مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال نوزدهم، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۳، صفحات ۵۸-۴۳

تعیین نمایه شیمیایی و مشخصات عملکردی پست‌بیوتیک‌های مشتق شده از *لاکتوباسیلوس کازئی* ATCC 39392 و ارزیابی فعالیت ضد میکروبی آن علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* در شرایط آزمایشگاهی

سمانه مرادی[۱]، مریم مصلحی شاد[۲]، هدایت حسینی[۳]، امیر محمد مرتضویان[۳]، سعیده شجاعی علی آبادی[۴]، امین عباسی[۵]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۲- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد صفادشت، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۴ - نویسنده مسئول: دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران. پست الکترونیکی: saeedeh.shojaee@gmail.com

۵- نویسنده مسئول: دانشجوی دکتری تخصصی، گروه علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران. پست الکترونیکی: abbasia@sbmu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۹/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱/۲۰

چکیده

سابقه و هدف: پست‌بیوتیک‌ها با توجه به مزایای ایمنی، بالینی و تکنولوژیکی می‌توانند به عنوان ابزاری امیدوارکننده در تأمین ایمنی غذا به کار گرفته شوند. مطالعه حاضر به بررسی نمایه‌های شیمیایی و خصوصیات عملکردی و فعالیت ضدمیکروبی پست‌بیوتیک‌های *لاکتوباسیلوس کازئی* علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌پردازد.

مواد و روش‌ها: تعیین نمایه ترکیبات شیمیایی پست‌بیوتیک‌ها به وسیله کروماتوگرافی گازی کوپل‌شده با طیف‌سنج جرمی صورت گرفت. ارزیابی محتوای تام فنولی و فلاونوئیدی پست‌بیوتیک‌ها به ترتیب با استفاده از روش‌های فولین-سیکالتو و رنگ سنجی به کمک کلرید آلومینیوم صورت پذیرفت. سنجش ظرفیت ضد اکسایشی نیز با سه روش اندازه‌گیری مهار رادیکال آزاد DPPH، مهار رادیکال آزاد ABTS و رنگ‌بری بتاکاروتن-لینولئیک اسید انجام شد. فعالیت ضد میکروبی پست‌بیوتیک‌ها توسط ارزیابی‌های حداقل غلظت بازدارنده رشد و باکتری‌کشی و همچنین تعیین قطر هاله عدم رشد به روش انتشار در چاهک مورد بررسی قرار گرفت. بررسی نمایه ایمنی پست‌بیوتیک‌ها نیز توسط تست MTT صورت گرفت.

یافته‌ها: نتایج حاصل از بررسی کروماتوگرام، حضور ۱۰ ترکیب زیستی مشخص با اثرات ضد میکروبی شناخته شده را تأیید کرد. ترکیبات پست‌بیوتیک دارای غلظت بالایی از اجزای فنولی و فلاونوئیدی بودند. غلظت‌های ۴۰ و ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب به عنوان حداقل غلظت بازدارنده رشد و باکتری‌کشی در نظر گرفته شدند و همچنین کمترین و بیشترین هاله عدم رشد به ترتیب با قطر ۲۳ ± ۷ و ۶۵ ± ۲۹ میلی‌متر مربوط به غلظت‌های ۵ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. طبق نتایج ارزیابی ایمنی، پست‌بیوتیک‌ها تأثیر سویی بر فرآیندهای رشد و تکثیر رده سلولی نرمال KDR نداشته و تنها برای غلظت‌های ۱۲۰ و ۱۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در بازه زمانی ۴۸ ساعته کاهش زنده‌مانی در سلول‌ها دیده شد.

نتیجه‌گیری: پست‌بیوتیک‌ها با مشخصات ایمن و فعالیت‌های زیستی چشم‌گیر ازجمله فعالیت ضدمیکروبی، قابلیت استفاده به منظور توسعه غذاهای فراسودمند را دارا می‌باشند.

واژگان کلیدی: پست‌بیوتیک، *لاکتوباسیوس کازئی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، نمایه شیمیایی، نمایه ایمنی

پیام‌های اصلی

- نمایه شیمیایی و مشخصات عملکردی پست‌بیوتیک‌های مشتق شده از *لاکتوباسیلوس کازئی* ATCC 39392 تعیین گردید.
- ترکیبات پست‌بیوتیک دارای فعالیت معنی‌دار ضدباکتریایی می‌باشند.
- تعویق انداختن و مسدود نمودن واکنش‌های رادیکال‌های آزاد از جمله فعالیت‌های ضد رادیکالی ترکیبات پست‌بیوتیک می‌باشند.
- پست‌بیوتیک‌ها با توجه به مزایای ایمنی، بالینی و تکنولوژیکی می‌توانند به عنوان ابزاری امیدوارکننده در تأمین ایمنی میکروبی و شیمیایی مواد غذایی به کار گرفته شوند.

• مقدمه

غذا نقش اساسی در زندگی داشته و مواد مغذی را برای رشد و سلامتی انسان‌ها فراهم می‌کند (۱). انسان‌ها همواره به دنبال راهی برای حفظ و نگهداری مواد غذایی در برابر فسادهای شیمیایی، میکروبی و پاتوژن‌های منتقله از غذا بوده است. در حال حاضر، افراد جامعه مواد غذایی سالم را با مقدار کمتری از افزودنی‌ها و مواد شیمیایی مرتبط می‌دانند و این آگاهی ضرورت ایجاد اطمینان به جهت حصول ایمنی غذا و برآورده کردن تقاضای مصرف‌کنندگان را آشکار می‌سازد (۲). امنیت و ایمنی مواد غذایی همواره به عنوان دو مولفه جدایی ناپذیر در نظر گرفته می‌شوند که رابطه تنگاتنگی با یکدیگر داشته و به شکل معنی‌داری در روندهای صعودی دو مؤلفه تأثیر داشته و ایفای نقش می‌کنند. علی‌رغم وجود مسئله امنیت غذایی در کشورهای در حال توسعه اقتصادی، این مسئله همچنان در کشورهای توسعه یافته اقتصادی نیز چالش برانگیز بوده و به طور کامل مرتفع نشده است، حال آن‌که به موازات آن موضوع ایمنی مواد غذایی نیز مطرح می‌باشد که طبق تخمین‌های صورت گرفته انتقال بیش از ۲۰۰ نوع بیماری را می‌توان به برخی مواد غذایی نسبت داد. طبق گزارشات ایمنی غذا (سال ۲۰۲۲) سازمان بهداشت جهانی، مصرف سرانه غذای ناایمن زمینه‌ساز ۶۰۰ میلیون مورد بیماری غذازاد و ۴۲۰ هزار مورد مرگ و میر گردید (۳). فلذا، می‌توان اذعان نمود که تامین وضعیت ایمنی مواد غذایی در سطح بهینه نه تنها حاشیه امنی برای افزایش مصرف سرانه غذا توسط جامعه فراهم می‌کند از سوی دیگر به واسطه کاهش ضایعات غذایی موجب تقویت مولفه امنیت غذایی شده و غذای کافی (با محتوای تغذیه‌ای قابل قبول) در اختیار اقشار مختلف جامعه قرار می‌دهد (۴). ایمنی غذا مسئله مهمی برای هر دو طیف مصرف‌کنندگان و تولیدکنندگان قلمداد می‌شود. در جوامع صنعتی و علمی تلاش‌های زیادی برای افزایش ایمنی مواد غذایی انجام می‌شود (۵). عوامل خطرساز برای ایمنی غذا شامل عوامل فیزیکی (وجود مو، ضایعات حیوانات، تکه‌های رنگی، مواد چرب و کاغذ)، عوامل شیمیایی (فلزات سنگین، بقایای سموم دفع آفات، بقایای سموم کشاورزی، آنتی‌بیوتیک‌ها و آمین‌های بیوژنیک) و عوامل بیولوژیکی (انگلی، ویروس، باکتری‌ها و قارچ‌ها) است (۶). از بین عوامل ذکر شده گروه عوامل میکروبی به خصوص باکتری‌ها نقش اصلی در تهدید ایمنی مواد غذایی دارند، زیرا توانایی به خصوصی در ایجاد فساد و بروز اثرات بیماری‌زایی در میزبان دارند. از برخی باکتری‌های تهدیدکننده ایمنی غذایی می‌توان به گونه‌های *سالمونلا* (*Salmonella* spp)، *کامپیلوباکتر ژژونی* (*Campylobacter jejuni*)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus*)، گونه‌های *کلستریدیوم* (*Clostridium* spp)، *اشریشیا کلی* (*Escherichia coli*) و گونه های *لیستریا* (*Listeria* spp) اشاره کرد (۷, ۸).

مهار رشد میکروب‌های بیماری‌زا رویکرد اصلی برای حفظ ایمنی مواد غذایی و کنترل چنین بیماری‌هایی از طریق غذا است. در دهه‌های اخیر، روش‌های مختلفی همچون استفاده از عوامل فعال زیستی مشتق‌شده از پروبیوتیک‌ها برای جلوگیری از رشد میکروب‌های بیماری‌زا و متعاقبا افزایش ماندگاری مواد غذایی به‌ویژه در کشورهای در حال توسعه به عنوان استراتژی-های جدید در نظر گرفته می‌شوند (۹). پروبیوتیک‌ها به عنوان میکروارگانیسم‌های زنده و فعال تعریف می‌شوند که وقتی به مقدار کافی دریافت شوند، اثرات سلامت‌بخشی برای میزبان به همراه دارند. از مزایای سلامت‌بخشی پروبیوتیک‌ها می‌توان به تنظیم اختلالات گوارشی، تقویت عملکرد سیستم ایمنی روده، مهار واکنش‌های آلرژیک، محافظت از سیستم قلبی عروقی، اثرات ضد اکسایشی، ضد توموری و خاصیت هیپوکلسترولمی اشاره کرد (۱۰). همچنین، سلول‌های پروبیوتیک قادر به تولید مواد ضدمیکروبی مانند باکتریوسین‌ها، پراکسید هیدروژن و اسیدهای آلی (اسیدهای بوتیریک، لاکتیک و استیک) می‌باشند (۱۱). از جمله عوامل فعال زیستی

با منبع میکروبی می‌توان به ترکیبات پست‌بیوتیک اشاره نمود. این ترکیبات را می‌توان در سه جز اصلی سلول‌های میکروبی غیرفعال‌شده، بخش‌های عملکردی سلول و متابولیت‌های سلولی تعریف و تقسیم‌بندی نمود که اگر در مقدار کافی دریافت شوند، اثرات سلامت بخش از خود برجای می‌گذارند. پست‌بیوتیک‌ها علاوه بر داشتن ویژگی‌های تعدیل کنندگی سیستم ایمنی، خواص ضد التهابی، ضد اکسایشی، ضدچاقی، کاهندگی فشار خون، کاهندگی کلسترول سرم و خواص ضد سرطانی، دارای خواص فارماکوکنتیک مناسب مانند ساختار شیمیایی مشخص، نمایه ایمن و ماندگاری طولانی هستند (۱۲-۱۴). لذا با توجه به مستندات اشاره شده، می‌توان از پست‌بیوتیک‌ها به عنوان یک ترکیب ضدمیکروبی طبیعی و بالقوه برای جلوگیری از فساد مواد غذایی و ارتقا ایمنی در صنایع غذایی استفاده کرد (۱۵). از این‌رو در مطالعه حاضر نمایه ترکیبات شیمیایی فرار پست-بیوتیک‌های مشتق‌شده از *لاکتوباسیلوس کازئی* ATCC 39392 و مشخصات عملکردی آن‌ها تعیین شده و سپس فعالیت ضد میکروبی آن‌ها علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 29213 در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت.

• مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی و سویه‌های میکروبی

مطالعه حاضر در دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی در سال ۱۴۰۲ انجام شده است. محلول کوئرستین، معرف فولین-سیکالتو، محلول DPPH و محلول ABTS از شرکت سیگما (آمریکا)، محیط کشت MRS broth، Mueller Hinton agar و Tryptic Soy Broth از شرکت مرک (آلمان) و همچنین آنتی‌بیوتیک جنتامایسین از شرکت MAST انگلستان تهیه شد. سویه پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* (*Lactobacillus Casei*) ATCC 39392 و همچنین سویه پاتوژن *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus*) ATCC 29213 از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی تهیه گردید.

تهیه کشت باکتری پروبیوتیک

باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* لیوفلیزه در محیط MRS (De Man, Rogosa and Sharpe) broth به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تلقیح گردیده و برای حداقل دو مرتبه به طور متوالی تجدید کشت شد. مقدار یک میلی‌لیتر از استوک باکتری در دو میلی‌لیتر محیط کشت استریل تلقیح شد و به مدت یک شبانه روز در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرم-خانه‌گذاری شد. پس از رشد باکتری در محیط مایع، برای دستیابی به تک کلنی باکتریایی در کنار شعله و با استفاده از لوپ استریل از فالکون‌های حاوی باکتری کشت داده شده به روش کشت چهار مرحله‌ای به درون پلیت حاوی محیط کشت آگاردار، کشت داده شد و پلیت‌های کشت داده شده در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند. پس از پایان زمان گرم‌خانه‌گذاری، جهت اطمینان یک نمونه از کلنی‌ها از نظر ظاهری زیر میکروسکوپ بررسی شدند (۱۶).

تهیه پودر پست‌بیوتیک از سویه پروبیوتیک

به منظور تهیه پودر پست‌بیوتیک از *لاکتوباسیلوس کازئی*، کشت میکروارگانیسم‌ها از استوک‌های موجود در فریزر منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد در فالکون‌های استریل صورت گرفت. پس از یک شبانه روز، گرم‌خانه‌گذاری فالکون‌های حاوی *لاکتوباسیلوس کازئی* در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد صورت گرفته و محتویات فالکون‌ها به درون ارلن مایرهای ۲۵۰ سی‌سی حاوی محیط‌های کشت اختصاصی میکروارگانیسم‌ها که از قبل تهیه و استریل شده بودند، انتقال داده شدند. به منظور کسب مقادیر بالای پودر پست‌بیوتیک‌ها، محتویات ارلن‌ها به درون ارلن‌های ۲۰۰۰ سی‌سی حاوی محیط کشت اختصاصی *لاکتوباسیلوس کازئی*، منتقل شدند. پس از سپری شدن مدت زمان گرم‌خانه‌گذاری و رشد میکروارگانیسم‌ها به منظور رسوب سلول‌های باکتریایی، سانتریفیوژ در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد صورت گرفت. طی این مرحله محلول رویی کشت جداسازی شده و رسوب حاصله دو مرتبه با بافر فسفات ۰/۱ مولار و pH برابر ۶/۹ شستشو داده شد. رسوب به دست‌آمده به مدت یک شبانه روز در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. سپس باکتری‌ها از حالت انجماد خارج و یک میلی‌لیتر بافر لیزکننده به باکتری‌ها اضافه شد. عمل خرد کردن باکتری‌ها در کنار یخ، توسط دستگاه سونیکاتور (Tomy, Japan) با دامنه ۶۰ درصد به مدت دو دقیقه انجام گرفت. به منظور جلوگیری از بالا رفتن دمای محلول و پروب سونیکاتور، دستگاه به مدت چهار دقیقه خاموش گردید. در انتها نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی-گراد با دور سانتریفوژ (۱۵۰۰۰ دور در دقیقه) گردیدند. محلول رویی جدا شده و به مدت یک شبانه روز داخل دستگاه خشک‌کن انجمادی (Freeze drier, Christ, Germany) قرار داده شد تا خشک شوند. برای تهیه غلظت‌های مختلف از ترکیبات پست-بیوتیک مقادیر مورد نیاز وزن شده و جهت استریل کردن از فیلترهای سرسرنگی ۰/۲ و ۰/۴۵ میکرونی استفاده گردید (۱۷).

تعیین ترکیبات شیمیایی پست‌بیوتیک‌ها با کروماتوگرافی گازی کوپل‌شده با طیف‌سنج جرمی

جداسازی و تفکیک ترکیبات پست‌بیوتیک توسط روش کروماتوگرافی گازی با مشخصات گاز کروماتوگراف نوع شیمادزو (Shimadzu) مدل 9A، نوع ستون DB-5 به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت فاز ساکن ۰/۲۵ میکرون انجام پذیرفت. دمای اولیه ستون ۵۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت پنج دقیقه نگهداری شد و سپس افزایش دما تا ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد، به صورت افزایش‌های سه درجه سانتی‌گراد در دقیقه برنامه‌ریزی شد. تزریق و آشکارسازی هر دو در دمای ۲۹۰ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. گاز حامل ستون، گاز هلیم با سرعت خطی ۳۲ سانتی‌متر بر ثانیه بود (۱۶). شناسایی ترکیبات با روش کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی با مشخصات گاز کروماتوگراف متصل به طیف‌سنج جرمی واریان (Varian) مدل ۳۴۰۰ انجام شد. دمای اولیه ستون ۵۰ درجه سانتی‌گراد و دمای نهایی ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد با افزایش‌های سه درجه بر دقیقه و درجه حرارت محفظه تزریق نیز ۲۳۰ درجه سانتی‌گراد، گاز حامل هلیم با سرعت خطی ۳۱/۵ سانتی‌متر بر ثانیه بود. همچنین سرعت جریان ۱/۱ میلی‌متر بر دقیقه، انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت، زمان اسکن یک ثانیه و محدوده جرمی amu ۴۰-۳۵۰ قرار داده شد (۱۸). شناسایی ترکیبات تشکیل‌دهنده پست‌بیوتیک با استفاده از شاخص‌های زمان بازداری (Retention times) و بررسی طیف‌های جرمی ترکیبات و مقایسه آن‌ها با طیف‌های جرمی استاندارد موجود در کتابخانه‌های کامپیوتری و مراجع معتبر، صورت گرفت.

تعیین مقدار کل ترکیبات فنولی پست‌بیوتیک‌ها

برای اندازه‌گیری مقدار کل ترکیبات فنولی از روش Follin-Ciocalteu استفاده شد. بدین جهت مقدار ۰/۴گرم اسید گالیک خشک در۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد حل شده و سپس با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد و بدین ترتیب محلول مادر تهیه شد. برای رسم منحنی کالیبراسیون مقادیر ۰، ۱، ۲، ۳، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌لیتر از محلول مذکور به بالن‌های ژوژه ۱۰۰ میلی‌لیتری منتقل و هر یک با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. این محلول‌ها به ترتیب دارای غلظت‌های ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید گالیک بودند. در این آزمایش ۲۰ میکرولیتر از ترکیبات پست‌بیوتیک با ۲ میلی لیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر از معرف Follin-Ciocalteu مخلوط شدند. بعد از ۳ دقیقه، ۳۰۰ میکرولیتر از محلول هفت درصد کربنات سدیم به آن‌ها اضافه شد و محلول‌ها به مدت دو ساعت تکان داده شدند. نهایتا جذب محلول‌ها در ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد. مقدار کل ترکیبات فنولی پست‌بیوتیک‌ها با استفاده از منحنی استاندارد اسید گالیک محاسبه شد. پس از رسم منحنی کالیبراسیون اسید گالیک، معادله خطی منحنی تعیین می‌گردد که با قراردادن مقادیر جذب به دست آمده از ترکیبات پست-بیوتیک در این معادله می‌توان غلظت معادل اسید گالیک از پست‌بیوتیک‌ها را بدست آورد. غلظت در این مرحله بر حسب قسمت در میلیون (ppm) می‌باشد. پس از تبدیل ppm به میلی-گرم اسید گالیک، نتیجه نهایی بر حسب میلی‌گرم اسید گالیک بر گرم خشک پست‌بیوتیک‌ها گزارش می‌شود (۱۶, ۱۹).

تعیین فلاونوئید کل پست‌بیوتیک‌ها

بدین منظور یک میلی‌لیتر پست‌بیوتیک یا محلول کوئرستین با غلظت‌های ۰/۵ – ۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به ۰/۳ میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم (۱۰ درصد وزنی/حجمی) به نمونه‌ها اضافه و مخلوط به مدت ۶ دقیقه هم زده شد. پس از آن ۲ میلی‌لیتر سدیم هیدروکسید (۱ مولار) اضافه شد. در نهایت جذب محلول در طول موج ۵۱۰ نانومتر اندازه‌گیری و میزان فلاونوئید کل بر اساس میلی‌گرم کوئرستین در گرم پست-بیوتیک گزارش شد (۲۰).

