



## مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: [www.fsct.modares.ac.ir](http://www.fsct.modares.ac.ir)

### مقاله علمی-پژوهشی

اثرات اولتراسوند بر خواص آنتی اکسیدانی پست بیوتیک های مشتق شده از پلت سلولی و سوپرناتانت کشت

*Enterococcus faecium*

مهسا شیری<sup>۱</sup>، جمشید فرمانی<sup>۲\*</sup>، علی معتمدزادگان<sup>۳</sup>، علی برزگر<sup>۴</sup>، H.P. Vasantha Rupasinghe<sup>۵</sup>

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۲- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۳- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۴- دانشیار، گروه علوم پایه، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران، ساری، ایران

۵- گروه علوم گیاهی، غذایی و محیطی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه دالهاوزی، ترو، نوا اسکوشیا، کانادا.

### اطلاعات مقاله

### چکیده

مطالعات فزاینده، پتانسیل بالای پست بیوتیک ها را در محافظت از سلامت میزبان برجسته کرده اند. در مقایسه با غذاهای فراسودمند سنتی، پست بیوتیک ها مزایایی مانند فعالیت فیزیولوژیکی بالا، ماندگاری طولانی، جذب آسان و غیره را دارند. این تحقیق به مطالعه اثرات تیمار اولتراسوند بر فعالیت آنتی اکسیدانی پست بیوتیک های مشتق شده از باکتری *Enterococcus faecium* پرداخته است. این باکتری، آلفا همولیتیک یا غیر همولیتیک و همزیست روده انسان است. میکروارگانیسم تحت ۶ عملیات زمانی فراصوت مختلف (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ دقیقه) قرار گرفت. آزمایش های ABTS، DPPH، MIC و HRS به منظور بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی در سطح پلت و سوپرناتانت انجام شدند. نتایج تجزیه واریانس یک طرفه نشان داد که اثر اولتراسوند روی خواص آنتی اکسیدانی پست بیوتیک ها طی زمان های مختلف در سطوح پلت و سوپرناتانت معنی دار بوده است. پست بیوتیک ها در سطح سوپرناتانت فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتری با DPPH در زمان ۲۰ دقیقه، ABTS کنترل و MIC در زمان ۲۰ دقیقه و HRS کنترل داشتند. در سطح پلت فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتری با DPPH کنترل، ABTS کنترل و MIC در زمان ۲۰ دقیقه و HRS زمان ۳۰ دقیقه مشاهده شد. به علاوه، نمونه های تولید شده در زمان ۵ دقیقه در تمام آزمایشات و در هر دو سطح پلت و سوپرناتانت کمترین فعالیت آنتی اکسیدانی (۰ تا ۳۶ درصد) را نشان دادند و تنها در آزمایش MIC کنترل (۰ درصد) پایین ترین مقدار بود. خاصیت آنتی اکسیدانی پست بیوتیک های تولید شده در سطح سوپرناتانت در تمام آزمایش ها به جز ABTS نسبت به پلت بیشتر بود. پیشنهاد می شود که پست بیوتیک های استخراج شده از *E. faecium* به عنوان آنتی اکسیدان، در صنایع غذایی و دارویی مورد استفاده قرار گیرند.

### تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۱۰/۰۵

تاریخ داوری: ۱۴۰۵/۰۲/۱۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۲/۲۳

### کلمات کلیدی:

انتروکوکوس فاسیوم،

اولتراسوند،

پست بیوتیک،

خواص آنتی اکسیدانی

DOI: 10.48311/fsct.2026.118542.83005

\* مسئول مکاتبات:

jamshid\_farmani@yahoo.com

## ۱- مقدمه

طبق گفته سازمان بهداشت جهانی (WHO) و سازمان غذا و کشاورزی (FAO)، پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده غیر بیماری‌زا هستند که اثرات مفیدی بر سلامت دارند و در صورت مصرف در دوزهای مناسب، می‌توانند از بیماری‌هایی مانند سرطان، بیماری‌های قلبی، دیابت، بیماری‌های قلبی، سرطان‌های دستگاه گوارش و غیره جلوگیری یا آن‌ها را درمان کنند [۱، ۲]. با این حال، همه باکتری‌های پروبیوتیک ایمن در نظر گرفته نمی‌شوند. خطرات باکتری‌های پروبیوتیک زنده، از جمله عفونت‌های سیستمیک، فعالیت‌های متابولیکی مضر، تحریک بیش از حد سیستم ایمنی، انتقال ژن و عوارض جانبی گوارشی، در گزارش‌های موردی، آزمایش‌های بالینی و مدل‌های تجربی شرح داده شده است [۳]. محققان در سال‌های اخیر راه‌حل‌های مختلفی برای حل این چالش‌ها ارائه کرده‌اند و یکی از مؤثرترین و کاربردی‌ترین رویکردها در این زمینه، استفاده از شکل بی‌جان باکتری (پست‌بیوتیک‌ها) به عنوان جایگزین پروبیوتیک‌ها است [۴]. پست‌بیوتیک‌ها شامل هر ماده‌ای هستند که توسط فعالیت متابولیکی پروبیوتیک‌ها آزاد یا از طریق آن‌ها تولید می‌شوند و تأثیر مفید مستقیم یا غیرمستقیمی بر میزبان دارند [۵]. علاوه بر این، آن‌ها به آسانی به محل‌های اثر متصل شده و به راحتی قابل دستیابی، استانداردسازی، حمل و نقل و ذخیره هستند [۶]. نکته قابل توجه این است که آن‌ها غیر بیماری‌زا و غیرسمی هستند و مقاومت بالایی در برابر هیدرولیز نشان می‌دهند [۷]. بهینه‌سازی شرایط تخمیر می‌تواند پست‌بیوتیک‌ها را قادر سازد تا حداکثر اثرات پروبیوتیکی خود را اعمال کنند [۸]. تولید پست‌بیوتیک‌ها شامل چندین مرحله است. مرحله اول تخمیر سوپسترا و کشت توسط باکتری‌ها است [۹]. دوم غیرفعال‌سازی سویه پروبیوتیک از طریق روش‌های حرارتی مانند پاستوریزاسیون، استریلیزاسیون و گرمایش اهمی یا روش‌های غیرحرارتی مانند میدان‌های الکتریکی پالسی، اولتراسوند، تابش و دی‌اکسید کربن فوق بحرانی است. مرحله سوم، به دست آوردن مواد رویی عاری از

پست‌بیوتیک‌ها یا سلول‌ها از طریق سانتریفیوژ یا فیلتراسیون تخمیرهای غیرفعال است [۹]. در حال حاضر، رایج‌ترین روش غیر فعال‌سازی میکروارگانیسم‌ها عملیات حرارتی است، زیرا ساده و کم هزینه است. با این وجود، عملیات حرارتی ممکن است باعث آسیب جبران‌ناپذیری به مواد فعال فیزیولوژیکی حساس به حرارت میکروارگانیسم‌ها، به ویژه پروتئین‌ها و پلی‌پپتیدها شود. حرارت عمدتاً به غشای سلولی آسیب می‌رساند، اسید نوکلئیک را پاره می‌کند، آنزیم ضروری را غیرفعال می‌کند، پروتئین را حالت دناتوره‌ای کرده و ریبوزوم را پلیمریزه می‌کند. از این منظر، غیر فعال‌سازی غیر حرارتی میکروارگانیسم‌ها در تحقیقات آتی کاربرد بیشتری خواهد داشت. اولتراسوند باعث افزایش آنزیم‌های خارج سلولی، عمدتاً بتا-گالاکتوزیداز و استخراج موثر آنتی-اکسیدان‌ها و ترکیبات زیست فعال مانند فنول‌ها، فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها در پروبیوتیک‌ها می‌شود [۱۰، ۱۱]. از امواج فراصوت می‌توان پس از تخمیر برای غیرفعال کردن باکتری و قبل از آن برای بهبود پایداری، کاهش زمان فرایند و افزایش کیفیت استفاده کرد [۱۲].

