

## **Obtención de fructanos a partir de fuentes vegetales No convencionales**

Víctor Rodríguez, Idalia Osuna, Enrique Romo y Claudia Amezcua

V.Rodríguez, I.Osuna, E.Romo y C.Amezcua  
Universidad Politécnica de Sinaloa, Carretera Municipal libre Mazatlán Higuera Km 3, 82199 Mazatlán, Sinaloa  
camezcua@upsin.edu.mx

M. Ramos.,V.Aguilera.,(eds.) Ciencias Agropecuarias, Handbook -©ECORFAN- Valle de Santiago, Guanajuato, 2013.

## Abstract

Today there is the need to find alternatives for obtaining oligofructosaccharides (FOS), because, these compounds are widely used as low-energy substitutes and non- carcinogenics in the food industry. The main sources of obtaining FOS are *Helianthus tuberosu*, *Cichorium intybus*, *Tequilana weber*, however, there may be other vegetables alternatives for their obtaining less conventional such as *E. crassipes*. The objective of this work was to determinate optimum conditions of fructans extraction process from *E. crassipes*, which was used in phytoremediation of effluents from aquaculture previously. This project provides an alternative to use of this plant species abundant.

## 10 Introducción

Actualmente la industria alimentaria demanda grandes cantidades de oligofructosacáridos, oligofructanos, glucofructanos, inulina, oligosacáridos resistentes o simplemente FOS debido a su importancia desde el punto de vista nutricional y salud (Lajolo, 2006).

Estos compuestos se emplean como sustitutos hipocalóricos no carcinogénicos en una diversidad de alimentos tales como, confitería, chocolatería, bebidas, heladería, embutidos y otros derivados lácteos (Chacón-Villalobos, 2006). Las principales fuentes de inulina conocidas en el mundo son a partir de alcachofa de Jerusalén (*Helianthus tuberosus*) y de raíz de achicoria (*Cichorium intybus*).

También se han identificado otras fuentes vegetales con fructanos similares a la inulina y que pueden brindar características funcionales similares, entre estas se encuentra el agave azul *Tequilana weber* (Salazar *et al.*, 2010; Mancilla *et al.*, 2006; López *et al.*, 2003; Arrazola, 1969). Estudios preliminares recientes realizados por Rodríguez, *et al.*, 2010 (comunicación personal) determinaron la presencia de fructanos a partir de fuentes vegetales poco convencionales, tal es el caso de *Eicchornia crassipes* (lirio de agua). *E. crassipes* es una planta flotante de hojas gruesas, considerada como una especie invasiva que provoca daños en ríos, lagos, lagunas, estanques y canales, a pesar de ello, ha captado la atención por su alta capacidad de remover nutrientes en agua (Sánchez., *et al.*, 2011; Sipaúba-Talavares, *et al*, 2002, Stratford *et al.*, 1984; Ingole *et al.*, 2003; Mohanty *et al.*, 2006; Xia *et al.*, 2006). Es por eso la importancia de realizar estudios ha cerca de esta especie vegetal ya que hasta el momento no existen reportes en los que se le destine como fuente de biomoléculas de interés comercial, como son los fructanos.

En este proyecto se planteo la obtención de fructanos a partir de *E. crassipes* especie vegetal la cual fue previamente utilizada en fitoremediación de efluentes provenientes de granjas acuícolas.

### 10.1 Métodos

El proyecto se desarrolló en dos etapas principales:

Etapa 1. Obtención del material vegetal. La meta de esta etapa fue contar con material vegetal de *E. crassipes* utilizada previamente en fitoremediación de efluentes provenientes de granjas acuícolas.

Etapa 2. Optimización del proceso de extracción de fructanos. La meta de esta etapa fue contar con las condiciones óptimas del proceso de extracción de fructanos a partir de *E. crassipes*.

## 10.2 Resultados y discusión

Etapa 1. Obtención del Material vegetal

En la tabla 10 se muestran los resultados de la caracterización físico-química y microbiológica del efluente tratado por *E. crassipes*.

