула изученных культур МКБ необходимо внесение еще и менахинона. Интересно отметить, что патогенные стрептококки, приспособившись к развитию в организмах животных, утратили гены, необходимые для восстановления кислорода. Этот факт подтверждает предположение, выдвинутое голландской группой (Brooijmans et al., 2009a), что эволюционные предшественники МКБ имели группы генов, кодирующие оксидазы, однако со временем утеряли их вследствие множественных делеций при переходе к преимущественно анаэробному образу жизни. Те же МКБ, которые сохранили способность к аэробному дыханию, рассматривают в настоящее время как потенциально активные пробиотические и стартовые культуры для молочной и мясной промышленности из-за их большей устойчивости к кислородным стрессам.

Гем как вспомогательный компонент электрон-транспортной цепи. Процесс восстановления кислорода у факультативно анаэробной МКБ *Lc. lactis* можно индуцировать добавлением предшественников гема, что приводит к повышению эффективности роста культуры с удвоением выхода биомассы, а также выживаемости клеток в условиях аэрации. У лактококков улучшается рост в присутствии O_2 и протопорфирина IX в среде из-за адаптивной перестройки метаболизма с брожения на дыхание (Duwat et al., 2001; Shi et al., 2016). Показано, что ген *cydA*, кодирующий цитохром *d*-оксидазу и непосредственно участвующий в поглощении кислорода, а также ген *hemZ*, кодирующий феррохелатазу (конвертирует протопорфирин IX в гем), экспрессируются в поздней логарифмической стадии роста культур *Lc. lactis* в аэробных условиях (Duwat et al., 2001).

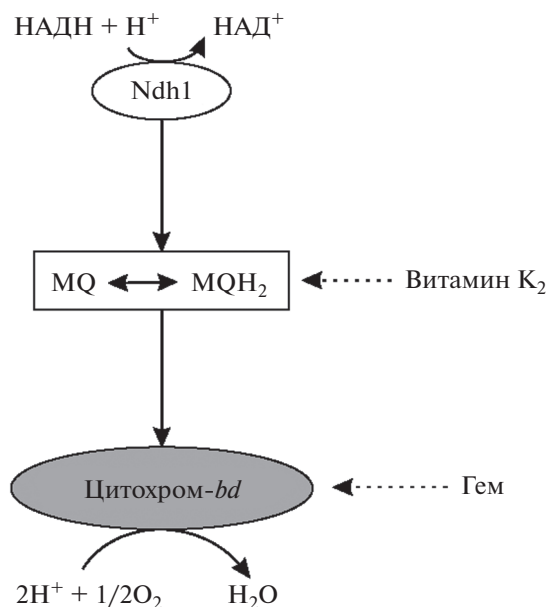


Рис. 1. Предполагаемая электрон-транспортная цепь у *Lactiplantibacillus plantarum* WCFS1, разветвленная на уровне оксидаз. Пунктирные стрелки показывают внеклеточное происхождение менахинона и гема. Ndh – НАДН-дегидрогеназа, MQ – менахинон, MQH₂ – менахинол (по Brooijmans et al., 2009a).

Как биоактивная молекула, гем может вовлекаться не только в процесс восстановления кислорода. Например, некоторые лактобактерии, включая и те, что неспособны к поглощению O_2 , синтезируют активную гем-зависимую каталазу при росте в аэробных условиях в присутствии гематина, защищающую клетки от эндогенного H_2O_2 (Wolf et al., 1991; Frankenberg et al., 2002). Ни один представитель молочнокислых бактерий не способен к синтезу гема, поэтому им необходима транспортная система, обеспечивающая его поглощение. Например, у *Lc. lactis* эту функцию выполняет оперон *fhuDBAR* (Gaudu et al., 2003; Pedersen et al., 2012). Затем гему необходимо связаться с мембраной клетки. Он может быть включен в состав белков-шаперонов. Хорошим кандидатом на роль гем-связывающего белка является алкилгидропероксидредуктаза (AhpC, один из ключевых белков окислительного стресса), которая способна защитить внутриклеточный гем от деградации (Lechardeur et al., 2010). Другой комплекс – CydCD, который входит в состав цитохром *bd*-оксидазы вместе с CydAB, активен в восстановленных условиях и транспортирует цистеин и глутатион, которые могут способствовать взаимодействию CydAB с гемом (Pittman et al., 2005).

Несмотря на то, что гем играет важную роль в реакциях поглощения и элиминации токсичного кислорода (Kumar, Vandyopadhyay, 2005), клеткам необходимо также наличие механизмов, обеспе-

Таблица 1. Примеры молочнокислых бактерий в зависимости от прогнозируемого (наличие генов *cydABCD*) или подтвержденного способа восстановления кислорода (по Pedersen et al., 2012)

Способ восстановления кислорода	<i>Streptococcaceae</i>	Лактобациллы (прежнее название – <i>Lactobacillaceae</i>)
Восстановление кислорода в присутствии экзогенного гема	<i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactococcus garviae</i>	
Восстановление кислорода в присутствии экзогенного гема и менахинона		<i>Limosilactobacillus antri</i> (<i>Lactobacillus antri</i>) <i>Levilactobacillus brevis</i> (<i>Lactobacillus brevis</i>) <i>Lentilactobacillus buchneri</i> (<i>Lactobacillus buchneri</i>) <i>Lactobacillus casei</i> <i>Loigolactobacillus coryniformis</i> (<i>Lactobacillus coryniformis</i>) <i>Lactobacillus crispatus</i> <i>Limosilactobacillus fermentum</i> (<i>Lactobacillus fermentum</i>) <i>Lactobacillus gasseri</i> <i>Lentilactobacillus hilgardii</i> (<i>Lactobacillus hilgardii</i>) <i>Lactobacillus johnsonii</i> <i>Limosilactobacillus oris</i> (<i>Lactobacillus oris</i>) <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> (<i>Lactobacillus paracasei</i>) <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (<i>Lactobacillus plantarum</i>) <i>Limosilactobacillus reuteri</i> (<i>Lactobacillus reuteri</i>) <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> (<i>Lactobacillus rhamnosus</i>) <i>Ligilactobacillus salivarius</i> (<i>Lactobacillus salivarius</i>) <i>Lactobacillus ultunensis</i> <i>Limosilactobacillus vaginalis</i> (<i>Lactobacillus vaginalis</i>)
Отсутствие внутриклеточного восстановления кислорода		<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> <i>Lactobacillus iners</i> <i>Latilactobacillus sakei</i>

чивающих выведение гема, во избежание токсических эффектов самого гема (Pedersen et al., 2012). Так, *Lc. lactis* обладает специальной системой оттока гема (HrtRBA), максимальная активность которой наблюдается во время избытка гема, что препятствует накоплению последнего. Следует отметить, что среди многочисленных МКБ, обладающих системами HrtRBA и/или Pef (менее строгая система, выводящая из клеток помимо гема еще и протопорфирин IX), некоторые штаммы не обладают способностью поглощать кислород (Pedersen et al., 2012).

Восстановление кислорода с участием менахинонов. Менахиноны (MX) – это ассоциированные с мембранами сложные органические соединения с окислительно-восстановительными свойствами, относящиеся к витаминам типа K₂. Они представляют собой нафтоидное кольцо, ковалентно связанное с гидрофобной изопреноидной цепью, состоящей из повторяющихся изопреновых единиц. В качестве центрального компонента ЭТЦ менахиноны переносят электроны от восстановителей (например, дегидрогеназ) к оксидоредуктазам (например, CydAB). Инактивация синтеза нафтоидных колец у *Lc. lactis* препятствует дальнейшему

процессу восстановления кислорода, но только если в комплекс не входит экзогенный менахинон (Rezaïki et al., 2008; Brooijmans et al., 2009b).

Можно предположить, что каждый тип менахинона выполняет определенную функцию, так как их биосинтез не прекращается даже в отсутствие кислорода. Помимо ЭТЦ с участием CydAB, экзогенные менахиноны переносят электроны от белковых комплексов, таких как нитратредуктазы и фумаратредуктазы, в процессах анаэробного дыхания у *L. plantarum* (Brooijmans et al., 2009b). Кроме того, менахиноны снижают внутриклеточную концентрацию меди и железа (Rezaïki et al., 2008; Tachon et al., 2009).

Таким образом, молочнокислые бактерии, не способные к синтезу необходимых для восстановления кислорода соединений, используют для активации этого процесса экзогенный гем или, в случае некоторых видов, гем и менахинон (Pedersen et al., 2012; Lin et al., 2016). Активация гемом и/или менахиноном процесса поглощения кислорода уменьшала его негативное воздействие за счет положительной регуляции центрального углеводного и энергетического метаболизма и сохранения оптимального окислительно-восстано-

вительного баланса, что приводило к улучшению роста и повышению аэротолерантности ряда штаммов МКБ (Siciliano et al., 2019).

ДЕЙСТВИЕ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА НА КЛЕТКИ

Окислительные повреждения клеток. На молекулярном уровне продукты неполного восстановления кислорода или, как их еще называют, активные формы кислорода ($O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} и H_2O_2) могут вступать в реакции с белками, липидами и нуклеиновыми кислотами. Супероксид анион-радикал имеет умеренный окислительный потенциал и может взаимодействовать с полифенолами, аскорбатом и катехоламинами, а также с молекулами нуклеиновых кислот (Fridovich, 1998). Кроме того, $O_2^{\cdot-}$, быстро диффундирующий в клетки, повреждает белки, содержащие [Fe-S]-кластеры, например, фумаразу или фумаратредуктазу (Amanatidou et al., 2001). Воздействие H_2O_2 приводит к карбонилированию белков и непосредственному окислению цистеиновых остатков в белковых молекулах, вызывая, таким образом, инактивацию многих ферментов (Storz, Imlay, 1999; Arcanjo et al., 2019). Пероксид водорода также может вступать в реакцию с катионами, такими как Fe^{2+} и Cu^+ , и приводить к образованию OH^{\cdot} по реакции Фентона (Duwat et al., 1995; Fridovich, 1998). Гидроксил-радикал, образуемый в реакции супероксид анион-радикала с пероксидом водорода, является сильным и весьма реакционноспособным окислительным агентом, который может окислять большинство органических соединений и разрывать (а также модифицировать) цепи ДНК и РНК, особенно опасно его воздействие на гемопротеины и липиды (Czapski, 1984; Fridovich, 1998; Kang et al., 2013).

