بررسی تاثیر به‌کارگیری همی سلولاز در روش استخراج رفلاکس حرارتی و اولتراسوند بر راندمان استخراج گلیسیریزیک اسید از ریشه شیرین‌بیان

الهام گیاهی[a]، جواد کرامت[b]، مهشید جهادی[c]*

[a] عضو باشگاه پژوهشگران جوان، دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

[b] دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

[c] استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۱۰/۲۷ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۴/۱۹

چکیده

مقدمه: اخیرا روش‌های استخراج به کمک آنزیم برای استخراج مواد زیست فعال گیاهی گزارش شده است. در این پژوهش هدف بررسی تاثیر آنزیم همی‌سلولاز بر راندمان عصاره استخراجی و استخراج گلیسیریزیک‌اسید از ریشه شیرین‌بیان توسط دو روش استخراج رفلاکس حرارتی و اولتراسوند می‌باشد.

مواد و روش‌ها: پس از آماده‌سازی ریشه شیرین‌بیان مرحله پیش‌تیمار آنزیمی، توسط آنزیم همی‌سلولاز در غلظت‌های مختلف (۰/۲، ۱، ۲، ۳ درصد) به مدت ۱ ساعت درون حمام آب در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد، صورت گرفت. عصاره به دو روش رفلاکس حرارتی و استخراج به کمک امواج اولتراسوند (۲۰ دقیقه در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد با فرکانس ۴۰ کیلوهرتز) استخراج و سپس سانتریفیوژ، تغلیظ و در آون خشک گردید. بازدهی استخراج عصاره محاسبه و میزان گلیسیریزیک‌اسید به روش HPLC اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: با افزایش غلظت آنزیم همی‌سلولاز بازدهی استخراج عصاره به طور معنی‌داری افزایش یافت، به طوریکه استخراج عصاره از ریشه گیاه شیرین‌بیان پیش‌تیمار آنزیمی شده با آنزیم همی‌سلولاز در هر دو روش استخراج، در غلظت ۳ درصد موجب دستیابی به بیشترین بازدهی استخراج شد ($p<۰/۰۵$). میان نمونه‌های شاهد و نمونه‌های پیش‌تیمار آنزیمی شده با آنزیم همی سلولاز در غلظت ۳ درصد در روش استخراج به شیوه رفلاکس و استفاده از اولتراسونیک اختلاف آماری معنی‌داری وجود داشت ($p<۰/۰۵$). بیشترین میزان گلیسیریزیک اسید استخراج شده از۱۰۰ گرم ریشه شیرین‌بیان پیش‌تیمار شده با آنزیم همی‌سلولاز، توسط غلظت ۰/۲ درصد آنزیم به روش استخراج رفلاکس به‌دست‌آمد که با نمونه شاهد اختلاف معنی‌دار داشت و با افزایش غلظت آنزیم (به ۲ و ۳ درصد) میزان گلیسیریزیک‌اسید استخراج شده از۱۰۰ گرم ریشه شیرین‌بیان نسبت به نمونه‌های شاهد تا حدودی کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: پیش‌تیمار آنزیمی ریشه گیاه شیرین‌بیان توسط آنزیم همی‌سلولاز در روش‌های استخراج رفلاکس حرارتی و استخراج به کمک اولتراسونیک، برای افزایش راندمان استخراج عصاره و گلیسیریزیک‌اسید از ریشه گیاه شیرین‌بیان روشی موثر می‌باشد و آنزیم‌ها با توانایی تخریب دیواره سلولی بافت گیاهی، موجب تسهیل آزادسازی مواد داخل سلولی می‌گردند.