**Tabla 10** Resultados de la caracterización del efluente de estudio

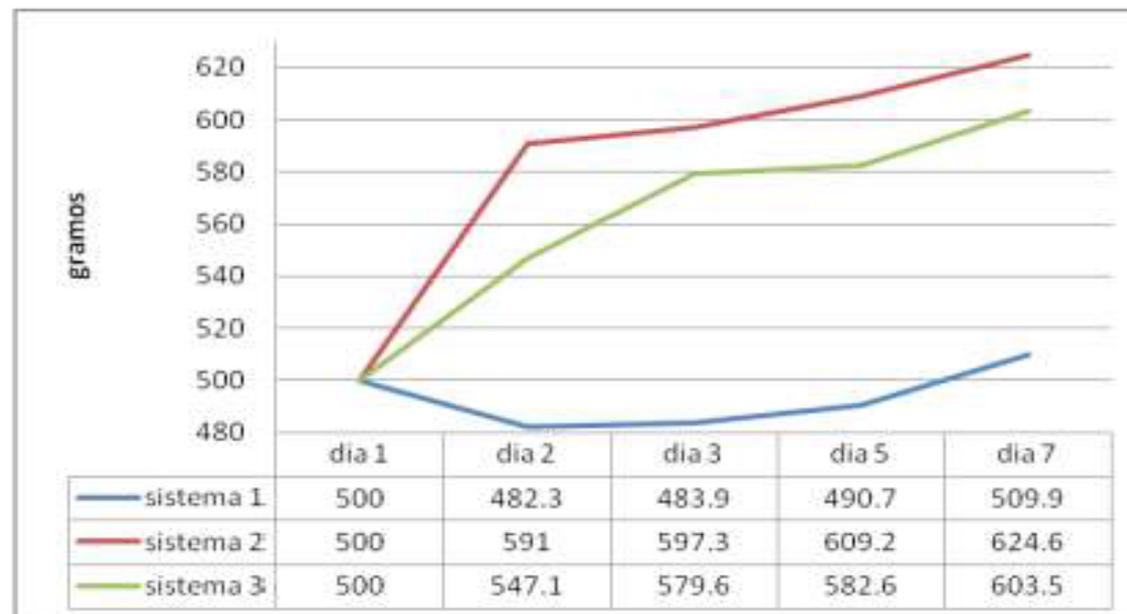
| Parámetro             | Valor (promedio) |
|-----------------------|------------------|
| pH                    | 8.5              |
| Temperatura           | 30°C             |
| Conductividad         | 0.59 mS/m        |
| Turbidez              | >1 Abs           |
| Sólidos sedimentables | 2 ml/L           |
| N-NO <sub>2</sub>     | 2.5 mg/L         |
| Coliformes totales    | 23 NMP/100mL     |
| Coliformes fecales    | No detectables   |

El efluente tuvo un pH alcalino, valor que se encuentra dentro del rango normal de efluentes provenientes de actividades acuícolas, una alta turbidez debido a la presencia de sólidos suspendidos y microalgas, una concentración alta de N-NO<sub>2</sub>. Ramírez-Carillo, *et al.*, (2009) reportaron que esto pudiera ser debido a que no existen condiciones favorables para su rápido recambio a N-NO<sub>3</sub> por una baja concentración de oxígeno molecular libre o baja presencia de bacterias nitrificantes. El análisis microbiológico determinó presencia de coliformes y ausencia de coliformes fecales.

## 10.3 Evaluación del efecto de las aguas residuales provenientes de granjas acuícolas sobre el crecimiento de *E. crassipes*

A un sistema de 40L le fueron colocados 500g de material vegetal para evaluar el efecto de las aguas residuales sobre el crecimiento y aspecto físico de las plantas con un recambio cada 72 y 144 h de agua residual por triplicado. En la figura 1 se presentan los resultados del crecimiento de las plantas durante 7 d.

