مقاله علمی پژوهشی/ نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۳۰ شماره ۳/ سال ۱۳۹۹/ صفحات ۱۲۳تا ۱۳۵

بررسی ویژگی بالقوه پری بیوتیکی زایلوالیگوساکاریدهای تولید شده به روش آنزیمی ازهسته خرما

داوود عطایی[۱]، زهره حمیدی اصفهانی[۲*] و حسن احمدی گاولیقی[۲]

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۱/۹ تاریخ پذیرش: ۹۸/٤/۲۳

[۱] دانشجوی دکتری، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

[۲] به‌ترتیب دانشیارو استادیار ، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

* مسئول مکاتبه: Email: hamidy_z@modares.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: هسته خرما حاوی مقادیر بالایی فیبراست که با استخراج الیگوساکاریدهای آن می‌توان به مواد فراسودمندی مانند پری‌بیوتک‌ها دست یافت. **هدف** : هدف این تحقیق، استخراج زایلان از هسته خرما، تبدیل آنزیمی آن به زایلوالیگوساکاریدها و بررسی قابلیت پری‌بیوتیکی آنها در مقایسه با پری‌بیوتیک تجاری (فروکتوالیگوساکارید)است. **روش کار**: زایلان هسته خرما (رقم کبکاب) استخراج و سپس با استفاده از دو آنزیم زایلاناز تجاری به نام پنتوپان‌منوبی‌جی و ورون۱۹۱ آبکافت گردید. کمیت و کیفیت زایلوالیگوساکاریدهای حاصل، به وسیله کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (تعویض یونی) تعیین گردید. برای سنجش *برون‌تنی* هضم‌پذیری گوارشی، زایلوالیگوساکاریدهای حاصل از آبکافت، در معرض محلول های شیمیایی مشابه شیره‌های گوارشی قرار داده شد. همچنین اثر زایلوالیگوساکاریدهای حاصل، به عنوان منبع کربن، بر رشد *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* (PTCC1644)، در مقایسه با کنترل منفی (محیط کشت بدون منبع کربن) و کنترل مثبت (گلوکز) و پری‌بیوتیک تجاری مورد ارزیابی قرار گرفت. pH محیط های کشت نیز در فواصل زمانی دو ساعت یک‌باراندازه‌گیری شد. **نتایج**: نتایج نشان داد که الیگوساکاریدهای حاصل از آبکافت، مقاوم به هضم بودند. بین زایلوالیگوساکاریدها، پری‌بیوتیک تجاری و گروههای کنترل، از نظر اثر بر سرعت رشد(μ_{max}) و دانسیته نوری بعد از ۲۴ ساعت (OD_{600})، تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($P\leq$ ۰/۰۵). اما بین دو زایلوالیگوساکارید حاصل از دوآنزیم مذکور، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($P>$ ۰/۰۵). کاهش pH محیط های حاوی زایلوالگوساکارید در بین سایر محیط ها (نسبت به نمونه کنترل منفی) ، بیشترین بود که نشان دهنده تولید بیشتر اسیدهای آلی است. **نتیجه گیری نهایی**: به دلیل هضم ناپذیری زایلوالیگوساکاریدهای به‌دست‌آمده از آبکافت آنزیمی زایلان هسته خرما و اثر مثبت بر رشد *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* ، می‌توان خاصیت بالقوه پری‌بیوتیکی به آنها نسبت داد.

واژگان کلیدی: پروبیوتیک، زایلوالیگوساکارید، هسته خرما، هضم‌پذیری

مقدمه

کربوهیدرات‌ها به دو دسته قابل هضم و غیرقابل هضم تقسیم می شوند. کربوهیدرات‌های غیرقابل هضم آنهایی

هستند که در قسمت بالایی دستگاه گوارش هضم نمی شوند و به صورت دست‌نخورده به قسمت انتهایی روده بزرگ (کولون) رسیده و به مصرف بعضی از ریزاندامگان (میکروارگانیسم) ساکن این منطقه می رسند چنین خصوصیتی مشخصه ترکیبات پری‌بیوتیک است (سینگ و همکاران ۲۰۱۴؛ اروجی و همکاران ۱۳۹۶). پری‌بیوتیک ها عبارتند از ترکیبات غیر قابل هضم که باعث تحریک اختصاصی رشد و یا فعالیت یکی یا تعداد محدودی از باکتری‌های روده بزرگ شده و موجب افزایش سلامتی میزبان می شوند (چاپلا و همکاران، ۲۰۱۲). گزارش های متعددی در تایید اثرات پری‌بیوتیک ها در پیشگیری از برخی بیماریهای متابولیکی و قلبی عروقی و برخی سرطان ها وجود دارد. از انواع پری بیوتیک ها می‌توان به فروکتوالیگوساکاریدها، گالاکتوالیگوساکاریدها و لاکتولوز اشاره کرد. امروزه لاکتولوز به عنوان یک غذا دارو به شکل شربت برای برخی بیماران تجویز می شود. در کشورهای توسعه یافته فروکتوالیگوساکاریدها و گالاکتوالیگوساکاریدها در ترکیب غذای نوزادان و غذاهای فراسودمند استفاده می شود (گانزل ۲۰۱۲).

زایلوالیگوساکاریدها[1] ترکیباتی هستند که پژوهش در مورد تولید، منابع و فعالیت پری‌بیوتیکی‌شان در جریان است. زایلوالیگوساکاریدها را می توان از آبکافت[2] زایلان به دست آورد. مواد لیگنوسلولزی که گسترده‌ترین مواد زیستی در طبیعت هستند از سلولز (بسپار[3] خطی از واحدهای بتا ۱و۴- گلوکز)، لیگنین (بسپاری از واحدهای فنیل- پروپان حاوی الکل های پیچیده) و همی سلولز (بسپار متشکل از واحدهای قندی پنج کربنه) تشکیل یافته‌اند (سون و همکاران ۲۰۱۶). انواع همی سلولز موجود در طبیعت شامل گلوکورونوزایلان، آرابینوزایلان، مانان، گلوکومانان، گالاکتومانان، گالاکتوگلوکومانان، بتاگلوکان، زایلوگلوکان، و زایلان است. زایلان بیشترین همی‌سلولز موجود در طبیعت است که عموما از واحدهای قند پنج کربنی زایلوز با پیوندهای بتا ۱و۴ و گروههای جانبی تشکیل یافته است. ایشورد و همکاران (۲۰۰۳) در مطالعه خود همی سلولز هسته خرما رقم اپل را استخراج و واحدهای قندی تشکیل دهنده آن را تعیین کیفی و کمی نمودند. نتایج این تحقیق نشان داد که همی‌سلولز هسته خرما رقم مذکور عمدتا از واحدهای قندی زایلوز تشکیل یافته است. در دهه اخیر تحقیقاتی پیرامون تهیه زایلوالیگوساکاریدها از زایلان حاصل از منابع مختلف لیگنوسلولزی و خواص پری‌بیوتیکی آنها انجام شده است (مونیز و همکاران ۲۰۱۶؛ فاریار و همکاران ۲۰۱۵)، ولی تا کنون پژوهشی در مورد استخراج زایلان از هسته خرما و تولید زایلوالیگوساکارید از آن صورت نگرفته است. در تحقیق حاضر، زایلان هسته خرما رقم کبکاب، استخراج و سپس تحت تاثیر دو آنزیم زایلاناز تجاری قرار داده شد و زایلوایگوساکاریدهای تولید شده، توسط کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (تعویض یونی)، شناسایی کمی و کیفی شدند. در مرحله بعد هضم پذیری زایلوالیگوساکاریدها در محیط *برون تنی*[4] مورد آزمون قرار گرفت، سپس اثر محصولات حاصل از هر یک از آنزیم ها بر تکثیر باکتری پروبیوتیک *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم*[5] در مقایسه با پری‌بیوتیک تجاری ، گروههای کنترل مثبت (محیط کشت حاوی گلوکز) و منفی (محیط کشت بدون منبع کربن) مطالعه گردید.

