

بهینه‌سازی شرایط استخراج اینولین از کنگر با و بدون اعمال فراصوت به کمک روش سطح پاسخ

سلیمان عباسی* و حنا فرزانه مهر^۱

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۶/۱/۲۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۶/۱۲/۷)

چکیده

امروزه اینولین به دلیل دارا بودن ویژگی‌های مفید تغذیه‌ای به طور گسترده‌ای در جهان مورد استفاده می‌باشد. یکی از منابع مهم استخراج صنعتی اینولین نوعی کنگر است. لذا در این بررسی، میزان قند کل، اینولین و بهینه‌سازی شرایط استخراج آبی اینولین با و بدون اعمال امواج فراصوت (به شکل مستقیم و غیرمستقیم) و ترکیب‌های مختلف زمان، دما و نسبت حلال به کنگر فرنگی مورد مطالعه قرار گرفت. طرح آزمایشی شامل استفاده از طرح Box-Behnken و روش آماری سطح پاسخ بود. با توجه به مدل تجربی به دست آمده توسط روش سطح پاسخ، ارتباط میان متغیرهای مورد مطالعه و میزان استخراج قند کل کنگر فرنگی مناسب تشخیص داده شد. با توجه به میزان ماده خشک (۶/۷ درصد) و میزان قند کل (۳/۹ درصد) کنگر فرنگی، شرایط بهینه استخراج اینولین دمای 80°C ، زمان ۵ دقیقه و نسبت حلال به کنگر فرنگی ۱:۵ تعیین گردید. به علاوه، مقایسه یافته‌های روش استخراج آبی با و بدون اعمال امواج فراصوت نشان‌دهنده رابطه مستقیم بین میزان استخراج قند کل، فرکانس و توان امواج فراصوت بود، به گونه‌ای که با به کار بردن امواج فراصوت با فرکانس و توان بالاتر زمان استخراج نسبت به زمان استخراج آبی بدون اعمال فراصوت به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت.

واژه‌های کلیدی: کنگر فرنگی، اینولین، قند کل، امواج فراصوت، روش سطح پاسخ

مقدمه

واحدهای فروکتوز آن بین ۲ تا ۷۰ متغیر است. به طور کلی به بسپارهای (پلیمرهای) خطی یا منشعب فروکتوز که در آن پیوندهای فروکتوزیل - فروکتوز اکثریت پیوندهای گلیکوزیدی را تشکیل دهند فروکتان گفته و این ترکیب‌ها در طبیعت یا به صورت اینولین (با پیوندهای ۱ → ۲) و یا لوان (پیوندهای ۶ → ۲) یافت می‌شوند (۱۱). فروکتان‌های نوع اینولین براساس طول زنجیر و درجه بسپارش (Degree of Polymerization)

سابقه شناسایی و استخراج اینولین به حدود ۲۰۰ سال پیش بر می‌گردد. زمانی که یک دانشمند آلمانی به نام رز برای نخسین بار ترکیبی ویژه با منشأ گیاهی را از زنجبیل شامی (*Imula helenium*) با استفاده از آب جوش جدا نمود (۱۳). اینولین کربوهیدراتی Polydisperse متشکل از پیوندهای ۱ → ۲ فروکتوزیل - فروکتوز با یک واحد گلوکز انتهایی است که تعداد

۱. به ترتیب دانشیار و کارشناس ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

*: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: sabbasifood@modares.ac.ir

به گروه‌های مختلفی مانند الیگوفروکتوز (ترکیبی از الیگومرها با ۷-۲ DP)، اینولین طبیعی یا استاندارد (استخراج شده از ریشه کاسنی با ۶۵-۲ DP) و اینولین HP یا بلند زنجیر (اینولین با کارایی بالا با ۶۵-۱۰ DP) طبقه‌بندی می‌شوند (۲۹).

اینولین و الیگوفروکتوزها فیبرهای غذایی محلول و قابل تخمیری هستند که از طریق بهبود نظم، افزایش تناوب دفع و حجم مدفوع به بهبود عملکرد روده کمک می‌نمایند (۲۹). این مواد پریبیوتیک و بیفیدوزنیک بوده و از طریق فعالیت باکتری‌ها قابل هضم هستند. آنها ترکیب فلور روده‌ای انسان را تغییر داده به‌صورتی که باعث ایجاد جمعیت غالب بیفیدیوباکترها (۳۲) و کاهش باکتری‌ها، به‌ویژه، باکتریوئیدس، فوزوباکتريا و کلاستریدا می‌گردند (۱۵). به‌علاوه، مصرف این مواد سبب افزایش جذب کلسیم و بهبود محتوا و تراکم مواد معدنی استخوان در دوران رشد می‌گردد (۷). هم‌چنین، مصرف اینولین علاوه بر کاهش تری‌گلیسریدهای خون سبب کاهش تولید چربی نیز می‌گردد (۲۹). لازم به گفتن است که به‌ازای مصرف هر گرم اینولین و الیگوفروکتوز حدود ۱/۵ کیلوکالری انرژی تولید می‌شود که این میزان انرژی معادل فقط ۳۸ درصد انرژی یک مولکول قند شش‌کربنی هضم شده است (۲۸).

در دهه‌های گذشته کاربرد اینولین در صنایع غذایی، به‌دلیل طعم تلخ آن، محدود به تولید نوشیدنی‌های شبیه به قهوه بود (۱۴). ولی امروزه اینولین به‌طور موفقیت‌آمیزی برای جایگزینی چربی و قند با مزایایی شامل میزان کالری کمتر، غنی‌سازی با فیبر غذایی و دیگر ویژگی‌های تغذیه‌ای به‌کار می‌رود (۱۵). به‌طور طبیعی فقط ۱۵ درصد گونه‌های گیاهی گلدار حاوی فروکتان‌ها می‌باشند ولی این مواد توسط برخی باکتری‌ها و قارچ‌ها نیز تولید می‌شوند (۲۷). گونه‌های گیاهی حاوی فروکتان در بعضی خانواده‌های تک و دولپه‌ای (Mono and Dicotyledenous) مانند *Poaceae*, *Amaryllidaceae*, *Liliaceae* و *Asteraceae* یافت می‌شوند. در حال حاضر برای تولید صنعتی اینولین از دو گونه متعلق به تیره *Asteraceae* یعنی کنگرفرنگی اورشلیم (*Helianthus tuberosus*) و کاسنی

بهینه‌سازی شرایط استخراج اینولین از کنگر با و بدون اعمال فراصوت ...

محاسبه گردید.