شواهد علمی نشان می‌دهد که پست‌بیوتیک‌ها دارای خواص عملکردی متنوعی مانند ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضد سرطانی و تنظیم کنندگی سیستم ایمنی می‌باشند [۱۳]. آنتی‌اکسیدان‌ها موادی هستند که به طور مؤثر از طریق روش‌های متمایز، مانع یا به تعویق انداختن وقایع اکسیداسیون ناخواسته می‌شوند [۱۴]. آنتی‌اکسیدان‌ها کاربردهای زیادی در صنایع دارویی، آرایشی، بهداشتی، غذایی، پتروشیمی و پلیمری دارند [۱۵]. سیستم آنتی‌اکسیدانی درون‌زا در بدن انسان همیشه به ترکیبات آنتی‌اکسیدانی نیاز دارد [۱۶]. بنابراین، امروزه علاقه فزاینده‌ای به آنتی‌اکسیدان‌ها، به ویژه آن‌هایی که از منابع میکروبی به دست می‌آیند، وجود دارد [۱۷]. استفاده از پروبیوتیک‌ها و متابولیت‌های آن‌ها (پست‌بیوتیک‌ها) و همچنین استفاده گسترده از آن‌ها در مواد غذایی به عنوان افزودنی، به شدت افزایش یافته است [۱۸]. خواص آنتی-اکسیدانی پست بیوتیک‌های مشتق شده از لاکتوباسیلوس

باکتری *Enterococcus faecium* PTCC 1957 به صورت آمپول‌های لیوفیلیزه برای انجام آزمایشات از مرکز منطقه‌ای کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران خریداری شد. آماده‌سازی باکتری و کشت اولیه آن طبق دستورالعمل مرکز منطقه‌ای کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران انجام شد. تهیه استوک اسلنت و استوک گلیسرولی جهت نگهداری باکتری‌ها انجام شد.

## ۲-۲- آماده‌سازی سوسپانسیون‌های باکتریایی

ابتدا با حفظ شرایط آسپتیک یک لوپ از استوک اسلنت مورد نظر برداشته و در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت استریل اختصاصی سویه در دما لازم (۳۷ درجه سانتی‌گراد) و به مدت زمان ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکر دار گرمخانه‌گذاری شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون برداشته شد و در لوله حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت محیط کشت مایع استریل اختصاصی هر سویه به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکردار (در دمای مناسب باکتری‌ها و هم‌زدن با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه) گرمخانه‌گذاری شد. در صورت نیاز به حجم بیشتر از سوسپانسیون از تعداد لوله‌های بیشتری استفاده شد (می‌توان از ارلن و حجم بیشتر محیط کشت و سوسپانسیون اولیه باکتری استفاده کرد).

## ۲-۳- تهیه پست‌بیوتیک

۱۰۰ میکرولیتر باکتری پروبیوتیک انتروکوکوس فاسیوم<sup>۱</sup> در BHI براث (۱۰ میلی‌لیتر) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد رشد داده شد. سلول‌های پست‌بیوتیک با سانتریفیوژ در  $6000 \times g$  به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد جدا شدند. پلت با آب مقطر استریل دو بار با سانتریفیوژ در  $4500 \times g$  به مدت ۱۰ دقیقه شسته و سپس به پلت (۱۰ برابر وزنی) بافر فسفات<sup>۳</sup> (PBS) استریل اضافه و تا زمان مخلوط شدن کامل ورتکس شد. به‌طور میانگین

پلانتاروم<sup>۱</sup> در بسیاری از مطالعات انجام شده نشان داده شده است [۵، ۱۹، ۲۰]. با این حال، فعالیت آنتی‌اکسیدانی پست‌بیوتیک‌ها می‌تواند تحت تأثیر نوع کشت و سوبسترا و روش به‌دست آوردن آن‌ها قرار گیرد [۲۱]. می‌توان از روش‌های مختلفی برای تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی مواد غذایی استفاده کرد. ABTS و DPPH نمونه‌هایی از روش‌های سنجش رادیکال پروتون هستند. روش ABTS بسیار حساس است؛ طیف گسترده‌ای از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی را تشخیص می‌دهد و می‌تواند در هر دو سیستم آبدوست و لیوفیل به کار رود که آن را برای انواع نمونه‌ها مناسب می‌کند. روش DPPH تکرارپذیرتر و ساده‌تر تلقی می‌شود. با این حال، فقط در نمونه‌های آبدوست توصیه می‌شود، از این رو نسبت به ABTS از تطبیق‌پذیری کمتری برخوردار است. فعالیت کیلیت‌کننده فلزات (MIC) به عنوان یکی از مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی، غلظت فلز واسطه کاتالیزور را در پراکسیداسیون لیپید کاهش می‌دهد [۲۲]. HRS فعالیت مهارکنندگی رادیکال هیدروکسیل، واکنش‌پذیرترین رادیکال را که مربوط به پراکسیداسیون لیپید و بیومولکول‌های سلول‌ها است، اندازه‌گیری می‌کند [۲۳]. بنابراین، هدف از این مطالعه بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی (ABTS، DPPH، MIC و HRS) پست‌بیوتیک‌های به‌دست‌آمده از باکتری انتروکوکوس فاسیوم (در دو سطح پلت و سوپرناتانت) با استفاده از روش اولتراسوند در فرکانس ثابت، زمان‌های مختلف (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰) و همچنین مقایسه آن با پست‌بیوتیک بدون اعمال فرایند است.

## ۲- روش کار

### ۲-۱- آماده‌سازی باکتری و کشت اولیه

3: Phosphate buffer

1: *Lactiplantibacillus plantarum*

2: *Enterococcus faecium*

استفاده از معادله زیر به صورت فعالیت مهار رادیکال بیان شد [۲۴].

$$100 \times \left( \frac{A_{\text{نمونه}}}{A_{\text{نمونه}} - A_{\text{بلانک}}} \right) = \text{فعالیت مهار رادیکال}$$

### ۳-۳-۲- بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی توسط ABTS

محلول استوک ABTS (۴/۷ میلی مولار) در متانول خالص تهیه شد. سپس این محلول با حجم مساوی از محلول آبی پرسولفات پتاسیم (۶/۲ میلی مولار) مخلوط و پس از ۱۲ تا ۱۶ ساعت نگهداری در دمای اتاق در تاریکی، مخلوط با متانول رقیق شد تا به جذب ۰/۷ (در طول موج ۷۳۴ نانومتر) برسد. ۲۰ میکرولیتر پست بیوتیک در متانول با ۲ میلی لیتر محلول ABTS مخلوط شد. پس از ۶ دقیقه نگهداری در دمای اتاق در تاریکی، میزان جذب نمونه های آنالیز شده به روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۷۳۴ نانومتر خوانده شد. در نمونه بلانک از محیط کشت استریل BHI برای سوپرناتانت و یا PBS برای پلت به جای پست بیوتیک استفاده شد. نتایج به عنوان فعالیت مهار رادیکال در رابطه زیر بیان شد [۲۴].

$$100 \times \left( \frac{A_{\text{نمونه}}}{A_{\text{نمونه}} - A_{\text{بلانک}}} \right) = \text{فعالیت مهار}$$

رادیکال

### ۳-۳-۳- سنجش کلیت یون فلزی<sup>۱</sup> (MIC)

۳۰۰ میکرولیتر نمونه (پست بیوتیک) یا نمونه کنترل (آب) با ۵ میکرولیتر کلرید آهن (II) (۲ میلی مولار) و ۱۰ میکرولیتر فروزین (۵ میلی مولار) مخلوط شد. پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون (شرایط تاریک در دمای اتاق)، جذب در طول موج ۵۲۲ نانومتر خوانده شد [۲۵].

$$\text{MIC (\%)} = \frac{\text{جذب نمونه} - \text{جذب نمونه کنترل}}{\text{جذب کنترل}}$$

### ۳-۳-۴- بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی توسط سنجش مهار رادیکال هیدروکسیل<sup>۷</sup> (HRS)

وزن سلول بعد از سانتریفیوژ ۰/۱۱ گرم به ازای هر لوله (۱۰ میلی لیتر محیط کشت) بود. مایع رویی<sup>۴</sup> (سوپرناتانت) به عنوان پست بیوتیک و پلت<sup>۵</sup> (به همراه PBS) به عنوان سلول زنده باکتری پروبیوتیک نگهداری شدند. در ادامه به روش مختلف زیر پست بیوتیک تهیه شد:

۱- پلت و سوپرناتانت بدون اعمال فرایند (به عنوان

نمونه های کنترل) از طریق فیلتر استریل ۰/۲۲ میکرومتر فیلتر شدند.

۲- سوپرناتانت و پلت در فرکانس ثابت ۳۷ کیلوهرتز

و توان ورودی ۲۸۰ وات، به مدت زمان ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک

قرار گرفتند. سطح آب متناسب با سطح محتوای

ارلن بود. ارلن ها در مرکز حمام قرار گرفتند و دما

روی ۲۵ درجه سانتی گراد ثابت بود. پلت و

سوپرناتانت از طریق فیلتر استریل ۰/۲۲ میکرومتر

فیلتر شدند.

### ۳-۳-۳- تعیین خاصیت آنتی اکسیدانی

ارزیابی خاصیت آنتی اکسیدانی با استفاده از روش های زیر برای نمونه های پست بیوتیک در سطوح سوپرناتانت و پلت مورد بررسی قرار گرفت.

