www.rifst.ac.ir/jrifst.aspx
نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی
سال ۱۳۹٤، جلد ٤، شماره ۳، صفحات ۲٥٦ - ۲٤۷

JRIFST

بررسی روش‌های مختلف جداسازی و خواص فیزیکوشیمیایی فراکسیون‌های با طول زنجیره مختلف اینولین حاصل از گیاه کاسنی

پگاه درجانی*[1]، مرضیه حسینی نژاد[2]، رسول کدخدایی[3]، الناز میلانی[4]، احمد بالندری[2]

۱- دانشجوی دکترای گروه فراوری مواد غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی، مشهد
*نویسنده مسئول (pegahdargany@yahoo.com)
۲- استادیار گروه زیست فناوری مواد غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی، مشهد
۳- دانشیار گروه نانوفناوری مواد غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی، مشهد
۴- استادیار گروه فراوری مواد غذایی، پژوهشکده علوم و فراوری مواد غذایی جهاد دانشگاهی خراسان رضوی

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۰/۱۵
تاریخ پذیرش: ۹۴/۰۴/۱۶

واژه‌های کلیدی
اتانل
اولترافیلتراسیون
اولیگوفروکتوز
اینولین
کریستالیزاسیون

چکیده

اینولین طبیعی استخراج شده از ریشه‌های تازه گیاه کاسنی متشکل از واحدهای فروکتوز با پیوندهای β(۲→۱) با درجه پلیمریزاسیون مختلف می‌باشد. میزان اینولین، طول زنجیره و خواص عملکردی آن علاوه بر منشاء ژنتیکی، شرایط محیطی رشد و زمان برداشت گیاه، به روش استخراج و فرآیندهای پس از استخراج نیز بستگی دارد. اینولین با زنجیره کوتاه حلالیت و شیرینی بیشتری داشته و به عنوان جایگزین شکر استفاده می‌شود، حال آن‌که اینولین زنجیره بلند دارای حلالیت کمتر، ویسکوزیته و پایداری حرارتی بیشتری بوده و به عنوان جایگزین چربی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این پژوهش جهت دستیابی به فراکسیون‌های اینولین با طول زنجیره مختلف، از ریشه گیاه کاسنی رقم *ارکیس* استفاده شد و اثر تیمارهای نسبت اتانل به ماده جامد (۲:۱ و ۱۰:۱)، کریستالیزاسیون و رسوب محلول آبی (۲۰- درجه سانتی‌گراد) و اولترافیلتراسیون با قطر غشای ۴ کیلودالتون بر بازده استخراج، درجه پلیمریزاسیون و خواص فیزیکوشیمیایی ترکیبات حاصل بررسی شد. نتایج نشان داد که افزایش غلظت اتانل باعث رسوب و راندمان بیشتر اینولین می‌شود. رسوب حاصل از نسبت ۲:۱ اتانل به ماده جامد در مقایسه با سایر روش‌های استفاده شده دارای بیشترین درجه پلیمریزاسیون (۶۶) و کمترین درصد قند احیاء بوده (۱/۲درصد) و رسوب حاصل از فاز تراوه غشای اولترافیلتراسیون دارای بیشترین درصد قند احیاء (۵/۳۱ درصد) و کمترین درجه پلیمریزاسیون (۱۶) بود.

مقدمه

اینولین و فروکتوالیگوساکاریدها به‌طور طبیعی در بسیاری از منابع گیاهی از جمله سیر، پیاز، مارچوبه، گندم، کنگر، کاسنی و غیره وجود دارند (Muir *et al.*, 2007). در بین منابع عمده اینولین، گیاه کاسنی (*Cichorium intybus*) به دلیل دارا بودن درصد بالای اینولین و مشابه‌بودن روش‌های استخراج و تخلیص آن با چغندرقند کاربرد صنعتی بیشتری پیدا کرده است. اینولین کاسنی یک فروکتان خطی متشکل از واحد-های فروکتوزیل- فروکتوز با پیوندهای β(۲-۱) است که شامل یک سری از الیگومرها و پلیمرهای با درجه پلیمریزاسیون بین ۲ تا ۶۰ واحد و با میانگین درجه پلیمریزاسیون ۱۲ می‌باشد (Meyer &Tungland 2002, Meyer *et al.*, 2011). فراورده‌های حاصل از اینولین به صورت اینولین زنجیره کوتاه یا فروکتو-اولیگوساکاریدها با درجه پلیمریزاسیون ۲-۱۰