**Gráfica 10** Cultivo de *E. crassipes* en; Sistema 1. Medio sintético con un recambio cada 72 h. Sistema 2. Efluente con un recambio cada 72 h. Sistema 3 Efluente con un recambio cada 144 h.



Se observa un crecimiento de las plantas en los sistemas 2 y 3 que corresponden al cultivo de *E. crassipes* en el efluente. Se obtuvo un aumento en el peso del 20.6% y 24.9% en los sistemas 2 y 3 respectivamente en 7 d.

El crecimiento en el medio sintético (sistema 1) solamente represento el 1.98%. El aspecto de las plantas cultivadas en el efluente (datos no presentados) fue de vigor, mientras que en el medio sintético hubo cierta marchitez de las hojas. Resultados semejantes han sido reportados por Allinson, *et al.*, (2009) donde *E. crassipes* puede ser cultivada satisfactoriamente en efluentes industriales con un pH 9 y un alto contenido de N.

#### 10.4 Remoción de nutrientes del efluente mediante *E. crassipes*

pH. El pH fue determinado durante 10 d. Los resultados muestran que la presencia de *E. crassipes* favorece la disminución de pH alcanzando un valor promedio de 7. Dicho valor cumple con valores normativos mexicanos permitido para aguas tratadas que es de 6.5-8.5.

Temperatura. La temperatura se mantuvo en un rango entre 29 y 32.3 °C.

Conductividad. Los resultados presentan que la conductividad oscila en un rango de 0.53-0.66 mS/m valores permitidos dentro de la normatividad de aguas residuales tratadas.

Turbidez. La turbidez del efluente fue disminuído el 100% en presencia de *E. crassipes* al cabo de 10 d. Ampliamente ha sido reportado que esta especie vegetal presenta una alta capacidad de remover nutrientes del agua mejorando considerablemente la calidad de esta (Sánchez, *et al.*, 2011; Sipaúba-Talavares, *et al.*, 2002). Existen investigaciones relacionadas con el aprovechamiento de *E. crassipes* como especie aplicada a la fitoremediación de aguas contaminadas con metales pesados y compuestos químicos (Stratford *et al.*, 1984; Ingole *et al.*, 2003; Mohanty *et al.*, 2006; Xia *et al.*, 2006), Fang, *et al.*, (2007) reportaron la aplicación de *E. crassipes* en fitoremediación de aguas eutrofizadas.

**N-NO<sub>2</sub>.** La concentración N-NO<sub>2</sub> iniciales del efluente disminuyeron considerablemente a valores por debajo de 0.036 mg/L, esto es pudiera ser debido a la dinámica que impuso la presencia de *E. crassipes* en el sistema.

Coliformes totales y fecales. Los resultados presentaron que el sistema con *E. crassipes* hubo una disminución de la presencia de Coliformes totales (< 2 NMP/100mL) y ausencia de Coliformes fecales. Esto pudiera ser debido a los cambios nutricionales y ambientales impuestos por la presencia de *E. crassipes*.

#### Etapa 2. Optimización del proceso de extracción de fructanos.

Cuantificación de fructanos. Los fructanos fueron cuantificados utilizando el kit de Megazyme para fructanos (Megazyme fructan assay kit), de acuerdo a los métodos 999.03 de la AOAC y 32-32.01 de la AACC; para la medición específica de fructanos en extractos de planta y productos alimenticios que contienen almidón, sacarosa y otros azúcares.

