

Nina Trojan^{1*}, Paweł Satora¹

¹Wydział Technologii Żywności, Katedra Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Technicznej,
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

Wpłynęło w maju 2016 r.
Zaakceptowano w lipcu 2016 r.

1. Wprowadzenie. 2. Antyoksydanty pochodzące z żywności. 3. Probiotyki. 4. Metody analizy właściwości antyoksydacyjnych. 5. Potencjał antyoksydacyjny probiotyków. 5.1. Produkty spożywcze zawierające probiotyki. 6. Doświadczenia *in vivo* – modele zwierzęce. 7. Badania kliniczne. 8. Mechanizm działania probiotyków jako antyoksydantów. 9. Podsumowanie

Probiotics and their potential antioxidative activity

Abstract: Human population in the XXI century is struggling with the increasing incidence of such diseases as obesity, diabetes, cancers, food allergies and many others. Recent studies have shown that oxidative stress caused by reactive oxygen species and free radicals, may underlie the occurrence of many diseases. Probiotics are known for their beneficial effects on health and are established as dietary adjuncts. Researchers are trying to find potential probiotic strains which can exhibit antioxidant properties along other health benefits. *In vitro* and *in vivo* studies have indicated that probiotics exhibit antioxidant potential. Also, many studies have shown that consumption of probiotics as dietary supplements, may reduce oxidative damage and modify activity of crucial antioxidative enzymes in human cells. Incorporation of probiotics in foods can provide a good strategy to supply dietary antioxidants, but more studies are needed to standardize the methods and evaluate antioxidant properties of probiotics before they can be recommended for their antioxidant potential. This paper presents the latest news related to probiotics and their antioxidative potential.

1. Introduction. 2. Antioxidants from food. 3. Probiotics. 4. Methods for antioxidative activity testing. 5. Probiotics antioxidative potential. 5.1. Food products containing probiotics. 6. *In vivo* studies – animal models. 7. Clinical trials. 8. Probiotics as antioxidants. 9. Conclusions

Słowa kluczowe: antyoksydanty, probiotyki, ROS, stres oksydacyjny

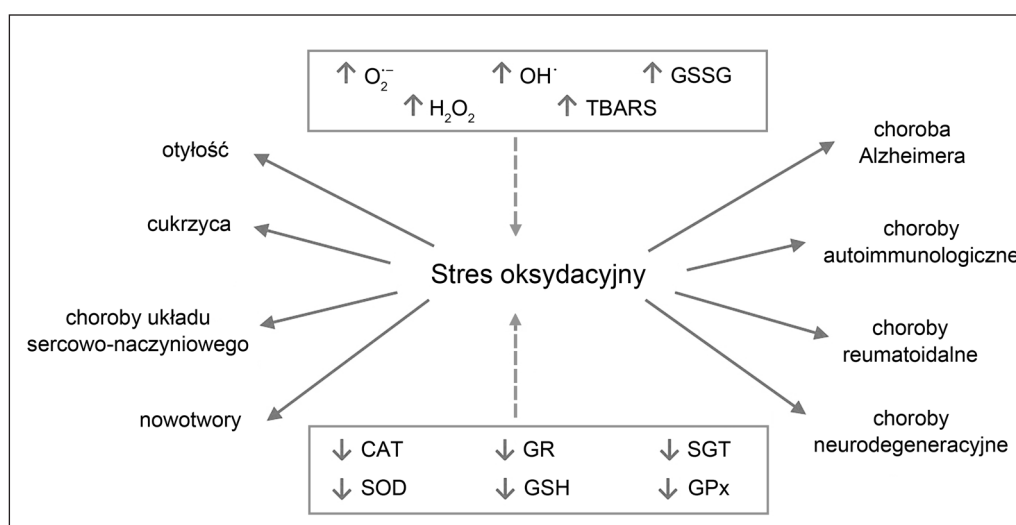
Key words: antioxidants, oxidative stress, probiotics, ROS

1. Wprowadzenie

Stres oksydacyjny definiowany jest jako stan komórki/organizmu, wywołany nagromadzeniem, a co za tym idzie nadmierną aktywnością reaktywnych form tlenu (ROS, *reactive oxygen species*) i/lub wolnych rodników. Do tego typu cząsteczek zalicza się między innymi anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$), nadtlenek wodoru (H_2O_2), rodnik hydroksylowy (OH^{\cdot}), czy też metale przejściowe (np. miedź lub żelazo). Obecność tych związków w komórkach jest naturalnym zjawiskiem fizjologicznym, będącym następstwem występowania w nich reakcji utleniania, czyli procesów polegających na przenoszeniu elektronów z danej substancji na utleniacz – związek będący w analizowanej reakcji akceptorem elektronów. Wyżej wymienione wolne rodniki i ROS są produktami, których wysoka reaktywność nadaje im zdolność wywoływania szybkich reakcji łańcuchowych. W kaskadach takich reakcji w sposób niekontrolowany przez komórkę mogą zacząć tworzyć się kolejne reaktywne formy tlenu, prowadząc do zachwiania jej równowagi redoks. Obserwuje się wówczas wyższą produkcję wolnych rodników i ROS niż komórka jest w stanie unieczynnić za pomocą obecnych

w niej mechanizmów antyoksydacyjnych. Do tego typu mechanizmów należą reakcje enzymatyczne katalizowane między innymi przez dysmutazę ponadtlenkową (SOD, *superoxide dismutase*), peroksydazę glutationową (GPx, *glutathione peroxidase*), reduktazę glutationową (GR, *glutathione reductase*) peroksydazę, transferazę glutationową (SGT, *glutathione S-transferase*) oraz katalazę (CAT, *catalase*). W komórce występują także nieenzymatyczne antyoksydanty takie jak witamina E (α -tokoferol), witamina C, koenzym Q, czy też glutation (GSH) [12, 50, 55, 56, 63] (Rys. 1). Ostatni z wymienionych nieenzymatycznych antyoksydantów pełni kluczową rolę w obronie antyoksydacyjnej. GSH jest substratem reakcji katalizowanych przez antyoksydanty enzymatyczne (między innymi peroksydazę glutationową) oraz stanowi „magazyn” grup tiolowych (-SH) w komórce. Dzięki obecności w jego cząsteczce grupy tiolowej może on oddziaływać z białkami, stabilizując ich strukturę. Glutation ulega przekształceniom z postaci zredukowanej (GSH) do utlenionej (GSSG), będącej dimerem glutationu. W reakcji przekształcenia GSH do GSSG powstają elektrony, które mogą być przyłączane przez wolne rodniki prowadząc do ich inaktywacji. GSH jest odtwarzane w reakcji katalizowanej przez reduktazę glutationową (GR).

* Autor korespondencyjny: Wydział Technologii Żywności, Katedra Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Technicznej, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, ul. Balicka 122, 30-149 Kraków; e-mail: ninatrojan@outlook.com



Rys. 1. Czynniki inicjujące powstanie stresu oksydacyjnego oraz jego rola w patogenezie wybranych chorób
 $O_2^{\cdot-}$ – anionorodnik ponadtlenkowy, H_2O_2 – nadtlenek wodoru, OH^{\cdot} – rodnik hydroksylowy, GSSG – utleniony glutation, TBARS – produkty peroksydacji lipidów, CAT – katalaza, SOD – dysmutaza ponadtlenkowa, GR – reduktaza glutationowa, GSH – zredukowany glutation, SGT – transferaza glutationowa, GPx – peroksydaza glutationowa.

lizowanej przez reduktazę glutationową w obecności NADPH, który zostaje utleniony do $NADP^+$ [21]. Działanie wszystkich antyoksydantów w organizmie sprowadza się finalnie do przeciwdziałania efektom procesów utleniania. Czy to w sposób bezpośredni za pomocą katalizowania reakcji enzymatycznych, czy też pośrednio jako związki dezaktywujące wolne rodniki i zatrzymujące kaskady reakcji łańcuchowych. W skład systemów antyoksydacyjnych bez wątpienia wchodzi także grupy związków uczestniczących w stałym odtwarzaniu potencjału antyoksydacyjnego, ponieważ wszystkie cząsteczki uczestnicząc w reakcjach ulegają zużyciu i muszą zostać odtworzone [30].

