Medical Science Journal of Islamic Azad University Vol. 34, No. 4, Winter 2024 ORIGINAL ARTICLE

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

Morvarid Moradi Chamachar[1], Nasrin Samadi[2], Mohammadreza Fazeli[3], Mona Salimi[4]
[1] PhD Student, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Science and Research Unit, Tehran Iran
[2]Associate Professor, Drug and Food Control Department, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3] Professor, Department of Drug and Food Control, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[4] 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 bacills 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

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-06-27]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1403.34.4.6.1]
[DOI: 10.61186/iau.34.4.401]

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۳۴، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۳، صفحات ۴۰۱ تا ۴۱۰

Original Article

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-06-27]

[DOR: 20.1001.1.10235922.1403.34.4.6.1]
[DOI: 10.61186/iau.34.4.401]

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

مروارید مرادی چماچار[۱]، نسرین صمدی[۲]، محمد رضا فاضلی[۳]، مونا سلیمی[۴]

[۱] دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات. تهران، ایران
[۲] دانشیار، گروه کنترل دارو و غذا، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
[۳] استاد، گروه کنترل دارو و غذا، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
[۴] استاد، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، انستیتو 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 هیدروالکلی گیاه یونجه در مقایسه با اینولین در شرایط آزمایشگاهی بود.*

روش بررسی: *عصاره گیری 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 پلانتاروم و همچنین اثر آن بر فعالیت ضد میکروبی سوپرناتانت 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 پلانتاروم 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 تعدیل میکروبیوم روده انسان و حیوان می‌کند.*

واژگان کلیدی: *یونجه، پروبیوتیک، پری‌بیوتیک، اینولین.*

مقدمه

خواص ضد میکروبی گیاهان از دیرباز مورد توجه بوده و گذشتگان بدون اطلاع از وجود میکروب ها و تنها از طریق تجربه‌های بالینی از این گیاهان در درمان بیماری‌های عفونی استفاده می‌کردند. گیاهان دارویی معمولاً 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 ملیلوتوس با نام علمی Melilotus officinalis. 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، آرژنین، 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 وغذا، نسرین صمدی (**email**: samadin@tums.ac.ir)
ORCID ID: 0000000160366272

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۹/۲
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۱۱/۲۸

می‌شود. از عصاره هیدرواتانولی، 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 شناخته شده با نام 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، ترئونین و لیزین است. قسمت‌های هوایی منبع خوبی از کلروفیل و ویتامین‌های E، C، B1، B2، B6 و B12 و نایسین، فولیک اسید، اینوزیتول، کولین و بتاکاروتن است و مواد معدنی با ارزشی مثل Mg، Fe، Cu، Ca، Mn، P، Sn، Si دارد (۴). فعالیت بیولوژیکی آن از آلکالوئید، 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 آنتی‌اکسیدانی، آپی ژنین، تریسین، لوتئولین و ترکیبات فنولیک است که فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و محافظت‌کننده نورونی دارند (۵). یونجه در درمان اختلالات کلیوی، اختلالات سیستم عصبی، آرتریت، التهاب، جوش، آسم و سرفه استفاده می‌شده است. در چین، از آن در بیماری سنگ کلیه، تب، بهبود علائم یائسگی، زخم معده، رفع احتباس مایعات و تورم استفاده می‌کردند. در هند، ترکیه و عراق برای درمان آرتریت 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 سرطان روده بزرگ و سینه بوده و دارای اثر محرک 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 واسید استیک تولید می‌کنند که با کاهش pH روده بزرگ رشد پاتوژن‌ها مهار می‌شود. همچنین پپتیدها و پروتئین‌هایی تولید می‌کنند که اثرات بازدارندگی بر روی عوامل بیماری زا دارند (۸). با توجه به توزیع گسترده گیاهان دارویی در کشور ما، داروهای گیاهی می‌توانند پایه مناسبی برای جایگزینی داروهای شیمیایی جهت درمان عفونت‌های میکروبی فراهم آورند (۹). با توجه به کاربردهای ذکرشده گیاه یونجه Medicago Sativa و لزوم بررسی ویژگی های عصاره هیدرو الکلی آن، هدف از این مطالعه بررسی ترکیب و خاصیت پری بیوتیکی عصاره هیدروالکلی گیاه یونجه تهیه شده از استان خوزستان روی دو گونه باکتری‌های پروبیوتیک که شامل باکتری لاکتی کازئی باسیلوس کازئی و لاکتی پلنتی باسیلوس پلانتاروم که به عنوان میکروارگانیسم‌های ایمن می‌شناسند. این دو باکتری، از رایج‌ترین باکتری‌های پروبیوتیک 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 صفراوی روده کوچک را دارند و همچنین تعیین غلظت مناسبی از عصاره، جهت استفاده در فراورده‌های 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 مکمل های 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 جمع‌آوری شد. این گیاه در دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران شناسایی و با شماره هرباریومی 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 جمع‌آوری شد و حلال آن با روش تقطیر در خلأ 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 متانولی، اتیل استاتی، هگزانی و عصاره آبی هستند (۱۰). بنابراین در این مطالعه از عصاره اتانولی گیاه استفاده شد.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-06-27]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1403.34.4.6.1]
[DOI: 10.61186/iau.34.4.401]