(میانگین ۴)، اینولین زنجیره بلند با درجه پلیمریزاسیون ۱۰- ۶۰ (میانگین ۲۵) و اینولین غنی شده با اولیگوفروکتوز (نسبت مساوی از اینولین زنجیره بلند و زنجیره کوتاه) به صورت تجاری در دسترس می‌باشند (Trrega *et al*., 2010). طول زنجیره اینولین روی خواص تکنولوژیکی آن مؤثر است به‌طوری که اینولین زنجیره کوتاه یا اولیگوفروکتوز محلول‌تر و شیرین‌تر از اینولین زنجیره متوسط بوده و دارای پروفایل شیرینی مشابه ساکارز می‌باشد اما محتوای کالری‌زایی (۱-۲ کالری در گرم) و قدرت شیرین-کنندگی آن (۳۵-۳۰ درصد) کمتر از ساکارز است (Roberfroid, 2002; Trrega *et al*., 2010, 2011). اولیگوفروکتوزها در صورت ترکیب با شیرین‌کننده‌های مصنوعی مثل آسپارتام، سوکرالوز و آسه‌سولفام ضمن تشدید مزه شیرینی باعث ایجاد احساس دهانی بهتر، حفظ طعم فراورده با کاهش پس‌مزه نامطلوب و افزایش پایداری محصول می‌شوند. همچنین در طی شرایط معمول فراوری مواد غذایی مانند فرایندهای حرارتی، شرایط اسیدی و یا فعالیت آبی کم، پایدار بوده و دارای خواص جذب رطوبت و کاهش فعالیت آبی هستند که باعث افزایش پایداری میکروبیولوژیکی شده و روی نقطه‌جوش و انجماد نیز مؤثر می‌باشند (Trrega *et al*., 2006; Roberfroid, 2007). اینولین زنجیره بلند دارای پایداری حرارتی بالاتر، حلالیت کمتر و ویسکوزیته بیشتری نسبت به اینولین زنجیره متوسط می‌باشد و به عنوان جایگزین چربی در بسیاری از فراورده‌های لبنی استفاده می‌شود. در صورتی که جایگزینی چربی مد نظر باشد اینولین زنجیره طویل در مقایسه با اینولین استاندارد دارای عملکرد بیشتری بوده، لذا به مقادیر کمتری از آنها نیاز می‌باشد و می-تواند در فراورده‌های غذایی مختلف به‌عنوان جایگزین پایدارکننده‌ها استفاده گردد (Akin *et al*., 2007; Buriti *et al*., 2010). اثرات پری‌بیوتیک اینولین نیز به فلور روده هر فرد و درجه پلیمریزاسیون زنجیره فروکتوز بستگی دارد. به طوری که فروکتان‌های زنجیره کوتاه در ابتدای روده بزرگ تخمیر می‌شوند در حالی‌که فروکتان‌های زنجیره بلند دارای تخمیر آهسته‌تری بوده و در بخش‌های انتهایی روده تخمیر می‌شوند (Gibson *et al*., 1995; Bosscher *et al*., 2006). در طی سال‌های اول دهه ۱۹۹۰ مطالعات زیادی روی جداسازی و خالص‌سازی اینولین و اولیگو-فروکتوزها برای استفاده به عنوان مکمل‌های رژیمی صورت گرفت. طبق تحقیقات صورت گرفته مشخص شده است که با استفاده از تکنیک‌هایی مانند تیمار با حلال، کریستالیزاسیون و رسوب محلول آبی، تیمار با آنزیم، اولترافیلتراسیون و روش‌های جداسازی کروماتوگرافی می‌توان فراکسیون‌های با طول زنجیره مختلف اینولین را جداسازی کرد (Paseephol *et al*., 2007). روش استاندارد برای رسوب پلی‌ساکاریدها استفاده از حلال اتانل می‌باشد (Saengthongp, 2005). با استفاده از غلظت‌های مختلف اتانل می‌توان فراکسیون‌های با طول زنجیره مختلف اینولین را جداسازی کرد. به‌طور معمول در غلظت ۷۱ درصد اتانل پلی ساکاریدهای با وزن مولکولی بالا رسوب می-کنند و با افزایش غلظت اتانل می‌توان سایر زنجیره‌های اینولین را نیز جدا کرد(Saengthongp, *et al*., 2007; Paseephol 2005). با توجه به حلالیت کم اینولین در دمای پایین از این روش می‌توان برای جداسازی مولکول‌های فروکتان با درجه پلیمریزاسیون مختلف استفاده نمود. در این روش اینولین‌های با طول زنجیره بالا در دمای پایین رسوب کرده و ته‌نشین می‌شوند (Lopez-Molina *et al*., 2005). با استفاده از تکنیک اولترافیلتراسیون و بهره‌گیری از غشاهای با اندازه مختلف نیز می‌توان مولکول‌های فروکتان با درجه پلیمریزاسیون مختلف را جداسازی کرد. در این روش مولکول‌های اینولین با درجه پلیمریزاسیون کمتر از اندازه منافذ غشاء به عنوان تراوه عبور کرده و مولکول-های با درجه پلیمریزاسیون بیشتر از اندازه منافذ غشاء به‌عنوان ناتراوه روی غشاء جمع‌آوری می‌شوند (Saengthongp, 2005). در این تحقیق بر اساس نتایج حاصل از فاز نخست پژوهش، گیاه کاسنی رقم خارجی *ارکیس* (*Orchies*)، کشت شده در شرایط آب و هوایی قزوین مورد استفاده قرار گرفت. با توجه به اینکه اکثر تحقیقات انجام شده روی اینولین طبیعی که از گیاه استخراج می‌شود صورت گرفته است و به‌دلیل اهمیت تأثیر طول زنجیره اینولین روی خواص ویژه و تکنولوژیکی آن و با توجه به روش‌های مختلف جداسازی فراکسیون‌های با طول زنجیره مختلف

اینولین، اثر تیمارهای نسبت اتانل به ماده جامد (۲:۱ و ۱۰:۱)، کریستالیزاسیون و رسوب محلول آبی (۲۰- درجه سانتی‌گراد) و اولترافیلتراسیون با قطر غشای ۴ کیلودالتون روی بازده استخراج، درجه پلیمریزاسیون و خواص فیزیکوشیمیایی ترکیبات حاصل بررسی شد.

مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده در این پژوهش شامل، گیاه کاسنی ریشه‌ای خارجی رقم *ارکیس* کشت شده در منطقه قزوین (برداشت شده در اوایل مهر ۱۳۹۲) که از مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند تهیه شد، اتانل ۹۹ درصد، هیدروکسید کلسیم، اسید فسفریک، کربن فعال، اسید سولفوریک، هیدروکسید سدیم، فنل کریستاله، دی‌فروکتوز استاندارد، تارتارات مضاعف سدیم پتاسیم، دی‌نیتروسالیسیلیک اسید از شرکت مرک آلمان، اینولین استاندارد (HP) از Beneo-oraftiR، بود. در این تحقیق برای جداسازی فراکسیون‌های با طول زنجیره مختلف اینولین به روش اولترافیلتراسیون از سیستم پایلوت غشایی موجود در پژوهشکده علوم و صنایع غذایی استفاده شد که مشخصات آن شامل مدول قاب صفحه[1] با اندازه منافذ غشای[2] ۴ کیلودالتون و جنس پلی‌اتر سولفون[3] (PE2- PES) از شرکت Sepro، با عبور جریان هم راستا (Dead-end) و فشار ۴ بار بود. سایر دستگاه‌های استفاده شده عبارتند از: تغلیظ تحت خلأ مدل Buchi waterbath B- 480, Switzerland، pHمتر الکترونیکی مدل MetrohmAG Herisan, Switzerland، اسپکتروفتومتر مدل UV-160A,Shimadzu Japan.

تهیه عصاره گیاه و خالص‌سازی

در فاز اول پژوهش نتایج حاصل از بهینه‌یابی شرایط استحصال اینولین از ریشه کاسنی رقم *ارکیس*، شامل دمای ۷۴ درجه سانتی‌گراد، زمان ۴۰ دقیقه و نسبت آب به ماده جامد (وزنی/ حجمی) ۱۲:۱ تعیین گردید. لذا در این پژوهش برای تهیه عصاره ابتدا غده‌های کاسنی، شسته و پوست‌گیری شده؛ پس از خردشدن در مخلوط‌کن، با ۱۲ برابر (وزنی/ حجمی) آب به ازاء هر یک گرم غده مخلوط شدند و سوسپانسون حاصل به مدت ۴۰ دقیقه در دمای ۷۴ درجه سانتی‌گراد قرارگرفت تا هم آنزیم‌ها غیرفعال شوند و هم اینولین به داخل آب نفوذ کند. پس از این مرحله عصاره حاصل با استفاده از یک صافی پارچه‌ای از جنس کتان صاف شد، سپس برای حذف ترکیبات پکتینی، پروتئین‌ها و دیگر مواد کلوئیدی، pH عصاره با استفاده از محلول هیدروکسید کلسیم ۵ درصد از ۶- ۵ به حدود ۱۲-۱۰ رسانده شد و عصاره به مدت نیم ساعت در دمای ۶۰-۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. رسوب حاصل با استفاده از کاغذ صافی جدا شد تا عصاره نسبتاً شفاف با رنگ زرد تیره به‌دست‌آید. برای حذف کلسیم اضافی و دیگر مواد آلی موجود، pH عصاره با استفاده از محلول اسید فسفریک ۱۰ درصد به ۹-۸ رسیده و به مدت ۳-۲ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد، تا رسوب تشکیل گردد. سپس رسوب حاصل با استفاده از کاغذ صافی جدا گردید. برای اطمینان از فرآیند تصفیه مناسب مرحله افزودن هیدروکسید کلسیم و اسید فسفریک ۲ بار انجام شد. عصاره تصفیه شده با افزودن کربن فعال به میزان ۱ درصد و همزدن شدید در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و مدت زمان ۳۰ دقیقه رنگبری گردید. پس از صاف کردن مخلوط با کاغذ صافی و خاک فیلتر، کربن فعال جدا شده و عصاره کاملاً بی‌رنگ و شفاف با میزان مواد جامد محلول ۸-۷ درصد به‌دست آمد (Paseephol *et al*., 2007). برای مقایسه روش‌های مختلف جداسازی فراکسیون‌های با طول زنجیره مختلف، عصاره شفاف حاصل از مرحله رنگبری با استفاده از تیمارهای نسبت اتانل به ماده جامد (۱: ۲ و ۱۰:۱)، کریستالیزاسیون و رسوب محلول آبی (۲۰- درجه سانتی‌گراد) و اولترافیلتراسیون با قطر غشای (۴ کیلودالتون) مورد بررسی قرار گرفت.