Szereg wyników badań dostarcza dowodów na znaczącą rolę reaktywnych form tlenu, a przez to stresu oksydacyjnego w patogenezie wielu chorób u ludzi. Do schorzeń tych zalicza się między innymi choroby cywilizacyjne, takie jak otyłość, cukrzyca typu 2, choroby sercowo-naczyniowe, udary oraz chorobę Alzheimera, zaćmę czy też choroby reumatoidalne [12, 50, 56, 63] (Rys. 1). Istnieje zatem potrzeba poszukiwania nietoksycznych przeciwutleniaczy, które zwiększają zdolności antyoksydacyjne organizmu, a przez co spowolnią postęp wielu przewlekłych chorób. Dzięki wynikom licznych badań naukowych, publikacji popularnonaukowych, a nawet reklam obserwuje się coraz większą świadomość społeczeństwa na temat wartości odżywczych spożywanych produktów. Taka sytuacja skłania do poszukiwania nowych źródeł antyoksydantów w już istniejących na rynku składnikach żywności o udokumentowanej, innej wartości prozdrowotnej. Różne doniesienia wskazują, że to probiotyki mogą stać się takim składnikiem. Ze względu na swoją długą tradycję bezpiecznego stosowania oraz ich potencjalne działanie

przeciwrodnikowe stają się obiecującym składnikiem żywności o działaniu antyoksydacyjnym i są pod tym kątem intensywnie badane [47].

2. Antyoksydanty pochodzące z żywności

Wśród wielu składników żywności najbardziej obfite w naturalne przeciwutleniacze są produkty pochodzenia roślinnego. Zawarte w nich antyoksydanty pełnią swoją funkcję działając w różnorodny sposób. Część z nich odpowiada za wychwytywanie i „zmiatanie” wolnych rodników oraz neutralizowanie ich w bezpośrednich reakcjach chemicznych (wolne rodniki i reaktywne formy tlenu są redukowane do bardziej stabilnych i nie-reaktywnych form). Inne mają zdolność do hamowania aktywności enzymów odpowiedzialnych za tworzenie wolnych rodników lub chelatowania tzn. wiązania w komórkach jonów metali przejściowych (szczególnie żelaza i miedzi), czyli metali odpowiedzialnych za zapoczątkowanie łańcucha reakcji wolnorodnikowych. Prowadzą także do ochrony innych antyoksydantów, np. zapobiegając utlenianiu witaminy C lub poprawiając działanie endogennych przeciwutleniaczy np. glutationu. Do tego typu związków zalicza się między innymi: polifenole tworzące dwie główne grupy związków – kwasy fenolowe (kwas kawowy, elagowy, ferulowy) oraz flawonoidy z licznymi podgrupami, karotenoidy, witaminy i tokoferole [54, 70].

Bogatymi w tego typu związki roślinami są: czosnek, brokuły, zielona herbata, soja, pomidory, marchew, brukselka, kapusta, cebula, czerwone buraki, żurawina, kakao, jagody, czerwone winogrona, śliwki i owoce cytrusowe. Rozbudowany rynek żywności funkcjonalnej

zajął się poszukiwaniem substancji o charakterze antyoksydacyjnym w już istniejących produktach. Wykazano, że duży potencjał w tym obszarze wykazują produkty mleczne. Ostatnie doniesienia wskazują, że szeroko rozpowszechnione probiotyki mogą także okazać się dobrym źródłem przeciwutleniaczy [47].

3. Probiotyki

Probiotyki to żywe drobnoustroje, które – podawane w odpowiednich ilościach – wywierają korzystne skutki zdrowotne. Są to mikroorganizmy, głównie bakterie kwasu mlekowego (LAB, *Lactic Acid Bacteria*), mogące zasiedlać różne środowiska, w tym organizm człowieka. Probiotyk może mieć w swym składzie pojedyncze szczepy bakterii kwasu mlekowego, szczepy drożdży, kultury pleśni lub też bakterie kwasu mlekowego łącznie z wyselekcjonowanymi szczepami drożdżowymi. Bakterie probiotyczne dodawane są do różnych środków spożywczych. Występują przede wszystkim w sfermentowanych produktach mlecznych, ale także w tradycyjnych kiszonkach. Nadają produktom specyficzny smak i zapach, a także chronią je przed rozwojem szkodliwych mikroorganizmów. Można je również znaleźć w preparatach farmaceutycznych, suplementach diety, stosowanych chociażby przy antybiotykoterapii [59]. Wśród wielu pozytywnych efektów jakie probiotyki wywierają na ludzki organizm wymienić można między innymi: łagodzenie objawów nietolerancji laktozy, zapobieganie biegunkom i infekcjom układu moczowo-płciowego, obniżanie poziomu cholesterolu, wzmocnienie układu odpornościowego [4, 14], zmniejszanie ryzyka wystąpienia nowotworów – głównie jelita grubego – oraz łagodzenie objawów alergii [15, 44].

Do drobnoustrojów o działaniu probiotycznym należą przede wszystkim bakterie z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Oprócz nich do tej grupy zalicza się także inne bakterie kwasu mlekowego: *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* i *Weissella* [37], *Bacillus* spp. [28], niektóre szczepy *Escherichia coli* oraz *Propionibacterium* spp. Najbardziej rozpowszechnionym szczepem drożdżowym o właściwościach probiotycznych jest *Saccharomyces boulardii* [26, 53].

Ostatnie dziesięciolecia zmieniły podejście społeczeństwa do zdrowego odżywiania i stosowania w diecie tzw. żywności funkcjonalnej, inaczej FOSHU (*Foods for Specified Health Use*). Jest to rodzaj żywności, z której usunięto szkodliwe składniki (np. alergeny), bądź wzbogacono ją w substancje aktywne fizjologicznie, tak aby otrzymać produkt posiadający odpowiednią wartość odżywczą, poprawiającą stan zdrowia człowieka [68]. Poszerzenie wiedzy na temat pozytywnych właściwości drobnoustrojów probiotycznych sprawiło, że ich obec-

ność w komercyjnych produktach spożywczych jest powszechna i została bardzo dobrze przyjęta przez konsumentów. Dlatego przemysł spożywczy całego świata dokłada wszelkich starań, by skonstruować produkty żywności funkcjonalnej, będące nośnikami mikroorganizmów o działaniu probiotycznym, umożliwiając im przetrwanie w warunkach przewodu pokarmowego i pełnienie w nim swoich dobroczynnych funkcji. Do takich działań mobilizują także doniesienia o ich potencjalnych właściwościach antyoksydacyjnych, poruszanych w tym artykule.