Активные формы кислорода у бифидо- и лактобактерий могут образовываться через НАД(Ф)Н-оксидазные системы (рис. 2). В частности, у *Bifidobacterium bifidum* основным продуцентом H_2O_2 является дигидрооротатдегидрогеназа типа *b*, очищенная из НАДН-оксидазной фракции белков (Satoh et al., 2019), а у *B. longum* ssp. *infantis* аэробное образование H_2O_2 обусловлено НАДФН-оксидазой (Tanaka et al., 2018). Многие виды микроорганизмов, в том числе и МКБ, в ходе эволюции сформировали эффективные и тонко регулируемые антиоксидантные системы защиты, такие, как внутриклеточные окислительно-восстановительные циклы с участием тиолов (глутатиона [GSH] и тиоредоксина [TRX]), ферменты антиоксидантной защиты (каталаза и супероксиддисмутаза, которые играют взаимодополняющую и синергичную роль в биохимических путях удаления АФК) и электрон-транспортные цепи вос-

становления кислорода (с участием гема и/или менахинона). Эти системы защищают клетки от окислительных стрессов, уменьшая потенциальные повреждения макромолекул от АФК, и помогают поддерживать оптимальный окислительно-восстановительный потенциал, что способствует защите клеток и от многочисленных иных стрессовых воздействий в окружающей среде — осмотических, кислотных, температурных и т.д. (Zhang, Li, 2013).

Влияние окислительных стрессов на метаболизм МКБ. Многие последствия влияния кислорода и его активных форм заметны и на метаболическом уровне. Например, *Lc. lactis* в анаэробных условиях способен преобразовывать различные углеводы в молочную кислоту. В этих условиях две молекулы НАДН, полученные в ходе окисления глицеральдегид-3-фосфата, окисляются, чтобы способствовать превращению пирувата в молочную кислоту под действием лактатдегидрогеназы. Соотношение НАДН/НАД⁺ играет определяющую роль в контроле сдвига от молочнокислого к смешанному брожению у *Lc. lactis* (Garrigues et al., 1997). Пируватдегидрогеназный комплекс катализирует восстановление НАД⁺ при окислении пирувата. Функционирование этого пути также подтверждается накоплением ацетата. Кроме того, ацетатный путь производит одну молекулу АТФ, что энергетически выгодно по сравнению с образованием молочной кислоты (Vido et al., 2004; Rezaiki et al., 2008). Таким образом, уменьшение содержания НАДН в клетке коррелирует со снижением образования лактата в условиях дыхания по сравнению с брожением.

При культивировании пробиотических МКБ *Lactobacillus acidophilus* и *Bifidobacterium* spp. в присутствии кислорода (5–21%) образование молочной кислоты клетками *L. acidophilus* уменьшалось с возрастанием концентрации O_2 , как и соотношение лактат/ацетат для бифидобактерий; специфические активности НАДН-оксидазы и НАДН-пероксидазы в аэробных условиях у многих МКБ были существенно выше, чем при анаэробнозе (Talwalkar, Kailasapathy, 2003).

Исследования, проведенные на *L. plantarum*, показали, что, в дополнение к использованию O_2 (через цитохром *bd*-оксидазу), эта бактерия может также использовать фумарат и нитрат в качестве акцепторов электронов. Такое анаэробное дыхание по-прежнему требует гема в качестве кофактора. Инактивация НАДН-дегидрогеназы у *L. plantarum* делает невозможным аэробное дыхание, однако при этом не влияет на анаэробное нитратное дыхание, что говорит о наличии других доноров электронов при анаэробном метаболизме (Pedersen et al., 2012).

Анализируя энергетический метаболизм *Lc. lactis* (рис. 3), можно предположить, что ингибирование молочнокислого брожения (обычно гомо-

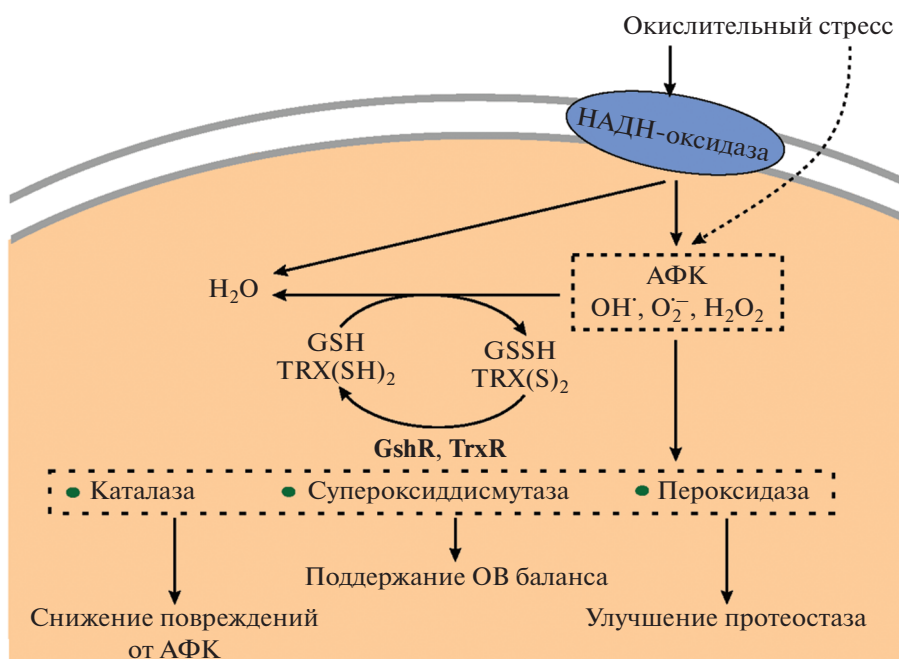


Рис. 2. Антиоксидантные системы в клетках молочнокислых бактерий. АФК – активные формы кислорода, GSH – глутатион, TRX – тиоредоксин (по Zhang, Li, 2013).

ферментативного) в процессе дыхания и в присутствии гема способствует окислению НАДН в цепи переноса электронов с помощью цитохром *bd*-оксидазы (Agioli et al., 2013).

Таким образом, можно сделать вывод, что в аэробных условиях НАДН-оксидаза и НАДН-пероксидаза (см. табл. 2) конкурируют с лактатдегидрогеназой (ЛДГ) в отношении НАДН (Murphy, Condon, 1984). Следовательно, синтез молочной кислоты при аэробнозе уменьшается, и гликолитический поток смещается в сторону продукции ацетата, этанола, ацетоина, диацетила и CO_2 (смешанное брожение) под действием пируватде-

гидрогеназы, пируват-формиат-лиазы и α -ацетоллактатсинтазы (рис. 3).

Эти изменения также приводят к образованию пероксида водорода, который вызывает замедление роста культур *Lc. lactis* и даже их гибель. Концентрация около 0.2 мМ H_2O_2 ингибирует рост этой бактерии на 50%, а концентрации свыше 1.15 мМ могут поставить под угрозу жизнеспособность клеток (Duwat et al., 1999). Хотя НАДН-пероксидаза (табл. 2) способствует уменьшению содержания пероксида водорода в клетках, ее роль в противодействии пероксидным стрессам в целом невелика (в 10–30 раз ниже, чем у НАДН-оксидазы), поэтому высокие концентрации H_2O_2 часто вызывают

Таблица 2. Ключевые ферментативные реакции с участием кислорода у молочнокислых бактерий (по Miyoshi et al., 2003)

Ферментативные реакции	Ферменты
$НАДН + H^+ + O_2 \rightarrow НАД^+ + H_2O_2$	НАДН : H_2O_2 -оксидаза
$2НАДН + 2H^+ + O_2 \rightarrow 2НАД^+ + 2H_2O$	НАДН : H_2O -оксидаза
Пируват + фосфат + $O_2 \rightarrow$ ацетилфосфат + $CO_2 + H_2O_2$	Пируватоксидаза
α -Глицерофосфат + $O_2 \rightarrow$ дигидроксиацетонфосфат + H_2O_2	α -Глицерофосфатоксидаза
$2O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$	Супероксиддисмутаза
$НАДН + H^+ + H_2O_2 \rightarrow НАД^+ + 2H_2O$	НАДН-пероксидаза

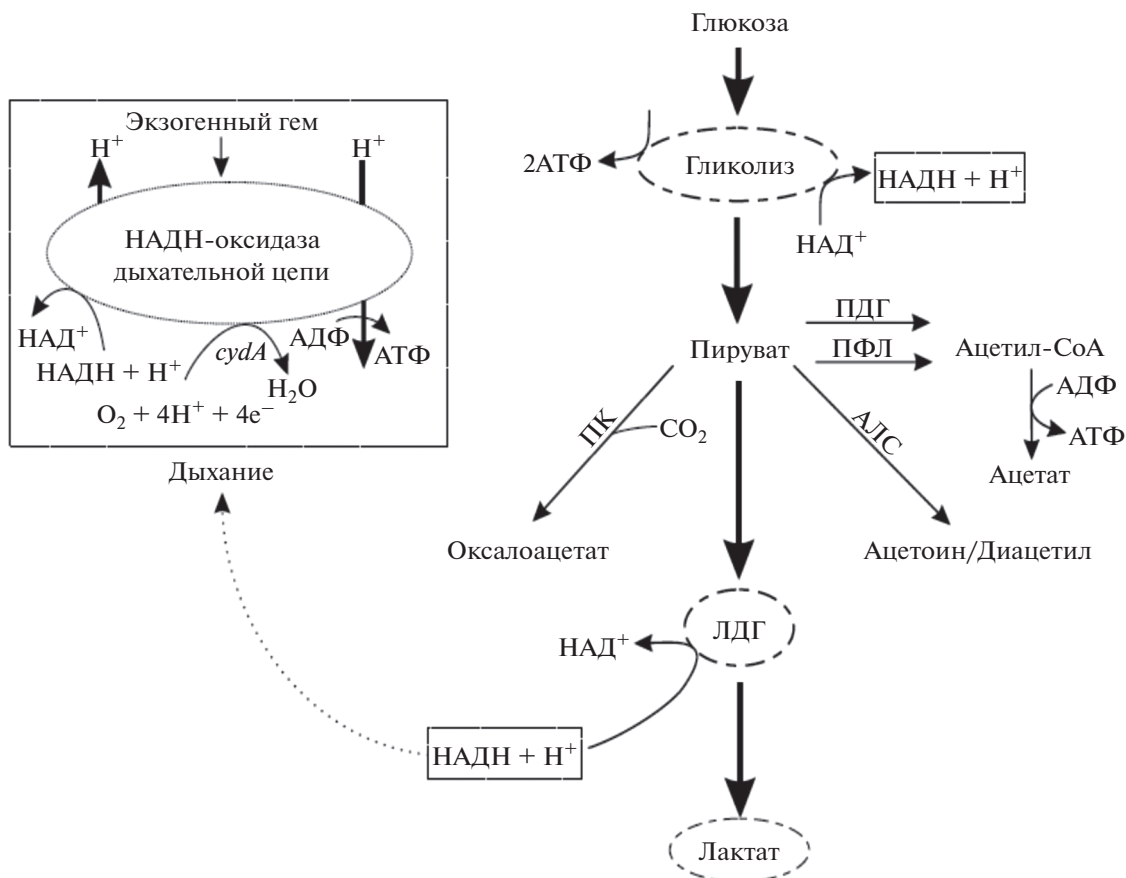


Рис. 3. Упрощенное представление гомоферментативного и гетероферментативного видов молочнокислого брожения и гем-зависимого дыхания у *Lc. lactis* IL1403 (по Arioli et al., 2013). Стрелки показывают метаболитические потоки. Глюкоза катаболизируется до пирувата посредством гликолиза с образованием АТФ и НАДН. Регенерация НАД^+ происходит во время зависящего от гема дыхания. Избыток пирувата может метаболизироваться пируватформилтазой (ПФЛ), пируватдегидрогеназой (ПДГ) и ацетолактатсинтазой (АЛС). Также показана анаэробная реакция, катализируемая пируваткарбоксилазой (ПК). Ген субъединицы I цитохромоксидазы обозначен как *cydA*. ЛДГ – лактатдегидрогеназа.