جداسازی فراکسیون‌های با طول زنجیره مختلف استفاده از غلظت‌های مختلف اتانل

عصاره شفاف حاصل از رنگبری با استفاده از دستگاه تغلیظ تحت خلأ به بریکس ۴۰ رسید (Paseephol *et*

[1] Plate-and-frame module
[2] Molecular Weight Cut-0ff
[3] Polyethersulfone

al., 2007). با توجه به اینکه عصاره تغلیظ شده هنوز حاوی ترکیبات محلول و مواد معدنی می‌باشد، برای حذف این ترکیبات و رسوب مواد قندی و اینولین از اتانل استفاده شد. برای این منظور عصاره تغلیظ شده تحت تیمارهای نسبت اتانل به ماده جامد (۲:۱ و ۱۰:۱)، قرار گرفت. در هنگام افزودن اتانل رسوب سفید رنگ به حالت سوسپانسیون تشکیل شد. این سوسپانسیون برای ته‌نشینی کامل رسوب به مدت ۲ روز در بن ماری تحت دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و پس از آن الکل باقیمانده در فاز رویی رسوب توسط پیپت جدا شده و رسوب حاصل در آون ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک گردید. رسوب خشک شده در پایان آسیاب و وزن نهایی آن نسبت به وزن غده‌های اولیه به دست آمد (Saengthongp, 2005; Paseephol *et al*., 2007).

استفاده از روش کریستالیزاسیون

عصاره شفاف حاصل از رنگبری در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ روز قرار گرفت سپس بعد از رفع انجماد، رسوب ایجاد شده با سانتریفیوژ (۴۵۰۰×g به مدت ۱۰ دقیقه) جداسازی و در آون ۵۰ درجه به مدت ۲۴ ساعت خشک گردید و پودر حاصل جمع آوری شده و برای آزمایش‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت (Lopez-Molina *et al*., 2005). همچنین عصاره شفاف حاصل از رنگبری پس از تغلیظ تحت خلأ تا بریکس ۱۵ به مدت ۴۸ ساعت در دمای یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفت و فرایند رسوب اینولین بررسی شد (Saengthongp, 2005; Paseephol *et al*., 2007).

استفاده از غشای اولترافیلتراسیون

عصاره شفاف حاصل از رنگبری از سیستم اولترا-فیلتراسیون با غشای با قطر ۴ کیلودالتون عبور داده شد. فاز تراوه و ناتراوه حاصل جمع‌آوری شده و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ روز قرار گرفت. پس از رفع انجماد رسوب حاصل با سانتریفوژ جدا شد و پس از خشک کردن در آون ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت پودر حاصل جمع آوری و برای آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفت (Moerman *et al*., 2004; Swennen *et al*., 2005; Saengthongp, 2005).

آزمون‌های فیزیکی و شیمیایی ترکیبات حاصل

برای اندازه‌گیری ترکیبات موجود در پودر حاصل و بررسی خواص آنها یک سری آزمایش‌های فیزیکو-شیمیایی به شرح ذیل روی پودرهای اینولین استخراج شده، انجام شد.

اندازه‌گیری کربوهیدرات کل

برای اندازه‌گیری قند کل موجود در نمونه‌ها از روش فنل سولفوریک اسید استفاده شد. ابتدا به ۱ میلی‌لیتر نمونه (به غلظت ۷۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، ۱ میلی-لیتر محلول فنل ۵ درصد و سپس ۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۹۸ درصد به نمونه‌ها اضافه شد. بعد از قرار دادن مخلوط مذکور در بن ماری با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، به مدت۲۰ دقیقه، جذب آن با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر ماورای بنفش- مرئی در طول موج ۴۸۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. در این روش جهت تهیه منحنی استاندارد قند کل، اینولین (HP) (Beneo-oraftiR) به عنوان استاندارد مورد استفاده قرار گرفت (Dubois *et al*., 1956).

اندازه‌گیری قند احیاءکننده[1]

برای اندازه‌گیری قند احیاءکننده موجود در نمونه‌ها از معرف اسید دی‌نیتروسالیسیلیک استفاده شد. بدین-صورت که ۳ میلی‌لیتر از نمونه (غلظت ۱۰۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) را به لوله آزمایش منتقل کرده و ۳ میلی‌لیتر معرف اسید دی‌نیتروسالیسیلیک به آن اضافه گردید. پس از مخلوط شدن، نمونه‌ها در حمام آب گرم ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرارگرفتند. بعد از گذشت زمان ۱۰-۱۵ دقیقه به هر یک از نمونه‌ها ۱ میلی‌لیتر محلول تارتارات مضاعف سدیم پتاسیم ۴۰ درصد افزوده و پس از سرد شدن، مقدار قند احیاء نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۷۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. در این روش جهت تهیه منحنی استاندارد قند احیاء از D- فروکتوز به

[1] Reducing sugar

عنوان استاندارد استفاده گردید (Dubois *et al*., 1956; Miller, 1959).

اندازه‌گیری درصد اینولین و اولیگوفروکتوز (محتوای فروکتان)

برای اندازه‌گیری مقدار پلی‌فروکتان موجود در ریشه کاسنی میزان قند احیای محاسبه شده از میزان قند کل به دست آمده کسر گردید و درصد پلی‌فروکتان به روش زیر محاسبه شد (Lingyun *et al*., 2007).