روش اندازه‌گیری میزان ماده جامد محلول (بریکس)

میزان بریکس عصاره استخراج شده از کنگر فرنگی توسط دستگاه ضریب شکست‌سنج (رفراکتومتر) (ATAGO DR-A1) مدل AD-13 ساخت کشور ژاپن) اندازه‌گیری شد. برای این منظور، مقداری از نمونه‌های کنگر فرنگی را خرد کرده و سپس با فشار دست عصاره آن استخراج گردید. چند قطره از عصاره خارج شده روی محل نمونه دستگاه قرار داده شد و میزان بریکس آن اندازه‌گیری گردید که پس از اعمال اصلاحات مربوط به دما، عدد حاصله، نشانگر میزان بریکس عصاره استخراجی در دمای مشخص بود (۸).

روش‌های استخراج اینولین

استخراج آبی اینولین بدون اعمال فراصوت

به منظور استخراج آبی اینولین از بن ماری (Kottermann ساخت کشور آلمان) استفاده شد. حدود ۱۰ گرم از نمونه کنگر فرنگی خرد شده با روش ذکر شده در بالا را در بشری ریخته و تحت ترکیب دمایی، زمانی و نسبت‌های مختلف آب مقطر مطابق جدول ۱ قرار داده شد. نمونه‌ها پس از استخراج و سرد شدن تا دمای محیط، توسط قیف بوخزر و کاغذ صافی واتمن شماره ۴۰ صاف و پس از محاسبه حجم عصاره استخراجی، توسط دستگاه سانتریفیوژ (Kubota مدل ۶۹۰۰ ساخت کشور ژاپن) با سرعت $9000 \times g$ سانتریفیوژ شدند. عصاره حاصل تا قبل از انجام آزمایش‌ها در دمای $18^{\circ}C$ - نگه‌داری شد. برای انجام آزمایش‌ها، نمونه‌های منجمد شده در بن ماری $40^{\circ}C$ قرار گرفتند تا یخ آنها باز شود.

استخراج آبی اینولین با اعمال فراصوت

پس از به دست آوردن شرایط بهینه استخراج آبی اینولین با استفاده از روش سطح پاسخ، نمونه‌های کنگر فرنگی تحت تیمار فراصوت در زمان‌های مختلف، به منظور به دست آوردن

روش سطح پاسخ یا Response Surface Methodology (RSM) و تعیین ترکیب بهینه متغیرها و سپس بررسی تأثیر اعمال امواج فراصوت در شرایط بهینه استخراج آبی روی میزان اینولین استخراجی بود.

مواد و روش‌ها

مواد

هیدروکسید سدیم، اسید سولفوریک، فنل، D فروکتوز و پتاسیم سدیم تارتارات از شرکت مرک آلمان، دی نیترو سالیسیلیک اسید از شرکت Fluka سوئیس و اینولین IQ Frutafit از شرکت Cosun-Sensus هلند تهیه شدند.

روش‌ها

آماده‌سازی نمونه‌های کنگر فرنگی

نمونه‌های کنگر فرنگی محصول کردستان در اردیبهشت ماه سال ۱۳۸۵ از بازار محلی تهران خریداری و پس از پاک و شسته شدن در بسته‌های نایلونی بسته‌بندی و تا قبل از زمان استخراج در شرایط انجماد ($18^{\circ}C$) نگه‌داری شدند. برای انجام عملیات استخراج اینولین، نمونه‌های کنگر فرنگی منجمد پس از خارج شدن از یخ‌زن توسط خردکن نوع Brown Multiquick (مدل MR 5550 MBC-HC ساخت کشور اسپانیا) به منظور افزایش سطح تماس با حلال و بهبود فرایند استخراج به قطعات کوچک تبدیل شدند. سپس عمل استخراج مطابق روش‌های توضیح داده شده در بندهای بعد صورت گرفت.

روش اندازه‌گیری ماده خشک کنگر فرنگی

به منظور اندازه‌گیری میزان ماده خشک کنگر فرنگی، وزن مشخصی از نمونه‌ی کنگر فرنگی به مدت ۲۴ ساعت در آون (EHRET مدل TKL 4105 ساخت کشور آلمان) در دمای $105^{\circ}C$ قرار داده شد (۶) و پس از انتقال به دسیکاتور و سرد شدن، توسط ترازوی دقیق توزین و میزان ماده خشک

جدول ۱. نمایش متغیرهای مستقل فرایند و مقادیر آنها

مقادیر			علائم		متغیرهای مستقل
+۱	۰	-۱	Coded	Uncoded	
۹۰	۸۰	۷۰	x_1	X_1	دما (درجه سانتی گراد)
۲۵	۲۰	۱۵	x_2	X_2	زمان (دقیقه)
۵	۴	۳	x_3	X_3	نسبت حلال به کنگر فرنگی (وزنی/وزنی)

خلا کندانسور تبخیر کننده چرخشی روی مایکروویو تعبیه شد که از یک سمت به پمپ خلا و از سمت دیگر به بالن متصل بود. پمپ خلا به صورت متصل به تبخیر کننده و مجهز به خلا سنج جهت کنترل ثبات خلا به کار گرفته شد. جهت مقایسه عملکرد دو دستگاه فوق در فاصله‌های زمانی مختلف از عصاره تغلیظ شده نمونه برداری صورت گرفته و میزان بریکس آن توسط دستگاه رفاکتومتر اندازه گیری شد. نمونه‌ها پس از تغلیظ درون کیسه‌های پلاستیکی ریخته شده و در دمای 18°C - منجمد گردیدند. سپس نمونه‌های منجمد شده توسط دستگاه خشک کن انجمادی آزمایشگاهی Christ Alpha 1-4 (مدل ساخت کشور آلمان) تحت شرایط دمایی پایین (45°C) و فشار مطلق $0.05/0.05$ میلی بار خشک شدند.

