

## Investigation of carbohydrates, and in-vitro antimicrobial and prebiotic effects of alfalfa extract in comparison with inulin

**Morvarid Moradi Chamachar<sup>1</sup>, Nasrin Samadi<sup>2</sup>, Mohammadreza Fazeli<sup>3</sup>, Mona Salimi<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> PhD Student, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Science and Research Unit, Tehran Iran

<sup>2</sup> Associate Professor, Drug and Food Control Department, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>3</sup> Professor, Department of Drug and Food Control, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>4</sup> Professor, Department of Physiology and Pharmacology, Pasteur Institute, Tehran, Iran

### Abstract

**Background:** The alfalfa plant with the scientific name *Medicago Sativa* is called the queen of forages due to its high nutritional value. On the other hand, studies have shown that alfalfa has an effect on the intestinal microbial composition and its function. Inulin is also a compound with natural prebiotic properties that is used in various products. The aim of this study was to investigate carbohydrates, and in-vitro antimicrobial and the prebiotic activities of alfalfa extract compared to inulin.

**Materials and methods:** Extraction from the aerial part of alfalfa was done by maceration method. Then the carbohydrates and prebiotic effect of alfalfa extract compared to inulin on the growth of two bacteria *Lacticasei bacillus casei* and *Lactiplanti bacillus plantarum* and also its effect on the antimicrobial activity of their supernatant were investigated.

**Results:** Alfalfa extract showed more prebiotic properties than inulin, so that growth and antimicrobial effect of two bacteria, *Lacticasei bacillus casei* and *Lactiplanti bacillus plantarum*, in the medium containing 2.5% extract were more than the medium containing inulin with the same amount.

**Conclusion:** In this study, an acceptable prebiotic property was obtained for alfalfa extract compared to the inulin, which makes alfalfa a suitable candidate for further studies to modulate the intestinal microbiome of humans and animals.

**Keywords:** Alfalfa, Probiotic, Prebiotic, Inulin.

**Cited as:** Moradi Chamachar M, Samadi N, Fazeli MR, Salimi M. Investigation of carbohydrates, and in-vitro antimicrobial and prebiotic effects of alfalfa extract in comparison with inulin. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2024; 34(4): 401-410.

**Correspondence to:** Nasrin Samadi

**Tel:** +98 9121403022

**E-mail:** samadin@tums.ac.ir

**ORCID ID:** 0000-0001-6036-6272

**Received:** 23 Nov 2023; **Accepted:** 17 Feb 2024

## بررسی کربوهیدرات‌ها، اثر ضد میکروبی و پری بیوتیکی عصاره گیاه یونجه در مقایسه با اینولین در شرایط آزمایشگاهی

مروارید مرادی چماچار<sup>۱</sup>، نسرین صمدی<sup>۲</sup>، محمد رضا فاضلی<sup>۳</sup>، مونا سلیمی<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

<sup>۲</sup> دانشیار، گروه کنترل دارو و غذا، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

<sup>۳</sup> استاد، گروه کنترل دارو و غذا، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

<sup>۴</sup> استاد، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، انتستیتو پاستور، تهران، ایران

### چکیده

**سابقه و هدف:** گیاه یونجه (*آلفا آلفا*) با نام علمی *Medicago Sativa* به علت ارزش غذایی بالایی که دارد، ملکه علوفه‌ها نامیده می‌شود. از طرفی مطالعات نشان داده‌اند که یونجه روی ترکیب میکروبی روده و عملکرد آن تأثیرگذار است. اینولین نیز یک ترکیب با خاصیت پری بیوتیکی طبیعی است که در محصولات مختلف از آن استفاده می‌شود. هدف این مطالعه بررسی کربوهیدرات‌ها و اثر پری بیوتیکی عصاره هیبروالکلی گیاه یونجه در مقایسه با اینولین در شرایط آزمایشگاهی بود.

**روش بررسی:** عصاره گیاری از قسمت هوایی یونجه به روش ماسراسیون انجام شد. سپس بررسی کربوهیدرات‌ها، اثر ضد میکروبی و اثر پری بیوتیکی عصاره گیاه یونجه در مقایسه با اینولین بر رشد باکتری‌های لاکتی کازئی باسیلوس کازئی و لاکتی پلنتی باسیلوس پلاتراروم و همچنین اثر آن بر فعالیت ضد میکروبی سوپریاتانت آن‌ها بررسی شد.

**یافته‌ها:** عصاره یونجه خاصیت پری بیوتیکی بیشتری نسبت به اینولین از خود نشان داد، به طوری که رشد و اثر ضد میکروبی دو باکتری لاکتی کازئی باسیلوس کازئی و لاکتی پلنتی باسیلوس پلاتراروم در محیط حاوی ۲٪/۵ عصاره بیشتر از محیط حاوی اینولین با مقدار مشابه بود.

**نتیجه‌گیری:** در این مطالعه خاصیت پری بیوتیکی قابل قبولی برای عصاره یونجه نسبت به پری بیوتیک طبیعی اینولین به دست آمد که یونجه را کاندید مناسبی جهت مطالعات بیشتر برای تعديل میکروبیوم روده انسان و حیوان می‌کند.

**واژگان کلیدی:** یونجه، پری بیوتیک، پری بیوتیک، اینولین.

### مقدمه

خواص ضد میکروبی گیاهان از دیرباز مورد توجه بوده و گذشتگان بدون اطلاع از وجود میکروب‌ها و تنها از طریق تجربه‌های بالینی از این گیاهان در درمان بیماری‌های عفونی استفاده می‌کردند. گیاهان دارویی عموماً همواره در دسترس و ارزان بوده و بیشتر از داروهای شیمیایی در درمان بیماری‌های مختلف، بدون عوارض جانبی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱).

۲). گیاه یونجه انواع مختلفی دارد، بطور مثال یونجه زرد یا شبدر زرد یا ملیوتوس با نام علمی *Melilotus officinalis* است. این گیاه بومی مناطق جنوب و مرکز اروپا، جنوب غرب و مرکز آسیا، هندوستان و ایران است. ترکیبات گیاه یونجه زرد شامل ویتامین‌ها، آنزیم آمیلاز (مخصوص هضم مواد نشاسته ای)، پروتئین‌هایی مانند لیزین، آرژین، هیستیدین، آدنین، فنیل آلانین، آسپاراژین و سیستین، اسید فسفریک، منیزیم، آهن است. وجود این ترکیبات باعث شده است فرآورده‌های حاصل از آن در صنایع دارویی، غذایی، دام و طیور، آرایشی و بهداشتی مورد استفاده قرار می‌گیرد. با توجه به اینکه مواد موثره دارویی یونجه زرد، در ریشه این گیاه ساخته و ذخیره

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده داروسازی، گروه کنترل دارو و غذا، نسرین

صمدی (email: samadin@tums.ac.ir)

0000000160366272 ORCID ID

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۹/۲

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۱۱/۲۸

توزيع گستردگی‌های دارویی در کشور ما، داروهای گیاهی می‌توانند پایه مناسی برای جایگزینی داروهای شیمیایی جهت درمان عفونت‌های میکروبی فراهم آورند (۹). با توجه به کاربردهای ذکر شده گیاه یونجه *Sativa* و *Medicago* لزوم بررسی ویژگی‌های عصاره هیدروالکلی آن، هدف از این مطالعه بررسی ترکیب و خاصیت پری بیوتیکی عصاره هیدروالکلی گیاه یونجه تهیه شده از استان خوزستان روی دو گونه باکتری‌های پروپیوتیک که شامل باکتری لاکتی کازئی باسیلوس کازئی و لاکتی پلنتی باسیلوس پلاتارتاروم که به عنوان میکروارگانیسم‌های ایمن می‌شناستند. این دو باکتری، از رایج‌ترین باکتری‌های پروپیوتیک هستند که بخش مهمی از فلور طبیعی مجاری گوارشی، تناسلی، تنفسی انسان و حیوانات را تشکیل می‌دهند. بنابراین توانایی تحمل pH پایین معده، آنزیم‌های گوارشی و نمکهای صفوایی روده کوچک را دارند و همچنین تعیین غلظت مناسبی از عصاره، جهت استفاده در فراوردهای غذایی یا مکمل‌های دارویی هستند. برای این منظور اثر پری بیوتیکی عصاره هیدروالکلی یونجه با اینولین به عنوان یک ترکیب پری بیوتیکی طبیعی شناخته شده و پر مصرف در انواع غذاها و مکمل‌های دارویی مقایسه شده است.