تعیین فعالیت ضد اکسایشی پست‌بیوتیک‌ها

اندازه‌گیری فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

فعالیت ضد اکسایشی پست‌بیوتیک‌ها با استفاده از روش اندازه‌گیری کاهش ظرفیت رادیکالی (Radical Scavenging Capacity:RSC) به کمک ۲،۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) مورد ارزیابی قرار گرفت. DPPH ترکیبی است بنفش رنگ که به دلیل حضور گروه‌های فنیل در ساختار آن به راحتی به صورت رادیکال در آمده و در واقع منبع رادیکال آزاد می‌باشد. این ترکیب با گرفتن یک الکترون از ترکیب ضد اکسایشی، از رنگ بنفش به زرد تغییر رنگ می‌دهد. رادیکال‌های آزاد موجود در DPPH، در ۵۱۷ نانومتر جذب دارند که از قانون بیر لامبرت پیروی می‌کنند و کاهش جذب آن با میزان ماده ضد اکسایشی رابطه خطی دارد. هر چه بر مقدار ماده ضد اکسایشی افزوده شود، DPPH بیشتری مصرف شده و رنگ بنفش بیشتر به سمت زرد میل می‌کند. برای تعیین فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH، ۵۰ میکرولیتر پست‌بیوتیک یا کنترل با پنج میلی‌لیتر محلول DPPH اتانولی (۰/۱۲ میلی مولار) مخلوط شد. محلول حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و جذب آن (A) در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. سپس فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH به صورت زیر اندازه‌گیری شد (۲۱).

$$\text{درصد جذب رادیکال } DPPH = 100 \times (\text{جذب پست‌بیوتیک} - \text{جذب نمونه کنترل} / \text{جذب نمونه کنترل})$$

اندازه‌گیری فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS

رادیکال‌های کاتیونی ABTS با مخلوط کردن محلول هفت میلی‌مولار ABTS و محلول ۲/۴۵ میلی‌مولار پرسولفات سدیم در آب با نسبت ۱:۱ و نگهداری آن در مکانی تاریک به مدت ۱۶ ساعت تولید گردید. محلول تولیدی با استفاده از متانول تا رسیدن به جذب ۰/۷ در طول موج ۷۳۴ نانومتر رقیق شد. پس از آن ۳/۹ میلی‌لیتر محلول رقیق شده رادیکال‌های کاتیونی ABTS با ۰/۱ میلی‌لیتر پست‌بیوتیک مخلوط شد. در پایان جذب نمونه در طول موج ۷۳۴ نانومتر پس از گذشت شش دقیقه در دمای اتاق خوانده شد. میزان فعالیت مهار کنندگی رادیکال ABTS با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (۲۲).

$$\text{درصد جذب رادیکال } ABTS = 100 \times (\text{جذب پست‌بیوتیک} - \text{جذب نمونه کنترل} / \text{جذب نمونه کنترل})$$

روش رنگ‌بری بتاکاروتن – لینولئیک اسید β-Carotene/Linoleic acid bleaching)

قدرت ضد اکسایشی ترکیبات پست‌بیوتیک طی این آزمون با ثبت تغییرات رنگ بتاکاروتن توسط دستگاه اسپکتوفتومتر طی گذشت زمان تعیین شد. بدین ترتیب هرچه قدرت ضد اکسایشی ترکیبات پست‌بیوتیک بیشتر باشد سرعت تغییر رنگ بتاکاروتن در اثر واکنش با رادیکال‌های آزاد کاهش می‌یابد (۲۳).

تعیین فعالیت ضد میکروبی پست‌بیوتیک‌ها

تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد (Minimum inhibitory concentration)

برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) از روش میکرودایلوشن (Broth Micro Dilution) استفاده گردید. برای آزمایش MIC از میکروپلیت ۹۶ چاهکی استریل درب‌دار استفاده شد. این میکروپلیت‌ها دارای هشت ردیف ۱۲ چاهکی به حجم ۲۵۰ میکرولیتر هستند. ابتدا از محیط کشت TSB (Tryptic Soy Broth) به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به داخل چاهک‌ها ریخته شد و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از ترکیبات پست-بیوتیک در غلظت‌های مختلف (۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به همراه حلال دی متیل سولفاکساید (DMSO) Dimethyl sulfoxide)) به چاهک‌ها تلقیح شد. در ادامه ۱۰ میکرولیتر از محیط کشت حاوی باکتری معادل با نیم مک فارلند به تمام چاهک‌ها اضافه شد. چاهک یازدهم به عنوان کنترل منفی (فاقد باکتری) و چاهک دوازدهم به عنوان کنترل مثبت (فقط حاوی باکتری) در نظر گرفته شد. پس از تلقیح باکتری‌ها، میکروپلیت به مدت ۲۴ ثانیه بر روی شیکر قرار گرفت تا به طور یکنواخت مخلوط گردد. سپس جذب نوری با استفاده از دستگاه الایزا ریدر در ساعت صفر و با طول موج ۶۳۰ نانومتر خوانده شد. در مرحله آخر میکروپلیت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. بعد از اتمام گرم‌خانه‌گذاری، دوباره کدورت یا عدم کدورت در چاهک‌ها، هم به صورت چشمی و هم توسط جذب نوری توسط الایزا ریدر خوانده شد و کمترین غلظتی که کدورتی در آن مشاهده نشد به عنوان MIC منظور گردید. همچنین بررسی عدم تأثیر پذیری مهار رشد باکتری‌ها به واسطه حلال DMSO نیز مشابه روش ذکر شده انجام گرفت (۲۴).

تعیین حداقل غلظت باکتری‌کشی (Minimum bactericidal concentration)

برای اندازه‌گیری MBC از چاهک‌های فاقد کدورت (MIC و بیشتر از آن) مقدار ۱۰ میکرولیتر در شرایط استریل و در نزدیکی شعله برداشته شد و بر روی محیط مولر هینتون آگار تلقیح و کشت داده شد. پس از انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، پلیتی که هیچ باکتری در آن رشد نکرد به عنوان MBC در نظر گرفته شد. کلیه آزمایشات با سه تکرار انجام شدند (۲۴).

اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد به روش انتشار در چاهک (Agar well diffusion)

به منظور سنجش خاصیت ضد باکتریایی ترکیبات پست-بیوتیک، روش انتشار در چاهک و اندازه‌گیری هاله عدم رشد انجام شد. بدین منظور پس از تهیه سوسپانسیون باکتریایی *استافیلوکوکوس اورئوس* معادل نیم مک فارلند ($۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ CFU) با استفاده از سمپلر به میزان ۲۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون بر روی محیط کشت اختصاصی مولر هینتون آگار (Mueller-Hinton agar) تلقیح شد و سپس به وسیله پیپت پاستور خم شده به صورت چمنی کشت داده شد. سپس چاهک‌هایی روی محیط‌های کشت به قطر چهار میلی‌متر با استفاده از پیپت شماره پنج و عمق چهار میلی‌متر حفر گردید. برای تعیین قطر هاله عدم رشد ۱۰۰ میکرولیتر از ترکیب پست-بیوتیک در غلظت‌های مختلف (۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در چاهک‌های تعبیه شده تلقیح گردید و سپس گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انجام شد. همچنین در این آزمون از آنتی‌بیوتیک جنتامایسین و ترکیب DMSO (چهار درصد) به ترتیب به عنوان کنترل مثبت و منفی استفاده گردید. پس از گذشت این مدت

زمان هاله منطقه مهار رشد به وسیله کولیس اندازه گیری شد و قطر چاهک از آن کسر شد. آزمایش در سه تکرار انجام گرفت و قطر هاله‌های به دست آمده ثبت گردید (۱۶).

تعیین سمیت سلولی بالقوه ترکیبات پست‌بیوتیک

تست MTT یک آزمون سنجش میزان زنده‌مانی سلول‌ها بر پایه رنگ‌سنجی است و اساس آن احیای نمک تترازولیوم توسط NADPH یا NADH تولیدی توسط آنزیم‌های دهیدروژناز سلول های زنده به فورمازان می‌باشد. سلول‌های مرده توانایی تبدیل MTT (۳'-(۴و۵ دی متیل تیازول-۲ایل)-۲و۵ دی فنیل تترازولیوم برماید) به فورمازان را از دست داده‌اند بنابراین، رنگ ارغوانی به عنوان یک نشان‌گر مناسب برای تعداد سلول‌های زنده عمل می‌کند. میزان رنگ تولید شده با تعداد سلول‌هایی که از نظر متابولیک فعال هستند، رابطه مستقیم دارد. جهت انجام این تست، ابتدا سلول‌های رده نرمال KDR از کف فلاسک با اضافه کردن آنزیم تریپسین جدا شده و سپس شمارش سلولی صورت گرفت. رده‌های سلولی نرمال با دانسیته سلولی ۲×۱۰^{۴} به داخل هر چاهک میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای انتقال یافت و در شرایط رشد سلولی (۹۵ درصد رطوبت، پنج درصد CO_2 و و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) به مدت یک شبانه روز گرم‌خانه-گذاری شدند تا سلول‌ها به سطح چاهک‌ها بچسبند. پس از سپری شدن مدت زمان گرم‌خانه‌گذاری، جهت تعیین IC_{50} (غلظتی از پست‌بیوتیک که سبب کاهش ۵۰ درصد رشد سلول-های تیمار شده نسبت به سلول‌های تیمار نشده می‌گردد)، سلول‌ها با غلظت‌های مختلف ترکیبات پست‌بیوتیک (۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۲۰ و ۱۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تیمار شده و مجددا به مدت ۴۸-۲۴ ساعت (در شرایطی که قبلا ذکر شد)، گرم‌خانه‌گذاری شدند. سپس مقدار ۲۰ میکرولیتر از محلول MTT به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت اضافه شد. پلیت‌ها به مدت ۴-۱ ساعت در تاریکی و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند. پس از اتمام زمان انکوباسیون، جذب نوری پلیت‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از الایزا میکروپلیت ریدر (Biotek, USA) خوانده شد. برای هر نمونه سه تکرار گذاشته شد. همچنین در این تست از سلول‌های تیمار نشده به عنوان کنترل منفی استفاده شد (۱۲).

تجزیه و تحلیل آماری

جهت آنالیز آماری داده‌ها از نرم افزار GraphPad Prism 5 استفاده شد. در ابتدا با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوو، نرمال بودن توزیع داده‌ها بررسی شد و برای مقایسه میانگین داده‌ها بین گروه‌های مختلف از تحلیل واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) و آزمون تعقیبی TUKEY استفاده گردید. P value کمتر از ۰/۰۵ نیز از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

• یافته‌ها

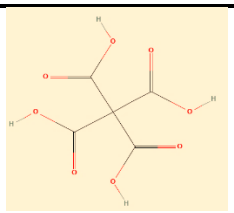
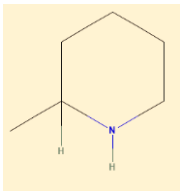
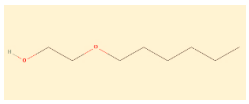
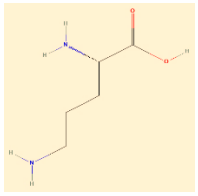
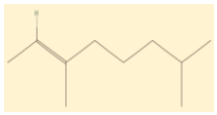
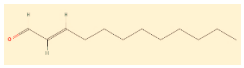
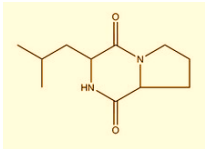
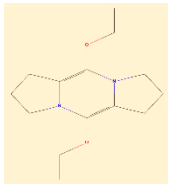
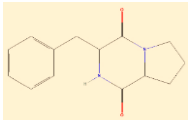
نمایه ترکیبات شیمیایی پست‌بیوتیک‌ها