روش اندازه‌گیری قند کل و قند احیا

برای اندازه‌گیری قند کل از روش دوبوئیس و همکاران (۱۲) استفاده گردید. برای این منظور ۱ میلی لیتر از عصاره کنگر فرنگی استخراج شده (به روش استخراج آبی با و بدون اعمال فراصوت) را تا غلظت ۱ درصد رقیق کرده سپس، به لوله آزمایش منتقل و یک میلی لیتر محلول فنل ۵ درصد و بلافاصله ۵ میلی لیتر اسید سولفوریک ۹۸-۹۵ درصد به آن افزوده شد. بعد از سپری شدن ۱۰ دقیقه لوله‌ها به حمام آب 30°C - 25°C درجه سانتی گراد منتقل و بعد از سرد شدن میزان جذب نمونه‌ها در طول موج 490nm توسط دستگاه اسپکتروفتومتر Scino (مدل UVS-2100، ساخت کشور کره) اندازه‌گیری شد. جهت رسم منحنی استاندارد از اینولین Frutafit IQ به‌عنوان استاندارد

بهترین زمان استخراج، قرار گرفتند. در این روش از حمام فراصوت (Elma، مدل TP 690/H، با فرکانس ۳۵ کیلوهرتز و توان ۷۰ وات ساخت کشور آلمان) استفاده شد و ۱۰ گرم از نمونه‌های کنگر فرنگی خرد شده با روش ذکر شده در قبل در بشری ریخته شده و تحت شرایط بهینه نسبت حلال، دمای استخراج و در زمان‌های مختلف ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ دقیقه، با روش فراصوت استخراج شدند. به منظور بررسی اثر فرکانس و توان دستگاه اعمال فراصوت، استخراج با استفاده از دستگاه پروپ سونیکیتور Dr.Hielscher (مدل UP 400 S، ساخت کشور آلمان با فرکانس ۶۰ - ۵۰ کیلوهرتز و توان ۳۰۰ وات) نیز انجام و نتایج به دست آمده با یافته‌های حمام فراصوت مقایسه شدند.

روش استخراج اینولین از کنگر فرنگی در شرایط بهینه

پس از به دست آوردن شرایط بهینه استخراج آبی، عمل استخراج روی ۱۰۰۰ گرم کنگر فرنگی انجام و عصاره حاصله پس از سانتریفیوژ کردن توسط دو روش: ۱. دستگاه تبخیر کننده چرخان Heidolph (مدل LR4001-Efficient ساخت آلمان) در دمای ۷۵ درجه سانتی گراد و میزان خلا ۵۵ سانتی متر جیوه و ۲. دستگاه مایکروویو تحت خلا (۵) با توان ۱۲۰۰ وات و میزان خلا ۴۵ سانتی متر جیوه تغلیظ گردید. مایکروویو به کار برده شده از نوع AEG مدل E.EH 8223 با فرکانس ۲۴۵۰ مگاهرتز و توان اسمی ۱۲۰۰ وات بود. در این دستگاه نمونه پس از انتقال درون بالن شیشه‌ای داخل مایکروویو قرار گرفت. برای خارج کردن و سرد کردن رطوبت خارج شده و ایجاد شرایط

طراحی آزمایش و تجزیه و تحلیل آماری

در این مطالعه از طراحی سطح پاسخ مدل Box-Behnken با سه متغیر برای بررسی ارتباط بین پاسخ‌های به‌دست آمده و متغیرهای فرایند و بهینه‌سازی ترکیب متغیرها استفاده شد (۷)، ۱۰ و ۲۵). مقادیر عددی متغیرهای مستقل شامل: X_1 (دما)، X_2 (زمان) و X_3 (نسبت حلال به کنگر فرنگی) در سه سطح در جدول ۱ نشان داده شده است. لازم به توضیح است که به دلیل نوسانات زیاد اینولین استخراجی، حتی در نمونه‌های تکراری، میزان قند کل استخراجی به‌عنوان معیاری از میزان استخراج در نظر گرفته شد.

مطابق جدول ۲ تعداد نمونه‌های مورد آزمایش ۱۵ مورد بود که ۱۲ مورد آنها فاکتوریل (نقاط ۱۲-۱) و سه مورد نقاط مرکزی (تیمارهای ۱۵-۱۳) بودند. از سه تکرار نقطه مرکزی برای تخمین خطای آزمایش استفاده شد. در ضمن، متغیرها مطابق معادله زیر کدگذاری شدند:

$$x_i = (X_i - \bar{X}_i) / \Delta X_i$$

در این جا، x_i مقدار بدون بعد متغیر مستقل فرایند، X_i مقدار واقعی متغیر مستقل فرایند، \bar{X}_i مقدار واقعی متغیر مستقل در نقطه مرکزی و ΔX_i تغییر پله‌ای است. کدهای مشخص شده عبارت‌اند از:

$$x_1 = (d_m - 80) / 10$$

$$x_2 = (t - 20) / 5$$

$$x_3 = (4 - \text{نسبت حلال به کنگر فرنگی}) / 1$$

میانگین غلظت قند کل به‌دست آمده از سه مرتبه تکرار هر آزمایش به‌عنوان متغیر وابسته یا پاسخ (Y_i)، و معادله درجه دوم زیر برای بررسی نتایج استفاده شد:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{33} x_3^2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3$$

به‌منظور تجزیه و تحلیل اطلاعات و رسم نمودارهای مربوط به روش سطح پاسخ از نرم افزار سیگماپلات و برای رسم سایر نمودارها از نرم‌افزار اکسل استفاده شد.

استفاده گردید. به‌منظور محاسبه قند کل پس از قراردادی میزان جذب‌های خوانده شده در معادله خط به‌دست آمده از طریق نمونه‌های استاندارد و به‌دست آوردن میزان غلظت به کمک رابطه زیر مقدار غلظت واقعی نمونه محاسبه شد:

$$= \text{میزان قند کل در } 100 \text{ گرم کنگر فرنگی}$$

$$\frac{\text{حجم استخراج شده } \times 100 \times \text{عکس رقت} \times \text{مقدار غلظت به دست آمده}}{\text{وزن نمونه کنگر}}$$

به‌منظور اندازه‌گیری قند احیا نیز از روش میلر (۲۲) استفاده شد. بدین صورت که ۳ میلی‌لیتر عصاره کنگر فرنگی استخراج شده (به روش استخراج آبی با و بدون اعمال فراصوت) را تا غلظت ۵ درصد رقیق کرده و پس از انتقال به لوله آزمایش، ۳ میلی‌لیتر معرف دی‌نیتروسالیسیلیک اسید به آن افزوده شد. نمونه‌ها سپس در حمام آب‌گرم ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵-۵ دقیقه قرار داده شدند. بعد از گذشت این زمان به هر یک از نمونه‌ها ۱ میلی‌لیتر محلول سدیم پتاسیم تارتارات ۴۰ درصد افزوده شده و نمونه‌ها به‌منظور کاهش دما به حمام آب سرد انتقال یافتند. سپس میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۷۵ nm توسط دستگاه طیف نوری اندازه‌گیری شد. جهت تهیه منحنی استاندارد از D- فروکتوز به‌عنوان استاندارد استفاده شد.

