

Nutritional Characteristics of Alfalfa Sprout and the Impact of Fermentation with Probiotic Bacteria on Its Antioxidant and Prebiotic Properties

Maryam Ghaderi-Ghahfarokhi^{*1}, Sahar Elmi Anvari²,
Maryam Shakarami³, Mehdi Zarei⁴

¹ Assistant Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran, Email: m.ghaderi@scu.ac.ir

² Ph.D. student, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

³ MSc graduate, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

⁴ Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Article Info

Article type:
Research Full Paper

Article history:
Received: 2024-8-3
Revised: 2024-9-19
Accepted: 2024-9-22

Keywords:
Alfalfa sprout
Antioxidant activity
Nutritional values
Prebiotic
Probiotic

ABSTRACT

Background and objectives: Plant sprouts are receiving a significant deal of attention because of their abundance, bioavailability of components, and health benefits. Germinated legume seeds were the most common sprouts consumed in the human diet. Alfalfa (*Medicago sativa*) sprout is a valuable source of protein, fiber, minerals, vitamins (B vitamins), glucosinolate, and phenolic compounds. Alfalfa sprouts are usually consumed as dehydrated leaves, powder, or dietary supplements in the form of tablets. Regarding nutritional values, alfalfa sprout powder (ASP) could act as a prebiotic agent. The present study aimed to investigate the nutritional values and in vitro prebiotic potential of ASP on two probiotic strains, namely *Lactobacillus casei* ATCC 393 and *Bifidobacterium longum* ATCC 55813. Also, the effects of fermentation of ASP by probiotics on polyphenolic content and antioxidant activity were investigated.

Materials and methods: Fatty acid composition, amino acid profile, and mineral content of ASP were determined using a gas chromatography-mass detector, an amino acid analyzer, and inductively coupled plasma-optical emission spectrometry, respectively. ASP at two concentration levels of 0.5 and 1% was tested for its growth stimulation effect on two probiotics, *L. casei* and *B. longum*. Fructooligosaccharide (FOS) and glucose were used as standard prebiotic and control positive, respectively. The changes in probiotic populations and pH were monitored during 48 h of fermentation in glucose-free MRS broth (GF-MRSB). The total phenolic content (TPC) and antioxidant activity of ASP were evaluated during fermentation using the Folin–Ciocalteu method and the DPPH radical scavenging assay.

Results: ASP contains high levels of aspartic acid, glutamic acid, and essential amino acids, including phenylalanine, leucine, and lysine. It also includes a high content of unsaturated fatty acids, including linoleic and oleic acids. Potassium was found to be the mineral with the highest composition, followed by phosphorus and calcium. Both

probiotic strains could grow effectively in the presence of ASP. The cell numbers of *L. casei* and *B. longum* increased by 4.91 and 5.11 Log CFU/ml after 48 h fermentation of ASP-1%, which were comparable with the stimulatory effects of FOS and glucose. The pH decrease of GF-MRSB was negatively correlated with the concentration of ASP. Antioxidant activity and TPC increased continually during fermentation by both probiotics, with *L. casei* exhibiting a stronger impact.

Conclusion: Results demonstrated that ASP is an excellent source of minerals, essential amino acids, and unsaturated fatty acids. Probiotic bacteria not only survive in the presence of ASP but also increase polyphenolic content, thus enhancing the antioxidant activity and functional capacity of the fermented ASP. Fermenting phenolic compound-rich plant sprouts with probiotic bacteria can be considered a novel approach to the development of functional foods.

Cite this article: Ghaderi-Ghahfarokhi, M., Elmi Anvari, S., Shakarami, M., Zarei, M. 2024. Nutritional Characteristics of Alfalfa Sprout and the Impact of Fermentation with Probiotic Bacteria on Its Antioxidant and Prebiotic Properties. *Food Processing and Preservation Journal*, 16(3), 55-78.



© The Author(s).

DOI: 10.22069/fppj.2024.22681.1830

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

ASP بود و پس از آن فسفر و کلسیم قرار گرفتند. هر دو سویه‌ی پروبیوتیک رشد قابل ملاحظه‌ای در حضور ASP داشتند. جمعیت لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم لانگوم طی ۴۸ ساعت تخمیر با ۱٪-ASP به ترتیب ۴/۹۱ و ۵/۱۱ Log CFU/ml افزایش یافت که قابل مقایسه با اثرات گلوکز و FOS بود. کاهش در pH محیط کشت GF-MRSB با غلظت ASP همبستگی منفی نشان داد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی و TPC در طول زمان تخمیر توسط هر دو باکتری افزایش یافتند که اثر لاکتوباسیلوس کازئی بیشتر بود.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد ASP منبع عالی از املاح، اسیدهای آمینه ضروری و اسیدهای چرب غیراشباع است. باکتری‌های پروبیوتیک نه تنها در حضور ASP زنده ماندند بلکه باعث افزایش ترکیبات فنولی و بهبود فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ظرفیت عملکردی ASP تخمیر شده گردیدند. تخمیر جوانه‌های گیاهی غنی از ترکیبات فنولی با باکتری‌های پروبیوتیک، می‌تواند به‌عنوان رویکرد نوینی در توسعه‌ی غذاهای عملگرا مدنظر قرار گیرد.

استناد: قادری قهفرخی، مریم؛ علمی انواری، سحر؛ شاکرمی، مریم؛ زارعی، مهدی. (۱۴۰۳). ویژگی‌های تغذیه‌ای جوانه یونجه و تأثیر تخمیر با باکتری‌های پروبیوتیک بر ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و پری‌بیوتیکی آن. *فراوری و نگهداری مواد غذایی*، ۱۶ (۳)، ۵۵-۷۸.

DOI: 10.22069/fppj.2024.22681.1830

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان



© نویسندگان.

مقدمه

ارزش تغذیه‌ای و ویژگی‌های حسی بسیاری از دانه‌های غلات و حبوبات با فرایند جوانه‌زنی بهبود می‌یابد. فرآیند جوانه‌زنی چندین قرن است که با اهداف گوناگون نظیر نرم شدن مغز دانه، بهبود ویژگی‌های تغذیه‌ای و کاهش محتوای ترکیبات ضد تغذیه‌ای مورد استفاده قرار گرفته است و با بهبود ویژگی‌های تغذیه‌ای، محتوای ترکیبات زیست فعال دانه‌ها و قابلیت خوراکی آن‌ها همراه است (۱). جوانه‌ها جزء مواد غذایی گیاهی غنی از فیتونوترینت‌ها می‌باشند و منابع خوبی از فلاونوئیدها، پلی‌فنول‌ها، گلوکوزینولات‌ها، ایزوتیوسیانات‌ها، پروتئین، فیبر، ویتامین‌ها و مواد معدنی محسوب می‌شوند؛ به همین دلیل جوانه‌ها را به تنهایی می‌توان یک "غذای فراسودمند" در نظر گرفت که فرای اثرات تغذیه‌ای، دارای ویژگی‌های بهبود سلامت و پیشگیری از بیماری‌ها نیز می‌باشند (۲، ۳). در اکثر دانه‌ها، جوانه‌زنی سبب افزایش تجمع ترکیبات فنولی محلول در جوانه و دانه‌ی جوانه زده می‌شود و محتوای فنولی آن‌ها با بسیاری از میوه‌ها و سبزیجات قابل مقایسه است (۴). یونجه^۱ با نام علمی *Medicago sativa* L یک گیاه علفی گل‌دار چندساله از خانواده بقولات متعلق به جنس *Medicago* است و به‌عنوان یکی از اولین و مهم‌ترین گیاهان علوفه‌ای اهلی شده در دنیا توسط انسان جهت تغذیه دام استفاده شده است. یونجه در تغذیه انسان معمولاً به‌صورت برگ تازه یا جوانه مصرف می‌شود و عمدتاً کرکی، ترد و شیرین است. در حال حاضر جوانه یونجه به‌صورت تازه، پودر یا قرص و کپسول و به‌عنوان مکمل‌های تغذیه‌ای در دنیا عرضه می‌شود. همچنین تحقیقات انجام شده بر روی جوانه یونجه حاکی از آن است که جوانه یونجه به دلیل وجود طیف وسیعی از ترکیبات

زیست‌فعال سبب کاهش مشکلات کلیوی و آرتریت^۲ (التهاب مفصل)، کاهش سطح کلسترول و سطح قند خون، درمان خونریزی و مشکلات گوارشی و همچنین کاهش آسیب‌های DNA ناشی از H₂O₂ شده و بدن انسان را در مقابل برخی از بیماری‌های مزمن و قلبی-عروقی محافظت می‌نماید (۵، ۶). در سال‌های اخیر مصرف جوانه‌های تازه، دانه‌های جوانه زده تازه یا انواع خشک و پودر شده‌ی آن‌ها عمدتاً به دلیل پروفایل تغذیه‌ای مناسب و نیز آگاهی مصرف‌کنندگان از اثرات سلامتی‌بخش آن‌ها افزایش یافته است. استفاده از جوانه‌ها در فرمولاسیون مواد غذایی از یک طرف سبب بهبود ارزش تغذیه‌ای سامانه‌های غذایی می‌شود و از طرف دیگر فرآوری ماده‌ی غذایی منجر به کاهش بار آلودگی میکروبی جوانه‌ها خواهد شد (۱). طبق تعریف سازمان غذا و کشاورزی (FAO) و سازمان بهداشت جهانی (WHO) پروبیوتیک‌ها مکمل‌های غذایی میکروبی زنده (باکتری یا قارچ) هستند که در صورت مصرف در مقادیر کافی و توصیه شده با حفظ یا بهبود تعادل میکروبی روده، اثرات مفیدی بر سلامتی مصرف‌کنندگان اعمال می‌کنند (۷). جهت دستیابی به اثرات مطلوب مرتبط با پروبیوتیک‌ها رسیدن روزانه ۱۰^۸-۱۰^۹ عدد میکروارگانیسم پروبیوتیک زنده به روده کوچک لازم است و این مهم در گرو بقای آن‌ها در فرآورده غذایی طی حمل و نقل، نگهداری، مصرف و نیز در حین عبور از دستگاه گوارش است. یکی از راهکارهای موجود در این زمینه، استفاده از ترکیبات پری‌بیوتیک می‌باشد. پری‌بیوتیک‌ها ترکیبات یا سوبستراهایی هستند که به‌صورت گزینش‌پذیر توسط میکروارگانیسم‌های موجود در میزبان مورد استفاده قرار گرفته و اثرات سلامتی‌بخش اعمال می‌کنند (۸). بسیاری از ترکیبات موجود در جوانه‌ها یا آرد دانه‌های جوانه زده نظیر فیبر، پروتئین، ویتامین‌ها و یا اجزای

² Arthritis

¹ Alfalfa

سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران خریداری شدند. تمامی محیط کشت‌های مورد استفاده در این مطالعه از شرکت Merck، آلمان یا ایبرسکو ایران تهیه گردید. کلیه مواد شیمیایی جهت تهیه محلول‌ها یا محیط کشت از درجه آزمایشگاهی و شرکت‌های Merck، آلمان، Barad Chemical، ایران، Loba Chemie، هند و Sigma، آمریکا خریداری شدند.