Diseño Box-Behnken de superficie de respuesta. Para la optimización del proceso de extracción de fructanos de *E. crassipes* se utilizó un diseño factorial tipo Box-Behnken 3<sup>3</sup> con 15 corridas experimentales. Los tres factores de estudio se presentan en la tabla 2, los cuales fueron; temperatura (°C); tiempo de extracción (min) y la relación líquido-sólido (mL/g)

**Tabla 10.1** Factores estudiados y sus niveles

| Factores             | Niveles |    |     |
|----------------------|---------|----|-----|
|                      | -1      | 0  | 1   |
| <b>A:</b> T (°C)     | 60      | 75 | 90  |
| <b>B:</b> t (min)    | 30      | 75 | 120 |
| <b>C:</b> RLS (ml/g) | 4       | 5  | 6   |

La metodología de superficie de respuesta (MSR) es una colección de técnicas estadísticas y matemáticas útiles para el desarrollo, mejora y optimización de procesos. La aplicación más amplia de la MSR es en el ámbito industrial, particularmente en situaciones donde algunas variables de entrada influyen potencialmente algunos aspectos de las características de un proceso o producto (Myers, Montgomery, & Anderson-Cook, 2009). Tomando en cuenta los factores y los niveles mostrados en la tabla 2, el software estadístico STATGRAPHICS Centurion XV ©StatPoint Inc., 1982-2007, propuso 15 experimentos donde se combinaron los factores estudiados a diferentes niveles (Box, Huter, & Hunter, 2008). En la tabla 10.1 se observan las 15 combinaciones de experimentos con los resultados de extracción de fructanos; en donde se puede observar que los valores de extracción fueron desde 52.27 hasta 257.09 mg/L. El valor máximo de extracción se encontró en el experimento 14 a una temperatura de 75°C, tiempo de 75 minutos y RLS de 5 ml/g. Al aplicarse el análisis de regresión sobre los datos experimentales, la variable respuesta y los factores estudiados se obtuvo la siguiente ecuación (1).

$$\text{Fructanos (mg/l)} = -4035.07 + 48.1789*T + 10.8934*t + 848.541*RSL - 0.227811*T^2 - 0.0298301*T*t - 2.6047*T*RSL - 0.0577764*t^2 - 65.2588*RSL^2 \quad (10)$$

En la tabla 10.2 se muestra un resumen del análisis de varianza (ANOVA) aplicado sobre el modelo estadístico. El coeficiente de determinación  $R^2$  fue de 89.04 lo que indica que el modelo ajustado explica el 89.04% del comportamiento de la variable respuesta. El coeficiente de determinación ajustado ( $R^2$  adj) fue de 74.42%, lo cual indica un buen grado de correlación entre los valores observados experimentalmente y los calculados por el software. De acuerdo al ANOVA, los factores A, B y C fueron estadísticamente significativos ( $P < 0.05$ ) con respecto al porcentaje de extracción de fructanos y se observó una interacción significativa entre los factores AA, BB y CC (Tabla 4). Lo anterior indica que los factores que afectan de manera significativa el porcentaje de extracción de fructanos son la temperatura, el tiempo de extracción y la RLS.

**Tabla 10.2** Matriz del diseño Box-Behnken y respuesta experimental de la variable dependiente

| Experimento | Temperatura (°C) | Tiempo (min) | RLS (ml/g) | Fructanos (mg/l) |
|-------------|------------------|--------------|------------|------------------|
| 1           | 75               | 75           | 5          | 254,45           |
| 2           | 60               | 120          | 5          | 83,21            |
| 3           | 90               | 120          | 5          | 69,34            |
| 4           | 75               | 120          | 6          | 80,01            |
| 5           | 60               | 30           | 5          | 65,07            |
| 6           | 90               | 30           | 5          | 131,75           |
| 7           | 75               | 75           | 5          | 255,25           |
| 8           | 75               | 30           | 4          | 74,14            |
| 9           | 75               | 120          | 4          | 86,94            |
| 10          | 90               | 75           | 4          | 118,95           |
| 11          | 75               | 30           | 6          | 52,27            |
| 12          | 60               | 75           | 6          | 237,36           |
| 13          | 90               | 75           | 6          | 57,61            |
| 14          | 75               | 75           | 5          | 257,09           |
| 15          | 60               | 75           | 4          | 142,41           |

