

柑桔类果汁的酶法脱苦研究进展

文 蓉, 黎继烈, 崔培梧, 杨 杰, 黄 凌

(中南林业科技大学 生命科学与技术学院, 湖南 长沙 410004)

摘 要: 类柠檬苦素和柚皮苷是柑桔类果汁中的主要苦味成分, 会明显的降低柑桔类果汁的品质。对柑桔类果汁的苦味形成的机理及酶法脱苦的研究进展进行了综述。

关键词: 柑桔汁; 酶法脱苦; 类柠檬苦素; 柚皮苷

中图分类号: TS 255.44 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)03-0130-04

柑桔中含有柠檬酸、苹果酸、维生素、类胡萝卜素、还原糖、非还原糖和蛋白质等营养成分, 是一种很受欢迎的水果。但在柑桔加工产品中出现过度苦味是柑桔加工业中较重要的问题。目前已报道的脱苦法有: 吸附法、添加苦味抑制剂法、固定化细胞脱苦、超临界 CO₂ 脱苦法、膜技术脱苦、基因工程脱苦、酶法、代谢脱苦法等, 但还没有完全令人满意的方法。当前较为普遍使用的是吸附法和添加苦味抑制剂法, 然后是酶(固定化酶)脱苦法。酶法脱苦能不影响柑桔果汁品质的情况下较好地去除苦味, 将成为今后的发展方向。

柑桔类果汁苦味来源主要由两类物质组成: 一类为柠檬苦素(Limonin)的二萜烯二内酯化合物(A和D环)

引起橙汁和桔汁苦味; 另一类为果实中多种黄酮苷, 其中柚皮苷(Naringin)为葡萄柚和苦橙等柑桔类果汁中的主要黄酮苷。目前, 柑桔果汁脱苦酶主要为作用于柚皮苷的柚苷酶(Naringinase)和作用于类柠檬苦素的脱苦酶。

1 柚苷酶的生产及应用

1.1 柚皮苷酶法脱苦机理

柚皮苷(Naringin)分子式为 C₂₇H₃₂O₁₄, 化学名称是 4, 5, 7-三羟基黄酮-7-鼠李糖葡萄糖苷, 体积约 0.465 nm³, 它是黄酮基与二糖结合形成的, 如果鼠李糖结合在黄酮的第 7 位碳原子上, 这个化合物是苦的; 如果结合在第 2 位碳原子上, 化合物是不苦的, 柚皮苷微溶于水, 溶于丙酮、乙醇和热醋酸中^[1]。

柚苷酶是由 α-L-鼠李糖苷酶(EC 3.2.01.40)和 β-D-葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.21)组成。α-L-鼠李糖苷酶可将柑桔类果汁中黄酮苷类化合物柚皮苷水解成櫻桃苷(Prunin)和鼠李糖。而櫻桃苷(Prunin)的苦味约为柚皮苷的 1/3, 因此可降低柑桔类果汁中的苦味。櫻桃苷(Prunin)可以在 β-D-葡萄糖苷酶的继续作用下生成无苦

第一作者简介: 文蓉(1984), 女, 硕士, 研究方向为微生物遗传育种。E-mail: wenrongaaa@163.com.

通讯作者: 黎继烈(1959), 女, 湖南岳阳人, 博士, 教授, 现从事微生物育种及发酵过程调控方面研究工作。E-mail: lijilie@163.com.

收稿日期: 2008-10-16

Male Sterility Mechanism and Application Research of Pepper

WU Li-jun¹, WU Zhi-ming²

(1. Resource and Environment College, Central South Forest Science and Technology University, Changsha, Hunan 410004, China; 2. Horticulture College, Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China)

Abstract: Progress in cytology, endogenous hormone and matter metabolism of male sterility in pepper were reviewed in this paper. Applications of pepper male sterility in seed production were analyzed and the prospect was discussed.