آزمون‌های شیمیایی

تعیین پروفایل آمینواسید کل: جهت تعیین پروفایل آمینو اسید ASP، ابتدا به ۰/۲ گرم از نمونه در فلاسک‌های ته گرد پیرکس ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول اسیدکلریدریک ۶ نرمال حاوی ۰/۱ درصد فنول اضافه شد. در ادامه جهت هضم پروتئین و آزادسازی اسیدهای آمینه پس از دمیدن گاز نیتروژن، فلاسک‌های حاوی نمونه به مدت ۲۰ ساعت در دمای $50 \pm 0^\circ \text{C}$ قرار گرفتند و پس از به حجم رساندن محتوای فلاسک‌ها با آب مقطر (به حجم ۲۰۰ میلی‌لیتر) و عبور از کاغذ فیلتر واتمن درجه GF/A، آنالیز اسیدهای آمینه با استفاده از دستگاه آمینواسید آنالایزر (مدل Pico-Tag، آمریکا) انجام شد. بدین منظور، نمونه از کارتریج Sep-pak C18 عبور داده شد و به دستگاه تزریق شد. ستون مورد استفاده برای آنالیز از نوع RP Nova-Pack C18 (۳/۹ × ۱۵۰mm) بود. فاز متحرک نیز شامل دو محلول A (۹۴۰ میلی‌لیتر از ۰/۱۴ مولار سدیم استات با $\text{pH}=6.4$ حاوی ۰/۰۵٪ تری اتیل آمین با ۶۰ میلی‌لیتر استون نیتریل) و محلول B (۰/۶۰٪ استونیتریل و ۰/۴۰٪ آب) بود. شناسایی پیک‌ها در طول موج ۵۴۰ nm و مدت‌زمان ۲۰ دقیقه برای هر نمونه انجام شد. تعیین آمینواسیدهای آزاد نیز به روش گفته شده با کمی تغییر از جمله استخراج اسیدهای آمینه آزاد با استفاده از محلول آبی داغ هیدروکلریدریک

فعال از قبیل الیگوساکاریدها، آمینواسیدها و پپتیدها می‌توانند رشد باکتری‌های پروبیوتیک را حمایت کرده و زنده‌مانی آن‌ها را افزایش دهند. در واقع فرم جوانه زده این دانه‌ها در مقایسه با فرم اولیه، حاوی سوبستراهای بیش‌تری جهت تحریک رشد باکتری‌های پروبیوتیک می‌باشد (۹). مطالعات محدودی در زمینه بررسی اثرات متقابل پروبیوتیک‌ها و جوانه‌های غلات و حبوبات در حین تخمیر در شرایط آزمایشگاهی یا در فرمولاسیون‌های غذایی صورت گرفته است. از آن جمله می‌توان به بررسی اثرات پری‌بیوتیکی جوانه‌ی چاودار روی برخی باکتری‌های پروبیوتیک در شرایط آزمایشگاهی و نیز در فرمولاسیون ماست اشاره کرد (۱۰). نتایج جست‌وجو در منابع علمی، حاکی از آن بود که اکثر مطالعات به بررسی پروفایل تغذیه‌ای (۱۱)، (۱۲، ۱۳) و یا کاربرد آرد بذر یونجه در فرمولاسیون مواد غذایی پرداخته‌اند (۱۳، ۱۴) و پژوهشی در زمینه بررسی پتانسیل پری‌بیوتیکی پودر جوانه یونجه^۱ (ASP) انجام‌نشده است. در این پژوهش ویژگی‌های تغذیه‌ای پودر جوانه یونجه و پتانسیل پری‌بیوتیکی آن در تعامل با دو باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی^۲ و بیفیدوباکتریوم لانگوم^۳ مورد بررسی قرار خواهد گرفت. همچنین تغییرات محتوای ترکیبات فنولی و خواص آنتی‌اکسیدانی این جوانه در حین تخمیر با باکتری‌های پروبیوتیک در شرایط آزمایشگاهی ارزیابی خواهد شد.

مواد و روش‌ها

مواد: پودر جوانه یونجه رقم همدانی از شرکت جوانه آفتاب (مشهد، ایران) خریداری گردید. همچنین سویه‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی ATCC 393 و بیفیدوباکتریوم لانگوم ATCC 55813 از

³ *Bifidobacterium longum*

¹ Alfalfa sprout powder

² *Lactobacillus Casei*

و خشک توزین و سپس ۵ میلی‌لیتر اسید نیتریک غلیظ به آن افزوده شد و نمونه‌ها تحت برنامه دمایی شامل دمای °C ۱۷۰-۲۵ به مدت ۱۰ دقیقه، دمای °C ۲۴۰-۱۷۰ به مدت ۱۰ دقیقه دیگر و نیز هوادهی در دمای اتاق به مدت ۲۰ دقیقه در دستگاه هضم به روش ماکروویو قرار گرفتند. در ادامه محلول حاصله پس از عبور از کاغذ صافی با آب مقطر به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد (۱۷). محلول حاصله به دستگاه پلاسمای جفت شده القائی-طیف‌سنج نشر نوری^۱ (ICP-OES) ساخت آلمان تزریق و آنالیز املاح تحت شرایط استاندارد دستگاه انجام شد. در نهایت با ضرب نتایج اولیه قرائت شده از دستگاه در ضریب رقت، نتایج نهایی به دست آمد.

آزمون‌های میکروبی

آماده‌سازی باکتری‌های پروبیوتیک و ارزیابی پتانسیل پری‌بیوتیکی: در این مطالعه از سویه‌های استاندارد *B. longum* و *L. casei* نگهداری شده در دمای °C ۸۰- به صورت کشت لیوفلیزه استفاده شد. باکتری‌ها طبق دستورالعمل آماده‌سازی شدند. قبل از انجام آزمون‌های میکروبی، جهت تهیه کشت مایع تازه از باکتری‌های اشاره شده طی دو بار متوالی در دو روز تلقیح هر دو سویه در محیط کشت MRS برات انجام گرفت و هر بار انکوباسیون تحت دمای °C ۳۷ به مدت ۲۴ ساعت و در شرایط بی‌هوای انجام شد.

ارزیابی فعالیت پری‌بیوتیکی: جهت ارزیابی فعالیت پری‌بیوتیکی از محیط کشت شبیه‌سازی شده MRS برات بدون قند ($GF-MRSB^2$) طبق دستورالعمل Moreno-Vilet و همکاران (۱۸) استفاده شد. اجزای محیط با یکدیگر ترکیب و pH محیط کشت روی 6.2 ± 0.2 تنظیم شد. ASF و اینولین (به‌عنوان پری‌بیوتیک تجاری) با غلظت ۱ درصد به صورت مجزا

اسید ۵ mN در دمای °C ۸۰ و سپس حذف پروتئین توسط سولفوسالیسیلیک اسید انجام شد (۱۵).

تعیین پروفایل اسید چرب: به‌منظور تعیین پروفایل اسید چرب در نمونه ASP، در ابتدا ۱۰ گرم از پودر جوانه یونجه در بشر با ۲۵۰ میلی‌لیتر از مخلوط کلروفرم: هگزان: متانول به ترتیب با نسبت ۸: ۵: ۲ حجمی/حجمی مخلوط و برای مدت ۸ ساعت به‌وسیله شیکر (مدل TM 52 E، ایران) در دور پایین هم زده شد تا فاز روغنی جدا گردد. سپس باقیمانده حلال به‌وسیله روتاری اوپراتور (مدل RV 8V-C، آلمان) در دمای °C ۴۵ جدا گردید. در ادامه مشتق سازی اسیدهای چرب استخراج شده با معرف متیلاسیون شامل متوکسید سدیم متانولی ۰/۲۵ مولار: پترولیوم اتر: اتیل اتر به ترتیب با نسبت ۱: ۵: ۲ حجمی/حجمی انجام شد و حجم نمونه با افزودن هگزان به ۱ میلی‌لیتر رسید. جهت تعیین پروفایل اسید چرب از دستگاه کروماتوگرافی گازی مجهز به ستون کاپیلاری HP-5MS (با ابعاد ۳۰ m × ۰/۲۵ mm و ضخامت ۰/۲۵ μm) و اسپکترومتر جرمی (مدل 7955A GC-7890B، آمریکا) استفاده شد. هلیوم به‌عنوان گاز حامل با سرعت ۱ ml/min و دمای منبع یونیزاسیون °C ۲۵۰ در نظر گرفته شد. برنامه دمایی آون (مدل E240، آلمان) شامل: ۴ دقیقه در °C ۸۰، افزایش به °C ۱۴۰ با سرعت °C/min ۲۰، افزایش به °C ۲۵۰ با سرعت °C/min ۱۰ و سپس باقی ماندن در این دما به مدت ۱۰ دقیقه بود (۱۶). تعیین پروفایل اسید چرب از طریق مقایسه زمان‌های بازداری و الگوی جزء به جزء سازی با پیک‌های موجود در کتابخانه Wily 7n و NIST05a انجام گرفت.

لندازه‌گیری املاح: جهت تعیین نوع املاح موجود در ASP، ابتدا ۰/۵ گرم از پودر جوانه یونجه در لوله تمیز

² Glucose free MRS broth

¹ Inductively coupled plasma - optical emission spectrometry

درصد وزنی / حجمی به آن افزوده شد. مخلوط حاصله در لوله آزمایش درب‌دار به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری ساخت ایران تحت دمای °C ۶۰ قرار گرفت و در نهایت جذب آن در طول موج ۷۶۰ نانومتر توسط دستگاه میکروپلیت ریدر (مدل Synergic HT، آمریکا) اندازه‌گیری گردید. آب مقطر به‌عنوان محلول بلانک در نظر گرفته شد (۲۱، ۲۲). جهت رسم منحنی استاندارد از غلظت‌های مختلف (۸۰۰-۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) گالیک اسید استفاده شد. ($y = 0.0015x$) و مقادیر TPC برحسب میکروگرم در میلی‌لیتر محیط کشت گزارش شد.

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی: جهت انجام این آزمایش از روش مهار رادیکال‌های آزاد DPPH استفاده شد. محلول DPPH با غلظت ۷/۸ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول تهیه شد و ۷۵۰ میکرو لیتر از محلول اتانولی DPPH با ۷۵۰ میکرو لیتر از نمونه مخلوط شد و مخلوط حاصله به مدت ۳۰ دقیقه در دمای °C ۳۷ و در تاریکی انکوبه شدند. در نهایت جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه میکروپلیت ریدر (مدل Synergic HT، آمریکا) قرائت گردید. محلول حاوی DPPH و آب مقطر نیز به‌عنوان نمونه‌ی کنترل در نظر گرفته شد. میزان مهار رادیکال‌های آزاد با استفاده از رابطه زیر و بر حسب درصد محاسبه شد: (۲۳)

$I = \text{درصد مهار رادیکال آزاد}$

$$\left(\frac{\text{جذب نمونه}}{\text{جذب کنترل DPPH}} \right) \times 100$$

آنالیز آماری

در بخش ارزیابی فعالیت پری‌بیوتیکی، اثرات اصلی (زمان تخمیر و نوع ترکیب پری‌بیوتیکی) و اثرات متقابل آنها با استفاده از تجزیه واریانس

به بطری‌های حاوی محیط کشت GF-MRSB افزوده شدند و محیط کشت MRS براث تجاری حاوی ۰.۲٪ گلوکز و محیط کشت GF-MRSB (فاقد منبع کربوهیدراتی) به ترتیب به‌عنوان کنترل مثبت و کنترل منفی در نظر گرفته شدند (۱۹). پس از استریل و سرد کردن محیط‌ها، هریک از باکتری‌های پروبیوتیک در سطح غلظت 10^4 CFU/ml به‌صورت مجزا به محیط کشت‌های مختلف تلقیح شد. محتوای هر بطری پس از توزیع در لوله‌های درب‌دار استریل ۱۰ میلی‌لیتری، تحت شرایط بی‌هوازی در دمای °C ۳۷ به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند. در زمان‌های ۰، ۲۴ و ۴۸ ساعت رقیق‌سازی و سپس کشت و شمارش میکروبی به روش پور پلیت انجام شد. پلیت‌ها در شرایط بی‌هوازی در دمای °C ۳۷ به مدت ۴۸ ساعت انکوبه گردیدند. لازم به ذکر است به محیط کشت MRS آگار و GF-MRSB مورد استفاده برای رشد *B. longum* سیستئین هیدروکلراید (۰.۰۵٪) به‌عنوان عامل احیاء‌کننده اضافه شد (۲۰).

