

柑橘果汁中的苦味物质及脱苦技术研究进展

张娜威, 潘思轶, 范刚, 任婧楠

华中农业大学食品科学技术学院/环境食品学教育部重点实验室, 武汉 430070

摘要 柑橘汁富含多种矿物质和维生素, 具有较高的营养价值, 但柑橘类果汁中的苦味脱除一直都是柑橘加工业面临的主要问题。少量苦味能够赋予柑橘汁特定的风味, 但苦味过强就会影响产品的品质和销售。本文概述了造成柑橘汁“即时”苦味的柚皮苷和“延迟”苦味的柠檬苦素的生化特性、结构及参与其分解代谢途径的酶, 讨论了近年来用于脱苦的不同物理、化学和生物技术方法研究进展, 简述了相应的脱苦机制及存在的优缺点, 并对未来柑橘脱苦技术的发展趋势做出展望。

关键词 柑橘; 柚皮苷; 柠檬苦素; 脱苦; 柑橘汁; 深加工; 苦味物质

中图分类号 TS 255.44 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2021)01-0040-09

柑橘类水果是世界上最重要的水果之一, 在热带和亚热带地区以及许多地区广泛种植, 年产量约为 1.02 亿 t^[1]。柑橘类水果中含有黄烷酮、酚酸、柠檬苦素、L-抗坏血酸、类胡萝卜素、挥发性萜烯等多种生物活性化合物^[2], 因其诱人的颜色、令人愉悦的风味和香气而受到世界各地消费者的欢迎。近年来, 随着产量的增加、存储和加工技术的进步以及全年供应的实现, 柑橘类水果现已成为中国人重要的饮食营养来源^[3], 它们可以鲜食, 也可以加工成果汁、果酱或甜点。目前, 饮料生产是柑橘类水果加工的主要方向^[4]。柑橘在经过榨汁、杀菌、贮藏等加工过程后, 会出现苦味增强的现象, 进而影响柑橘汁的口感, 导致产品质量和经济价值的下降, 降低消费者可接受度, 制约柑橘汁加工业的发展^[5]。研究表明, 柑橘榨汁后的苦味源自两方面: (1) 柑橘(柚子、苦橙和葡萄柚)自身所含有的类黄酮及其衍生物所造成的苦味; (2) 由无苦味的化合物转化成苦味物质所造成的苦味, 即榨汁过程中的“延迟苦味”^[6]。当前基于化学、物理和生物技术方法已经开发了许多脱苦技术, 然而, 如何在提高消费者的接受度的同时保持果汁的风味物质和营养价值, 更科学地进行脱苦一直是柑橘加工研究者的重点课题。

1 引起苦味物质的化合物

柑橘类水果中存在不同类型的植物营养素, 分为黄烷酮、黄酮、黄酮醇、黄烷、异黄酮、三萜、柠檬苦素类苷元、芥子油苷(有机硫化合物)和异硫氰酸盐等, 具有特定的功能性和实用性^[7]。这些化合物是否呈苦味取决于其糖苷链的类型^[8]。柑橘类水果中存在多种苦味代谢产物, 如柚皮苷、枸桔苷、新橙皮苷、柠檬苦素、诺米林、宜昌橙苦素、诺米林酸等, 如表 1 所示。其中, 以柚皮苷为代表的黄烷酮糖苷类化合物和以柠檬苦素为代表的三萜类化合物是造成柑橘汁苦味的 2 种主要化合物^[9], 柚皮苷苦味阈值较高, 水溶液中阈值为 20 mg/L, 柠檬苦素在水溶液中苦味阈值为 1.0 mg/L, 果汁中苦味阈值 3.4 mg/L, 约为柚皮苷苦味阈值的 20 倍^[10], 如在柑橘中的含量超过 6 mg/kg, 则柑橘汁已苦得不宜饮用。引起苦味的化合物含量可能因水果的品种、部位、成熟期、生长条件而不同。柑橘类水果中的柠檬苦素和柚皮苷含量通常在幼果或果实膨大阶段积累相对较高, 成熟过程中会逐步降低^[11]。对金诺果实不同部位的分析表明^[12], 果皮中柚皮苷含量最高, 为 0.422 mg/g, 其次为果汁(0.230 mg/mL)和种子(0.134 mg/g); 柠檬苦素含量最高