Key words: Pepper; Cytology; Endogenous hormone; Matter metabolism; Application

味的柚皮素(Naringenin)和葡萄糖。2001年Chien等用高效液相色谱法(HPLC)证实这一水解顺序,并指出仅有 β -D-葡萄糖苷酶存在时,柚皮苷不能被水解^[2]。

1.2 柚苷酶生产菌株的选育及发酵

柚苷酶可由黑曲霉、青霉、米曲霉等霉菌产生。由于柚苷酶不是单一酶,目前还没有基因工程菌方面的研究。Norouzzian等^[3-4]筛选出产柚苷酶菌种斜卧青霉PTCC 5248,其最适产酶条件为pH 4.5,温度55℃;柠檬酸、葡萄糖、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Zn^{2+} 对产酶有抑制作用;固定化酶在60~65℃时效果最好。Soria等^[5]从土霉素CECT 2663分离出柚苷酶,并对其产酶条件进行研究。Puri等^[6-7]发现产柚苷酶菌种黑曲霉1344在pH 4.5,温度30℃时利用糖蜜和蛋白胨做为碳源和氮源时产酶量最高;糖浓度能影响产酶量和菌体生长量;金属离子能促进酶活的提高。

汪钊等^[8-9]筛选出黑曲霉ZG 84,通过诱变获得变异株ZG 86,产柚苷酶酶活达1 125 U/mL。对ZG 86进行固体发酵,发酵酶活达到15 000 U/g豆饼粉。励建荣等^[10]筛选到黑曲霉HZG 27,在30℃,150 r/min, pH 5.0的条件下培养108 h,菌株分泌的柚苷酶酶活为635 U/mL。胡奎等^[11]筛选到黑曲霉SN 01,摇瓶产酶达291 U/mL,经NTG诱变、筛选育成菌株SN 90,其摇瓶产酶可达1 282 U/mL。SN 90的产酶过程需要柚苷诱导,对葡萄糖浓度不敏感,为低分解代谢物阻遏型突变株。赖崇德等^[12]选育出黑曲霉A 166,摇瓶发酵酶活力达到955.6 U/mL。陈玲等^[13-14]通过敏感抗生素对柚苷酶产生菌黑曲霉3-54菌株孢子致死浓度的测定,采用UV诱变,得到摇瓶发酵酶活力为500 U/mL的3-54-7号菌株;采用NTG诱变,得到摇瓶发酵酶活力达770.06 U/mL的3-54-NTG-16号菌株。Real等^[15]发现在温度303 K,压强160 MPa的环境下柚苷酶的活性比常压要高,压力对反应速率有积极影响。柚苷酶的动力参数研究表明压强160 MPa时 $V_{\max} = 2.7 \text{ mM/min}$ 跟常压 $V_{\max} = 0.06 \text{ mM/min}$ 相比,有显著的提高。

1.3 柚苷酶的应用

柚苷酶应用于柑桔类果汁的脱苦已有许多报道,国外已有商品酶出售,国内还没有商品酶。汪钊等^[9]用黑曲霉变异株ZG 86固体发酵所产柚苷酶对桔汁脱苦,脱除率达90%以上,苦味基本消失。励建荣等^[10,16]利用黑曲霉HZG 27所产柚苷酶在40℃,pH 4.0的条件下对柑桔汁进行脱苦,其柚皮苷含量下降达71%以上,苦味基本消失;在pH 4.0下,按果汁的0.04%~0.06%添加柚苷酶,于40℃下酶解1~1.5 h,可清除成品桔酒的苦味,从而改善桔酒的风味。何晋浙等^[17]在柑桔果醋加工中,利用柚苷酶进行脱苦试验,温度25~28℃,酸度0.5~0.8 g/100mL,柚苷酶加量15 U/mL,柚苷酶有较