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 اندازه‌گیری شد (۱۱). در فهلینگ «A»، ۷ گرم CuSO4.5H2O در ۲ قطره آب مقطر رقیق حاوی اسید سولفوریک حل شد. در «Fehling «B در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر، 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 سانتی‌گراد غوطه‌ور 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 ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد 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 میلی‌گرم عصاره یونجه، چند قطره تری فلورواستیک اسید ۴ مولار اضافه شد و در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد 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 سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس نمونه سرد شده و مشتقات قندها سه بار هر بار با ۵ میلی‌لیتر هگزان استخراج انجام شد. شناسایی پیک‌های مونوساکاریدها (آرابینوز، گلوکز، گالاکتوز، مانوز، رامنوز، زایلوز، گالاکتورونیک اسید، گلوکورونیک اسید و فروکتوز) با استفاده از دستگاه جی سی مس و بر اساس زمان بازداری استاندارد قندها و کتابخانه دستگاه انجام شد. جداسازی نمونه‌ها با استفاده از کروماتوگرافی گازی Agilent با استفاده از ستون HD-5 MS، قطر داخلی کاپیلاری ۰/۲۵ میلی‌متر، گاز حامل (هلیم) سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه، در یک گرادیان دمایی ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه انجام شد. سپس دما ۱۰ درجه سانتی‌گراد در دقیقه افزایش یافت (تا ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد) و دمای انژکتور ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. شناسایی با استفاده از Agilent mass spectrometer انجام شد (۱۳, ۱۴).

بررسی پلی ساکاریدهای عصار ه‌یونجه

برای جداسازی پلی ساکاریدها یونجه از کروماتوگرافی تبادل یونی با استفاده از ستون cellulose DEAE- (اندازه ذرات ۲۰۰-۱۰۰ میکرومتر) استفاده شد. حدود ۵۰۰ میلی‌گرم عصاره در ۵ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد؛ و با استفاده از فاز متحرک محلول کلرید سدیم ۰/۰۱، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴، مولار از ستون با سرعت ۲ میلی‌لیتر در دقیقه عبور داده شد. فراکشن‌های مختلف با حجم ۲۰ میلی‌لیتر جمع‌آوری شد و وجود قند در فراکشن‌ها با استفاده از روش کربازول- سولفوریک اسید بررسی شد. سپس فراکشن‌ها بر روی منحنی برده شده و فراکشن‌های اصلی گزارش شدند (۱۱, ۱۵).

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

برای این منظور ارلن‌هایی به شرح زیر تهیه شد. دوارلن حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط استاندارد MRS (طبق فرمول ارائه شده توسط شرکت Merck آلمان) تهیه شد و به هر کدام از آن‌ها نیم میلی‌لیتر از سوسپانسیون *لاکتی پلنتی باسیلوس پلانتاروم* 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 هرکدام حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط MRS فاقد 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 به‌طور جداگانه ۰/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری *لاکتی کازئی باسیلوس کازئی* اضافه شد و به دو ارلن دیگر نیز ۰/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون *باکتری لاکتی پلنتی باسیلوس پلانتاروم* اضافه گردید. دوباره چهار ارلن دیگر هرکدام حاوی ۵۰ میلی‌لیتر 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 ۰/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری *لاکتی کازئی باسیلوس کازئی* اضافه شد و به دو ارلن دیگر نیز ۰/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری *لاکتی*

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-06-27]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1403.34.4.6.1]
[DOI: 10.61186/iau.34.4.401]

پلنتی باسیلوس پلانتاروم اضافه شد. سپس ارلن‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند و در فواصل زمانی ۶ و ۱۲ و ۲۴ از نظر اثر ضد میکروبی، تعداد باکتری‌های زنده بررسی شدند.