مواد و روش ها

هگزان از شرکت دکتر مجللی (ایران)، فروکتوالیگوساکارید (FOS[6]) با نام تجاری Orafti P 95 از Beneo بلژیک، آنزیم پنتوپان‌منو بی‌جی[7](آمریکا)، آلفا آمیلاز بزاق (IX-A)، پپسین معده‌ای و پانکرآتین از شرکت سیگما آلدریچ (آمریکا)، آنزیم ورون ۱۹۱[8]از شرکت AB enzyme (آلمان)، ال-سیستئین هیدروکلراید (C-7755) و ال-آسکوربات سدیم هر دو از سیگما

[1] XOS
[2] Hydrolysis
[3] Polymer
[4] *In vitro*
[5] *Bifidobacterium Bifidum*
[6] Froctooligosaccharide
[7] Pentopan mono BG
[8] Veron 191

(آمریکا)، زایلوز، زایلوبیوز،زایلوتریوز، زایلوتترا اوز، زایلوپنتا اوز و زایلوهگزاوز از شرکت مگازایم ایرلند و بقیه مواد شامل سدیم کلریت، اسید استیک گلاسیال، استات سدیم، سدیم هیدروکسید، اتیل الکل،سدیم پتاسیم تارتارات، سولفوریک اسید، فنل، کلرید پتاسیم، فسفات دی هیدروژن سدیم، کربنات هیدروژن سدیم، کلرید منیزیم، دی آمونیوم کربنات، کلرید کلسیم، پپتون کازئین، عصاره مخمر، عصاره گوشت، گلوکز، فسفات دی‌پتاسیم هیدروژن، توئین ۸۰، ۳ و۵ دی نیتروسالیسیلیک اسید از شرکت مرک (آلمان) خریداری شد. باکتری لیوفیلیزه شده *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* (PTCC1644) از مرکز کلکسیون قارچها و باکتری های صنعتی ایران[1]وابسته به سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران تهیه گردید.

استخراج زایلان

هسته های خرما توسط آسیاب تیغه‌ای به پودر تبدیل شد. سپس فرآیند خالص‌سازی پودر خرما به روش ایشورد و همکاران (۲۰۰۳) انجام شد. این مرحله شامل چربی زدایی با هگزان (دمای 40^oC به مدت چهار ساعت)، قند و رنگ زدایی با اتیل الکل (75^oC به مدت چهار ساعت) و لیگنین زدایی با کلریت سدیم ۰/۷٪ (75^oC به مدت پنج ساعت) بود. مواد باقیمانده از این مرحله (هلوسلولز)، ابتدا به مدت ۳ ساعت در معرض محلول سود ۰/۱ نرمال با دمای 80^oC قرار گرفت (چن و همکاران ۲۰۱۱)، مواد حاصل از مرحله اخیر پس از دوبار شستشو با آب، به مدت ۲۴ ساعت در معرض محلول سود ۲/۲۵ نرمال در دمای اتاق قرار گرفتند و از کاغذ صافی عبور داده شد و توسط اسید استیک گلاسیال تا pH حدود ۵/۵ خنثی گردید. محلول خنثی، با سه حجم الکل اتیلیک 95^o دردمای 4^oC مخلوط شد و پس از گذشت یک شب، با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. رسوبات حاصل، چندین مرحله با آب شستشو شدند و در انتها در جریان هوای 60^oC خشک شدند (سمنتا و همکاران، ۲۰۱۲).

آبکافت زایلان

از دو آنزیم زایلاناز تجاری ورون ۱۹۱و پنتوپان منوبی‌جی به ترتیب متعلق به خانواده GH10 و GH11، برای آبکافت زایلان هسته خرمااستفاده شد. محلول آنزیمی از هر یک از دو آنزیم در غلظت معین آماده شد و پس از ورتکس و سانتریفوژ نمودن آن، از مایع رویی آنزیم برای آبکافت استفاده گردید. از زایلان نیز دو محلول ۳٪ (وزنی /حجمی) در بافر اسید استیک/ استات سدیم ۲۰ میلی مولار(pH=۵) آماده شد. به یکی از محلولهای زایلان، مایع رویی آنزیم ورون، و به محلول دیگر، مایع رویی آنزیم پنتوپان (هر کدام به نسبت ۲۰ واحد آنزیم به ازاء هر گرم زایلان) افزوده شد. محلول زایلان حاوی آنزیم ورون، در دمای $40\ ^\circ C$ به مدت ۲ ساعت (کایران و همکاران ۲۰۱۳) و محلول زایلان حاوی آنزیم پنتوپان منوبی‌جی در دمای $55\ ^\circ C$ به مدت ۴ ساعت (اسکارنوت و همکاران ۲۰۱۲) در ترموشیکر قرار داده شد؛ پس از سپری شدن زمان ها، با قرار دادن آن ها در آب جوش به واکنش آنزیمی خاتمه داده شد. محلول‌های حاصل از آبکافت آنزیمی، با ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ وبعد از آن از فیلتر ۰/۲۲µm عبور داده شدند. به این ترتیب، آبکافته زایلوالیگوساکاریدی حاصل از آنزیم ورون (Vxos) و آبکافته زایلوالیگوساکاریدی حاصل از آنزیم پنتوپان (Pxos) به دست آمدند. در مرحله بعد هر یک از محلول های Vxos و Pxos ها تا رسیدن به ماده خشک ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر توسط تبخیر کننده تحت خلا تغلیظ و در شیشه های غیر قابل نفوذ به هوا ذخیره شدند (هوای داخل شیشه ها با فرستادن گاز ازت به داخل آن ها، خارج شد).