واژه‌های کلیدی: *اولتراسونیک، رفلاکس، شیرین‌بیان، همی‌سلولاز*

* نویسنده مسئول مکاتبات email: mahshidjahadi@yahoo.com

مقدمه

شیرین‌بیان گیاهی علفی، پایا، از خانواده بقولات و تیره پروانه‌واران با نام علمی *گلیسیریزا گلابرا* (*Glycyrrhiza glabra*) می‌باشد (امیدبیگی، ۱۳۷۹). شیرین‌بیان به طور وسیعی در صنعت دخانیات، داروسازی و مواد غذایی کاربرد دارد. قسمت های مهم و تجاری گیاه، ریشه و ساقه‌های زیرزمینی در هم پیچیده است (Fenwick *et al*., 1990). ماده فعال اصلی آن گلیسیریزیک اسید یا گلیسیریزین، به عنوان شیرین کننده مجاز با کالری‌زایی پایین و تشدیدکننده طعم می‌باشد. از دو واحد گلوکورونیک اسید و یک مولکول اسید گلیسیرتینیک (گلیسیرتیک اسید، آگلیکون، انوکسولون) که مسئول خواص دارویی شیرین بیان است، تشکیل شده است (Baek *et al*., 2008). میزان شیرینی آن ۵۰ تا ۱۰۰ برابر ساکارز می‌باشد (داعی پاریزی و همکاران، ۱۳۸۹). سایر ترکیبات ریشه شامل گلوکز، ساکارز، فلاوونوئیدها، ایزوفلاوونوئیدها، کالکون‌ها، کومارین، تری ترپنوئیدها، استرول‌ها، نشاسته، سلولز، لیگنین، اسیدهای آمینه، صمغ‌ها و روغن‌های فرار است (Fenwick *et al*., 1990; Charpe & Rathod, 2012)

روش‌های مختلفی برای استخراج گلیسیریزیک اسید از ریشه شیرین بیان به کار برده شده است که شامل استخراج با سوکسله، استخراج در دمای اتاق، استخراج غیر مداوم، استخراج با آب داغ تحت فشار، استخراج با حلال، استخراج به کمک مایکروویو و استخراج به کمک امواج اولتراسوند است (Baek *et al*., 2008; Pan *et al*., 2000). روش‌های استخراج سنتی و روش استخراج با حلال برای استخراج گلیسیریزیک اسید از شیرین بیان دارای معایبی از جمله مصرف حلال زیاد، زمان استخراج طولانی، بازده کمتر و دمای استخراج بالاتر هستند. بنابراین روشی موثرتر برای استخراج نیاز می‌باشد (Charpe & Rathod, 2012). اخیرا روش‌های استخراج به کمک آنزیم برای استخراج مواد بیواکتیو گیاهان گزارش شده است. به عنوان مثال استخراج وانیلین از غلاف سبز وانیل، فنل‌ها، طعم دهنده‌ها، استخراج پلی ساکاریدها از استرکولیا، استخراج کاروتنوئیدها از گل همیشه بهار و پوست گوجه فرنگی، استخراج روغن از هسته انگور و استخراج استویوزید از استویا. استخراج به کمک آنزیم مثل سلولاز و پکتیناز به تجزیه یا فروپاشی ترکیبات دیواره سلول گیاهی کمک می‌کند، بنابراین خروج مواد داخل سلولی برای فرایند استخراج راحت تر صورت می گیرد (Puri *et al*., 2012).

در این پژوهش هدف بررسی تاثیر آنزیم همی سلولاز در چهار غلظت مختلف (۰/۲، ۱، ۲، ۳ درصد) بر راندمان عصاره استخراجی و استخراج گلیسیریزیک اسید از ریشه شیرین بیان توسط روش‌های استخراج رفلاکس حرارتی و اولتراسوند می باشد.

مواد و روش ها

- مواد

آنزیم همی سلولاز با درجه غذایی از شرکت Enzyme development corporation تهیه گردید. مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش سدیم هیدروکسید، اسیداستیک گلایسیال، محلول آمونیاک، متانول با درجه HPLC، مونوآمونیوم گلیسیریزینات و مفنامیک اسید (مرک و سیگما) بودند.