**Tabla 10.3** Análisis de varianza del modelo polinomial para la variable dependiente

| Fuente        | Valor-P |
|---------------|---------|
| A:Temperatura | 0,2328  |
| B:Tiempo      | 0,9748  |
| C:RSL         | 0,9676  |
| AA            | 0,0493  |
| AB            | 0,3538  |
| AC            | 0,0991  |
| BB            | 0,0014  |
| CC            | 0,0204  |

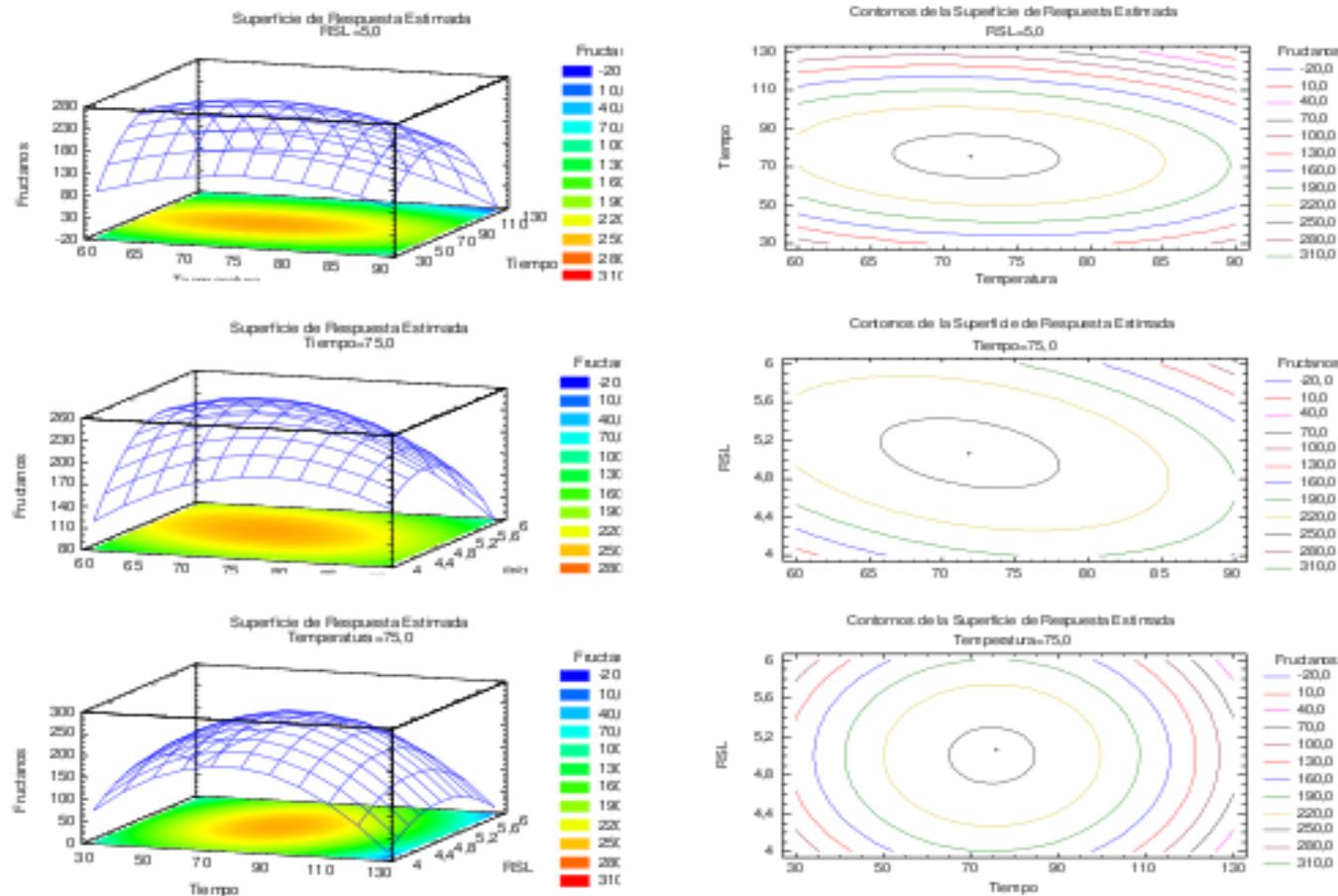
Lingyun *et al.*, (2007) realizaron un estudio para encontrar el punto óptimo de extracción de inulina en alcachofas de Jerusalén (*Heliantus tuberosus*) por medio de un análisis de superficie de respuesta, encontrando que los factores que influyeron significativamente en el porcentaje de extracción de inulina fueron la temperatura del agua de extracción y la relación agua-sólido.