收稿日期: 2020-12-23

基金项目: “十三五”国家重点研发计划专项(2017YFD0400101); 湖北省重点研发计划项目(2020BBA049)

张娜威, E-mail: 1457863723@qq.com

通信作者: 范刚, E-mail: fangang@mail.hzau.edu.cn

的是种子(9.52 mg/g),其次是果皮(4.69 mg/g)和果汁(0.218 mg/mL)。

表 1 柑橘中主要的苦味物质

类别 Category	呈苦物质 Bitter substance	含量/(mg/g) Content
类黄酮化合物 Flavonoids	柚皮苷 Naringin	0.009~6.658 ^[13]
	新橙皮苷 Neohesperidin	0.015~0.651 ^[14]
	枸桔苷 Poncirin	0~0.005 ^[15]
柠檬苦素类化合物 Limonoids	柠檬苦素 Limonin	0.019~3.647 ^[13]
	诺米林 Nomilin	0~0.446 ^[16]
	宜昌橙苦素 Ichangin	0~0.003 ^[17]

1.1 柚皮苷

柚皮苷(4,5,7-三羟基黄酮-7-鼠李糖苷)为类黄酮化合物(flavonoids),是葡萄柚和柚子中主要的类黄酮苦味成分,同为类黄酮的新橙皮苷(neohesperidin)和枸桔苷(poncirin)也很苦,但它们在柑橘

汁中的含量相对较低。柚皮苷具有抗氧化、抗溃疡作用和抗炎活性^[18],也是在水果隔膜和柑橘的白色内果皮中发现的主要的水溶性苦味成分^[19],在榨汁的过程中被提取至果汁当中,是果汁苦味的主要原因。柚皮苷(分子式: $C_{27}H_{32}O_{14}$,相对分子质量:580.5)具有 8 个氢键供体、14 个氢键受体和 6 个可旋转键,拓扑极性表面积为 225\AA^2 ^[20],柚皮苷易溶于甲醇、乙醇、丙酮、醋酸、稀碱溶液及热水,不溶于乙醚、氯仿、苯等非极性溶剂。柑橘中柚皮苷含量与果实成熟度有关,在未成熟的果实中含量很高。随着果实的成熟,柚皮苷被 α -L-鼠李糖苷酶水解为 L-鼠李糖和樱桃苷,苦味程度是柚皮苷 33% 的樱桃苷会进一步水解为无苦味的柚皮素和 D-葡萄糖,从而进一步降低苦味,如图 1 所示^[21]。