## مواد و روشها

### جمع آوری گیاه و عصاره گیری

گیاه یونجه از منطقه شادگان استان خوزستان در فروردین ۱۴۰۰ در زمان گل‌دهی جمع آوری شد. این گیاه در دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران شناسایی و با شماره هریاریومی ۷۱۲۱ نگهداری می‌شود. اندام هوایی گیاه که از قبل تهیه گردیده بود و در شرایط دور از نور مستقیم خشک گردید و سپس توسط آسیاب برقی در ابعاد ذره ایی مناسب برای عصاره گیری پودر گردید. مقدار ۱/۲۸۰ کیلوگرم اندام هوایی گیاه خرد و آسیاب شده بود سپس به روش ماسراسیون و با کمک دستگاه همزن به فاصله زمانی ۴۸ ساعت ۶ مرتبه با اتانول ۷۰ درصد عصاره گیری شد. محلول حاصل از عصاره گیری در سه مرحله جمع آوری شد و حللا آن با روش تقطیر در خلاً دوار تبخیر گردید. طبق مقالات منتشرشده درزمینه عصاره اتانولی با استخراج حداکثر ترکیبات موجود در گیاه مؤثرترین عصاره، عصاره اتانولی بود و بعد از آن به ترتیب عصاره‌های متابولی، اتیل استاتی، هگزانی و عصاره آبی هستند (۱۰). بنابراین در این مطالعه از عصاره اتانولی گیاه استفاده شد.

می‌شود. از عصاره هیدرواتanolی، ریشه این گیاه برای استخراج مواد موثره استفاده می‌کنند که در محصولات دارویی و دام و طیور مورد استفاده قرار می‌گیرد (۶). گیاه یونجه مورد استفاده در این پژوهش با نام علمی *Medicago Sativa* و *alfalfa* گیاهی دارویی متعلق به خانواده Fabaceae است. این گیاه علفی گل‌دار و پایاست که تا ارتفاع حدود یک متری رشد می‌کند (۲). یونجه به علت ارزش غذایی بالایی که دارد ملکه علوفه‌ها نامیده می‌شود (۳). یونجه غنی از اسیدهای آمینه ضروری مثل والین، لوسین، تئوین و لیزین است. قسمت‌های هوایی منبع خوبی از کلروفیل و ویتامین‌های E، B6، B2، B1 و B12 و نایسین، فولیک اسید، اینوزیتول، کولین و بتاکاروتون است و مواد معدنی با ارزشی مثل Ca، Fe، Mg، Si، Sn، P، Mn، Cu دارد (۴). فعالیت بیولوژیکی آن از آلkalوئید، ساپونین، تانن و لیگنان است. یونجه آنزیم‌های فراوانی مانند آمیلاز، اینورتاز و پکتیناز دارد و می‌تواند به عنوان کمک کننده در هضم استفاده شود. جوانه یونجه منبعی غنی از فلاونوئیدهای با خاصیت آنتی‌اسیدانی، آپی‌ژنین، تریسین، لوئولین و ترکیبات فولیک است که فعالیت آنتی‌اسیدانی، ضدالتهابی و محافظت‌کننده نورونی دارد (۵). یونجه در درمان اختلالات کلیوی، اختلالات سیستم عصبی، آرتربیت، التهاب، جوش، آسم و سرفه استفاده می‌شده است. در چین، از آن در بیماری سنگ کلیه، تب، بہبود علائم یائسگی، زخم معده، رفع احتباس مایعات و تورم استفاده می‌کردند. در هند، ترکیه و عراق برای درمان آرتربیت استفاده می‌شد (۶). اینولین یک پلی ساکارید طبیعی است که از گیاهان به دست می‌آید به عنوان کربوهیدرات ذخیره‌ای است که به طور طبیعی به صورت مخلوط الیگو و پلی ساکاریدهای فروکتوز از ۲ تا ۱۰۰ واحد وجود دارد و پلیمر ذخیره سازی فراوان گلوکز و فروکتوز است. مصرف اینولین به دلیل جذب در انتهای روده، مستقیماً به کاهش دریافت کالری و سطح گلوکز خون کمک می‌کند. همچنین محافظت کننده در برابر سلطان روده بزرگ و سینه بوده و دارای اثر محرك ایمنی و پیشگیری کننده از بیماری‌های روده مانند اسهال است. اثر پری بیوتیکی اینولین بدین صورت است که توانایی در تحریک انتخابی رشد باکتری‌های مفید روده را دارد. باکتری‌های مفید اینولین را تخمیر کرده و اسید لاکتیک و اسید استیک تولید می‌کنند که با کاهش pH روده بزرگ رشد پاتوژن‌ها مهار می‌شود. همچنین پیتیدها و پروتئین‌هایی تولید می‌کنند که اثرات بازدارندگی بر روی عوامل بیماری زا دارند (۸). با توجه به

حامل (هلهیم) سرعت جریان ۱ میلی لیتر در دقیقه، در یک گرadiان دمای ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه انجام شد. سپس دما ۱۰ درجه سانتی گراد در دقیقه افزایش یافت (تا ۳۰۰ درجه سانتی گراد) و دمای انژکتور ۲۸۰ درجه سانتی گراد تنظیم شد. شناسایی با استفاده از Agilent mass spectrometer انجام شد (۱۴, ۱۳).

#### بررسی پلی ساکاریدهای عصاره یونجه

برای جداسازی پلی ساکاریدها یونجه از کروماتوگرافی تبادل یونی با استفاده از ستون DEAE-cellulose ذرات (اندازه ذرات ۱۰۰-۲۰۰ میکرومتر) استفاده شد. حدود ۵۰۰ میلی گرم عصاره در ۵ میلی لیتر آب مقطر حل شد؛ و با استفاده از فاز متحرک محلول کلرید سدیم ۰/۰۱، ۰/۰۲، ۰/۰۳، ۰/۰۴، مولار از ستون با سرعت ۲ میلی لیتر در دقیقه عبور داده شد. فراکشن های مختلف با حجم ۲۰ میلی لیتر جمع آوری شد و وجود قدر در فراکشن ها با استفاده از روش کرباژول - سولفوریک اسید بررسی شد. سپس فراکشن ها بر روی منحنی برده شده و فراکشن های اصلی گزارش شدند (۱۵, ۱۱).