4. Metody analizy właściwości antyoksydacyjnych

W celu oceny potencjału antyoksydacyjnego związków naturalnych opracowano wiele różnych metod. Najważniejszy jest jednak wybór metody względnie szybkiej i dającej obiektywne rezultaty, a przede wszystkim adekwatnej do specyfiki analizowanego produktu. Każdy z obecnie opisanych testów aktywności antyoksydacyjnej cechuje się specyficznym mechanizmem działania, mając przy tym swoje wady i zalety, jednakże w przypadku braku uniwersalnej metody dla danego produktu, która może dać jednoznaczne wyniki, najlepszym sposobem jest użycie wielu metod jednocześnie. Niektóre procedury obejmują stosowanie syntetycznych przeciwutleniaczy lub wolnych rodników, część opiera się na reakcjach peroksydacji lipidów, większość z nich wymaga wcześniejszej obróbki analizowanego materiału i ukazuje wyniki w specyficzny dla siebie sposób. Antyoksydacyjne właściwości produktów probiotycznych także badano stosując różne metody *in vitro* i *in vivo*. Ich opis przedstawiony został poniżej oraz zestawiony w Tabeli I.

Metoda z rodnikiem DPPH

Jedną z najczęściej stosowanych metod do pomiaru aktywności antyutleniającej jest metoda wykorzystująca rodnik DPPH \cdot (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl). Metanolowy roztwór rodnika wykazuje pasmo absorpcji w zakresie widzialnym, z maksimum przy 515–540 nm. W wyniku przebiegu reakcji obserwowany jest spadek intensywności zabarwienia, proporcjonalny do zawartości antyutleniaczy. Rodnik powinien znajdować się w nadmiarze w stosunku do związku antyoksydacyjnego, tak by cała ilość antyutleniacza miała szansę zreagować [20]. W wyniku reakcji powstaje zredukowana forma rodnika DPPH \cdot (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyna) o barwie żółtej [23]. Metoda DPPH jest często stosowana ze względu na to, że jest stosunkowo prosta i nie wymaga długotrwałego przygotowania próbki. Dodatkowo rodnik DPPH \cdot jest dostępny komercyjnie, a więc nie trzeba go bezpośrednio wytwarzać z prekursora, jak w przypadku poniżej opisanej metody ABTS.

Tabela I
Wybrane metody analizy właściwości antyoksydacyjnych różnych próbek biologicznych

Metoda	Zasada działania metody	Obserwacje	Piśmiennictwo
DPPH	w obecności związku o charakterze atyoksydacyjnym następuje redukcja stabilnego rodnika 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylu (DPPH) o fioletowym zabarwieniu do żółtej 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyny	żółte zabarwienie substancji oceniane wzrokowo lub analizowane spektrofotometrycznie	[11, 17]
ABTS	antyutleniacze prowadzą do redukcji kationorodnika ABTS ⁺ – 2,2-azynobis-(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonian) powodując odbarwienie niebieskozielonego roztworu	odbarwienie roztworu oceniane wzrokowo lub analizowane spektrofotometrycznie	[27, 57]
FRAP	monitorowanie zdolności donorowych antyutleniacza, za pomocą pomiaru redukcji kompleksu żelaza(III) z 2,4,6-tris(2-pirydylo)-1,3,5-triazyną ([Fe ³⁺ – (TPTZ) ₂] ³⁺) do intensywnie niebieskiego kompleksu [Fe ²⁺ – (TPTZ) ₂] ²⁺	analiza spektrofotometryczna	[5, 8, 9]
ORAC	antyutleniacze hamują prowadzoną przez wolne rodniki reakcję utleniania sondy fluorescencyjnej, która w trakcie tej reakcji wykazuje spadek fluorescencji	analiza fluorymetryczna	[24, 46, 68]
analiza zdolności neutralizacji rodnika hydroksylogowego	w obecności żelaza następuje zmiana absorbancji związana z dezaktywacją rodnika hydroksylogowego przeprowadzaną przez antyoksydanty – kwasy hydroksybenzoesowe, należące do grupy polifenoli	analiza spektrofotometryczna	[29]

Za zgodą Mishra V i wsp., *J. Agric. Food Chem.* **63**, 3615-3526 (2015) Copyright (2015) American Chemical Society [47]

Metoda może być także stosowana z wykorzystaniem analizy przepływowo-wstrzykowej (FIA, *flow injection analysis*), co znacznie ułatwia i przyspiesza pomiar, a ponadto umożliwia w większym stopniu kontrolowanie warunków oznaczeń [43]. Wadą są zaś możliwe interferencje od związków absorbujących przy tej samej długości fali, np. karotenoidów.

Metoda z kationorodnikiem ABTS⁺

Inną metodą, opartą na przeniesieniu elektronu, ale również wykorzystującą detekcję spektrofotometryczną, jest metoda polegająca na monitorowaniu stężenia barwnego kationorodnika ABTS⁺ – 2,2-azynobis-(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonianu). Ma on barwę niebieskozieloną i wykazuje cztery maksima absorpcji przy 417, 645, 728 oraz 815 nm w środowisku wodnym, a trzy – 414, 730, 873 nm w środowisku etanolowym. Kationorodnik przed pomiarem należy wygenerować. W tym celu można zastosować reakcje enzymatyczne (np. z mioglobina lub peroksydazą chrzanową) lub chemiczne utlenienie (za pomocą MnO₂, K₂S₂O₈). Chemiczne metody generowania ABTS⁺ są jednak bardziej wymagające pod względem warunków reakcji (m.in. bardzo długi czas reakcji). Antyutleniacze redukują ABTS⁺ w zależności od aktywności, stężenia przeciwutleniacza i czasu trwania reakcji [18].

Metoda FRAP

(*Ferric Ion Reducing Antioxidant Parameter*)

Metoda oznaczania zdolności do redukcji jonów żelaza (III) opiera się na reakcji redukcji kompleksu Fe³⁺ z (2,4,6-tris(2-pirydylo)-1,3,5-triazyną (TPTZ), zaś jej

produktem jest intensywnie niebieski kompleks z Fe²⁺ ($\lambda_{max} = 593 \text{ nm}$). Mierzone są więc zdolności donorowe antyutleniacza [10]. Trwałość kompleksu zależy od pH, a optymalne warunki występują przy pH 3,6, które osiągnąć jest przez dodatek buforu octanowego. Metoda FRAP jest szybka, ma jednak szereg wad, ponieważ wykorzystywany kompleks jest redukowany przez wszystkie związki, również te które nie należą do antyutleniaczy, których potencjał redoks jest niższy od 0,70 V. Powstałe jony Fe²⁺ mogą w obecności H₂O₂ brać udział w reakcjach produkujących rodniki, co również wpływa myląco na uzyskane wyniki. Ponadto wartość pH reakcji nie jest zbliżona do pH fizjologicznego. Niektóre związki w ogóle nie wykazują redukujących zdolności w stosunku do Fe³⁺-TPTZ. Należą do nich tiolet, w tym bardzo ważny, wspomniany we wcześniejszym fragmencie artykułu, glutation oraz białka [51]. Fakt ten powoduje zaniżanie wyników, szczególnie dla próbek biologicznych. Z tego powodu poszukiwane są nowe układy oparte na redukcji jonów Fe³⁺ [6]. Za pomocą tej metody Carlsen i wsp. [13] analizowali aktywność antyoksydacyjną różnych produktów spożywczych. Kilka przykładów produktów przytoczonych w niniejszej pracy przeglądowej wraz z uzyskanymi przez badaczy wynikami przytoczono w Tabeli II.