تعیین pH: pH محیط کشت به‌عنوان یکی از شاخص‌های تخمیر، در زمان‌های ۰، ۲۴ و ۴۸ ساعت با استفاده از pH متر دیجیتال و پس از کالیبراسیون با بافرهای ۴ و ۷ تعیین گردید.

تعیین محتوای فنولی کل: جهت تعیین محتوای ترکیبات فنولی کل (TPC) در سه زمان ۰، ۲۴ و ۴۸ ساعت ۵ میلی‌لیتر از محیط تخمیر برداشته شد. نخست نمونه‌ها جهت جداسازی سلول‌ها و ذرات جامد احتمالی به مدت ۵ دقیقه در ۴۰۰۰ g سانتی‌فیوژ شدند. سپس تغییرات TPC محیط کشت در طی زمان تخمیر با روش Folin-Ciocalteu مورد سنجش قرار گرفت. جهت تعیین TPC، ۲۰ میکرولیتر از عصاره با ۱/۱۶ میلی‌لیتر آب دیونیزه و ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین-سیوکالتو مخلوط شد و پس از طی زمان ۱ تا ۸ دقیقه، ۳۰۰ میکرولیتر از محلول سدیم کربنات ۲۰

آمینواسید، املاح و اسیدهای چرب آن تعیین گردید که نتایج آن در جدول ۱ تا ۳ قابل مشاهده است.

پروفیل اسیدهای آمینه: همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، پودر جوانه یونجه حاوی تمامی اسیدهای آمینه مورد نیاز بدن (به جز متیونین) به صورت آزاد یا در ساختار پروتئین‌ها می‌باشد. در بین اسیدهای آمینه ضروری کل بیش‌ترین مقدار به فنیل آلانین اختصاص داشت و پس‌از آن لوسین، تیروزین، ترئونین و لیزین قرار گرفتند. همچنین در بین اسیدهای آمینه آزاد و ضروری نیز، هیستیدین و ترئونین بیش‌ترین مقدار را به خود اختصاص دادند. این نتایج همچنین نشان می‌دهد اسیدهای آمینه ضروری موجود در ASP بیشتر نقش ساختاری دارند. بنابراین ASP می‌تواند بخشی از نیاز بدن به اسیدهای آمینه ضروری را در رژیم غذایی تأمین نماید. آسپارتیک اسید و پس‌از آن گلوتامیک اسید، اسیدهای آمینه شاخص رقم‌های مختلف بذر یونجه تلقی می‌شوند؛ (۲۵) از این رو، طبیعی است که جوانه یونجه غنی از این اسیدهای آمینه باشد. در مطالعه‌ای که روی آرد کنسانتره یونجه انجام شد نتایج نشان داد این کنسانتره حاوی مقادیر قابل توجهی اسیدهای آمینه ضروری می‌باشد که لوسین، فنیل آلانین و والین از بین اسیدهای آمینه ضروری و گلوتامیک اسید و آسپارتیک اسید از بین اسیدهای آمینه غیرضروری بیش‌ترین مقدار را به خود اختصاص دادند (۲۶). محتوای اسیدهای آمینه آزاد موجود در جوانه سه رقم یونجه Nubaria، Giza 1 و Ismailia 1 به ترتیب ۱۱/۱، ۱۳/۱ و ۱۶/۱ میلی‌گرم در هر گرم ماده خشک گزارش شد. مقدار کل اسیدهای آمینه آزاد در مطالعه‌ی حاضر ۲/۳۸٪ یا ۲۳/۸ میلی‌گرم در هر گرم ماده خشک بود که از مقادیر گزارش شده از ارقام یاد شده بیشتر است.

ANOVA (طرح کاملاً تصادفی) با رویه GLM^۱ مورد بررسی قرار گرفتند. مقایسه‌ی میانگین‌ها با روش توکی^۲ در سطح اطمینان ۹۵٪ با استفاده از نرم‌افزار مینی تب نسخه‌ی ۱۶ (Minitab Inc., State College, PA, USA) انجام شد. نتایج بر اساس میانگین \pm انحراف استاندارد گزارش شد. رسم نمودارها با نرم‌افزار اکسل صورت پذیرفت.

نتایج و بحث

ویژگی‌های تغذیه‌ای جوانه یونجه: بر اساس نتایج آزمایش‌ها انجام شده در این مطالعه ترکیبات شیمیایی کلی ASP شامل $44/60 \pm 0/54$ ٪ رطوبت، $3/10 \pm 52/54$ ٪ خاکستر، $44/60 \pm 2/20$ ٪ پروتئین، $9/42 \pm 0/97$ ٪ چربی، $1/21 \pm 12/50$ ٪ فیبر کل و $25/50 \pm 1/34$ ٪ کربوهیدرات کل بود؛ (۲۴) بنابراین ASP می‌تواند به‌عنوان منبع سرشار از پروتئین، کربوهیدرات، چربی و فیبر مورد توجه قرار گیرد. محتوای پروتئینی جوانه‌ی بذر سه رقم یونجه با نام‌های Giza 1، Nubaria و Ismailia 1 به ترتیب ۱۷/۵، ۲۰/۲ و ۲۴/۱٪ گزارش شد؛ درحالی‌که محتوای فیبر خام آن‌ها ۱۳/۳، ۱۶/۱ و ۱۵/۰٪ و محتوای کربوهیدرات کل آن‌ها نیز به ترتیب ۲۴/۷، ۱۷/۷ و ۲۵/۶٪ بود. محتوای چربی این سه رقم جوانه برای Giza 1، Nubaria و Ismailia 1 به ترتیب ۰/۸۷، ۰/۸۴ و ۱/۳۳٪ گزارش شد که بسیار کم‌تر از مقادیر به‌دست‌آمده در این مطالعه می‌باشد (۱۱). در مطالعه Mattioli و همکاران (۲۰۱۹) مقدار پروتئین، فیبر و خاکستر جوانه یونجه تازه به ترتیب $2/0 \pm 6/2$ ، $2/12 \pm 30/90$ و $0/08 \pm 20/40$ گرم در کیلوگرم ماده مرطوب گزارش شد (۱۲). برخی از ویژگی‌های تغذیه‌ای ASP شامل ترکیبات شیمیایی کلی، پروفایل

² Tukey's test

¹ General linear model

جدول ۱- پروفایل اسید آمینه کل و آزاد پودر جوانه یونجه

Table 1. Amino acids profile of Alfalfa sprout flour

ردیف	نوع اسید آمینه	اسید آمینه آزاد (mg/g)	اسید آمینه کل (mg/g)
	Type of amino acid	Free amino acid (mg/g)	Total amino acid (mg/g)
اسیدهای آمینه غیر ضروری			
Non-essential amino acid			
1	آسپارتیک اسید Aspartic acid	1.70	60.58
2	گلوتامیک اسید Glutamic acid	1.02	59.67
3	سرین Serine	3.21	19.53
4	گلیسین Glycine	2.14	24.33
5	آرژنین Arginine	3.12	16.67
6	آلانین Alanine	1.55	24.50
7	پروлін Proline	2.90	8.75
اسیدهای آمینه ضروری			
Essential fatty acid			
8	ترئونین Threonine	2.64	21.34
9	هیستیدین Histidine	4.31	8.12
10	تیروزین Tyrosine	0.25	21.41
11	والین Valine	ND	4.29
12	سیستین Cysteine (cys)	ND	2.65
13	ایزولوسین Isoleucine	ND	13.66
14	لوسین Leucine	ND	27.27
15	فنیل آلانین Phenylalanine	0.07	32.02
16	لیزین Lysine	0.88	21.04

بررسی از بین اسیدهای آمینه غیر ضروری، گلوتامیک اسید و سپس آسپارتیک اسید بیشترین مقدار را به خود اختصاص دادند، حال آنکه جوانه‌ی هر سه گونه حاوی مقادیر قابل توجهی از فنیل آلانین، ترئونین، سیستین و ایزولوسین بود. همچنین مقدار اسیدهای آمینه‌ی سیستین، ایزولوسین، متیونین، لوسین، تیروزین،

مطالعات محدودی در زمینه تعیین نوع و مقدار اسیدهای آمینه در جوانه یونجه صورت گرفته است. پروفایل اسیدهای آمینه موجود در جوانه‌ی سه گونه دیگر جنس *Medicago* شامل *M. indicus*، *M. interexta* و *M. polymorpha* تعیین گشت. نتایج حاکی از آن بود که در جوانه‌ی هر سه گونه‌ی مورد

قابل قیاس نیست. در طی جوانه‌زنی بسته به شرایط تغییراتی در میزان ماده‌ی خشک دانه یا بذر اولیه رخ داده و معمولاً میزان مواد آلی سلول کاهش و محتوای مواد غیر آلی یا معدنی افزایش می‌یابد. علاوه بر این، تغییر در میزان حلالیت املاح و تغییر مکان آن‌ها در طی جوانه‌زنی می‌تواند قابلیت استخراج و دسترسی زیستی آن‌ها را تحت تأثیر قرار دهد (۳۰).

اسیدهای چرب: ترکیب اسید چرب روغن استخراج شده از ASP با روش GC-Mass تعیین و نتایج آن در جدول ۳ درج شده است. نتایج نشان داد که بیش‌ترین درصد به لینولئیک اسید اختصاص دارد و پس از آن اولئیک اسید و پالمیتیک اسید قرار گرفتند. مقادیر به نسبت پایین‌تری از استئاریک اسید و آراشیدیک اسید نیز در روغن استخراجی تشخیص داده شد.

همانطور که مشاهده می‌شود، روغن استخراج شده از ASP سرشار از اسیدهای چرب غیراشباع بوده و از ارزش تغذیه‌ای بالایی برخوردار است. لینولئیک اسید، اولئیک اسید و پالمیتولئیک اسید در مجموع ۷۸/۲۸٪ از اسیدهای چرب موجود در روغن ASP را تشکیل دادند و درصد کل اسیدهای چرب اشباع ۲۱/۷۱٪ بود. حضور اسیدهای چرب فرد کربنه نظیر پنتادسکلئیک اسید، مارگاریک اسید، هنیکوزانوئیک اسید و تریکوزانوئیک اسید^۲ که در سایر روغن‌ها نایاب هستند، یکی از ویژگی‌های جالب توجه این روغن بود. لینولئیک اسید، اولئیک اسید و پالمیتولئیک اسید مهم‌ترین و فراوان‌ترین اسیدهای چرب غیراشباع این روغن را تشکیل دادند؛ درحالی‌که پالمیتیک اسید فراوان‌ترین اسید چرب اشباع تشکیل دهنده‌ی این روغن بود (جدول ۳).

لیزین، فنیل آلانین و تریپتوفان پس از جوانه‌زنی نسبت به بذر اولیه به‌طور قابل توجهی افزایش یافت (۲۷).