شناسایی کمی و کیفی زایلوالیگوساکاریدها به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

به منظور تایید حضور زایلوالیگوساکاریدها و تشخیص درجه بسپارش، روش کرماتوگرافی مایع با کارایی بالا از نوع تعویض یونی با آشکارساز الکتروشیمیایی[2]به کار گرفته شد. سامانه مورد استفاده دارای پمپ با قابلیت برنامه ریزی گرادیانی بوده و از ستون تعویض یونی PA1 با ابعاد ۲۵۰×۴/۶ میلی متر برای جداسازی استفاده شد. اساس برنامه جداسازی، روش بلاغی و همکاران (۲۰۱۱) بود. فاز متحرک شامل آب، سدیم هیدروکسید

[1] PTCC (Persian Type Culture Collection)

[2] HPAEC- PAD

۲۰۰ میلی مولار و سدیم استات ۵۰۰ میلی مولار بود که همگی توسط گاز ازت هواگیری شدند. دمای عملیات ۳۰°C بود. برنامه جداسازی به صورت گرادیانی و کل زمان ۴۶ دقیقه بود، به طوریکه در زمان های ۶-۰ دقیقه محلول سود ۵۰ میلی مولار، ۱۶-۶ دقیقه سود ۴۲ میلی مولار و سدیم استات ۵۰ میلی مولار، ۲۶-۱۶ دقیقه سود ۵۰ میلی مولار و سدیم استات ۱۰۰ میلی مولار، ۳۶-۲۶ دقیقه سود ۲۰۰ میلی‌مولار (شستشوی زایلوالیگوساکاریدها) و ۴۶-۳۶ دقیقه سود ۵۰ میلی‌مولار (به تعادل رسیدن ستون برای تزریق بعدی) به ستون وارد شد.

به منظور رسم منحنی استاندارد داخلی، استانداردهای زایلوز، زایلوبیوز، زایلوتریوز، زایلوتتروز، زایلوپنتوز و زایلوهگزوز در غلظت های ۱، ۲/۵، ۴، ۵، ۶، ۸و ۱۰ پی پی ام تهیه و به دستگاه تزریق گردید.

اندازه‌گیری برون‌تنی هضم پذیری گوارشی زایلوالیگوساکارید

اندازه‌گیری هضم‌پذیری زایلوالیگوساکارید، به روش (شی و همکاران، ۲۰۱۸) انجام شد. در این روش قند احیاء قبل از هر تیمار هضم و قند کل و قند احیاء بعد از هر تیمار هضم اندازه گرفته شد. اندازه‌گیری قند احیاء به روش اسپکتروفتومتری (با اسپکتروفتومتر Agilent مدل Carry 60 ساخت کشور آلمان) با ماده دی نیتروسالیسیلیک اسید[1] بر حسب زایلوز (کایران و همکاران ۲۰۱۳) بود. قند کل به روش فنل- اسید سولفوریک (سها و بریور ۱۹۹۴) تعیین گردید. محلول زایلوالیگوساکارید با غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر به این منظور، واز زایلوز به عنوان استاندارد داخلی برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد. درصد آبکافت (HD %) یا به عبارتی درصد هضم زایلوالیگوساکارید در تیمارهای هضم با بکارگیری معادله زیر محاسبه گردید:

$$HD\% = \frac{Rs-Ro}{Ts-Ro} \times 100$$

R_S و T_S به ترتیب عبارتند از مقدار قند احیاء و قند کل بعد از تیمار هضم و R_O عبارت است از مقدار قند احیاء قبل از تیمار در محیط شبیه گوارشی

هضم پذیری دهانی

هضم پذیری Vxosو Pxos در مرحله دهانی در محیط شبیه سازی بزاق بررسی گردید. این محیط (pH = ۷/۰) حاوی ترکیبات KCl، KH_2PO_4، $NaHCO_3$، MgCl، $(NH_4)_2\ CO_3$، $CaCl_2$ و α–Amylase به ترتیب با غلظت ۱۵/۱، ۳/۷، ۱۳/۶، ۰/۱۵، ۰/۰۶، ۱/۵۰ میلی مولار و آلفا آمیلاز ۱۵۰U/ml بود. مقدار ۵ میلی لیتر از محیط فوق به ۵ میلی لیتر از هر یک از محلول های Vxos و Pxos افزوده شد و در حمام آب ۳۷°C قرار گرفت. بعد از سپری شدن ۵ دقیقه، جوشانده شد تا آلفا آمیلاز بزاقی غیر فعال شود (شی و همکاران ۲۰۱۸).

هضم پذیری معده ای

هضم‌پذیری Vxos و Pxos در مرحله معده با استفاده از محیط شبیه سازی معده بررسی گردید. این محیط حاوی ترکیبات KCl، KH_2PO_4، $NaHCO_3$، MgCl، $(NH_4)_2\ CO_3$، $CaCl_2$، NaCl و پپسین به ترتیب با غلظت های ۶/۹، ۰/۹، ۰/۲۵، ۰/۱۰، ۰/۵۰، ۰/۱۵، ۴۷/۲ میلی مولار و پپسین ۴۰۰۰U/ml بود. محلول فوق با استفاده از اسیدکلریدریک ۰/۰۰۱ نرمال به‌pH=۳ رسانده شد. ۵ میلی لیتر از آن به ۵ میلی لیتر از محلول های Vxos و Pxos افزوده شد ودر حمام آب ۳۷°C قرار گرفت. بعد از سپری شدن ۲ ساعت، جوشانده شد تا پپسین غیر فعال شود (شی و همکاران ۲۰۱۸).

هضم پذیری روده کوچک

هضم‌پذیری Vxos و Pxos در مرحله روده کوچک با استفاده از محیط شبیه سازی روده بررسی گردید. این محیط حاوی ترکیبات، KCl، KH_2PO_4، $NaHCO_3$، $CaCl_2$، NaCl و تریپسین به ترتیب با غلظت های ۶/۸۰، ۰/۸۰، ۰/۸۵، ۰/۳۳، ۰/۶، ۳۸/۴ میلی مولار و تریپسین ۱۰۰U/ml بود. محلول فوق با استفاده از اسیدکلریدریک به pH =۷/۰ رسانده شد. ۵ میلی لیتر از آن به ۵ میلی لیتر ازمحلول‌های Vxos و Pxos افزوده شد و در حمام آب ۳۷°C قرار داده شد. بعد از سپری شدن ۲ ساعت،

[1] DNS

جوشانده شد تا تریپسین غیر فعال شود (شی و همکاران ۲۰۱۸).

تعیین اثر محلول‌های زایلوالیگوساکارید بر رشد باکتری بیفیدوباکتریوم

فعالسازی و تهیه سوسپانسیون باکتری

برای فعالسازی و تهیه سوسپانسیون *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* از روش و محیط کشت توصیه شده توسط مرکز کلکسیون قارچها و باکتری های صنعتی ایران (PTCC) استفاده شد. کازئین پپتون، عصاره مخمر، عصاره گوشت، گلوکز، فسفات هیدروژن دی پتاسیم، توئین ۸۰ و آب مقطر به ترتیب به مقدار ۱۰/۰، ۵/۰، ۵/۰، ۱۰/۰، ۳/۰ گرم، ۱/۰ میلی لیتر و ۱ لیتر با هم مخلوط وpH توسط اسید کلریدریک ۰/۰۰۱ نرمال به ۶/۸ رسانده شد. به محلول فوق پس از سترون سازی آن در گرمخانه، در شرایط سترون مقادیری از دو محلول آسکوربات سدیم و سیستئین هیدروکلراید افزوده شد به طوریکه غلظت نهایی این دو به ترتیب به ۱٪ و ۰/۰۵٪ رسید. برای تهیه محلول سیستئین هیدروکلراید، ابتدا مقدار محاسبه شده‌ای از آن در آب حل و به حجم معین رسانده شد و با فیلتر ۰/۲۲ میکرونی سترون گردید سپس فیلتر با همان حجم آب شسته شد تا نمک باقی مانده روی فیلترشسته شده و وارد بخش صافی‌گذر گردد. برای آسکوربات هم به همین شیوه عمل شد.