رابطه (۱)

$$\text{درصد پلی فروکتان} = \frac{\text{حجم عصاره استخراجی} \times \text{مقدار پلی فروکتان}}{\text{مقدار نمونه کاسنی}} \times ۱۰۰$$

تعیین میانگین درجه پلیمریزاسیون اینولین استخراج شده

میانگین درجه پلیمریزاسیون اینولین استخراج شده از تقسیم درصد وزنی قند کل بر درصد وزنی قند احیاء-کننده به دست آمد (Paseephol *et al*., 2007).

تعیین بازده رسوب اینولین

مقدار اینولین حاصل از ۱۰۰ گرم ریشه تازه کاسنی برحسب گرم اندازه‌گیری شد (Saengthongp, 2005; Paseephol *et al*., 2007).

اندازه‌گیری درصد ماده خشک

برای اندازه‌گیری درصد ماده خشک نمونه از روش (AOAC, 2000a) استفاده شد. نمونه‌ها در ۳ تکرار در دمای ۱۰۲ درجه سانتی‌گراد خشک شده و بعد از روی اختلاف وزن نمونه قبل و بعد از قرار دادن در آون درصد ماده خشک محاسبه گردید.

رابطه (۲)

$$\text{درصد ماده خشک} = \frac{\text{جرم نمونه خشک شده}}{\text{جرم نمونه اولیه}} \times ۱۰۰$$

اندازه‌گیری درصد خلوص

برای اندازه‌گیری درصد خلوص، مقدار قند موجود در رسوب (میزان قند کل محاسبه شده از میزان قند احیای به دست آمده کسر گردید) بر مقدار ماده خشک رسوب تقسیم شد (Paseephol *et al*., 2007).

رابطه (۳)

$$\text{درصد خلوص} = \frac{\text{مقدار قند}}{\text{ماده خشک}} \times ۱۰۰$$

اندازه‌گیری خاکستر کل

برای اندازه‌گیری خاکستر کل از روش (AOAC, 2000b) استفاده شد. نمونه در ۳ تکرار در کوره-الکتریکی با دمای ۵۰۰ درجه سانتی‌گراد سوخته شد و پس از رسیدن به وزن ثابت، درصد خاکستر نمونه از روی وزن اولیه نمونه و وزن خاکستر حاصل محاسبه گردید.

رابطه (۴)

$$\text{درصد خاکستر} = \frac{\text{جرم خاکستر}}{\text{جرم نمونه اولیه}} \times ۱۰۰$$

اندازه‌گیری pH محلول اینولین

برای اندازه‌گیری pH محلول اینولین استخراج شده، ابتدا محلول ۱۰ درصد اینولین در آب تهیه و بعد pH این محلول با استفاده از دستگاه pH متر الکترونیکی اندازه‌گیری شد (Lopez-Molina *et al*., 2005).

آنالیز آماری

طرح در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی در ۳ تکرار انجام پذیرفت. جهت مقایسه میانگین تیمارها از آزمون دانکن در سطح ۹۵ درصد استفاده شد. نرم‌افزار مورد استفاده در این آزمون SAS بود.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از اثر تیمارهای نسبت اتانل به ماده جامد (۲:۱ و ۱۰:۱)، کریستالیزاسیون و رسوب محلول آبی (۲۰- درجه سانتی‌گراد) و اولترافیلتراسیون با قطر غشای ۴ کیلودالتون روی بازده رسوب اینولین، درجه پلیمریزاسیون و خواص فیزیکوشیمیایی ترکیبات حاصل در جدول ۱ و ۲ نشان داده شده است.

جدول ۱- مقایسه بازده رسوب اینولین حاصل از ریشه گیاه کاسنی رقم *ارکیس* به روش‌های مختلف

نوع روش	اینولین (گرم / ۱۰۰گرم غده)
رسوب با آب (۴ درجه سانتی‌گراد)	۵/۳ ± ۰/۴[c]
کریستالیزاسیون با آب و انجماد (۲۰- درجه سانتی‌گراد)	۸/۵ ± ۰/۵[a]
نسبت اتانل به ماده جامد (۲:۱)	۷/۳ ± ۰/۳۵[b]
نسبت اتانل به ماده جامد (۱۰:۱)	۸/۷±۰/۴۵[a]

جدول ۲- بررسی خواص فیزیکوشیمیایی اینولین حاصل از ریشه گیاه کاسنی رقم *ارکیس* به روش‌های مختلف

نوع روش	٪ کربوهیدرات کل	٪ قند احیا	٪ اینولین و اولیگوفروکتوز	درجه پلیمریزاسیون	٪ ماده خشک	٪ خلوص
اتانل/ ماده جامد (۱: ۲)	۸۴/۳۳±۲/۶۲[c]	۱/۲±۰/۰۳[b]	۸۳/۱۶[b]	۶۶[a]	۹۰/۶±۰/۹[a]	۹۱/۳۳ [a]
اتانل/ ماده جامد (۱:۱۰)	۸۹/۳۳± ۱/۲۴ [ab]	۱/۵۸±۰/۰۸[b]	۸۷/۷۳[a]	۵۶[b]	۹۱/۶۶±۰/۴۳ [a]	۹۵/۳۳ [a]
کریستالیزاسیون	۸۸/۶۶±۱/۲۴ [abc]	۱/۷۷±۰/۱۱[b]	۸۶/۸۹[ab]	۵۰[c]	۹۱/۳۳±۰/۴۷ [a]	۹۴/۳۳ [a]
رسوب فاز تراوه UF	۹۰/۷۷±۱/۲۹[a]	۵/۳۱±۰/۵۳[a]	۸۵/۴۶ [ab]	۱۶[d]	۹۱/۳۳±۱/۴ [a]	۹۳[a]
رسوب فاز ناتراوه UF	۸۵/۳۳±۲/۳۰[bc]	۱/۷۱ ±۰/۱[b]	۸۳/۶۱ [ab]	۴۹[c]	۹۱±۱/۵۳[a]	۹۱/۳۳ [a]