- آماده سازی ریشه شیرین‌بیان

ریشه خشک شیرین‌بیان برداشت شده در فصل تابستان ۱۳۹۳ از منطقه کرمانشاه تهیه شد. ریشه‌ها توسط دستگاه آسیاب ریشه خرد و از الک با مش ۲ میکرومتر عبور داده شد و در بسته‌هایی دور از هوا در دمای محیط نگهداری شد.

- پیش‌تیمار آنزیمی ریشه شیرین‌بیان

به حدود ۲۰ گرم از ریشه آماده‌سازی شده ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول آنزیمی (در غلظت‌های مختلف ۰/۲، ۱، ۲، ۳ درصد (w/v) تهیه شده با بافر استات (pH =5) اضافه شد. حدود ۱ ساعت درون حمام آب در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد، روی هیتر و همزن مغناطیسی قرار گرفت تا مرحله پیش‌تیمار آنزیمی را طی کند (Puri *et al*., 2012).

- استخراج به روش رفلاکس حرارتی

پس از پیش‌تیمار آنزیمی و تنظیم pH حدود خنثی (۷) محتوای درون بطری همراه با ۳۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به درون بالن رفلاکس انتقال یافت. سپس عملیات رفلاکس حرارتی به مدت ۴ ساعت انجام شد. بعد از طی زمان لازم محتوای درون بالن رفلاکس صاف و عصاره استخراجی

تغلیظ حرارتی گردید.

- استخراج به کمک امواج اولتراسوند

پس از پیش‌تیمار آنزیمی و تنظیم pH حدود خنثی (۷) محتوای درون بطری همراه با ۳۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به درون بطری شیشه‌ای انتقال یافت. سپس نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد در حمام اولتراسونیک (مدل FS20 ، Fisher scientific، آلمان) با فرکانس ۴۰ کیلوهرتز قرار گرفت. محتوای درون بطری صاف و عصاره استخراجی تغلیظ گردید (Char & Rathod, 2012). تیمار شاهد کلیه مراحل نام برده شده را مانند سایر تیمارها طی کرد با این تفاوت که در مرحله پیش‌تیمار آنزیمی به آن محلول آنزیمی اضافه نگردید.

- محاسبه بازدهی استخراج عصاره

عصاره‌های تغلیظ شده حاصل، توسط دستگاه سانتریفیوژ (مدل 3-16PK سیگما، آلمان) با دور ۱۸۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. عصاره‌های شفاف (فاز بالایی) حاصل از سانتریفیوژ در آون با دمای۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و خشک گردید. با محاسبه وزن اولیه‌ی ظرف و وزن نهایی آن که حاوی ماده خشک بر جای مانده است، مقدار کل ماده خشک استخراج شده در مرحله استخراج محاسبه و به صورت درصد (گرم به صد گرم نمونه ریشه شیرین بیان) بیان شد.

- اندازه‌گیری گلیسیریزیک اسید با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)

اندازه‌گیری کمی گلیسیریزیک اسید توسط دستگاه HPLC (مدل knauer K2600، شرکت Knuaer، آلمان) با مشخصات ستون c_{18}، طول ستون ۲۵۰ میلی‌متر و قطر ۵ میلی‌متر، پمپ به صورت تک حلاله با فشار ۲ بار و فاز متحرک متشکل از متانول، آب و اسید استیک و سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه و مجهز به آشکارساز UV ۲۵۴ نانومتر، با استفاده از روش استاندارد داخلی صورت گرفت. محلول عصاره خشک به دست آمده برای آزمون HPLC مورد استفاده قرار گرفت.

در یک بالن ۱۰۰ میلی‌لیتری، محلول آمونیاکی شامل ۰/۰۵ درصد از نمونه عصاره شیرین‌بیان و ۰/۰۵ درصد مفنامیک اسید تهیه شد. مقدار تزریق در هر نوبت برابر با ۲۰ میکرولیتر بود. نتایج بر اساس میزان گلیسیریزیک اسید موجود در ۱۰۰ گرم عصاره خشک شیرین بیان به دست آمد و سپس راندمان استخراج گلیسیریزیک اسید موجود در ریشه شیرین بیان محاسبه گردید (Wang *et al*., 2004; داورپناه، ۱۳۸۵).