باکتری *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* به صورت آمپول لیوفیلیزه به آزمایشگاه منتقل شد. طبق دستورالعمل کلکسیون، ابتدا سوسپانسیونی از باکتری در داخل آمپول تهیه شد. ۲۰ میلی لیتر از محیط مایع فوق به یک فالکون استریل منتقل شد و هوای سر لوله با جریان گاز ازت گرفته شد. کل سوسپانسیون به فالکون منتقل و بلافاصله درب آن بسته شد. محیط کشت تلقیح شده در دمای ۳۷^{o}C در داخل گرمخانه (متصل به سیلندر گاز دی اکسید کربن جهت برقراری شرایط بی هوازی) قرار داده شد. مقدار گاز CO_2 در سطح ۵٪ تنظیم گردید. بعد از ۴۸ ساعت، توده میکروبی شناوری مشاهده شد که نشان دهنده فعال شدن باکتری و تکثیر آن بود.

آماده سازی محیط کشتها با منابع کربنی مختلف

برای آماده‌سازی محیط کشت‌ها از همان روش فعالسازی استفاده شد. در این جا پنج نوع محیط کشت در لوله های در پیچ دار (از هر کدام ۸ لوله) و در سه تکرار (جمعا ۱۲۰ لوله) آماده شد. در محیط کشت شماره ۱ هیچ قندی به عنوان منبع کربن استفاده نشد (نمونه کنترل منفی)، در محیط کشت شماره ۲ از قند گلوکز (کنترل مثبت)، در محیط کشت شماره ۳ از Pxos، در محیط کشت شماره ۴ از Vxos و در محیط کشت شماره ۵ از FOS به عنوان منبع کربن و انرژی با غلظت ۱۰/۰ گرم در لیتر استفاده شد (کریتندن و همکاران ۲۰۰۲).

تلقیح باکتری بیفیدوم در محیط‌های آماده‌سازی شده

به هر کدام از لوله‌ها تحت شرایط سترون، ۱٪حجمی/حجمی از سوسپانسیون فعال باکتری افزوده شد سپس لوله ها در گرمخانه با دمای۳۷ ^{o}C قرار داده شدند.

تعیین کدورت و سرعت رشد باکتری در محیط‌های کشت

برای تعیین میزان رشد باکتریایی از روش تعیین دانسیته نوری (کدورت) در ۶۰۰ نانومتر بوسیله اسپکتروفتومتر استفاده شد (مورا و همکاران ۲۰۰۷؛ وانگ و همکاران ۲۰۱۰). در پایان زمان های ۰، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲و ۲۴ساعت، هر یک از نمونه ها از گرمخانه خارج و پس از ورتکس نمودن، محتویات آن‌ها به کووت انتقال و دانسیته نوری آنها اندازه گیری شد. دانسیته نوری مربوط به زمان صفر هر یک از قندها به عنوان بلانک آن قند منظور شد.

بررسی روند تغییرات pH در طی رشد باکتریایی

pH هر یک از نمونه ها در زمان‌های ۰، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲و ۲۴ ساعت بوسیله pH متر و در دمای ۲۰^{o}C اندازه‌گیری شد (وانگ و همکاران ۲۰۱۰). از دو بافر ۷ و ۴ برای کالیبره نمودن دستگاه استفاده گردید.

تجزیه وتحلیل آماری

تمام آزمونها در در سه تکرار ودر قالب طرح آزمایشی کاملا تصادفی به وسیله نرم افزار SPSS (نسخه ۲۱، آمریکا) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و برای

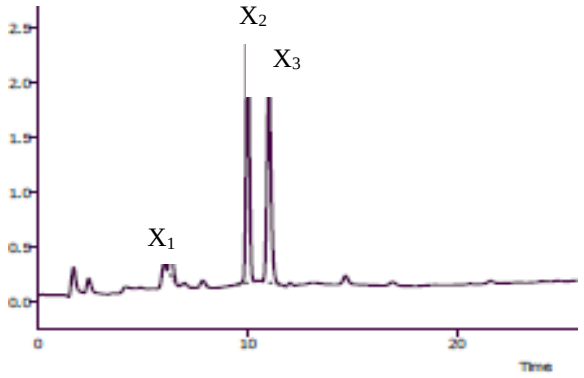
مقایسه میانگین ها، آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد.

نتایج و بحث

شناسایی زایلوالیگوساکاریدها به روش کروماتوگرافی مایع

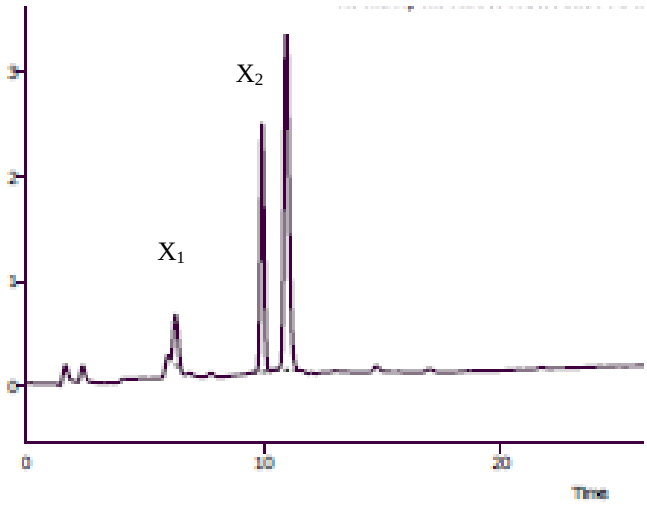
شکل شماره ۱ و۲ به ترتیب کروماتوگرام مربوط به V_{XOS}و P_{XOS} را نمایش می‌دهد. در این کروماتوگرام‌ها محل ظهور پیک های زایلوز (X_1)، زایلوبیوز (X_2) و زایلوتریوز (X_3) مشخص است. انجام محاسبات کمی بر اساس منحنی استاندارد نشان داد که V_{XOS} حاوی X_2 و X_3 به ترتیب به میزان ۰/۸۲ و ۰/۳۱ میلی مول بر گرم زایلان می باشد. P_{XOS} نیز حاوی X_2 و X_3 به ترتیب به نسبت ۰/۵۵ و ۰/۶۲ میلی مول بر گرم زایلان می‌باشد.

بر طبق این نتایج، میزان زایلوتریوز در P_{XOS} دو برابر زایلوتریوز در V_{XOS} می‌باشد، که نشان می دهد آنزیم پنتوپان تمایل بیشتری به آزادسازی زایلوالیگوساکارید از نوع درجه بسپارش بالاتر دارد و با توجه به این که آنزیم پنتوپان منوبی‌جی متعلق به خانواده GH_{11} و آنزیم ورون متعلق به خانواده GH_{10} هستند قابل پذیرش است. طبق گزارش فالک و همکاران (۲۰۱۴) زایلانازهای متعلق به خانواده GH_{10} تمایل به آزادسازی XOS با درجه بسپارش پایین‌تر دارند و زایلانازهای متعلق به خانواده GH_{11} تمایل به آزادسازی XOS با درجه بسپارش بالاتر دارند.