جداسازی فراکسیون‌ها با استفاده از اتانل

با توجه به اینکه استفاده از غلظت‌های پایین اتانل باعث رسوب اینولین‌های با طول زنجیره بلندتر می‌شود لذا با بکارگیری نسبت ۲:۱ اتانل به ماده جامد فرایند رسوب بررسی شد. بر اساس نتایج حاصل از جدول ۱ و ۲ مشخص شد که رسوب حاصل نسبت به سایر روش‌های استفاده شده دارای بیشترین درجه پلیمریزاسیون و کمترین درصد قند احیاء بود. با توجه به اینکه قسمت اعظم فروکتان‌های موجود در عصاره تغلیظ شده رسوب نمودند، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که مقدار اینولین با طول زنجیره بلند در عصاره بیشتر می‌باشد. همچنین با افزایش غلظت اتانل بیشترین درصد محتوای فروکتان مشاهده شد. لذا مشخص گردید افزایش غلظت اتانل باعث افزایش بازده رسوب اینولین می‌شود. بر اساس گزارش Saengthongp (۲۰۰۵) نیز مشخص شد که مقدار رسوب حاصل از غلظت‌های بالای اتانل نسبت به غلظت‌های پایین اتانل و آب بیشتر است. غلظت اتانل همچنین روی طول زنجیره اینولین نیز مؤثر است به‌طوری که افزودن حلال به نسبت ۲:۱ باعث تشدید رسوب فروکتان‌های با طول زنجیره بلندتر شده و با افزایش غلظت حلال (نسبت ۱۰:۱) فروکتان‌های با طول زنجیره کوتاه‌تر نیز رسوب می‌یابند. لذا بازده رسوب افزایش می‌یابد (Paseephol *et al*., 2007; Pourfarzad *et al*., 2014). میزان خاکستر نمونه‌های مختلف ناچیز بوده (کمتر از ۰/۲ درصد) و pH حدود ۵-۷ ارزیابی شد. ترکیبات حاصل از روش‌های مختلف بکار برده شده از لحاظ ماده خشک و درصد خلوص اختلاف معنی‌داری نداشتند.

جداسازی فراکسیون‌ها با استفاده از کریستالیزاسیون محلول آبی

حلالیت اینولین در آب به درجه حرارت وابسته است (Lopez-Molina *et al*., 2005)، لذا با توجه به حلالیت کم آن در دمای پایین می‌توان از این روش برای جداسازی اینولین در محلول آبی استفاده کرد. بنابراین با توجه به حلالیت پایین اینولین در دماهای پایین مشخص شد که با انجماد عصاره رنگبری شده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد و سپس رفع انجماد می‌توان اینولین را رسوب داد اما برای افزایش راندمان رسوب باید طول زمان انجماد افزایش یابد. لذا با افزایش زمان انجماد تا ۵ روز بازده رسوب اینولین به این روش با بازده رسوب حاصل از نسبت ۱۰:۱ اتانل به ماده جامد اختلاف معنی‌داری نداشت. همچنین رسوب حاصل از فرایند کریستالیزاسیون از لحاظ محتوای فروکتان و درصد قند احیاء با نسبت‌های

مختلف اتانل اختلاف معنی‌داری نداشت اما درجه پلیمریزاسیون رسوب حاصل در مقایسه با نسبت‌های مختلف اتانل پایین‌تر بود. لازم به ذکر است که در رسوب حاصل از کریستالیزاسیون در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد و سپس رفع انجماد پس‌مزه تلخ مشاهده نگردید در حالی که رسوب حاصل از اتانل دارای پس-مزه تلخ بود که احتمالاً به دلیل رسوب تانن‌ها همراه فروکتان‌ها در غلظت‌های مختلف حلال می‌باشد. همچنین مشخص شد تغلیظ عصاره رنگبری‌شده تا بریکس ۱۵ و استفاده از دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نیز باعث رسوب اینولین می‌شود اما بر اساس نتایج مشخص شد که رسوب حاصل از این روش کیفیت پایینی داشته و بازده رسوب نیز پایین می‌باشد. لذا اینولین حاصل از این روش برای آزمایش‌های بعدی مورد استفاده قرار نگرفت. Paseephol و همکاران (۲۰۰۷) فرایند رسوب اینولین در محلول آبی را در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بررسی نمودند و بر اساس نتایج مشخص شد که بازده استخراج اینولین به این روش پایین می‌باشد.