برای این منظور نمونه برداشته شده از هر کشت باکتری در ۴۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و سپس سوپرناتانت حاصل با عبور دادن از فیلتر ۰/۲۲ میکرون استریل شد. نیمی از این سوپرناتانت به میکروتیوپ دیگری منتقل شد و pH آن با سود یک نرمال استریل به حدود خنثی (۶/۵-۶) رسید. سپس از کشت *استافیلوکوکوس اورئوس Staphylococcus aureus* بر روی محیط کشت کازو آگار، با استفاده ازسرم فیزیولوژی استریل سوسپانسیونی با OD=۰/۲۵ در طول موج ۶۰۰ نانومتر تهیه شد که غلظتی معادل CFU/ml ۱۰^{۸} × ۱/۵ دارد و با استفاده از سواپ استریل به صورت تمام سطح روی سطح محیط مولر هینتون آگار که آگار آن یک درصد باشد کشت داده شد. با استفاده از چاهک زن استریل درروی هر پلیت ۴ چاهک به قطر ۷ میلی‌متر ایجاد شد. سپس در دو چاهک روبرو از سوپرناتانت اضافه شد و برای انتشار بیشتر در زیر لامینار فلو به مدت ۳ ساعت قرار داده شد. سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری گردید پس از آن هاله عدم رشد ایجاد شده در اطراف چاهک‌ها برحسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد.

بررسی اثر ضدمیکروبی

اثر ضدمیکروبی سوپرناتانت حاصل از محیط MRS حاوی ٪۲/۵ عصاره در مقابل باکتری‌های استاندارد که از کلکسیون باکتریها و قارچهای عفونی و صنعتی ایران Persian Type Culture Collection (PTCC) تهیه شده بودند، بررسی شد. این باکتری‌ها دارای مقاومت مشخص و استانداردی نسبت به عوامل ضد میکروبی هستند. برای بررسی اثر ضد میکروبی در شرایط واقعی، در کنار این باکتری‌ها از انواع جدا شده از بیماران (سویه‌های بالینی) که مقاومت بالاتری نسبت به سویه‌های استاندارد کلکسیونی دارند نیز استفاده شد.

برای این منظور سوپرناتانت‌های حاصل در ۴۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و سپس با عبور دادن از فیلتر ۰/۲۲ میکرون استریل شد. سپس از کشت باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مختلف شامل استافیلوکوکوس اورئوس Staphylococcus areu، استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MSRA)، سودوموناس ائروژینوزا (Pseudomonas aeruginosa)، کلبسیلا پنومونیه (Klebsiella pneumoniae) و اشریشیا کلای (Eschreichia coli) بر روی محیط کشت کازو آگار، با استفاده از سرم فیزیولوژی استریل سوسپانسیونی با جذب نوری مناسب در طول موج ۶۰۰ نانومتر تهیه شد که غلظتی معادل CFU/ml ۱۰۸ × ۱/۵ داشته باشد. سپس با استفاده از سواپ استریل به صورت تمام سطح روی سطح محیط مولر هینتون آگار که آگار آن یک درصد باشد کشت داده شدند و با استفاده از چاهک زن استریل در روی هر پلیت چاهک‌هایی به قطر ۷ میلی‌متر ایجاد شد. درون چاهک‌ها حجم ۱۰۰ میکرولیتر از سوپرناتانت اضافه شد و برای انتشار بیشتر در زیر لامینار فلو به مدت ۳ ساعت قرار داده شد. سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری گردید پس از آن هاله عدم رشد ایجاد شده در اطراف چاهک‌ها برحسب میلی‌متر اندازه گیری شد.

تحلیل آماری

تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SPSS و توسط آنالیز واریانس یک‌طرفه و Tykey post hoc انجام شد. تفاوت‌ها در $p<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شدند.

یافته‌ها

مقدار پلی ساکاریدها و خاکستر عصاره گیاه یونجه

در محلول حاوی ۲/۵ درصد عصاره یونجه مقدار پلی ساکارید ۱۰/۱ درصد بود. به عبارت دیگر مقدار کربوهیدرات آن در صد میلی‌لیتر از محیط حاوی ۲/۵ عصاره حدود ۰/۲۶ گرم محاسبه شد.