به‌منظور محاسبه قند احیا پس از قراردادی میزان جذب‌های خوانده شده در معادله خط به‌دست آمده از طریق نمونه‌های استاندارد و به‌دست آوردن میزان غلظت به ترتیب زیر مقدار غلظت واقعی نمونه محاسبه شد:

$$= \text{میزان قند احیا در } 100 \text{ گرم کنگر فرنگی}$$

$$\frac{\text{حجم استخراج شده } \times 100 \times \text{عکس رقت} \times \text{مقدار غلظت به دست آمده}}{\text{وزن نمونه کنگر}}$$

اندازه‌گیری میزان اینولین

برای اندازه‌گیری میزان اینولین نمونه‌های کنگر فرنگی، میزان قند احیای محاسبه شده از میزان قند کل به‌دست آمده کسر گردید و جواب حاصل به‌عنوان میزان اینولین در ۱۰۰ گرم نمونه کنگر فرنگی گزارش شد.

جدول ۲. نمایش طراحی آزمون‌ها براساس مدل Box-Behnken با سه متغیر به همراه نتایج مشاهده شده و پیش‌گویی شده

شماره آزمون	دما	نسبت حلال:کنگر		زمان	درصد قند کل (نتایج آزمایش‌ها) Y_0	درصد قند کل (نتایج پیش‌بینی شده) Y
		X_2	X_3			
۱	-۱	۰	-۱	-۱	۲/۶	۲/۵
۲	-۱	-۱	۰	۰	۲/۳	۲/۳
۳	-۱	+۱	۰	۰	۳/۱	۳/۲
۴	-۱	۰	+۱	+۱	۳/۲	۳/۲
۵	۰	-۱	-۱	-۱	۲/۵	۲/۶
۶	۰	+۱	+۱	-۱	۳	۲/۹
۷	۰	-۱	-۱	+۱	۲/۶	۲/۶
۸	۰	+۱	+۱	+۱	۳/۹	۳/۸
۹	+۱	۰	-۱	-۱	۲/۸	۲/۸
۱۰	+۱	-۱	۰	۰	۲/۵	۲/۴
۱۱	+۱	+۱	+۱	۰	۳/۲	۳/۲
۱۲	+۱	۰	-۱	+۱	۳	۳/۱
۱۳	۰	۰	۰	۰	۲/۹	۲/۷
۱۴	۰	۰	۰	۰	۲/۵	۲/۷
۱۵	۰	۰	۰	۰	۲/۶	۲/۷

جدول ۳. نتایج تجزیه واریانس ضرایب رگرسیون مدل Box-Behnken روی میزان استخراج قند کل

منبع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F	P
ضریب رگرسیون	۹	۴/۸۵۷	۰/۵۳۹۷	۷/۱۵۱۹	۰/۰۲۱۶
باقی مانده	۵	۰/۳۷۷۳	۰/۰۷۵۵		
کل	۱۴	۵/۲۳۴۳	۰/۳۷۳۹		

$$r^2 = 0/9507, r = 0/9750$$

نتایج و بحث

میزان ماده خشک و بریکس

براساس اندازه‌گیری‌های صورت گرفته روی نمونه‌های کنگرفرنگی استفاده شده در این مطالعه، مشخص گردید که میانگین میزان ماده خشک و محتوای مواد جامد محلول موجود در کنگرفرنگی ایرانی به ترتیب $6/7 \pm 0/3$ و $4/3 \pm 0/2$ درصد بود. این یافته‌ها نشان می‌دهند که به ازای هر ۱۰۰ گرم

کنگرفرنگی ایرانی ۴/۳ گرم مواد جامد محلول وجود دارند که حدود ۹۰ درصد (۳/۹ گرم) آن متعلق به مواد قندی می‌باشند. حال با توجه به منابع موجود در این زمینه و با احتساب این‌که حدود ۷۰-۲۰ درصد مواد قندی مربوط به اینولین هستند می‌توان انتظار داشت که از هر ۱۰۰ گرم کنگرفرنگی مورد مطالعه فقط می‌توان بین ۲/۷۳-۰/۷۸ گرم اینولین استخراج نمود که این موضوع با توجه به نتایج بررسی حاضر (جدول ۶) در

جدول ۴. نمایش میزان معنادار بودن ضرایب رگرسیون بر روی میزان استخراج قند کل از کنگر فرنگی

ضریب	میزان ضریب	خطای استاندارد	t	P
β_0	۲/۶۶۶۷	۰/۰۸۷۲	۳۰/۵۶۶۴	< ۰/۰۰۰۱
β_1	۰/۰۳۷۵	۰/۰۵۳۴	۰/۷۰۱۹	۰/۵۱۴۰
β_2	۰/۲۲۵۰	۰/۰۵۳۴	۴/۲۱۱۶	۰/۰۰۸۴
β_3	۰/۴۱۲۵	۰/۰۵۳۴	۷/۷۲۱۲	۰/۰۰۰۰۶
β_{11}	۰/۰۰۴۲	۰/۰۷۸۶	۰/۰۵۳۰	۰/۹۵۹۸
β_{22}	۰/۲۲۹۲	۰/۰۷۸۶	۲/۹۱۴۲	۰/۰۳۳۲
β_{33}	۰/۱۰۴۲	۰/۰۷۸۶	۱/۳۲۴۶	۰/۲۴۲۶
β_{12}	-۰/۱۰۰۰	۰/۰۷۵۶	-۱/۳۲۳۶	۰/۲۴۲۹
β_{13}	-۰/۰۲۵۰	۰/۰۷۵۶	-۰/۳۳۰۹	۰/۷۵۴۱
β_{23}	۰/۲۰۰۰	۰/۰۷۵۶	۲/۶۴۷۱	۰/۰۴۵۶

جدول ۵. نتایج تجزیه واریانس ضرایب رگرسیون مدل دو جمله‌ای (بر اساس اثر متقابل نسبت حلال به کنگر فرنگی - زمان)

روی میزان استخراج قند کل

منبع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F	P
ضریب رگرسیون	۵	۲/۱۴۹۴	۰/۴۲۹۹	۲۳/۰۳۱۴	< ۰/۰۰۰۱
باقی مانده	۹	۰/۱۶۸۰	۰/۰۱۸۷		
کل	۱۴	۲/۳۱۷۳	۰/۱۶۵۵		

غذایی به عنوان یک منبع عمده برای دریافت فیبر غذایی توجه نموده و این مسأله چیزی از اهمیت این ماده غذایی ارزشمند نمی‌کاهد.

شرایط بهینه استخراج

همان‌طور که در جدول ۲ می‌توان دید بیشترین میزان استخراج قند کل مربوط به شرایط ترکیب دمایی 80°C و زمان ۲۵ دقیقه و نسبت حلال به کنگر فرنگی ۱:۵ می‌باشد.