### ۳-۳-۱- بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی توسط DPPH

فعالیت مهار رادیکال DPPH با استفاده از محلول DPPH تازه (۰/۱ میلی مولار) در متانول خالص تعیین شد. برای فعالیت آنتی اکسیدانی، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر محلول پست بیوتیک با ۳/۹۰ میلی لیتر محلول DPPH مخلوط و پس از ۳۰ دقیقه نگهداری در دمای اتاق در تاریکی، میزان جذب نمونه ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. در نمونه بلانک از محیط کشت استریل BHI برای سوپرناتانت و یا PBS برای پلت به جای پست بیوتیک استفاده شد. نتایج با

1: Metal Ion Chelation assay

7: Hydroxyl Radical Scavenging

4: Supernatant

5: Pellet

به منظور بررسی فعالیت HRS، هر نمونه ۲۵۰ میکرولیتری با ۲۵۰ میکرولیتر ۲/۵ میلی مولار ۱، ۱۰-فنانترولین، ۲۵۰ میکرولیتر PBS (۰/۱ مولار، pH ۷/۴) و ۲۵۰ میکرولیتر از ۲/۵ میلی مولار FeSO<sub>4</sub> قبل از مخلوط شدن با ۲۵۰ میکرولیتر ۲۰ میلی مولار H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> اضافه شد. محلول آزمایش در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۹۰ دقیقه انکوبه شده و جذب با استفاده از اسپکتروفتومتر UV در طول موج ۵۳۶ نانومتر خوانده و فعالیت HRS با استفاده از معادله زیر تعیین شد [۲۰].

$$\text{HRS activity (\%)} = (\text{As} - \text{Ac}) / (\text{Ab} - \text{Ac}) \times 100$$

که در آن As به عنوان جذب نمونه، Ac جذب حاوی نمونه کنترل (محیط کشت BHI برای سوپرناتانت و PBS برای پلت) و Ab جذب محلول بدون حضور نمونه و H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> است. تمامی نمونه‌ها در سه تکرار مورد آزمایش قرار گرفتند.

### ۳-۴- تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه و تحلیل داده‌ها بر اساس آزمون تجزیه واریانس یک-طرفه (One-way ANOVA) و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ انجام شد. سپس از آزمون t به منظور مقایسه خاصیت آنتی‌اکسیدانی بین پست‌بیوتیک‌های تولید شده در سطح پلت و سوپرناتانت استفاده شد. تمامی تجزیه و تحلیل‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS (version 23) انجام گرفت.

### ۳- نتایج و بحث

پست‌بیوتیک‌های به دست آمده از باکتری‌های پروبیوتیک، اخیراً به دلیل اثرات مطلوب و حداقل عوارض جانبی، توجه محققان را به خود جلب کرده‌اند. این ترکیبات طبیعی هستند و هیچ خطری برای باکتری‌های افراد دارای نقص ایمنی ندارند [۲۶]. بنابراین، پتانسیل بالایی برای کاربرد صنعتی مرتبط با محصولات غذایی و دارویی دارند. در تحقیق حاضر با استفاده از روش‌های سنجش DPPH، ABTS، MIC و HRS

مشاهده شد که پست‌بیوتیک‌های تهیه شده از انتروکوکوس فاسیوم (سوپرناتانت و پلت) فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی دارند. همچنین مدت زمان اعمال فرایند اولتراسوند بر خاصیت آنتی‌اکسیدانی پست‌بیوتیک‌ها اثرات معنی‌داری داشته است. در تایید نتایج این تحقیق، محققان دیگر به طور گسترده فعالیت آنتی‌اکسیدانی پست‌بیوتیک‌های مشتق شده از باکتری را گزارش کرده‌اند [۲۱، ۲۷]. در تحقیقی توسط Noori و همکاران (۲۰۲۳) مشاهده شد که پست‌بیوتیک تولید شده از *Lactobacillus casei* فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی را با استفاده از روش DPPH داشت [۲۸]. همچنین در پژوهش Ageeli و Mohamed (۲۰۲۵) آگزوپلی ساکاریدهای تولید شده از *Lactiplantibacillus plantarum* B7 فعالیت مهار رادیکال DPPH، ABTS، فعالیت HRS و فعالیت مهار سوپراکسید را نشان داد [۲۹].

۳-۱- ارزیابی خواص آنتی‌اکسیدانی پست‌بیوتیک‌های تولید شده با استفاده از تیمار اولتراسوند در سطوح پلت و سوپرناتانت

نتایج تجزیه واریانس یک‌طرفه<sup>۸</sup> نشان می‌دهد که اثر اولتراسوند روی خواص آنتی‌اکسیدانی پست‌بیوتیک‌ها طی زمان‌های مختلف (۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰ دقیقه) در سطوح پلت و سوپرناتانت معنی‌دار بوده است (جدول ۱ و جدول ۲). در تایید این نتایج خواص آنتی‌اکسیدانی بالای پست‌بیوتیک تهیه شده از *Lactaseibacillus paracasei* با استفاده از روش اولتراسوند توسط سنجش‌های کاهش قدرت احیاکنندگی، فعالیت مهار رادیکال DPPH و فعالیت HRS توسط Dong و همکاران (۲۰۲۴) مشاهده شد [۳۰]. همچنین بر اساس یافته‌های Aguilar-Toalá و همکاران (۲۰۱۹) پست‌بیوتیک‌های تولید شده از سویه‌های *L. casei* CRL 431 و *B. coagulans* GBI-30 با استفاده از سنجش کیلیت یون فلزی فعالیت مهار اکسیداسیون در حدود ۷۹٪ نشان دادند [۲۵]. با توجه به نتایج Çelik و همکاران (۲۰۲۴)، در سوپرناتانت بدون سلول و آگزوپلی ساکارید سویه

<sup>۸</sup> One-way ANOVA :

*salivarius* KC27L فعالیت آنتی اکسیدانی با استفاده از حذف رادیکال DPPH، فعالیت کیلت کنندگی یون  $Fe^{2+}$  و فعالیت مهار رادیکال آنیون سوپراکسید مشاهده شد [۳۱].

**Table 1: Results of one-way analysis of variance (ANOVA) for antioxidant properties of postbiotics produced using ultrasound treatment at different times on the Supernatant surface.**

| P-value | F-value | Mean squares | d.f | Parameters |
|---------|---------|--------------|-----|------------|
| 0.000** | 229.35  | 110.47       | 6   | DPPH       |
| 0.000** | 3841.32 | 1049.05      | 6   | ABTS       |
| 0.000** | 288.11  | 548.31       | 6   | MIC        |
| 0.000** | 251     | 1470.14      | 6   | HRS        |

\*\* Indicates significance at the 1 percent level. \* Indicates significance at the 5 percent level. ns: Indicates no significance.

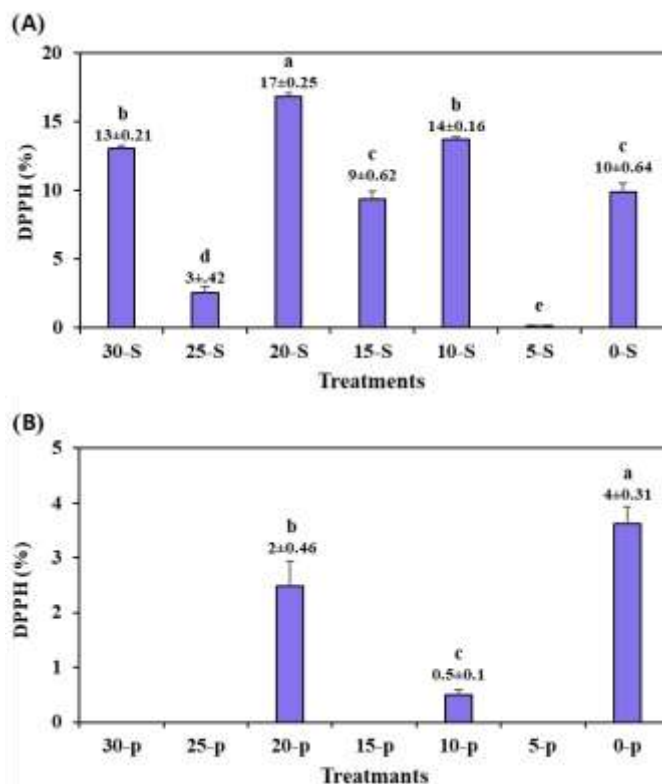
**Table 2: Results of one-way analysis of variance (ANOVA) for antioxidant properties of postbiotics produced using ultrasound treatment at different times on the pellet surface.**

| P-value | F-value | Mean squares | d.f | Parameters |
|---------|---------|--------------|-----|------------|
| 0.000** | 34.79   | 6.64         | 6   | DPPH       |
| 0.000** | 702.59  | 405.12       | 6   | ABTS       |
| 0.000** | 886.67  | 307.65       | 6   | MIC        |
| 0.000** | 392.61  | 2244.34      | 6   | HRS        |

\*\* Indicates significance at the 1 percent level. \* Indicates significance at the 5 percent level. ns: Indicates no significance.