гибель клеток МКБ (Condon, 1987; Maresca et al., 2018).

В целом, определение метаболитов и анализ метаболитических потоков *L. paracasei* показал, что в аэробных условиях метаболизм пирувата переключается с образования молочной кислоты на синтез ацетата для обеспечения процесса роста клеток достаточной энергией при высоких скоростях поглощения кислорода. Когда культуры достигают стационарной фазы роста в таких условиях, происходит значительное подавление поглощения и последующего метаболизма глюкозы из-за накопления в клетках АФК, которые ингибируют ключевой фермент гликолиза – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу; синтез молочной кислоты также продолжает снижаться. Необходимо отметить, что внутриклеточный восстановительный баланс на примере *L. paracasei* сильно зависит от ацетил-КоА (ацетат/этанол) в экспоненциальной фазе

роста и от ацетоина (ацетоин/2,3-бутандиол) в стационарной фазе роста (Tian et al., 2018).

ФЕРМЕНТЫ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ В КЛЕТКАХ МКБ

НАДН-оксидаза/НАДН-пероксидаза. Наиболее распространенным ферментативным механизмом устойчивости к окислительным стрессам, который был обнаружен у многих МКБ, является наличие в клетках НАДН-оксидазной и НАДН-пероксидазной системы (Condon, 1987). Вначале кислород может удаляться из клеток за счет функционирования НАДН-оксидазы, которая использует O_2 для окисления НАДН в НАД^+ , что приводит к увеличению внутриклеточной концентрации H_2O_2 . Пероксид водорода, в свою очередь, разлагается НАДН-пероксидазой, и в результате образуется H_2O . Это было показано у аэротолерантных штаммов *L. casei*, обладающих мощной НАДН-перок-

сидазой (Npr), которая играет решающую роль в механизмах противодействия пероксидным стрессам (Naraki et al., 2020).

Было показано, что при высокой скорости гликолиза в аэробной культуре *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435 (не имеющей НАДН-пероксидазную активность, но содержащей НАДН-оксидазу) образующийся в качестве конечного продукта гликолиза пируват взаимодействует в ходе неферментативной реакции с пероксидом водорода, образуя ацетат, CO_2 и H_2O (van Niel et al., 2002). Таким образом, это можно рассматривать в качестве альтернативного способа защиты лактококков от внутриклеточного пероксида водорода, накопление которого в культурах резко снижает их скорость роста (Miyoshi et al., 2003).

НАДН-оксидазы (NOX, кодируемые генами *noxE*, *nox2* и/или *nox*), как правило, относятся к флавопротеинам и участвуют в обеспечении аэротолерантности микроаэробных МКБ (Tachon et al., 2010, 2011; Jänsch et al., 2011; Derr et al., 2012). NOX, в основном, отвечает за быстрое удаление кислорода и играет важную роль в поддержании внутриклеточного окислительно-восстановительного баланса (Tachon et al., 2010; Naraki et al., 2020).

Было обнаружено, что в делеционных штаммах МКБ по гену *nox* наблюдалось повышенное содержание СОД и глутатионредуктазы. В связи с этим устойчивость к окислительному и кислотному стрессам у таких мутантных штаммов была лучше (Jänsch et al., 2011). Интересно, что действие НАДН-оксидазы связано с использованием клетками сахаров. Мутанты *F. sanfranciscensis* с подавленной экспрессией гена *nox* не росли на питательной среде MRC в аэробных условиях, если в среду дополнительно не добавляли фруктозу (Zhang, Li, 2013).

Супероксиддисмутаза (СОД) является металлоферментом, который катализирует реакцию дисмутации супероксидного анион-радикала в пероксид водорода и молекулярный кислород: $2\text{O}_2^{\cdot-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ (McCord, Fridovich, 1969). Существуют четыре типа фермента, которые отличаются по наличию атомов металла в активном центре: железо-содержащие (Fe-СОД), марганец-содержащие (Mn-СОД), медь/цинк-содержащие (Cu/Zn-СОД) и никель-содержащие (Ni-СОД). СОД присутствует у большинства организмов, некоторые бактерии (например, *E. coli*) могут обладать одновременно несколькими типами СОД (Bruno-Bárcena et al., 2004). Подавляющее большинство строго анаэробных микроорганизмов содержат в клетках Fe-СОД. У многих представителей родов *Streptococcus* и *Lactococcus* удаление супероксидного анион-радикала происходит, в основном, за счет функционирования Mn-СОД, однако большинство лактобацилл лишены супероксиддисмутазной актив-

ности (Bruno-Bárcena et al., 2004; Marques Da Silva et al., 2019).

Важная роль СОД в обеспечении выживаемости клеток МКБ в условиях сильных кислородных стрессов была показана, в частности, на *L. sake*. Штамм NCFB 2813, обладавший в 10–20 раз (в зависимости от фазы роста культуры) более высокой активностью СОД по сравнению со штаммом DSM 6333, показывал повышенную скорость роста в присутствии 90% O_2 , а концентрация $\text{O}_2^{\cdot-}$ в цитозоле клеток этого аэротолерантного штамма была в 9–10 раз ниже, чем у кислород-чувствительного (Amanatidou et al., 2001).

Mn-содержащая СОД так же способна обеспечивать дополнительную защиту от пероксидного стресса (Serata et al., 2018). Так, экспрессия гена *sodA*, кодирующего Mn-СОД *S. thermophilus*, в клетках *L. gasseri* и *L. acidophilus* значительно повышала их устойчивость к H_2O_2 (Bruno-Bárcena et al., 2004). Известно, что негативные эффекты пероксида водорода на рост и выживаемость клеток в значительной степени зависят от наличия “свободного” растворимого железа в виде Fe(II), которое может высвобождаться из лабильных [4Fe-4S]-кластеров белков, окисляемых супероксидными радикалами (Flint et al., 1993; Keyer, Imlay, 1996; Bruno-Bárcena et al., 2004). Ион железа Fe^{2+} реагирует с пероксидом водорода с образованием крайне реакционноспособного гидроксил-радикала (OH^{\cdot}) по реакции Фентона. Непрерывное образование OH^{\cdot} требует поступления Fe(II), которое может образовываться также через восстановление Fe(III) с помощью $\text{O}_2^{\cdot-}$, а СОД, удаляя супероксид-радикал, препятствует формированию восстановительного цикла железа (Bruno-Bárcena et al., 2004). Восстановление Fe(III) может также осуществляться за счет различных восстановителей – глутатиона, тиоредоксина, флавоферментов и т.д. (Halliwell, Gutteridge, 1990; Kakhlon, Cabantchik, 2002; Petrat et al., 2003).

Таким образом, защита клеток молочнокислых бактерий от АФК и их аэротолерантность может быть достигнута: дисмутацией $\text{O}_2^{\cdot-}$ посредством СОД, удалением H_2O_2 благодаря каталазе и/или гидропероксидазе, включением свободного железа в форме Fe(II) в железо-хелатирующий агент или в железо-связывающие белки (например, белок Drg у грамположительных бактерий), наличием белков-протекторов для [Fe-S]-кластеров и функционированием репарационных механизмов для удаления повреждений макромолекул клетки (Bruno-Bárcena et al., 2004).

Каталаза играет важную роль в снижении негативных эффектов пероксидного стресса на клетку путем разложения пероксида водорода в реакции $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$. Известно два типа

каталаз: гем-зависимые (истинные каталазы) и марганец-содержащие (псевдокаталазы). Активная гем-зависимая каталаза гомотетрамерной структуры обнаружена у многих видов МКБ, но лишь при условии наличия гема или гематина в питательной среде. Каталазам второго типа для проявления активности не требуется наличие гема или гематина, но такие Mn-содержащие каталазы (MnKat), обладающие гексамерной структурой, у молочнокислых бактерий встречаются достаточно редко (Noonpakdee et al., 2004; Glorieux, Calderon, 2017).

Наличие каталазы у промышленных штаммов МКБ является одним из полезных свойств для получения заквасок, используемых в пищевой промышленности (Zotta et al., 2017), однако такая необходимая при производстве многих ферментированных мясных продуктов стартовая культура, как *L. rhamnosus*, не обладает каталазной активностью (An et al., 2010). В связи с этим создано большое количество рекомбинантных штаммов стартовых культур МКБ, устойчивых к длительному аэробно-анаэробному росту. В качестве примера можно привести каталазо-отрицательный штамм *L. plantarum* TISTR850, в котором был клонирован и экспрессирован под сильным промотором ген *katA*, кодирующий гем-зависимую каталазу из *L. sakei* SR911. Полученный рекомбинантный штамм *L. plantarum* с высокой каталазной активностью, сохранявший жизнеспособность в течение 60 ч в условиях аэрации и при дефиците глюкозы, использовали для снижения процесса окисления липидов при хранении ферментированных мясных продуктов (Noonpakdee et al., 2004). Гетерологичная экспрессия гена *katA* из *L. sakei* YSI8 в клетках *L. rhamnosus* приводила к чрезвычайному усилению устойчивости к пероксидному стрессу у рекомбинантного штамма, вплоть до 10^4 раз по сравнению с исходным штаммом для клеток из стационарной фазы роста (An et al., 2010). Аналогичные эксперименты были проведены также на *L. casei* MCJΔ1, трансформированной плазмидами с геном *katE* из *L. plantarum* или *L. brevis*, кодирующим гем-зависимую каталазу. Выживаемость рекомбинантных штаммов при 1-часовой инкубации с 2 mM H₂O₂ оказалась в 270–300 раз выше, чем у исходного каталазо-отрицательного штамма, а в условиях 96-часовой аэрации культур – в 146–190 раз выше, что свидетельствует о важной роли каталазы в обеспечении аэротолерантности клеток (Lin et al., 2016).