بررسی اثر پری بیوتیکی عصاره گیاه یونجه ۲/۵ درصد در محیط MRS استاندارد و MRS قادر منبع کربن و نیتروژن در مقایسه با اینولین ۲/۵ درصد

برای این منظور ارلن هایی به شرح زیر تهیه شد. دوالن حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط استاندارد MRS (طبق فرمول ارائه شده توسط شرکت Merck آلمان) تهیه شد و به هر کدام از آن ها نیم میلی لیتر از سوسپانسیون لاکتی پانتی باسیلوس پلاتاروم یا لاکتی کازئی باسیلوس کازئی با جذب نوری ۰/۶ در ۶۰۰ نانومتر که غلظت آن معادل  $10^7$  CFU/ml است، اضافه شد. چهار ارلن دیگر هر کدام حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط MRS قادر منبع کربن و نیتروژن که به دو ارلن ۲/۵ درصد (۱/۲۵ گرم) عصاره یونجه و به دو ارلن دیگر ۲/۵ درصد اینولین اضافه شد. سپس به یک ظرف از محیط حاوی عصاره و اینولین به طور جداگانه ۰/۰ میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری لاکتی کازئی باسیلوس کازئی اضافه شد و به دو ارلن دیگر نیز ۵/۰ میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری لاکتی پانتی باسیلوس پلاتاروم اضافه گردید. دوباره چهار ارلن دیگر هر کدام حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط استاندارد MRS تهیه شد که به دو ارلن ۲/۵ درصد (۱/۲۵ گرم) عصاره یونجه و به دو ارلن دیگر ۲/۵ درصد اینولین اضافه شد. سپس به یک ظرف از محیط حاوی عصاره و اینولین به طور جداگانه ۰/۰ میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری لاکتی کازئی باسیلوس کازئی اضافه شد و به دو ارلن دیگر نیز ۵/۰ میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری لاکتی

تعیین مقدار پلی ساکاریدهای عصاره گیاه یونجه غلظت پلی ساکاریدها در عصاره با استفاده از روش فهلینگ (Fehling) با تبدیل مخلوط مس آبی تیره (II) به رسوب قرمز رنگ اکسید مس نامحلول اندازه گیری شد (۱۱). در فهلینگ «A»، ۷ گرم CuSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O در ۲ قطره آب قطره رقیق حاوی اسید سولفوریک حل شد. در «B» Fehling در ۱۰۰ میلی لیتر آب قطره ۳۵ گرم تارتارات پتاسیم و ۱۲ گرم سود حل شد. سپس ۱۵ میلی لیتر از محلول «A» و ۱۵ میلی لیتر از محلول «B» ترکیب شدند سپس ۲ میلی لیتر از این مخلوط به همراه سه قطره عصاره یونجه در یک لوله آزمایش خالی ریخته شد، و در حمام آب ۶۰ درجه سانتی گراد غوطه ور شد. ایجاد سوسپانسیون سبز و رسوب قرمز نشانه مثبت بودن آزمایش است.

#### تعیین مقدار خاکستر

برای این منظور مقدار ۱ گرم از عصاره یا اینولین را به یک بوته چینی خشک توزین شده منتقل کرده و سپس در کوره در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۸ ساعت قراردادیم تا مواد آلی سوخته و خاکستر سفید بماند. برای اکسید شدن کامل نمونه چند قطره اسید نیتریک غلیظ اضافه نموده و دوباره در کوره به مدت ۲ ساعت دیگر قرار داده تا مواد آلی کاملاً خاکستر شوند. سپس کوره را خاموش کرده و پس از سرد شدن بوته آن را توزین کرده و اختلاف وزن آن با ظرف خالی را به دست آوردیم و درصد خاکستر به دست آمده نسبت به وزن اولیه نمونه محاسبه شد (۱۲).

#### بررسی ترکیب قندهای مونومر عصاره به روش Gas

chromatography/Mass spectrometry (GC/MS) برای هیدرولیز پلی ساکارید ها، به ۱۰۰ میلی گرم عصاره یونجه، چند قطره تری فلورواستیک اسید ۴ مولار اضافه شد و در ۱۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۵ ساعت قرار گرفت. سپس سه بار هر بار ۱ میلی لیتر متانول اضافه شد و با استفاده از دستگاه روتاری عصاره هیدرولیز شده خشک شد. برای آنالیز ساکاریدها به نمونه حدود ۱۰۰ میکرولیتر تری متیل سیلیل ایمیدازول و ۵۰۰ میکرولیتر پیریدین اضافه شد و به مدت ۲۵ دقیقه در دمای ۷۵ درجه سانتی گراد انکوبه شد. سپس نمونه سرد شده و مشتقات قندها سه بار هر بار با ۵ میلی لیتر هگزان استخراج انجام شد. شناسایی پیکهای مونوساکاریدها (آراینوز، گلوكز، گالاكتوز، مانوز، رامنوز، زایلوز، گلاكتورونیک اسید، گلوكورونیک اسید و فروکتوز) با استفاده از دستگاه جی سی مس و بر اساس زمان بازداری استاندارد قندها و کتابخانه دستگاه انجام شد. جداسازی نمونه ها با استفاده از کروماتوگرافی گازی Agilent با استفاده از ستون MS-5 HD، قطر داخلی کاپیلاری ۰/۲۵ میلی متر، گاز

پنجه (Eschrechia coli) و اشريشيا كلاي (pneumoniae) بـر روی محیط کشت کاـزو آـگـار، با استفاده از سـرم فـيـزـيـولـوـژـي استـرـيل سـوسـپـانـسـيـونـي با جـذـبـ نـورـيـ منـاسـبـ در طـولـ مـوجـ ۶۰۰ نـانـومـتر تـهـيـهـ شـدـ کـهـ غـلـظـتـيـ معـادـلـ ۱۰۸ CFU/ml. سـپـسـ باـ استـفـادـهـ اـزـ سـوـاـپـ استـرـيلـ بهـ صـورـتـ تـامـ سـطـحـ روـيـ سـطـحـ مـحـيـطـ مـولـرـ هيـنـتوـنـ آـگـارـ کـهـ آـگـارـ آـنـ يـكـ درـصـدـ باـشـدـ کـشتـ دـادـ شـدـنـ وـ باـ استـفـادـهـ اـزـ چـاهـكـ زـنـ اـسـتـرـيلـ درـ روـيـ هـرـ پـليـتـ دـادـهـ شـدـنـ وـ باـ استـفـادـهـ اـزـ چـاهـكـ زـنـ اـسـتـرـيلـ درـ روـيـ هـرـ پـليـتـ چـاهـكـهـايـ بهـ قـطـرـ ۷ مـيلـيـمـترـ ايـجادـ شـدـ. درـونـ چـاهـكـهـايـ حـجمـ ۱۰۰ مـيـكـرـوـبـيـوـپـ دـيـگـرـيـ منـقـلـ شـدـ وـ pH آـنـ باـ سـودـ يـكـ نـرـمالـ استـرـيلـ بهـ حدـودـ خـنـشـيـ (۶/۵) رـسيـدـ. سـپـسـ اـزـ کـشتـ استـافـيلـوـكـوكـوسـ/ـورـئـوسـ Staphylococcus aureus برـ روـيـ مـحـيـطـ کـشتـ کـاـزوـ آـگـارـ،ـ باـ استـفـادـهـ اـزـ سـرمـ فـيـزـيـولـوـژـيـ استـرـيلـ سـوسـپـانـسـيـونـيـ باـ OD=۰/۲۵ درـ طـولـ مـوجـ ۶۰۰ نـانـومـترـ تـهـيـهـ شـدـ کـهـ غـلـظـتـيـ معـادـلـ ۱۰۸ CFU/ml. دـارـدـ وـ باـ استـفـادـهـ اـزـ سـوـاـپـ استـرـيلـ بهـ صـورـتـ تـامـ سـطـحـ روـيـ سـطـحـ مـحـيـطـ مـولـرـ هيـنـتوـنـ آـگـارـ کـهـ آـگـارـ آـنـ يـكـ درـصـدـ باـشـدـ کـشتـ دـادـهـ شـدـنـ وـ باـ استـفـادـهـ اـزـ چـاهـكـ زـنـ اـسـتـرـيلـ درـ روـيـ هـرـ پـليـتـ ۴ چـاهـكـ بهـ قـطـرـ ۷ مـيلـيـمـترـ ايـجادـ شـدـ. سـپـسـ درـ دـوـ چـاهـكـ روـبـرـوـ اـزـ سـوـپـرـنـاتـانتـ اـضـافـهـ شـدـ وـ برـايـ اـنتـشـارـ بـيـشـتـرـ درـ زـيـرـ لـامـينـارـ فـلوـ بـهـ مـدتـ ۳ ساعـتـ قـرـارـ دـادـ شـدـ. سـپـسـ درـ دـمـایـ ۳۷ درـجـهـ سـانـتـيـ گـرـادـ بـهـ مـدتـ ۲۴ ساعـتـ گـرـمـخـانـهـ گـذـارـيـ گـرـدـيدـ پـسـ اـزـ آـنـ هـالـهـ عـدـمـ رـشـدـ ايـجادـ شـدـهـ درـ اـطـرافـ چـاهـكـهـايـ بـرـحـسـبـ مـيلـيـمـترـ انـداـزـهـ گـيرـيـ شـدـ.