املاح: جوانه‌های تهیه شده از غلات و حبوبات منابع ارزشمندی از املاح ضروری برای بدن می‌باشند؛ چراکه مقدار آن‌ها اغلب در طی جوانه‌زنی افزایش می‌یابد. علاوه بر افزایش محتوای املاح، معمولاً دسترسی زیستی آن‌ها نیز به دلیل تجزیه فیتات، تانن‌ها و سایر ترکیبات ضد تغذیه‌ای در حین جوانه‌زنی نیز بهبود می‌یابد (۲۸). جوله یونجه سرشار از املاح ضروری برای بدن می‌باشد. در بین عناصر موجود به ترتیب پتاسیم، فسفر، کلسیم و گوگرد بیش‌ترین مقدار را به خود اختصاص داده‌اند. همچنین این پودر منبع مناسبی از منیزیم و سدیم محسوب می‌شود. عناصر دیگر نظیر آهن، مس، روی و منگنز هرچند در مقادیر کم‌تر اما در این پودر تشخیص داده شدند (جدول ۲).

در مطالعه Sahni و همکاران (۲۰۲۰) گزارش شد پس از ۷۲ ساعت جوانه‌زنی بذر یونجه در بین املاح ماکرو، فسفر (بین ۱۲۰۰۰-۱۰۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) و پتاسیم (بین ۱۰۰۰۰-۸۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) و در بین املاح میکرو، آهن (۱۴۰-۱۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) و روی (بین ۱۶۰-۱۴۰ میلی‌گرم در کیلوگرم)، بیش‌ترین مقدار را به خود اختصاص دادند. همچنین جوانه یونجه حاوی مقادیر مناسبی از سدیم، منیزیم، کلسیم، مس و منگنز بود (Chiriatic، ۲۹). و همکاران (۲۰۲۰) نیز به تعیین غلظت عناصر مختلف در حین جوانه‌زنی یونجه و شبدر قرمز^۱ پرداختند و گزارش کردند به ترتیب پتاسیم و منیزیم فراوان‌ترین عنصر موجود در بذر یونجه و شبدر قرمز می‌باشند.

درکل به دلیل تفاوت در بذر اولیه، شرایط و مدت‌زمان جوانه‌زنی نتایج مطالعات مختلف با یکدیگر

² Tricosanoic acid

¹ Red clover

جدول ۲- محتوای املاح پودر جوانه یونجه

Table 2. Mineral content of Alfalfa sprout powder

مقدار (میلی گرم/کیلوگرم) (mg/kg) content	املاح
5374.77	پتاسیم (K) Potassium (K)
3823.05	فسفر (P) Phosphorus (P)
3182.40	کلسیم (Ca) Calcium (Ca)
1901.09	گوگرد (S) Sulfur (S)
1679.67	منیزیم (Mg) Magnesium (Mg)
1019.06	سدیم (Na) Sodium (Na)
64.88	روی (Zn) Zinc (Zn)
60.80	آهن (Fe) Iron (Fe)
17.24	بورن (B) Boron (B)
16.18	منگنز (Mn) Manganese (Mn)
12.70	مس (Cu) Copper (Cu)
2.72	نیکل (Ni) Nickel (Ni)
2.72	مولیبدن (Mo) Molybdenum (Mo)
1.81	سلنیم (Se) Selenium (Se)

تشخیص داده شد. پس از ۷ روز جوانه زنی بذر، محتوای اسیدهای چرب اشباع نظیر پالمیتیک اسید، استئاریک اسید و بهینیک اسید تا حدودی افزایش و مقدار اسیدهای چرب غیراشباع به خصوص آلفا لینولنیک اسید، لینولئیک اسید و اولئیک اسید کاهش یافت. افزایش ناچیزی نیز در محتوای اسیدهای چرب بلند زنجیر و چند غیر اشباعی مشاهده شد (۳۱). تفاوت‌های مشاهده شده بین تحقیقات مختلف از نظر نوع و درصد اسیدهای چرب را می‌توان به تفاوت در پروفایل اسید چرب بذر اولیه و نیز شرایط و زمان جوانه زنی نسبت داد (۳۲).

Marton و همکاران (۲۰۱۰) به بررسی پروفایل اسید چرب بذر یونجه و جوانه حاصل از آن پرداختند. این محققین نیز به وجود مقادیر جزئی از اسیدهای چرب غیر معمول نظیر پنتادسکلک اسید و مارگاریک اسید در بذر اولیه اشاره کردند. فراوان‌ترین اسیدهای چرب موجود در بذر یونجه شامل لینولئیک اسید، آلفا-لینولنیک اسید، پالمیتیک اسید و اولئیک اسید بود. همچنین مقادیر اندکی از اسیدهای چرب بلند زنجیر و چند غیر اشباعی نظیر ایکوزا تری انوئیک اسید (C20:3, n3)، ایکوزا تری انوئیک اسید (C20:3, n6) و آراشیدونیک اسید (C20:4, n6) در روغن بذر یونجه

جدول ۳- پروفایل اسید چرب پودر جوانه یونجه

Table 3. Fatty acid composition of Alfalfa sprout powder

مقدار (%)	زمان بازداری (دقیقه)	اسید چرب
Content (%)	Retention time	Fatty acid
0.263	25.853	میرستیک اسید (C14:0) Myristic acid (C14:0)
0.132	27.993	پنتادسکلک اسید (C15:0) Pentadecanoic acid (C15:0)
0.174	29.630	پالمیتولیک اسید (C16:1) Palmitoleic acid (C16:1)
11.551	30.073	پالمیتیک اسید (C16:0) Palmitic acid (C16:0)
0.175	33.991	مارگاریک اسید (C17:0) Margaric acid (C17:0)
41.326	33.407	لینولئیک اسید (C18:2) Linoleic acid (C18:2)
32.294	33.542	اولئیک اسید (C18:1) Oleic acid (C18:1)
3.938	33.874	استئاریک اسید (C18:0) Stearic acid (C18:0)
0.515	36.922	الائیدیک اسید (C18:1, n=9, trans) Elaidic acid (C18:1, n=9, trans)
1.441	37.342	آراشیدیک اسید (C20:0) Arachidic acid (C20:0)
0.257	38.980	هئیکوزانویک اسید (C21:0) Heneicosanoic acid (C21:0)
1.573	40.559	بهینیک اسید (C22:0) Behenic acid (C22:0)
0.138	42.075	تریگوزانویک اسید (C23:0) Tricosanoic Acid (C23:0)
0.274	43.532	لیگنوسریک اسید (C24:0) Lignoceric acid (C24:0)

اختلاف معنی‌داری بین جمعیت *L. casei* در محیط‌های مختلف مشاهده گردید ($P < 0.05$) و میزان افزایش جمعیت باکتری در نمونه‌های کنترل منفی، ASP-0.5%، ASP-1%، گلوکز و FOS به ترتیب ۰/۷، ۳/۶۴، ۴/۳۲، ۴/۸۳ و Log cfu/ml ۴/۳ بود. کم‌ترین میزان رشد *L. casei* همانطور که در شکل ۱ (a) مشاهده می‌شود در محیط کشت GF-MRSB مشاهده گردید که به دلیل عدم دسترسی به منابع قندی می‌باشد. در این روز اختلاف معنی‌داری بین جمعیت *L. casei* در دو محیط کشت حاوی پری‌بیوتیک

پتانسیل پری‌بیوتیکی: پتانسیل پری‌بیوتیکی ASP روی دو باکتری پروبیوتیک پر کاربرد در صنعت غذا یعنی *L. casei* و *B. longum* در شرایط *in vitro* طی ۴۸ ساعت تخمیر با بررسی تغییرات جمعیت باکتری‌ها مورد بررسی قرار گرفت. شکل ۱ (a) تغییرات جمعیت *L. casei* طی ۴۸ ساعت تخمیر در دمای $^{\circ}\text{C}$ ۳۷ و در حضور ترکیبات مختلف را نشان می‌دهد. در روز ۰، جمعیت باکتری *L. casei* در محیط کشت GF-MRSB حاوی ترکیبات مختلف، بین Log cfu/ml ۴/۱۴ - ۴/۳۵ متغیر بود. پس از ۲۴ ساعت از تخمیر،

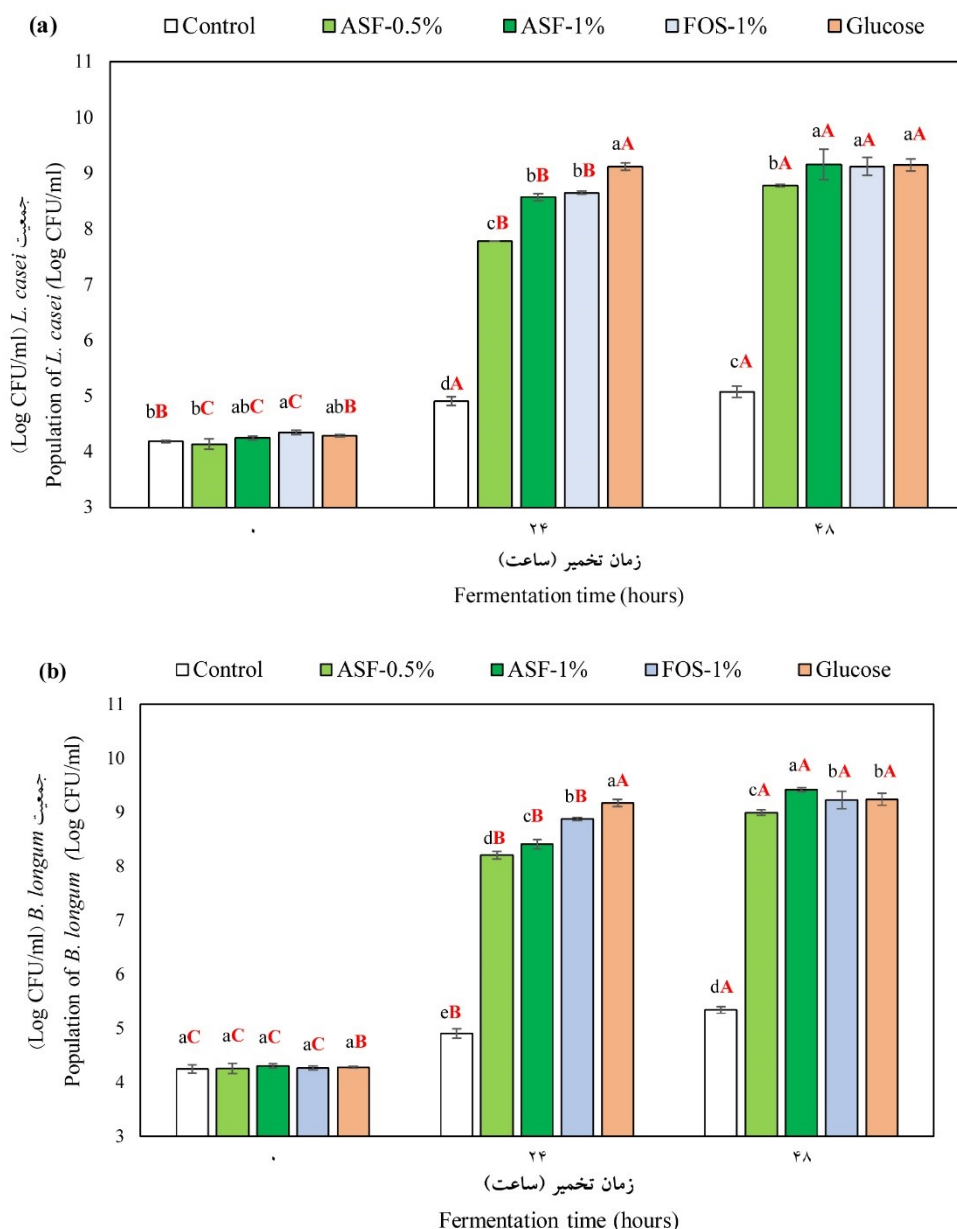
باکتری‌های مورد بررسی در محیط کشت فاقد منابع قندی حمایت و رشدی معادل یا نزدیک به قند ساده گلوکز را ایجاد کند. در مطالعه‌ی Noori و همکاران (۲۰۱۷) تأثیر عصاره جوانه‌ی چاودار روی دو باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس^۱ و بیفیدوباکتریوم اینمالیس^۲ را مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد، افزودن غلظت‌های مختلف عصاره‌ی جوانه چاودار (۲۵-۰/۱٪) سبب افزایش قابل ملاحظه‌ی رشد هر دو باکتری گردید و میزان رشد با غلظت عصاره ارتباط مستقیم داشت. همچنین اثر آن روی بیفیدوباکتریوم اینمالیس محسوس‌تر بود. در زمان‌های ۱۲ و ۲۴ ساعت تخمیر در شرایط *in vitro* میزان رشد دو باکتری در حضور غلظت ۲٪ عصاره بیشتر از گلوکز بود. محققین این نتایج را با محتوای بالای پروتئین و فیبر در این عصاره مرتبط دانستند (۱۰).