Создание рекомбинантных штаммов лактобацилл с гетерологичной экспрессией негемовой каталазы дает большое преимущество в том, что в этом случае не требуется добавлять гем в питательную среду для синтеза клетками активного фермента. К настоящему времени удалось показать, как можно защитить один вид МКБ от повреждающего воздействия H₂O₂ и повысить устойчивость к

аэрации с помощью синтеза гетерологичной каталазы другим видом-партнером в смешанной культуре. Эти эксперименты были проделаны на смешанных культурах продуцирующей пероксид водорода, но чувствительной к нему *L. bulgaricus*, и *L. casei*, в клетках которой был экспрессирован ген, кодирующий негемовую Mn-содержащую каталазу из *L. plantarum* ATCC 14431 (Rochat et al., 2006).

Аналогичные подходы применяют и в случае бифидобактерий, которые, как правило, чувствительны к различным окислительным стрессам. Так, гетерологичная экспрессия гена *LpKatL*, кодирующего гем-зависимую каталазу у *L. plantarum*, в клетках *Bifidobacterium longum* NCC2705 приводила к быстрому разложению экзогенного H₂O₂ и иных пероксидов, которые образовывались в качестве побочных продуктов при аэробном культивировании (Zuo et al., 2014).

Синтез активной истинной каталазы у некоторых МКБ, как уже указывалось выше, возможен в присутствии экзогенного гема, так как сами МКБ не способны к его синтезу (Noonpakdee et al., 2004; Ricciardi et al., 2018). Но дело в том, что добавление гема в сырье для ферментативных процессов в молочной или мясной промышленности не всегда представляется возможным. Поэтому сегодня все большее применение находят штаммы МКБ, обладающие Mn-содержащей каталазой (Mn-Kat). Этот фермент разлагает H₂O₂, используя марганец как каталитический редокс-кофактор, таким образом, не испытывая потребности в геме. Субъединицы Mn-содержащих каталаз меньше по размеру, чем таковые у обычных гемовых каталаз (примерно 27 и 60 кДа соответственно), и Mn-Kat более устойчивы к повышенным температурам (Kono, Fridovich, 1983). Важно отметить, что Mn-содержащая каталаза – это цитоплазматический фермент, который не выделяется клетками в культуральную жидкость, и его активность проявляется лишь у штаммов, обладающих высоким внутриклеточным содержанием Mn (Rochat et al., 2006).

Тиоредоксинредуктаза. С помощью фермента тиоредоксинредуктазы (TR) происходит окисление тиоредоксина (TRX) с использованием НАДФН в качестве кофактора. На протяжении многих лет исследований роли тиоредоксина в клеточном метаболизме было выяснено, что он в качестве дисульфидной оксидоредуктазы играет важную роль в различных восстановительных процессах, таких, как антиоксидантная защита клетки, восстановление белков и биосинтез нуклеиновых кислот (Serrano et al., 2007; Lu, Holmgren, 2014; Jastrzab et al., 2021).

Снижение активности тиоредоксинредуктазной и глутатион-редоксиновой систем имеет большое значение для всех живых организмов.

Эти две системы обеспечивают поддержание цитоплазмы в восстановленном состоянии (Scharf et al., 1998). Избыток тиоредоксина у *L. plantarum* WCFSI увеличивал устойчивость клеток к окислительным стрессам, создаваемым пероксидом водорода или диамидом (Serrano et al., 2007).

Анализ полного генома *L. plantarum* WCFSI показал, что тиоредоксинредуктазная система у этого микроорганизма состоит из шести открытых рамок считывания. Непосредственно тиоредоксинредуктазу кодируют четыре гена из шести: *trxA1* (lp_0236), *trxA2* (lp_2270), *trxA3* (lp_3437) и *trxH* (lp_2633). Два других гена, *trxB1* (lp_0761) и *trxB2* (lp_2585), определены, соответственно, как кодирующие тиоредоксин и нуклеотид-дисульфид-оксидоредуктазу. Эти шесть генов распределены по геному и высоко консервативны у всех исследуемых штаммов *L. plantarum*, независимо от их местообитаний (Molenaar et al., 2005).

Было показано, что уровни транскрипции гена *gapB* (гликолитический ген, участвующий в энергетическом метаболизме) и активность глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы (ГАФДГ — ключевого фермента гликолиза по своему месторасположению в пути и по количеству связанных с ним регуляторных взаимодействий) у *L. plantarum* возрастали в несколько раз при сверхэкспрессии гена *trxB1* в условиях перексидного стресса (Serrano et al., 2007). Эта способность предотвращает окисление белка GapB и поддерживает синтез активной формы ГАФДГ. Вероятно, усиленный синтез тиоредоксина у *L. plantarum* WCFSI защищает ГАФДГ в условиях окислительных стрессов, вызываемых пероксидами. Тиоредоксинредуктазная система (гены *trxA2* и *trxB1*) у *L. plantarum* WCFSI индуцируется именно пероксидными стрессами и является ключевой в антиоксидантной защите у этого штамма (Serrano et al., 2007).

Исследования, проведенные ван Нилем и соавт. (van Niel et al., 2002), показали, что ГАФДГ у *L. lactis* действительно является наиболее чувствительным для окислительных стрессов (в частности, при обработке клеток 2.2 мМ H₂O₂) белком из всех ферментов гликолиза.

Также тиоредоксинредуктаза была обнаружена в клетках типового вида рода *Bifidobacterium* — *B. bifidum*, способной к микроаэробному росту (при 5% O₂), но из-за накопления H₂O₂ прекращающей рост при концентрациях кислорода свыше 10%. Экспрессия гена, кодирующего эту тиоредоксинредуктазу, индуцировалась кислородом. Интересно, что разложение H₂O₂ у данной бифидобактерии происходило с участием системы тиоредоксинредуктаза—алкилгидропероксидредуктаза (Satoh et al., 2019).

Другие белки МКБ, вовлеченные в окислительные стрессы. Еще одним механизмом обеспечения

стрессоустойчивости клеток МКБ является поддержание активности белка RecA. Этот белок широко распространен у бактерий, например, в клетках *E. coli*, где он играет ключевую роль в SOS-ответах и гомологичной рекомбинации (Miller, Kokjohn, 1990; Walker, 1996). На мутантном штамме *L. lactis* с введенным геном *recA* было показано, что RecA обеспечивает устойчивость к окислительному и термическому воздействиям (Dawat et al., 1995). В отсутствие активности RecA гидроксил-радикалы, образующиеся в реакции Фентона, вызывали в ДНК необратимые повреждения (Miyoshi et al., 2003).

Lactobacillus helveticus, часто применяемая в качестве закваски в молочной промышленности, относится к термотолерантным молочнокислым бактериям, которые не требуют строго анаэробных условий для роста и получают большую часть энергии, осуществляя молочнокислое брожение (Guerzoni et al., 2001). Хотя в присутствии кислорода эти бактерии и образуют пероксид водорода в реакции с НАДН, тем самым уменьшая внутриклеточную концентрацию молекулярного O₂, в их клетках не было обнаружено активностей ключевых ферментов антиоксидантной защиты, таких, как СОД или каталаза (Cappa et al., 2005). Однако клетками *Lactobacillus helveticus* были выработаны различные способы защиты генома, и одним из наиболее важных является нуклеотид-эксцизионная репарация ДНК при различных стрессовых воздействиях (Goosen, Moolenaar, 2001; Cappa et al., 2005).

Белки эндонуклеазного эксцизионного комплекса UvrABC определяют и разрезают поврежденную ДНК в многоступенчатой реакции, обладая способностью восстанавливать единичные одноосновные модификации, массивные нуклеотидные аддукты, нековалентные модификации, а также внутри- и межнитевые кросс-связи (Cappa et al., 2005). Анализ транскрипции гена *uvrA*, кодирующего субъединицу А эндонуклеазы эксцизии, показал, что воздействие на клетки низкого pH 5.0 или 2.6 мМ H₂O₂ индуцирует резкое увеличение экспрессии гена *uvrA* через 15 мин после начала стресса, и этот высокий уровень экспрессии поддерживается, по крайней мере, в течение 80 мин, обеспечивая устойчивость *L. helveticus* к кислотным и окислительным стрессам (Cappa et al., 2005).

Кроме того, у *L. helveticus* в ответ на пероксидный и температурный стрессы активируется десатуразная система, поглощающая кислород и повышающая содержание ненасыщенных жирных кислот в клеточной мембране, что защищает клетки от токсичных активных форм кислорода и высоких температур (Guerzoni et al., 2001).

В опытах с делеционным по гену *rpoN* (кодирует альтернативный σ-фактор 54) штаммом *L. plantarum*

было показано, что его чувствительность к пероксиду водорода возросла в 100 раз по сравнению с исходным штаммом. Это связано со снижением экспрессии маннозного оперона фосфотрансферазной системы (ФТС), регулируемой, в частности, σ^{54} и необходимой, в том числе, для получения клеткой энергии при формировании адаптивного ответа на воздействие пероксидов (Stevens et al., 2010).

Интересный механизм антиоксидантной защиты, включающий транспортные белки цистина ABC (кодируются генным кластером *суuABC*) и цистатионин γ -лиазу (кодируется геном *cgl*), был показан для нескольких штаммов *L. reuteri*: при поглощении экзогенного цистина с помощью белка-транспортера СуuС клетки в аэробных условиях секретировали большое количество восстановительных эквивалентов, представлявших собой тиолы, включая H_2S как продукт разложения цистина и мощный антиоксидант цистеин (Lo et al., 2009). Протеомный анализ *L. acidophilus* выявил, что в условиях пероксидного стресса в клетках резко возрастает содержание цистеинсинтазы, необходимой для формирования пула цистеина, обеспечивающего стабильность белков, протекание метаболических реакций и функционирование пути восстановления дисульфидов; также в клетках возрастало содержание ферментов репарации ДНК и белков с цистеиновыми остатками в активном центре (Calderini et al., 2017).

ХИМИЧЕСКИЕ ЭЛЕМЕНТЫ И ВЕЩЕСТВА, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИЕ АНТИОКСИДАНТНУЮ ЗАЩИТУ В КЛЕТКАХ МКБ

Глутатион (GSH) – наиболее распространенный и обнаруженный почти у всех живых организмов (Allocati et al., 2012), в том числе и у МКБ (например, у *Lc. lactis*, *L. fermentum* ME-3; Kullisaar et al., 2010), небелковый тиол. Он играет важную роль в ответах на многие стрессы (окислительные, кислотные, осмотические), защищая клетку от свободных радикалов и определяя редокс-статус внутриклеточной среды (Kim et al., 2012).