شکل ۱- کروماتوگرام آبکافته زایلوالیگوساکارید حاصل از آنزیم ورون

Figure1- Chromatogram of xylooligosac X_3 e hydrolysates obtained by Veron 191 enzyme



شکل۲- کروماتوگرام آبکافته زایلوالیگوساکارید حاصل از آنزیم پنتوپان منوبی‌جی

Figure 2- Chromatogram of xylooligosaccharide hydrolysates obtained by Pentopan Mono BG enzyme

میزان هضم زایلوالیگوساکاها

میانگین مقدار قند احیاء دو محلول Vxos و Pxos و به ترتیب ۳/۶۳ و ۴/۲۳ و میلی گرم در هر میلی لیتر بر حسب زایلوز به دست آمد (جدول۱). درصد قند کل برای همه نمونه ها تقریبا ۹/۸۹ میلی گرم بر میلی لیتر به‌دست آمد. میانگین مقدار قند احیاء Pxos بعد از انجام تیمار هضم دهانی، معده و روده به ترتیب ۴/۲۵، ۴/۲۴ و ۴/۲۵ به دست آمد. میانگین مقدار قند احیاء Vxos بعد از تیمار هضم دهانی، معده و روده نیز به ترتیب ۳/۶۴، ۳/۶۴ و ۳/۶۵ دست آمد. تجزیه و تحلیل نتایج در مورد هر دو محلول Vxos و Pxos نشان داد که اختلاف معنی داری (P< ./۵) بین قند احیاء قبل و بعد از تیمارهای هضمی وجود ندارد. به عبارتی دیگر زایلوالیگوساکاریدهای حاصله به روش آنزیمی مقاوم به شرایط pH دهان، معده و روده می باشند.

جدول۱- هضم‌پذیری *برون‌تنی* Vxos و Pxos در محیط مشابه دهان، معده و روده

Table1- *In vitro* digestibility of Vxos and Pxos in simulated oral, gastric, and intestinal medium

Digestion treatment	Reduction sugar (mg/ml)		Hydrolysis degree (%)	
	Vxos	Pxos	Pxos	Vxos
Before digestion	3.63± 0.4000[b]	4.23±0.0361[a]		
Oral digestion	3.64± 0.0458[b]	4.25± 0.0265[a]	0.16	0.35
Gastric digestion	3.64± 0.003[b]	4.24± 0.0173[a]	0.16	0.17
Intestinal digestion	3.65± 0.0173[b]	4.25± 0.0173[a]	0.31	0.35

Data in the table represents the mean ±standard deviation of triplicate analysis. Different superscripts within the same column represents significant difference at P≤0.05

درصد آبکافت Vxos در مراحل سه گانه هضم به ترتیب ۰/۳۵، ۰/۱۷ و ۰/۳۵ و درصد آبکافت Pxos در مراحل سه گانه هضم به ترتیب ۰/۱۶، ۰/۱۶و ۰/۳۱ می باشد. به این ترتیب مشاهده می شود که مقدار هضم برای هر دو نوع آبکافته (Vxos و Pxos)، پایین و قابل چشم پوشی است و به این معنی است که زایلوالیگوساکاریدهای تولید شده از زایلان هسته خرما بوسیله دو آنزیم تجاری مورد اشاره، مقاوم به هضم در مراحل دهان (بزاق)، معده و روده هستند و این یکی از خصوصیات ترکیبات پری‌بیوتیک است. نتایج این تحقیق با نتایج مطالعه شی و همکاران در سال ۲۰۱۸ هماهنگی دارد.

اثر محلول های زایلوالیگوساکارید هسته خرما بر رشد بیفیدوباکتریوم

جمعیت میکروبی روده تنها منبع میکروبی بسیار مهم در بدن انسان است و نقش مهمی را در تکامل و رشد ایمنی بعد از تولد ایفا می کند. این منبع مهم نقش بسزایی در حفظ و عملکردهای متابولیکی و افزایش مقاومت در مقابل عوامل بیماریزا دارد (هودا و همکاران ۲۰۱۲). از میان جمعیت میکروبی روده، بیفیدوباکتری‌ها تا ۲۵٪ فلور میکروبی روده را به خود اختصاص می‌دهند. بیفیدوباکتری‌ها جزء باکتری‌های پروبیوتیک مهم هستند. از میان بیفیدوباکتری‌ها، *B. adolescentis* و *B. longum*غالب دربزرگسالان و *B. bifidum* و *B. breve* غالب در نوزادان هستند (وانگ وهمکاران ۲۰۱۰).

بیفیدوباکتری‌ها قادرند از طیف وسیعی از سوبستراها به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده کنند که شامل هگزوزهای متعدد و الیگو و پلی‌ساکاریدها هستند (وانگ و همکاران ۲۰۱۰) اما سرعت مصرف منابع کربنی در گونه های مختلف این باکتری ها متفاوت است (واتسون و همکاران ۲۰۱۲)..

یکی از راههای مقایسه قابلیت مصرف ترکیبات مختلف برای یک ریزاندام مقایسه سرعت رشد حداکثر ریزاندام (μ_{max}) در حضور ترکیبات است (مورا و همکاران ۲۰۰۷). بر طبق معادله رشد در سامانه ناپیوسته Ln $\frac{x}{x0} = \mu t$ و اگر کدورت را شاخصی برای رشد بدانیم

داریم: $\mu t = Ln \frac{A}{A0}$. با محاسبه سرعت های رشد ویژه (μ) در زمان های مختلف گرمخانه‌گذاری می توان،μ_{max}، سرعت رشد در فاز لگاریتمی، را بدست آورد. دیگر شاخص رشد باکتری، کدورت محیط کشت در طول موج ۶۰۰nm بعد از ۲۴ ساعت (OD_{600}) است.

جدول ۲- شاخص‌های رشد (μ_{max} و OD_{600}) *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* در حضور منابع کربنی مختلف

Table2- Growth indicators (μ_{max} and OD_{600}) of *Bifidobacterium Bifidum* at the different carbon sources

Carbon Source Growth indicator	Negative Control	Glucose	FOS	Vxos	Pxos
OD_{600}	0.103±0.004[a]	0. 621±0.105[b]	0.940±0.024[c]	0.991±0.004[d]	1.06±0.017[d]
μ_{max} (h^{-1})	0.383±0.047[a]	0.408±0.120[b]	0.525±0.010[c]	0.639±0.018[d]	0.637±0.127[d]

Data in the table represents the mean ±standard deviation of triplicate analysis. Different superscripts within the same raw represent significant difference at $P \leq 0.05$