همچنین Chavez Garcia و همکاران (۲۰۲۳) گزارش کردند جوانه‌ها منابع سرشار از نشاسته مقاوم، فیبرهای رژیمی و الیگوساکاریدها هستند که می‌توانند پتانسیل پری‌بیوتیکی نشان دهند. در مطالعه‌ی دیگری پتانسیل پری‌بیوتیکی پودر میوه‌ی جک فروت و نیز عصاره‌ی پری‌بیوتیکی آن روی دو باکتری لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم لانگوم در شرایط *in vitro* مورد بررسی قرار گرفت و با اینولین و فروکتان به‌عنوان پری‌بیوتیک‌های تجاری مقایسه شد. نتایج نشان داد لاکتوباسیلوس کازئی در مقایسه با بیفیدوباکتریوم لانگوم رشد بیش‌تری روی پودر میوه‌ی جک فروت و نیز عصاره‌ی پری‌بیوتیکی آن دارد. همچنین میزان رشد لاکتوباسیلوس کازئی روی عصاره‌ی پری‌بیوتیکی جک فروت در مقایسه با اینولین و فروکتان و محیط کشت تجاری MRS بالاتر بود هرچند اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده نشد.

تجاری FOS با ۰/۵٪-ASP از نظر تحریک رشد *L. casei* مشاهده نشد. باگذشت زمان تخمیر به ۴۸ ساعت بیش‌ترین میزان افزایش جمعیت به ترتیب در محیط حاوی ۰/۵٪-ASF، ۱٪-FOS و ۱٪-ASP، کنترل منفی و گلوکز مشاهده گردید و از این نظر اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده گردید ($P < ۰/۰۵$). به‌جز نمونه‌های گلوکز و کنترل منفی، میزان افزایش جمعیت *L. casei* در ۲۴ ساعت دوم تخمیر در تمامی محیط‌ها معنی‌دار بود ($P < ۰/۰۵$). تغییرات جمعیت *B. longum* در طی ۴۸ ساعت تخمیر نیز در شکل ۱ (b) مشاهده می‌شود. در زمان ۰، اختلاف معنی‌داری بین نمونه‌های مختلف از نظر سطح تلقیح *B. longum* مشاهده نشد ($P > ۰/۰۵$)، اما با پیشرفت تخمیر، جمعیت باکتری در تمامی محیط‌های کشت افزایش یافت. میزان افزایش جمعیت *B. longum* در محیط کشت حاوی ۱٪-ASP، ۰/۵٪-ASP، ۱٪-FOS، کنترل منفی و گلوکز، به ترتیب ۳/۹۵، ۴/۱، ۴/۶۱، ۰/۶۶ و ۴/۶۱ Log cfu/ml بود. در ۲۴ ساعت دوم تخمیر، بیش‌ترین میزان افزایش جمعیت *B. longum* در محیط حاوی ۱٪-ASP مشاهده شد (۱/۰۱ Log cfu/ml) و پس‌از آن ۰/۵٪-ASF (۰/۷۹ Log cfu/ml)، کنترل منفی (۰/۷۹ Log cfu/ml) و گلوکز (۰/۴۳، ۱٪-FOS (۰/۳۵ Log cfu/ml) و حبوبات (۰/۰۷ Log cfu/ml) قرار گرفتند. غلات و حبوبات جوانه زده منبع سرشار از مواد مغذی از قبیل ویتامین‌ها، قند، مواد ازته، آنتی‌اکسیدان‌ها، اسیدهای آمینه و مواد معدنی بوده که با تأمین مواد مغذی مورد نیاز این باکتری‌ها، روی آن‌ها اثر حفاظتی دارند و شرایط بهینه رشد آن‌ها را فراهم می‌نمایند (۳۳). همانطور که در بخش‌های قبلی نیز نشان داده شد، ASP منبع سرشار از مواد مغذی مختلف به‌ویژه پروتئین و فیبر تلقی می‌شود که می‌تواند از رشد

² *Bifidobacterium animalis*

¹ *Lactobacillus acidophilus*



شکل ۱- تغییرات جمعیت باکتری *L. casei* (a) و *B. longum* (b) طی ۴۸ ساعت تخمیر در حضور پودر جوانه یونجه و فروکتوالیگوساکارید حروف کوچک متفاوت روی هر ستون نشان دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین ترکیبات پری‌بیوتیک در هر روز می‌باشند ($P < 0.05$). حروف بزرگ متفاوت روی هر ستون نشان دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین زمان‌های مختلف تخمیر یک ترکیب پری‌بیوتیک می‌باشند ($P < 0.05$).

Figure 1. Changes in the population of *L. casei* (a) and *B. longum* during 48 hours of fermentation in the presence of alfalfa sprout powder and fructooligosaccharide

Different small letters in each column indicate significant differences between different prebiotics at each time ($P < 0.05$). Different capital letters in each column indicate significant differences between different days of each prebiotic ($P < 0.05$).

دارد. محققین تفاوت مشاهده شده بین رشد دو باکتری در حضور ترکیبات پری‌بیوتیکی مختلف را به توانایی آن‌ها در تخمیر کربوهیدرات‌های غیرقابل هضم نسبت

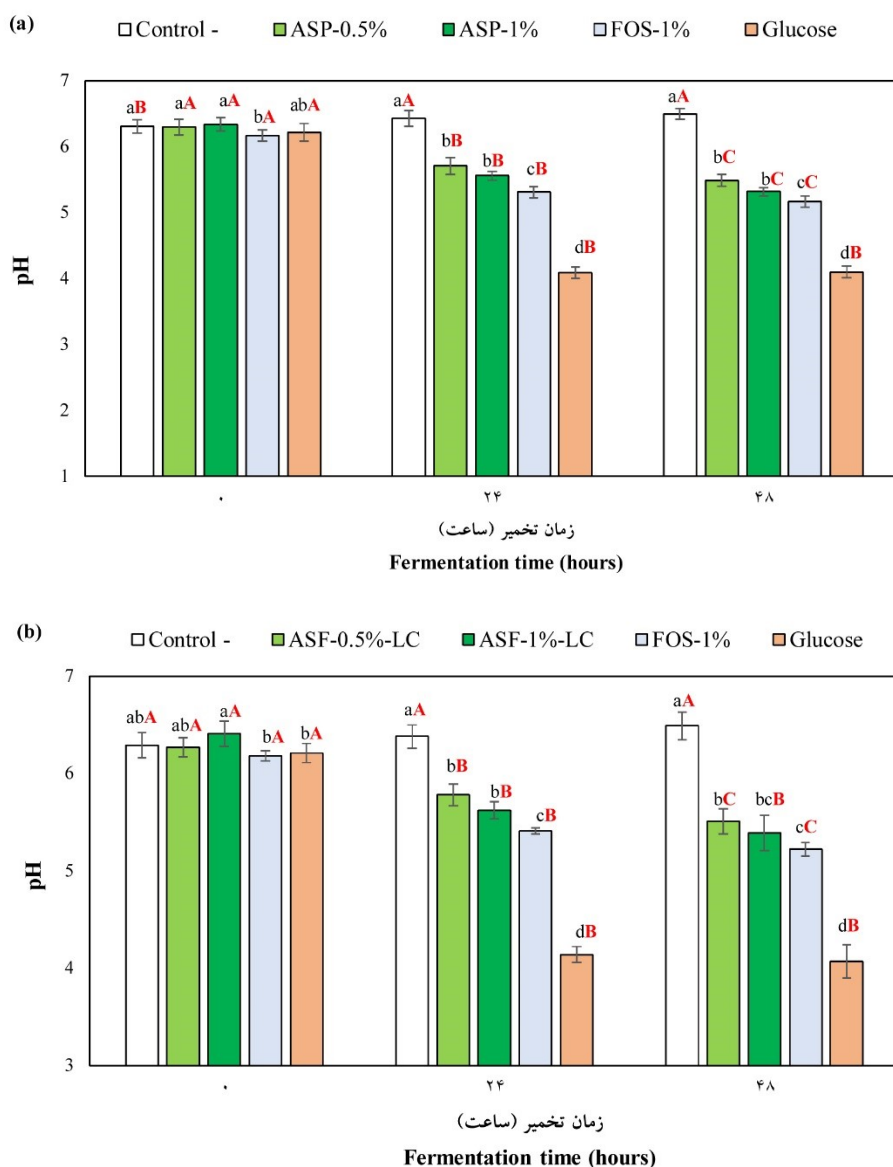
در مورد بیفیدوباکتریوم لانگوم نتایج نشان داد این باکتری روی اینولین رشد بیشتری نسبت به پودر میوه‌ی جک فروت، عصاره‌ی پری‌بیوتیکی و فروکتان

ادامه‌ی زمان تخمیر، تغییر معناداری در pH محیط کشت حاوی گلوکز مشاهده نشد ($P > 0/05$) حال آنکه در حضور FOS و غلظت‌های مختلف ASP، افت pH هرچند با میزان کم‌تر اما ادامه یافت. اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه^۱ (SCFAs) (نظیر استیک اسید، پروپیونیک اسید، بوتیریک اسید، لاکتیک اسید) محصولات نهایی اصلی تولید شده از فیبرها و کربوهیدرات‌های غیرقابل هضم توسط تخمیر باکتریایی هستند که به اسیدی شدن محیط منجر می‌شوند (۳۷). همانطور که در بخش قبلی گفته شد، ASP حاوی مقادیر قابل توجهی فیبر و کربوهیدرات کل می‌باشد که می‌توانند توسط آنزیم‌های باکتریایی هیدرولیز شده و با تولید SCFAs، اسیدیته محیط کشت را افزایش دهند. لازم به ذکر است هر دو باکتری کم‌ترین میزان تولید اسید را در نمونه‌ی کنترل منفی نشان دادند و pH این نمونه‌ها افزایش جزئی نشان داد و این افزایش طی ۴۸ ساعت تخمیر برای *L. casei* و *B. longum* به ترتیب ۰/۲ و ۰/۱۹ بود. احتمالاً افزایش pH در نمونه‌ی کنترل منفی به دلیل این است که باکتری‌های مورد بررسی تنها از منابع ازته موجود جهت رشد و تکثیر خود استفاده کرده و متابولیت‌های حاصل از آن‌ها سبب افزایش pH محیط شده‌اند (۳۸). مصرف سریع گلوکز باعث افزایش اسیدیته محیطی می‌شود که برای رشد میکروارگانیسم‌ها در محیط حاوی گلوکز مناسب نیست. در دسترس بودن قندهای آزاد به‌عنوان منبع ساده کربن منجر به سرکوب کاتابولیک و تولید اسید بیشتر در محیط‌های حاوی گلوکز می‌شود. در مقابل تأخیر در متابولیسم پلی‌ساکاریدها به دلیل پیچیدگی ساختار آن‌ها است که می‌تواند باعث القای مسیرهای متابولیسمی متنوع شود (۳۹). در مقابل همانطور که شد، رشد هر دو باکتری و تولید اسید و کاهش pH، در محیط حاوی ASP در ۲۴ ساعت دوم تخمیر ادامه یافت.