- تجزیه و تحلیل آماری

مقایسه اثر آنزیم همی‌سلولاز در چهار غلظت مختلف (۰/۲، ۱، ۲ و ۳ درصد) بر راندمان عصاره استخراجی و استخراج گلیسیریزیک اسید از ریشه شیرین بیان توسط روش‌های استخراج رفلاکس حرارتی و اولتراسوند با استفاده از آزمون آنالیز واریانس ANOVA در قالب یک طرح کاملا تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SAS:9 انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح اطمینان ۹۵٪ انجام شد. نمودارها توسط نرم افزار Excel رسم گردید.

یافته‌ها

- تاثیر به کارگیری آنزیم همی‌سلولاز در دو روش استخراج رفلاکس حرارتی و اولتراسونیک بر بازدهی استخراج عصاره از ریشه گیاه شیرین‌بیان

شکل ۱ بازدهی استخراج عصاره از ریشه گیاه شیرین‌بیان با پیش تیمار آنزیمی توسط آنزیم همی‌سلولاز را در غلظت‌های ۰/۲، ۱، ۲ و ۳ درصد به دو روش استخراج رفلاکس حرارتی و اولتراسونیک نشان می‌دهد. بر طبق شکل ۱ با افزایش غلظت آنزیم همی‌سلولاز در هر دو روش استخراج، بازدهی استخراج عصاره به طور معنی‌داری افزایش یافت و میان نمونه‌های پیش‌تیمار آنزیمی شده در غلظت‌های ۲ و ۳ درصد با شاهد اختلاف آماری معنی‌دار در سطح ۹۵٪ دیده شد ($p<0/05$). بازدهی استخراج عصاره در نمونه های شاهد در روش استخراج به شیوه رفلاکس حرارتی و استفاده از اولتراسونیک اختلاف آماری معنی‌داری دیده نشد. اما در کل افزایش غلظت آنزیم در هر دو روش موجب افزایش بازدهی استخراج عصاره شد به طوریکه استخراج عصاره از ریشه گیاه شیرین‌بیان پیش تیمار آنزیمی شده با آنزیم همی سلولاز در هر دو روش استخراج، در غلظت ۳ درصد موجب دستیابی به بیشترین بازدهی استخراج شد.

- تاثیر به کارگیری آنزیم همی‌سلولاز در دو روش استخراج رفلاکس حرارتی و اولتراسونیک بر راندمان استخراج گلیسیریزیک اسید