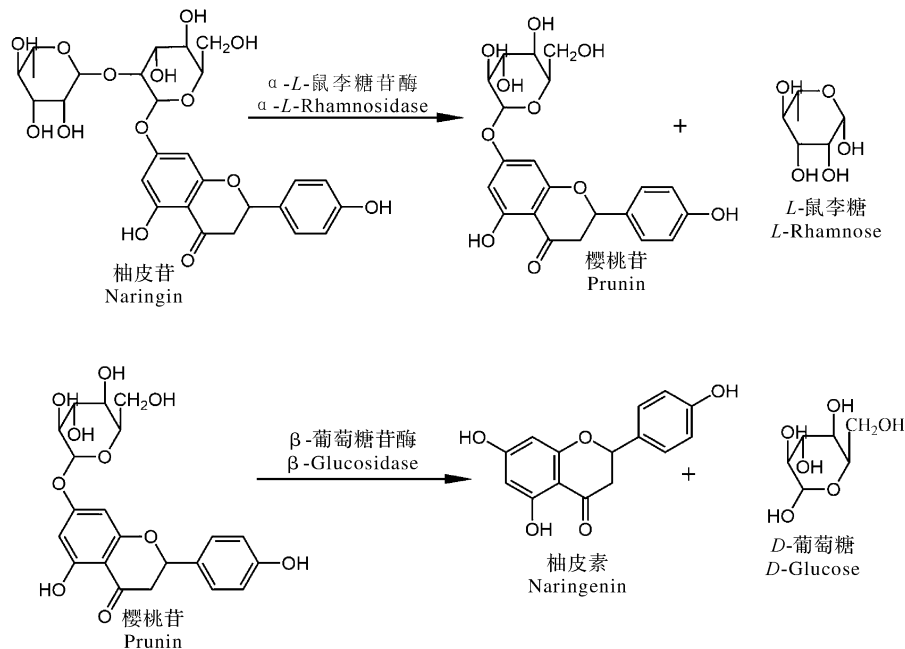


图 1 柚苷酶对柚皮苷的水解过程

Fig.1 Hydrolysis of naringin by naringinase

1.2 柠檬苦素

柠檬苦素类化合物(limonoids)是一类高度氧化的四环三萜类次生代谢产物,主要存在于芸香科(Rutaceae)、楝科(Meliaceae)植物组织中^[22],具有抗癌、抗人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)、抗炎、抗氧化、抗菌、镇痛、除虫、调节血糖等作用^[23]。柠檬苦素类化合物的最初前体——脱乙酰诺米林酸(角鲨烯,squalene)在柑橘属植物茎的韧皮部由乙酸、甲羟戊酸等合成^[24],

放射性示踪实验发现,韧皮部的脱乙酰诺米林酸转化成诺米林^[25],然后转移到植物的其他组织中,如叶、果实、种子等,在种子和果实中诺米林经过氧化、异构化、乙酰化、甲基化和水解等次级修饰最终产生柠檬苦素类化合物^[26]。

柠檬苦素类化合物是以柠檬苦素的化学结构为基本单位的一系列化合物,主要包括 2 种:类柠檬苦素苷元和类柠檬苦素糖苷,类柠檬苦素糖苷的结构均是苷元在 C17 位与一分子葡萄糖以糖苷键的形

式结合,苷元又可分为中性的 A 环内酯和酸性的 D 环内酯 2 种类型。苷元与糖苷结构的差别导致了其性质的差异:苷元的水溶性差且具有明显苦味,而糖苷具有良好的水溶性且几乎没有苦味^[27]。

具有强烈苦味的柠檬苦素类化合物有柠檬苦素、诺米林、宜昌橙苦素和诺米林酸 4 种,通常情况下柠檬苦素是最重要的苦味源,诺米林次之,而宜昌橙苦素和诺米林酸因其含量较低而作用不明显^[28]。柠檬苦素又称柠碱,是类柠檬苦素苷元的衍生物,它是芸香科家族水果中存在的一种重要的柠檬苦素类化合物。柠檬苦素(分子式: $C_{26}H_{30}O_8$; 相对分子质量: 470.52), 具有 8 个氢键受体, 1 个具有拓扑极性表面积 105 \AA^2 的可旋转键和 1 个共价键合单元。柠檬苦素是一种白色化合物, 在化学上属于呋喃内酯, 微溶于水, 易溶于无水乙醇和冰醋酸。

柑橘类水果榨汁后产生的苦味通常是由于物理破坏(如机械损伤)或冰冻损害等外界胁迫而引发的。中晚熟的完整鲜果几乎不含柠檬苦素, 柠檬苦素的非苦味前体柠檬苦酸 A 环内酯(LARL), 内源性存在于细胞质中, 最可能在中性至微碱性的膜囊, 在果汁加工过程中, 当这些囊泡破裂后, LARL 遇到

果汁的净酸性 pH 值, 逐渐催化环闭合形成柠檬苦素^[29], 研究表明, 非苦味形式向苦味形式的转化是通过柠檬苦素 D 环内酯水解酶催化的反应^[30], 它在酸性条件下发生, 反应速率取决于 LARL 的可利用性, 如图 2 所示^[31]。

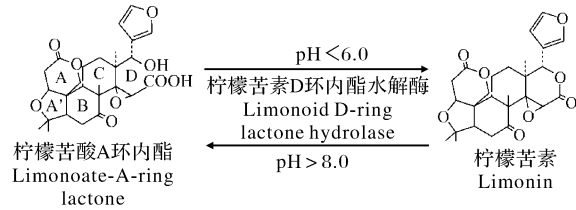


图 2 “延迟”苦味形成机制

Fig.2 “Delayed” bitterness formation mechanism

在成熟阶段, 柠檬苦素葡萄糖基转移酶基因 (*CitLGT*) 的表达开始增加, 柠檬苦素葡萄糖基转移酶会将类柠檬苦素苷元转化为几乎没有苦味的糖苷, 类柠檬苦素糖苷浓度增加, LARL 的含量下降^[32], 故成熟后的柑橘榨汁后较未成熟的苦味显著降低。研究表明, 柠檬苦素被酶解为无苦味衍生物主要是通过 3 种途径实现^[33], 如图 3 所示^[34], 具体转化程度取决于水果成熟程度和酶水解代谢的水平。