دادند. طبق این نتایج بیفیدوباکتریوم لانگوم بیشتر قادر به تجزیه‌ی ترکیبات پری‌بیوتیک پیچیده نظیر اینولین بود درحالی‌که لاکتوباسیلوس کازئی محیط سرشار از مواد مغذی موجود در عصاره پری‌بیوتیکی میوه‌ی جک فروت را به پری‌بیوتیک‌های تجاری ترجیح داد (۳۵). در تائید نتایج این بخش از پژوهش، افزودن پودر هسته خرما به فرمولاسیون ماست سین بیوتیک سبب افزایش زنده مانی دو باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس La5 و بیفیدوباکتریوم لاکتیس Bb-12 گردید که احتمالاً با درصد بالای فیبر موجود در آن مرتبط است (۳۶).

تغییرات pH: تغییرات pH محیط کشت GF-MRSB در حضور دو باکتری پروبیوتیک و ترکیبات پری‌بیوتیکی مختلف طی ۴۸ ساعت تخمیر مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که در شکل ۲ (a) دیده می‌شود، در حضور *L. casei* در روز ۰ بیش‌ترین pH در محیط کشت حاوی ۱٪ ASP مشاهده گردید که اختلاف معنی‌داری با ۱٪ FOS و گلوکز داشت. پس از گذشت ۲۴ ساعت، به‌جز نمونه‌ی کنترل منفی، در سایر نمونه‌ها pH به‌طور معناداری کاهش یافت و میزان افت pH در محیط کشت حاوی گلوکز، ۱٪ ASP، ۱٪ FOS، ۰/۵٪ ASP- به ترتیب ۲/۰۷، ۰/۷۹، ۰/۷۷ و ۰/۴۹ بود. با ادامه روند تخمیر، افت pH محیط کشت در تمامی نمونه‌ها ادامه یافت هرچند نسبت به ۲۴ ساعت ابتدایی کم‌تر بود. کم‌ترین و بیش‌ترین میزان افت pH در ۲۴ ساعت دوم تخمیر در محیط کشت حاوی گلوکز و ۰/۵٪ ASF مشاهده گردید. در حضور باکتری *B. longum* نیز تغییرات مشابهی در pH محیط کشت مشاهده گردید به‌طوری‌که در ۲۴ ساعت ابتدایی تخمیر بیش‌ترین میزان تولید اسید و افت pH به ترتیب در محیط کشت حاوی گلوکز ($0/13 < 1\% \text{ FOS} < 0/86$) $1\% \text{ ASP} < 0/78$ ($0/59 < 0/59$) بود (شکل ۲ b). با

¹ Short Chain Fatty Acid



شکل ۲- تغییرات pH محیط کشت طی ۴۸ ساعت تخمیر با باکتری *L. casei* (a) و *B. longum* در حضور پودر جوانه یونجه و فروکتوالیگوساکارید

حروف کوچک متفاوت روی هر ستون نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار بین ترکیبات پری بیوتیک در هر روز می باشند ($P < 0.05$). حروف بزرگ متفاوت روی هر ستون نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار بین زمان‌های مختلف تخمیر یک ترکیب پری بیوتیک می باشند ($P < 0.05$).

Figure 2. Changes in the pH of media during 48 h fermentation by of *L. casei* (a) and *B. longum* in the presence of alfalfa sprout powder and fructooligosaccharide

Different small letters in each column indicate significant differences between different prebiotics at each time ($P < 0.05$). Different capital letters in each column indicate significant differences between different days of each prebiotic ($P < 0.05$).

محدودکننده برای رشد بسیاری از باکتری‌های پروبیوتیک محسوب می‌باشد احتمالاً ASP با ظرفیت بافری بالای خود، امکان ادامه رشد باکتری‌های مورد

دلیل این مشاهده را می‌توان به ظرفیت بافری بالایی موجود در آرد بسیاری از غلات و حبوبات نسبت داد. از آنجاکه pH پایین اغلب فاکتور

مطالعه را در ساعات پایانی تخمیر فراهم کرده است (۴۰). در مطالعه‌ی انجام شده توسط Sah و همکاران (۲۰۱۶)، پتانسیل پری‌بیوتیکی پودر ضایعات آناناس به‌عنوان سوبسترای تخمیر برای باکتری‌ها با پایش تغییرات میزان اسید تولید شده در محیط کشت مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد بیش‌ترین میزان اسید در محیط کشت حاوی پودر تفاله آناناس خشک شده به روش انجمادی در حضور لاکتوباسیلوس پاراکازنی^۱ تولید شده است (۱۹). همچنین در مطالعه دیگری، توانایی تغییر pH محیط کشت در حضور پلی‌ساکارید استخراج شده از میوه بلوط، توسط لاکتوباسیلوس پلانٹاروم^۲ مورد بررسی قرار گرفت که نتایج نشان داد، pH محیط کشت طی ۷۲ ساعت تخمیر به‌طور معناداری کاهش یافت. کاهش مشاهده شده نسبت به گلوکز کم‌تر و نسبت به اینولین بیشتر بود (۴۱). این تفاوت‌ها به تنوع مسیرهای متابولیکی مختلف برای هضم سوبستراهای موجود در محیط‌های تخمیر نسبت داده شد.

ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی: برخلاف تصوراتی که از اثرات ضد میکروبی ترکیبات فنولی روی تمامی باکتری‌ها وجود دارد، نتایج تحقیقات مختلف نشان می‌دهد، ترکیبات فنولی نه‌تنها روی پروبیوتیک‌ها اثرات ضد میکروبی ندارند بلکه سبب تحریک رشد و همچنین زنده مانی باکتری‌های پروبیوتیک می‌شوند. در مقابل تخمیر توسط باکتری‌های پروبیوتیک نیز سبب افزایش زیست‌دسترسی ترکیبات فنولی، افزایش محتوای فنولی و آزاد کردن ترکیبات حد واسط جدید می‌گردد (۴۰). در این مطالعه نیز تأثیر فرآیند تخمیر توسط دو باکتری *L. casei* و *B. longum* روی محتوای فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی ASP مورد مطالعه قرار گرفت که نتایج آن در شکل ۳ مشاهده می‌شود. لازم به ذکر است

TPC و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در محیط حاوی گلوکز و FOS به دلیل فقدان منابع پلی‌فنولی و همچنین تداخل ترکیبات قندی در تعیین TPC به دلیل واکنش با معرف فولین-سیوکالتو اندازه‌گیری نشدند.

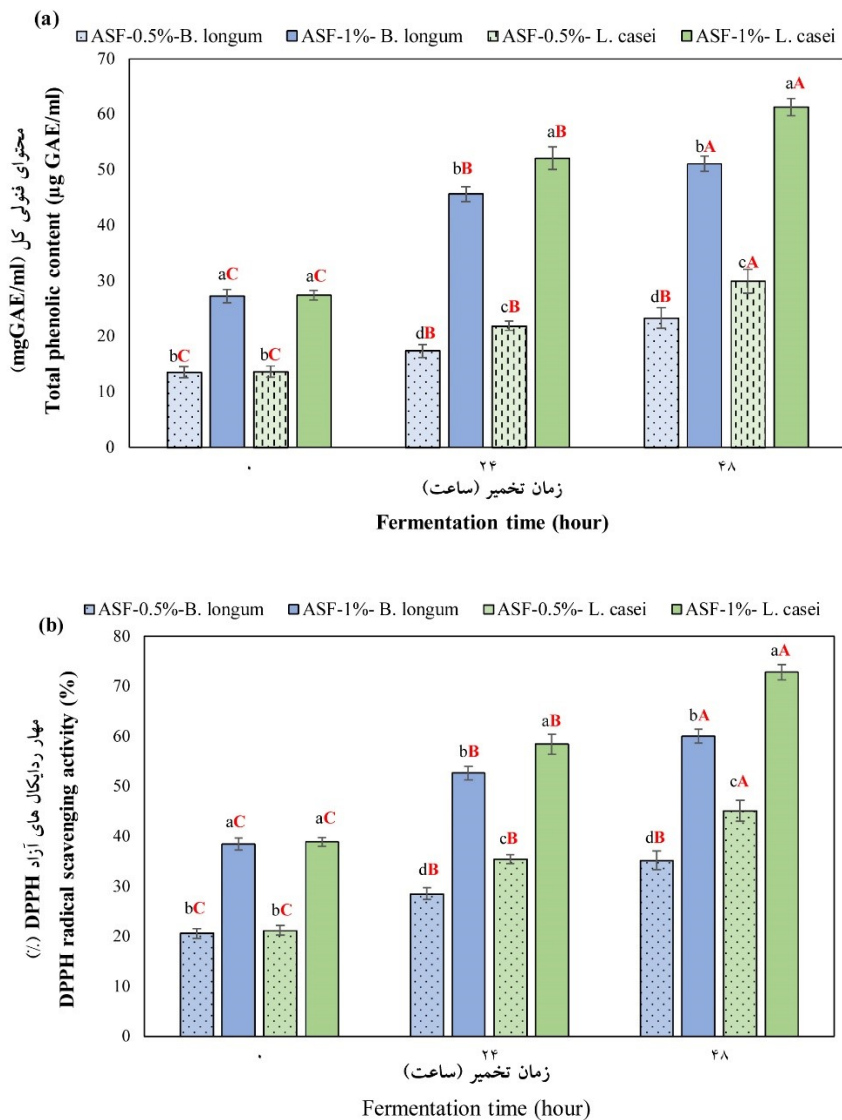
نمونه کنترل منفی نیز در تمامی زمان‌های اندازه‌گیری فاقد TPC بود. در ابتدای تخمیر و در سطح غلظت مشابه ASP، اختلاف معنی‌داری بین TPC در محیط‌های تلقیح شده با *L. casei* و *B. longum* مشاهده نشد ($P > 0/05$). طی ۲۴ ساعت ابتدایی تخمیر، TPC در تمامی نمونه‌ها به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < 0/05$). میزان افزایش در محیط حاوی ASP-۰/۵% و ASP-۱% و تلقیح شده با *B. longum* به ترتیب ۲۸/۱ و ۶۷/۶٪ و در محیط تلقیح شده با *L. casei* به ترتیب ۶۰/۳ و ۸۹/۷۹٪ بود. افزایش TPC طی روز ۲ تخمیر نیز ادامه یافت و به حداکثر میزان خود رسید. همانطور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، اختلاف معنی‌داری بین عملکرد دو باکتری در افزایش TPC مشاهده گردید و در هر دو سطح غلظت ASP، *L. casei* توانایی بیش‌تری در افزایش TPC نسبت به *B. longum* نشان داد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی با روش مهار رادیکال‌های آزاد DPPH نیز مشابه با TPC برای تمامی نمونه‌ها روند افزایشی در طول زمان تخمیر نشان داد. بیش‌ترین میزان فعالیت مهارکنندگی طی ۴۸ ساعت تخمیر، به ترتیب مربوط به محیط حاوی ASP-۱% در حضور باکتری *L. casei* (۳۸/۷۲-۹/۸٪)، محیط حاوی ASP-۱% در حضور باکتری *B. longum* (۶۰/۰۴-۳۸/۴۵٪)، محیط حاوی ASP-۰/۵% در حضور باکتری *L. casei* (۴۵/۱۲-۲۱/۲۳٪) و محیط حاوی ASP-۰/۵% در حضور باکتری *B. longum* (۳۵/۲۲-۲۰/۶۳٪) بود. شاکرامی و همکاران (۲۰۲۲)، گزارش کردند TPC عصاره متانولی (۰/۸۰٪) پودر جوانه یونجه معادل $17/64 \pm$

¹ *Lactobacillus paracasei*

² *Lactiplantibacillus plantarum*

گلوکوزید مهم‌ترین ترکیبات فنولی تشکیل دهنده‌ی عصاره خشک جوانه یونجه و دایدزین^۱ و جنیستین^۲، دایدزئین^۳ و جنیستئین^۴ مهم‌ترین ترکیبات ایزوفلاونی عصاره خشک جوانه یونجه می‌باشند (۴۳).