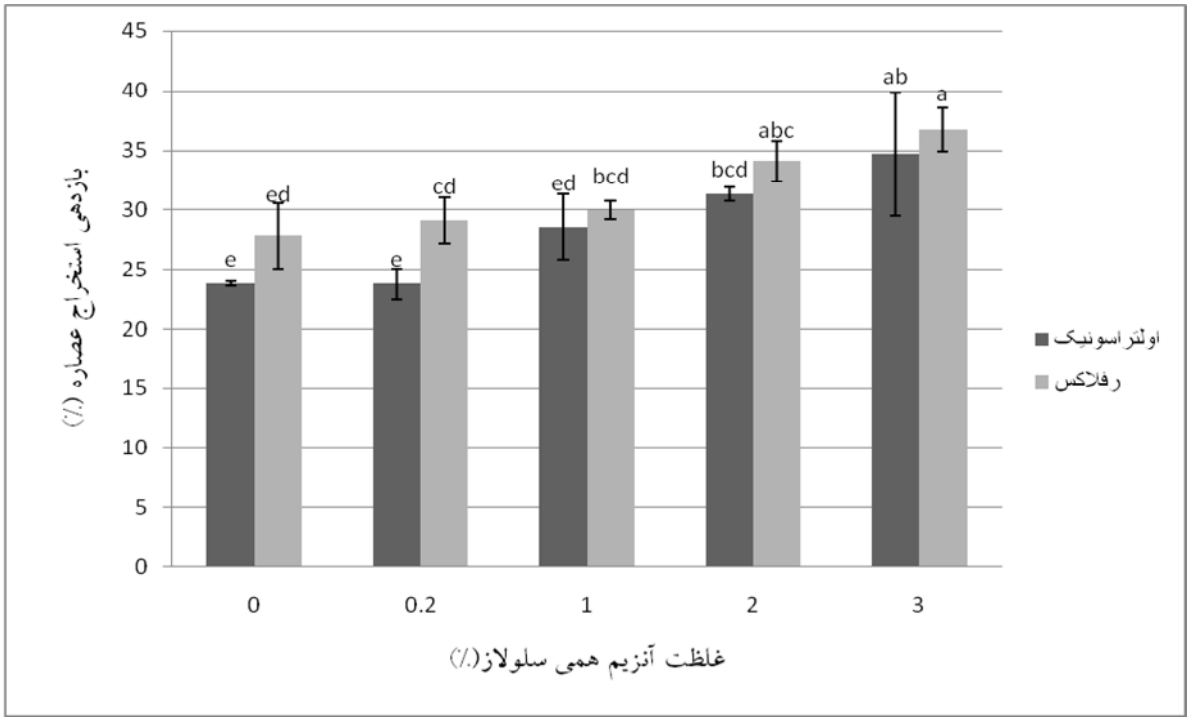
شکل ۲ تاثیر به کارگیری آنزیم همی سلولاز و غلظت آن را بر میزان گلیسیریزیک اسید موجود در ۱۰۰ گرم ریشه شیرین‌بیان به عنوان ماده موثره در ریشه شیرین بیان به دو روش استخراج رفلاکس حرارتی و اولتراسونیک نشان می‌دهد. بر طبق شکل ۲ استفاده از آنزیم همی‌سلولاز در پیش‌تیمار آنزیمی ریشه گیاه شیرین‌بیان در روش استخراج اولتراسونیک به طور معنی‌داری بر راندمان استخراج گلیسیریزیک‌اسید از ریشه این گیاه موثر نبود. بیشترین میزان گلیسیریزیک‌اسید استخراج شده از۱۰۰ گرم ریشه شیرین‌بیان پیش‌تیمار شده با آنزیم همی‌سلولاز، توسط غلظت ۰/۲ درصد آنزیم به روش استخراج رفلاکس حرارتی به دست آمد ($p<۰/۰۵$). با افزایش غلظت آنزیم (به ۲ و ۳ درصد) میزان گلیسیریزیک‌اسید استخراج شده از۱۰۰ گرم ریشه شیرین‌بیان نسبت به نمونه‌های شاهد کاهش یافت.