با به‌کارگیری روش آماری سطح پاسخ، مقایسه‌ی مقادیر مشاهده شده (Y_0) با مقادیر پیش‌گویی شده (Y) (جدول ۲) تطابق نزدیک این اعداد را نشان می‌دهند. برای مثال در آزمون شماره ۱ میزان پاسخ پیش‌گویی شده برابر ۲/۵ و میزان پاسخ به‌دست آمده برابر با ۲/۶ و یا در آزمون شماره ۲ هر دو مقادیر

عمل بین ۰/۶ تا ۲/۳ گرم در صد گرم کنگر برآورد شد. در حالی که میزان ماده خشک کنگر فرنگی گونه اورشلیم، که به طور صنعتی در کشورهای اروپایی برای تهیه اینولین مورد استفاده قرار می‌گیرد، حدود ۱۶-۱۴ درصد بوده که با احتساب ضریب ۲۰ تا ۷۰ درصدی، اینولین قابل استخراج آن در حدود ۹-۳ گرم به ازای ۱۰۰ گرم کنگر تازه گزارش شده است (۱۴). در جدول ۶ مقدار قند کل و اینولین استخراج شده از کنگر فرنگی تحت شرایط مختلف (ترکیبات مختلف دما، زمان و نسبت حلال به کنگر فرنگی) نشان داده شده است. این یافته‌ها نشانگر این واقعیت هستند که احتمالاً از کنگر فرنگی گونه ایرانی نمی‌توان به‌عنوان یک منبع صنعتی برای استخراج اینولین استفاده نمود. زیرا نسبت به میزان اینولین موجود باید هزینه نسبتاً زیادی صرف شود. هر چند کماکان می‌توان به این ماده

جدول ۶. نتایج تأثیر ترکیب سه متغیر دما، نسبت کنگر به حلال و زمان (با استفاده از طرح Box-Behnken) روی میزان استخراج آبی قند کل، قند احیا و اینولین از کنگرفرنگی

شماره آزمون	قند کل (درصد)	قند احیا (درصد)	اینولین (درصد)
۱	۲/۶	۱/۶	۱
۲	۲/۳	۱/۷	۰/۶
۳	۳/۱	۱/۵	۱/۲
۴	۳/۲	۱/۸	۱/۴
۵	۲/۵	۱/۵	۱
۶	۳	۱/۷	۱/۳
۷	۲/۶	۱/۴	۱/۲
۸	۳/۹	۱/۶	۲/۳
۹	۲/۸	۱/۵	۱/۳
۱۰	۲/۵	۱/۵	۱
۱۱	۳/۲	۱/۸	۱/۴
۱۲	۳	۱/۴	۲/۱
۱۳	۲/۹	۱/۷	۱/۲
۱۴	۲/۵	۱/۷	۰/۸
۱۵	۲/۶	۱/۵	۱/۱

مشاهده و پیش‌گویی شده برابر می‌باشند که این امر نشان‌دهنده هم‌بستگی بسیار خوب بین نتایج به‌دست آمده با روش تجربی و مقادیر پیش‌گویی شده با روش آماری است. در ضمن، نتایج حاصل از تجزیه واریانس ضرایب رگرسیون در جدول ۳ ارائه شده است. با توجه به مقدار عدد P می‌توان نتیجه‌گیری نمود که متغیرهای مستقل تأثیر معنی‌داری ($P < 0/05$) روی میزان استخراج قند کل دارند که برای تعیین میزان تأثیر هرکدام از ضرایب آزمون t روی ضرایب انجام شد.

میزان معنی‌دار بودن تأثیر هر یک از ضرایب با استفاده از آزمون t و میزان P در جدول ۴ نشان داده شده است. اعداد نشان‌داده شده در صورت هرچه بزرگ‌تر بودن میزان t و هرچه کوچک‌تر بودن میزان P معنی‌دارتر خواهند بود (۲۶). نتایج نشان داده شده در جدول ۴ حاکی از آن است که در میان آثار خطی نسبت حلال به کنگرفرنگی و زمان استخراج به‌ترتیب با

$P < 0/001$ و $P < 0/05$ ، بیشترین تأثیر معنی‌دار را روی مقدار استخراج قند کل داشتند. به‌طوری که در عمل نیز با افزایش آنها میزان استخراج به‌صورت خطی افزایش یافت. در میان اثرات متقابل، تنها اثر معنی‌دار مربوط به ترکیب نسبت حلال به کنگرفرنگی (x_3) - زمان (x_2) با $P < 0/05$ بود. بنابراین، می‌توان نتیجه‌گیری نمود که نسبت حلال به کنگرفرنگی و زمان موثرترین متغیرهای این مطالعه هستند. لینگون و همکاران (۲۰) نیز در پژوهشی روی استخراج اینولین از کنگرفرنگی با استفاده از روش سطح پاسخ، مشخص نمودند که نسبت حلال به کنگرفرنگی و دما دارای بیشترین تأثیر بر بازده استخراج بودند. هم‌چنین در تحقیق دیگری که (۲۶) روی استخراج پروتئین دانه‌های کدوی جوانه زده با استفاده از همین روش صورت گرفت مشخص گردید که نسبت حلال به جسم جامد دارای بیشترین تأثیر بر پاسخ به‌دست آمده بود.

نشان داده شده است. با توجه به نتایج گرفته شده از شکل ۱ و داده‌های نشان داده شده در جدول ۶ بهترین شرایط استخراج آبی در دمای 80°C ، زمان ۲۵ دقیقه و نسبت حلال به کنگرفرنگی ۱:۵ به دست آمد. در ضمن، همان‌گونه که در جدول ۶ مشاهده می‌گردد بیشترین میزان قند کل و هم‌چنین اینولین استخراجی مربوط به شرایط آزمون شماره ۸ می‌باشد که با مراجعه به جدول ۲ نیز می‌توان دریافت که در این آزمون، استخراج در شرایط ترکیب بهینه متغیرها صورت گرفته بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که شرایط بهینه برای استخراج قند کل مشابه شرایط بهینه استخراج اینولین است.