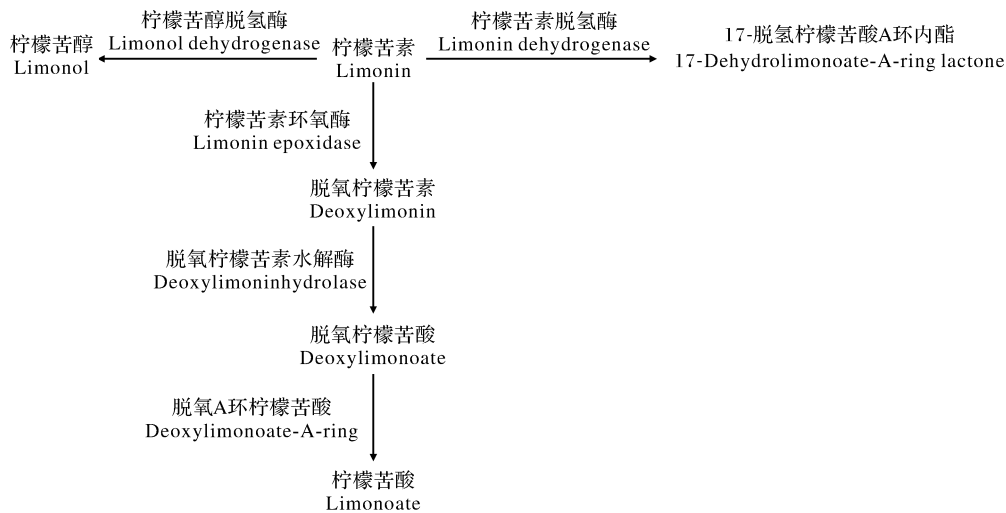


图 3 柠檬苦素转化为其非苦味代谢物的分解代谢途径

Fig.3 Catabolic pathways for the conversion of limonin into its non-bitter metabolites

2 脱苦方法

为减少柑橘类水果在发育和成熟过程中苦味化合物的积累, 研究人员已经做出了许多努力, 使用化学喷雾、农艺方法和采后处理来减少水果中富集的

苦味物质。目前, 基于物理、化学和生物技术方法开发了很多脱苦技术, 减少苦味的机制主要包括:

- (1) 除去苦味化合物(如漂烫、吸附、超滤膜过滤);
- (2) 除去富含苦味成分的部分(如白色内果皮和种子);
- (3) 添加苦味化合物清除剂(如碱处理、环糊精

处理);(4)酶促转化;(5)利用基因工程技术调节苦味化合物的合成途径。

2.1 物理方法脱苦

榨汁方式会直接影响果汁的苦味程度,有研究表明,与未处理的同类产品相比,轻柔地挤压水果可将果汁中的苦味降至最低^[35]。Sandhu 等^[36]对比不同榨汁处理方式对果汁理化指标的影响,结果表明使用螺旋式榨汁机可以有效减少果汁中的苦味;现代榨汁机虽然可以更快地从水果中提取果汁,但是在提取过程中,将富含苦味物质的种子与多汁囊一起压碎可能会给果汁带来苦味;在榨汁之前,从水果中手动去除种子可减少果汁中的苦味。Thakur 等^[37]研究表明从无核果汁中提取的汁液中引起苦味的成分(柚皮苷和柠檬苦素)的含量最少。

漂烫是一种热处理过程,应用于水果和蔬菜行业,以使内源酶失活,影响其感官和营养价值以及货架期。Zid 等^[38]对苦橙皮进行水和蒸汽热烫,结果显示在 95 °C 和 85 °C 时,水烫可分别去除 38% 和 48% 的苦味黄烷酮(柚皮苷和新橙皮苷),而蒸汽热烫对苦味化合物含量无显著影响,研究发现,其脱苦机制是通过固液萃取,热水进入富含苦味物质的白色内表皮使其中的糖苷类黄烷酮溶解,然后将其转移到固体基质的外部,再从外表面转移到水溶液中。黄烷酮糖苷的这种流出依赖于诸如时间和温度之类的变化,但较高的温度必然会破坏柑橘果实的组织结构。为了在保持柑橘组织结构的同时实现较好的脱苦效果,Jagannath 等^[39]在 65 °C 下对柑橘进行反复热烫,然后进行渗透脱水。在此过程中,柚皮苷含量降低了 50%,而且随着贮藏时间延长,柚皮苷含量又进一步降低。