Metoda ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*)

W metodzie tej rodniki peroksylogowe (generowane ze związków azowych) lub rodniki hydroksylogowe (generowane z reakcji jonów Cu⁺ z H₂O₂) reagują z sondą fluorescencyjną. Sondą jest związek wykazujący silną fluorescencję, np. fluoresceina, dichlorofluoresceina

Tabela II
Zawartość związków antyoksydacyjnych oznaczonych metodą FRAP w wybranych produktach mlecznych i sokach owocowych, na podstawie Carlsen i wsp. [13]

Lp.	Produkt	Zawartość związków antyoksydacyjnych [mmol/100 g produktu]
1	maślanka, 1,5 %	0,04
2	mleko krowie, 2%	0,04
3	mleko kozie	0,04
4	kwaśna śmietana	0,15
5	jogurt naturalny	0,06
6	jogurt z jagodami	0,25
7	ser Gorgonzola	0,54
8	sok jabłkowy	0,27
9	sok pomarańczowy	0,64
10	sok żurawinowy	0,92

lub pirogalol [3]. W wyniku reakcji utlenienia fluorescencja sondy zanika. Po dodaniu substancji o właściwościach antyutleniających do środowiska reakcji, zostaje zahamowany rozkład znacznika fluorescencyjnego i następuje neutralizacja wolnych rodników przez cząsteczki antyutleniacza. Obserwujemy więc wydłużenie czasu indukcji i spadek stałej szybkości reakcji rozkładu sondy. Zdolności antyutleniające wyrażane są poprzez porównanie przebiegu reakcji w obecności próbki z reakcją zachodzącą w obecności wzorcowego antyoksydantu. Jako substancji wzorcowej służącej wyrażeniu zdolności antyutleniającej w jednostkach stężenia najczęściej stosuje się rozpuszczalny w wodzie analog witaminy E – troloks lub kwas galusowy. Metodą tą mierzyć można zdolności antyutleniające zarówno hydrofilowych, jak i lipofilowych antyoksydantów. Ze względu na stosowany detektor fluorescencyjny, metoda charakteryzuje się wysoką czułością i precyzją [41].

Analiza zdolności neutralizacji rodnika hydroksylowego

Rodnik hydroksylowy ($\text{OH}\cdot$) to obojętna forma jonów wodorotlenkowych (OH^-). Jest on jednym z najbardziej reaktywnych rodników, uczestniczący w procesie peroksydacji lipidów i odpowiadający za powstawanie uszkodzeń w obrębie DNA [29]. Jony żelaza biorą czynny udział w tworzeniu rodnika hydroksylowego w reakcji Fentona. W tej metodzie, w obecności żelaza, obserwuje się zmiany absorbancji związane z dezaktywacją rodnika hydroksylowego przeprowadzaną przez antyoksydanty – kwasy hydroksybenzoesowe, należące do grupy polifenoli [47, 48].

Inne metody

Wśród innych, dodatkowych metod umożliwiających badanie właściwości antyoksydacyjnych szczepów

probiotycznych wymienić można analizy genetyczne, polegające na badaniu poziomu ekspresji genów kodujących enzymy uczestniczące w zmiataniu wolnych rodników, takie jak SOD czy CAT. Bada się także aktywność tych enzymów, zdolność drobnoustrojów do przeżycia w różnych stężeniach ROS, czy też zdolność do chelatowania metali przejściowych [16, 22, 39, 66].

5. Potencjał antyoksydacyjnych probiotyków

Pełna charakterystyka drobnoustrojów probiotycznych przeprowadzana jest na początku za pomocą metod *in vitro*, a następnie potwierdzana w doświadczeniach *in vivo*, na odpowiednich modelach zwierzęcych. Taki schemat dotyczy też analizy właściwości antyoksydacyjnych probiotyków. W pierwszych etapach drobnoustroje analizowano za pomocą różnorodnych, opisanych wcześniej metod, a następnie podawano je zwierzętom w odpowiednim dla danego zwierzęcia nośniku, czyli rodzaju żywności. W badaniach *in vitro* analizowano aktywność przeciwutleniającą różnych gatunków drobnoustrojów probiotycznych (choć były to głównie bakterie należące do *Lactobacillus* sp. oraz *Bifidobacterium* sp.) oraz szeroką gamę produktów spożywczych zawierających organizmy probiotyczne.

Przeprowadzono liczne analizy potencjału antyoksydacyjnego drobnoustrojów należących do rodzaju *Bifidobacterium*. Wśród nich przebadano między innymi *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 – jelitowy szczep o udowodnionych właściwościach probiotycznych. Analizowano zarówno potencjał całych, nienaruszonych komórek bakteryjnych (hodowanych w pożywce MRS), jak i tzw. ekstrakty komórkowe – ICFE (*intracellular free extracts*). W obu przypadkach zaobserwowano odpowiednio 32 i 48% inhibicję procesu peroksydacji kwasu linolowego oraz 52 i 42% aktywność zmiatania rodnika DPPH. Dla tych szczepów analizowano także cytotoksyczność N-tlenku 4-nitrochinoliny (4NQO) na komórki jelitowe linii 407. Zaobserwowano 89% zahamowanie toksyczności w hodowli komórek linii 407 w połączeniu z żywymi bakteriami, ale nie zanotowano zmian w przypadku ICFE. Co więcej, hodowla zawierająca 10^9 komórek *B. longum* ATCC 15708 powodowała inhibicję procesu peroksydacji lipidów o 16 i 34% odpowiednio dla całych komórek oraz ICFE [38]. Shen i wsp. [61] porównali aktywność antyoksydacyjną supernatantów powstałych po zwirowaniu hodowli, komórek nienaruszonych szczepu *Bifidobacterium animalis* 01 oraz ich ICFE. Zaobserwowali zahamowanie procesu peroksydacji kwasu linolowego o odpowiednio: 30, 41 i 71%. Badacze analizowali także aktywność zmiatania rodnika DPPH, uzyskując najwyższą aktywność dla supernatantu, a najniższą dla komórek w pożywce MRS. Supernatant tego szczepu wykazywał

także 78% aktywność zmiatania rodnika hydroksylowego oraz 86% dla anionorodnika ponadtlennego, a wyniki te były wyższe niż w przypadku komórek w pożywce MRS lub ICFE.

Jak wiadomo, żelazo może indukować tworzenie nadtlenu wodoru i rodnika hydroksylowego. W badaniu przeprowadzonym przez Sun i wsp. [62] analizowano przeżywalność różnych bakterii mlekowych z rodzaju *Lactobacillus* w jelitach myszy, w których zwiększono stężenie żelaza. Wykazano, że niektóre szczepy z rodzaju *Lactobacillus* są bardziej odporne na przetrwanie w środowisku o zwiększonej zawartości żelaza, a co za tym idzie na działanie wolnych rodników tlenowych. Pozwala im to jednocześnie na wywieranie niezmiennego, pozytywnego wpływu na ekosystem jelita oraz potencjał redoks w nim panujący. Zaobserwowano, że szczep *L. rhamnosus* GG (LGG) był w stanie przeżyć dłużej w środowisku o wysokim stężeniu nadtlenu wodoru i rodnika hydroksylowego, niż szczepy *L. paracasei* Fn032, czy też *L. plantarum* Fn001. Co więcej, w obecności szczepu LGG obserwowano obniżenie stężenia wolnych rodników oraz aldehydu malonowego (MDA) – produktu procesu peroksydacji lipidów. Szczep *L. plantarum* Fn001 nie wykazywał działania antyoksydacyjnego ani w badaniu *in vivo*, ani *in vitro*, w których symulowano warunki panujące w przewodzie pokarmowym. Obserwowano także, że szczepy o właściwościach antyoksydacyjnych zwiększają swoje zdolności zmiatania wolnych rodników w obecności sztucznego soku żołądkowego i trzustkowego. Inni badacze analizowali 39 szczepów *Lactobacillus* pod kątem ich zdolności do przetrwania w warunkach zwiększonego stężenia ROS. Zaobserwowali, że różne szczepy tego samego gatunku, wyizolowane z jednego środowiska, wykazują odmienną tolerancję na nadtlenek wodoru czy rodnik hydroksylowy. Mogą charakteryzować się różną ekspresją genów kodujących dysmutazę ponadtlenną i katalazę oraz prowadzić inhibicję peroksydacji kwasu linolowego w różnym stopniu. Na podstawie wyników tego badania, wysunięto wnioski, o zróżnicowanej skuteczności antyoksydacyjnej probiotycznych bakterii z rodzaju *Lactobacillus* [1]. Ciekawym, szybkim i nowatorskim podejściem do analizy właściwości antyoksydacyjnych probiotyków jest wykorzystanie nicienia *Caenorhabditis elegans* jako gospodarza – organizmu modelowego. W tym badaniu Grompone i wsp. [26] przeanalizowali aż kilkadziesiąt różnych bakterii kwasu mlekowego. Wśród nich znalazły się 62 szczepy *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. plantarum* oraz *L. rhamnosus*), 9 szczepów *Streptococcus thermophilus* oraz 6 *Bifidobacterium* (*B. animalis*, *B. breve*, *B. longum*). Nicienie był karmiony szczepami probiotycznymi, po czym poddawano go ekspozycji H_2O_2 , porównując uzyskane wyniki do efektu protekcyjnego wywieranego przez szczep *Escherichia*