امروزه استخراج با روش فراصوت به دلیل کارایی بالاتر و میزان مصرف انرژی و آب پایین‌تر به صورت جایگزینی مناسب برای روش‌های استخراج قدیمی و به‌عنوان روشی اثبات شده در فراوری مواد گیاهی، به‌ویژه ترکیبات با وزن مولکولی پایین تبدیل شده است (۳۰) که این اثر افزایشی امواج فراصوت روی میزان استخراج مواد موثره از منابع گیاهی مربوط به محتوای انرژی بالای این امواج و تأثیر آنها در شکستن و متلاشی کردن دیواره‌های سلولی و افزایش احتمال رهاش محتویات آنها به محیط استخراج است (۱۹). با توجه به این مزیت‌ها در بررسی حاضر سعی شد تا تأثیر اعمال این امواج در دو شکل مستقیم و غیرمستقیم مورد بررسی قرار گیرد. در جدول ۷ میزان قند کل استخراج شده با استفاده از اعمال امواج فراصوت غیرمستقیم، در شرایط بهینه نسبت حلال به کنگرفرنگی و دمای استخراج به دست آمده از روش استخراج آبی، در زمان‌های مختلف نشان داده شده است. این یافته‌ها نشان‌دهنده این نکته هستند که علاوه بر این که میزان استخراج به دست آمده پایین‌تر از میزان استخراج آبی می‌باشد بلکه میزان اینولین نیز به مراتب کمتر از قند احیاست که علت این امر را شاید بتوان این‌گونه توجیه نمود که احتمالاً در چنین شرایطی توان و انرژی امواج فراصوت در حدی نبود که بتواند اولاً در ساختار سلولی ذرات نسبتاً درشت بافت کنگر گسیختگی لازم را ایجاد نماید تا امکان انتشار مواد قندی از داخل سلول به خارج افزایش یابد و دوم

با توجه به نتایج ارائه شده در جدول ۴ می‌توان گفت که ضرایب $\beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_{12}, \beta_{13}$ فاقد اثر معنی‌دار بر میزان استخراج قند کل هستند ($P > 0.05$). به عبارت دیگر اثر عامل دما و اثرات متقابل دما-زمان و دما-نسبت حلال به کنگرفرنگی معنی‌دار نمی‌باشند. لذا، مدل سه جمله‌ای گفته شده در قبل به شکل مدل دو جمله‌ای زیر که نشان‌گر ارتباط تجربی میان میزان استخراج قند کل و دو متغیر معنی‌دار زمان استخراج و نسبت حلال به کنگرفرنگی می‌باشد تبدیل گردید. در ضمن، برای بررسی ارتباط بین متغیرهای مستقل و متغیر وابسته از نمودار سه بعدی سطح پاسخ رسم شده توسط مدل استفاده شد (شکل ۱).

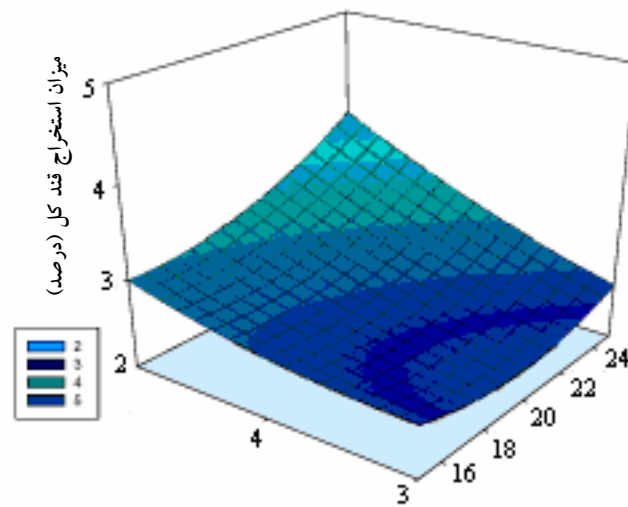
$$Y = 2/667 + 0/2250 x_1 + 0/4125 x_2 + 0/2292 x_1^2 + 0/1042 x_2^2 + 0/2000 x_{12}$$

در شکل ۱ تأثیر تغییر نسبت حلال به کنگرفرنگی و مدت زمان استخراج بر درصد استخراج قند کل توسط نمودار سه‌بعدی سطح پاسخ نشان داده شده است. با نگاه به این نمودار می‌توان دریافت که بیشترین میزان استخراج مربوط به محدوده‌ای می‌باشد که در آنجا نسبت حلال به کنگرفرنگی ۵ : ۱ و زمان استخراج ۲۵ دقیقه است.

جدول ۵ نیز نتایج تجزیه واریانس دو متغیر، نسبت حلال به کنگرفرنگی و زمان، را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌گردد، میزان P به دست آمده نشان‌دهنده سطح بالای معنی‌دار بودن دو متغیر نسبت حلال به کنگرفرنگی و زمان استخراج بر میزان پاسخ حاصل (میزان استخراج قند کل) است. در ضمن، این یافته‌ها نشان می‌دهند که این دو متغیر در واقع موثرترین متغیرها بر میزان استخراج قند کل هستند.

مقایسه تأثیر اعمال و عدم اعمال امواج فراصوت بر روی استخراج اینولین از کنگرفرنگی

در جداول ۶ و ۷ نتایج مربوط به میزان استخراج قند کل، قند احیا و اینولین از کنگر به روش آبی با و بدون اعمال امواج فراصوت براساس طرح Box-Behnken (مطابق جدول ۲)



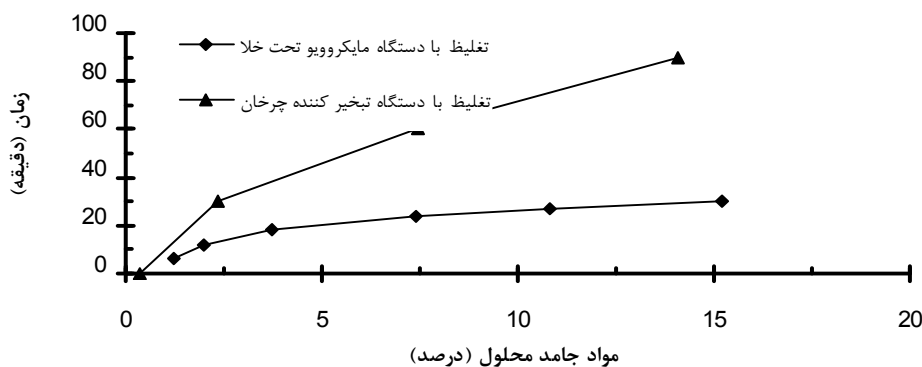
شکل ۱. نمایش نمودار سه بعدی سطح پاسخ مربوط به تأثیر تغییرات نسبت حلال به کنگر فرنگی و زمان روی میزان استخراج قند کل از کنگر فرنگی

جدول ۷. مقایسه نتایج استخراج آبی اینولین با اعمال امواج فراصوت غیرمستقیم (حمام فراصوت با فرکانس ۳۵ کیلوهرتز و توان ۷۰ وات) و مستقیم (پروپ سونیکیتور با فرکانس ۶۰-۵۰ کیلوهرتز و توان ۳۰۰ وات) در شرایط بهینه استخراج