حاضر، فعالیت مهار رادیکال DPPH پلت تولید شده از ۰/۵ درصد (به ترتیب مربوط به نمونه 10-P تا ۲/۵ و ۳/۶ درصد (مربوط به نمونه 20-P و 0-P) متغیر بود. فعالیت مهار رادیکال DPPH سوپرناتانت بین ۰/۱ درصد (5-S) تا ۱۶/۸ (20-S) درصد متغیر بود. نتایج فوق نشان داد که زمان ۲۰ دقیقه ای فرایند اولتراسوند در مقایسه با سایر زمان ها تاثیر بیشتری بر خاصیت آنتی اکسیدانی (DPPH) پست بیوتیک ها در هر دو سطح پلت و سوپرناتانت داشت. با این حال، فعالیت مهار رادیکال DPPH در پست بیوتیک های تولید شده در سطح پلت بسیار کمتر از پست بیوتیک کنترل بود.

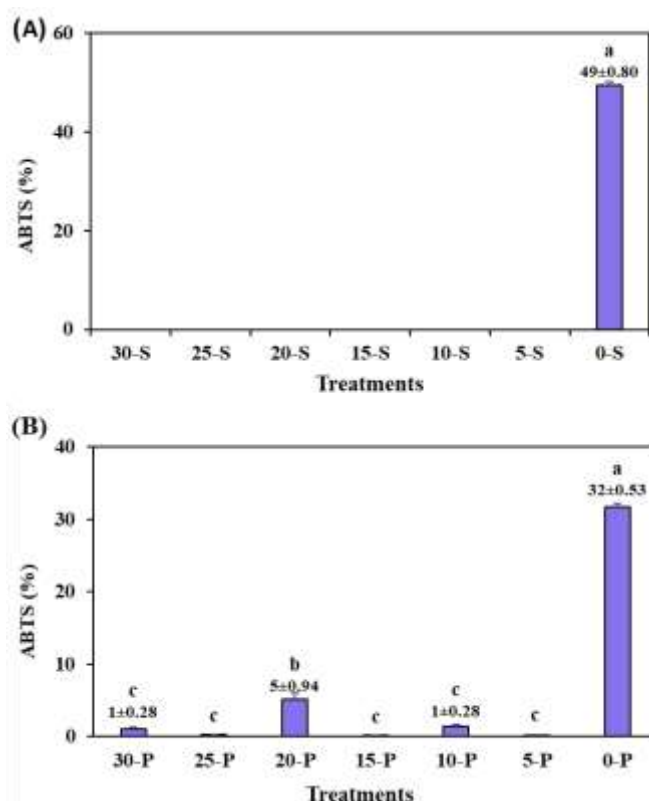
مقایسه میانگین ها نشان داد که فعالیت DPPH پست بیوتیک در سطح سوپرناتانت در زمان ۲۰ دقیقه (20-S) نسبت به زمان های دیگر به طور معنی داری بالاتر بود، در حالی که زمان ۵ دقیقه کمترین میزان فعالیت را داشت. به علاوه، نمونه ی پلت کنترل (0-P) فعالیت DPPH بالاتری را نسبت به سایر پست بیوتیک در سطح پلت نشان داد (شکل ۱). رادیکال آزاد DPPH دارای یک الکترون جفت نشده در یک اتم از پل نیتروژنی خود است و این باعث کاهش قابل توجه قرار گرفتن در معرض رادیکال پروتون می شود. همچنین، اثر مخرب و قدرتمندی بر اندام های بدن دارد [۳۲]. در تحقیق



**Figure 1:** Comparison of the average antioxidant properties of postbiotics produced using ultrasound treatment at different times on the supernatant (A) and pellet (B) surfaces using the DPPH test. Data values represent the mean  $\pm$  standard error. Different lower-case letters above the columns indicate statistically significant differences between the treatments at  $\alpha = 0.05$  based on the Duncan test ( $n=3$ ). 0-P: Pellet 0 min (control), 5-P: Pellet 5 min, 15-P: Pellet 15 min, 20-P: Pellet 20 min, 25-P: Pellet 25 min, 30-P: Pellet 30 min 0-S: Supernatant 0 min (control), 5-S: Supernatant 5 min, 15-S: Supernatant 15 min, 20-S: Supernatant 20 min, 25-S: Supernatant 25 min, 30-S: Supernatant 30 min. The numbers above the columns indicate the mean  $\pm$  standard error.

بود. این نتایج نشان داد که نمونه‌های تولید شده توسط اولتراسوند نسبت به نمونه‌های شاهد فعالیت مهار رادیکال ABTS کمتری داشتند. فعالیت مهار رادیکال ABTS پست-بیوتیک تولید شده توسط اولتراسوند نسبت به نمونه شاهد کاهش قابل توجهی داشت، به‌طوری‌که در هیچ‌کدام از نمونه‌ها فعالیت ABTS مشاهده نشد، درحالی‌که نمونه کنترل ۴۹/۵ درصد فعالیت مهار رادیکال ABTS نشان داد. نتایج فوق نشان می‌دهد که اولتراسوند می‌تواند تاثیر منفی روی فعالیت ABTS پست‌بیوتیک‌های تولید شده داشته باشد.

در ارتباط با فعالیت ABTS در سوپرناتانت، پست‌بیوتیک کنترل دارای بالاترین میزان فعالیت بود و سایر سطوح هیچ‌گونه فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان ندادند (شکل ۲). به‌طور مشابه، فعالیت آنتی‌اکسیدان ABTS در سطح پلت در پست-بیوتیک کنترل دارای بالاترین مقدار بود و زمان ۵ دقیقه هیچ‌گونه فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان نداد (شکل ۲). فعالیت مهار رادیکال ABTS پلت در این مطالعه از ۰/۲ درصد (مربوط به نمونه 15-P) تا ۳۱/۷ درصد (مربوط به نمونه کنترل) متغیر

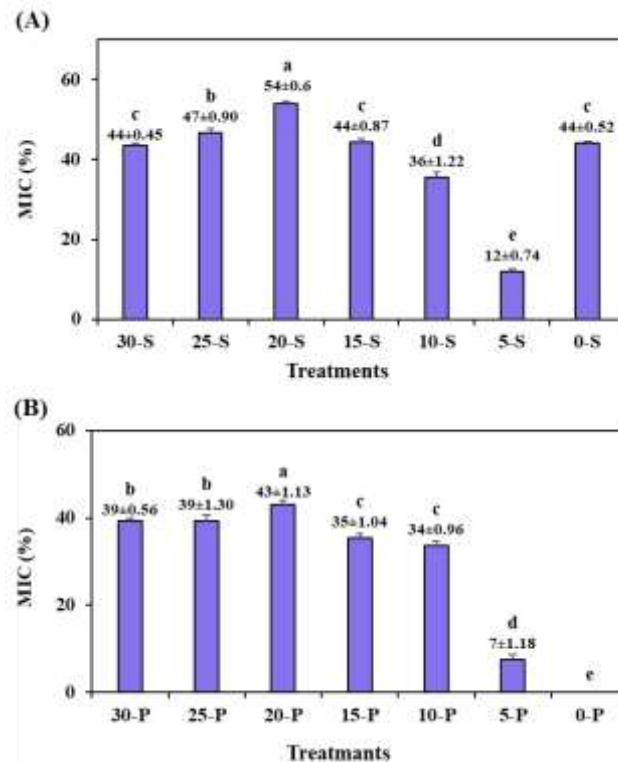


**Figure 2: Comparison of the average antioxidant properties of postbiotics produced using ultrasound treatment at different times on the supernatant (A) and pellet (B) surfaces using the ABTS test. Data values represent the mean  $\pm$  standard error. Different lower-case letters above the columns indicate statistically significant differences between the treatments at  $\alpha = 0.05$  based on the Duncan test ( $n=3$ ). 0-P: Pellet 0 min (control), 5-P: Pellet 5 min, 15-P: Pellet 15 min, 20-P: Pellet 20 min, 25-P: Pellet 25 min, 30-P: Pellet 30 min 0-S: Supernatant 0 min (control), 5-S: Supernatant 5 min, 15-S: Supernatant 15 min, 20-S: Supernatant 20 min, 25-S: Supernatant 25 min, 30-S: Supernatant 30 min. The numbers above the columns indicate the mean  $\pm$  standard error.**