### تحلیل آماری

تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SPSS و توسط آنالیز واریانس یکطرفه و post hoc Tkey انجام شد. تفاوت‌ها در  $p < 0.05$  معنی‌دار در نظر گرفته شدند.

### یافته‌ها

مقدار پلی ساکاریدها و خاکستر عصاره گیاه یونجه در محلول حاوی  $2/5$  درصد عصاره یونجه مقدار مقدار پلی ساکارید  $10/1$  درصد بود. به عبارت دیگر مقدار کربوهیدرات آن در صد میلی لیتر از محیط حاوی  $2/5$  عصاره حدود  $0/26$  گرم محاسبه شد.

نتایج تعیین خاکستر نشان داد که مقدار خاکستر موجود در عصاره یونجه  $2/7$  و در مورد اینولین  $0/18$  درصد بود.

### نتایج آنالیز GC-MS عصاره گیاه یونجه

نتایج این آزمون نشان داد که عصاره یونجه حاوی مونوساکاراهای گلوكز، زايلوز، فروكتوز، آرابينوز و گالاكترونیک اسید است که مقادیر نسبی آن‌ها در جدول ۱ و شکل ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱. ترکیب مونوساکاریدهای عصاره یونجه بر اساس آنالیز

GC/MS	منوساکارید	درصد نسبی (وزنی/وزنی)
۳/۲	فرکتوز	
۱۷/۱	گلوكز	
۱۱/۲	گالاكتوز	
۳۹/۲	آرابينوز	
۱۶/۵	گالاكترونیک اسید	
۱۲/۸	گلوكورونیک اسید	

پنـتـیـ باـسـیـلوـسـ پـلـاتـارـومـ اـضـافـهـ شـدـ. سـپـسـ اـرـلنـهـاـ درـ دـمـایـ ۳۷ درـجـهـ سـانـتـيـ گـرـادـ گـذـارـيـ شـدـنـ وـ درـ فـواـصلـ زـمانـيـ ۶ وـ ۱۲ وـ ۲۴ اـزـ نـظـرـ اـثـرـ ضـدـ مـيـكـرـوبـيـ،ـ تـعـدـادـ باـكـتـرـيـهـايـ زـنـدهـ بـرـرسـيـ شـدـنـ.

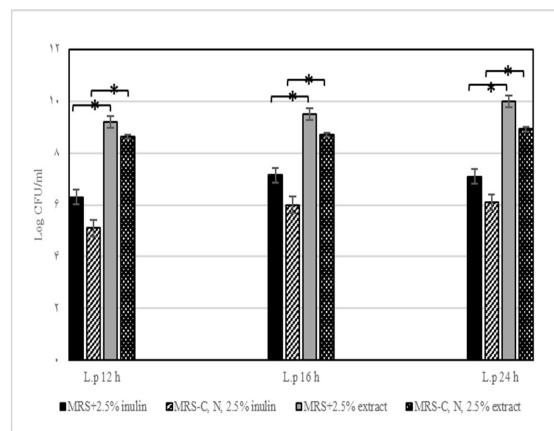
برـايـ اـينـ منـظـورـ نـمـونـهـ بـرـداـشـتـهـ شـدـهـ اـزـ هـرـ کـشتـ باـكـتـرـيـ درـ ۴۰۰۰ دورـ درـ دـقـيقـهـ وـ درـ دـمـايـ ۴ درـجـهـ سـانـتـيـ گـرـادـ بـهـ مـدتـ ۱۰ دقـيقـهـ سـانـتـرـيفـيـوـزـ شـدـ وـ سـپـسـ سـوـپـرـنـاتـانتـ حـاـصـلـ بـاـ عـبـورـ دـادـنـ اـزـ فـيـلـتـرـ ۰/۲۲ مـيـكـرـونـ استـرـيلـ شـدـ. نـيمـيـ اـزـ اـينـ سـوـپـرـنـاتـانتـ بـهـ مـيـكـرـوـتـيـوـبـ دـيـگـرـيـ منـقـلـ شـدـ وـ pH آـنـ باـ سـودـ يـكـ نـرـمالـ استـرـيلـ بـهـ حدـودـ خـنـشـيـ (۶/۵) رـسيـدـ. سـپـسـ اـزـ کـشتـ استـافـيلـوـكـوكـوسـ/ـورـئـوسـ Staphylococcus aureus برـ روـيـ مـحـيـطـ کـشتـ کـاـزوـ آـگـارـ،ـ باـ استـفـادـهـ اـزـ سـرمـ فـيـزـيـولـوـژـيـ استـرـيلـ سـوسـپـانـسـيـونـيـ باـ OD=۰/۲۵ درـ طـولـ مـوجـ ۶۰۰ نـانـومـترـ تـهـيـهـ شـدـ کـهـ غـلـظـتـيـ معـادـلـ ۱۰۸ CFU/ml. دـارـدـ وـ باـ استـفـادـهـ اـزـ سـوـاـپـ استـرـيلـ بـهـ صـورـتـ تـامـ سـطـحـ روـيـ سـطـحـ مـحـيـطـ مـولـرـ هيـنـتوـنـ آـگـارـ کـهـ آـگـارـ آـنـ يـكـ درـصـدـ باـشـدـ کـشتـ دـادـهـ شـدـنـ وـ باـ استـفـادـهـ اـزـ چـاهـكـ زـنـ اـسـتـرـيلـ درـ روـيـ هـرـ پـليـتـ ۴ چـاهـكـ بهـ قـطـرـ ۷ مـيلـيـمـترـ ايـجادـ شـدـ. سـپـسـ درـ دـوـ چـاهـكـ روـبـرـوـ اـزـ سـوـپـرـنـاتـانتـ اـضـافـهـ شـدـ وـ برـايـ اـنتـشـارـ بـيـشـتـرـ درـ زـيـرـ لـامـينـارـ فـلوـ بـهـ مـدتـ ۳ ساعـتـ قـرـارـ دـادـ شـدـ. سـپـسـ درـ دـمـایـ ۳۷ درـجـهـ سـانـتـيـ گـرـادـ بـهـ مـدتـ ۲۴ ساعـتـ گـرـمـخـانـهـ گـذـارـيـ گـرـدـيدـ پـسـ اـزـ آـنـ هـالـهـ عـدـمـ رـشـدـ ايـجادـ شـدـهـ درـ اـطـرافـ چـاهـكـهـايـ بـرـحـسـبـ مـيلـيـمـترـ انـداـزـهـ گـيرـيـ شـدـ.