روش اعمال فراصوت	زمان استخراج (دقیقه)	قند کل (درصد)	قند احیا (درصد)	اینولین (درصد)
غیرمستقیم	۱۰	۱/۷	۱/۲	۰/۵
	۲۰	۱/۸	۱/۳	۰/۵
	۳۰	۲/۳	۱/۵	۰/۸
	۴۰	۲/۵	۱/۶	۰/۹
	۵۰	۲/۸	۱/۸	۱
	۶۰	۳/۱	۲/۱	۱
مستقیم	۱۵	۴	۱/۴	۲/۶

همکاران (۲۰) نشان داده که استخراج اینولین از کنگر فرنگی با استفاده از امواج فراصوت، حمام فراصوت با فرکانس ۵۹ کیلوهرتز و توان ۹۰ وات، سبب کاهش در زمان استخراج و افزایش سرعت استخراج نسبت به روش استخراج آبی گردید. البته در این بررسی آنها از پودر کنگر اورشلیم برای استخراج اینولین استفاده کردند که بسیار متفاوت با شرایط به کار رفته در بررسی حاضر بود. در ضمن، در تحقیق حاضر فرکانس استفاده

این که شاید فرکانس و توان پائین سبب شده تا نوعی اغتشاش در دیواره‌های سلولی ایجاد گردیده و روند معمول انتشار نیز مختل گردد. ولی در عین حال احتمالاً فراصوت در مدت طولانی (حدود ۶۰ دقیقه) و دمای بالا (80°C) توانسته با شکستن فروکتان‌های وارد شده به محلول استخراجی به قندهای سازنده آن میزان اینولین را کاهش و مقدار قند احیا را افزایش دهد. در حالی که مطالعات انجام شده توسط لینگیون و



شکل ۲. مقایسه نمودارهای تغلیظ عصاره استخراجی کنگر فرنگی با استفاده از تبخیر کننده چرخان و مایکروویو تحت خلا

می‌توان ملاحظه نمود که میزان اینولین استخراج شده نیز خیلی بیش‌تر از قند احیا بوده و به این ترتیب مشخص می‌گردد که به احتمال بسیار زیاد توان و فرکانس امواج فراصوت نقش بسیار تعیین کننده‌ای در عمل استخراج به‌طور عام، قند کل و اینولین به‌طور خاص دارند. این یافته‌ها کاملاً هم‌راستا با یافته‌های گزارش شده توسط سایر پژوهش‌گران می‌باشند (۱۹ و ۲۰).

تهیه پودر ناخالص اینولین

برای تهیه پودر ناخالص اینولین، عصاره‌ی حدود یک کیلوگرم کنگر فرنگی خرد شده (در شرایط بهینه تعیین شده با استفاده از روش سطح پاسخ با نسبت حلال به کنگر فرنگی ۱:۵، زمان ۲۵ دقیقه و دمای 80°C) استخراج، صاف و سانتریفیوژ شد. سپس عصاره حاصله با استفاده از دو روش تبخیر کننده چرخان و مایکروویو تحت خلا تغلیظ گردید. با مشاهده شکل ۲ مشخص می‌گردد که غلظت مواد جامد محلول با روش تبخیر کننده چرخان در مدت زمان ۱۰۰ دقیقه از حدود ۵٪ درصد به حدود ۱۵ درصد رسید. در حالی‌که برای رسیدن به این نسبت از مواد جامد محلول فقط به ۲۰ دقیقه زمان با استفاده از روش مایکروویو تحت خلا نیاز بود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که سرعت تغلیظ عصاره با استفاده از دستگاه مایکروویو تحت خلا ابداعی نگارندگان به مراتب سریع‌تر از دستگاه تبخیر کننده چرخان است. در ضمن، برای خشک کردن نمونه‌های تغلیظ شده ابتدا آنها را در یخ‌زن منجمد کرده سپس توسط دستگاه

شده برابر ۳۵ کیلوهرتز و توان دستگاه برابر ۷۰ وات بود. در همان راستا، لی و همکاران (۱۹) نیز در پژوهشی که روی استخراج چندقندی‌ها از درخت عناب چینی با استفاده از روش فراصوت انجام دادند، دریافتند که افزایش دما یا افزایش توان صوت سبب افزایش بازده استخراج می‌گردد. با مقایسه جداول ۶ و ۷ و نتایج مربوط به استخراج آبی قند کل با و بدون اعمال فراصوت مشاهده می‌گردد که اعمال فراصوت با توان و فرکانس پایین در کاهش مدت زمان استخراج و افزایش میزان بازده موثر نبود به‌طوری‌که حتی پس از گذشت مدت زمانی معادل ۶۰ دقیقه نمی‌توان به میزان قند کل استخراج شده با روش استخراج آبی، بدون اعمال فراصوت، رسید.

به همین دلیل در ادامه بررسی حاضر سعی شد تا تأثیر فرکانس و توان امواج فراصوتی بر روی میزان استخراج بررسی شود. برای این منظور عمل استخراج با استفاده از دستگاه پروب سونیکیتور (فراصوت مستقیم) (فرکانس ۶۰-۵۰ کیلوهرتز و توان ۳۰۰ وات) و در شرایط دمایی و نسبت حلال به کنگر مشابه با شرایط قبل صورت گرفت. نتایج به‌دست آمده نشان داد (جدول ۷) که میزان استخراج قند کل به‌دست آمده با این روش بیشتر و زمان استخراج کوتاه‌تر از دو روش انجام شده قبلی بوده و نشان‌دهنده آن است که احتمالاً برای شکستن سلول‌های بافت کنگر فرنگی نیاز به اعمال امواج فراصوت با توان و فرکانس بالاتر از توان و فرکانس استفاده شده در روش استخراج با حمام فراصوت می‌باشد. در ضمن به روشنی

بیشترین تأثیر بر میزان استخراج قند کل بودند به صورتی که با افزایش آنها میزان پاسخ به دست آمده به صورت خطی افزایش یافت. نتایج تحقیق روی استخراج آبی با استفاده از امواج فراصوت حاکی از این نکته بود که علاوه بر فرکانس و توان امواج فراصوتی اعمال مستقیم یا غیرمستقیم این امواج در عمل استخراج مؤثر بوده و سبب افزایش میزان استخراج قند کل و اینولین و کاهش قابل ملاحظه در مدت زمان استخراج می‌گردند به طوری که هرچه توان و فرکانس امواج فراصوت بالاتر، میزان استخراج بیشتر و مدت زمان استخراج کوتاه‌تر بود. در ضمن مشخص شد که روش تغلیظ در شرایط مایکروویو تحت خلا به مراتب کارآمدتر و سریع‌تر از روش تبخیر تحت شرایط خلا بود.