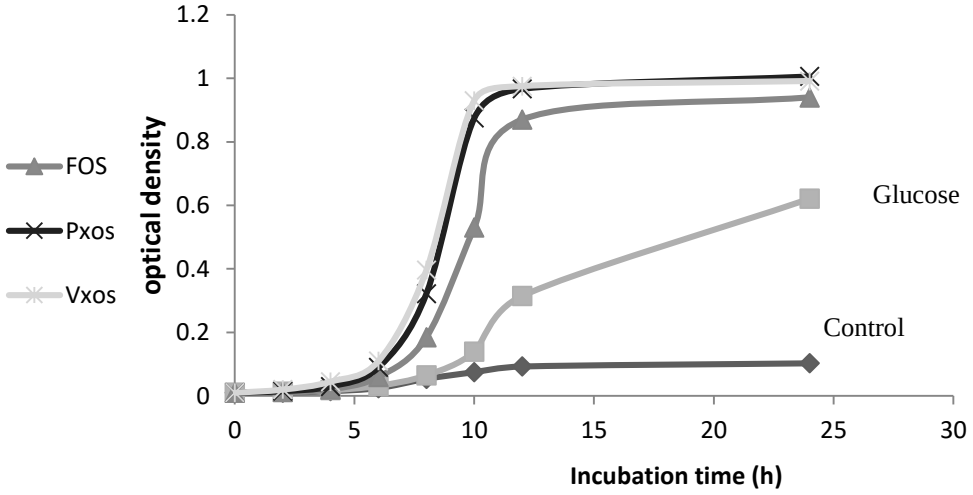
همانگونه که جدول ۲ نشان می دهد هر دو شاخص رشد (μ_{max} و D_{600}) اندازه‌گیری شده تمام منابع کربنی، اختلاف معنی‌داری با نمونه کنترل منفی داشتند (۰/۵ ≥P). فروکتوالیگوساکارید تجاری اختلاف معنی‌داری با گلوکز و هر دوی زایلوالیگوساکاریدها داشت به طوری که μ_{max} و D_{600} آنها بالاتر از گلوکز و پایینتر از زایلوالیگوساکاریدها بود. Vxos و Pxosاز نظر شاخص‌های رشد اختلاف آماری معنی داری با یکدیگر نشان ندادند (۰/۵ <P). و لذا از نظر اثر بر رشد *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* مشابه بودند. از آنجایی که Pxos و Vxos شامل زایلوالیگوساکاریدهای با درجه بسپاری دو و سه بودند و از طرفی احتمالا تفاوت چندانی بین سرعت تخمیر X_2 و X_3 توسط *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* وجود ندارد لذا می توان عدم معنی‌دار بودن اختلاف را توجیه نمود. بالا بودن μ_{max} مهم است زیرا مصرف سریع ماده توسط پروبیوتیک‌های ساکن روده بزرگ قبل از خروج مدفوع و رشد سریع پروبیوتیک‌ها در مقابل عوامل بیماری‌زا اهمیت زیادی در ظهور خاصیت پری‌بیوتیکی دارد.

شکل ۳ نشان می‌دهد که زایلوالیگوساکاریدهای هسته خرما سرعت مصرف بالاتری در مقایسه با FOS داشتند که احتمالا علت آن درجه بسپارش پایین (۳-۲) آنها باشد. گلوکز با سرعت پایینتری نسبت به هر دو کاتابولیزه شده است. مک لاژلین و همکاران (۲۰۱۵) گزارش دادند که FOS ها از نظر اثر بر رشد باکتری های پروبیوتیکی با هم متفاوتند به طوریکه هر چه درجه بسپارش فروکتوالیگوساکارید کمتر باشد سرعت تخمیر و رشد بیفیدوباکتری‌ها بالاتر است. درجه بسپارش FOS تجاری استفاده‌شده در این تحقیق ۸-۲ بود. مورا و همکاران ۲۰۰۷، نتایج مشابهی برای بعضی از زایلوالیگوساکاریدها در مقابل گلوکز در کشت *بیفیدوباکتریوم آدولسنتیس* و *بیفیدوباکتریوم لانگوم* گزارش دادند. در گزارش وانگ و همکاران (۲۰۱۰)، *بیفیدوم* نیز از جمله گونه هایی بوده است که زایلوالیگوساکاریدها را مصرف نموده به طوریکه انواع خطی و با درجه بسپارش ۴-۲ سرعت مصرف بالاتری داشته اند .

اثر منابع مختلف کربنی بر pH

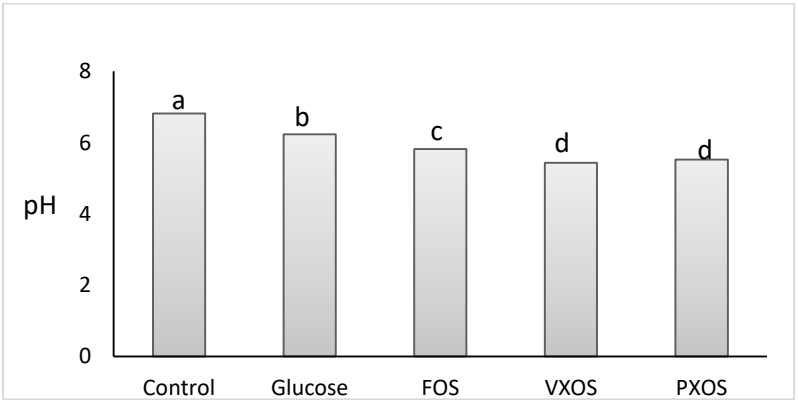
شکل۴، pH محیط های مختلف کربنی را بعد از ۲۴ ساعت کشت *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* نشان می دهد. نتایج نشان می دهند که میزان pH محیط های کشت با یکدیگر متفاوت است به طوری که بیشترین کاهش pH نسبت به pH محیط کشت کنترل منفی در مورد زایلوالیگوساکاریدهای هسته خرما مشاهده شد اما از طرف دیگر بین محیط کشت های حاوی Vxos و Pxos تفاوت معنی داری مشاهده نشد (۰/۵ <P). کاهش pH

هرچه بیشتر باشد نشان‌دهنده تولید محصولات جانبی تخمیر مانند اسیدهای چرب کوتاه زنجیر و آلی و در نتیجه افزایش اثرات سلامت افزایی ترکیب مورد نظر است (ولان و همکاران، ۲۰۰۵). پژوهشگران دیگر نیز کاهش pH محیط را برای بیفیدوها و از جمله بیفیدم گزارش داده‌اند البته میزان کاهش در گزارش‌های مختلف متفاوت است که یکی از دلایل آن مدت زمان کشت (۲۴ یا ۴۸ یا ۷۲ ساعت) است (وانگ و همکاران ۲۰۱۰؛ چاپلا و همکاران ۲۰۱۲؛ کالل و همکاران ۲۰۱۵).