### بررسی اثر ضد میکروبی

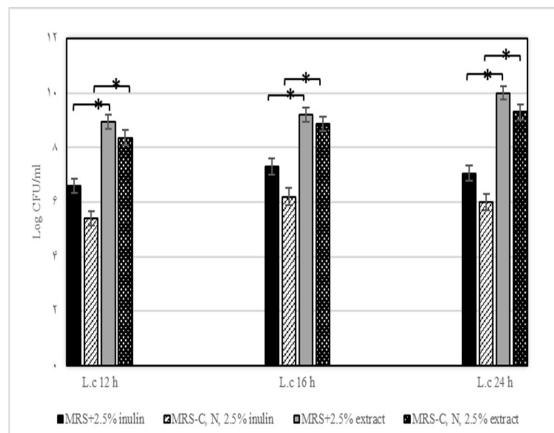
اـثرـ ضدـمـيـكـرـوبـيـ سـوـپـرـنـاتـانتـ حـاـصـلـ اـزـ مـحـيـطـ MRSـ حـاوـيـ  $۰/۲۵$  عـصارـهـ درـ مـقـابـلـ باـكـتـرـيـهـايـ استـانـدارـدـ کـهـ اـزـ کـلـكـسـيـونـ باـكـتـرـيـهـاـ وـ قـارـچـهـايـ عـفـونـيـ وـ صـنـعـتـيـ اـيرـانـ Persian Type Culture Collection تـهـيـهـ شـدـهـ بـودـنـدـ،ـ بـرـرسـيـ شـدـ.ـ اـينـ باـكـتـرـيـهـاـ دـارـايـ مقـاـومـتـ مشـخـصـ وـ اـسـتـانـدارـدـ نـسـبـتـ بـهـ عـوـاملـ ضـدـ مـيـكـرـوبـيـ هـسـتـنـدـ.ـ بـرـايـ بـرـرسـيـ اـثرـ ضـدـ مـيـكـرـوبـيـ درـ شـرـايـطـ وـاقـعـيـ،ـ درـ کـنـارـ اـينـ باـكـتـرـيـهـايـ اـزـ اـنـوـاعـ جـدـاـ شـدـهـ اـزـ بـيـمارـانـ (ـسوـيـهـهـايـ بـالـيـنيـ)ـ کـهـ مقـاـومـتـ بـالـاتـرـ نـسـبـتـ بـهـ سـوـيـهـهـايـ استـانـدارـدـ کـلـكـسـيـونـيـ دـارـنـدـ نـيزـ استـفـادـهـ شـدـ.

برـايـ اـينـ منـظـورـ سـوـپـرـنـاتـانتـهـايـ حـاـصـلـ درـ ۴۰۰۰ دورـ درـ دـقـيقـهـ وـ درـ دـمـايـ ۴ درـجـهـ سـانـتـيـ گـرـادـ بـهـ مـدتـ ۱۰ دقـيقـهـ سـانـتـرـيفـيـوـزـ شـدـ وـ سـپـسـ باـ عـبـورـ دـادـنـ اـزـ فـيـلـتـرـ ۰/۲۲ مـيـكـرـونـ استـرـيلـ شـدـ. سـپـسـ اـزـ کـشتـ باـكـتـرـيـهـايـ گـرمـ مـبـثـتـ وـ گـرمـ مـنـفـيـ مـخـتـلـفـ شـامـلـ استـافـيلـوـكـوكـوسـ/ـورـئـوسـ Staphylococcus aureus،ـ استـافـيلـوـكـوكـوسـ Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MSRA)،ـ سـوـدـومـونـاسـ اـئـرـوـزـينـوـزاـ Klebsiella،ـ پـلـسـيـلاـ پـنـوـمـونـيـهـ (Pseudomonas aeruginosa)

نتایج بررسی رشد و فعالیت ضد میکروبی سوپرناتانت لاكتی پلنتی باسیلوس پلاتاروم ولاکتی کازئی باسیلوس کازئی در محیط MRS استاندارد و محیط MRS حاوی ۲/۵ درصد عصاره یونجه که در مطالعه قبلی نیز بررسی شده است (۱۶) و همچنین محیط حاوی ۲/۵ درصد اینولین در ساعت ۱۲، ۱۶ و ۲۴ در شکل‌های ۳ و ۴ نشان داده شده است. همان طور که ملاحظه می‌شود رشد هر دو باکتری در محیط MRS استاندارد و MRS قادر منبع کربن و نیتروژن حاوی ۲/۵٪ عصاره به طور معنی‌داری بیشتر از محیط‌های مشابه که حاوی ۰/۲٪ اینولین بودند به دست آمد.  
 $P < 0/05$



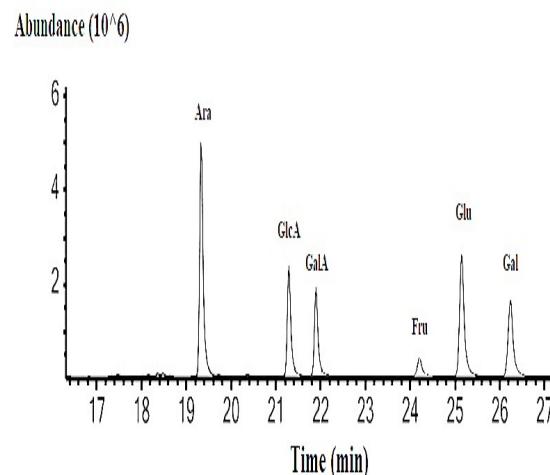
شکل ۳. مقایسه اثر غلظت ۲/۵ درصد اینولین با عصاره گیاه یونجه (۱۷) بر روی رشد لاكتی پلنتی باسیلوس پلاتاروم در محیط استاندارد MRS و MRS قادر منبع کربن و نیتروژن.  
 $P < 0/05$ \*



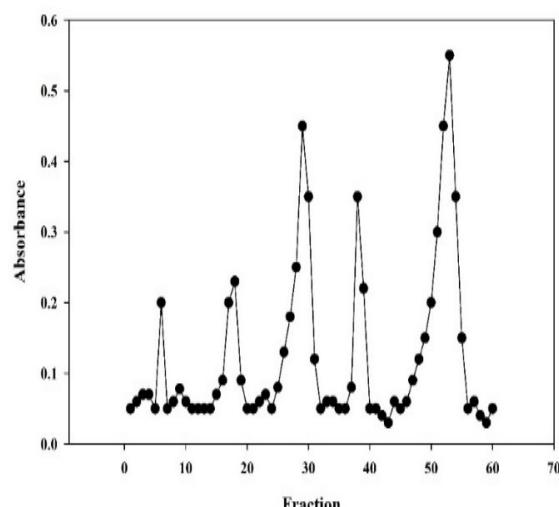
شکل ۴. مقایسه اثر غلظت ۲/۵ درصد اینولین با عصاره گیاه یونجه (۱۷) بر روی رشد لاكتی کازئی باسیلوس کازئی در محیط استاندارد MRS و MRS قادر منبع کربن و نیتروژن.  
 $P < 0/05$ \*

### بررسی پلی ساکاریدهای عصاره یونجه

با کروماتوگرافی تعویض یونی ۵ فراکشن پلی ساکاریدی در عصاره یونجه مشخص شدند که مقادیر مربوط به فراکشن‌ها در جدول ۲ و نمودار مربوط به فراکشن‌ها در شکل ۲ نشان داده شده است. همان گونه که مشاهده می‌شود فراکشن ۵ و ۳ بیشترین درصد را در بین فراکشن‌های پلی ساکاریدی دارند.