coli OP50. Wykazano najwyższą aktywność antyoksydacyjną u szczepu *L. rhamnosus* CNCM I-3690.

W związku z tym, że miedź i żelazo to metale prooksydacyjne, badano zdolności drobnoustrojów probiotycznych do chelatowania tych pierwiastków. Wykazano wysoką zdolność wiązania Cu^{2+} przez *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* oraz 6 różnych szczepów *Lactobacillus bulgaricus*. W przypadku dwóch szczepów *B. longum* – B6 oraz 15708 zaobserwowano zdolność wiązania zarówno Cu^{2+} , jak i Fe^{2+} . Wszystkie badane szczepy nie powodowały inhibicji działania dysmutazy ponadtlennkowej w medium hodowlanym, nawet po dodaniu do niego jonów Cu^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , czy też Mn^{2+} . Przebadane w tym eksperymencie szczepy probiotyczne prowadziły również do inhibicji utleniania askorbinianu o około 7–12%. Porównywano także zdolności zmiatania rodnika hydroksylowego przez szczepy probiotyczne uzyskując najwyższą zdolność w tym zakresie dla *L. acidophilus* E, a najniższą dla *S. thermophilus* 3641 [39].

Przebadano także zawartość GSH w szczepach probiotycznych i wykazano jego najwyższe stężenie u szczepu *L. casei* HY 2782, po 24 godzinach hodowli, a po 72 wartości malała. Różnice w ilości GSH obserwowano także hodując te same szczepy w różnych pożywkach i tak, zaobserwowano, że probiotyki w typowej dla bakterii LAB pożywce MRS produkują najwięcej tego antyutleniacza, w porównaniu z hodowlą w podłożu Bif-TPY (Bifidobacterium Tryptone Phytone Yeast Extract) lub bulionie BCP (Bromcresol Purple Dextrose Broth). Badacze wykazali także pozytywną korelację pomiędzy stężeniem GSH, a aktywnością antyoksydacyjną badanych komórek [69].

Kim i wsp. [34] analizowali efekt ochronny probiotycznego szczepu *Lactobacillus gasseri* NRI 312 wobec oksydacyjnego uszkodzenia lipidów wchodzących w skład błon komórkowych oraz uszkodzenia DNA, na liniach ludzkich komórek limfocytów T (Jurkat). Wykazali, że po dodaniu bakterii probiotycznych do hodowli komórek obserwuje się zmniejszenie negatywnych skutków wywoływanych przez stres oksydacyjny na błony komórkowe oraz około 50% zahamowanie uszkodzeń w obrębie DNA.

5.1. Produkty spożywcze zawierające probiotyki

Celem potwierdzenia właściwości antyoksydacyjnych probiotyków, uzyskanych w badaniach *in vitro*, wykonuje się wiele analiz produktów spożywczych zawierających drobnoustroje probiotyczne.

Przeprowadzono fermentację 3 rodzajów mleka: krowiego, koziego i wielbłądziego uzupełniając próbki o szczep probiotyczny *Pediococcus pentosus* i analizowano właściwości antyoksydacyjne oraz profil kwasów tłuszczowych. Wyniki wykazały, że najwyższy poziom

zmianienia rodnika DPPH' obserwuje się w sfermentowanym mleku kozim (98%), a następnie w produkcji z mleka wielbłądziego (86%) i mleka krowiego (79%) [7]. Przeanalizowano także aktywność antyoksydacyjną dwóch dostępnych na rynku synbiotyków. Jeden z nich skonstruowany był na bazie serwatki i miodu, a drugi zawierał inulinę, sok pomarańczowy i probiotyczny szczep *L. helveticus* MTCC 5463. Oba produkty charakteryzowały się zdolnością zmniejszenia rodnika hydroksylowego, przy czym aktywność ta malała podczas przechowywania produktów w niskich temperaturach (około 4°C) [60]. W innym synbiotyku, w skład którego wchodziły fruktooligosacharydy oraz bakterie *L. plantarum* lub *L. fermentum* zaobserwowano odpowiednio 85 i 82% zdolność zmniejszenia rodnika DPPH', a aktywność ta wzrastała wraz z czasem inkubacji bakterii probiotycznych z fruktooligosacharydami, uzyskując tym samym efekt działania właściwy dla synbiotyku [42]. Inni badacze analizowali zdolności namnażania szczepów probiotycznych należących do *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* w połączeniu z prebiotykami takimi jak: miód, pyłek kwiatowy, inulina, laktuloza oraz rafinoza. Wykazano największy przyrost biomasy bakterii oraz najwyższą aktywność zmniejszenia rodnika DPPH' (45%) po 7 dniach inkubacji w próbce, w której połączono probiotyki z pyłkiem pszczelim i inuliną [64].

6. Doświadczenia *in vivo* – modele zwierzęce

Po badaniach *in vitro*, modele zwierzęce są kolejnym etapem wykorzystywanym do analizy konkretnych cech drobnoustrojów probiotycznych, już w odniesieniu do działania na cały organizm. Dopiero pozytywne wyniki uzyskane w badaniach na zwierzętach można przenosić na działanie danego czynnika u ludzi.

Wang i wsp. [16] badali oddziaływanie probiotycznego szczepu *L. fermentum* na świnię. Wykazali, że suplementacja tym drobnoustrojem wspomaga zdrowy wzrost świń poprzez jego wpływ na podniesienie aktywności SOD oraz GPx oraz obniżanie stężenia MDA w surowicy krwi badanych zwierząt. Co więcej zaobserwowano zwiększenie aktywności CAT i spadek stężenia MDA w wątrobie tych zwierząt [66]. W innym badaniu, tym razem przeprowadzonym na szczurach, badano wpływ dwóch szczepów probiotycznych – *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B3 oraz A13. Zaobserwowano wzrost poziomu GSH w jelitach szczurów suplementowanych wyżej wymienionymi szczepami. Jednocześnie zaobserwowano zwiększony poziom TBARS – cząsteczek, które podobnie jak ROS powstają w procesie peroksydacji lipidów, ale mają dłuższy okres półtrwania, przez co są łatwiejsze do wykrycia. Tego typu niejednoznaczne wyniki uzyskane w badaniach na zwierzętach wymagają potwierdzenia dalszymi analizami [16]. Jak pokazały