Сравнительный протеомный анализ с использованием клеток *Lc. lactis* SK11, выращенных с добавлением и без добавления глутатиона, показал, что он стабилизировал ферменты гликолиза, что и объясняло устойчивость клеток *Lc. lactis* SK11 с высоким содержанием глутатиона к различным стрессам. Это свидетельствует о том, что глутатион может эффективно использоваться в качестве универсального защитного химического вещества для улучшения выживаемости и сохранности молочных заквасочных культур (Zhang, Li, 2013; Al-Madboly et al., 2020).

Помимо защиты клеток МКБ от неблагоприятных воздействий глутатион способствует усилению роста культур *Ligilactobacillus salivarius* (Lee et al., 2010) или может быть использован в качестве источника серы, как в случае *L. reuteri* (Lee et al., 2011; Zhang, Li, 2013).

Глутатион синтезируется в клетке либо с помощью двух ферментов, осуществляющих последовательные реакции (глутамин-цистеин-синтетазы и глутатионсинтетазы), либо путем использования бифункционального фермента глутамат-цистеин-лигазы/глутатионсинтетазы (Allocati et al., 2012; Pophaly et al., 2017; Xiong et al., 2018).

Гомологи глутатионредуктазы (GshR) широко представлены в клетках МКБ и являются важными компонентами GSH-зависимых окислительно-восстановительных систем. У *L. plantarum* было найдено две глутатионредуктазы, которые защищали клетки от воздействия солей желчных кислот (Hamon et al., 2011). Инактивация гена *gshR* увеличивала накопление дисульфида глутатиона (GSSG) и приводила к снижению устойчивости клеток *F. sanfranciscensis* к окислительным стрессам (Jansch et al., 2007).

Предшественники глутатиона (цистеин и γ -глутамилцистеин) также участвуют в антиоксидантной защите. При использовании экзогенного цистеина возможен аэробный рост *F. sanfranciscensis* с инактивированной глутатионредуктазой (Jansch et al., 2007; Zhang, Li, 2013).

Марганец как антиоксидантный агент в клетках МКБ. Как было сказано выше, у некоторых представителей лактобацилл, в частности, у *L. plantarum*, отсутствует истинная СОД. Но, несмотря на это, данный микроорганизм обладает аэротолерантностью при росте на глюкозе, а при росте на многоатомных спиртах вообще является облигатным аэробом. Защита от токсического эффекта O_2 связана, вероятно, с активным процессом аккумуляции $Mn(II)$ в клетках. Многие представители МКБ проявляют достаточно высокие ростовые потребности к марганцу, который не является необходимым элементом для других гетеротрофных бактерий (Serata et al., 2018). Рост *L. plantarum* в Mn -дефицитной питательной среде приводил к формированию клеток, которые обладали повышенной чувствительностью к O_2 (Archibald, Fridovich, 1981a).

Необычно высокая внутриклеточная концентрация $Mn(II)$ не является единственной интересной особенностью *L. plantarum* и, возможно, родственных ей лактобактерий. В частности, у *L. plantarum* отсутствует потребность в железе. Таким образом, у данной МКБ не происходит образование пероксида водорода в реакциях типа Фентона и Габера–Вейса. Этот факт, в дополнение к значительному содержанию Mn (~9 мкг/мг белка в экстрактах клеток), может объяснять высокую

устойчивость к кислороду *L. plantarum*, не обладающей активностью СОД (Archibald, Fridovich, 1981a). В ходе так называемого дыхательного роста (аэробноз в присутствии гема и витамина К₂ в качестве источника менахинона) с внесением марганца в питательную среду культуры *L. plantarum* достигали наибольшего выхода биомассы (Watanabe et al., 2012).

К внутриклеточному аккумулярованию марганца, эффективно удаляющего супероксид-анионы при аэробном росте, способны и представители группы *L. casei* – *L. paracasei*. За поглощение марганца у них отвечает система многочисленных Mn-транспортных белков NRAMP-типа (кодируемых генами *mntH1* и *mntH2*) и ABC-типа (кодируемых кластером *mtsCBA*), подверженных общей регуляции (Serata et al., 2018).

Необходимо отметить, что большинство штаммов молочнокислых бактерий, которые аккумуляровали высокие внутриклеточные уровни Mn(II), были лишены активности истинной СОД, хотя и были способны к росту при аэробнозе. Напротив, те лактобациллы, которые обладали СОД-активностью и лучше росли в аэробных условиях, чем в анаэробных, не содержали в клетках Mn(II) в высоких концентрациях (Kono et al., 1976; Archibald, Fridovich, 1981b; Serata et al., 2018). Это говорит о том, что марганец в миллимолярных концентрациях в клетках МКБ может заменять собой СОД и служит для эффективного удаления эндогенного супероксид-аниона, обеспечивая определенный уровень аэротолерантности клеток. Это происходит благодаря взаимодействию супероксид-аниона с марганцем и окислению последнего. В присутствии пирофосфатов (нуклеозидтрифосфаты, динуклеотидные коферменты) трехвалентный марганец стабилизируется и может накапливаться в клетке. В отсутствие таких стабилизирующих хелатирующих агентов образуется MnO²⁺, который тут же распадается на MnO₂, Mn(II) и O₂ (Kono et al., 1976).

По всей видимости, замена функции СОД высокими, вплоть до 25 мМ, концентрациями Mn(II) у ряда штаммов аэротолерантной *L. plantarum* является адаптацией к существованию в растительном материале, т.к. у штаммов *L. plantarum*, обитающих в молочных продуктах, не было выявлено высокой внутриклеточной концентрации данного металла (Archibald, Fridovich, 1981b).

ПРИМЕНЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ В ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ И МЕДИЦИНЕ

Активные формы кислорода могут вызывать окислительные повреждения макромолекул клетки, а иногда непосредственно приводят к гибели клеток

(Kehrer, 1993). Такие болезни, как атеросклероз, различные онкологические заболевания, ожирение, эмфизема, цирроз печени, артрит, болезнь Крона, воспалительные заболевания ЖКТ и др. напрямую соотносятся с окислительными повреждениями клеток соответствующих тканей (Kehrer, 1993; Grajek et al., 2005; LeBlanc et al., 2011; Basu Thakur et al., 2019; Vasquez et al., 2019; Kim et al., 2021). Таким образом, токсическое воздействие АФК играет значимую патологическую роль. Надо также принимать во внимание, что такие окислители, как пероксид водорода и хлорноватистая кислота, вырабатываются врожденной иммунной системой в качестве антимикробных агентов в процессе воспаления (Basu Thakur et al., 2019).

Прием пищи, в состав которой входят антиоксидантные добавки, может уменьшить уровень АФК в тканях и значительно снизить риск окислительных повреждений организма человека и животных. Наиболее известными антиоксидантами являются аскорбиновая кислота (витамин С), токоферол (витамин Е), β-каротин (провитамин А), холекальциферол (витамин D₃), кофермент Q₁₀, каротиноидный пигмент ликопин. К природным антиоксидантам также относят полифенолы – флавины и флавоноиды (часто встречаются в овощах), танины (присутствуют в какао, кофе, чае), антоцианы (присутствуют в красных ягодах), линолеовую кислоту (входит в состав многих растительных масел и животных жиров), белковые фракции (в особенности, содержащие казеин, лактоферрин).

Молочнокислые бактерии являются идеальными объектами для доставки ферментов антиоксидантной защиты (в частности, СОД и каталазы) в желудочно-кишечный тракт для предотвращения или лечения различных воспалительных патологических процессов в нем (LeBlanc et al., 2011). Показано, что пробиотическая МКБ *L. reuteri*, колонизирующая кишечник, обладает сложными регуляторными системами ответа на различные окислительные стрессы, которых нет у *E. coli* и других энтеробактерий и которые включают, в частности, белок теплового шока Lo18, полифосфаткиназу 2 и уникальный регуляторный белок RsiR (Basu Thakur et al., 2019).

К настоящему времени доказано, что антиканцерогенными, антимикробными, гиполипидемическими, иммуномодуляторными и антиоксидантными свойствами обладают живые клетки и экстракты клеток многих штаммов МКБ, а также, в некоторых случаях, их фракции растворимых экзополисахаридов (Choi et al., 2006; Gao et al., 2013; Guo et al., 2013; Li et al., 2014; Yamamoto et al., 2019; Даниленко и соавт., 2020; Marsova et al., 2020).

L. plantarum C88, выделенная из тофу (традиционного китайского ферментированного пищевого продукта из соевых бобов) и обладающая повышен-

ной ингибиторной активностью в отношении гидроксил-радикала и высокой устойчивостью к пероксиду водорода, предложена как эффективный пробиотик-антиоксидант, в частности, ингибирующий перекисное окисление липидов (Li et al., 2012). Введение клеток штаммов *L. plantarum* C88 и MA2 (Li et al., 2012; Tang et al., 2016) или *L. brevis* MG000874 (Noureen et al., 2019) старым мышам, подвергнутым индуцированному D-галактозой окислительному стрессу, приводило к значительному усилению активностей каталазы, СОД и глутатионпероксидазы в сыворотке крови и клетках печени мышей, восстанавливая антиоксидантный статус организма. Пробиотические йогурты и ферментированное молоко, в особенности, содержащие клетки *L. casei* и *L. acidophilus*, обладают высоким антиоксидантным потенциалом за счет высвобождения антиоксидантных пептидов в процессе протеолиза (Fardet, Rock, 2018).

Недавними исследованиями было показано, что *Limosilactobacillus frumenti* увеличивает активности ряда антиоксидантных ферментов и снижает общий уровень активных форм кислорода за счет активации NO-синтазы 1 в эпителиальных клетках тонкого кишечника млекопитающих (Nie et al., 2019). Пробиотические препараты на основе *Lactobacillus gasseri* усиливают защиту от окислительных стрессов, активируя в клетках млекопитающих редокс-чувствительную сигнальную систему Nrf2/ARE (Kobatake et al., 2017).

МКБ являются неотъемлемой частью микробиоты ЖКТ человека и играют значимую роль для здоровья хозяина. Пробиотические штаммы, ограничивающие накопление чрезмерного количества активных радикалов в тканях хозяина, могут способствовать предотвращению либо контролю заболеваний, связанных с различными окислительными стрессами. Таким образом, с помощью пробиотических бактериальных штаммов появляется возможность повысить уровень клеточной антиоксидантной защиты хозяина (Guo et al., 2013; Tang et al., 2016). Стоит напомнить, что антиоксидантные активности (ферментативное удаление АФК, ингибирование перекисного окисления липидов и т.д.) являются, как правило, штаммоспецифичными, поэтому для использования МКБ в качестве максимально эффективных медицинских или ветеринарных пробиотических добавок нужно предварительно проводить комплексные исследования большой коллекции штаммов по выявлению необходимых свойств *in vitro* и оценке их потенциала в профилактике и лечении заболеваний *in vivo* (Noureen et al., 2019; Poluektova et al., 2021).