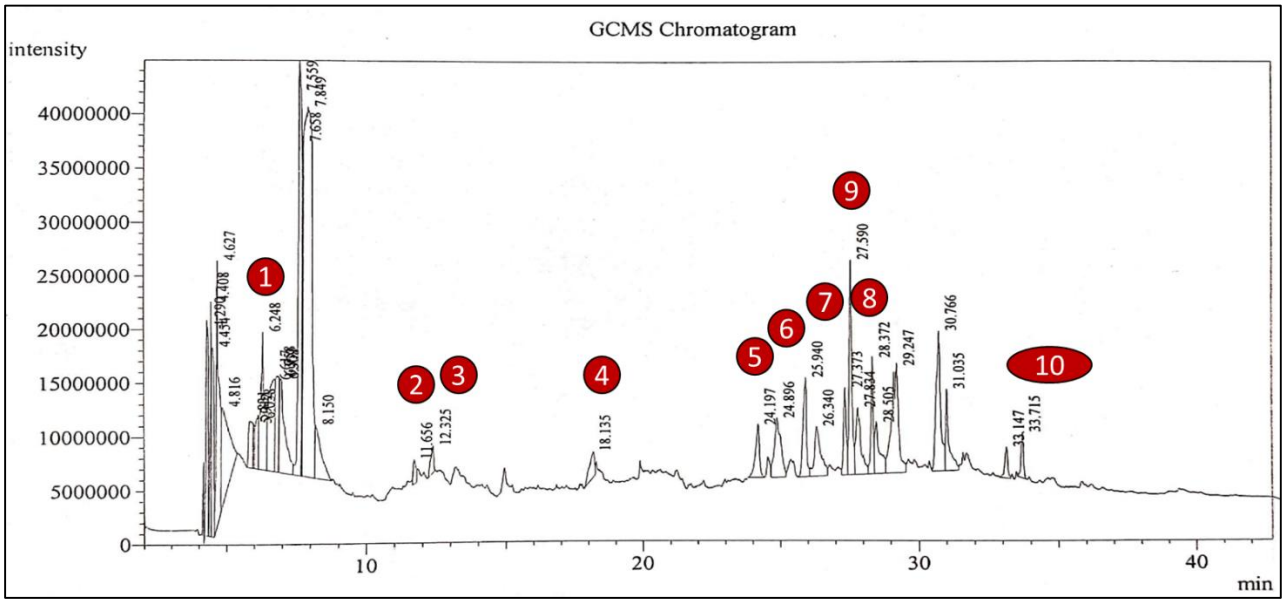
یافته‌های حاصل از شناسایی ترکیبات شیمیایی موجود در محلول خام (بدون اعمال فرآیندهای حرارتی و فیزیکوشیمیایی) پست‌بیوتیک‌ها با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنجی جرمی (GC-MS) در شکل ۱ و جدول ۱ آورده شده است. در این مطالعه به طور کلی ۳۴ ترکیب شناسایی شدند و از بین آن‌ها ۱۰ ترکیب با فعالیت چشم‌گیر ضد میکروبی مشخص گردیدند. عمده‌ترین ترکیب موثر موجود در محلول پست‌بیوتیک Diethoxy-2,3,7,8-tetrahydro-1H,6H-۵،۱۰-dipyrrolo[1,2-a:1',2'-d]pyrazine به میزان ۳۱/۳۶ درصد بود. از سایر ترکیبات موجود می‌توان به ترتیب درصد به Diethoxy-2,3,7,8-tetrahydro-1H,6H-dipyrrolo[1,2-۵،۱۰-a:1',2'-d]pyrazine (۳۱/۳۶ درصد)، ۱-Undecene (۱۵/۶۵ درصد)، 1, 4-diaza-2, 5-dioxo-3-isobutyl bicyclo[4.3.0]nonane (۱۴/۳۲ درصد)، 2-Octene, 3,7-dimethyl-, (Z) (۱۲/۲۵ درصد)، Methanetetracarboxylic acid (۱۲/۱۵ درصد)، ۲-Methylpiperidine (۸/۶ درصد)، (S)-2,5-Diaminopentanoic acid (۵/۹ درصد)، ۲-Dodecenal (۴/۵ درصد)، 2-(Hexyloxy)ethanol (۴/۳ درصد) و Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(phenylmethyl)- (۲/۳ درصد) اشاره نمود.

مقدار کل ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی پست‌بیوتیک‌ها

ترکیبات پست‌بیوتیک مورد بررسی در این مطالعه دارای غلظت بالایی از اجزای فنولی (۲۴ ± ۹۶/۲۳ میلی‌گرم اسید گالیک در گرم پست‌بیوتیک) و فلاونوئیدی (۳۵ ± ۲۰/۳۳ میلی‌گرم کوئرستین در گرم پست‌بیوتیک) بودند ($P < ۰/۰۵$). قابل تامل است که محتوا و کیفیت محلول نهایی پست‌بیوتیک سنتز شده تحت تأثیر شرایط رشد، روش استخراج و نگهداری اولیه است. با در نظر گرفتن تمام عوامل موثر، ترکیبات پست-بیوتیک مورد بررسی شامل مقدار چشم‌گیری از مواد فنولی و فلاونوئیدی بودند. قابل ذکر است که همواره بین حضور این ترکیبات و بروز اثرات آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی همبستگی قوی و مثبتی وجود دارد (۲۵).

جدول ۱. شناسایی متابولیت‌های فعال زیستی منتخب موجود در ترکیبات پست‌بیوتیک خام *لاکتوباسیلوس کازئی* ATCC 39392 توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی

ردیف	ترکیب شناسایی شده	فرمول مولکولی	ساختاردو بعدی	وزن مولکولی (g/mol)	زمان بازداری (دقیقه)	٪
۱	Methanetetracarboxylic acid	$C_5H_4O_8$		۱۹۲/۰۸	۶/۲۵۰	۱۲/۱۵
۲	۲-Methylpiperidine	$C_6H_{13}N$		۹۹/۱۷	۱۱/۵۶۸	۸/۶
۳	۲-(-Hexyloxy)ethanol	$C_6H_{13}OCH_2CH_2OH$		۱۴۶/۲۳	۱۲/۳۲۵	۴/۳
۴	(S)-2,5-Diaminopentanoic acid	$C_5H_{12}N_2O_2$		۱۳۲/۱۶	۱۸/۱۳۳	۵/۹
۵	2-Octene, 3,7-dimethyl-, (Z)-	$C_{10}H_{20}$		۱۴۰/۲۷	۲۴/۲۰۰	۱۲/۲۵
۶	1-Undecene	$C_{11}H_{22}$		۱۵۴/۲۹	۲۴/۹۰۰	۱۵/۶۵
۷	2-Dodecenal	$C_{12}H_{22}O$		۱۸۲/۳۰	۲۶/۳۴۲	۴/۵
۸	1, 4-diaza-2, 5-dioxo-3-isobutyl bicyclo[4.3.0]nonane	$C_{11}H_{18}N_2O_2$		۲۱۰	۲۷/۳۷۵	۱۴/۳۲
۹	5,10-Diethoxy-2,3,7,8-tetrahydro-1H,6H-dipyrrolo[1,2-a:1',2'-d]pyrazine	$C_{14}H_{22}N_2O_2$		۲۵۰/۳۴	۲۷/۵۹۲	۳۱/۳۶
۱۰	Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(phenylmethyl)-	$C_{14}H_{16}N_2O_2$		۲۴۴/۲۹	۳۳/۷۱۷	۲/۳



شکل ۱. کروماتوگرام متابولیت‌های فعال زیستی مشتق‌شده از *لاکتوباسیلوس کازئی* ATCC 39392

اعداد مربوط به متابولیت‌هایی با فعالیت شناخته‌شده ضدمیکروبی می‌باشد.

فعالیت ضد اکسایشی پست‌بیوتیک‌ها

با توجه به این‌که ترکیبات زیست فعال میکروبی دارای فعالیت واکنش‌پذیری پیچیده‌ای می‌باشند، لذا استفاده از حداقل دو روش بررسی ضد اکسایشی جهت تأیید و تعیین فعالیت ضد اکسایشی آن‌ها توصیه می‌شود (۲۶). از این‌رو در مطالعه حاضر خاصیت ضد اکسایشی ترکیبات پست‌بیوتیک به سه روش اندازه‌گیری مهار رادیکال آزاد DPPH، مهار رادیکال آزاد ABTS و رنگ‌بری بتاکاروتن-لینولئیک اسید مورد ارزیابی قرار گرفت که به ترتیب برابر با ۱۲ ± ۶۸/۳۲ درصد، ۴۷ ± ۷۳/۴۵ درصد و ۳۶ ± ۶۱/۷۶ درصد بود ($P < ۰/۰۵$) (شکل ۲).

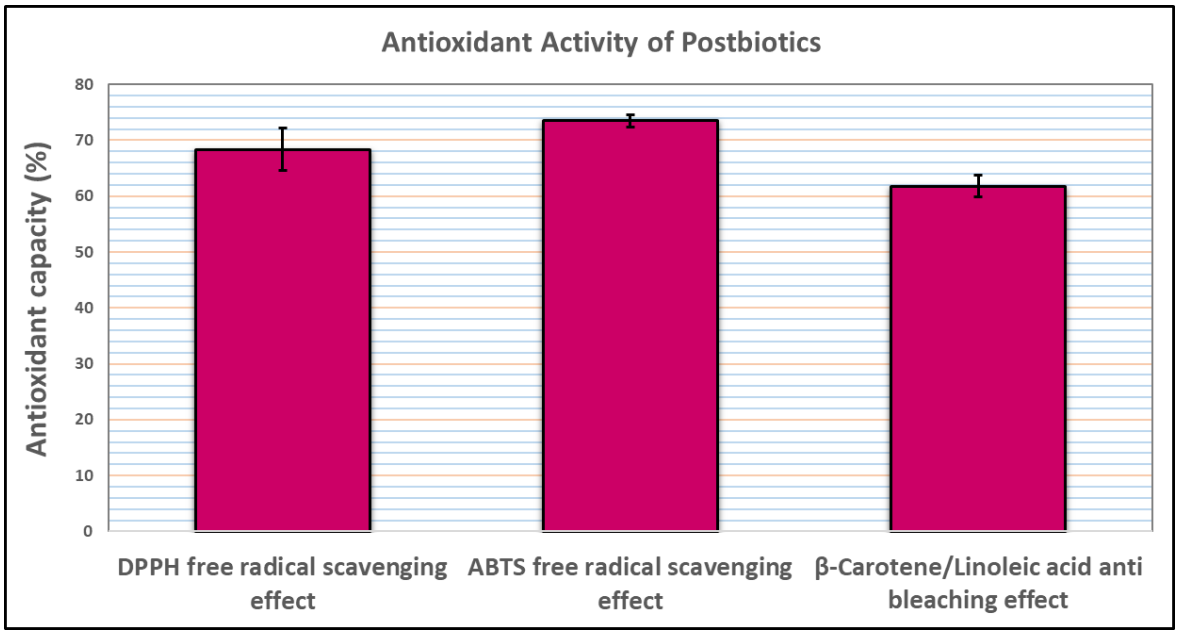
فعالیت ضد میکروبی پست‌بیوتیک‌ها

حداقل غلظت بازدارنده رشد و باکتری‌کشی

بر اساس نتایج به‌دست آمده از روش میکرودایلوشن غلظت‌های ۴۰ و ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب به عنوان حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) و حداقل غلظت باکتری کشی (MBC) در نظر گرفته شدند ($P < ۰/۰۵$). همچنین در چاهک کنترل مثبت که حاوی محیط کشت و باکتری بود، رشد دیده شد، اما در چاهک کنترل منفی که محتوی محیط کشت و پست‌بیوتیک بود کدورتی مشاهده نشد. همچنین در غلظت‌های به‌کاربرده شده برای DMSO در تمام چاهک‌ها کدورت دیده شد که نشان دهنده بی‌تأثیر بودن حلال ترکیبات پست‌بیوتیک در مهار رشد باکتری است.