Cai *et al.*, (2008) encontraron que la temperatura del agua de extracción, relación agua sólido y el tiempo de extracción afectaron el porcentaje de extracción de polisacáridos de nopal (*Opuntia milpa alta*). Xulie *et al.*, (2007) encontraron que la temperatura del agua para la extracción, la relación agua sólido, el tiempo de extracción y el tamaño de partícula tienen influencia en el porcentaje de extracción de polisacáridos a partir de un hongo comestible (*BaChu mushroom*). A partir de la ecuación 1, se generaron las gráficas de superficie de respuesta relacionando la extracción de fructanos en función de la temperatura, tiempo de extracción y relación líquido-sólido.

En la figura 10 (a) se observa el efecto de la temperatura y el tiempo sobre la cantidad de extracción de fructanos a una RSL fija. En este caso se aprecia que el porcentaje de extracción máximo es cercano al punto central del gráfico con respecto a la temperatura. Este mismo comportamiento se observa en la figura 10 (b), que relaciona el efecto de la temperatura y la RSL de extracción a un tiempo fijo. Lo anterior refleja que a temperaturas cercanas a los 90°C la extracción de fructanos se ve afectada, esto debido posiblemente a la hidrólisis de los fructanos provenientes del Jacinto de agua (*Eicchornia crassipes*). La figura 10 (c) muestra el efecto de la relación tiempo y RSL sobre el porcentaje de extracción a una temperatura fija. En este caso se observa claramente el efecto del tiempo sobre el porcentaje de extracción, apreciándose que a tiempos mayores a 90 minutos la cantidad de extracción de fructanos disminuye. La forma general de los tres gráficos indica que los tres factores estudiados tienen un efecto en el porcentaje de extracción de fructanos, siendo los más influyentes la temperatura, el tiempo de extracción y la relación agua sólido respectivamente.

De acuerdo al software estadístico, los valores óptimos de los diferentes factores que influyen en el porcentaje de extracción de fructanos se muestran en la tabla 5. Con la finalidad de validar el análisis de superficie de respuesta, se llevó a cabo la obtención del extracto líquido de fructanos con las condiciones óptimas antes mencionadas y la cantidad de fructanos obtenidos fue de  $246.34 \pm 12.81$  mg/l ( $n = 3$ ). El valor obtenido fue cercano al valor teórico predicho, lo que indica que el modelo utilizado fue adecuado para explicar los datos experimentales con respecto a los valores teóricos. Resulta difícil comparar las cantidades de extracción de fructanos (como polisacáridos) obtenidos en este estudio con respecto a lo reportado por otros autores, (Xulie *et al.*, 2007; Cai *et al.*, Ying *et al.*, 2008), debido a que el material utilizado para realizar la extracción de polisacáridos es un extracto semi-purificado, mientras que en esta investigación la extracción se llevó a cabo directamente sobre la materia prima sin que esta sufriera modificación alguna, esto con la finalidad de obtener información que pudiera ser aplicada directamente como una oportunidad de aprovechamiento industrial de *E. crassipes*, donde generalmente el proceso de extracción de polisacáridos inicia con una extracción sólido-líquido, obteniéndose un extracto líquido sobre el cual se realizan operaciones de separación hasta llegar al producto final.