Результаты последних исследований свидетельствуют о новых перспективах в использовании пробиотических штаммов МКБ в качестве защитных компонентов в желудочно-кишечной

микробной экосистеме для снижения негативных эффектов и последствий окислительных стрессов, а также для оздоровления не только ЖКТ, но и печени, почек, плазмы крови и повышения общего уровня антиоксидантного статуса организма хозяина (Li et al., 2014; Yamamoto et al., 2019; Даниленко и соавт., 2020; Marsova et al., 2020). Кроме того, аэротолерантные МКБ в качестве стартовых культур улучшают органолептические свойства ферментированных продуктов (в частности, за счет образования летучих соединений в процессе аэробного роста) и значительно повышают их рекомендуемые сроки хранения. В целом, антиоксидантные эффекты пробиотиков чрезвычайно широки – от быстрого биохимического удаления высокореакционноспособных активных форм кислорода до индуцирования через различные регуляторные и сигнальные молекулы цитопротекторной и иммунной системы организма хозяина (Guo et al., 2013; Feng, Wang, 2020; Averina et al., 2021).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Брюханов А.Л., Нетрусов А.И. Аэротолерантность строго анаэробных микроорганизмов: факторы защиты от окислительного стресса (обзор) // Прикл. биохимия и микробиология. 2007. Т. 43. С. 637–654.
- Brioukhanov A.L., Netrusov A.I. Aerotolerance of strictly anaerobic microorganisms and factors of defense against oxidative stress: a review // Appl. Biochem. Microbiol. 2007. V. 43. P. 567–582.
- Даниленко В.Н., Ставровская А.В., Воронков Д.Н., Гущина А.С., Марсова М.В., Ямщикова Н.Г., Ольшанский А.С., Иванов М.В., Иллариошкин С.Н. Использование фармабиотика на основе штамма *Lactobacillus fermentum* U-21 с целью модуляции нейродегенеративного процесса при экспериментальном паркинсонизме // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. 2020. Т. 14. № 1. С. 62–69.
- Allocati N., Federici L., Masulli M., Di Ilio C. Distribution of glutathione transferases in Gram-positive bacteria and *Archaea* // Biochimie. 2012. V. 94. P. 588–596.
- Al-Madboly L.A., Ali S.M., Fakharany E.M.E., Ragab A.E., Khedr E.G., Elokely K.M. Stress-based production, and characterization of glutathione peroxidase and glutathione s-transferase enzymes from *Lactobacillus plantarum* // Front. Bioeng. Biotechnol. 2020. V. 8. P. 78.
- Amanatidou A., Bennik M.H.J., Gorris L.G.M., Smid E.J. Superoxide dismutase plays an important role in the survival of *Lactobacillus sakei* upon exposure to elevated oxygen // Arch. Microbiol. 2001. V. 176. P. 79–88.
- Amaretti A., di Nunzio M., Pompei A., Raimondi S., Rossi M., Bordon A. Antioxidant properties of potentially probiotic bacteria: *in vitro* and *in vivo* activities // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2013. V. 97. P. 809–817.
- An H., Zhou H., Huang Y., Wang G., Luan C., Mou J., Luo Y., Hao Y. High-level expression of heme-dependent catalase gene *kata* from *Lactobacillus sakei* protects *Lactobacillus*

- rhamnosus* from oxidative stress // *Mol. Biotechnol.* 2010. V. 45. P. 155–160.
- Arcanjo N.O., Andrade M.J., Padilla P., Rodríguez A., Madruga M.S., Estévez M. Resveratrol protects *Lactobacillus reuteri* against H₂O₂-induced oxidative stress and stimulates antioxidant defenses through upregulation of the *dhaT* gene // *Free Radic. Biol. Med.* 2019. V. 135. P. 38–45.
- Archibald F.S., Fridovich I. Manganese and defenses against oxygen toxicity in *Lactobacillus plantarum* // *J. Bacteriol.* 1981a. V. 145. P. 442–451.
- Archibald F.S., Fridovich I. Manganese, superoxide dismutase, and oxygen tolerance in some lactic acid bacteria // *J. Bacteriol.* 1981b. V. 146. P. 928–936.
- Arioli S., Zambelli D., Guglielmetti S., De Noni I., Pedersen M.B., Pedersen P.D., Dal Bello F., Mora D. Increasing the heme-dependent respiratory efficiency of *Lactococcus lactis* by inhibition of lactate dehydrogenase // *Appl. Environ. Microbiol.* 2013. V. 79. P. 376–380.
- 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. V. 9. P. 1340.
- Basu Thakur P., Long A.R., Nelson B.J., Kumar R., Rosenberg A.F., Gray M.J. Complex responses to hydrogen peroxide and hypochlorous acid by the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* // *mSystems.* 2019. V. 4. P. e00453–19.
- Brooijmans R.J.W., de Vos W.M., Hugenholtz J. *Lactobacillus plantarum* WCFS1 electron transport chains // *Appl. Environ. Microbiol.* 2009a. V. 75. P. 3580–3585.
- Brooijmans R., Smit B., Santos F., van Riel J., de Vos W.M., Hugenholtz J. Heme and menaquinone induced electron transport in lactic acid bacteria // *Microb. Cell Fact.* 2009b. V. 8. P. 28.
- Bruno-Bárcena J.M., Andrus J.M., Libby S.L., Klaenhammer T.R., Hassan H.M. Expression of a heterologous manganese superoxide dismutase gene in intestinal lactobacilli provides protection against hydrogen peroxide toxicity // *Appl. Environ. Microbiol.* 2004. V. 70. P. 4702–4710.
- Calderini E., Celebioglu H.U., Villarroel J., Jacobsen S., Svensson B., Pessione E. Comparative proteomics of oxidative stress response of *Lactobacillus acidophilus* NCFM reveals effects on DNA repair and cysteine *de novo* synthesis // *Proteomics.* 2017. V. 17. № 5. P. 1600178.
- Cappa F., Cattivelli D., Cocconcelli P.S. The *uvrA* gene is involved in oxidative and acid stress responses in *Lactobacillus helveticus* CNBL1156 // *Res. Microbiol.* 2005. V. 156. P. 1039–1047.
- Choi S.S., Kim Y., Han K.S., You S., Oh S., Kim S.H. Effects of *Lactobacillus* strains on cancer cell proliferation and oxidative stress *in vitro* // *Lett. Appl. Microbiol.* 2006. V. 42. P. 452–458.
- Chooruk A., Piwat S., Teanpaisan R. Antioxidant activity of various oral *Lactobacillus* strains // *J. Appl. Microbiol.* 2017. V. 123. P. 271–279.
- Condon S. Responses of lactic acid bacteria to oxygen // *FEMS Microbiol. Rev.* 1987. V. 46. P. 269–280.
- Czapski G. Reaction of OH[•] // *Methods Enzymol.* 1984. V. 105. P. 209–215.
- De Angelis M., Gobbetti M. Environmental stress responses in *Lactobacillus*: a review // *Proteomics.* 2004. V. 4. P. 106–122.
- Derr A.M., Faustoferri R.C., Betzenhauser M.J., Gonzalez K., Marquis R.E., Quivey R.G., Jr. Mutation of the NADH oxidase gene (*nox*) reveals an overlap of the oxygen- and acid-mediated stress responses in *Streptococcus mutans* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2012. V. 78. P. 1215–1227.
- Duwat P., Ehrlich S.D., Gruss A. Effects of metabolic flux on stress response pathways in *Lactococcus lactis* // *Mol. Microbiol.* 1999. V. 31. P. 845–858.
- Duwat P., Ehrlich S.D., Gruss A. The *recA* gene of *Lactococcus lactis*: characterization and involvement in oxidative and thermal stress // *Mol. Microbiol.* 1995. V. 17. P. 1121–1131.
- Duwat P., Sourice S., Cesselin B., Lamberet G., Vido K., Gaudu P., Le Loir Y., Violet F., Loubière P., Gruss A. Respiratory capacity of the fermenting bacterium *Lactococcus lactis* and its positive effects on growth and survival // *J. Bacteriol.* 2001. V. 183. P. 4509–4516.
- Fardet A., Rock E. *In vitro* and *in vivo* antioxidant potential of milks, yoghurts, fermented milks and cheeses: a narrative review of evidence // *Nutr. Res. Rev.* 2018. V. 31. P. 52–70.
- Feng T., Wang J. Oxidative stress tolerance and antioxidant capacity of lactic acid bacteria as probiotic: a systematic review // *Gut Microbes.* 2020. V. 12. P. 1801944.
- Flint D.H., Tuminello J.F., Emptage M.H. The inactivation of Fe-S clusters containing hydro-lyases by superoxide // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. P. 22369–22376.
- Frankenberg L., Brugna M., Hederstedt L. *Enterococcus faecalis* heme-dependent catalase // *J. Bacteriol.* 2002. V. 184. P. 6351–6356.
- Fridovich I. Oxygen toxicity: a radical explanation // *J. Exp. Biol.* 1998. V. 201. P. 1203–1209.
- Gao D., Gao Z., Zhu G. Antioxidant effects of *Lactobacillus plantarum* via activation of transcription factor Nrf2 // *Food Funct.* 2013. V. 4. P. 982–989.
- Garrigues C., Loubiere P., Lindley N. D., Coccain-Bousquet M. Control of the shift from homolactic acid to mixed-acid fermentation in *Lactococcus lactis*: predominant role of the NADH/NAD⁺ ratio // *J. Bacteriol.* 1997. V. 179. P. 5282–5287.
- Gaudu P., Lamberet G., Poncet S., Gruss A. CcpA regulation of aerobic and respiration growth in *Lactococcus lactis* // *Mol. Microbiol.* 2003. V. 50. P. 183–192.
- Glorieux C., Calderon P.B. Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach // *Biol. Chem.* 2017. V. 398. P. 1095–1108.
- Goosen N., Moolenaar G.F. Role of ATP hydrolysis by UvrA and UvrB during nucleotide excision repair // *Res. Microbiol.* 2001. V. 152. P. 401–409.
- Grajek W., Olejnik A., Sip A. Probiotics, prebiotics and antioxidants as functional foods // *Acta Biochim. Pol.* 2005. V. 52. P. 665–671.