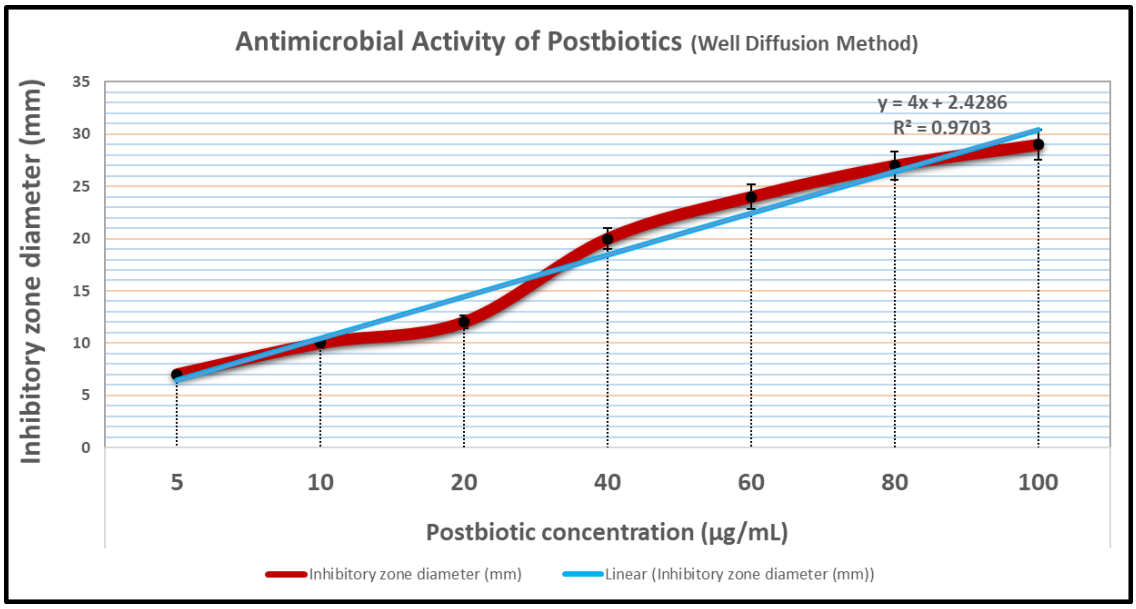
قطر هاله عدم رشد به روش انتشار در چاهک

نتایج حاصل از اثر ۱۰۰ میکرولیتر از ترکیب پست‌بیوتیک در غلظت‌های مختلف بر میانگین هاله‌های عدم رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* حاکی از فعالیت ضد میکروبی وابسته به غلظت ترکیبات پست‌بیوتیک می‌باشد به طوری که کمترین و بیشترین هاله عدم رشد به ترتیب با قطر ۲۳ ± ۷ و ۶۵ ± ۲۹ میلی‌متر مربوط به غلظت‌های ۵ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد ($P < ۰/۰۵$). با توجه به شکل ۳ می‌توان اذعان نمود که رفتار ضد میکروبی ترکیبات پست‌بیوتیک در ایجاد هاله عدم رشد از روند ایجاد شده در آزمون بررسی حداقل غلظت بازدارنده رشد پیروی کرده و تأثیر معنی‌داری با رسیدن به غلظت MIC از خود نشان می‌دهد و با افزایش غلظت تأثیر ضد میکروبی خود را به صورت خطی حفظ می‌کند. همچنین *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به کنترل مثبت آنتی‌بیوتیک جنتامایسین از خود حساسیت نشان داده و چاهک حاوی کنترل منفی DMSO تأثیر معنی‌داری در رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* ایجاد نکرد. فعالیت ضد میکروبی ترکیبات پست‌بیوتیک در مطالعات مختلف نیز بررسی شده و نتایج حاکی از تأثیر معنی‌دار این ترکیبات بر طیف وسیع باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و همچنین کپک‌ها و گاها ویروس‌ها می‌باشد (۲۷-۲۹).



شکل ۲. فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیبات پست‌بیوتیک مشتق‌شده از *لاکتوباسیلوس کازئی* ATCC 39392.

نمودارها مربوط به بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی پست‌بیوتیک‌ها با سه روش متفاوت می‌باشد.

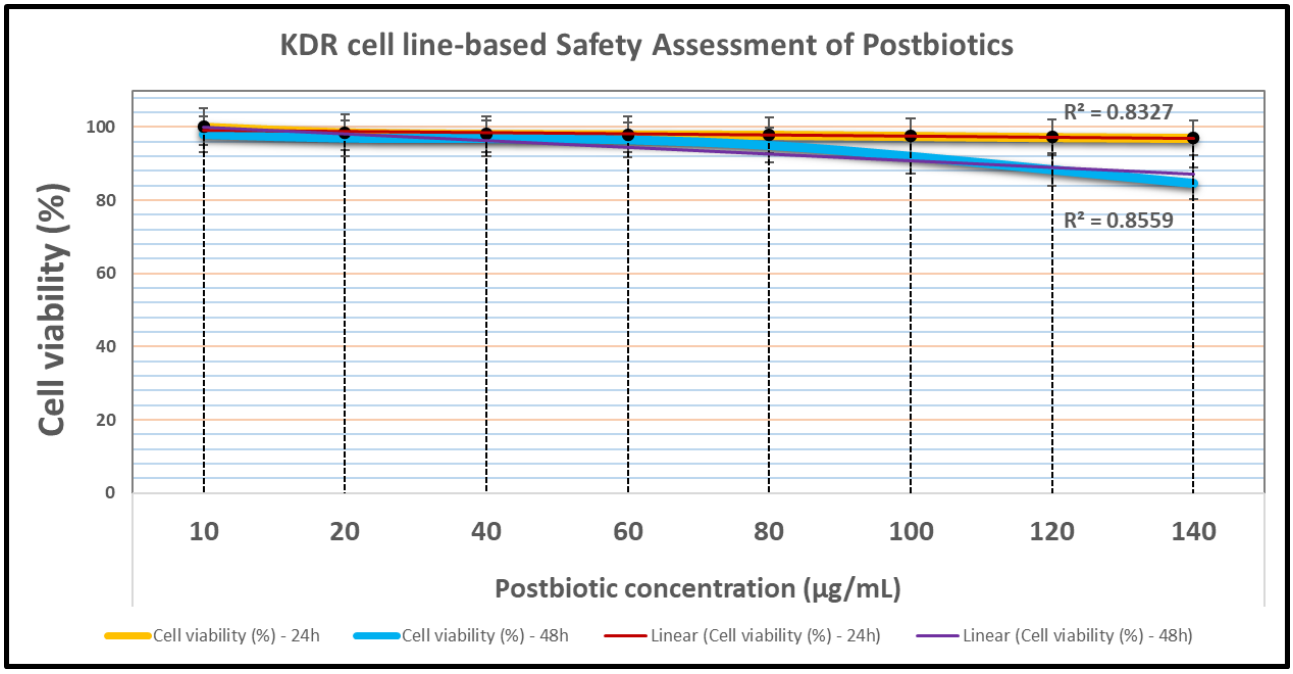


شکل ۳. فعالیت ضدمیکروبی ترکیبات پست‌بیوتیک مشتق‌شده از *لاکتوباسیلوس کازئی* ATCC 39392.

ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی بر اساس غلظت‌های مختلف ترکیبات پست‌بیوتیک به روش انتشار در چاهک می‌باشد.

نمایه ایمنی ترکیبات پست‌بیوتیک

از جمله ارزیابی‌های کلیدی در بررسی مشخصات ایمنی و تعیین میزان سازگارپذیری جزء پست‌بیوتیک سنتزی با شرایط فیزیولوژیکی بدن، بررسی نمایه ایمنی آن در سطح رده‌های سلولی نرمال می‌باشد. از این‌رو در این مطالعه ترکیبات پست-بیوتیک در غلظت‌های مختلف عملکردی مورد بررسی در سطوح سلولی رده نرمال KDR (دارای منشا جنینی مشترک با سلول‌های اپی‌تلیال دستگاه گوارش) به مدت ۴۸ – ۲۴ ساعت تیمار شده و نتایج حاصل از تأثیرپذیری روند زنده‌مانی سلول‌های نرمال از حضور ترکیبات پست‌بیوتیک در شکل ۴ نشان داده شده است.



شکل ۴. ارزیابی نمایه ایمنی ترکیبات پست‌بیوتیک مشتق‌شده از *لاکتوباسیلوس کازئی* ATCC 39392 ارزیابی نمایه ایمنی غلظت‌های مختلف ترکیبات پست‌بیوتیک به روش تست MTT در رده سلولی نرمال KDR.

• بحث

نمایه ترکیبات شیمیایی پست‌بیوتیک‌ها

کروماتوگرافی گازی رایج ترین ابزار تحلیلی مورد استفاده برای تجزیه و تحلیل کیفی و کمی اسیدهای چرب آزاد، ترکیبات فرار (دی استیل، استوئین و دی متیل سولفون، ۲-بوتانون) و اسیدهای آلی در محلول تهیه‌شده از پست‌بیوتیک‌ها می‌باشد. در مطالعه Yeon و همکاران (۲۰۱۲) تجزیه و تحلیل پروفایل اسیدهای آلی در محیط کشت *لاکتوباسیلوس پنتوسوس* و *پدیدوکوکوس لولی* توسط کروماتوگرافی گازی کوپل‌شده به طیف‌سنجی جرمی صورت گرفت و ۱۲ جزء اسید آلی با این روش شناسایی شدند (۳۰). با این حال، بسته به نوع نمونه و تکنیک تشخیص، معمولا قبل از مراحل تزریق و جداسازی به مراحل اضافی نیاز است. به عنوان مثال در مطالعه‌ای جهت تعیین پروفایل شیمیایی ترکیبات فرار پست‌بیوتیک مشتق‌شده از *لاکتوباسیلوس کازئی* از تکنیک میکرواستخراج فاز جامد (HS-SPME) استفاده شد و در نهایت ۶۲ ترکیب از جمله الکل‌ها، ترپن‌ها، اسیدها، کتون‌ها و استرها را در محلول پست-بیوتیک تأیید کردند (۳۱). در مطالعه دیگری، دستگاه کروماتوگرافی گازی مجهز به آشکارساز یونیزاسیون شعله‌ای (GC-FID) جهت بررسی محتوای اسید چرب کوتاه زنجیر در محلول پست‌بیوتیک حاصل از چهار سویه *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس*، *اشریشیا کلی* و *انتروکوکوس فکالیس* مورد استفاده قرار گرفت (۳۲). همچنین اسیدهای چرب و ترکیبات فرار تولید شده توسط *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* با فعالیت ضد قارچی بالقوه به ترتیب با استفاده از روش‌های GC-FID و GC-MS مورد ارزیابی قرار گرفت (۳۳). قابل تامل است که جهت بررسی پروفایل کلی ترکیبات شیمیایی پست‌بیوتیک‌ها بایستی از سایر تکنیک‌ها همچون کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)، تجزیه و تحلیل مبتنی بر اسپکتروفتومتری، طیف سنجی رزونانس مغناطیسی هسته‌ای (NMR) و طیف‌سنجی تبدیل فوریه فروسرخ (FTIR) بهره گرفت که البته بسته به نوع پست‌بیوتیک، روش استخراج و هدف مطالعه (ایجاد اثر زیستی مشخص) دامنه استفاده از هر کدام مشخص شده و گاها به شکل ترکیبی و مکمل هم استفاده می‌شوند (۱۶).