نتایج تعیین خاکستر نشان داد که مقدار خاکستر موجود در عصاره یونجه ۲/۷ و در مورد اینولین ۰/۱۸ درصد بود.

نتایج آنالیز GC-MS عصاره گیاه یونجه

نتایج این آزمون نشان داد که عصاره یونجه حاوی مونوساکاهای گلوکز، زایلوز، فروکتوز، آرابینوز و گالاکترونیک اسید است که مقادیر نسبی آن‌ها در جدول ۱ و شکل ۱ نشان داده شده است.

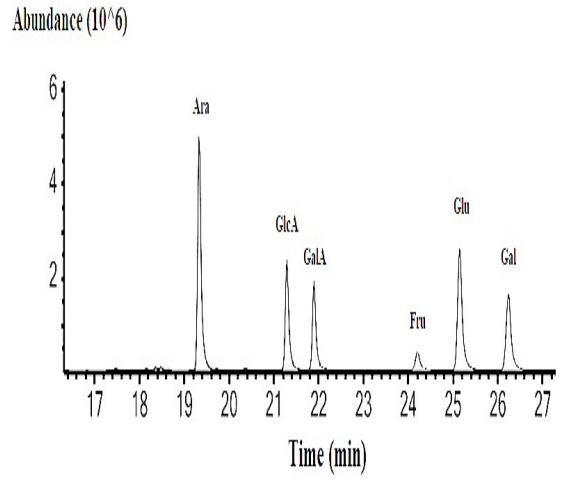
جدول ۱. ترکیب مونوساکاریدهای عصاره یونجه بر اساس آنالیز GC/MS

منوساکارید	درصد نسبی (وزنی/وزنی)
فرکتوز	۳/۲
گلوکز	۱۷/۱
گالاکتوز	۱۱/۲
آرابینوز	۳۹/۲
گالاکترونیک اسید	۱۶/۵
گلوکورونیک اسید	۱۲/۸

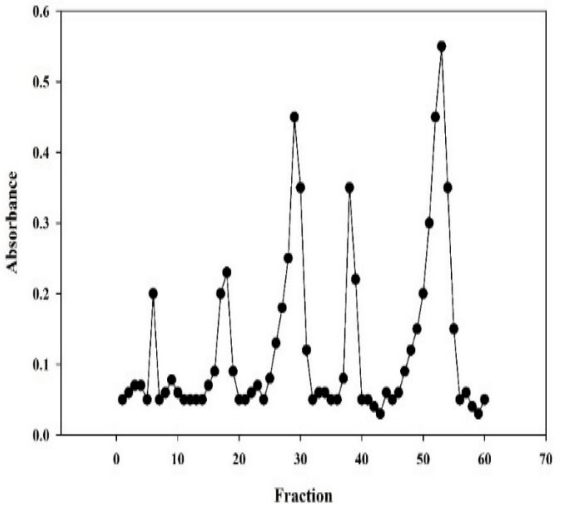
[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-06-27]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1403.34.4.6.1]
[DOI: 10.61186/iau.34.4.401]

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.



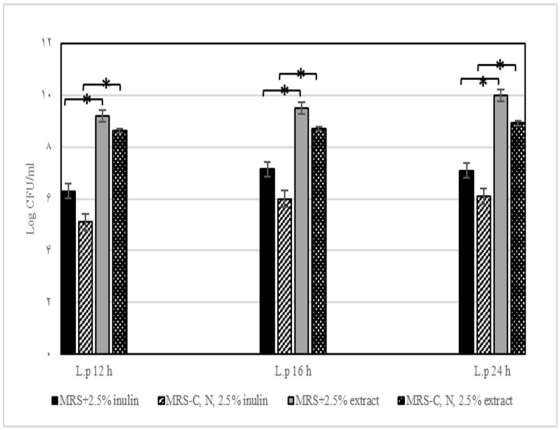
شکل ۱. آنالیز GC/MS عصاره یونجه حاوی مونوساکاهای گلوکز، زایلوز، فروکتوز، آرابینوز، گالاکترونیک اسید و گلوکورونیک اسید