- Guerzoni M.E., Lanciotti R., Cocconcelli P.S. Alteration in cellular fatty acid composition as a response to salt, acid, oxidative and thermal stresses in *Lactobacillus helveticus* // Microbiology (SGM). 2001. V. 147. P. 2255–2264.
- Guidone A., Ianniello R.G., Ricciardi A., Zotta T., Parente E. Aerobic metabolism and oxidative stress tolerance in the *Lactobacillus plantarum* group // World J. Microbiol. Biotechnol. 2013. V. 29. P. 1713–1722.
- Guo Y., Pan D., Li H., Sun Y., Zeng X., Yan B. Antioxidant and immunomodulatory activity of selenium exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* // Food Chem. 2013. V. 138. P. 84–89.
- Halliwell B., Gutteridge J.M. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview // Methods Enzymol. 1990. V. 186. P. 1–85.
- Hamon E., Horvatovich P., Izquierdo E., Bringel F., Marchioni E., Aoudé-Werner D., Ennahar S. Comparative proteomic analysis of *Lactobacillus plantarum* for the identification of key proteins in bile tolerance // BMC Microbiol. 2011. V. 11. P. 63.
- Ianniello R.G., Zotta T., Matera A., Genovese F., Parente E., Ricciardi A. Investigation of factors affecting aerobic and respiratory growth in the oxygen-tolerant strain *Lactobacillus casei* N87 // PLoS One. 2016. V. 11. P. e0164065.
- Jänsch A., Freiding S., Behr J., Vogel R.F. Contribution of the NADH-oxidase (Nox) to the aerobic life of *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM20451T // Food Microbiol. 2011. V. 28. P. 29–37.
- Jänsch A., Korakli M., Vogel R.F., Ganzle M.G. Glutathione reductase from *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM20451T: contribution to oxygen tolerance and thiol exchange reactions in wheat sourdoughs // Appl. Environ. Microbiol. 2007. V. 73. P. 4469–4476.
- Jastrzab A., Skrzydlewska E. Thioredoxin-dependent system. Application of inhibitors // J. Enzyme Inhib. Med. Chem. 2021. V. 36. P. 362–371.
- Kakhlon O., Cabantchik Z.I. The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes // Free Radic. Biol. Med. 2002. V. 33. P. 1037–1046.
- Kandler O. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria // Antonie van Leeuwenhoek. 1983. V. 49. P. 209–224.
- Kang T.S., Korber D.R., Tanaka T. Influence of oxygen on NADH recycling and oxidative stress resistance systems in *Lactobacillus panis* PM1 // AMB Express. 2013. V. 3. P. 10.
- Kehrer J.P. Free-radicals as mediators of tissue-injury and disease // Crit. Rev. Toxicol. 1993. V. 23. P. 21–48.
- Keyer K., Imlay J.A. Superoxide accelerates DNA damage by elevating free iron // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. P. 13635–13640.
- Kim J.E., Eom H.J., Kim Y., Ahn J.E., Kim J.H., Han N.S. Enhancing acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* with glutathione // Biotechnol. Lett. 2012. V. 34. P. 683–687.
- Kim K.T., Kim J.W., Kim S.I., Kim S., Nguyen T.H., Kang C.H. Antioxidant and anti-inflammatory effect and probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from canine and feline feces // Microorganisms. 2021. V. 9. P. 1971.
- Klimko A.I., Cherdyntseva T.A., Brioukhanov A.L., Netrusov A.I. *In vitro* evaluation of probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains // Probiotics Antimicrob. Proteins. 2020. V. 12. № 3. P. 1139–1148.
- Kobatake E., Nakagawa H., Seki T., Miyazaki T. Protective effects and functional mechanisms of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 against oxidative stress // PLoS One. 2017. V. 12. P. e0177106.
- Kono Y., Fridovich I. Isolation and characterization of the pseudocatalase of *Lactobacillus plantarum* // J. Biol. Chem. 1983. V. 258. P. 6015–6019.
- Kono Y., Takahashi M.-A., Asada K. Oxidation of manganese pyrophosphate by superoxide radicals and illuminated spinach chloroplasts // Arch. Biochem. Biophys. 1976. V. 174. P. 454–462.
- Kullisaar T., Songisepp E., Aunapuu M., Kilk K., Arend A., Mikelsaar M., Rehema A., Zilmer M. Complete glutathione system in probiotic *Lactobacillus fermentum* ME-3 // Appl. Biochem. Microbiol. 2010. V. 46. P. 481–486.
- Kumar S., Bandyopadhyay U. Free heme toxicity and its detoxification systems in human // Toxicol. Lett. 2005. V. 157. P. 175–188.
- LeBlanc J.G., del Carmen S., Miyoshi A., Azevedo V., Sesma F., Langella P., Bermúdez-Humarán L.G., Watterlot L., Perdigon G., de Moreno de LeBlanc A. Use of superoxide dismutase and catalase producing lactic acid bacteria in TNBS induced Crohn's disease in mice // J. Biotechnol. 2011. V. 151. P. 287–293.
- Lechardeur D., Fernandez A., Robert B., Gaudu P., Trieu-Cuot P. The 2-cys peroxiredoxin alkyl hydroperoxide reductase *c* binds heme and participates in its intracellular availability in *Streptococcus agalactiae* // J. Biol. Chem. 2010. V. 285. P. 16032–16041.
- Lee K., Kim H.J., Rho B.S., Kang S.K., Choi Y.J. Effect of glutathione on growth of the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* // Biochemistry (Moscow). 2011. V. 76. P. 423–426.
- Lee K., Pi K., Kim E.B., Rho B.S., Kang S.K., Lee H.G., Choi Y.J. Glutathione-mediated response to acid stress in the probiotic bacterium, *Lactobacillus salivarius* // Biotechnol. Lett. 2010. V. 32. P. 969–972.
- Li S., Huang R., Shah N.P., Tao X., Xiong Y., Wei H. Antioxidant and antibacterial activities of exopolysaccharides from *Bifidobacterium bifidum* WBIN03 and *Lactobacillus plantarum* R315 // J. Dairy Sci. 2014. V. 97. P. 7334–7343.
- Li S., Zhao Y., Zhang L., Zhang X., Huang L., Li D., Niu C., Yang Z., Wang Q. Antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditional Chinese fermented foods // Food Chem. 2012. V. 135. P. 1914–1919.
- Lin J., Zou Y., Cao K., Ma C., Chen Z. The impact of heterologous catalase expression and superoxide dismutase overexpression on enhancing the oxidative resistance in *Lactobacillus casei* // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2016. V. 43. P. 703–711.
- Lo R., Turner M.S., Barry D.G., Sreekumar R., Walsh T.P., Giffard P.M. Cystathionine γ -lyase is a component of cysteine-mediated oxidative defense in *Lactobacillus reuteri* BR11 // J. Bacteriol. 2009. V. 191. P. 1827–1837.

- Lu J., Holmgren A. The thioredoxin antioxidant system // *Free Radic. Biol. Med.* 2014. V. 66. P. 75–87.
- Maresca D., Zotta T., Mauriello G. Adaptation to aerobic environment of *Lactobacillus johnsonii/gasseri* strains // *Front. Microbiol.* 2018. V. 9. P. 157.
- Marques Da Silva W., Oliveira L.C., Soares S.C., Sousa C.S., Tavares G.C., Resende C.P., Pereira F.L., Ghosh P., Figueiredo H., Azevedo V. Quantitative proteomic analysis of the response of probiotic putative *Lactococcus lactis* NCDO 2118 strain to different oxygen availability under temperature variation // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10. P. 759.
- Marsova M., Poluektova E., Odorskaya M., Ambaryan A., Revishchin A., Pavlova G., Danilenko V. Protective effects of *Lactobacillus fermentum* U-21 against paraquat-induced oxidative stress in *Caenorhabditis elegans* and mouse models // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2020. V. 36. P. 104.
- McCord J.M., Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein) // *J. Biol. Chem.* 1969. V. 244. P. 6049–6055.
- Miller R.V., Kokjohn T.A. General microbiology of *recA*: environmental and evolutionary significance // *Annu. Rev. Microbiol.* 1990. V. 44. P. 365–394.
- Miyoshi A., Rochat T., Grataudoux, J.J., Le Loir Y., Oliveira S.C., Langella P., Azevedo V. Oxidative stress in *Lactococcus lactis* // *Genet. Mol. Res.* 2003. V. 2. P. 348–359.
- Molenaar D., Bringel F., Schuren F.H., de Vos W.M., Siezen R.J., Kleerebezem M. Exploring *Lactobacillus plantarum* genome diversity by using microarrays // *J. Bacteriol.* 2005. V. 187. P. 6119–6127.
- Murphy M.G., Condon S. Comparison of aerobic and anaerobic growth of *Lactobacillus plantarum* in a glucose medium // *Arch. Microbiol.* 1984. V. 138. P. 49–53.
- Naraki S., Irimi S., Sasaki Y. NADH peroxidase plays a crucial role in consuming H₂O₂ in *Lactobacillus casei* IGM394 // *Biosci. Microbiota Food Health.* 2020. V. 39. P. 45–56.
- Nie Y., Hu J., Hou Q., Zheng W., Zhang X., Yang T., Ma L., Yan X. *Lactobacillus frumenti* improves antioxidant capacity via nitric oxide synthase 1 in intestinal epithelial cells // *FASEB J.* 2019. V. 33. P. 10705–10716.
- Noonpakdee W., Sitthimonchai S., Panyim S., Lertsiri S. Expression of the catalase gene *katA* in starter culture *Lactobacillus plantarum* TISTR850 tolerates oxidative stress and reduces lipid oxidation in fermented meat product // *Int. J. Food Microbiol.* 2004. V. 95. P. 127–135.
- Noureen S., Riaz A., Arshad M., Arshad N. *In vitro* selection and *in vivo* confirmation of the antioxidant ability of *Lactobacillus brevis* MG000874 // *J. Appl. Microbiol.* 2019. V. 126. P. 1221–1232.
- Pedersen M.B., Gaudu P., Lechardeur D., Petit M.A., Gruss A. Aerobic respiration metabolism in lactic acid bacteria and uses in biotechnology // *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2012. V. 3. P. 37–58.
- Petrat F., Paluch S., Dogruöz E., Dörfler P., Kirsch M., Korth H.G., Sustmann R., Groot de H. Reduction of Fe(III) ions complexed to physiological ligands by lipoyl dehydrogenase and other flavoenzymes *in vitro*: implications for an enzymatic reduction of Fe(III) ions of the labile iron pool // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 46403–46413.
- Pittman M.S., Robinson H.C., Poole R.K. A bacterial glutathione transporter (*Escherichia coli* CydDC) exports reductant to the periplasm // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 32254–32261.
- Poluektova E., Yunes R., Danilenko V. The putative antidepressant mechanisms of probiotic bacteria: relevant genes and proteins // *Nutrients.* 2021. V. 13. P. 1591.
- Pophaly S.D., Poonam S., Pophaly S.D., Kapila S., Nanda D.K., Tomar S.K., Singh R. Glutathione biosynthesis and activity of dependent enzymes in food-grade lactic acid bacteria harbouring multidomain bifunctional fusion gene (*gshF*) // *J. Appl. Microbiol.* 2017. V. 123. P. 194–203.
- Pridmore R.D., Pittet A.C., Praplan F., Cavadini C. Hydrogen peroxide production by *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 and its role in anti-*Salmonella* activity // *FEMS Microbiol. Lett.* 2008. V. 283. P. 210–215.
- Rezaïki L., Lamberet G., Derré A., Gruss A., Gaudu P. *Lactococcus lactis* produces short-chain quinones that cross-feed Group B *Streptococcus* to activate respiration growth // *Mol. Microbiol.* 2008. V. 67. P. 947–957.
- Ricciardi A., Ianniello R.G., Parente E., Zotta T. Factors affecting gene expression and activity of heme- and manganese-dependent catalases in *Lactobacillus casei* strains // *Int. J. Food Microbiol.* 2018. V. 280. P. 66–77.
- Ricciardi A., Zotta T., Ianniello R.G., Boscaino F., Matera A., Parente E. Effect of respiratory growth on the metabolite production and stress robustness of *Lactobacillus casei* N87 cultivated in cheese whey permeate medium // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10. P. 851.
- Rochat T., Grataudoux J.-J., Gruss A., Corthier G., Maguin E., Langella P., van de Guchte M. Production of a heterologous nonheme catalase by *Lactobacillus casei*: an efficient tool for removal of H₂O₂ and protection of *Lactobacillus bulgaricus* from oxidative stress in milk // *Appl. Environ. Microbiol.* 2006. V. 72. P. 5143–5149.
- Satoh T., Todoroki M., Kobayashi K., Niimura Y., Kawasaki S. Purified thioredoxin reductase from O₂-sensitive *Bifidobacterium bifidum* degrades H₂O₂ by interacting with alkyl hydroperoxide reductase // *Anaerobe.* 2019. V. 57. P. 45–54.
- Scharf C., Riethdorf S., Ernst H., Engelmann S., Volker U., Hecker M. Thioredoxin is an essential protein induced by multiple stresses in *Bacillus subtilis* // *J. Bacteriol.* 1998. V. 180. P. 1869–1877.
- Serata M., Yasuda E., Sako T. Effect of superoxide dismutase and manganese on superoxide tolerance in *Lactobacillus casei* strain Shirota and analysis of multiple manganese transporters // *Biosci. Microbiota Food Health.* 2018. V. 37. P. 31–38.
- Serrano L.M., Molenaar D., Wels M., Teusink B., Bron P.A., de Vos W.M., Smid E.J. Thioredoxin reductase is a key factor in the oxidative stress response of *Lactobacillus plantarum* WCFSI // *Microb. Cell Fact.* 2007. V. 6. P. 29.
- Shi W., Li Y., Gao X., Fu R. Improvement of the respiration efficiency of *Lactococcus lactis* by decreasing the culture pH // *Biotechnol. Lett.* 2016. V. 38. P. 495–501.
- Siciliano R.A., Pannella G., Lippolis R., Ricciardi A., Mazzeo M.F., Zotta T. Impact of aerobic and respirative life-style on *Lac-*