شکل ۱. آنالیز GC/MS عصاره یونجه حاوی مونوساکارای گلوكز، زايلوز، فروكتوز، آرابينوز، گالاكترونیک اسید و گلوكورونیک اسید



شکل ۲. آنالیز فراکشن‌های پلی ساکاریدی در عصاره یونجه

بررسی اثر پری بیوتیکی عصاره گیاه یونجه ۲/۵ درصد در محیط MRS استاندارد و MRS قادر منبع کربن و نیتروژن در مقایسه با اینولین ۲/۵ درصد

نتایج میانگین قطر هاله عدم رشد سوپرناتانت لاکتی پلنتی باسیلوس پلانتاروم ولاکتی کائزی باسیلوس کائزی در محیط MRS حاوی ۲/۵ درصد عصاره یونجه بر روی باکتری های گرم مثبت و گرم منفی (استافیلولکوکوس اورئوس، استافیلولکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین، سودوموناس آئرورژینوزا، کلبسیلا پنومونیه و اشريشیا کلای) مختلف از نمونه های کلکسیونی و بالینی در جدول ۴ آورده شده است. همان گونه که ملاحظه می شود سوپرناتانت حاصل از هر دو باکتری لاکتی پلنتی باسیلوس پلانتاروم ولاکتی کائزی باسیلوس کائزی دارای اثر مهاری بر روی باکتری های مورد آزمون استاندارد و بالینی بودند.

### بحث

میکروبیوتای روده عملکردهای مهمی در سلامت میزبان دارند و می توانند مستقیماً بر شرایط فیزیولوژیکی بدن مانند بهبود سد روده، تحریک مکانیسم های دفاعی در برابر پاتوژن ها، بهبود سیستم ایمنی میزبان، افزایش مکانیسم های دفاعی در برابر بیماری های التهابی روده، تنظیم خود ایمنی، تولید متابولیت های بیولوژیکی و از بین بردن سلول های سرطانی اثر

### جدول ۲. درصد فراکشن های پلی ساکاریدی عصاره یونجه

فراکشن پلی ساکاریدی	درصد نسبی (وزنی/اوزنی)
۱	۸/۷
۲	۱۲/۱
۳	۲۷/۵
۴	۱۶/۵
۵	۳۵/۲

نتایج هاله های عدم رشد در محیط های MRS حاوی اینولین در جدول ۳ نشان داده شده است. همان طور که مشاهده می شود هاله های عدم رشد نیز در محیط MRS استاندارد و MRS فاقد منبع کربن و نیتروژن حاوی ۲/۵٪ عصاره بیشتر از محیط های حاوی ۲/۵٪ اینولین هستند. در ساعت ۱۶ قطر هاله عدم رشد برای سوپرناتانت حاوی عصاره در مقابل باکتری استافیلولکوکوس اورئوس حدود ۱۵/۵-۱۶/۵ میلیمتر و در ساعت ۲۴ ۱۸-۱۹ میلیمتر بود. در حالی که برای محیط حاوی اینولین هاله عدم رشد در ساعت ۱۶، ۱۴/۵-۱۴/۵ در ساعت ۱۳/۵-۱۴/۵ در ساعت ۱۶/۵ ۱۴/۵-۱۶/۵ میلیمتر به دست آمد.

بررسی اثر ضد میکروبی سوپرناتانت حاصل از محیط MRS حاوی ۲/۵٪ عصاره در مقابل باکتری های مختلف کلکسیونی و بالینی

جدول ۳. قطر هاله عدم رشد (میلی متر) سوپرناتانت لاکتی پلنتی باسیلوس پلانتاروم ولاکتی کائزی باسیلوس کائزی در محیط MRS استاندارد و MRS حاوی عصاره یا اینولین (n=3, Mean ± SD)

زمان (ساعت)	لاکتی کائزی باسیلوس کائزی		لاکتی پلنتی باسیلوس پلانتاروم	
	MRS	محیط حاوی ۲/۵٪	MRS	محیط حاوی ۲/۵٪
۱۲	۱۱±۰/۵	۱۰/۵±۰/۵	۱۱±۰/۳	۱۱±۰/۳
۱۶	۱۳±۰/۵	۱۳/۵±۰/۵	۱۳±۰/۵	۱۵/۵±۰/۵
۲۴	۱۷±۰/۵	۱۶/۵±۰/۳	۱۶±۰/۵	۱۹±۰/۴

جدول ۴. میانگین نتایج هاله های عدم رشد سوپرناتانت MRS استاندارد حاوی ۲/۵٪ عصاره لاکتی پلنتی باسیلوس پلانتاروم ولاکتی کائزی باسیلوس کائزی روی باکتری های مختلف

باکتری	حاله عدم رشد (میلی متر)	لاکتی کائزی باسیلوس کائزی	لاکتی پلنتی باسیلوس پلانتاروم
اشریشیا کلی ۱۳۳۰	۱۷/۵	۱۶/۵	
اشریشیا کلی (بالینی)	۱۷	۱۵/۵	
استافیلولکوکوس اورئوس ۱۱۱۲	۱۹	۱۸	
استافیلولکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین	۱۴	۱۴/۵	
سودوموناس آئرورژینوزا ۱۰۷۴	۱۱/۵	۱۲	
سودوموناس آئرورژینوزا (بالینی)	۱۱	۱۰/۵	
کلبسیلا پنومونیه ۱۰۵۳	۱۲	۱۱/۵	
کلبسیلا پنومونیه (بالینی)	۱۲	۱۲	