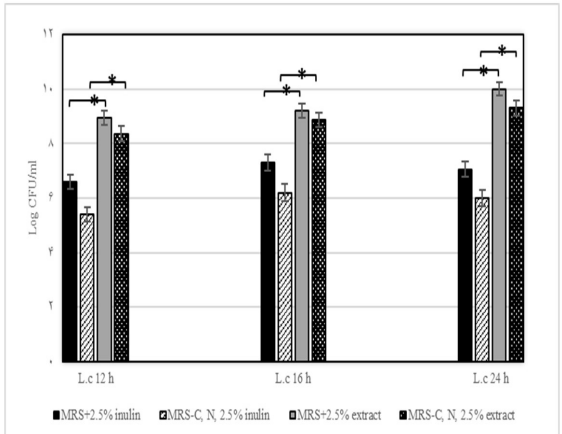
شکل ۲. آنالیز فراکشن‌های پلی ساکاریدی در عصاره یونجه

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

نتایج بررسی رشد و فعالیت ضد میکروبی سوپرناتانت *لاکتی پلنتی باسیلوس پلانتاروم* و*لاکتی 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 ساعات 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 فاقد منبع کربن و نیتروژن حاوی ۲/۵٪ عصاره به طور معنی‌داری بیشتر از محیط‌های مشابه که حاوی ۲/۵٪ اینولین بودند به دست آمد ($P<۰/۰۵$).



شکل ۳. مقایسه اثر غلظت ۲/۵ درصد اینولین با عصاره گیاه یونجه (۱۷) بر روی رشد *لاکتی پلنتی باسیلوس پلانتاروم* در محیط استاندارد MRS و MRS فاقد منبع کربن و نیتروژن. *$P<۰/۰۵$



شکل ۴. مقایسه اثر غلظت ۲/۵ درصد اینولین با عصاره گیاه یونجه (۱۷) بر روی رشد *لاکتی کازئی باسیلوس کازئی* در محیط استاندارد MRS و MRS فاقد منبع کربن و نیتروژن. *$P<۰/۰۵$

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-06-27]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1403.34.4.6.1]
[DOI: 10.61186/iau.34.4.401]

جدول ۲. درصد فراکشن‌های پلی ساکاریدی عصاره یونجه

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

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

بررسی اثر ضدمیکروبی سوپرناتانت حاصل از محیط MRS حاوی ۲/۵٪ عصاره در مقابل باکتری‌های مختلف کلکسیونی و بالینی

نتایج میانگین قطر هاله عدم رشد سوپرناتانت *لاکتی پلنتی باسیلوس پلانتاروم* و*لاکتی کازئی باسیلوس کازئی* در محیط MRS حاوی ۲/۵ درصد عصاره یونجه بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی (*استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین، *سودوموناس ائروژینوزا*، *کلبسیلا پنومونیه* و *اشریشیا کلای*) مختلف از نمونه‌های کلکسیونی و بالینی در جدول ۴ آورده شده است. همان‌گونه که ملاحظه می‌شود سوپرناتانت حاصل از هر دو باکتری *لاکتی پلنتی باسیلوس پلانتاروم* و*لاکتی کازئی باسیلوس کازئی* دارای اثر مهاری بر روی باکتری‌های مورد آزمون استاندارد و بالینی بودند.

بحث

میکروبیوتای روده عملکردهای مهمی در سلامت میزبان دارند و می‌توانند مستقیماً بر شرایط فیزیولوژیکی بدن مانند بهبود سد روده، تحریک مکانیسم‌های دفاعی در برابر پاتوژن‌ها، بهبود سیستم ایمنی میزبان، افزایش مکانیسم های دفاعی در برابر بیماری های التهابی روده، تنظیم خود ایمنی، تولید متابولیت‌های بیولوژیکی و از بین بردن سلول‌های سرطانی اثر

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

زمان (ساعت)	*لاکتی کازئی باسیلوس کازئی*			*لاکتی پلنتی باسیلوس پلانتاروم*		
	MRS	محیط حاوی ۲/۵٪ عصاره (۱۷)	محیط حاوی ۲/۵٪ اینولین	MRS	محیط حاوی ۲/۵٪ عصاره (۱۷)	محیط حاوی ۲/۵٪ اینولین
۱۲	۱۱ ± ۰/۵	۱۱ ± ۰/۳	۱۰/۵ ± ۰/۵	۱۱ ± ۰/۳	۱۲ ± ۰/۵	۱۱/۵ ± ۰/۳
۱۶	۱۳ ± ۰/۲	۱۵/۵ ± ۰/۵	۱۳/۵ ± ۰/۵	۱۳ ± ۰/۵	۱۶ ± ۰/۳	۱۴/۵ ± ۰/۵
۲۴	۱۷ ± ۰/۵	۱۹ ± ۰/۴	۱۶/۵ ± ۰/۳	۱۶ ± ۰/۳	۱۸ ± ۰/۵	۱۴/۵ ± ۰/۳