بحث

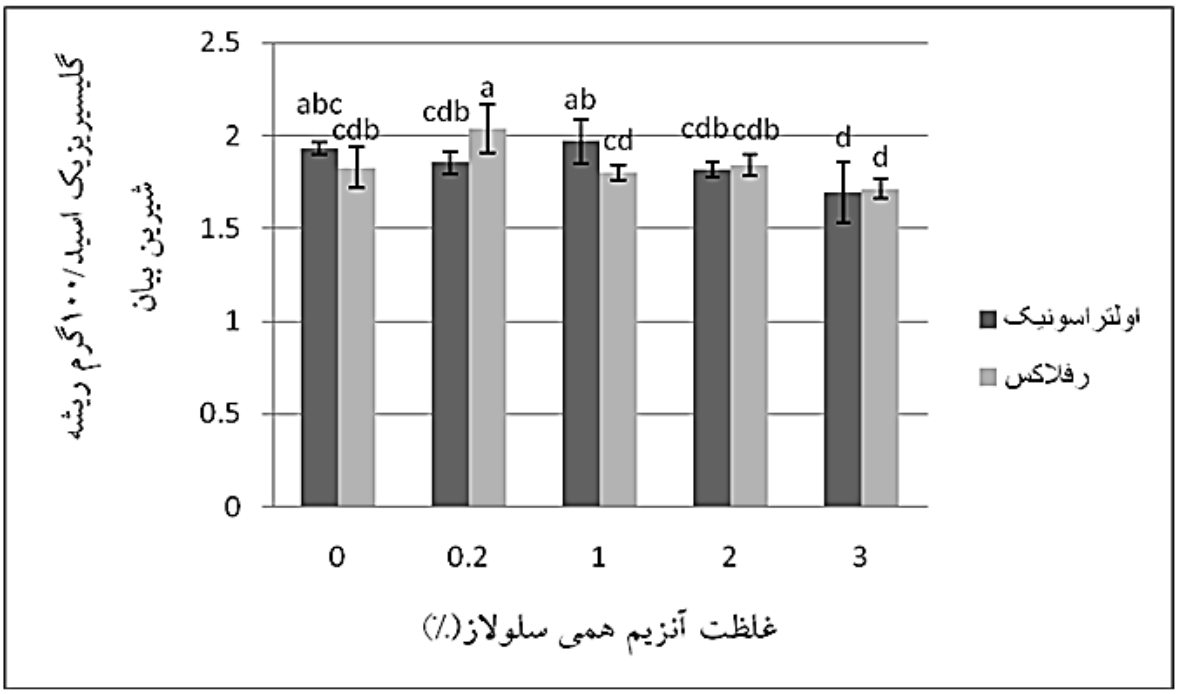
یافته‌ها نشان داد که با افزایش غلظت آنزیم همی‌سلولاز در هر دو روش استخراج، بازدهی استخراج عصاره به طور معنی‌داری افزایش یافت به طوریکه استخراج عصاره از ریشه گیاه شیرین‌بیان پیش تیمار آنزیمی شده با آنزیم همی سلولاز در هر دو روش استخراج، در غلظت ۳ درصد موجب دستیابی به بیشترین بازدهی استخراج شد. Puri و همکاران در سال 2011 در استخراج شیرین کننده طبیعی استویوزید از گیاه استویا گزارش کرده‌اند که آنزیم همی‌سلولاز پیوند بتا ۱ و ۴ که زیر دیوار اولیه نخستین لایه از صفحه میانی دیواره سلولی گیاه قرار دارد را می‌شکند و به گلوکز و سلوبیوز تبدیل می‌کند. با شکسته شدن اجزا دیواره سلولی استخراج ترکیبات داخل سلولی با سهولت صورت می‌گیرد. نتیجه حاصل شده مشابه با نتایج بدست آمده از استخراج آنزیمی سایر ترکیبات بیواکتیو از گیاهان می‌باشد. برای مثال استخراج کاروتنوئید طبیعی لیکوپن از گوجه فرنگی به کمک آنزیم سلولاز توسط Choudhari & Ananthanarayan در سال 2007 انجام شد و تحت شرایط اپتیمم استفاده از آنزیم باعث افزایش بازدهی استخراج لیکوپن شد. نتایج حاصل نشان می‌دهد که تجزیه پلی ساکاریدهای دیواره سلولی گام اساسی در افزایش بازده استخراج عصاره در گیاهان می‌باشد.

دیواره سلولی گیاهی شامل سلولز و همی سلولز مانند زایلوگلوکان و زایلان می‌باشد که شبکه نسبتاً سخت و محکمی را تشکیل می‌دهند. آنزیم همی‌سلولاز باعث شکستن دیواره سلولی گیاهان می‌شود. بنابراین استخراج عصاره گیاهی با سهولت صورت می‌گیرد. Wilkins و همکاران در سال 2007 گزارش کرداند که سلولز، پکتین و همی‌سلولز در پوسته باقی مانده از گریپ فروت می‌توانند به قندهای مونومر توسط آنزیم‌ها هیدرولیز شوند.