با توجه به اطلاعات موجود در خصوص اثر مثبت گیاه یونجه بر روی میکروبیوتای روده حیوانات، در این مطالعه سعی شد که اثر عصاره هیدروالکلی گیاه یونجه بر روی رشد دو سویه مهمی که در فرآورده های پروبیوتیک انسانی استفاده می شوند، به منظور طراحی فرآورده های حاوی پروبیوتیک و عصاره یونجه به طوری که در انسان نیز قابل استفاده باشند، سنجیده شود. بنابراین در این مطالعه اثر عصاره گیاه یونجه بر روی رشد باکتری های پروبیوتیک لاکتی پلنتی باسیلوس پلاتاروم ولاکتی کازئی باسیلوس کازئی در مقایسه با اینولین، که یک پری بیوتیک پرمصرف در مکمل های غذایی و دارویی است، به عنوان کنترل بررسی شد. نتایج این مطالعه نشان داد که در غلظت مشابه از هر دو ترکیب (۲/۵ درصد)، رشد دو باکتری پروبیوتیک در محیط حاوی عصاره یونجه به طور معنی داری بیشتر از محیط حاوی اینولین بود. همچنین اثر ضد میکروبی سوپرناتانت حاصل از کشت پروبیوتیکها در محیط حاوی عصاره یونجه نیز قطره الدهای عدم رشد بزرگ تری نسبت به MRS سوپرناتانت حاصل از محیط حاوی اینولین و محیط استاندارد نشان داد. علت این اثر عصاره به پلی ساکاریدهایی نسبت داده می شود که خواص پری بیوتیکی دارند. در پژوهشی ارتباط میان ترکیبات پلی ساکاریدی یونجه و تکثیر و عملکرد ایمنی لنفو سیسته های B و T طحال موش در شرایط آزمایشگاهی مورد تائید قرار گرفت (۱۹). همچنین نتایج مطالعه دیگری نشان داد که بین پلی ساکاریدهای موجود در یونجه با خواص آنتی اکسیدانی ارتباط وجود دارد، به طوری که می تواند استرس اکسیداتیو را در فیبروبلاست های جنینی MEFs القا شده با  $O_2$  از طریق فعل کردن موس میکرو مسیرهای MAPK/P38 و مهار مسیرهای NK-kB کم کند، اما تاکنون مطالعه ای بر روی انسان صورت نگرفته است (۲۱).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که عصاره یونجه حاوی درصد بالایی از فراکشن های مختلف پلی ساکاریدی است. پلی ساکاریدهای گیاهی غیر قابل هضم که توسط آنزیمه های گوارشی معده هضم نمی شوند می توانند باعث افزایش تنوع زیستی میکروبیوتای روده و کاهش بروز بیماری های مزمم شوند. پری بیوتیکها مواد غذایی غیر قابل هضم و یا ترکیبات غذایی هستند که به شکل تغییر نیافته توسط فرآیند گوارش، وارد کولون می شوند و به عنوان یک منبع انرژی و رشد برای باکتری های مفیدی که در روده بزرگ زندگی می کنند، عمل می کنند. این اتفاق نظر وجود دارد که پری بیوتیکها با تامین تغذیه برای باکتری های پروبیوتیک، به بهبود تعادل پروبیوتیک روده ای در روده کمک می کنند. پری بیوتیکها نه تنها به عنوان تغذیه و

بگذارند (۱۷). در اصل، لاکتوباسیلوس ها را به عنوان میکرو اگانیسم های ایمن می شناسند. لاکتو باسیلی باسیلوس پلاتاروم و لاکتی کازئی باسیلوس کازئی، از رایج ترین باکتری های پروبیوتیک هستند که بخش مهمی از فلور طبیعی می دهند. بنابراین توانایی تحمل pH پایین معده، آنزیم های گوارشی و نمک های صفرایی روده کوچک برای آنها ضروری است (۲۲). لاکتوباسیلوس ها به عنوان آغازگر به محصولات غذایی تخمیری اضافه می شوند. این باکتری ها قادر به تخمیر کربوهیدراتها برای تولید انرژی و اسیدهای آلی مختلف به ویژه اسید لاکتیک هستند که در بروز اثرات ضد باکتریایی نقش دارند (۱۸).

یونجه یک گیاه چند ساله پر محصول است که در سراسر جهان با ویژگی های غذایی غنی و ترکیبات زیست فعال کشت می شود مطابق مطالب ذکر شده در مقالات، گیاه یونجه خواص متغیری همچون اثرات ضد باکتریایی دارد و همچنین دارای ترکیبات آنتی اکسیدان و ضد التهاب نیز می باشد. یکی از اثرات احتمالی گوارش یونجه، می تواند نقش آن در بهبود وضعیت دستگاه گوارش از راه کمک به رشد باکتری های اسید لاکتیک باشد. به عنوان مثال مطالعه ای که بر روی تعدادی بچه خوک انجام شد، نشان داد که افزودن عصاره یونجه به رژیم غذایی با افزایش فراوانی نسبی فرمیکوتها همراه بود، در حالی که جمعیت باکترونیکس ها با افزودن آن کاهش یافت. تغییرات در این دو سویه میکروبی ممکن است بر متابولیسم و عملکرد میکروبیوتای روده تأثیر بگذارند (۲۰). وانگ و همکارانش نیز در سال ۲۰۱۸، به بررسی اثر آلفalfa بر روی میکروبیوتای خوک پرداختند. در مطالعه آن ها به ۲۴ خوک به طور تصادفی غذای حاوی٪/۰.۵٪/۰ و ۱۵٪ آلفalfa به مدت ۲۸ روز داده شد. با استفاده از روش توالی یابی بر اساس ژن 16S rRNA نشان داده شد که رژیم حاوی آلفalfa به طور قابل توجهی فراوانی جنس های توریسی باکتر (*Touricibacter*), اسینتوپاکتر (*Acinetobacter*), پاراکوکس (*Paracoccus*), اسیدیفیلوم (*Acidiphilum*), پروپیونی باکتریوم (*Propionibacterium*) و سودوموناس (*Corynebacterium*), استافیلوكوکس (*Staphylococcus*) را کاهش داد و به طور قابل توجهی فراوانی جنس لاكتوسپیرا، ماروینسپیرا و دسوفووپیریو را در سکوم افزایش داد. همچنین غلظت بوتیرات به طور معنی داری در روده خلفی خوک ها بعد از تیمار با یونجه افزایش یافت (۷).

گوارش حیوانات هضم شوند. با این حال، آن‌ها را می‌توان تا حدی توسط میکروبیوتای روده‌ای خاص تخمیر کرد تا چربی‌های با زنجیره کوتاه تولید کند. اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه برای تقویت سد روده، یکپارچگی و تنظیم ایمنی مفید هستند (۲۱). با توجه به ارتباط میان عملکردهای بیولوژیکی پلی ساکاریدها با ویژگی‌های مولکولی آن‌ها، طراحی روشی بهینه برای استخراج و خالص‌سازی ترکیبات موثر یونجه حائز اهمیت است.

به تازگی از پلی ساکاریدهای مشتق شده از گیاه یونجه به عنوان ادجوانات جهت تقویت سیستم ایمنی در حیوانات یا انسان‌ها استفاده شده است و نتایج این تحقیق نیز لزوم بررسی ساختار مولکولی و فعالیت بیولوژیکی پلی ساکاریدهای مشتق از یونجه را به منظور گسترش کاربرد آن‌ها به عنوان مکمل‌های غذایی با دارویی نشان می‌دهد.

نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره یونجه در مقایسه با اینولین با غلظت مشابه به طور معنی‌داری باعث افزایش بیشتری در رشد دو باکتری پروبیوتیک لاکتی کازئی باسیلوس کازئی و لاکتی پلنتی باسیلوس پلاتارتوم و همچنین افزایش اثر ضد میکروبی سوپراناتانت حاصل از کشت آنها شد. بنابراین عصاره یونجه می‌تواند کاندید مناسبی جهت مطالعات بیشتر برای تعدیل میکروبیوم روده انسان باشد و در آینده می‌توان آن را به میزان کافی به فراورده‌های مکمل خوراکی اضافه کرد. با توجه به اثر مثبت عصاره یونجه بر روی رشد دو گونه پروبیوتیک مورد مطالعه، تهیه فرمولاسیون‌های سین بیوتیک حاوی پروبیوتیک‌ها و عصاره یونجه نیز می‌تواند در مطالعات آتی مورد بررسی قرار گیرد. در نهایت بررسی ساختار مولکولی و فعالیت بیولوژیکی پلی ساکاریدهای مشتق از یونجه برای تحقیقات آینده توصیه می‌شود.

## تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شد.

## REFERENCES

1. Lorenzo-Leal AC, Palou E, López-Malo A. Evaluation of the efficiency of allspice, thyme and rosemary essential oils on two foodborne pathogens in *in-vitro* and on alfalfa seeds, and their effect on sensory characteristics of the sprouts. *Int J Food Microbiol* 2019; 295:19-24.
2. Kumar A, Rahal A, Chakraborty S, Tiwari R, Latheef SK, Dhama K. *Ocimum sanctum* (Tulsi): a miracle herb and boon to medical science- A Review. *Int J Agron Plant Prod* 2013; 4 :1580-9.
3. Samac DA, Austin-Phillips S. Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Agrobacterium protocols* 2006:301-12.