此外,使用特定的设备(压滤机)和膜(中空纤维膜)通过超滤也可以将苦味成分与提取的果汁分离开来。超滤去除苦味的机制是:超滤膜具有截留大尺寸分子的能力,较小的分子可以通过膜,进而产生特定的渗透性。Wethern^[40]研究表明使用超滤法澄清葡萄柚汁的过程可降低果汁的苦味。盐和糖分子可顺利透过超滤膜^[41],诸如微生物、维生素之类的大分子则被超滤膜截留,因此,过膜后所得的渗透物被微生物污染的风险也大大降低。Ilame 等^[42]证明,超滤膜组件(基于聚砜的膜,分子质量 30 ku)有潜力在不添加添加剂的情况下延长金诺果汁的保质期至 60 d。由于在低温下进行膜处理,可以避免热

处理,因此可以忽略挥发性香气化合物的损失。

利用聚酰胺选择性地从脐橙汁中大量吸附柠檬苦素的研究已取得成功^[43]。类似地,各种吸附剂(如醋酸纤维素、尼龙基质、多孔聚合物和离子交换剂)的使用也被用于减少葡萄柚汁的苦味和酸性^[44]。吸附是将溶液中的溶质选择性地转移到固体物质(吸附剂)表面的一种物理化学过程,该过程在达到平衡后保持溶质的热力学平衡,不再吸收。这些吸附剂既可以单独使用,也可以与其他吸附剂结合使用,由于它们的选择性吸附,不同吸附剂对苦味的去除程度也有所差别,柚皮苷和柠檬苦素的去除率取决于吸附剂的交联程度和表面积,单个基质或多个基质的组合使用能够实现不同程度的脱苦。

2.2 化学方法脱苦

Kore 等^[5]使用碱处理对果汁进行脱苦,在 82~83 °C 下用氢氧化钠处理水果 40~60 s,然后用已知浓度的柠檬酸冲洗并在自来水中洗涤以除去过量的氢氧化钠。碱液处理过程中,去皮果实富含苦味物质的乳白色外层与羟基和羧基发生反应形成亲水性衍生物,并在水洗过程中得以去除,但碱液处理会改变果汁中的成分,导致果汁的回收率稍有降低。Sogi 等^[45]观察到,在碱液处理过程中,所用氢氧化钠的浓度对苦味的脱除起到决定性作用。当氢氧化钠达到特定的浓度能够有良好的脱苦效果,但是超过特定的限度反而会造成负面效果。

关于环糊精在柑橘汁脱苦中应用的报道相当有限。环糊精是含有(α -1,4)连接的 α -D-吡喃葡萄糖单元的环状寡糖,形成亲脂性中心腔和亲水性外表面,在水溶液中形成亲水锥,与极性小于水且具有合适大小以适合亲脂性空腔的化合物形成包合物^[46]。Konno 等^[47]用可溶性 β -环糊精单体包封柑橘汁中的柠檬素和柚皮苷,随着 β -环糊精的加入,柚皮苷和柠檬苦素的溶解度增加,使用 0.5% 的 β -环糊精可以降低柑橘汁最初苦味的 58%。Shaw 等^[48]用不溶性 β -环糊精聚合物去除脐橙和葡萄柚中柠檬苦素和柚皮苷。研究表明, β -环糊精聚合物能将苦味类黄酮和类柠檬苦素降低约 30%~50%,虽然柚皮苷、7- β -芸香糖苷、香豆素和类黄酮等成分也被去除,但可溶性固形物、酸度和抗坏血酸含量保持不变^[49]。 β -环糊精与柚皮苷或柠檬苦素形成不溶性络合物,用有机溶剂萃取工艺处理络合物使 β -环糊精再生,也提高了其在大规模试验中的应用。