**Figura 10** Superficie de respuesta resultantes del modelo polinomial correspondiente a la variable dependiente (a) temperatura vs. Tiempo; (b) temperatura vs. RSL; (c) tiempo vs. RSL.



**Tabla 10.4** Valores óptimos obtenidos con el análisis de superficie de respuesta para la extracción de fructanos de *E. crassipes*.

| Factor                     | Niveles |      | Óptimo |
|----------------------------|---------|------|--------|
|                            | Bajo    | Alto |        |
| Temperatura (°C)           | 60      | 90   | 71.81  |
| Tiempo (min)               | 30      | 120  | 75.73  |
| RSL (ml/g)                 | 4       | 6    | 5.07   |
| Valor óptimo = 257.61 mg/l |         |      |        |

Con respecto a los estudios antes mencionados, Xulie *et al.*, (2007) determinaron las condiciones óptimas de extracción de polisacáridos del hongo *BaChu mushroom*, obteniendo un porcentaje de extracción del 8.73%, a una temperatura de 94°C, RSL de 6 y un tiempo de extracción de 10 horas. Cai *et al.*, (2008) extrajeron polisacáridos de nopal (*Opuntia milpa alta*), encontrando a través de un diseño de superficie de respuesta que el máximo porcentaje de extracción de polisacáridos fue del 0.694% a una temperatura de 86.1°C, RSL de 3.72 y tiempo de extracción de 3.61. Ying *et al.* (2008) optimizaron la extracción de polisacáridos de *Lycium barbarum*, obteniendo un porcentaje de 22.56% a una temperatura de 100°C, RSL de 31.2 y tiempo de 5.5 h. Arango-Bedoya *et al.*, (2011) reportaron la extracción de inulina a partir de Yacón (*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl) con un rendimiento óptimo de 20.7% bajo condiciones de extracción de 23 min a 82.2 °C y relación solvente-materia prima de 4.5 l/500 g (9 ml/g).

Jing-en *et al.*, (2011), encontraron valores óptimos para la extracción de polisacáridos de 86.9°C para la temperatura, 4.1 h para el tiempo y una relación agua-sólido de 17.7:1 para un rendimiento de 37.84%.

Song *et al.*, (2012) estudiaron la extracción de carbohidratos de Ginkgo (*Ginkgo biloba*) encontrando que los valores óptimos para los factores fue de RSL de 4, temperatura de 95°C y un tiempo de extracción de 120 min. Dianhui (2012), realizó el estudio de la optimización en la extracción de polisacáridos de *Dioscorea nipponica* Makino obteniendo las condiciones óptimas de 95°C, 134 min RSL de 33:1, para una extracción de 3.82%. En el caso de *Pomegranate peel*, Caiping y Xiaolin (2013) obtuvieron que las condiciones óptimas para tener una extracción del 10.358% de polisacáridos fue 98°C, RSL 37 ml/g y 1.9 h de extracción.

## 10.5 Conclusiones

El uso de aguas residuales provenientes de plantas acuícolas resultaron adecuadas para para el crecimiento *E. crassipes*.

Los factores que afectan significativamente ( $P < 0.05$ ) la extracción de fructanos a partir de *E. crassipes* fueron la temperatura, el tiempo y la relación líquido-sólido.

Los valores óptimos para la extracción de fructanos a partir de *Eichhornia crassipes* fueron: temperatura de extracción 71.81°C, tiempo de extracción 75.72 minutos y una relación líquido-sólido de 5.07 ml/g; obteniéndose con lo anterior un valor teórico de extracción de 257.61 mg/L de fructanos.