بازدهی استخراج عصاره در نمونه‌های شاهد در روش استخراج به شیوه رفلاکس حرارتی و استفاده از اولتراسونیک اختلاف آماری معنی‌داری نداشت. اما در کل افزایش غلظت آنزیم در هر دو روش موجب افزایش بازدهی استخراج عصاره شد. مدت زمان عصاره‌گیری در روش استخراج رفلاکس حرارتی نسبت به روش استخراج اولتراسونیک طولانی‌تر است. بنابراین زمان بیشتری برای آزادسازی ترکیبات گیاهی وجود دارد و استفاده از پیش تیمار آنزیمی ریشه گیاه شیرین‌بیان توسط آنزیم همی‌سلولاز به باز شدن ساختار دیواره سلولی گیاه کمک می‌کند. لذا عصاره گیری با سهولت بیشتری صورت می‌گیرد. بیشترین میزان گلیسیریزیک‌اسید استخراج شده از ۱۰۰ گرم ریشه شیرین‌بیان پیش‌تیمار شده با آنزیم همی-سلولاز، توسط غلظت ۰/۲ درصد آنزیم به روش استخراج رفلاکس حرارتی و غلظت ۱ درصد آنزیم به روش استخراج اولتراسونیک به دست آمد و با افزایش غلظت آنزیم (به ۲ و ۳ درصد) میزان گلیسیریزیک‌اسید استخراج شده از۱۰۰ گرم ریشه شیرین‌بیان نسبت به نمونه‌های شاهد تا حدودی کاهش یافته‌است. این امر احتمال دارد به دلیل تجزیه ترکیب گلیسیریزیک‌اسید در طی فرایند استخراج باشد، علاوه بر این Patindol و همکاران در سال 2007 بیان کرده‌اند که آنزیم‌های سلولولیتیک گرایش به مهار شدن توسط محصولات محلول سلولزی دارند. بنابراین اثر کاتالیکی آنزیم، با افزایش غلظت آنزیم در استخراج ممکن است به حد ماکزیمم خود نرسد و در نتیجه قابلیت تجزیه‌ی کمتر توسط آنزیم، موجب مهار تولید محصول شود.



شکل۱- اثر آنزیم همی سلولاز و غلظت آن بر بازدهی استخراج عصاره از ریشه‌ی گیاه شیرین‌بیان به دو روش استخراج رفلاکس حرارتی و اولتراسونیک (حروف غیرمشترک نشان دهنده وجود اختلاف آماری معنی‌دار است (p<۰/۰۵))



شکل ۲- اثر آنزیم همی سلولاز و غلظت آن بر میزان گلیسیریزیک اسید موجود در ۱۰۰ گرم ریشه شیرین بیان به دو روش استخراج رفلاکس حرارتی و اولتراسونیک (حروف غیرمشترک نشان دهنده وجود اختلاف آماری معنی دار است (p<۰/۰۵))

نتیجه‌گیری

با افزایش غلظت آنزیم بازدهی استخراج عصاره از ریشه گیاه شیرین بیان افزایش یافت زیرا آنزیم‌ها باعث تخریب دیواره سلولی بافت گیاهی می‌گردند و آزادسازی ترکیبات داخل سلولی با سهولت بیشتری صورت می‌گیرد. بیشترین درصد استخراج عصاره در هر دو روش استخراج

رفلاکس حرارتی و اولتراسونیک در پیش‌تیمار آنزیمی ریشه گیاه شیرین‌بیان توسط آنزیم همی‌سلولاز، در غلظت ۳ درصد آن به دست آمد. به عنوان نتیجه گیری کلی پیش تیمار آنزیمی ریشه گیاه شیرین بیان در روش‌های استخراج رفلاکس حرارتی و استخراج به کمک اولتراسونیک، برای افزایش راندمان استخراج عصاره و گلیسیریزیک‌اسید از ریشه گیاه شیرین بیان روشی موثر می‌باشد و آنزیم‌ها با توانایی تخریب دیواره سلولی بافت گیاهی، موجب تسهیل آزادسازی مواد داخل سلولی می‌گردند.