佳的活性,酒精度为6.0%~8.0%(V)时,有利于醋酸发酵,制得的果醋清亮透明,酸甜可口,果香明显,基本无苦味。单杨等^[18]用复合酶制剂Naringinase和Sumizyme C对柑桔发酵酒的最佳脱苦条件是温度50℃,pH 4.0, Naringinase和Sumizyme C各加0.1%,溶解保温2 h,感官评价效果较好。王鸿飞等^[19]利用柚苷酶对柑桔汁进行脱苦,最适工艺条件是柚苷酶用量0.5 g/L,温度60℃,pH 4.0作用时间90 min。

柚苷酶的最适pH与柑桔汁的自然pH相接近,因此,常用固定化柚苷酶进行脱苦。可供选择的固定化材料随固定化的方法不同而不同:采用共价键法固定柚苷酶的材料为DEAE-Sephadex、纤维素、甲壳素等;采用吸附法固定柚苷酶的材料为空心玻璃;采用包埋法固定柚苷酶的材料为多孔载体如海藻酸钠、琼脂糖、醋酸纤维等。1977、1978年Ono将酶分别固定在DEAE和羧酸-氨基乙基纤维上,1988、1989年Tesen将酶分别将酶固定于甲壳素和中空纤维上固定在海藻酸钠上,1998年Soares等使用醋酸纤维和三醋酸纤维制成膜固定酶。试验结果表明,用固定化酶处理后的果汁苦味明显降低。Puri等^[21]用海藻酸钠固定柚苷酶来去除金诺桔汁中的苦味物质,30 U的柚苷酶在3 h内水解82%的柚苷,在最优化条件下,苦味脱除率达60%。Euenieder等^[21]用丝绸和羊毛固定青霉来源的柚苷酶,用固定化酶处理后的果汁苦味明显降低。徐仲伟等^[21]人采用150 U和180 U的固定化柚苷酶水解柚皮苷,苦味脱除率分别为41.0%和49.7%,固定化酶比自然酶具有更广泛的pH和温度适应范围,较高的热稳定性,且柑桔果汁用固定化酶脱苦处理后,未产生任何异味。Sekeroglu等^[23]对影响游离的柚苷酶和固定化柚苷酶的水解柚苷的条件:温度、pH、酶液浓度等进行研究;在最适工艺条件pH 3.5,温度60℃下,固定化酶酶活为83%,稳定性好,重复利用率高。Busto等^[24]用聚乙烯醇固定来源于黑曲霉CECT 2088的柚苷酶,再生效果较好,酶活较高。Pedro等^[25-26]在高压条件下用海藻酸钙来固定柚苷酶,其酶活性和稳定性都比常压下好。

2 类柠檬苦素脱苦酶的生产及应用

2.1 类柠檬苦素酶法脱苦机理

柠檬苦素(Limonin)及其类似物属三萜类物质,是植物次生代谢的产物,主要存在于芸香科(Rutaceae)和楝科(Meliaceae)植物中。它是一个含呋喃环的高度氧化的四环三萜烯(Triterpenoids)化合物,迄今已分离到大约300多种类柠檬苦素。柑桔果实中比较常见而且含量较高的类柠檬苦素主要有:柠檬苦素、诺米林(Nomililn)、宜昌根辛(Ichangsensin)、脱乙酰诺米林(Deacetyl-nomililn)、诺米林酸(Nomililn acid)、脱乙酰诺米林酸(Deacetyl-nomililn acid)等。在柑桔类果汁中,柠檬苦素