## 10.6 Referencias

- Arang, O; Cuarán, G & Fajardo, J. (2008). Extracción, cristalización y caracterización de inulina a partir de Yacón (*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl) para su utilización en la industria alimentaria y farmacéutica. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 6(2): 14-20
- Arrazola, D F. (1969). Estudio del Contenido de Azúcares en la piña del agave tequilana. Tesis de licenciatura. Facultad de Química Universidad Autónoma de Puebla. México, p. 4, 5.
- Box G; Hunter, J & Hunter, W. (2008). Estadística para Investigadores. Reverté. México.
- Cai, W, Gu, X. & Tang, J. (2008). Extraction, purification and characterization of the polysaccharides from *Opuntia milpa alta*. *Carbohydrate polymers*, 71: 403-410.
- Chacón-Villalobos A. (2006). Perspectivas agroindustriales actuales de los oligofruetosacáridos (FOS). *Agronomía Mesoamericana* 17(2): 265-286.
- Fang, Y Y., Yang, X E., Qing, CH., Min P P, Feng, DH, & Rengel, Z. (2007). Phytoremediation of nitrogen polluted water using water hyacinth. *Journal of Plant Nutrition*.30:1765-1770.
- Jing-En, L; Shao-Ping, Y, Zeng-hui Q & Ming-yong X. (2011). Extraction optimization, characterization and bioactivity of crude polysaccharides from Herba Moslae. *Carbohydrate Polymers*. 83 (3): 1201-1206.

Lajolo F. (2006). Carbohidratos en alimentos regionales iberoamericanos. EdUSP. 200-204.

Lingyun, W.; Jianhua, W.; Xiaodong, Z.; Da, T.; Yalin, Y.; Chenggang, C.; Tianhua, F. & Fan, Z. (2007). Studies on the extracting technical conditions of inulin from jerusalem artichoke tubers. *Journal of Food Engineering*. 79: 1087-1093.

López, M. G., Mancilla-Margall, N. A. & Mendoza-Díaz, G. (2003). Molecular structures of fructans from agave Tequilana weber var. azul. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 51:7835-7840.

Luo, D. (2012). Optimization of total polysaccharide extraction from *Dioscorea nipponica* Makino using response surface methodology and uniform design. *Carbohydrate Polymers*. 90 (1): 284-288.

Mancilla-Margall, N. A. & López, M. G. (2006). Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from agave and daisyliion species. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 54:7832-7839.

Myers, R; Montgomery, D; & Anderson-Cook, C. (2009). Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments. John Wiley & Sons. USA

Salazar-Leyva J. A., Zazueta-Patrón I. E., Brito-Rojas H. D., Osuna-Ruiz I., Rodríguez- Tirado V. A., Regalado-Rivera R. & Lízarraga-Vidal V. M. (2010). Obtención de Fructanos de Agave *Tequilana weber cv. azul* Cultivado en el Estado de Sinaloa. Memorias. VII Congreso del Noroeste y III Nacional de Ciencias Alimentarias y Biotecnología. Hermosillo Son., 8 -13 de Noviembre.

Sánchez, R. R., Beltrán, O. S. P., Araiza, L. N., Rodríguez-Tirado V.A., & Amézcua-Vega. C. (2011). Estudio de *E. crassipes* sobre efluentes provenientes de granjas acuícolas. Memorias. XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Querétaro., 19-24 de Junio.

Sipaúba-Talavares L. H, Fávero, E. G. P. & Braga, F. M. S. (2002). Utilization of macrophytebiofilter in effluent Fromm aquaculture: I. Floating plant. *Brazilia Journal Biology*. 62(4A) 713-723.

Song, L; Mei, A; Hu, Y; Zhang, J & Chai, X. (2012). Response surface optimized extraction of carbohydrate compound from Folium Ginkgo and its bioactivity. *Carbohydrate Polymers*. 88(1): 112-117.

Xujie, H & Wei, C. (2007). Optimization of extraction process of crude polysaccharides from wild edible *BaChu mushroom* by response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, 72: 67-74.

Yin, G. & Dang, Y. (2008). Optimization of extraction technology of the *Lycium barbarum* polysaccharides by Box-Behnken statistical design. *Carbohydrate Polymers*. 74: 603-610.

Zhu, C; & Liu, X. (2013). Optimization of extraction process of crude polysaccharides from *Pomegranate peel* by response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*. 92(2): 1197-1202.