منابع

امیدبیگی، ر. (۱۳۷۹). تولید و فراوری گیاهان دارویی. چاپ اول، جلد سوم، انتشارات آستان قدس رضوی، ۳۹۷ صفحه.

داعی پاریزی، ن.، باقی‌زاده، ا.، مهربانی، م.، و بخشی خانیکی، غ. (۱۳۸۹).تعیین درصد عصاره و گلیسریزین ریشه شیرین‌بیان نواحی مختلف استان کرمان و نمونه هایی از استان فارس با روشHPLC . مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان، شماره ۱۷،صفحه ۳۱۶-۳۲۷.

داورپناه، ز. (۱۳۸۵). بررسی اثر فصل و منطقه برداشت بر میزان اسیدگلیسیریزیک ریشه شیرین‌بیان.کارشناسی ارشد، پایان‌نامه دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان.

داورپناه، ز.، شیخ زین الدین، م.، دخانی، ش.، و سعیدی، ق. (۱۳۸۸). بررسی اثر فصل و منطقه برداشت بر میزان اسیدگلیسیریزیک، املاح معدنی و قند موجود در ریشه شیرین‌بیان. مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، شماره ۴۷.صفحه ۲۷-۳۴.

Baek, J. Y., Lee, J. M. & Lee, S. C. (2008). Extraction of nutraceutical compounds from licorice roots with subcritical water. Separation and Purification Technology, 63 (3), pp. 661-664.

Charpe, T. W. & Rathod, V. K. (2012). Extraction of glycyrrhizic acid fromlicorice root using ultrasound: Process intensification studies. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, 54(0), pp. 37-41.

Choudhari, S. M. & Ananthanarayan, L. (2007). Enzyme aided extraction of lycopene from tomato tissues. Food chemistry, 102(1), pp. 77-81.

Fenwick, G. R., Lutomski, J. & Nieman, C. (1990). Liquorice, Glycyrrhiza glabra L. Composition, uses and analysis. Food Chemistry, 38(2), pp. 119-143.

Isbrucker, R. A. & Burdock, G. A. (2006). Risk and safety assessment on the consumption of Licorice root (Glycyrrhiza sp.), its extract and powder as a food ingredient, with emphasis on the pharmacology and toxicology of glycyrrhizin." Regulatory Toxicology and Pharmacology 46(3), pp. 167-192.

Pan, X., Liu, H., Jia, G., & Shu, Y. Y. (2000).Microwave-assisted extraction of glycyrrhizic acid from licorice root. Biochemical Engineering Journal, 5(3), pp. 173-177.

Patindol, J., Wang, L. & Wang, Y. J. (2007). Cellulase-Assisted Extraction of Oligosaccharides from Defatted Rice Bran. Journal of Food Science, 72(9), C516-C521.

Puri, M., Kaur, A., Schwarz, W. H., Singh, S. & Kennedy, J. (2011). Molecular characterization and enzymatic hydrolysis of naringin extracted from kinnow peel waste. International Journal of Biological Macromolecules, 48(1), pp. 58-62.

Puri, M., Sharma, D. & Barrow, C. J. (2012). Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. Trends in Biotechnology, 30(1), pp. 37-44.

Puri, M., Sharma, D., Barrow, C. J. & Tiwary, A. (2012). Optimisation of novel method for the extraction of steviosides from Stevia rebaudiana leaves. Food Cemistry, 132(3), pp. 1113-1120.

Wang, Q. E., Ma, S., Fu, B., Lee. F. S. C. & Wang, X. (2004). Development of multi-stage countercurrent extraction technology for the extraction of glycyrrhizic acid (GA) from licorice (Glycyrrhiza uralensis Fisch). Biochemical Engineering Journal. 21(3), pp. 285-292.

Wilkins, M. R., Widmer, W. W., Grohmann, K. & Cameron, R. G. (2007). Hydrolysis of grapefruit peel waste with cellulase and pectinase enzymes. Bioresource Technology, 98(8), pp. 1596-1601.