تقویت‌کننده فلور پروبیوتیک مهم روده عمل می‌کنند، بلکه فعالیت، رشد و متابولیسم میکروب‌های غیر سودمند که برای بقا باید با آن‌ها رقابت کنند را کند می‌کنند. کربوهیدرات‌های غیرقابل هضم دستگاه گوارش شامل پلی ساکاریدها مانند پیروودکسترین، الیگوساکاریدها مانند فروکتوالیگوساکارید، گلوكوالیگوساکارید، ترانس-گالاكتوالیگوساکارید، زایلوبالیگوساکارید و دی‌ساکاریدها مانند لاکتولوز و لاکتیتول هستند. از طرفی مانان به عنوان یک پری بیوتیک و منبع انرژی بهبود فلور روده طیور بسیار موثر است. همچنین مانان می‌تواند با اتصال به دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی از جمله سالمونلا باعث ممانعت از اتصال این باکتری به دیواره روده شود. و کمک مناسبی برای جلوگیری از بیماری با این باکتری باشد. لذا مانان می‌تواند از تشکیل کلنی و اتصال این باکتری‌های بیماری‌زا به غشاء روده جلوگیری کند. از طرف دیگر با افزایش ترشح ایمونوگلوبولین‌ها از اتصال باکتری‌های بیماری‌زا یا سوموم آنها به اپی تلیوم روده جلوگیری می‌کنند. مانان اوکیگوساکاریدها همچنین به عنوان منبع تغذیه‌ای برای باکتری‌های فلور دستگاه گوارش به حساب می‌آیند و به این طریق تعداد باکتری‌های فلور را افزایش می‌دهد که در روند رقابت با باکتری‌های بیماری‌زا موثر است و جایگزین مناسبی برای آنتی‌بیوتیک‌ها است (۶). نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره هیدروالکلی گیاه یونجه استان خوزستان نیز حاوی فراکشن‌های مختلف پلی ساکاریدی با خاصیت پری بیوتیکی است که افزایش رشد و فعالیت متابولیک باکتری‌های پروبیوتیک تایید کننده این ویژگی است. مطالعه‌ای که در خصوص اثر ترکیبات گیاهی برروی میکروبیوم روده خوک انجام شد، نشان داد که پلی ساکاریدها از نظر انواع پیوندها و وزن‌های مولکولی متنوع هستند و این تنوع تأثیر قابل توجهی روی فعالیت زیستی آنها دارد. در این ترکیبات، پیوندهای گلیکوزیدی درون زنجیره‌ای از انواع مختلف (۳، ۴، ۵ → ۱)، (۱ → ۵) و (۱ → ۶) شناسایی شده‌اند. این نوع پیوند مولکولی با پیوند درون ملکول نشاسته که از نوع گلیکوزیدی ۱، ۴ است، متفاوت است و باعث می‌شود این پلی ساکاریدها نتوانند توسط آنزیمه‌های گوارشی موجود در دستگاه

4. Watson BS, Lei Z, Dixon RA, Sumner LW. Proteomics of *Medicago sativa* cell walls. *Phytochemistry* 2004; 65:1709-20.
5. Liu X, Sun Y, Bian J, Lv M, Han T, Sun H, et al. Phytochemical and chemotaxonomic study on *Medicago sativa* L.(leguminosae). *Biochem Syst Ecol* 2018; 80: 55-8.
1. Nakhei rad MH, Khiyabaniyan asl A, Azari Takami Gh, Razavilar V, Tehrani Sharif M. Effect of probiotic *Pediococcus acidilactic* and manioligosaccharide and beta-glucan prebiotic on immune salmon and survival parameters against *Streptococcus iniae*. *Vet Res Biol Prod* 2020; 132: 40-47. [In Persian]
6. Wang J, Qin C, He T, Qiu K, Sun W, Zhang X, et al. Alfalfa-containing diets alter luminal microbiota structure and short chain fatty acid sensing in the caecal mucosa of pigs. *J Anim Sci Biotechnol* 2018; 9: 1-9.
7. Teferra TF. Possible actions of inulin as prebiotic polysaccharide: A review. *Food Front* 2021; 2:407-16.
8. Snow Setzer M, Sharifi-Rad J, Setzer WN. The search for herbal antibiotics: An in-silico investigation of antibacterial phytochemicals. *Antibiotics* 2016; 5:30.
9. Khan S, Jan G, Bibi H, Sher J, Ullah S, Abidullah S. Phytochemical screening and antimicrobial activity of the *Cichorium intybus* (Familyasteraceae) and *Medicago sativa* (Familyfabaceae) Peshawar. *Pak J Pharmacognosy Phytochem* 2018; 7:603-16.
10. Antonio C, Dolores M, Martínez Carrera DC, Rivera Tapia JA, Portillo Reyes R, Morales Almora P, et al. Detection of polysaccharides in *Ganoderma lucidum* extracts. *Nova scientia*2018; 10:247-57.
11. Kato Y, Matsuda T, Hashimoto T. New gel permeation column for the separation of watersoluble polymers. *J Chromatogr A* 1985; 332: 39-46.
12. Rovkina K, Krivoshchekov S, Guryev A, Yusubov M, Belousov M. Water-soluble polysaccharides of Alfalfa (*Medicago sativa* (Fabaceae)) of flora of Krasnoyarsk krai. *Russ J Org Chem* 2018; 44: 854-9.
13. Slobodianik L, Budniak L, Marchyshyn S, Kostyshyn L, Zakharchuk O. Analysis of carbohydrates in *Saponaria officinalis* L. using GC/MS method. *Pharmacria* 2021; 68:339-45.
14. Starke I, Holzberger A, Kamm B, Kleinpeter E. Qualitative and quantitative analysis of carbohydrates in green juices (wild mix grass and alfalfa) from a green biorefinery by gas chromatography/mass spectrometry. *Fresenius J Anal Chem* 2000; 367: 65-72.
15. Chamachar MM, Fazeli MR, Salimi M, Samadi N. Growth promoting activity, anti-biofilm effect, and down regulation of *papC* and *rcsA* genes expression by *Medicago sativa* (alfalfa) extract. *Food Bioscience* 2022; 50: 102182
16. Abobaker A, Alzwi A, Alraied AHA. Overview of the possible role of vitamin C in management of COVID-19. *Pharmacol Rep* 2020; 72:1517-1528.
17. Darabipour F, Isazadeh Kh, Faazi Ghasemi M, Sadeghi Khamene Tabrizi S. Evaluation of antagonism effects *Lactobacillus Acidophilus* *Lactobacillus palantaromber Z Enterobacteriaceae* isolated from plants. *Microbe World Magazine* 2015 14-39.
18. Gillon AD, Saska I, Jennings CV, Guarino RF, Craik DJ, Anderson MA. Biosynthesis of circular proteins in plants. *Plant J* 2008; 53:505-15.
19. Li Y, Fu X, Ma X, Geng S, Jiang X, Huang Q, et al. Intestinal microbiome-metabolome responses to essential oils in piglets *Front Microbiol* 2018;9:1988.
20. Liu C, Xue WJ, Ding H, An C, Ma SJ, Liu Y. Probiotic Potential of *Lactobacillus* Strains Isolated from Fermented Vegetables in Shaanxi, China. *Front Microbiol* 2022; 12:774903.