شکل ۳- تاثیر منابع مختلف کربنی بر رشد باکتری *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم*

Figure3- Effect of different carbon sources *on growth of Bifidobacterium Bifidum*



شکل ۴- pH محیط های کشت *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* بعد از ۲۴ ساعت

Figure4- pH of *Bifidobacterium Bifidum* culture media after 24 h

Different superscripts above the bars represent significant difference at P≤0.05

نتیجه‌گیری

استفاده از پسماند صنایع غذایی و کشاورزی برای تولید محصولات خاص سبب بالارفتن ارزش افزوده بخش‌های کشاورزی و صنایع تبدیلی می‌شود. خرما از محصولات مهم باغی کشور ایران است. بخشی از خرمای تولیدی و به ویژه خرماهای درجه دو و سه جذب صنایع تبدیلی می‌شود و به فرآورده‌هایی نظیر شیره خرما، شکلات خرما، لواشک، سرکه و قند مایع تبدیل می‌گردد و در انتها مقدار زیادی هسته به عنوان پسماند به جای می ماند. (سلیمانی ده دیوان و همکاران ۱۳۹۵). هسته خرما ۱۰-۱۵ درصد وزن کل میوه را به خود اختصاص داده و حاوی درصد بالایی فیبر از جمله زایلان است. نتایج تحقیق نشان داد که می توان زایلان هسته خرما را تحت شرایط خاصی استخراج نمود و به وسیله برخی زایلانازهای تجاری مانند ورون ۱۹۱و پنتوپان منوبی‌جی به زایلوالیگوساکاریدها تبدیل نمود. نتایج پژوهش همچنین روشن نمود که هر دونوع زایلوالیگوساکارید به یک اندازه بر رشد باکتری *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* اثر داشته و در مقایسه با یک پری‌بیوتیک تجاری مانند Orafti p 95 که یک فروکتوالیگوساکارید است از قابلیت بالاتری برای تکثیر باکتری پروبیوتیک *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* برخوردار است و نهایتا این که هسته خرما را می توان در تولید ترکیبات دارای خاصیت فراسودمند بکار برد.

منابع مورد استفاده

اروجی ا، قنبرزاده ب و دانش ع، ۱۳۹۶، بررسی خواص بافتی و حسی خامه پری بیوتیک حاوی اینولین و پلی دکستروز با استفاده از روش سطح پاسخ، پژوهش های صنایع غذایی، ۲۷، ۲۰۷-۱۹۳.

سلیمانی ده دیوان ن، گلشن تفتی ا و یاسینی اردکانی ع، ۱۳۹۵، بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی، میزان پلی فنل ها، رنگدانه ها و فیبر در هسته ارقام مضافتی و کلوته استان کرمان، پژوهش های صنایع غذایی، ۲۶، ۱۲۲-۱۱۳.

Balaghi S, Mohammadifar A, Zargaraan A, Gavlighi H and Mohammadi M, 2011. Compositional analysis and rheological characterization of gum tragacanth exudates from six species of Iranian Astragalus. Food Hydrocolloids 25: 1775-1784.

Chapla D, Pandit P and Shah A, 2012. Production of xylooligosaccharides from corncob xylan by fungal xylanase and their utilization by probiotics, Bioresource Technology 115: 215-221.

Chapla D, Pandit P and Shah A, 2012. Production of xylooligosaccharides from corncob xylan by fungal xylanase and their utilization by probiotics. Bioresource Technology 115: 215-221.

Chen X, Shekiro J, Elander R and Tuker M, 2011. Improved xylan hydrolysis of corn stover by deacetylation with high solid dilute acid pretreatment. Industrial and Engineering Chemistry Research 51: 70-76.

Crittenden R, Karppinen S, Ojanen S, Tenkanen M, Fagerström R, Mättö J, Saarela M, Mattila-Sandholm T and Poutanen K, 2002. In vitro fermentation of cereal dietary fibre carbohydrates by probiotic and intestinal bacteria. Journal of the Science of Food and Agriculture 82:781-789.

Escarnot E, Aguedo M and paquot M, 2012. Enzymatic hydrolysis of arabinoxylans from spelt bran and hull. Journal of Cereal Science 55: 243-253.

Falk P, Aronsson A, Grey C, Stalbrand H, Karlsson EN and Adlercreutz P, 2014. Production of arabinoxylan-oligosaccharide mixtures of varying composition from rye bran by a combination of process conditions and type of xylanase. Bioresource Technology 174: 118-125.

Faryar R, Linares-Pasten JA, Immerzeel P, Mamo G, Andersson M, Stalbrand H, Mattiasson B and Karlsson EN, 2015. Production of prebiotic xylooligosaccharides from alkaline extracted wheat straw using the K80R-variant of a thermostable alkali-tolerant xylanase. Food and Bioproducts Processing 93: 1-10.

Ganzle M, 2012. Enzymatic synthesis of galacto-oligosaccharides and other lactose derivatives (hetero oligosaccharides) from lactose.International. Dairy Journal 22 (2):116-12.

Gibson GR and Roberfroid MB, 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota Introducing the concept of prebiotics. The Journal of Nutrition 125: 1401–1412.

Hooda S, Brittany MVB, Mariana CRS, Jennifer MB, Michael AS, Thomas WB, Scot ED, George CFJ and Kelly SS, 2012. 454 pyrosequencing reveals a shifti fecal microbiota of healthy adult men consuming polydextrose or soluble corn fiber1-3. Journal of Nutrition 14: 1259–1265.

Ishurd O, Ali Y, Wei W, Bashir F, Ali A, Ashour A and Pan Y, 2003. An alkali-soluble heteroxylan from seeds of *phoenix dactylifera L*. Carbohydrate Research 338: 1609-1612.

Jayapal, N., Samanta, A.K., Kolte, A.P., Senani, S. Sridhar, M., Suresh, K.P., Sampath, K.T., 2013. Value addition to sugarcane bagasse: Xylan extraction and its process optimization for xylooligosaccharides production. Industrial crops and products 42: 14-24.

Kallel F, Driss D, Bouaziz F, Neifer M, Ghorber R, and Chaaboni SE, 2015. Production of xylooligosaccharides from garlic straw xylan by purified xylanase from bacillus mojavensis UES- FK and their in vitro evaluation. Food and Bioproducts processing 94: 536- 546.

Kiran EU, Akpinar O, Bakir U, 2013. Improvement of enzymatic xylooligosaccharides production by the co-utilization of xylans from different origins. Food and Bioproducts Processing 91: 565-574.

McLaughlin HP, Motherway MO, Lakshminarayanan B, Stanton C, Ross RP, Brulc J, Menon R, O'Toole PW and van Sinderen D, 2015. Carbohydrate catabolic diversity of Bifidobacteria and Lactobacilli of human origin. International Journal of Food Microbiology 203: 109-121.

Moniz P, Ho A, Duarte L, Kolida S, Rastall R, Pereira H and Carvalheiro F, 2016. Assessment of the bifidogenic effect of substituted xylo-oligosaccharides obtained from corn straw. Carbohydrate Polymers 136: 466-473.

Moura P, Barata R, Carvalheiro F, Girio F, Loureiro-Dias MC and Esteves MP, 2007. Invitro fermentation of xylooligosaccharides from corn cobs autohydrolysis by Bifidobacterium and Lactobacillus strains 40: 963-972.

Saha SK and Brewer CF 1994. Determination of the concentrations of oligosaccharides, complex type carbohydrates, and glycoproteins using the phenol-sulfuric acid method. Carbohydrate Research 254: 157–167

Samanta AK, Jayapal N, Kolte AP, Senani S, Sridar M, Suresh KP, Sampath KT, 2012. Enzymatic production of xylooligosaccharides from alkali solubilized xylan of natural grass. Bioresource Technology 112: 199-205.