是最重要的苦味源, 诺米林引起的苦味是很小的, 但在柑桔汁或从柑桔皮、果浆获得的副产物中, 诺米林是引起后苦味的重要因素。

类柠檬苦素脱苦酶主要有柠酸 A-环内脂脱氢酶, 柠檬苦素环氧酶, 柠檬苦素醇脱氢酶, 反式消除酶 (Transeliminase), 乙酰基裂解酶 (Acetyl-lyase) 等。研究表明, 在柑桔汁加工中出现的“苦味滞后” (Delayed Bitter-ness) 现象, 是由于柑桔榨汁后, 在酸以及柠檬苦素 D-环水解酶的作用下, 柠檬苦素的前体柠酸 A-环内脂转化为柠檬苦素。因此, 若能将柠酸 A-环内脂或柠檬苦素转化为其它物质就有可能减轻柑桔汁中的苦味。研究表明, 柠酸 A-环内脂脱氢酶可将柠酸 A-环内脂转化为无苦味的 17-脱氢柠酸 A-环内脂。柠檬苦素环氧酶、柠檬苦素醇脱氢酶、反式消除酶则可将柠檬苦素分别转化为没有苦味的脱氧柠檬苦素、柠檬苦素醇和反-19-羟基黄柏酮酸。上述酶对诺米林作用方式与柠檬苦素相似, 但乙酰基裂解酶代替了反式消除酶将诺米林转化成黄柏酮。

2.2 类柠檬苦素脱苦酶的分离和菌种的选育

Karim 等^[27] 从柚子中分离出柠檬苦素葡萄糖基转移酶, 在温度 37℃, pH 7.8 时酶活最高; Mn^{2+} 和 Co^{2+} 促进酶活分别达 33% 和 30%; EDTA, Cu^{2+} 和 Hg^{2+} 则抑制酶活。罗自生等^[28] 用醋酸杆菌 AS 1.41 脱除柑桔汁中柠檬苦素的苦味, 在温度 25℃ 摇床转速 150 r/min, 添加 1% 乙醇于液体培养基的条件下脱苦率达 58.3%。Suhay 等^[29] 从球形节杆菌细胞中分离出柠檬苦素脱氢酶, 通过硫酸铵分馏法、亲和色谱法、DEAE 离子交换法和 HPLC 将酶纯化, 并对酶的分子量进行测定, 用 SDS-PAGE 测定酶的分子组成。通过基因改造将这种细菌的酶分子克隆到柑桔类植物上可以用来减弱果实的自然苦味。

2.3 类柠檬苦素脱苦酶的应用

类柠檬苦素脱苦酶, 其最适 pH 都偏向碱性, 影响其在柑桔加工中的使用, 但可以将产生这些酶的微生物固定化, 以用于柑桔汁的脱苦。球形节杆菌 (*Arthrobacter globiformis*) 含有柠檬苦素 D-环水解酶和柠酸 A-环内脂脱氢酶可将柠檬苦素转化成 17-脱氢柠檬酸 A-环内脂; 球形节杆菌 II (*Arthrobacter globiformis* II) 含有柠檬苦素醇脱氢酶可将柠檬苦素转化成柠檬苦素醇; 束红球菌 (*Corynebacterium fascians*) 含有柠檬苦素醇脱氢酶和乙酰基裂解酶, 在柠檬苦素醇脱氢酶的作用下可将柠檬苦素转化成柠檬苦素醇, 在乙酰基裂解酶的作用下将诺米林转化成黄柏酮。

1983、1985 年 Hasegawa 等先后将球形节杆菌球形节杆菌、球形节杆菌 II、束红球菌固定于丙烯酰胺上用于柑桔汁的脱苦。Lopez 等^[30] 用聚乙烯醇 (PVA) 复合胶

为载体固定聚集红球菌 (*Rhodococcus fascians*) 细胞, 用于去除柑桔类果汁中的柠檬苦素类物质。刘虎成等^[31] 以 AS 1.14 为菌种, 采用 K-角叉胶进行包埋, 在液体培养基中添加 1% 乙醇, 温度 25℃, 摇床转速 150 r/min 的条件下脱苦率达 58.3%; 固定化细胞生物反应器在流速 2 mL/min 处理柑桔汁后基本无苦味, 可连续使用 11 次, 脱苦率仍可达 51.08%。罗自生等^[32] 固定化醋酸杆菌细胞其脱苦最佳供氧为: 摇床转速 160 r/min, 最适 pH 4.5, 最适温度 25℃; 而游离细胞脱苦的相应条件分别为 160 r/min, pH 5.5。低浓度 NaCl 对固定化细胞和游离细胞的脱苦都有强烈的抑制作用; 固定化细胞在柠檬苦素浓度达到 30 mg/kg, 游离细胞达到 35 mg/kg 后, 柠檬苦素降解速度趋于饱和; 固定化细胞的热稳定性比游离细胞好。