目前用于脱苦的物理化学方法还存在其局限性。物理、化学脱苦法是以果汁的营养品质、质地、风味、口感为代价来进行脱苦,吸附或化学反应一定程度上会改变果汁的化学成分。这些方法在本质上是非特异性的,因此存在效率低下的缺陷,还会由不可监控的变化而导致批次间的差异,在去除苦味成分的过程中由于所需的营养成分的部分损失而降低了产量^[50]。此外,所用到的化学品不能够重复使用,而且最棘手的问题是,这些化学品缺乏合理处理方式,因此这些化工产物的排放会对环境生态造成一定的影响。综上,物理化学法的脱苦技术不适宜大规模应用,所以研究人员正开发可持续和更环保的脱苦技术。

2.3 生物技术方法脱苦

如今,在“生物技术时代”,寻找一种高效、省时、低成本的技术,从小规模工业到大规模工业都可以使用,实现定向、靶向地去除果汁中的苦味成分,是完全有可能的,而且在果汁加工中引入生物技术可以克服理化加工的局限性。

近年来越来越多研究学者开始对酶法脱苦产生兴趣,与化学试剂相比,酶法对果汁中的苦味成分的去除作用要大得多,且处理条件温和,专一性强。针对柠檬苦素的脱苦酶主要有:柠檬苦素环氧酶、柠檬苦素脱氢酶、柠檬苦醇脱氢酶、反式消除酶、乙酰基裂解酶等^[34],其脱苦机制为控制柠檬苦素的合成或是将柠檬苦素转化为其他不具苦味的化合物,如图 3 所示。作用于柚皮苷的脱苦酶为柚苷酶,柚苷酶是由 α -L-鼠李糖苷酶和 β -D-葡萄糖苷酶组成的混合酶,具有 α -L-鼠李糖苷酶和 β -D-葡萄糖苷酶的活性^[51],其脱苦机制如图 1 所示。用于产生柚苷酶的菌株有米曲霉、黑曲霉、黄曲霉、大肠杆菌、蜡状芽孢杆菌,通常用于产生 α -L-鼠李糖苷酶的真菌和细菌菌株是卢氏梭状芽孢杆菌、黑曲霉、曲霉,但相比于细菌菌株,优先使用真菌菌株,因为它们具有在最少水存在下生长的能力。常用的筛菌底物有桔皮、米糠、麦麸、玉米芯、甘蔗渣、大豆壳、稻草等^[52-57]。酶处理需要在较温和的条件下进行,因为高温下酶很容易失活,故会限制其在工业化上的应用,因此,关于提高酶的耐热性、催化活性的研究对于扩大酶在实际生产中的应用价值很有必要。

固定化酶是目前工业上的趋势,它能够保持并延长酶的活性,促进其重复使用。固定化可以通过

多种方式实现,包括:(1)使用惰性材料来固定化酶;(2)用聚合凝胶晶格包裹酶;(3)用多功能试剂交联酶中的活性蛋白;(4)酶与不溶性支撑材料上的共价结合。但固定成功率取决于不同 pH 和温度下酶的活性、特定的修复基团和功能基团的存在、分子质量和酶纯度。Lei 等^[58]将柚皮苷酶通过交联剂戊二醛吸附到中孔二氧化硅 MCM-41 上,用于白葡萄柚脱苦,重复性试验数据表明,其水解度约为 44.57%,果汁中柚皮苷的转化率高达 95%。共价酶固定过程产生了一种不溶且相当稳定的酶形式,同时保留了催化特性,使酶可以在很宽的温度范围内发挥其作用。目前,固定化酶的趋势是利用纳米结构的材料作为酶的载体,包括纳米孔材料、纳米颗粒和纳米纤维^[59]。与传统载体相比,纳米结构材料具有高比面积的内在特征,有利于提高固定效率^[60]。Huang 等^[61]将带正电荷的柚皮苷酶和带负电荷的藻酸盐交替逐层涂在带负电荷的静电纺丝醋酸纤维素纳米纤维上,通过吸附和水解作用从柚子汁中去除 22.72%的柚皮苷和 60.71%柠檬苦素,且固定的柚皮苷酶的活性随涂层的增加而增加。Ladole 等^[62]首次报道了使用生态友好型生物催化剂单罐解决柑橘汁澄清和脱苦问题,通过使用氧化的壳聚糖作为大分子交联剂,将果胶酶和柚皮苷酶共同固定在壳聚糖包被的磁性纳米颗粒(chitosanMNPs)上,采用将共固定的酶对西柚汁进行单罐澄清和脱苦的评估,发现混浊度降低了约 52%,柚皮苷含量降低了约 85%,与游离酶相比,共固定化酶在高温下稳定,并显示出优异的热稳定性,半衰期延长了近 1.8 倍,储存稳定性长达 30 d。