مقدار کل ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی پست‌بیوتیک‌ها

در رابطه با محتوای ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی، مولسکا و همکارانش (۲۰۲۲)، غلظت ترکیبات فنولی و تأثیر آن‌ها بر فعالیت‌های ضد التهابی و مهار رادیکال‌های آزاد را در جوانه‌های گندم سیاه بررسی کردند. در این مطالعه اصلاح بذر گندم سیاه توسط مخمر *ساکارومایسس بولاردی* صورت گرفت. جوانه گندم سیاه تغییر یافته دارای محتوای فنولی کل بیشتری (۱۵۲۶ میکروگرم در گرم وزن خشک) نسبت به دانه‌ها (۶۷۲ میکروگرم در گرم وزن خشک) و گروه کنترل (۹۵۱ میکروگرم در گرم وزن خشک) بود. محققان اذعان نمودند که افزودن مخمر پروبیوتیک به جوانه‌ها علاوه بر تقویت فعالیت ضد التهابی و ضد

اکسایشی، محتوای تغذیه‌ای آن‌ها را نیز افزایش داد (۳۴). علاوه بر این، وانگ و همکارانش (۲۰۲۲)، از سه باکتری اسید لاکتیک تجاری (*لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ۹۰، *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* ۷۶ و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ۸۵) برای بررسی تأثیرات روی ترکیبات فنولی، پتانسیل ضد اکسایشی و مواد فرار طعمی نوشیدنی کیوی تهیه شده از دو رقم Actinidia chinensis cv. Hongyang و Actinidia deliciosa cv. Xuxiang استفاده کردند. نتایج نشان داد که *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* ۷۶ به طور قابل توجهی مقدار کل ترکیبات فنولی را در نمونه‌های Hongyangو Xuxiang افزایش می‌دهد. علاوه بر این، غلظت اسید پروتوکاتچوئیک و کاتچین (دو ماده شیمیایی گیاهی تازه تولید شده در آب کیوی تخمیری) به طور معنی‌داری با قابلیت‌های ضد اکسایشی مبتنی بر تکنیک‌های DPPH، ABTS و FRAP مرتبط بود و به طور قابل‌توجهی افزایش یافت ($P < ۰/۰۵$) (۳۵). در این راستا حسینی و همکاران (۲۰۲۳) به بررسی فعالیت‌های زیستی پست‌بیوتیک‌های مشتق شده از مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* PTCC 5269 در شرایط برون-تنی (*In-vitro*) پرداختند. بر اساس نتایج حاصله، پست‌بیوتیک-های سنتز شده از منبع مخمری دارای سطوح بالایی از محتوای فنولی (۰/۲۵ ± ۱۰۲/۴۶ میلی‌گرم اسید گالیک در گرم پست-بیوتیک) و فلاونوئیدی (۷۵/۳۲ ± ۱۹/۸۷ میلی‌گرم کوئرستین در گرم پست‌بیوتیک) بودند. در این مطالعه نیز بین محتوای ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی و همچنین بروز اثرات ضد اکسایشی پست‌بیوتیک‌های سنتزی همبستگی مثبت و معنی-داری مشاهده شد (۲۴). از این رو، می‌توان بیان کرد که مخمرها و باکتری‌های پروبیوتیک و متابولیت‌های پست‌بیوتیک آن‌ها دارای سطح قابل توجهی از ترکیبات فنولی هستند که به طور مستقیم بر فعالیت‌های ضد اکسایشی آن‌ها و همچنین ماتریکس غذایی حامل آن‌ها تأثیر می‌گذارد که می‌تواند بیانگر اهمیت غنی‌سازی ماتریکس‌های غذایی توسط ترکیبات پست‌بیوتیک باشد.

فعالیت ضد اکسایشی پست‌بیوتیک‌ها

مطالعات مختلفی فعالیت ضد اکسایشی پست‌بیوتیک‌ها از منابع باکتریایی و مخمری پروبیوتیک را گزارش نموده‌اند که با روش‌های مختلفی بررسی شده‌اند (۳۶-۳۸). قابل تامل است که حضور ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و ترکیب شیمیایی اولیه محلول پست‌بیوتیک و همچنین موقعیت و ترکیب گروهای هیدروکسیلی و وجود گروه‌های عاملی کتونی نیز می‌توانند بر بروز خاصیت ضد اکسایشی نقش داشته باشند (۲۴, ۳۹). ترکیبات فنولی قادر به اهدای اتم هیدروژن به رادیکال‌های آزاد هستند و بنابراین واکنش زنجیره‌ای مرحله انتشار را در طی فرآیند اکسیداسیون متوقف می‌کنند . در نتیجه، می‌توان اذعان نمود که ترکیبات پست‌بیوتیک با توجه به نمایه ایمنی خاص خود و همچنین بروز فعالیت معنی‌داری ضد اکسایشی که در ارتباط مستقیم با محتوای چشم‌گیر ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی می‌باشد ممکن است برای به تعویق انداختن یا مسدود کردن واکنش‌های رادیکال آزاد و اختلالات اکسیداتیو مرتبط در شرایط برون‌تنی و درون‌تنی (*In-vivo*) به کار گرفته شوند.

فعالیت ضد میکروبی پست‌بیوتیک‌ها

در ارتباط با فعالیت ضد میکروبی پست‌بیوتیک‌ها، می‌توان به مطالعه Nataraj و همکاران (۲۰۲۱) اشاره کرد که با هدف استخراج و شناسایی پست‌بیوتیک‌ها از منابع باکتریایی پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* NCFM و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* GG انجام شد. تجزیه و تحلیل نتایج کروماتوگرافی گازی کوپل‌شده با طیف‌سنجی جرمی، اسید هگزادکانوئیک، اسید ۹-اکتادسنوئیک و متیل استئارات را به عنوان اسیدهای چرب اصلی مشخص نمود. طبق نتایج، کمترین و بیشترین هاله عدم رشد به ترتیب با قطر ۰۰ ± ۱۱ و ۰۰ ± ۳۴ میلی‌متر مربوط به غلظت‌های ۱۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود ($P < ۰/۰۵$). یافته‌های ارزیابی فعالیت ضد میکروبی پست‌بیوتیک‌های سنتزی در این مطالعه علیه ایزوله-های *استافیلوکوکوس* مقاوم و حساس به پنی‌سیلین نشان داد که این اثر وابسته به غلظت می‌باشد (۴۰) و نتایج مطالعه ما نیز در همین راستا می‌باشد. در مطالعه دیگر، حسینی و همکاران (۲۰۲۳) به بررسی فعالیت‌های زیستی بالقوه پست‌بیوتیک‌های مشتق شده از مخمر پروبیوتیک *ساکارومایسس سرویزیه* در شرایط آزمایشگاهی پرداختند. فعالیت ضد میکروبی پست-بیوتیک‌ها در این مطالعه با استفاده از سنجش‌های ضد میکروبی انتشار در دیسک، انتشار در چاهک، حداقل غلظت بازدارنده رشد و حداقل غلظت باکتری‌کشی در برابر برخی از گونه‌های باکتریایی فساد و بیماری‌زا مورد بررسی قرار گرفت. طبق نتایج به دست‌آمده در این مطالعه نوع گونه‌های مخمر بر فعالیت ضد باکتریایی پست‌بیوتیک‌های مشتق‌شده تأثیر می‌گذارد و متابولیت‌های میکروبی بر باکتری‌های گرم مثبت غالبا تأثیر بیشتری نسبت به باکتری‌های گرم منفی نشان دادند. برای باکتری‌های گرم مثبت، میانگین ناحیه مهار به ترتیب ۱۹/۶۱و ۲۳/۲۴ میلی‌متر در آزمون‌های انتشار در دیسک و چاهک بود. در حالی که میانگین مناطق بازدارندگی برای باکتری‌های گرم منفی به ترتیب ۱۰/۹۰ و ۱۵/۱۶ میلی‌متر بود. یافته‌های مشابهی از آزمون‌های حداقل غلظت بازدارنده رشد و باکتری-کشی به دست آمد و مقدار پست‌بیوتیک کمتری برای از بین

بردن یا محدود کردن رشد باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی مورد نیاز بود (۲۴). *استافیلوکوکوس اورئوس* از جمله باکتری‌های فرصت طلب بوده که شیوع فراوان آن در محیط و مقاومت بالای آن در سطوح خشک شده سبب شده است تا به عنوان یک معیار آلودگی در صنعت غذا محسوب شود. در حال حاضر رویکرد استفاده از ترکیبات پست‌بیوتیک جهت مقابله با رشد و تولید بیوفیم این باکتری در مطالعات مختلفی مطرح شده و نتایج آن‌ها حاکی از موفقیت آمیز بودن سنتز پست‌بیوتیک‌های موثر در مهار فنوتیپی و ژنوتیپی عوامل حدت *استافیلوکوکوس اورئوس* تحت شرایط برون‌زی و درون‌زی می‌باشد. لذا می‌توان این ترکیبات را به عنوان ابزاری امیدوارکننده جهت محدود نمودن رشد و تکثیر اجرام میکروبی در ماتریکس‌ها و مقیاس‌های مختلف صنعت غذایی معرفی نمود. با این حال، جهت حصول بالاترین میزان تولید پست‌بیوتیک‌های موثر و همچنین بروز اثر هدف‌دار ضد میکروبی به شکل طیف محدود یا وسیع، مطالعات بیشتری نیاز می‌باشد که با اتکا به مفاهیم بیولوژی میکروبی در پاسخ پذیری از محرک‌های محیطی، بهره‌گیری از تکنیک‌های دستورزی ژنوم، طراحی و گزینش سامانه‌های حامل زیستی و نهایتا سازگار پذیری جزء سنتزی با شرایط فیزیولوژیک بدن میزبان می‌توان به این اهداف رسید.