جدول ۴. میانگین نتایج هاله های عدم رشد سوپرناتانت MRS استاندارد حاوی ۲/۵٪ عصاره *لاکتی پلنتی باسیلوس پلانتاروم* و*لاکتی کازئی باسیلوس کازئی* روی باکتری‌های مختلف

باکتری	هاله عدم رشد (میلی‌متر)	
	لاکتی پلنتی باسیلوس پلانتاروم	*لاکتی کازئی باسیلوس کازئی*
اشریشیا کلی PTCC ۱۳۳۰	۱۶/۵	۱۷/۵
اشریشیا کلی (بالینی)	۱۵/۵	۱۷
استافیلوکوکوس اورئوس PTCC ۱۱۱۲	۱۸	۱۹
استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین	۱۴/۵	۱۴
سودوموناس آئروژینوزا PTCC ۱۰۷۴	۱۲	۱۱/۵
سودوموناس آئروژینوزا (بالینی)	۱۰/۵	۱۱
کلبسیلا پنومونیه PTCC ۱۰۵۳	۱۱/۵	۱۲
کلبسیلا پنومونیه (بالینی)	۱۲	۱۲

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-06-27]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1403.34.4.6.1]
[DOI: 10.61186/iau.34.4.401]

بگذارند (۱۷). در اصل، لاکتوباسیلوس‌ها را به عنوان میکروارگانیسمهای ایمن می‌شناسند. *لاکتو باسیلی باسیلوس پلانتاروم و لاکتی کازئی باسیلوس کازئی*، از رایج‌ترین باکتریهای پروبیوتیک 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 صفراوی روده کوچک برای آنها ضروری است (۲۲). لاکتوباسیلوس‌ها به عنوان آغازگر به محصولات غذایی تخمیری اضافه می‌شوند. این باکتری‌ها 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 ویژگی‌های غذایی غنی و ترکیبات زیست فعال کشت می‌شود مطابق مطالب ذکرشده در مقالات، گیاه یونجه خواص متفاوتی همچون اثرات ضد باکتریایی دارد و همچنین دارای ترکیبات آنتی‌اکسیدان و ضدالتهاب نیز می‌باشد. یکی از اثرات احتمالی گیاه یونجه، می‌تواند نقش آن در بهبود وضعیت دستگاه گوارش از راه کمک به رشد باکتری‌های اسید لاکتیک باشد. به عنوان مثال مطالعه‌ای که بر روی تعدادی بچه خوک انجام شد، نشان داد که افزودن عصاره یونجه به رژیم غذایی با افزایش فراوانی نسبی *فرمیکوتها* همراه بود، درحالی‌که جمعیت *باکتروئیدس‌ها* 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 آلفالفا بر روی میکروبیوتای خوک پرداختند. در مطالعه آن‌ها به ۲۴ خوک به طور تصادفی غذای حاوی ۰٪، ۵٪، ۱۰٪ و ۱۵٪ آلفالفا به مدت ۲۸ روز داده شد. با استفاده از روش توالی یابی بر اساس ژن 16S rRNA نشان داده شد که رژیم حاوی آلفالفا به طور قابل توجهی فراوانی جنس‌های *توریسی باکتر* (*Touricibacter*)، *اسینتوباکتر* (*Acinetobacter*)، *پاراکوکوس* (*Paracoccus*)، *اسیدیفیلوم* (*Acidiphyllum*)، *پروپیونی باکتریوم* (*Propionibacterium*)، *کورینه باکتریوم* (*Corynebacterium*)، *سودوموناس* (*Pseudomonas*) و *استافیلوکوکوس* (*Staphylococcus*) را کاهش داد و به طور قابل توجهی فراوانی جنس *لاکنوسپیرا*، *مارووینبریانتیا* و *دسولفوویبریو* را در سکوم افزایش داد. همچنین غلظت بوتیرات به طور معنی‌داری در روده خلفی خوک ها بعد از تیمار با یونجه افزایش یافت (۷).