inne badania na szczurach oprócz potencjału antyoksydacyjnego *L. casei* ssp. *casei*, probiotyk ten wykazuje także zdolność obniżania poziomu cholesterolu we krwi. W grupie zwierząt suplementowanych mlekiem fermentowanym, zaobserwowano obniżenie poziomu cholesterolu o 2–11% i o 15–25% w grupie, w której mleko było dodatkowo wzbogacone o liofilizowany szczep *L. casei*. Obserwowano także spadek TBARS u tych zwierząt. Wyniki porównywane były z grupą kontrolną otrzymującą jedynie zwykłe, odtuszczone mleko [32]. W innym badaniu analizowano izolowany z jelita szczura probiotyczny szczep *E. coli* CFR, u którego zaindukowano silny stres oksydacyjny za pomocą DMH (1,2-dimetylohydrazyny), która jest silnym kancerogenem alkilującym DNA. Związek ten jest często używany w badaniach naukowych, między innymi do indukowania nowotworów okrężnicy u zwierząt laboratoryjnych. Stwierdzono, że u zwierząt traktowanych DMH istotnie spadła aktywność enzymów antyoksydacyjnych (SOD, CAT oraz GPx), a także nasilił się proces peroksydacji lipidów w wątrobie i jelitach tych zwierząt. Co najistotniejsze, po doustnej suplementacji szczepem probiotycznym zanotowano zniesienie działania DMH, aktywność enzymów antyoksydacyjnych wzrosła, a proces peroksydacji lipidów w obu analizowanych tkankach utrzymywał się na poziomie bliskim kontroli. Dodatkowo badanie histologiczne wykazało istotny udział ochronny *E. coli* CFR na śluzówkę jelita [53]. W innych badaniach zaobserwowano także, że suplementacja szczepem LGG pomaga zmniejszyć negatywne działanie alkoholu na wątrobę [19].

7. Badania kliniczne

Celem potwierdzenia prozdrowotnych właściwości bakterii probiotycznych uzyskanych w badaniach *in vitro* i na modelach zwierzęcych przeprowadzono badania kliniczne z udziałem ludzi (randomizowane z podwójnie ślepią próbą, kontrolą – placebo oraz badaniem naprzemiennym). Analizowano właściwości szczepu *L. fermentum* ME-3. W badaniach udział wzięły zarówno osoby zdrowe, jak i pacjenci z alergiami, czy też po przebyciu udaru. W jednym z badań pacjenci otrzymywali kapsułki probiotyku lub synbiotyku ze szczepem ME-3, sfermentowane kozie mleko lub preparaty spożywcze typu ser lub kefir. Konsumpcja szczepu ME-3 miała pozytywny wpływ na skład mikroflory jelitowej. Zaobserwowano zwiększoną liczebność bakterii należących do *Lactobacillus* w próbkach kału badanych ochotników, co zapewniało im zwiększoną odporność na działanie drobnoustrojów chorobotwórczych. Probiotyk wykazywał pozytywne działanie w odniesieniu do poziomu cytokin we krwi, głównych markerów gospodarki węglowodanowej i lipidowej (glukozy,

trójglicerydów, cholesterolu HDL i LDL), metabolitów takich jak homocysteina, bilirubina czy kreatynina oraz poziomu wapnia i żelaza we krwi [45]. W innym badaniu pacjentom z atopowym zapaleniem skóry (AZS) podawano przez 3 miesiące fermentowane mleko kozie z *L. fermentum* ME-3. Po spożyciu probiotyku zaobserwowano obniżoną zawartość prooksydacyjnego żelaza w formie utlenionej w porównaniu z wartościami przed suplementacją. Stwierdzono także osłabienie procesu peroksydacji lipidów. Suplementacja doprowadziła do wzrostu poziomu GSH w skórze oraz w surowicy krwi tych pacjentów [33]. W innym badaniu pilotażowym analizie poddano 21 chorych po udarze mózgu. Pacjentów losowo podzielono na dwie grupy. W pierwszej, pacjenci oprócz standardowej opieki rehabilitacyjnej otrzymywali przez 3 tygodnie kapsułki z liofilizowanym szczepem ME-3 (3 razy dziennie kapsułka z 10^9 cfu/g bakterii). W drugiej grupie pacjenci otrzymywali 3 razy dziennie 250 mg sacharozy i mikrocelulozy, jako grupa kontrolna. Przed i po terapii obserwowano standardowe dla tego typu rekonwalescencji parametry ruchowe pacjentów oraz liczne parametry biochemiczne. Jedynie w grupie otrzymującej suplementację probiotykiem wykryto podwyższenie poziomu GSH oraz istotny spadek wartości markerów stanu zapalnego [33]. Zwiększoną aktywność antyoksydacyjną w organizmie uzyskano także w badaniu klinicznym, w którym 53 zdrowym osobom, przez 3 tygodnie podawano synbiotyki zawierający *L. fermentum* ME-3, *L. paracasei* 8700:2, *Bifidobacterium longum* 46 oraz inulinę [58].

8. Mechanizm działania probiotyków jako antyoksydantów

Suplementy diety o działaniu antyoksydacyjnym oraz żywność zawierająca w swoim składzie przeciwutleniające bez wątpienia pozwala zmniejszyć negatywne skutki stresu oksydacyjnego powstającego w ludzkim organizmie. Drobnoustroje probiotyczne, głównie LAB, stają się obiecującymi komponentami, które wykazują działanie antyoksydacyjne w tego typu produktach [34, 40]. Wiele badań dowiodło, że probiotyki zwiększają aktywność enzymów o charakterze antyoksydacyjnym takich jak SOD, GPx, SGT, CAT, GR, podnoszą poziom wspomnianego wcześniej glutationu, czy też chronią komórkę przed uszkodzeniami jakie mogą wywołać czynniki o charakterze rakotwórczym [35]. Antyoksydacyjne działanie probiotyków tłumaczone jest także tym, że drobnoustroje te uczestniczą w odbudowie prawidłowej mikroflory jelitowej, której homeostaza mogła zostać zachwiana na skutek różnych czynników chorobotwórczych [36, 49]. Bakterie kwasu mlekowego posiadają systemy umożliwiające wiązanie ROS powstających w trakcie trawienia spożywanych

pokarmów [31]. Co więcej, mogą one przeprowadzać hydrolizę białek pochodzących z produktów spożywczych, prowadząc do wytworzenia bioaktywnych peptydów o właściwościach antyoksydacyjnych, chroniących przed peroksydacją lipidów błonowych, a tym samym działających ochronnie na struktury komórkowe [2]. Wykazano ponadto, że *Lactobacillus* spp. wykazuje swoje działanie probiotyczne właśnie dzięki zdolności do przetrwania w obecności ROS, co nie jest obserwowane w przypadku innych bakterii jelitowych, np. kilku gatunków *Streptococcus*, wysoce wrażliwych na obecność H_2O_2 [22]. Antyoksydacyjne działanie *L. rhamnosus* GG może opierać się z kolei na hamowaniu wydzielania ROS oraz zwiększaniu żywotności neutrofilii, odpowiedzialnych za reakcję przeciwbakteryjną [65].