نمایه ایمنی ترکیبات پست‌بیوتیک

با توجه به رفتار حفظ زنده‌مانی سلول‌های رده نرمال در تیمار با ترکیبات پست‌بیوتیک، می‌توان اذعان نمود که این ترکیبات دارای تأثیر سوئی بر فرآیندهای رشد و تکثیر رده سلولی نرمال نداشته و همچنین در طی مدت زمان بررسی میزان زنده‌مانی آن‌ها را حفظ کرده و تنها برای تیمار غلظت‌های بالا از ترکیبات پست‌بیوتیک (۱۲۰ و ۱۴۰ میکروگرم بر میلی-لیتر) در بازه زمانی ۴۸ ساعته میزان کاهش زنده‌مانی معنی‌داری در سلول‌ها دیده شد ($P < ۰/۰۵$) که می‌تواند ناشی از برهم-کنش ترکیبات پست‌بیوتیک با سلول‌ها و همچنین کاهش مواد مغذی محیط و تجمع مواد دفعی سلولی در محیط باشد که معمولا در این حالت مرگ سلولی از مسیر نکروز رخ می‌دهد. در این رابطه عباسی و همکاران (۲۰۲۳) به بررسی فعالیت بالقوه آنتی ژنوتوکسیک و سیتوتوکسیک پست‌بیوتیک‌های مشتق‌شده از *ساکارومایسس سرویزیه* در رده سلولی سرطان روده بزرگ انسانی HT-29 پرداختند. پست‌بیوتیک‌های سنتز شده در این مطالعه در دامنه غلظتی مورد بررسی(۵ تا۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) دارای فعالیت آنتی ژنوتوکسیک (۶۰ – ۲۰ درصد ($P < ۰/۰۵$)) و مهار رشد سلول‌های سرطانی با IC_{50} ۲۲/۶۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر در زمان ۴۸ ساعت داشتند که این پاسخ عمدتا از طریق مسیر مرگ سلولی آپوپتوز القا می‌شد ($P < ۰/۰۵$). همچنین در این مطالعه غلظت‌های مختلف ترکیبات پست-بیوتیک در رده سلولی نرمال HFF تیمار گردید ولی تأثیر معنی-داری بر توقف چرخه سلولی در رده سلولی نرمال مشاهده نگردید (۱۲) که یافته‌های مطالعه ما نیز در این جهت می‌باشند و بیانگر نمایه ایمنی پست‌بیوتیک‌ها در سطح سلولی می‌باشد. با توجه به پررنگ شدن نقش و اهمیت انتهای زنجیره مصرف مواد غذایی که شامل سطوح سلولی و ژنوم میزبان می‌باشد و تأثیری که این مسیر می‌تواند در وضعیت کیفیت زندگی و نسل-های بعدی ایجاد کند، لذا بررسی و برقراری وضعیت ایمنی در زنجیره تامین و مصرف مواد غذایی از جمله راهبردهای استراتژیک هر کشوری می‌باشد. قابل تامل است که در این راهبرد بایستی وضعیت ایمنی عناصر مختلف از منابع طبیعی اولیه تا فرآیندهای تولید و فرآوری و همچنین نگهداری و مصرف مورد پایش قرار گرفته و در مورد هر کدام ضوابط و سازوکارهای سازگار با ایمنی غذا اتخاذ و اجرایی گردد. پایش وضعیت ایمنی منابع طبیعی اولیه در سطوح مختلف از جمله اجزاء پایه غذایی تا ترکیبات افزودنی (ترکیبات سنتتیک و خصوصا زیست فعال استخراجی از منابع میکروبی و گیاهی) با بهره‌گیری از روش‌های نوین مبتنی بر شرایط برون‌تنی و فیزیولوژیکی درون‌تنی میزبان از جمله بررسی‌های متابولومیکسی، پروتومیکسی و ژنومیکسی و همچنین ارزیابی برهم‌کنش‌های بالقوه با مایعات بیولوژیک بدن در قالب مطالعات کامپیوتری و ارگانوئیدی می‌تواند محوریت اصلی تحقیقات آتی در زمینه ایمنی مواد غذایی را تشکیل دهد.

نتیجه‌گیری

در سال‌های اخیر ترکیبات پست‌بیوتیک با توجه به مزایای بالقوه خود در داشتن نمایه ایمنی، در دسترس بودن منابع میکروبی بومی والد، مقرون به صرفه بودن سنتز آن‌ها و همچنین سازگارپذیری به مراتب بیشتر جهت استانداردسازی برای افزودن به ماتریکس‌های مواد غذایی و نهایتا عدم تجمع و سازگاری با شرایط هومئوستازی بدن میزبان به عنوان رویکردی نوین در حوزه‌های پیشگیری و درمان قلمداد می‌شوند. بر اساس نتایج حاصل از بررسی کروماتوگرام، پست‌بیوتیک‌های مشتق-شده از *لاکتوباسیلوس کازئی* ATCC 39392 حاوی ۳۴ ترکیب مختلف و ۱۰ ترکیب زیستی مشخص با اثرات ضد میکروبی شناخته شده بودند که نتایج به دست آمده در این مطالعه را میانجی‌گری نمودند. عمده‌ترین ترکیب موثر موجود در محلول پست‌بیوتیک ۵،۱۰-Diethoxy-2,3,7,8-tetrahydro-1H,6H-dipyrrolo[1,2-a:1',2'-d]pyrazine به میزان ۳۱/۳۶ درصد بود. ارزیابی مقدار کل ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی نشان داد که

ترکیبات پست‌بیوتیک مورد مطالعه دارای غلظت بالایی از اجزای فنولی (۲۴ ± ۹۶/۲۳ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم پست‌بیوتیک) و فلاونوئیدی (۳۵ ± ۲۰/۳۳ میلی‌گرم کوئرستین در گرم پست‌بیوتیک) بودند ($P < ۰/۰۵$) که می‌توان محتوا و کیفیت آن را به تأثیر پذیری از شرایط رشد، روش استخراج و نگهداری اولیه ارتباط داد. در رابطه با بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی ترکیبات پست‌بیوتیک در این مطالعه از سه روش اندازه‌گیری مهار رادیکال آزاد DPPH، مهار رادیکال آزاد ABTS و رنگ‌بری بتاکاروتن-لینولئیک اسید استفاده شد که نتایج حاصله به ترتیب برابر با ۱۲ ± ۶۸/۳۲ ، ۴۷ ± ۷۳/۴۵ و ۳۶ ± ۶۱/۷۶ درصد بود ($P < ۰/۰۵$). قابل تأمل است که این ترکیبات می‌توانند برای به تعویق انداختن یا مسدود کردن واکنش‌های رادیکال آزاد و اختلالات اکسیداتیو مرتبط در شرایط برون‌زی و درون‌زی به کار گرفته شوند. اثرات بالقوه ضد میکروبی ترکیبات پست‌بیوتیک علیه باکتری بیماری‌زای *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 29213 در قالب ارزیابی‌های حداقل غلظت بازدارنده رشد و باکتری‌کشی و همچنین تعیین قطر هاله عدم رشد به روش انتشار در چاهک مورد بررسی قرار گرفت و بر اساس نتایج به‌دست آمده از روش میکرودایلوشن غلظت‌های ۴۰ و ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب به عنوان حداقل غلظت بازدارنده رشد و حداقل غلظت باکتری‌کشی در نظر گرفته شدند ($P < ۰/۰۵$). افزون بر این، فعالیت ضد میکروبی ترکیبات پست‌بیوتیک مشخص گردید که وابسته به غلظت می‌باشد به طوری که کمترین و بیشترین هاله عدم رشد به ترتیب با قطر ۲۳ ± ۷ و ۶۵ ± ۲۹ میلی‌متر مربوط به غلظت‌های ۵ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد ($P < ۰/۰۵$). نتایج ارزیابی ایمنی نیز نشان داد که ترکیبات پست‌بیوتیک دارای تأثیر سوئی بر فرآیندهای رشد و تکثیر رده سلولی نرمال KDR نداشته و همچنین در طی مدت زمان بررسی میزان زنده‌مانی آن‌ها را حفظ کرده و تنها برای تیمار غلظت‌های بالا از ترکیبات پست‌بیوتیک (۱۲۰ و ۱۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در بازه زمانی ۴۸ ساعته میزان کاهش زنده‌مانی معنی‌داری در سلول‌ها دیده شد ($P < ۰/۰۵$). لذا با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان اذعان نمود که باکتری‌ها و مخمرهای پروبیوتیکی از دیرباز نقش مهمی در تولید انواع غذاهای تخمیری ایفا کرده‌اند و به دلیل پتانسیل بالای آن‌ها در سنتز ترکیبات پست‌بیوتیک با مشخصات ایمن و فعالیت‌های زیستی چشم‌گیر ازجمله فعالیت ضد میکروبی، ممکن است در توسعه غذاهای فراسودمند برای طیف مشخصی از جامعه به کار گرفته شوند. همچنین با استفاده از تکنیک‌های توسعه‌یافته و بهینه‌شده در استخراج، مشخصه‌سازی و اجرای مطالعات متابولومیک و پروتئومی، می‌توان مخلوط‌های خاصی از پست‌بیوتیک‌ها را با کارایی قابل‌توجهی توسعه داد. این امر به طور قابل ملاحظه‌ای کارایی سیستم‌های بهداشتی را نسبت به طیف وسیعی از بیماری‌های حاد یا مزمن افزایش خواهد داد.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد دانشجو (سمانه مرادی) با عنوان "بررسی فعالیت ضد میکروبی پست بیوتیک‌های مشتق شده از برخی سویه های پروبیوتیک در شرایط آزمایشگاهی و مطالعه آنها بر ماندگاری کیک روغنی" و کد طرح ۴۳۰۰۷۳۹۴ مصوب دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی می‌باشد. لذا از حمایت مالی آن مؤسسه در اجرای این مطالعه سپاسگزاری می‌شود.

• References

1. Sabahi S, Homayouni Rad A, Aghebati-Maleki L, Sangtarash N, Ozma MA, Karimi A, et al. Postbiotics as the new frontier in food and pharmaceutical research. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2022:1-28.
2. Moradi M, Molaei R, Guimarães JT. A review on preparation and chemical analysis of postbiotics from lactic acid bacteria. Enzyme and Microbial Technology. 2021;143:109722.
3. Ayivi RD, Gyawali R, Krastanov A, Aljaloud SO, Worku M, Tahergorabi R, et al. Lactic Acid Bacteria: Food Safety and Human Health Applications. Dairy. 2020;1(3):202-32.
4. de Freitas RSG, da Cunha DT, Stedefeldt E. Food safety knowledge as gateway to cognitive illusions of food handlers and the different degrees of risk perception. Food research international. 2019;116:126-34.
5. Odeyemi OA, Sani NA, Obadina AO, Saba CKS, Bamidele FA, Abughoush M, et al. Food safety knowledge, attitudes and practices among consumers in developing countries: An international survey. Food research international. 2019;116:1386-90.
6. Flynn K, Villarreal BP, Barranco A, Belc N, Björnsdóttir B, Fusco V, et al. An introduction to current food safety needs. Trends in food science & technology. 2019;84:1-3.

7. Liu Q, Yang H. Application of atomic force microscopy in food microorganisms. Trends in Food Science & Technology. 2019;87:73-83.

8. Rayani A, Ahanjan M, Goli HR, Naderi fard N, zamanzdeah M. Comparing the Effect of Probiotic and Non-probiotic Yogurt Drinks on Two Common Oral Microorganisms: An In Vitro Study. J-Mazand-Univ-Med-Sci. 2020;30(185):33-40.

9. Sepordeh S, Jafari AM, Bazzaz S, Abbasi A, Aslani R, Houshmandi S, Rad AH. Postbiotic as Novel Alternative Agent or Adjuvant for the Common Antibiotic Utilized in the Food Industry. Current Pharmaceutical Biotechnology. 2024;25(10):1245-1263.