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 می‌شوند، به منظور طراحی فرآورده‌های 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 پلانتاروم* و*لاکتی 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 معنی‌داری بیشتر از محیط حاوی اینولین بود. همچنین اثر ضدمیکروبی سوپرناتانت حاصل از کشت پروبیوتیک‌ها در محیط حاوی عصاره یونجه نیز قطر هاله‌های عدم رشد بزرگ‌تری نسبت به سوپرناتانت حاصل ازمحیط حاوی اینولین و محیط MRS استاندارد نشان داد. علت این اثر عصاره به پلی ساکاریدهایی نسبت داده می‌شود که خواص پری بیوتیکی دارند. در پژوهشی ارتباط میان ترکیبات پلی ساکاریدی یونجه و تکثیر و عملکرد ایمنی لنفوسیت‌های 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 آنتی‌اکسیدانی ارتباط وجود دارد، به طوری که می‌تواند استرس اکسیداتیو را در فیبروبلاست‌های جنینی موش MEFs القا شده با O_2 H_2 از طریق فعال کردن مسیرهای MAPK/P38 و مهار مسیرهای NK-kB کم کند، اما تاکنون مطالعه‌ای 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 آنزیم‌های گوارشی معده هضم نمی‌شوند می‌توانند باعث افزایش تنوع زیستی میکروبیوتای روده و کاهش بروز بیماری‌های مزمن شوند. پری بیوتیک‌ها مواد غذایی غیرقابل هضم و یا ترکیبات غذایی هستند که به شکل تغییر نیافته توسط فرآیند گوارش، وارد کولون می‌شوند و به عنوان یک منبع انرژی و رشد برای باکتری‌های مفیدی که در روده بزرگ زندگی می‌کنند، عمل می‌کنند. این اتفاق نظر وجود دارد که پری بیوتیک‌ها با تامین تغذیه برای باکتری‌های پروبیوتیک، به بهبود تعادل پروبیوتیک روده‌ای در روده کمک می‌کنند. پری بیوتیک‌ها نه تنها به‌عنوان تغذیه و

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-06-27]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1403.34.4.6.1]
[DOI: 10.61186/iau.34.4.401]

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. کربوهیدارت‌های غیرقابل هضم دستگاه گوارش شامل پلی ساکاریدها مانند پیرودکسترین، الیگوساکاریدها مانند فروکتوالیگوساکارید، ترانس-گالاکتوالیگوساکارید، گلوکوالیگوساکارید، زایلوالیگوساکارید و دی‌ساکاریدها مانند لاکتولوز و لاکتیتول هستند. از طرفی مانان به عنوان یک پری بیوتیک و منبع انرژی و سوبسترا برای لاکتوباسیلوس‌های روده عمل می‌کند و در بهبود فلور روده طیور بسیار موثر است. همچنین مانان می‌تواند با اتصال به دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی ازجمله 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 غشای روده جلوگیری کند. از طرف دیگر با افزایش ترشح ایمونوگلوبولین‌ها از اتصال باکتری‌های بیماری‌زا یا سموم آنها به اپی تلیوم روده جلوگیری می‌کنند. مانان اولیگوساکاریدها 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 باکتری های 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→۱)، (۵→۱) و (۶→۱) 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 آنزیم‌های گوارشی موجود در دستگاه 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 ادجوانت 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 آن ها به عنوان مکمل های غذایی یا 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 پلانتاروم* و همچنین افزایش اثر ضد میکروبی سوپرناتانت 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 فراورده های مکمل خوراکی اضافه کرد. با توجه به اثر مثبت عصاره یونجه بر روی رشد دو گونه پروبیوتیک مورد مطالعه، تهیه فرمولاسیون های 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.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-06-27]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1403.34.4.6.1]
[DOI: 10.61186/iau.34.4.401]

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 inaei*. 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 scientia2018; 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. Slobodianiuk L, Budniak L, Marchyshyn S, Kostyshyn L, Zakharchuk O. Analysis of carbohydrates in Saponaria officinalis L. using GC/MS method. Pharmacia 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.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-06-27]

[DOR: 20.1001.1.10235922.1403.34.4.6.1]

[DOI: 10.61186/iau.34.4.401]