Podsumowanie

Wzrastająca świadomość związana z czynnikami patogenezą wielu chorób, z którymi boryka się ludzkość XXI wieku skłania do poszukiwania mechanizmów umożliwiających przeciwdziałanie tym schorzeniom. Badania ostatnich lat dowiodły, że stres oksydacyjny, wywołany reaktywnymi formami tlenu oraz wolnymi rodnikami, może leżeć u podstaw występowania wielu chorób cywilizacyjnych. Na podstawie tej obserwacji rozpoczęto poszukiwania czynników przeciwdziałających stresowi oksydacyjnemu, czyli różnego rodzaju przeciwutleniaczy/antyoksydantów. Ich obecność wykazano zarówno w wielu produktach pochodzenia roślinnego i zwierzęcego, a niedawno zauważono także ogromny potencjał antyoksydacyjny drobnoustrojów probiotycznych. Wzrost zainteresowania żywnością funkcjonalną, a w szczególności probiotykami idzie w parze ze zwiększonymi nakładami pieniężnymi na badania naukowe skupiające uwagę na tego typu drobnoustrojach i ich funkcjach w przewodzie pokarmowym. Wiele badań koncentruje się na bakteriach obecnych w produktach spożywczych oraz tych, które są częścią naturalnego mikrobiomu przewodu pokarmowego. Analizie poddaje się czynniki odpowiedzialne za kolonizację tych bakterii, ich interakcje z organizmem gospodarza, a od niedawna także ich potencjał antyoksydacyjny. Wykazano, iż dzięki wielorakim mechanizmom, drobnoustroje te wykazują istotne i niepodważalne działanie przeciworodnikowe. Mają zdolność do przetrwania wyższych niż inne mikroorganizmy stężeń reaktywnych form tlenu, przeciwdziałają ich nagromadzeniu poprzez hamowanie kaskad reakcji łańcuchowych, prowadzą do produkcji bioaktywnych związków przeciwdziałających skutkom stresu oksydacyjnego w komórkach lub regulują aktywność enzymów anty- i prooksydacyjnych. Z punktu widzenia nie tylko

tych bakterii, ale wszystkich bytujących w przewodzie pokarmowym wciąż istotne jest projektowanie nowych lub ulepszanie już istniejących narzędzi molekularnych umożliwiających ich dogłębną analizę.

Piśmiennictwo

- Achuthan A.A., Duary R.K., Madathil A., Panwar H., Kumar H., Batish V.K., Grover S.: Antioxidative potential of lactobacilli isolated from the gut of Indian people. *Mol. Biol. Rep.* **39**, 7887–7897 (2012)
- Ahotupa M., Saxelin M., Korpela R.: Antioxidative properties of *Lactobacillus* GG. *Nutr. Today*, **1**, 51–52 (1996)
- Alarcón E., Campos A.M., Edwards A.M., Lissi E., López-Alarcón C.: Antioxidant capacity of herbal infusions and tea extracts: A comparison of ORAC-fluorescein and ORAC-pyrogallol red methodologies. *Food Chem.* **107**, 1114–1119 (2008)
- Andersson H., Asp N.G., Bruce A., Roos S., Wadstrom T., Wold A.E.: Health effects of probiotics and prebiotics: a literature review on human studies. *Scand. J. Nutr.* **45**, 58–75 (2001)
- Antolovich M., Prenzler P.D., Patsalides E., McDonald S., Robards K.: Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, **127**, 183–198 (2002)
- Apak R., Güçlü K., Özyürek M., Çelik S.E.: Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. *Microchim. Acta*, **160**, 413–419 (2008)
- Balakrishnan G., Agrawal R.: Antioxidant activity and fatty acid profile of fermented milk prepared by *Pediococcus pentosaceus*. *J. Food Sci. Technol.* DOI: 10.1007/s13197-012-0891-9 (2012)
- Benzie I.F., Strain J.J.: Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol.* **299**, 15–27 (1999)
- Benzie I.F., Strain J.J.: The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal. Biochem.* **239**, 70–76 (1996)
- Benzie I.F., Szeto Y.T.: Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 633–636 (1999)
- Blois M.S.: Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, **26**, 1199–1200 (1958)
- Brownlee M.: Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, **414**, 813–820 (2001)
- Carlsen M.H., Blomhoff R.: The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutr. J.* **9**, 3 (2010)
- Chapman C.M., Gibson G.R., Rowland I.: Health benefits of probiotics: are mixtures more effective than single strains? *Eur. J. Nutr.* **50**, 1–17, (2011)
- Chong E.S.: A potential role of probiotics in colorectal cancer prevention: review of possible mechanisms of action. *World J. Microbiol. Biotechnol.* DOI: 10.1007/s11274-013-1499-6 (2014)
- Coskun S., Aslim B., Yuksedag Z.N.: Effect of two strains of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* on nitric oxide generation and antioxidant status of rat small intestine. *Med. Chem. Res.* **19**, 1082–1091 (2010)
- Elmastas M., Turkekel I., Ozturk L., Gulcin I., Isildak O., Aboul-Enein H.Y.: The antioxidant activity of two wild edible mushrooms (*Morchella vulgaris* and *Morchella esculanta*). *Comb. Chem. High Throughput Screening*, **9**, 443–448 (2006)
- Floegel A., Kim D., Chung S., Koo S.I., Chun O.K.: Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *J. Food Compos. Anal.* **24**, 1043–1048 (2011)
- Forsyth C.B., Farhadi A., Jakate S.M., Tang Y., Shaikh M., Keshavarzian A.: *Lactobacillus* GG treatment ameliorates alcohol-induced intestinal oxidative stress, gut leakiness, and liver injury in a rat model of alcoholic steatohepatitis. *Alcohol*, **43**, 163–172 (2009)
- Foti M.C., Daquino C., Geraci C.: Electron-transfer reaction of cinnamic acid and their methyl esters with the DPPH radical in alcoholic solutions. *J. Org. Chem.* **69**, 2309–2314 (2004)
- Gałecka E., Mrowicka M., Malinowska K., Gałecki P.: Chosen non-enzymatic substances that participate in a protection against overproduction of free radicals. *Pol. Merkur. Lekarski*, **25**, 269–272 (2008)
- Garcia-Mendoza A., Liebana J., Castillo A., de la Higuera A., Gutierrez J.: Post-hydrogen peroxide effect in peroxidogenic oral streptococci. *Microb. Ecol. Health Dis.* **6**, 17–22 (1993)
- Ghasemia K., Ghasemia Y., Ebrahimzadeh M.A.: Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. *Pak. J. Pharm. Sci.* **22**, 277–281 (2009)
- Glazer A.N.: Phycoerythrin fluorescence-based assay for reactive oxygen species. *Methods Enzymol.* **186**, 161–168 (1990)
- Grajek W., Sip A.: Antagonistic activity of probiotics against pathogenic microorganisms. *Zakazenia*, **1**, 49–54 (2006)
- Grompone G., Ramón, D. i wsp.: Antiinflammatory *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-3690 strain protects against oxidative stress and increases lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One*, DOI: 10.1371/journal.pone.0052493 (2012)
- Gulcin I.: Antioxidant activity of L-adrenaline: an activity structure insight. *Chem.-Biol. Interact.* **179**, 71–80 (2009)
- Hairul Islam V.I., Praksh Babu N., Pnadikumar P., Ignacimuthu S.: Isolation and characterization of putative probiotic bacteria strain, *Bacillus amyloliquefaciens*, from North East Himalayan Soil Based on in vitro and in vivo functional properties. *Probiotics & Antimicrob. Prot.* **3**, 175–185 (2011)
- Halliwell B., Chirico S.: Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *Am. J. Clin. Nutr.* **57**, 715–725 (1993)
- Halliwell B., Gutteridge J.M.: The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch. Biochem. Biophys.* **280**, 1–8 (1990)
- Kaizu H., Sasaki M., Nakajama H., Suzuki Y.: Effect of antioxidative lactic acid bacteria on rats fed a diet deficient in vitamin. *J. Dairy Sci.* **76**, 2493–2499 (1993)
- Kapila S., Vibha Sinha P.R.: Antioxidative and hypocholesterolemic effect of *Lactobacillus casei* ssp. *Casei* (biodefensive properties of lactobacilli). *Indian J. Med. Sci.* **60**, 361–370 (2006)
- Kaur S., Vihalemm T. i wsp.: Successful management of mild atopic dermatitis in adults with probiotics and emollients. *Cent Eur J Med.* **3**, 215–220 (2008)
- Kim H.S., Jeong S.G., Ham J.S., Chae H.S., Lee J.M., Ahn C.N.: Antioxidative and probiotic properties of *Lactobacillus gasseri* NLRI-312 isolated from Korean infant feces. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* **19**, 1335–1341 (2006)
- Kumar M., Yadav H. i wsp.: Cancer-preventing attributes of probiotics: an update. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **61**, 473–496 (2010)
- Forsyth C.B., Farhadi A., Jakate S.M., Tang Y., Shaikh M., Keshavarzian A.: *Lactobacillus* GG treatment ameliorates alcohol-induced intestinal oxidative stress, gut leakiness, and liver injury in a rat model of alcoholic steatohepatitis. *Alcohol*, **43**, 163–172 (2009)
- Libudzisz Z., Klewicka E.: Lactic Acid Bacteria in Probiotics Products. *Zakazenia*, **4**, 57–62 (2006)
- Lin M.Y., Chang F.J.: Antioxidative effect of intestinal bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Dig. Dis. Sci.* **45**, 1617–1622 (2000)
- Lin M.Y., Yen C.L.: Antioxidative ability of lactic acid bacteria. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 1460–1466 (1999)