نمونه شاهد بود. درصد MIC سوپرناتانت بین ۱۲ درصد مربوط به نمونه 5-S تا ۵۴ درصد مربوط به نمونه 20-S متغیر بود. Min و همکاران (۲۰۱۹) گزارش دادند که فعالیت‌های کیلیت‌کننده یون آهن مربوط به آگزوپلی ساکارید هنگامی که غلظت آن به ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر رسید، به حداکثر مقدار ۶۹/۷ درصد افزایش یافت [۳۳]. در مطالعه دیگری، آگزوپلی ساکارید در غلظت ۴ میلی گرم در میلی لیتر اثر کیلیت‌کنندگی یون آهن (۲۷/۸ درصد) نشان داد [۲۲]. دلیل این خاصیت را می‌تواند به برخی از آنتی اکسیدان‌ها و آنزیم‌های آنتی اکسیدانی پست بیوتیک‌ها که می‌توانند توانایی‌های کیلیت‌کنندگی فلزات را داشته باشند نسبت داد، به طوری که آن‌ها می‌توانند آنزیم‌های متالوآنزیم مانند آنزیم تبدیل‌کننده آنژیوتانسین را مهار کند [۳۴]. باین‌حال، در بعضی از پژوهش‌ها درصد خاصیت آنتی اکسیدانی

مشابه با DPPH، در سطح سوپرناتانت در زمان ۲۰ دقیقه (20-S) نسبت به زمان‌های دیگر فعالیت MIC پست بیوتیک به طور معنی داری بالاتر بود و زمان ۵ دقیقه کمترین مقدار بود. در ارتباط با پلت، فعالیت MIC پست بیوتیک‌ها در زمان ۲۰ دقیقه دارای بالاترین میزان بود، درحالی که نمونه 0-P هیچ گونه فعالیت MIC نشان نداد (شکل ۳). فعالیت کیلیت‌کننده فلزات (MIC) به عنوان یکی از مکانیسم‌های آنتی اکسیدانی، غلظت فلز واسطه کاتالیزور را در پراکسیداسیون لیپید کاهش می‌دهد. آهن یک پرواکسیدان ضروری برای اکسیداسیون لیپید در بین فلزات واسطه است، زیرا واکنش پذیری بالایی نشان می‌دهد [۲۲]. فعالیت MIC پلت تولید شده با روش اولتراسوند از ۰ (P-0) تا ۴۳ درصد (20-P) متغیر بود. در نمونه‌های پلت فعالیت MIC بالاتر از

سوپرناتانت کمتر از مقدار به دست آمده از این تحقیق بود. به عنوان مثال، در تحقیق Çelik و همکاران (۲۰۲۴) فعالیت کیلیت کننده  $Fe^{2+}$  مربوط به سوپرناتانت بدون سلول *salivarius* KC27L ۱۹/۳ درصد بود [۳۱].



**Figure 3: Comparison of the average antioxidant properties of postbiotics produced using ultrasound treatment at different times on the supernatant (A) and pellet (B) surfaces using the MIC test. Data values represent the mean  $\pm$  standard error. Different lower-case letters above the columns indicate statistically significant differences between the treatments at  $\alpha = 0.05$  based on Duncan test ( $n=3$ ). 0-P: Pellet 0 min (control), 5-P: Pellet 5 min, 15-P: Pellet 15 min, 20-P: Pellet 20 min, 25-P: Pellet 25 min, 30-P: Pellet 30 min 0-S: Supernatant 0 min (control), 5-S: Supernatant 5 min, 15-S: Supernatant 15 min, 20-S: Supernatant 20 min, 25-S: Supernatant 25 min, 30-S: Supernatant 30 min. The numbers above the columns indicate the mean  $\pm$  standard error.**

پروتئین‌ها واکنش می‌دهند و در نتیجه باعث آسیب اکسیداتیو

شدید به مولکول‌های زیستی درون سلول‌های زنده می‌شوند که منجر به سرطان می‌شود [۳۲]. فعالیت مهارکنندگی رادیکال هیدروکسیل (HRS)، واکنش‌پذیرترین رادیکال را که مربوط به پراکسیداسیون لیپید و بیومولکول‌های سلول‌ها است، اندازه‌گیری می‌کند [۳۳]. در این مطالعه فعالیت HRS پلت بین ۲۶/۵ (5-P) تا ۸۳/۴۳ درصد (مربوط به نمونه 30-P) متغیر بود. به علاوه از لحاظ درصد فعالیت HRS اختلاف معنی‌داری بین نمونه‌های 0-S، 20-S، 30-S، 15-S نبود. فعالیت HRS در سوپرناتانت از ۳۷/۴۴ درصد (5-S) تا ۹۷/۷۹ (0-S) درصد متغیر بود. به علاوه نمونه‌های 0-S، 20-S و 25-S از

پست‌بیوتیک کنترل در سطح سوپرناتانت (0-S) بالاترین فعالیت HRS را داشت، درحالی‌که زمان ۵ دقیقه دارای کمترین مقدار بود. به علاوه فعالیت HRS نمونه‌ها در سطح سوپرناتانت در زمان ۲۰ و ۲۵ (S20 و S25) اختلاف معنی‌داری با 0-S نداشتند. در سطح پلت بالاترین فعالیت HRS مربوط به زمان ۳۰ دقیقه (30-P) بود. علاوه بر این، فعالیت HRS در پست‌بیوتیک‌های تهیه شده در زمان‌های ۱۵ و ۲۰ در سطح پلت (15-P و 20-P) اختلاف معنی‌داری با 30-P نداشتند (شکل ۴). رادیکال‌های هیدروکسیل به راحتی و به سرعت با مولکول‌های زیستی مانند DNA، لیپیدها و

لحاظ درصد فعالیت HRS اختلاف معنی داری نداشتند. فعالیت HRS پست بیوتیک های این مطالعه را می توان به آگزوپلی ساکاریدها نسبت داد. به نظر می رسد که ظرفیت بهینه حذف رادیکال هیدوکسیل در آگزوپلی ساکاریدها به دلیل انتقال فعال اتم های هیدروژن از گروه های هیدروکسیل موجود در آگزوپلی ساکاریدها باشد [۲۹]. فعالیت HRS پست بیوتیک ها در این مطالعه بالاتر از نتایج فعالیت HRS در پژوهش هایی است که در زیر به آن ها اشاره می کنیم. به عنوان مثال، نتایج تحقیق Ageeli و Mohamed (۲۰۲۵) نشان داد که بالاترین درصدهای فعالیت HRS بین ۶۵ تا ۷۸ درصد متغیر بود [۲۹]. پژوهش های مشابه فعالیت HRS در آگزوپلی ساکاریدهای *L. plantarum* C88، *L. helveticus* MB2-1 و *L. plantarum* YW32 به ترتیب با درصد مهار ۶۲/۹۳، ۸۵/۲۱ و ۷۷/۵ گزارش داده اند [۳۲، ۳۵]. نکته قابل توجه این است که نمونه های تولید شده در زمان ۵ دقیقه در تمام آزمایشات و در هر دو سطح پلت و سوپرناتانت (S-5 و P) کمترین فعالیت آنتی اکسیدانی را نشان دادند. به طور کلی نتایج مطالعه حاضر نشان دهنده اثرات بالای آنتی اکسیدانی پست بیوتیک های تولید شده بود و همچنین تفاوت در فعالیت آنتی اکسیدانی پست بیوتیک ها قابل مشاهده بود. به طوری که زمان ۲۰ دقیقه اعمال فرایند اولتراسوند بالاترین خاصیت آنتی اکسیدانی را در مقایسه با سایر زمان ها داشت، در حالی که زمان ۵ دقیقه کمترین خاصیت آنتی اکسیدانی را در بین سایر زمان های اعمال فرایند اولتراسوند داشت. این تفاوت به مکانیسم هایی مانند توانایی کلات سازی یون فلزی، سیستم آنزیم آنتی اکسیدانی و متابولیت های آنتی اکسیدانی موجود در پست بیوتیک بستگی دارد [۳۵]. به علاوه، نتایج این مطالعه نشان داد که روش تولید پست بیوتیک نیز می تواند

تأثیر مستقیم بر خاصیت آنتی اکسیدانی آن داشته باشد. روش اولتراسوند ممکن است به دلیل تولید و فروپاشی حباب های کاویتاسیون، اثرات شیمیایی، مکانیکی و بیوشیمیایی ایجاد کند [۳۶]. باکتری ها هنگام تیمار با امواج فراصوت با شدت نسبتاً کم، در فاز لگاریتمی تکثیر می شوند. همچنین، این فناوری غیر حرارتی آنزیم های خارج سلولی، عمدتاً بتا-گالاکتوزیداز، را افزایش می دهد که می تواند آنتی اکسیدان ها و ترکیبات زیست فعال مانند فنول ها، فلاونوئیدها و آنتوسیانین ها را به طور مؤثر استخراج کند. بر این اساس، می توان انتظار داشت که پس از اعمال امواج فراصوت در شرایط مناسب، خواص عملکردی و فیزیکوشیمیایی بهتری از غذاهای مبتنی بر پروبیوتیک حاصل شود [۳۷]. در بعضی از روش های سنجش تحقیق حاضر اولتراسوند تأثیر کاهشی بر خاصیت آنتی اکسیدانی پست بیوتیک ها داشت که دلیل این امر را می توان القای تشکیل رادیکال های آزاد که به طور بالقوه فعالیت کلی آنتی اکسیدانی را کاهش می دهند، دانست [۳۸، ۳۹]. همچنین گاهی افزایش فرکانس و مدت زمان سونیکاسیون، باعث کاهش جزئی پروتئین های محلول شود که منجر به تغییر در ظرفیت آنتی اکسیدانی می شود [۳۹، ۴۰]. در تایید این مطلب، Chávez-Alzaga و همکاران (۲۰۲۴) اثر تیمارهای سوبستراها (آب پنیر، شیر کامل و شیر بدون چربی) و اولتراسونیک (ترموسونیکاسیون و اولتراسوند با شدت بالا) را بر فعالیت آنتی اکسیدانی پست بیوتیک های کفیر محلول در آب (WSKPs) ارزیابی کردند. آن ها دریافتند که WSKP از آب پنیر بدون هیچ گونه فراوری، فعالیت آنتی اکسیدانی بیشتری نسبت به اولتراسونیک نشان داد [۲۱].