- tobacillus casei* N87 proteome // *Int. J. Food Microbiol.* 2019. V. 298. P. 51–62.
- Stevens M.J.A., Molenaar D., de Jong A., de Vos W.M., Kleerebezem M. Involvement of the mannose phosphotransferase system of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 in peroxide stress tolerance // *Appl. Environ. Microbiol.* 2010. V. 76. P. 3748–3752.
- Storz G., Imlay J.A. Oxidative stress // *Curr. Opin. Microbiol.* 1999. V. 2. P. 188–194.
- Tachon S., Brandsma J.B., Yvon M. NoxE NADH oxidase and the electron transport chain are responsible for the ability of *Lactococcus lactis* to decrease the redox potential of milk // *Appl. Environ. Microbiol.* 2010. V. 76. P. 1311–1319.
- Tachon S., Chambellon E., Yvon M. Identification of a conserved sequence in flavoproteins essential for the correct conformation and activity of the NADH oxidase NoxE of *Lactococcus lactis* // *J. Bacteriol.* 2011. V. 193. P. 3000–3008.
- Tachon S., Michelon D., Chambellon E., Cantonnet M., Mezange C., Henno L., Cachon R., Yvon M. Experimental conditions affect the site of tetrazolium violet reduction in the electron transport chain of *Lactococcus lactis* // *Microbiology (SGM)*. 2009. V. 155. P. 2941–2948.
- Talwalkar A., Kailasapathy K. Metabolic and biochemical responses of probiotic bacteria to oxygen // *J. Dairy Sci.* 2003. V. 86. P. 2537–2546.
- Tanaka K., Satoh T., Kitahara J., Uno S., Nomura I., Kano Y., Suzuki T., Niimura Y., Kawasaki S. O₂-inducible H₂O₂-forming NADPH oxidase is responsible for the hyper O₂ sensitivity of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. P. 10750.
- Tang W., Xing Z., Hu W., Li C., Wang J., Wang Y. Antioxidative effects *in vivo* and colonization of *Lactobacillus plantarum* MA2 in the murine intestinal tract // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016. V. 100. P. 7193–7202.
- Tian X., Wang Y., Chu J., Zhuang Y., Zhang S. Metabolite profiling coupled with metabolic flux analysis reveals physiological and metabolic impacts on *Lactobacillus paracasei* oxygen metabolism // *Process Biochem.* 2018. V. 68. P. 1–11.
- van Niel E.W.J., Hofvendahl K., Hahn-Hägerdal B. Formation and conversion of oxygen metabolites by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435 under different growth conditions // *Appl. Environ. Microbiol.* 2002. V. 68. P. 4350–4356.
- Vasquez E.C., Pereira T.M.C., Peotta V.A., Baldo M.P., Campos-Toimil M. Probiotics as beneficial dietary supplements to prevent and treat cardiovascular diseases: uncovering their impact on oxidative stress // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2019. P. 3086270.
- Vido K., Le Bars D., Mistou M.Y., Anglade P., Gruss A., Gaudu P. Proteome analyses of heme-dependent respiration in *Lactococcus lactis*: involvement of the proteolytic system // *J. Bacteriol.* 2004. V. 186. P. 1648–1657.
- Walker G.C. The SOS response of *Escherichia coli*. In: *Escherichia coli and Salmonella typhimurium* // *Cell. Mol. Biol.* 1996. P. 1400–1416.
- Watanabe M., van der Veen S., Nakajima H., Abee T. Effect of respiration and manganese on oxidative stress resistance of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 // *Microbiology (SGM)*. 2012. V. 158. P. 293–300.
- Wolf G., Strahl A., Meisel J., Hammes W.P. Heme-dependent catalase activity of lactobacilli // *Int. J. Food Microbiol.* 1991. V. 12. P. 133–140.
- Xiong Z.Q., Kong L.H., Wang G.Q., Xia Y.J., Zhang H., Yin B.X., Ai L.Z. Functional analysis and heterologous expression of bifunctional glutathione synthetase from *Lactobacillus* // *J. Dairy Sci.* 2018. V. 101. P. 6937–6945.
- Yamamoto N., Shoji M., Hoshigami H., Watanabe K., Watanabe K., Takatsuzu T., Yasuda S., Igoshi K., Kinoshita H. Antioxidant capacity of soymilk yogurt and exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria // *Biosci. Microbiota Food Health.* 2019. V. 38. P. 97–104.
- Zhang Y., Li Y. Engineering the antioxidative properties of lactic acid bacteria for improving its robustness // *Curr. Opin. Biotech.* 2013. V. 24. P. 142–147.
- Zheng J., Wittouck S., Salvetti E., Franz C.M.A.P., Harris H.M.B., Mattarelli P., O'Toole P.W., Pot B., Vandamme P., Walter J., Watanabe K., Wuys S., Felis G.E., Gänzle M.G., Lebeer S. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2020. V. 70. P. 2782–2858.
- Zotta T., Parente E., Ricciardi A. Aerobic metabolism in the genus *Lactobacillus*: impact on stress response and potential applications in the food industry // *J. Appl. Microbiol.* 2017. V. 122. P. 857–869.
- Zuo F., Yu R., Feng X., Khaskheli G.B., Chen L., Ma H., Chen S. Combination of heterogeneous catalase and superoxide dismutase protects *Bifidobacterium longum* strain NCC2705 from oxidative stress // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014. V. 98. P. 7523–7534.

Antioxidant Properties of Lactic Acid Bacteria

A. L. Bryukhanov¹, A. I. Klimko^{1, *}, and A. I. Netrusov¹

¹ Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: alenaklimko221@yandex.ru

Received April 18, 2022; revised May 27, 2022; accepted May 30, 2022

Abstract—Lactic acid bacteria (LAB) are widely used in fermentation processes for the preparation of various foodstuffs, including dairy, meat and vegetable products. In the course of industrial biotechnological processes, lactobacilli are often exposed to oxidative stress, which occurs due to accumulation of reactive oxygen species (ROS) inside the cells. ROS are formed as a result of incomplete reduction of molecular oxygen to

superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2), or hydroxyl radical (OH^{\cdot}) and cause serious damage to all cellular macromolecules. Since LAB do not possess a complete electron transport chain, it was previously believed that they are incapable of existence under oxic conditions. Nevertheless, in the cells of a number of LAB strains, the main antioxidant defense enzymes with high specific activity were found. These include two types of catalases and NADH peroxidase. Heme-containing catalase is synthesized in many species of lactobacilli if heme or hematin is present in the culture medium. Both monofunctional catalase and bifunctional catalase-peroxidase have been found in the cells of many LAB. Catalases of the second type (Mn-containing), which do not require the presence of heme, have also been found in the cells of some lactobacilli species. A high intracellular level of Mn(II) has been found in many LAB strains. Probiotic LAB cultures with pronounced antioxidant activity are in high demand, since they are potentially able to protect the host organism from the toxic effects of ROS and contribute to the prevention of cardiovascular, inflammatory, and oncologic diseases. Antioxidant defense systems in LAB cells were described in this review based on a thorough analysis of the current scientific data. In particular, the review describes the effect of oxidative stress on the metabolism of lactobacilli, their main antioxidant enzymes (NADH oxidase, NADH peroxidase, catalase, superoxide dismutase, thioredoxin reductase, etc.) and the key regulatory proteins and the genes responsible for oxygen uptake as one of the mechanisms for decreasing the ROS concentration.

Keywords: lactic acid bacteria (LAB), reactive oxygen species (ROS), superoxide dismutase (SOD), catalase, NADH peroxidase, oxidative stress, electron transport chain