جداسازی فراکسیون‌ها با استفاده از غشای اولترا-فیلتراسیون

در طی فرایند اولترافیلتراسیون با استفاده از غشای با اندازه منفذ مشخص می‌توان فراکسیون‌های با طول زنجیره مختلف را جدا کرد. به‌طوری که ترکیبات با وزن مولکولی کمتر از اندازه منفذ غشای استفاده شده (۴کیلودالتون) از غشاء عبور کرده و به عنوان فاز تراوه جمع آوری شده و ترکیبات با وزن مولکولی بیشتر از اندازه منفذ غشای استفاده شده به عنوان فاز ناتراوه در بالای غشا باقی می‌مانند (Moerman *et al*., 2004; Saengthongp, 2005; Swennen *et al*., 2005). لذا در این پژوهش با توجه به این که نسبت اینولین‌های زنجیره بلند بیشتر بود برای افزایش راندمان تراوه از غشای ۴ کیلودالتون برای جداسازی استفاده شد. نتایج حاکی از آن بود که رسوب حاصل از تراوه دارای بیشترین درصد کربوهیدرات کل، قند احیاء و کمترین درجه پلیمریزاسیون می‌باشد. رسوب حاصل از ناتراوه از لحاظ محتوای فروکتان و درصد قند احیاء با سایر روش‌ها اختلاف معنی‌داری نداشت و از لحاظ درجه پلیمریزاسیون با رسوب حاصل از کریستالیزاسیون فاقد اختلاف معنی‌داری بود که احتمالاً به دلیل پدیده پلیمریزاسیون غلظت و گرفتگی در سطح غشاء و حضور فروکتان‌های با طول زنجیره کمتر در فاز ناتراوه می‌باشد. در سایر منابع علمی جداسازی فروکتان‌ها بر مبنای طول زنجیره با روش مشابه صورت پذیرفته است. Chandrasekhar و همکاران (۲۰۱۱) با استفاده از غشای اولترافیلتراسیون با قطر غشای ۳ کیلودالتون فروکتان‌های با طول زنجیره کمتر از ۱۸۰۰ دالتون را از عصاره سیر جداسازی کردند.

نتیجه‌گیری

با توجه به تأثیر طول زنجیره اینولین روی خواص پری‌بیوتیکی و تکنولوژیکی آن، در این پژوهش اثر تیمارهای نسبت اتانل به ماده جامد (۲:۱ و ۱۰:۱)، کریستالیزاسیون و رسوب محلول آبی (۲۰- درجه سانتی‌گراد) و اولترافیلتراسیون با قطر غشای ۴ کیلو-دالتون بر بازده استخراج، درجه پلیمریزاسیون و خواص فیزیکوشیمیایی ترکیبات حاصل مورد بررسی قرارگرفت. نتایج حاکی از آن بود که استفاده از روش-های مختلف در فرایند استخراج اینولین بر طول زنجیره اینولین مؤثر می‌باشد. همچنین مشخص شد که غلظت اتانل مورد استفاده بر طول زنجیره اینولین مؤثر است به‌طوری که افزودن نسبت ۲:۱ اتانل به ماده جامد باعث تشدید رسوب فروکتان‌های با طول زنجیره بلندتر شده و با افزایش غلظت حلال (نسبت ۱۰:۱) فروکتان‌های با طول زنجیره کوتاه‌تر نیز رسوب می-یابند. لذا بازده رسوب افزایش نشان می‌دهد. رسوب حاصل از نسبت ۲:۱ اتانل به ماده جامد نسبت به سایر روش‌های استفاده شده دارای بیشترین درجه پلیمریزاسیون و کمترین درصد قند احیاء بوده و رسوب حاصل از فاز تراوه غشای اولترافیلتراسیون دارای بیشترین درصد کربوهیدرات کل، قند احیاء و کمترین درجه پلیمریزاسیون می‌باشد.

منابع

1- Akin, M. B., Akin, M. S. & Kirmaci, Z. 2007. Effects of inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice cream. Food Chemistry, 104: 93-99.

2- AOAC, 2000a. Official methods of analysis. Method 990.20. Determination of solids by direct forced air oven drying method. Washington, DC: AOAC.

3- AOAC, 2000b. Official methods of analysis. Method 945.46. Determination of ash by gravimetric method. Washington, DC: AOAC.

4- Bosscher, D., Van, L.J. & Frank, A. 2006. Inulin and oligofructose as prebiotic in prevention of intestinal infection and diseases. Nutrition Research Reviews, 9: 216-226.

5- Buriti, F. C.A., Inar, A. C. & Saad, S. M.I. 2010. Effects of refrigeration, freezing and replacement of milk fat by inulin and whey protein concentrate on texture profile and sensory acceptance of synbiotic guava mousses. Food Chemistry, 123: 1190–1197.

6- Chandrashekar, P. M., Harish Prashanth, K.V. & Venkatesh, Y.P. 2011. Isolation, structural elucidation and immunomodulatory activity of fructans from aged garlic extract. Phytochemistry, 72: 255–264.

7- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K. & Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. Analytical Chemistry, 28: 350-356.

8- Gibson, G. R., Beatty, E. R., Wang, X. & Cummings, J. H. 1995. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. Gastroenterology, 108**:** 975-982.

9- Lingyun, W., Jianhua, W., Xiaodong, Zh, Da, T. Yalin, Y. Chenggang, C., Tianhua, F. & Fan Zh. 2007. Studies on the extracting technical conditions of inulin from Jerusalem artichoke tubers. Journal of Food Engineering, 79: 1087–1093.