۲۸۴/۳۴ میلی‌گرم معادل گالیک اسید در هر ۱۰۰ گرم عصاره متانولی خشک شده به روش انجمادی می‌باشد (۲۵). سینامیک اسید، لوتئولین-۴-O- گلوکوزید، *p*-کوهاریک اسید، فرولیک اسید و لوتئولین-۷-O-



شکل ۳- تغییرات محتوای فنولی کل (a) و فعالیت آنتی‌اکسیدانی (b) طی ۴۸ ساعت تخمیر پودر جوانه یونجه با باکتری *L. casei* (a) و *B. longum* (b) در هر ستون نشان دهنده‌ی اختلاف آماری معنی‌دار بین ترکیبات پری‌بیوتیک در هر روز می‌باشند ($P < 0.05$). حروف بزرگ متفاوت روی هر ستون نشان دهنده‌ی اختلاف آماری معنی‌دار بین زمان‌های مختلف تخمیر یک ترکیب پری‌بیوتیک می‌باشند ($P < 0.05$).

Figure 3- Changes in the total phenolic content (a) and antioxidant activity (b) of media during 48 h fermentation of alfalfa sprout powder by of *L. casei* and *B. longum*. Different small letters in each column indicate significant differences between different prebiotics at each time ($P < 0.05$). Different capital letters in each column indicate significant differences between different days of each prebiotic ($P < 0.05$).

³ Daidzein
⁴ Genistein

¹ Daidzin
² Genistin

TPC در طول زمان تخمیر افزایش یافت اما این افزایش در نمونه‌های لوبین و کینوا بیشتر از گندم بود. همچنین *B. animalis* و *B. longum* تأثیر بیش‌تری بر افزایش TPC نشان دادند. این افزایش TPC به فعالیت‌های هیدرولیتیکی آنزیم‌های استرازی آزاد شده توسط بیفیدوباکتریوم‌ها نسبت داده شد. همچنین فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH در لوبین، کینوا و گندم طی ۷۲ ساعت تخمیر به ترتیب بین ۶۱-۳۲، ۲۷-۶۱ و ۳۳-۳۴٪ متغیر بود. در این مطالعه همبستگی بالایی بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی با TPC گزارش شد (۴۶). تبدیل زیستی ترکیبات فنولی به سایر متابولیت‌ها یا سنتز ترکیبات جدید می‌تواند از طریق مسیرهای متابولیکی مختلفی رخ دهد که خود وابسته به نوع سویسترا و نوع سویه پروبیوتیک است. هر باکتری پروبیوتیک رویکرد اختصاصی خود را در متابولیسم، تجزیه و هیدرولیز ترکیبات فنولی دارد (۴۷). بسیاری از گونه‌های پروبیوتیکی از طریق آنزیم‌های گلیکوزیل هیدرولاز، قادر به آزاد کردن آگلیکون از ساختار ترکیبات فنولی هستند و می‌توانند فرآیندهایی از قبیل دگلیکوزیلاسیون، دمتیلاسیون، دهیدروکسیلاسیون، شکستن باندهای استری، کاهش تعداد باندهای دوگانه، ایزومریزاسیون و دکربوکسیلاسیون ترکیبات فنولی را کاتالیز نمایند و دلیل مشاهده‌ی نتایج متفاوت در مطالعات مختلف همین تفاوت‌ها می‌باشند (۴۸).

نتیجه‌گیری

جوانه یونجه یکی از اشکال پرمصرف جوانه است که به‌صورت تازه، پودر شده یا مکمل در بازار موجود است. با توجه به این که عمر نگهداری جوانه‌های تازه در بازار بسیار محدود است، انواع پودر شده آن در سال‌های اخیر در بازار ارائه شده‌اند. در این مطالعه ویژگی‌های تغذیه‌ای پودر آن به‌عنوان یک محصول در

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد، تخمیر ASP توسط دو باکتری پروبیوتیک مورد بررسی با افزایش TPC و فعالیت آنتی‌اکسیدانی همراه بود. تخمیر آرد کامل سویا توسط *L. casei* طی ۷۲ ساعت تخمیر، با افزایش محتوای کل ترکیبات فلاونوئیدی از ۱۰۱/۵ به ۷۲۹/۹ میلی‌گرم در کیلوگرم و محتوای کل ترکیبات فنولی از ۵۰۸/۵ به ۱۰۰۲/۱ میلی‌گرم در کیلوگرم همراه بود که نتایج این مطالعه را مبنی بر توانایی *L. casei* در افزایش TPC را تأیید می‌نماید. این محققین گزارش کردند اغلب ترکیبات فنولی به‌صورت نامحلول یا به شکل متصل به سایر ترکیبات وجود دارند. احتمالاً به دلیل فعال شدن آنزیم‌های تجزیه‌کننده *L. casei*، ترکیبات فنولی به‌صورت آزاد در آمده و در نتیجه محتوای آن‌ها افزایش می‌یابد (۴۴). در مطالعه‌ی دیگری دلنه‌ی کامل جو و جو دوسر در محیط آبی به مدت ۱۸ ساعت با باکتری‌های *L. LA1*، *L. acidophilus* LA-5 و *L. reuteri* SD2112 و *johnsonii* تغییرات محتوای ترکیبات فنولی آزاد مورد بررسی قرار گرفت. بیش‌ترین میزان افزایش در محتوای ترکیبات فنولی آزاد به ترتیب در محیط تخمیر با LA1 *L. reuteri* SD2112 و *L. johnsonii* LA-5 حاصل گردید. بیش‌ترین میزان افزایش در تخمیر دانه جو از ۲/۵۵ به ۶۹/۹۱ میکروگرم در گرم و برای دانه جو دوسر از ۴/۱۳ به ۱۰۹/۴۲ میکروگرم در گرم بود. در انتهای تخمیر مقادیر قابل ملاحظه‌ای از ترکیبات فنولی باند شده در هر دو نمونه مشاهده گردید که میزان آن در جو دوسر کم‌تر بود (۴۵). در مطالعه دیگری تأثیر فرآیند تخمیر گندم، کینوا^۱ و لوبیای لوبین^۲ با سه سویه *B. longum*، *B. brevis* و *B. animalis* بر TPC و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. در مورد تمامی نمونه‌ها در تخمیر با هر سه سویه مورد بررسی،

² Lupin

¹ Quinoa

اثر منفی دارد. لذا می‌توان از این محصول به‌عنوان یک ترکیب با اثرات سلامتی بخش، در فرمولاسیون غذاهای عملگرا نظیر غذاهای سیمبیوتیک بهره جست. با این وجود، بررسی دقیق اثرات متقابل پروبیوتیک‌ها و ASP روی ویژگی‌های تغذیه‌ای، حسی، ترکیبات زیست فعال و فعالیت‌های بیولوژیکی این محصولات باید در مطالعات آتی مورد توجه قرار گیرد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز که هزینه این تحقیق را در قالب پژوهانه (گرنه شماره SCU.VF1401.38687) فراهم نمودند، سپاس‌گزاری می‌نمایم. همچنین از همکاری شرکت جوانه آفتاب مشهد بابت تأمین پودر جوانه یونجه صمیمانه تشکر می‌شود.

دسترس با عمر نگهداری بالا مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به درصد بالای پروتئین و چربی در این پودر، مصرف آن می‌تواند بخشی از نیاز بدن به اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب ضروری را تأمین نماید. علاوه بر املاح پر مقدار، ASP حاوی عناصر کم مقدار نظیر آهن، مس، روی و منگنز بود. در ارزیابی فعالیت پری‌بیوتیکی نیز مشخص گردید، ASP از پتانسیل بالایی در تحریک رشد دو باکتری پروبیوتیک مورد بررسی برخوردار است و از نظر این ویژگی با پری‌بیوتیک تجاری FOS قابل رقابت بود. نتایج این تحقیق همچنین نشان داد، ASP و پروبیوتیک‌ها با یکدیگر تعامل مثبتی داشته‌اند به طوری که محتوای ترکیبات فنولی و اثرات آنتی‌اکسیدانی ASP طی تخمیر به‌طور قابل توجهی افزایش یافت. علی‌رغم ارزش تغذیه‌ای بالا، ویژگی‌های ارگانولپتیکی خاص ASP نظیر بوی لوبیایی و مزه کمی تلخ، روی مصرف آن

References

1. Miyahira, R. F., Lopes, J.D.O., & Antunes, A.E.C. (2021). The use of sprouts to improve the nutritional value of food products: A brief review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 76(2), 143-152.
2. Xu, M., Rao, J., & Chen, B. (2020). Phenolic compounds in germinated cereal and pulse seeds: Classification, transformation, and metabolic process. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(5), 740-759.
3. S. Santos, C., Silva, B., MP Valente, L., Gruber, S., & W. Vasconcelos, M. (2020). The effect of sprouting in lentil (*Lens culinaris*) nutritional and microbiological profile. *Foods*, 9(4), 400.
4. Gan, R. Y., Lui, W. Y., Wu, K., Chan, C. L., Dai, S. H., Sui, Z. Q., & Corke, H. (2017). Bioactive compounds and bioactivities of germinated edible seeds and sprouts: An updated review. *Trends in Food Science & Technology*, 59, 1-14.
5. Almuhayawi, M. S., Hassan, A. H., Al Jaouni, S. K., Alkhalifah, D. H. M., Hozzein, W. N., Selim, S., AbdElgawad, H., & Khamis, G. (2021). Influence of elevated CO₂ on nutritive value and health-promoting prospective of three genotypes of Alfalfa sprouts (*Medicago Sativa*). *Food Chemistry*, 340, 128147.
6. Martínez, R., Kapravelou, G., Porres, J. M., Melesio, A. M., Heras, L., Cantarero, S., Gribble, F., Parker, H., Aranda, P., & López-Jurado, M. (2016). *Medicago sativa* L., a functional food to relieve hypertension and metabolic disorders in a spontaneously hypertensive rat model. *Journal of Functional Foods*, 26, 470-484.
7. Ehsani, A.; Mahmudi, R.; Tokmechi, A.; Pajohi, MR. (2011). Iranian white chees as a food carrier for probiotic bacteria. *Journal of Nutrition Sciences and Food Technology*, 3:77-83.
8. Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K., Cani, P., Verbeke, K., & Reid, G. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics