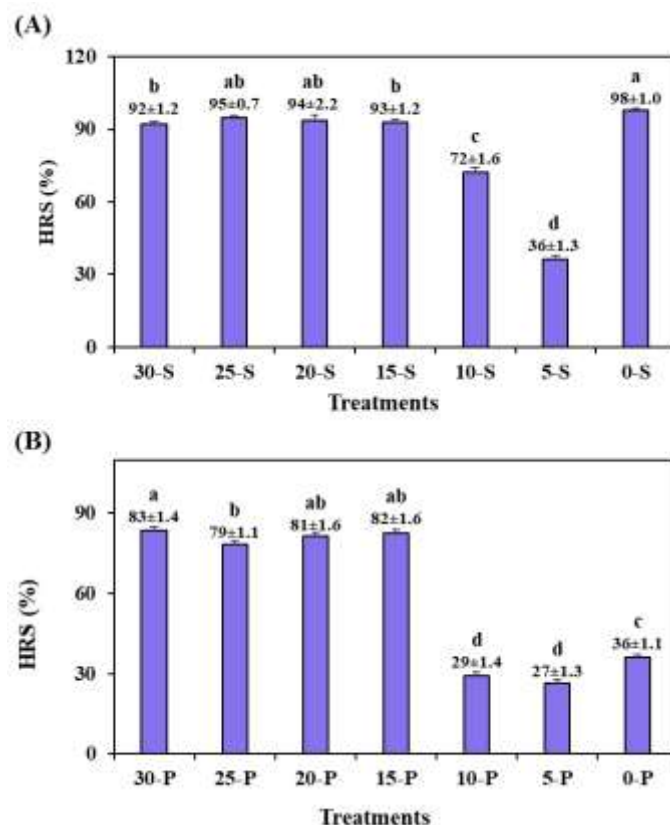


Figure 4: Comparison of the average antioxidant properties of postbiotics produced using ultrasound treatment at different times on the supernatant (A) and pellet (B) surfaces using the HRS test. Data values represent the mean  $\pm$  standard error. Different lower-case letters above the columns indicate statistically significant differences between the treatments at  $\alpha = 0.05$  based on Duncan test ( $n=3$ ). 0-P: Pellet 0 min (control), 5-P: Pellet 5 min, 15-P: Pellet 15 min, 20-P: Pellet 20 min, 25-P: Pellet 25 min, 30-P: Pellet 30 min 0-S: Supernatant 0 min (control), 5-S: Supernatant 5 min, 15-S: Supernatant 15 min, 20-S: Supernatant 20 min, 25-S: Supernatant 25 min, 30-S: Supernatant 30 min. The numbers above the columns indicate the mean  $\pm$  standard error.

DPPH، MIC و HRS اختلاف معنی‌داری وجود دارد و تنها

در روش ABTS اختلاف معنی‌داری بین خاصیت آنتی-

اکسیدانی پلت و سوپرناتانت وجود نداشت (جدول ۳).

### ۳-۲- مقایسه خاصیت آنتی‌اکسیدانی بین پست-

بیوتیک‌های تولید شده در سطح پلت و

#### سوپرناتانت

نتایج آزمون t نشان داد که بین خواص آنتی‌اکسیدانی پست-

بیوتیک‌ها در دو گروه پلت و سوپرناتانت در روش‌های

Table 3: T-test results of comparison antioxidant properties of postbiotics in the two pellet and supernatant groups

| P-value             | t-value | d.f | Method |
|---------------------|---------|-----|--------|
| 0.000**             | -46.06  | 40  | DPPH   |
| 0.763 <sup>ns</sup> | -0.30   | 40  | ABTS   |
| 0.014*              | -3.18   | 40  | MIC    |
| 0.003**             | -5.36   | 40  | HRS    |

\*\*: Indicates significance at the 1 percent level. \*: Indicates significance at the 5 percent level. ns: Indicates no significance.

زمان مختلف با استفاده از آزمون t نشان داد که خاصیت

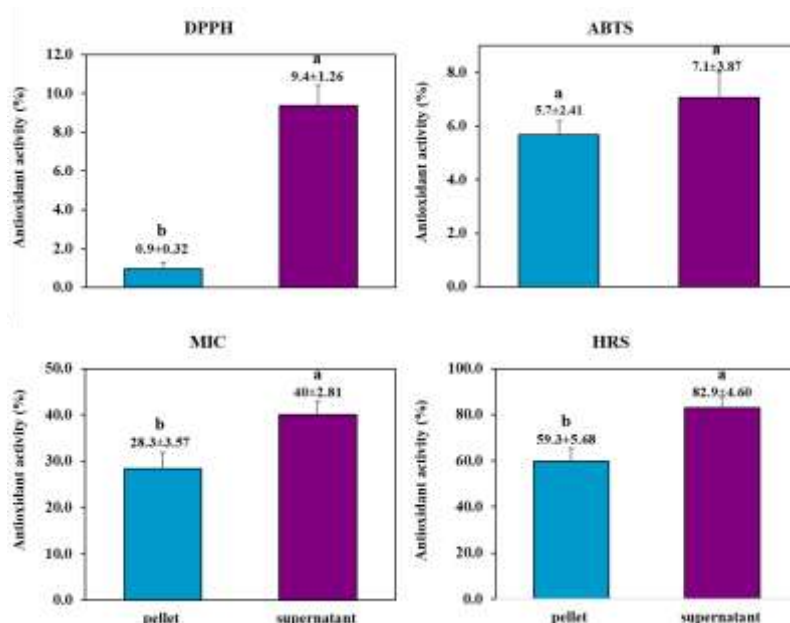
آنتی‌اکسیدانی سوپرناتانت در روش‌های DPPH، MIC و

نتایج مقایسه میانگین خاصیت آنتی‌اکسیدانی دو گروه پست-

بیوتیک‌های تولید شده در سطح پلت و سوپرناتانت در ۶

مختلفی در طول رشد میکروبی تولید می‌شوند که می‌توانند با سانتریفیوژ از سلول‌های میکروبی جدا شوند که غنی از آنتی اکسیدان‌ها، فنول‌ها، فلاونوئیدها، ترکیبات ضد میکروبی و ضد سرطانی هستند [۴۲]. همچنین این تفاوت را می‌توان به تغییرات در برخی خواص فیزیکوشیمیایی، از جمله جرم مولکولی و وجود گروه‌های عاملی خاص نسبت داد [۴۳]. دلیل دیگر اینکه سوپرناتانت بدون سلول اثرات بیولوژیکی بهتری دارد این است که مولکول‌های زیستی مختلف با همکاری یکدیگر عمل می‌کنند [۴۴]. با این وجود نتایج مطالعه حاضر با مشاهدات Sun و همکاران (۲۰۲۳) متفاوت بود، به‌طوری‌که آن‌ها دریافتند توانایی مهار DPPH در سوپرناتانت بدون سلول به‌طور قابل توجهی کمتر از سلول‌های *Lactocaseibacillus paracasei* و *Bifidobacterium lactis* کشته شده با حرارت است [۴۵].