40. Liu J., Huang S.S., Zhao Z.: Research on antioxidative capacity of lactic acid bacteria. *China Dairy Ind.* **38**, 38–41 (2010)
41. MacDonald-Wicks L.C., Wood L.G., Garg M.L.: Methodology for the determination of biological antioxidant capacity *in vitro*: a review. *J. Sci. of Food Agriculture*, **86**, 2046–2056 (2006)
42. Madhu A.N., Amrutha N., Prapulla S.G.: Characterization and antioxidant property of probiotic and synbiotic yogurts. *Probiotics Antimicrob. Proteins*, **4**, 90–97 (2012)
43. Magalhães L.M., Segundo M.A., Reis S., Lima J.L.F.C.: Automatic method for determination of total antioxidant capacity using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay. *Anal. Chim. Acta*, **558**, 310–318 (2006)
44. Majamaa H., Isolauri E.: Probiotics: a novel approach in the management of food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **99**, 179–185 (1997)
45. Mikelsaar M., Zilmer M.: *Lactobacillus fermentum* ME-3 – an antimicrobial and antioxidative probiotic. *Microb. Ecol. Health Dis.* **21**, 1–27 (2009)
46. Miller N.J., Rice-Evans C.A., Davies M.J., Gopinathan V., Milner A.: A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.* **84**, 407–412 (1993)
47. Mishra V., Shah C., Mokashe N., Chavan R., Yadav H., Prajapati J.: Probiotics as potential antioxidants: a systematic review. *J. Agric. Food Chem.* **15**, 3615–3626 (2015)
48. Naczki M., Shahidi F.: Extraction and analysis of phenolics in food. *J. Chromatogr. A*, **1054**, 95–111 (2004)
49. Nardone G., Compare D., Liguori E., Di Mauro V., Rocco A., Barone M., Napoli A., Lapi D., Iovene M.R., Colantuoni A.: Protective effects of *Lactobacillus paracasei* F19 in a rat model of oxidative and metabolic hepatic injury. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **299**, 669–676 (2010)
50. Ono Y., Mizuno K., Takahashi M., Miura Y., Watanabe T.: Suppression of advanced glycation and lipoxidation end products by angiotensin II type-1 receptor blocker candesartan in type 2 diabetic patients with essential hypertension. *Fukushima J. Med. Sci.* **59**, 69–75 (2013)
51. Ou B., Huang D., Woodill-Hampsch M., Flanagan J.A., Deemer E.K.: Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 3122–3128 (2002)
52. Pagliaro G., Battimo M.: The use of probiotics in gastrointestinal diseases. *J. Nutr. Metab.* **3**, 105–113 (2010)
53. Pandey S., Singh A., Kumar P., Chaudhari A., Nareshkumar G.: Probiotic *Escherichia coli* CFR 16 producing pyrroloquinoline-quinone (PQQ) ameliorates 1,2-dimethylhydrazine-induced oxidative damage in colon and liver of rats. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **173**, 775–786 (2014)
54. Potargowicz E., Szerszenowicz E.: Polifenole roślinne w kosmetyce. *Pol. J. Cosmetol.* **9**, 70–76 (2006)
55. Puzanowska-Tarasiewicz H., Kuźmicka L., Tarasiewicz M.: Antyoksydanty a reaktywne formy tlenu. *Bromat. Chem. Toksykol.* **1**, 9–14 (2010)
56. Rains J.L., Jain S.K.: Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radic. Biol. Med.* **50**, 567–575 (2011)
57. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C.: Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad. Biol. Med.* **26**, 1231–1237 (1999)
58. Saulnier D.M.A., Hutt P., Mikelsaar M., Bosscher D., Gibson G., Kolida S.: Effects of a symbiotic on biomarkers of oxidative stress and fecal microbiota in healthy adults: results of a cross-over double-blind placebo controlled trial. *Proc. Nutr Soc.* **66**, 101A (2007)
59. Schrezenmeir J., de Vrese M.: Probiotics, prebiotics, and synbiotics. *Adv. Biochem. Engin/Biotechnol.* **111**, 1–66 (2008)
60. Shah C., Mokashe N., Mishra V.: Preparation, characterization and *in vitro* antioxidative potential of synbiotic fermented dairy products. *J. Food Sci. Technol.* DOI: 10.1007/s13197-014-14917 (2014)
61. Shen Q., Shang N., Li P.: *In vitro* and *in vivo* antioxidant activity of *Bifidobacterium animalis* 01 isolated from centenarians. *Curr. Microbiol.* **62**, 1097–1103 (2011)
62. Sun J., Hu X.L., Le G.W., Shi Y.H.: Inhibition of Fe-induced colon oxidative stress by lactobacilli in mice. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **29**, 209–216 (2013)
63. Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T., Mazur M., Telser J.: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**, 44–84 (2007)
64. Vamanu E., Vamanu A., Popa O., Babeanu N.: The antioxidant effect of a functional product based on probiotic biomass, pollen and honey. *Anim. Sci. Biotechnol.* **43**, 331–336 (2010)
65. Vong L., Loretz R.J., Assa A., Glogauer M., Sherman P.M.: Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* inhibits the formation of neutrophil extracellular traps. *J. Immunol.* **192**, 1870–1877 (2014)
66. Wang A.N., Yi X.W., Yu H.F., Dong B., Qiao S.Y.: Free radical scavenging activity of *Lactobacillus fermentum* *in vitro* and its antioxidative effect on growing-finishing pigs. *J. Appl. Microbiol.* **107**, 1140–1148 (2009)
67. Whitehead T.P., Thorpe G.H.G., Maxwell S.R.J.: Enhanced chemiluminescent assay for antioxidant capacity in biological fluids. *Anal. Chim. Acta*, **266**, 265–277 (1992)
68. Włochal M., Grzymisławski M., Bogdański P.: Możliwości wykorzystania żywności funkcjonalnej w leczeniu otyłości. *Forum Zab. Metabol.* **5**, 51–62 (2014)
69. Yoon Y.H., Byun J.R.: Occurrence of glutathione sulfhydryl (GHS) and antioxidant activities in probiotic *Lactobacillus* spp. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* **17**, 1582–1585 (2004)
70. Zern T.L., Fernandez M.L.: Cardioprotective effects of dietary polyphenols. *J. Nutr.* **135**: 2291–2294 (2005)