- (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 14(8), 491-502.
9. Argüelles-López, O. D., Reyes-Moreno, C., Gutiérrez-Dorado, R., Sánchez-Osuna, M. F., López-Cervantes, J., Cuevas-Rodríguez, E. O., Milán-Carrillo, J., & Perales-Sánchez, J. X. K. (2018). Functional beverages elaborated from amaranth and chia flours processed by germination and extrusion. *Biotecnia*, 20(3), 135-145.
 10. Noori, N., Hamed, H., Kargozari, M., & Shotorbani, P. M. (2017). Investigation of potential prebiotic activity of rye sprout extract. *Food Bioscience*, 19, 121-127.
 11. Almuhayawi, M. S., Hassan, A. H., Al Jaouni, S. K., Alkhalifah, D. H. M., Hozzein, W. N., Selim, S., AbdElgawad, H., & Khamis, G. (2021). Influence of elevated CO₂ on nutritive value and health-promoting prospective of three genotypes of Alfalfa sprouts (*Medicago Sativa*). *Food Chemistry*, 340, 128147.
 12. Mattioli, S., Dal Bosco, A., Castellini, C., Falcinelli, B., Sileoni, V., Marconi, O., Cotozzolo, E., & Benincasa, P. (2019). Effect of heat-and freeze-drying treatments on phytochemical content and fatty acid profile of alfalfa and flax sprouts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(8), 4029-4035.
 13. Giuberti, G., Rocchetti, G., Sigolo, S., Fortunati, P., Lucini, L., & Gallo, A. (2018). Exploitation of alfalfa seed (*Medicago sativa* L.) flour into gluten-free rice cookies: Nutritional, antioxidant and quality characteristics. *Food Chemistry*, 239, 679-687.
 14. Ullah, F., Ahmad, S., Wahab, S., Zeb, A., Khan Khattak, M., Khan, S., & Kang, M. (2016). Quality evaluation of biscuits supplemented with alfalfa seed flour. *Foods*, 5(4), 68.
 15. Stone, A. K., Karalash, A., Tyler, R. T., Warkentin, T. D., & Nickerson, M. T. (2015). Functional attributes of pea protein isolates prepared using different extraction methods and cultivars. *Food Research International*, 76, 31-38.
 16. Nateghpour, B., Kavooosi, G., & Mirakhorli, N. (2021). Amino acid profile of the peel of three citrus species and its effect on the combination of amino acids and fatty acids *Chlorella vulgaris*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 98, 103808.
 17. Adebisi, J. A., Obadina, A. O., Adebo, O. A., & Kayitesi, E. (2017). Comparison of nutritional quality and sensory acceptability of biscuits obtained from native, fermented, and malted pearl millet (*Pennisetum glaucum*) flour. *Food Chemistry*, 232, 210-217.
 18. Moreno-Vilet, L., Garcia-Hernandez, M. H., Delgado-Portales, R. E., Corral-Fernandez, N. E., Cortez-Espinosa, N., Ruiz-Cabrera, M. A., & Portales-Perez, D. P. (2014). In vitro assessment of agave fructans (*Agave salmiana*) as prebiotics and immune system activators. *International Journal of Biological Macromolecules*, 63, 181-187.
 19. Sah, B. N. P., Vasiljevic, T., McKechnie, S., & Donkor, O. N. (2016). Effect of pineapple waste powder on probiotic growth, antioxidant and antimutagenic activities of yogurt. *Journal of food science and technology*, 53, 1698-1708.
 20. Li, J., Zhang, X., Cao, L., Ji, J., & Gao, J. (2018). Three inulin-type fructans from *Codonopsis pilosula* (Franch) Nannf. Roots and their prebiotic activity on *Bifidobacterium longum*. *Molecules*, 23(12), 3123.
 21. Slinkard, K., & Singleton, V. L. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28(1), 49-55.
 22. Zhang, H., Cui, S. W., Nie, S. P., Chen, Y., Wang, Y. X., & Xie, M. Y. (2016). Identification of pivotal components on the antioxidant activity of polysaccharide extract from *Ganoderma atrum*. *Bioactive Carbohydrates and Dietary fibre*, 7(2), 9-18.
 23. Chen, X., Qi, Y., Zhu, C., & Wang, Q. (2019). Effect of ultrasound on the properties and antioxidant activity of hawthorn pectin. *International journal of biological macromolecules*, 131, 273-281.
 24. Shakrmi, Maryam. (2022). Evaluation of physicochemical and organoleptic characteristics and *Lactobacillus acidophilus* viability in flavored yoghurt supplemented with alfalfa sprout. Master's thesis. Shahid Chamran University of Ahvaz.
 25. Babinec, J., Kozova, Z., Strakova, E., & Suchý, P. (2001). The variance of the amino acids in some lucerne (*Medicago sativa* L.) populations. *CIHEAM*, 45, 235-239.

26. Apostol, L., Lorga, S., & Mosoiu, C. (2017). Alfalfa concentrate—a rich source of nutrients for use in food products. *Journal of international scientific publications. Agriculture & Food*, 5, 66-73.
27. Zrig, A., Saleh, A., Hamouda, F., Okla, M. K., Al-Qahtani, W. H., Alwasel, Y. A., Al-Hashimi, A., Hegab, M. Y., Hassan, A. H. A., & AbdElgawad, H. (2021). Impact of sprouting under potassium nitrate priming on nitrogen assimilation and bioactivity of three Medicago species. *Plants*, 11(1), 71.
28. Bains, K., Uppal, V., & Kaur, H. (2014). Optimization of germination time and heat treatments for enhanced availability of minerals from leguminous sprouts. *Journal of Food Science and Technology*, 51, 1016-1020.
29. Sahni, P., Sharma, S., & Surasani, V. K. R. (2020). Influence of processing and pH on amino acid profile, morphology, electrophoretic pattern, bioactive potential and functional characteristics of alfalfa protein isolates. *Food Chemistry*, 333, 127503.
30. Chiriac, E. R., Chițescu, C. L., Sandru, C., Geană, E. I., Lupoae, M., Dobre, M., Borda, D., Gird, C. E., & Boscencu, R. (2020). Comparative study of the bioactive properties and elemental composition of red clover (*Trifolium pratense*) and alfalfa (*Medicago sativa*) sprouts during germination. *Applied Sciences*, 10(20), 7249.
31. Marton, M.; Mandoki, ZS.; Csapo-Kiss, ZS.; Csapo, J. (2010). The role of sprouts in human nutrition. A review. *Acta Univ. Sapientiae*, 3: 81-117.
32. Ghani, M., Kulkarni, K. P., Song, J. T., Shannon, J. G., & Lee, J. D. (2016). Soybean sprouts: A review of nutrient composition, health benefits and genetic variation. *Plant Breeding and Biotechnology*, 4(4), 398-412.
33. Călinoiu, L. F., Vodnar, D. C., & Precup, G. (2016). The probiotic bacteria viability under different conditions. *Bulletin UASVM Food Science and Technology*, 73(2), 55-60.
34. García, S. N. C., Rodríguez-Herrera, R., Flores, S. N., Silva-Belmares, S. Y., Esparza-González, S. C., Ascacio-Valdés, J. A., & Flores-Gallegos, A. C. (2023). Sprouts as probiotic carriers: A new trend to improve consumer nutrition. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, 7, 100185.
35. Trejo Rodriguez, I. S., Alcantara Quintana, L. E., Algara Suarez, P., Ruiz Cabrera, M. A., & Grajales Lagunes, A. (2021). Physicochemical properties, antioxidant capacity, prebiotic activity and anticancer potential in human cells of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed flour. *Molecules*, 26(16), 4854.
36. Ghasrehamidi, S., & Daneshi, M. (2018). Effect of Date seed Powder on qualitative properties and survival of probiotic bacteria in set yogurt. *Food Processing and Preservation Journal*, 11(1), 19-32.
37. Naqash, F., Masoodi, F. A., Rather, S. A., Wani, S. M., & Gani, A. (2017). Emerging concepts in the nutraceutical and functional properties of pectin—A Review. *Carbohydrate polymers*, 168, 227-239.
38. Wang, X., Huang, M., Yang, F., Sun, H., Zhou, X., Guo, Y., Wang, X., & Zhang, M. (2015). Rapeseed polysaccharides as prebiotics on growth and acidifying activity of probiotics *in vitro*. *Carbohydrate Polymers*, 125, 232-240.
39. Akbari-Alavijeh, S., Soleimani-Zad, S., Sheikh-Zeinoddin, M., & Hashmi, S. (2018). Pistachio hull water-soluble polysaccharides as a novel prebiotic agent. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107, 808-816.
40. Pallin, A., Agback, P., Jonsson, H., & Roos, S. (2016). Evaluation of growth, metabolism and production of potentially bioactive components during fermentation of barley with *Lactobacillus reuteri*. *Food Microbiology*, 57, 159-171.
41. Tadayoni, M., Sheikh-Zeinoddin, M., & Soleimani-Zad, S. (2015). Isolation of bioactive polysaccharide from acorn and evaluation of its functional properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 179-184.
42. Sharma, R., Diwan, B., Singh, B. P., & Kulshrestha, S. (2022). Probiotic fermentation of polyphenols: Potential sources of novel functional foods. *Food Production, Processing and Nutrition*, 4(1), 21.

43. Silva, L. R., Pereira, M. J., Azevedo, J., Gonçalves, R. F., Valentão, P., de Pinho, P. G., & Andrade, P. B. (2013). *Glycine max* (L.) Merr., *Vigna radiata* L. and *Medicago sativa* L. sprouts: A natural source of bioactive compounds. *Food Research International*, 50(1), 167-175.
44. Li, S., Jin, Z., Hu, D., Yang, W., Yan, Y., Nie, X., Lin, J., Zhang, Q., Gai, D., Ji, Y., & Chen, X. (2020). Effect of solid-state fermentation with *Lactobacillus casei* on the nutritional value, isoflavones, phenolic acids and antioxidant activity of whole soybean flour. *LWT-Food Science and Technology*, 125, 109264.
45. Hole, A. S., Rud, I., Grimmer, S., Sigl, S., Narvhus, J., & Sahlstrøm, S. (2012). Improved bioavailability of dietary phenolic acids in whole grain barley and oat groat following fermentation with probiotic *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus johnsonii*, and *Lactobacillus reuteri*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(25), 6369-6375.
46. Ayyash, M., Johnson, S. K., Liu, S. Q., Al-Mheiri, A., & Abushelaibi, A. (2018). Cytotoxicity, antihypertensive, antidiabetic and antioxidant activities of solid-state fermented lupin, quinoa and wheat by Bifidobacterium species: In-vitro investigations. *LWT-Food Science and Technology*, 95, 295-302.
47. He, Z., Zhang, H., Wang, T., Wang, R., & Luo, X. (2022). Effects of five different lactic acid bacteria on bioactive components and volatile compounds of oat. *Foods*, 11(20), 3230.
48. Braune, A., & Blaut, M. (2016). Bacterial species involved in the conversion of dietary flavonoids in the human gut. *Gut Microbes*, 7(3), 216-234.