HRS اختلاف معنی داری بالاتر از پلت بود. از طرف دیگر، بین خاصیت آنتی اکسیدانی نمونه‌های پلت و سوپرناتانت در روش ABTS اختلاف معنی داری مشاهده نشد (شکل ۵). دلیل این امر احتمالاً مربوط به متابولیت‌های تولید شده توسط پست‌بیوتیک است. در تایید این امر نتایج Çelik و همکاران (۲۰۲۴) نشان دادند که فعالیت DPPH مربوط به سوپرناتانت بدون سلول KC27L، ۷۵/۷ درصد (تقریباً مشابه با این تحقیق) است [۳۱]. نتایج تحقیق حاضر با نتایج Almabhashi و Gunes Altuntas (۲۰۲۵) که مقایسه سه روش تهیه پست‌بیوتیک‌ها (شامل سوپرناتانت بدون سلول، تیمار حرارتی و تیمار آنزیمی با اولتراسونیک) با استفاده از باکتری‌های اسید لاکتیک *Lactiplantibacillus plantarum*، *Pediococcus* و *Leuconostoc mes enteroides* AF1، F2، 50 *pentosaceus* را انجام دادند، مطابقت دارد [۴۱]. آن‌ها دریافتند که سوپرناتانت بدون سلول و عملیات حرارتی موثرترین روش‌ها هستند. متابولیت‌های فعال بیولوژیکی



**Figure 5: Comparison of the average antioxidant properties of postbiotics produced at the pellet and supernatant levels by different methods using the t-test. The numbers above the columns indicate the mean  $\pm$  standard error.**

پژوهش سعی بر این بود که با درک بهتر ویژگی‌ها و مزایای بالقوه سلامتی این پست‌بیوتیک‌ها، راه را برای ایجاد درمان‌های طبیعی نوآورانه و کارآمد برای بیماری‌های مختلف هموار کنیم. طبق یافته‌های این مطالعه، پست‌بیوتیک

#### ۴- نتیجه‌گیری

این مطالعه اطلاعات مفیدی در مورد مزایا استفاده از پست‌بیوتیک‌های ائروکوکوس فاسیوم ارائه می‌دهد. در این

### بیانیه تامین مالی

هزینه های این پژوهش به طور کامل توسط دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری تامین شد.

### مشارکت نویسندگان

تمام فعالیت ها توسط نویسنده انجام شده است.

### تضاد منافع

نویسنده تأیید می کند که هیچ گونه تضاد منافع مالی یا منافع رقابتی در این مطالعه ندارد.

### ۵-منابع

- [1] Choudhury, T. G., & Kamilya, D. (2019). Paraprobiotics: An aquaculture perspective. *Reviews in Aquaculture*, 11(4), 1258-1270.
- [2] Luo, K., Tian, X., Wang, B., Wei, C., Wang, L., Zhang, S., ... & Dong, S. (2021). Evaluation of paraprobiotic applicability of *Clostridium butyricum* CBG01 in improving the growth performance, immune responses and disease resistance in Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 544, 737041.
- [3] Doron, S., & Snyderman, D. R. (2015). Risk and safety of probiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 60(suppl\_2), S129-S134.
- [4] Aghebati-Maleki, L., Hasannezhad, P., Abbasi, A., & Khani, N. (2021). Antibacterial, antiviral, antioxidant, and anticancer activities of postbiotics: a review of mechanisms and therapeutic perspectives. *Biointerface Res Appl Chem*, 12(2), 2629-2645.
- [5] Żółkiewicz, J., Marzec, A., Ruszczyński, M., & Feleszko, W. (2020). Postbiotics—a step beyond pre- and probiotics. *Nutrients*, 12(8), 2189.
- [6] Jacobo, N. A. B., Reyes-Villagrana, R. A., & Chávez-Martínez, A. (2021). Relación entre probióticos-postbióticos y sus principales efectos bioactivos. *TECNOCENCIA Chihuahua*, 15(2), 836-836. Caponio, G.
- [7] Malashree, L., Angadi, V., Yadav, K. S., & Prabha, R. (2019). Postbiotics. *One Step Ahead of*

مشتق شده از انتروکوکوس فاسیوم به دلیل ظرفیت آنتی اکسیدانی قابل توجه، می تواند اثرات متعدد تقویت کننده بر سلامت داشته باشند. به طور کلی می توان گفت که پست بیوتیک های تهیه شده در سطح سوپرناتانت نسبت به پلت خاصیت آنتی اکسیدانی بالاتری نشان دادند، همچنین زمان اولتراسوند بر خاصیت آنتی اکسیدانی پست بیوتیک موثر بود، به طوری که زمان ۲۰ دقیقه بیشترین تاثیر را بر خاصیت آنتی-اکسیدانی پست بیوتیک ها داشت. بنابراین می توان پیشنهاد کرد که پست بیوتیک های تولید شده توسط اولتراسوند به طور فزاینده ای در بخش های غذای انسان، خوراک دام و داروسازی مورد استفاده قرار گیرند. با این وجود، برای اثبات مزایای مثبت پست بیوتیک ها به تحقیقات علمی بیشتری در مورد باکتری های اسید لاکتیک، با استفاده از روش های تثبیت شده و اصلاح شده برای استخراج، تأیید، توصیف و انجام تحقیقات متابولیک و پروتئومیک، پست بیوتیک هایی با کارایی قابل توجه نیاز است.

- Probiotics. Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci*, 8(01), 2049-2053.
- [8] Qiao, S., Lv, C., Zhang, X., Lv, X., Yang, D., & Zhao, J. (2024). Antioxidant and anti-stress properties of postbiotics produced by *Lysinibacillus macroides* G117. *Comparative Immunology Reports*, 6, 200143.
- [9] Da Silva Vale, A., de Melo Pereira, G. V., de Oliveira, A. C., de Carvalho Neto, D. P., Herrmann, L. W., Karp, S. G., ... & Soccol, C. R. (2023). Production, formulation, and application of postbiotics in the treatment of skin conditions. *Fermentation*, 9(3), 264.
- [10] Hernández-Granados, M. J., & Franco-Robles, E. (2020). Postbiotics in human health: Possible new functional ingredients?. *Food Research International*, 137, 109660.
- [11] Moradi, M., Kousheh, S. A., Almasi, H., Alizadeh, A., Guimarães, J. T., Yılmaz, N., & Lotfi, A. (2020). Postbiotics produced by lactic acid bacteria: The next frontier in food safety. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 19(6), 3390-3415.
- [12] Encinas-Vazquez, I. A., Carrillo-Pérez, E., Martín-García, A. R., Del-Toro-Sánchez, C. L., Márquez-Ríos, E., Bastarrachea, L. J., & Rodríguez-Figueroa, J. C. (2023). Effects of high-intensity ultrasound pretreatment on the exopolysaccharide concentration and biomass increase in cheese whey kefir. *Processes*, 11(7), 1905.