3 存在的问题与展望

目前, 酶法脱苦仍存在一定的缺点。如商业柚苷酶一般是通过黑曲霉发酵生产, 发酵生产时也会产生一定的果胶酶, 果胶酶将使果胶物质水解, 造成柑桔汁浊度下降, 风味变差, 反应速度慢, 固定化时对材料要求较高; 同时由于柑桔类果实品种繁多, 所含苦味成分及其含量不尽相同, 对于不同品种的柑桔类果汁用酶法脱苦其效果有差异, 因此, 酶法脱苦, 还有待于进一步研究。固定化微生物脱苦选择性强, 后处理简单, 目前还处于实验室研究阶段, 要实现工业化生产还需要做大量研究工作。综上所述, 选育优质高产酶菌株、提高酶活性, 选择合适的固定化材料等都是目前酶法脱苦的主要研究方向。

参考文献

- [1] 孙志高, 黄学根, 焦必宁. 柑桔果实主要苦味成分的分布及橙汁脱苦技术研究[J]. 食品科学, 2005, 26(6): 146-148.
- [2] 罗自生. 柑桔类果汁中柠碱的脱苦方法[J]. 饮料工业, 1998, 4(1): 2-3.
- [3] Norouzi D, Hosseinzadeh A, Inanlou D N, et al. Production and partial purification of naringinase by *Penicillium decumbens* PTCC 5248 [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2000(16): 471-473.
- [4] Norouzi D, Hosseinzadeh A, Inanlou D N, et al. Various techniques used to immobilize naringinase produced by *Penicillium decumbens* PTCC 5248 [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 1999(15): 501-502.
- [5] Soria F, Ellenrieder G, Grasselli M, et al. Fractionation of the naringinase complex from *Aspergillus terreus* by dye affinity chromatography [J]. Biotechnology Letters, 2004(26): 1265-1268.
- [6] Puri M, Kalra S. Purification and characterization of naringinase from a newly isolated strain of *Aspergillus niger* 1344 for the transformation of flavonoids [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2005(21): 753-758.
- [7] Puri M, Banerjee A, Banerjee U C. Optimization of process parameters for the production of naringinase by *Aspergillus niger* MTCC 1344 [J]. Process Biochemistry, 2005(40): 195-201.