10. Abbasi A, Aghebati-Maleki A, Yousefi M, Aghebati-Maleki L. Probiotic intervention as a potential therapeutic for managing gestational disorders and improving pregnancy outcomes. Journal of reproductive immunology. 2021;143:103244.

11. Abbasi A, Sanej KD, Mohammadi A, Moradi S, Nayeri BD, Bazzaz S, Hosseini H. The Role of Postbiotics in Food Safety Promotion.2023;15(1):75-108.

12. Abbasi A, Rad AH, Maleki LA, Kafil HS, Baghbanzadeh A. Antigenotoxicity and Cytotoxic Potentials of Cell-Free Supernatants Derived from *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* on HT-29 Human Colon Cancer Cell Lines. Probiotics and Antimicrobial Proteins. 2023:1-13.

13. Abbasi A, Aghebati-Maleki L, Homayouni-Rad A. The promising biological role of postbiotics derived from probiotic *Lactobacillus* species in reproductive health. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2022;62(32):8829-41.

14. Abbasi A, Saadat TR, Saadat YR. Microbial exopolysaccharides–β-glucans–as promising postbiotic candidates in vaccine adjuvants. International Journal of Biological Macromolecules. 2022;223:346-361.

15. Johnson CN, Kogut MH, Genovese K, He H, Kazemi S, Arsenault RJ. Administration of a postbiotic causes immunomodulatory responses in broiler gut and reduces disease pathogenesis following challenge. Microorganisms. 2019;7(8):268.

16. Abbasi A, Sabahi S, Bazzaz S, Tajani AG, Lahouty M, Aslani R, Hosseini H. An edible coating utilizing *Malva sylvestris* seed polysaccharide mucilage and postbiotic from *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* for the preservation of lamb meat. International Journal of Biological Macromolecules. 2023;246:125660.

17. Gao J, Li Y, Wan Y, Hu T, Liu L, Yang S, et al. A novel postbiotic from *Lactobacillus rhamnosus* GG with a beneficial effect on intestinal barrier function. Frontiers in microbiology. 2019;10:477.

18. Ozma MA, Abbasi A, Sabahi S. Characterization of postbiotics derived from *Lactobacillus paracasei* ATCC 55544 and its application in *Malva sylvestris* seed mucilage edible coating to the improvement of the microbiological, and sensory properties of lamb meat during storage. Biointerface Research in Applied Chemistry. 2022;13.

19. Abbasi A, Sheykhsaran E, Kafil HS. Postbiotics: science, technology and applications: Bentham Science Publishers; 2021.

20. Incili GK, Karatepe P, Akgöl M, Güngören A, Koluman A, Ilhak OI, et al. Characterization of lactic acid bacteria postbiotics, evaluation in-vitro antibacterial effect, microbial and chemical quality on chicken drumsticks. Food microbiology. 2022;104:104001.

21. Tang Z, Qian Y, Li Y, Wang R, Liu Z. Exploring the effect of *Lactiplantibacillus plantarum* Lac 9-3 with high adhesion on refrigerated shrimp: Adhesion modeling and biopreservation evaluation. Food Research International. 2023;164:112462.

22. Sabahi S, Abbasi A, Mortazavi SA. Characterization of cinnamon essential oil and its application in *Malva sylvestris* seed mucilage edible coating to the enhancement of the microbiological, physicochemical and sensory properties of lamb meat during storage. Journal of Applied Microbiology. 2022;133(2):488-502.

23. Mehrnia MA, Alizadeh Behbahani B, Barzegar H, Tanavar H. Sclerorhachis platyrachis essential oil: Antioxidant power, total phenolic and flavonoid content and its antimicrobial activity on some Gram-positive and Gram-negative bacteria "in vitro". Journal of food science and technology (Iran). 2021;18(112):189-98.

24. Hosseini H, Abbasi A, Sabahi S, Akrami S, Yousefi-Avarvand A. Assessing the potential biological activities of postbiotics derived from *Saccharomyces cerevisiae*: an in vitro study. Probiotics and Antimicrobial Proteins. 2023:1-17.

25. Wang R, Wang L, Zhang L, Wan S, Li C, Liu S. Solvents effect on phenolics, iridoids, antioxidant activity, antibacterial activity, and pancreatic lipase inhibition activity of noni (*Morinda citrifolia* L.) fruit extract. Food Chemistry. 2022;377:131989.

26. Namazi P, Barzegar H, Mehrnia MA. Evaluation of functional groups of bioactive compounds, antioxidant potential, total phenolic and total flavonoid content of red bell pepper extracts. Journal of food science and technology (Iran). 2021;18(113):301-11.

27. Vilhelmova-Ilieva N, Atanasov G, Simeonova L, Dobreva L, Mancheva K, Trepechova M, Danova S. Anti-herpes virus activity of lactobacillus' postbiotics. BioMedicine. 2022;12(1):21.

28. Ozma MA, Abbasi A, Akrami S, Lahouty M, Shahbazi N, Ganbarov K, et al. Postbiotics as the key

mediators of the gut microbiota-host interactions. Le infezioni in medicina. 2022;30(2):180.

29. Behzadnia A, Moosavi-Nasab M, Mohammadi A, Babajafari S, Tiwari BK. Production of an ultrasound-assisted biosurfactant postbiotic from agro-industrial wastes and its activity against Newcastle virus. Frontiers in Nutrition. 2022;9:966338.

30. Lee JY, Nguyen D-T, Park YS, Hwang KY, Cho YS, Kang K-D, et al. Organic acid profiling analysis in culture media of lactic acid bacteria by gas chromatography-mass spectrometry. Mass Spectrometry Letters. 2012;3(3):74-7.

31. Ricci A, Levante A, Cirlini M, Calani L, Bernini V, Del Rio D, et al. The influence of viable cells and cell-free extracts of *Lactobacillus casei* on volatile compounds and polyphenolic profile of elderberry juice. Frontiers in Microbiology. 2018;9:2784.

32. Patil S, Sawant S, Hauff K, Hampp G. Validated postbiotic screening confirms presence of physiologically-active metabolites, such as short-chain fatty acids, amino acids and vitamins in Hylak® Forte. Probiotics and antimicrobial proteins. 2019;11:1124-31.

33. Garnier L, Penland M, Thierry A, Maillard M-B, Jardin J, Coton M, et al. Antifungal activity of fermented dairy ingredients: Identification of antifungal compounds. International journal of food microbiology. 2020;322:108574.

34. Molska M, Reguła J, Kapusta I, Świeca M. Analysis of Phenolic Compounds in Buckwheat (Fagopyrum esculentum Moench) Sprouts Modified with Probiotic Yeast. Molecules. 2022; 27(22).

35. Wang Z, Feng Y, Yang N, Jiang T, Xu H, Lei H. Fermentation of kiwifruit juice from two cultivars by probiotic bacteria: Bioactive phenolics, antioxidant activities and flavor volatiles. Food Chem. 2022;373(Pt B):131455.

36. Izuddin WI, Humam AM, Loh TC, Foo HL, Samsudin AA. Dietary postbiotic *Lactobacillus plantarum* improves serum and ruminal antioxidant activity and upregulates hepatic antioxidant enzymes and ruminal barrier function in post-weaning lambs. Antioxidants. 2020;9(3):250.

37. Chang HM, Foo HL, Loh TC, Lim ETC, Abdul Mutalib NE. 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. 2021;7:602280.

38. Martorell P, Alvarez B, Llopis S, Navarro V, Ortiz P, Gonzalez N, et al. Heat-treated *Bifidobacterium longum* CECT-7347: A whole-cell postbiotic with antioxidant, anti-inflammatory, and gut-barrier protection properties. Antioxidants. 2021;10(4):536.

39. Barzegar H, Mehrnia M, Alizadeh Behbahani B. Determination of the chemical composition, antioxidant activity and the antimicrobial effect of *Heracleum Lasiopetalum* on infection and food poisoning microorganisms. Journal of Applied Microbiology in Food Industry. 2018;4(4):15-28.

40. Nataraj BH, Ramesh C, Mallappa RH. Characterization of biosurfactants derived from probiotic lactic acid bacteria against methicillin-resistant and sensitive *Staphylococcus aureus* isolates. LWT. 2021;151:112195.

Characterizing Chemical Profiles and Functional Attributes of Postbiotics Derived from *Lactobacillus casei* ATCC 39392 and Assessing Their Antimicrobial Activities against *Staphylococcus aureus* under *in-vitro* Conditions

Moradi S[1], Moslehi Shad M[2], Hosseini H[3], Mortazavian A[3], Shojaei Aliabadi S[4], Abbasi A[5*]*

1- MSc in Food Sciences and Technology, Department of Food Science and Technology, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2- Associate Prof, Department of Food Sciences and Technology, Safadasht Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

3- Prof, Department of Food Science and Technology, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

*4- *Corresponding author: Associate Prof, Department of Food Science and Technology, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. Email: saeedeh.shojaee@gmail.com*

*5- *Corresponding author: PhD Student in Food Sciences and Technology, Department of Food Science and Technology, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. Email: abbasia@sbmu.ac.ir*

Received 20 Dec, 2023 **Accepted 8 Apr, 2024**

Background and Objectives: Postbiotics can be used as promising tools in ensuring food safety due to their safety, clinical and technological benefits. In the present study, chemical profiles, functional characteristics and antimicrobial activities of postbiotics from *Lactobacillus casei* against *Staphylococcus aureus* were investigated.

Materials & Methods: Profiles of the chemical compounds in postbiotics were assessed using gas chromatography coupled with a mass spectrometer. Folin-Ciocalteu method and aluminum chloride colorimetry were used to assess total phenolic and flavonoid contents of the postbiotics. Antioxidant capacity was assessed using three methods of DPPH free radical scavenging, ABTS free radical scavenging, and β-carotene/linoleic acid bleaching. Antimicrobial activity of the postbiotics was assessed by investigating the minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration as well as measuring diameter of the inhibitory zones in the well diffusion method. The MTT test was carried out to assess safety profiles of the postbiotics.

Results: Results of the chromatogram analysis verified presence of ten distinct biological compounds with antimicrobial effects. The postbiotic compounds included high concentrations of phenolic and flavonoid components. Based on the results from the microdilution method, concentrations of 40 and 60 µg/ml were reported as the minimum inhibitory concentration and the minimum bactericidal concentration, respectively. Moreover, the minimum and maximum zones of growth inhibition with diameters of 7 ± 23 mm and 29 ± 65 mm were linked to concentrations of 5 and 100 µg/ml, respectively. Based on the results of the safety assessment, postbiotics included no adverse effects on the growth and proliferation processes of the normal KDR cell line. Only for concentrations of 120 and 140 µg/ml within the 48-h period, significant decreases in cell viability were observed.

Conclusion: Postbiotics with safe characteristics and impressive biological activities, including antimicrobial activity, can be used for the development of functional foods.

Keywords: Postbiotic, *Lactobacillus casei*, *Staphylococcus aureus*, Chemical profile, Safety profile