10- Lopez-Molina, D., Navarro-Martinez, M.D., Rojas-Melgarejo, F., Hiner, A.N.P., Chazarra, S. & Rodriguez-Lopez, J.N. 2005. Molecular properties and prebiotic effect of inulin obtained from artichoke (*Cynara scolymus L.*). Photochemistry, 66: 1476-1488.

11- Meyer, D., Vermulst, J., Tromp, R. H., & de Hoog, E. H. A. 2011. The effect of inulin on tribology and sensory profiles of skimmed milk. Journal of Texture Studies, 42: 387-393.

12- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry, 31: 426-428.

13- Moerman, F. T., Vanleeuwen, M. B. & Delcoyr, J. A. 2004. Enrichment of higher molecular weight fractions in inulin. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 52: 3780-3783.

14- Muir, J. G., Shepherd, S. J., Rosella, O., Rose, R., Barrett, J. S. & Gibson, P. R. 2007. Fructan and free fructose content of common Australian vegetables and fruit. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55: 6619-6627.

15- Paseephol, T., Small, D. & Sherkat, F. 2007. Process optimization for fractionating *Jerusalem artichoke* fructans with ethanol using response surface methodology. Food Chemistry, 104: 73-80.

16- Pourfarzad, A., Habibi Najafi, M. B., Haddad Khodaparast, M.H. & Hassanzadeh Khayyat, M. 2014. Characterization of fructan extracted from *Eremurus spectabilis* tubers: a comparative study on different technical conditions. Journal of Food Science and Technology, 33: 10-20.

17- Roberfroid, M. B. 2002. Functional foods: concepts and application to inulin and oligofructose. British Journal of Nutrition, 87: 139-144.

18- Roberfroid, M.B. 2007. Inulin-type fructans: functional food ingredients. Journal of Nutrition, 137: 2493–2502.

19- Saengthongp, W. 2005. Influence of harvest time and storage temperayure on charactrestics of inulin from *Jerusalem artichoke* and physicochemical properties of inulin – starch mixed gel. A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for the degree of doctor of philosophy (food science) graduate school, Kasetsart University.

20- Swennen, K., Christophe, M., Courtin, B.B., Vandecasteele, C. & Delcour .J A .2005. Ultrafiltration and ethanol precipitation for isolation of arabinoxy looligosaccharides with different structures. Carbohydrate Polymers, 62: 283–292.

21-Trrega, A. & Costell, E. 2006. Effect of inulin addition on rheological and sensory properties of fat-free starch-based dairy desserts. International Dairy Journal, 16: 1104-1112.

22- Trrega, A., Rocafull, A. & Costell, E. 2010. Effect of blends of short and long-chain inulin on the rheological and sensory properties of prebiotic low-fat custards. Journal of Food Science and Technology, 43: 556–562.

23-Trrega, A., Torres, J.D. & Costell, E. 2011. Influence of the chain-length distribution of inulin on the rheology and microstructure of prebiotic dairy desserts. Journal of Food Engineering, 104: 356–363.

24-Tungland, B. & Meyer, D. 2002. Non digestible and polysaccharides (dietary fiber): their physiology and role in human health and food. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 1: 73-77.

Methods of isolating and physiochemical properties of inulin ractions with different chain lenghts from chicory plants

Pegah Darjani [1], Marzieh Hosseini Nezhad [2], Rassoul Kadkhodaee [3], Elnaz Milani[4], Ahmad Balandari[2]

1- PhD. Student, Department of Food Processing, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran
*Corresponding author (pegahdargany@yahoo.com)
2- Assistant Professor, Department of Food Biotechnology, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran
3- Associate Professor, Department of Food Nanotechnology, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran
4- Assistant Professor, Department of Food Processing, Iranian Academic Center for Education Culture and Research (ACECR), Mashhad, Iran

Abstract

Native inulin extracted from chicory root consists of chains of fructose units by β (2→1) bonds with different degrees of polymerization. Inulin composition and its functional properties depends on genetic characteristics, growth environmental conditions, harvesting time, as well as the method of extraction the processes applied after extraction. "Short-chain" inulin, is more soluble and sweeter, so it can be used as sugar replacer, while "long-chain" inulin, commonly used as a fat substitute, is less soluble, more viscous and thermally stable. In this research, for isolating different structural fractions of inulin, root of chicory strain of *Orchies* was used. The Effect of different treatments including ethanol solvent to syrup ratio (2:1 and 10:1), crystallization and precipitation of aqueous solution in -20°C, and ultrafiltration using 4 kilo-dalton UF cut off on the degree of polymerization, yield of extraction and physicochemical properties of the compounds were compared. The results showed that ethanol with higher concentration resulted in more precipitation of inulin. Inulin participated by 2:1 E/S ratio had the highest degree of polymerization (66) and the least reduced sugar (1.2%) compared to those from other methods of fractionation. Inulin participated by ultrafiltration of permeate fraction had the lowest degree of polymerization (16) and highest reduced sugar (5.31%) compared to those from other methods of fractionation.

Keywords: Crystallization, Ethanol, Inulin, Oligofructose, Ultrafiltration