- [8] 汪钊, 毛富根. 柚苷酶生产菌的选育及发酵条件研究 [J]. 微生物学通报, 1995, 22(1): 18-22.
- [9] 汪钊, 毛富根. 柚苷酶固体发酵及消除桔子汁苦味的研究 [J]. 食品科学, 1996, 17(6): 17-19.
- [10] 励建荣, 钟妙, 黄晓静. 黑曲霉 HZG-7 菌株产柚苷酶的研究 [J]. 食品工业科技, 2000, 21(6): 19.
- [11] 胡奎, 李帮秀, 吴珍龄. 柚苷酶生产菌株的选育 [J]. 西南农业大学学报, 2003, 25(2): 141-143.
- [12] 赖崇德, 蔡华静, 夏海林, 等. 一株产柚苷酶菌株黑曲霉的分离及菌种鉴定的初步研究 [J]. 江西农业大学学报, 2005, 27(5): 759-763.
- [13] 陈玲, 涂晓嵘, 涂国全. 柚苷酶产生菌的抗药性 UV 诱变筛选 [J]. 江西农业大学学报, 2007, 29(2): 298-301.
- [14] 陈玲, 涂晓嵘, 涂国全. NTG 诱变筛选高产柚苷酶抗药性突变株 [J]. 江西农业大学学报, 2007, 29(4): 670-674.
- [15] Vila Real H J, Alfaia A J, Calado A R T, et al. High pressure temperature effects on enzymatic activity: Naringin bioconversion [J]. Food Chemistry, 2007(102): 565-570.
- [16] 励建荣, 梁新乐, 陈敏, 等. 酶法脱苦干型桔酒发酵工艺的研究 [J]. 中国酿造, 2000, 27(1): 81-83.
- [17] 何晋浙, 汪钊, 毛俊. 柚苷酶在柑桔果醋加工中的应用 [J]. 中国调味品, 2001(11): 18-20.
- [18] 单扬, 李高阳, 张菊华, 等. 柑桔发酵酒脱苦技术研究 [J]. 食品与机械, 2001(5): 14-15.
- [19] 王鸿飞, 李和生, 董明敏. 柚苷酶对柑桔类果汁脱苦效果的研究 [J]. 农业工程学报, 2004, 20(6): 174-177.
- [20] Puri M, Marwaha S S, Kothari R M. Studies on the applicability of alginate-entrapped naringinase for the debittering of kinnow juice [J]. Enzyme and Microbial Technology, 1996, 18: 281-285.
- [21] Ellenrieder G, Blanco S, Daz M. Hydrolysis of supersaturated naringin solutions by free and immobilized naringinase [J]. Biotechnology Techniques, 1998, 12(1): 63-65.
- [22] Chien P, Shen F. Monitoring enzymatic debittering in grapefruit juice by high performance liquid chromatograph [J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2001, 9(2): 115-120.
- [23] Sekeroglu G, Fadloglu S, Gogus F. Immobilization and characterization of naringinase for the hydrolysis of naringin [J]. Eur Food Res Technol, 2006, 224: 55-60.
- [24] Busto M D, Meza V, Ortega N, et al. Immobilization of naringinase from *Aspergillus niger* CECT 2088 in poly(vinyl alcohol) cryogels for the debittering of juices [J]. Food Chemistry, 2007, 104: 1177-1182.
- [25] Pedro H A L, Alfaia A J, Marques J, et al. Design of an immobilized enzyme system for naringin hydrolysis at high pressure [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007(40): 442-446.
- [26] Marques J, Vila-Real H J, Alfaia A J, et al. Modelling of the high pressure - temperature effects on naringin hydrolysis based on response surface methodology [J]. Food Chemistry, 2007(4).
- [27] Kanim M R, Hashinaga F. Isolation and characterization of limonoid glucosyltransferase from pummelo albedo tissue [J]. Food Chemistry, 2002(76): 431-436.
- [28] 罗自生, 张惟广, 曾凡坤, 等. 醋酸菌脱除柑桔汁柠檬苦味的研究 [J]. 食品与机械, 2001(1): 18-19.
- [29] Charles G, Suhayda, Omura M, et al. Limonate dehydrogenase from *Anthrobacter globiformis*: the native enzyme and its N-Terminal sequence [J]. Phytochemistry, 1995, 40(1): 17-20.
- [30] Lopez F M, Pilar I M, G. Martinez M I, et al. Immobilization of *Rhodococcus fascians* cells in poly(vinyl alcohol) cryogels for the debittering of citrus juices [J]. Journal of Biotechnology, 2007(131): 98-121.
- [31] 刘虎成, 李川, 黄春健. 柑桔汁微生物脱苦研究 [J]. 饮料工业, 2000(3): 17-20.
- [32] 罗自生, 席均芳, 张推广, 等. 固定化醋酸杆菌细胞特性的研究 [J]. 食品科学, 2001, 22(10): 35-37.

Enzymatic Method of Removing Bitter in Citrus Juice

WEN Rong, LI Ji-le, CUI Pei-wu, YANG Jie, HUANG Ling

(College of Life Science and Technology in Central South University of Forestry and Technology, Changsha, Hunan 410004, China)

Abstract: Limonin and Naringin are the main bitters in citrus juice, which decreased the quality of citrus juice. In this paper, Bitterness in citrus juice and its forming mechanism was introduced. And enzymatic method for the removal of bitterness was discussed.

Key words: Citrus juice; Enzymatic debittering; Limonin; Naringin