- [13] Cuevas-González, P. F., Liceaga, A. M., & Aguilar-Toalá, J. E. (2020). Postbiotics and paraprobiotics: From concepts to applications. *Food research international*, 136, 109502.
- [14] Caponio, G. R., Lippolis, T., Tutino, V., Gigante, I., De Nunzio, V., Milella, R. A., ... & Notarnicola, M. (2022). Nutraceuticals: Focus on anti-inflammatory, anti-cancer, antioxidant properties in gastrointestinal tract. *Antioxidants*, 11(7), 1274.
- [15] Pisoschi, A. M., & Negulescu, G. P. (2011). Methods for total antioxidant activity determination: a review. *Biochem Anal Biochem*, 1(1), 106.
- [16] Cheung, E. C., & Vousden, K. H. (2022). The role of ROS in tumour development and progression. *Nature Reviews Cancer*, 22(5), 280-297.
- [17] Zehiroglu, C., & Ozturk Sarikaya, S. B. (2019). The importance of antioxidants and place in today's scientific and technological studies. *Journal of food science and technology*, 56(11), 4757-4774.
- [18] Aydın, B., Çiydem, T., Kaya, E., & Açıık, L. (2021). Evaluation of the antioxidant effects of postbiotics and paraprobiotics in lactic acid bacteria isolated from traditional fermented sausages. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (28), 849-852.
- [19] Li, S., Zhao, Y., Zhang, L., Zhang, X., Huang, L., Li, D., ... & Wang, Q. (2012). Antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditional Chinese fermented foods. *Food chemistry*, 135(3), 1914-1919.
- [20] Chang, H. M., Foo, H. L., Loh, T. C., Lim, E. T. C., & Abdul Mutalib, N. E. (2021). Comparative studies of inhibitory and antioxidant activities, and organic acids compositions of postbiotics produced by probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* strains isolated from Malaysian foods. *Frontiers in veterinary science*, 7, 602280.
- [21] Chávez-Alzaga, G., Reyes-Villagrana, R. A., Espino-Solis, G. P., Arévalos-Sánchez, M. M., Rentería-Monterrubio, A. L., Sánchez-Vega, R., ... & Chávez-Martínez, A. (2024). The Effects of Substrates and Sonication Methods on the Antioxidant Activity of Kefir Postbiotics. *Fermentation*, 10(9), 492.
- [22] Rajoka, M. S. R., Mehwish, H. M., Hayat, H. F., Hussain, N., Sarwar, S., Aslam, H., ... & Shi, J. (2019). Characterization, the antioxidant and antimicrobial activity of exopolysaccharide isolated from poultry origin *Lactobacilli*. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 11(4), 1132-1142.
- [23] Xiao, Y., Wang, L., Rui, X., Li, W., Chen, X., Jiang, M., & Dong, M. (2015). Enhancement of the antioxidant capacity of soy whey by fermentation with *Lactobacillus plantarum* B1-6. *Journal of functional foods*, 12, 33-44.
- [24] Păcularu-Burada, B., & Bahrim, G. E. (2021). Extraction and antioxidant activity assessment of postbiotic exopolysaccharides produced by selected lactic acid bacteria. *Innovative Romanian Food Biotechnology*, (20).
- [25] Aguilar-Toalá, J. E., Hall, F. G., Urbizo-Reyes, U. C., Garcia, H. S., Vallejo-Cordoba, B., González-Córdova, A. F., ... & Liceaga, A. M. (2019). In silico prediction and in vitro assessment of multifunctional properties of postbiotics obtained from two probiotic bacteria. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 12, 608-622.
- [26] Hawar, S., Vevers, W., Karieb, S., Ali, B. K., Billington, R., & Beal, J. (2013). Biotransformation of patulin to hydroascladiol by *Lactobacillus plantarum*. *Food Control*, 34(2), 502-508.
- [27] Jang, H. J., Song, M. W., Lee, N. K., & Paik, H. D. (2018). Antioxidant effects of live and heat-killed probiotic *Lactobacillus plantarum* Ln1 isolated from kimchi. *Journal of food science and technology*, 55(8), 3174-3180.
- [28] Noori, S. M. A., Behfar, A., Saadat, A., Ameri, A., Yazdi, S. S. A., & Siahpoosh, A. (2023). Antimicrobial and Antioxidant Properties of Natural Postbiotics Derived from Five Lactic Acid Bacteria. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 18(1), e130785.
- [29] Ageeli, A. A., & Mohamed, S. F. (2025). Extraction, Purification and Characterization of Exopolysaccharide from *Lactiplantibacillus plantarum* B7 with Potential Antioxidant, Antitumor and Anti-Inflammatory Activities. *Processes*, 13(4), 935.
- [30] Dong, H., Ren, X., Song, Y., Zhang, J., Zhuang, H., Peng, C., ... & Li, Z. (2024). Assessment of multifunctional activity of a postbiotic preparation derived from *Lacticaseibacillus paracasei* postbiotic-P6. *Foods*, 13(15), 2326.
- [31] Çelik, K., Yuksekdağ, Z., Acar, B. Ç., & Kara, F. (2024). Determination of antioxidant and antimicrobial activities of cell-free supernatant (CFSKC27L) and exopolysaccharide (EPSKC27L) obtained from *Ligilactobacillus salivarius* KC27L. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 21(4), 928-941.
- [32] Li, W., Ji, J., Chen, X., Jiang, M., Rui, X., & Dong, M. (2014). Structural elucidation and antioxidant activities of exopolysaccharides from *Lactobacillus helveticus* MB2-1. *Carbohydrate Polymers*, 102, 351-359.
- [33] Min, W. H., Fang, X. B., Wu, T., Fang, L., Liu, C. L., & Wang, J. (2019). Characterization and antioxidant activity of an acidic exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* JLAU103. *Journal of bioscience and bioengineering*, 127(6), 758-766.
- [34] Gomaa, A. (2021). A Study of the Antimicrobial & Selected Health Promotive Effects of Synbiotics (Doctoral dissertation, Alabama Agricultural and Mechanical University).
- [35] Yang, X., Li, L., Duan, Y., & Yang, X. (2017). Antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* JM113 in vitro and its protective effect on broiler

- chickens challenged with deoxynivalenol. *Journal of Animal Science*, 95(2), 837-846.
- [36] Guimarães, J. T., Silva, E. K., Alvarenga, V. O., Costa, A. L. R., Cunha, R. L., Sant'Ana, A. S., ... & Cruz, A. G. (2018). Physicochemical changes and microbial inactivation after high-intensity ultrasound processing of prebiotic whey beverage applying different ultrasonic power levels. *Ultrasonics sonochemistry*, 44, 251-260.
- [37] Manyatsi, T. S., Mousavi Khaneghah, A., & Gavahian, M. (2024). The effects of ultrasound on probiotic functionality: an updated review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 64(31), 11643-11660.
- [38] Lim, S. Y., Benner, L. C., & Clark, S. (2019). Neither thermosonication nor cold sonication is better than pasteurization for milk shelf life. *Journal of Dairy Science*, 102(5), 3965-3977.
- [39] Safitri, W. N. E. (2023). Effect of frequency and duration of thermosonication on the physical, chemical and microbiological quality of cow's milk. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, 11(3), 136-146.
- [40] Ragab, E. S., Lu, J., Pang, X. Y., Nassar, K. S., Yang, B. Y., Zhang, S. W., & Lv, J. P. (2019). Effect of thermosonication process on physicochemical properties and microbial load of goat's milk. *Journal of food science and technology*, 56(12), 5309-5316.
- [41] Almahbashi, A., & Gunes Altuntas, E. (2025). From preparation to Bioactivity: A comparative study on preparation methods and characterization of postbiotics. *Food Science & Nutrition*, 13(5), e70294.
- [42] Asadi, Z., Abbasi, A., Ghaemi, A., Montazeri, E. A., & Akrami, S. (2024). Investigating the properties and antibacterial, antioxidant, and cytotoxicity activity of postbiotics derived from *Lactocaseibacillus casei* on various gastrointestinal pathogens in vitro and in food models. *GMS Hygiene and Infection Control*, 19, Doc60.
- [43] Andrew, M., & Jayaraman, G. (2020). Structural features of microbial exopolysaccharides in relation to their antioxidant activity. *Carbohydrate research*, 487, 107881.
- [44] Hartmann, H. A., Wilke, T., & Erdmann, R. (2011). Efficacy of bacteriocin-containing cell-free culture supernatants from lactic acid bacteria to control *Listeria monocytogenes* in food. *International Journal of Food Microbiology*, 146(2), 192-199.
- [45] Sun, Z., Zhao, Z., Fang, B., Hung, W., Gao, H., Zhao, W., ... & Zhang, M. (2023). Effect of thermal inactivation on antioxidant, anti-inflammatory activities and chemical profile of postbiotics. *Foods*, 12(19), 3579.



## Scientific Research

Effects of ultrasound on antioxidant properties of postbiotics derived from pellets and supernatants *Enterococcus faecium* culture

Mahsa Shiri<sup>1</sup>, Jamshid Farmani<sup>2\*</sup>, Ali Motamed Zadegan<sup>3</sup>, Ali Barzegar<sup>4</sup>, H.P. Vasantha Rupasinghe<sup>5</sup>

- 1- PhD student, Department of Food Science and Technology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Mazandaran, Iran.
- 2- Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agricultural Engineering, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
- 3- Professor, Department of Food Science and Technology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Mazandaran, Iran.
- 4- Associate Professor, Department of Basic Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Mazandaran, Sari, Iran
- 5- Department of Plant, Food, and Environmental Sciences, Faculty of Agriculture, Dalhousie University, Truro, Nova Scotia, Canada.

## ARTICLE INFO

## ABSTRACT

## Article History:

Received: 2025/12/26

Review: 2026/05/08

Accepted: 2026/05/13

## Keywords:

Antioxidant properties,

*Enterococcus faecium*,

postbiotics,

Ultrasound

DOI: 10.48311/fsct.2026.118542.83005

\*Corresponding Author E-

jamshid\_farmani@yahoo.com

Accumulating studies have highlighted the great potential of postbiotics in protecting host health. Compared with traditional functional foods, postbiotics have the advantages of high physiological activity, long shelf life, easy absorption, etc. In this study, the effects of ultrasound treatment on the antioxidant activity of postbiotics derived from *Enterococcus faecium* bacteria were evaluated. This bacterium is alpha-hemolytic or non-hemolytic and is a symbiont of the human intestine. The microorganism was subjected to 6 different ultrasonic treatments (5, 10, 15, 20, 25, and 30 minutes). ABTS, DPPH, MIC and HRS tests were performed to investigate antioxidant activity at the pellet and supernatant levels. The results of one-way analysis of variance showed that the effect of ultrasound on the antioxidant properties of postbiotics was significant at different times at the pellet and supernatant levels. postbiotics exhibited higher antioxidant activity at the supernatant level with DPPH at 20 min, ABTS control and MIC at 20 min and HRS control. At the pellet level, higher antioxidant activity was observed with DPPH control, ABTS control and MIC at 20 min, as well as HRS at 30 min. In addition, samples treated for 5 minutes demonstrated the lowest antioxidant activity (0 to 36 percent) across all experiments at both pellet and supernatant levels, with the exception of the MIC control experiment (0 percent). The antioxidant property of postbiotics extracted at the supernatant level was higher than the pellet in all experiments except for ABTS. We suggest that postbiotics extracted from *E. faecium* be used as antioxidants in the food and pharmaceutical industries.