خشک‌کن انجمادی در مدت نسبتاً طولانی خشک گردید و در نهایت پودر قهوه‌ای رنگی به دست آمد. البته لازم به گفتن است که با استفاده از ذغال فعال یا ستون‌های کروماتوگرافی می‌توان اغلب ناخالصی‌ها را قبل از انجام عمل تغلیظ جداسازی نمود تا به این ترتیب تا حدود زیادی میزان رنگ پودر حاصله را بهبود داد.

نتیجه‌گیری

یافته‌های این بررسی نشان دادند که کاربرد روش سطح پاسخ در یافتن شرایط بهینه استخراج آبی اینولین از کنگرفرنگی روش بسیار موثر و قابل اعتمادی است. از میان سه متغیر بررسی شده نسبت حلال به کنگرفرنگی و سپس زمان استخراج دارای

منابع مورد استفاده

- زرگری، ع. ۱۳۷۱. گیاهان دارویی. چاپ پنجم، جلد سوم، انتشارات دانشگاه تهران.
- فخر رنجبری، ح. ۱۳۷۷. بررسی مواد موثره کاسنی (*Cichorium intubus* L.). وزارت جهاد سازندگی، مرکز تحقیقات دارویی، مرکز تحقیقات منابع طبیعی و امور دام جهاد سازندگی استان آذربایجان غربی، گروه گیاهان دارویی، کد طرح ۰۳-۰۳-۷۶-۰۳۱۱۰۰۱۰۰۰.
- کوثری، ا. ۱۳۷۲. استخراج و خالص‌سازی اینولین از گیاهان بومی ایران. مرکز تحقیقات دارویی، تهران.
- کوثری، ا. ۱۳۷۳. استخراج و خالص‌سازی تبائین و اینولین از گیاهان بومی ایران. مرکز تحقیقات دارویی، تهران.
- Abbasi, S. and S. Azari. 2007. Novel freeze drying of onion slices using microwaves. *J. Food. Sci. and Technol.* 44:944-979.
- Anony. 2006. AOAC Official Methods of Analysis. 18th ed., AOAC International, Maryland.
- Anony. 2006. E-Handbook of statistical methods. Available at: <http://www.itl.nist.gov/Div898/handbook/>, date.
- Baldini, M., F. Danuso, M. Turi and G. P. Vannozzi. 2004. Evaluation of new clones of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) for inulin and sugar yield from stalkes and tubers. *Indust. Crops and Prod.* 19: 25-40.
- Bosscher, D., J. Van Loo and A. Frank. 2006. Inulin and oligofructose as functional ingredients to improve bone mineralization. *Int. Dairy J.* 16(9): 1092-1097.
- Box, G. E. P., W. G. Hunter and J. S. Hunter. 1978. *Statistics for Experimenters.* John Wiley and Sons Inc., New York.
- Carabin, G. and W. Flamm. 1999. Evaluation of safety of inulin and oligofructose as dietary fiber. *Regulatory Toxic. and Pharmacol.* 30: 268-282.
- Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356.
- Figueira, G. M., K. J. Park, F. P. R. Brod and S. L. Honório. 2004. Evaluation of desorption isotherms, drying rates and inulin concentration of chicory roots (*Cichorium intybus* L.) with and without enzymatic inactivation. *J. Food Eng.* 63: 273-280.
- Frank, A. and L. D. Leenheer. 2006. Inulin. Available at: http://www.wiley-vch.de/books/biopoly/pdf_v06/bpol6014_439_448.pdf.
- Kaur, N. and A. K. Gupta. 2002. Application of inulin and oligofructose in health and nutrition. *J. Biosci.* 27: 703-714.

16. Kim, M. 2000. The water-soluble extract of chicory reduces cholesterol uptake in gut-perfuse rats. *Nutr. Res.* 20: 1017–1026.
17. Ku, Y., O. Jansen, C. J. Oles, Z. Lazar and J. I. Rader. 2003. Precipitations of inulins and oligofructose by ethanol and other solvents. *Food Chem.* 81: 125–132.
18. Laurenzo, K. S., J. L. Navia and D. S. Neiditch. 1999. Preparation of inulin products. U. S. Patent, Number 5: 968-365.
19. Li, J., S. Ding and X. Ding. 2007. Optimization of the ultrasonically assisted extraction of polysaccharides from *Zizyphus jujuba* cv. Jinsixiaozao. *J. Food Eng.* 80: 176-183
20. Lingyun, W., W. Jianhua, Z. Xiaodong, T. DaYalin, C. Chenggang, F. Tianhua and F. Zhang. 2007. Studies on the extracting technical conditions of inulin from Jerusalem artichoke tubers. *J. Food Eng.* 79: 1087–1093.
21. Liyana-Pathirana, C. and F. Shahidi. 2005. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chem.* 93: 47–56.
22. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31: 420–428.
23. Moerman, F. T., M. B. Van Leeuwen and J. A. Delcour. 2004. Enrichment of higher molecular weight fraction in inulin. *J. Agric. and Food Chem.* 52: 3780–3783.
24. Molina, D., M. Martinez, F. Mregarejo, A. Hiner, S. Chazarra and J. Lopez. 2005. Molecular properties and prebiotic effect of inulin obtained from artichoke (*Cynara scolimus* L.). *Phytochemistry* 66: 1476–1484.
25. Montgomery, D. C. 1997. *Design and Analysis of Experiments*. 5th ed., John Wiley and Sons Inc., New York.
26. Quahong, L. and F. Caili. 2005. Application of response surface methodology for extraction optimization of germinant pumpkin seeds protein. *Food Chem.* 92: 701–706.
27. Ritsema, T. and S. Smeekens. 2003. Fructans: beneficial for plants and humans. *Current Opinion in Plant Biol.* 6: 223–230.
28. Roberfroid, M. 1999. Nutritional and health benefits of inulin and oligofructose. *Amer. Soc. For Nutr. Sci.* 1436–1437.
29. Roberfroid, M. 2005. *Inulin-Type Fructans: Functional Food Ingredients*. CRC Press, New York
30. Rodrigues, S. P. and A. S. Gustavo. 2007. Ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*Cocos nucifera*) shell powder. *J. Food Eng.* 80: 869-872.
31. Saengthongpinit, W. and T. Sajjaanantakul. 2005. Influence of harvest time and storage temperature on characteristics of inulin from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers. *Post Harvest Biol. and Technol.* 37: 93–100.
32. Trugland, B. C. and D. Meyer. 2002. Non-digestible oligo-and polysaccharides (dietary fiber): their physiology and role in human health and food. *Comprehensive Rev. in Food Sci. and Food Safety* 1: 73–92.