Shi Y, Liu J, Yan Q, You X, Yang S and Jiang Z 2018. In vitro digestability and prebiotic potential of curdlan (1,3)- β-D- glucan oligosaccharides in lactobacillus species. Carbohydrate Polymers 188:17-26.

Sing RD, Banerjee J and Arora A, 2014. Prebiotic potential of oligosaccharides. A focus on xylan derived oligosaccharides. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibres. 5: 19- 30.

Sun S, Sun S, Cao X and Sun R, 2016. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. Bioresource Technology 199: 49-58.

Wang J, Sun B, Cao Y and Wang C, 2010. Invitro fermentation of xylooligosaccharides from wheat bran insoluble dietery fibre by Bifidobacteria. Carbohydrate polymers 82: 419-423.

Watson D, Motherway MO, Schoterman MHC, Joost van Neerven RJ, Nauta A and Van Sinderen D, 2012. Selective carbohydrate utilization by lactobacilli and Bifidobacteria. Applied Microbiology 114: 1132-1146.

Whelan K, Judd PA and Preedy VR, 2005. Fructooligosaccharides and fiber partially prevent the alterations in fecal microbiota and short-chain fatty acid concentrations caused by standard enteral formula in healthy humans. Journal of Nutrition 135: 1896–1902.

Journal of Food Researches/vol.30 No.3/ 2020/pp 123-135
https://foodresearch.tabrizu.ac.ir

Evaluation of prebiotic potential of the Xylooligosaccharides produced by enzymatic method from date seed

D Ataei[1], Z hamidi-Esfahani[2*] and H Ahmadi Gavlighi[2]

Received: January 29, 2019 Accepted: July 14, 2019
[1]Ph.D. Student,,Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran
[2]Associate Professor and Assistant Professor, respectively, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran
[3]Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran
[*]Corresponding author: E-mail: hamidy_z@modares.ac.ir

Introduction: Xylooligosaccharides (XOS) are the sugar oligomers made up of xylose units and considered as non-digestible food ingredients. Xylooligosaccharides exhibit prebiotic effect when consumed as a part of diet. They are neither hydrolyzed nor absorbed in the the gastrointestinal tract. They affect the host by selectively stimulating the growth of good bacteria, so called probiotics and enhance one's health (Chapla et al., 2012). Probiotics defined as direct food microbials (DFM) that beneficially affect the host by improving its microbial balance and have been consumed to change the composition of colonic microbiota (Gibson and Roberfroid; 1995). Xylooligosaccharides are relatively new type of oligomers which have gained a lot of interest because of many technological and health benefits, and a lot of research is going on to explore their dietary and physiological roles. Moreover, it has acceptable organoleptic property. Xylooligosaccharidesdos not exhibit toxicity or negative effects on human health (Jayapal et al., 2013). Date fruit is one of the important garden products in Iran. A large amount of dates especially second and third grade dates, are used for production of date syrup, date chocolate, vinegar, liquid sugar and so on. In these industries, date seed is one of the wastes by-products. Hemicellulose (xylan) is one of the major parts of date seed. The purpose of this research is xylan extraction from date seed, enzymatic hydrolysis to obtain xylooligosaccharides and evaluation of their prebiotic potential compared with the commercial prebiotic (Fructooligosaccharide).
Materials and methods: Date seeds (Kabkab variety) were prepared from a local processor in Behbahan city (Khozestan, Iran) and after washing, dried by solar method. Seeds were grounded by shear mill (Ahrar mill company- Iran) and the particles bigger than 2mm were separated by sieve, and the particles smaller than 2 mm were stored at -20ºC until extraction processes. It has been reveal that highest efficiency in hemicellulose extraction is gained by alkali method. (Liu et al., 2016). Before extraction, fat, soluble sugars and lignin in order to purification were separated. Ishrud method (2003) was used for purification. Thirty grams of kernel powder was defatted for 4 hours at 40℃ with hexane, then washed with solvent several times. The remaining material was placed in ethanol (1:15) at 75℃ for 4 hours under constant stirring for the separation of monomers and colorants. In next step, in order to delignification, the remaining material was placed in sodium chlorite (% 0.7 NaClO) solution for 5 hours in the pH 4 and 75ºC, then dried by air at 60 ℃. The produced hollocellulose material was exposed to dilute solution NaOH (0.1 M) at 80 ℃ for 3 hours. After that the product was mixed with 2.25 M sodium hydroxide at room temperature (25°C) for 24 hours under N_2 atmosphere, then was centrifuged and the supernatant was separated. The produced solution was neutralized to pH=5.5 by acetic acid glacial. The neutralized solution was mixed with 3 volume

ethanol 95% and after overnight at 4℃ centrifuged at 10000 rpm. Then the gained xylan hydrolyzed by two commercial xylanases namely Pentopan mono BG and Veron 191. The XOS in the two hydrolysates were qualified and quantified by high performance liquid chromatography (HPAEC–PAD). In order to testing digestibility of both XOS, they were exposed to the solutions similar gastric juices (Shi et al., 2018). Effect of both XOS, as carbon sources, on growth of *Bifidobacterium bifidum* (μmax and OD_{600}) was compared with, negative control (without carbon source), positive control (glucose), and fructooligosaccharide (FOS). The pH of cultures were determined at interval times.

Results and discussion: The results showed that hydrolysate of each enzyme contained different ratio of xylobiose (X_2) and xylotriose (X_3). The both enzymes produced X_2 and X_3 from date seed xylan so that veron 191 produced X_2 more than X_3 while pentopan mono BG produced X_3 more than X_2**.** Veron 191 and pentopan mono BG, are belong to two main families of carbohydrate hydrolyzer, GH10 and GH11 respectively. Researches has been reported that GH10 and GH11 families produce low degree of polymerization (DP) and high DP XOS respectively (Kiran et al., 2013). For XOS hydrolysates through enzymatic hydrolysis of date seed xylan by veron 191(Vxos) and pentopan mono BG (Pxos), sugar content was determined as 3.63 and 4.23 mg/mL, respectively. For simulation of intestinal medium, Vxos and Pxos were subjected for digestion by α-amylase, gastric pepsin, and trypsin under pH of 7.0, 3.0, and 7.0, respectively. Reducing sugar content of Vxos after sequential in vitro digestion was 3.64, 3.64, and 3.65 mg/mL for oral, gastric, and intestinal phase, respectively. Reducing sugar content of Pxos after sequential in vitro digestion was 4.25, 4.24 and 4.25. No significant changes were observed in reducing sugar content and for both XOS after sequential gastrointestinal medium treatments. Results have indicated that both Vxos and Pxos were resistant to digestive enzymes in gastrointestinal tract, with no significant releasing of reducing sugar in the presence of digestive enzymes and specific pH conditions mentioned above. In terms of effect on growth, there was significant difference between Vxos and Pxos and another carbon sources ($P\leq 0.05$). Overall, due to indigestion property of XOS from xylan hydrolysate of date seed, and their positive effect on growth of *Bifidobacterium bifidum*, prebiotic potential property can be attributed to them.

Keywords: Probiotic, Prebiotic, Xylooligosaccharide, Date seed, Digestibility