另一种具有吸引力和挑战性的方法是利用基因工程技术。转录组学和基因组学方法的使用对于分析复杂的网状代谢途径非常有帮助,通过生物信息学分析,可以假设进一步修饰的目标,最终使代谢物发生预期的变化^[63]。早前,关于转基因柑橘树的研究工作已经开展^[64-65]。目前基因工程目标之一的酶是:(1)诺米林脱乙酰基酶;(2)柠檬酸脱氢酶;(3)葡萄糖基转移酶。在柑橘类水果中插入诸如诺米林脱乙酰基酶之类的特定酶编码基因,可以调节柠檬苦素的合成途径,通过自然生物转化将柠檬苦素等苦味物质转化成非苦衍生物,解决柑橘类果汁的苦味问题。Li 等^[66-67]对黑曲霉 JMU-TS528 所产的 α -L-鼠李糖苷酶使用定向进化技术和定点诱变开发了具

有热稳定性的 V529A 突变体和 K406R-K573R 突变体,这两种突变体在 65 °C 处理 30 min 后,仍然能保留其原始活性的 50% 以上,可以实现在橙汁生产的预热过程中水解柚皮苷,将其含量降至苦味阈值以下。基于蛋白质结构模拟的相互作用分析和分子动力学计算分析推测,突变体酶热稳定性的提高可能是由于增加了其氢键、阳离子- π 的相互作用和相对致密的构象。热稳定性突变体酶的开发,或许有望推动酶法脱苦在食品加工行业中的应用。

虽然生物技术脱苦有特异性强、靶向精准脱苦等优势,但其仍处于实验室阶段。酶的稳定性差、易变性失活、成本较高,需要选育优质高产酶的菌株,而且酶的纯化和固定化是一个繁琐的过程,不便于工业连续化生产。此外,人们对柑橘风味形成的分子机制认识还处于研究阶段,分子遗传工具和生物技术仍需进步。

3 总结与展望

在脱苦研究中,我们得知其实这些苦味物质是具有多种生物活性的,在当代注重膳食营养的大环境下,如何既不损失原有果汁的风味和营养成分又能实现高效脱苦、既简便又低成本地消除柑橘果汁中的苦味物质是大势所趋。从上述对物理、化学和生物技术脱苦方法的研究可以看出,目前还没有任何一种物理、化学或生物技术方法可以在不影响果汁的自然特性的情况下,使苦味果汁达到可口的品质。若以操作简便、重现性好、保存其天然营养特性、消费者易接受性为评判标准,与传统的物理化学方法相比,采用生物技术方法进行脱苦在这些方面表现出其独特的优势,其在处理果汁时不会造成变色、风味改变和稠度变化等问题。食品和药物管理局(FDA)规定“不得在果汁中添加或去除任何东西”,生物技术方法初步满足了该标准要求。

近年来,国内外已报道了较多的利用酶处理去除柑橘类果汁苦味的研究,利用基因工程技术对酶进行改性,将酶固定化处理,以期提高酶的催化活性和稳定性,拓宽其适用条件,降低其使用成本。但整体而言,酶法脱苦目前还缺乏一定的实用性,要实现工业化生产还需要大量的工作。此外,随着人们对柑橘风味形成的分子机制认识的不断加深,以及分子遗传工具和生物技术的不断进步,柑橘育种技术有望快速发展,如通过基因工程技术改良品种从而

实现脱苦,从根本上解决柑橘果汁的苦味问题,这将具有更加广阔的应用前景。

参考文献 References

- [1] MEHL F, MARTI G, BOCCARD J, et al. Differentiation of lemon essential oil based on volatile and non-volatile fractions with various analytical techniques: a metabolomic approach [J]. Food chemistry, 2014, 143(2): 325-335.
- [2] ZHANG H, XI W, YANG Y, et al. An on-line HPLC-FRSD system for rapid evaluation of the total antioxidant capacity of citrus fruits [J]. Food chemistry, 2015, 172: 622-629.
- [3] ZOU Z, XI W, HU Y, et al. Antioxidant activity of citrus fruits [J]. Food chemistry, 2016, 196: 885-896.
- [4] ZHANG J W, TAN L, ZHANG Y Z, et al. Debitting of lemon juice using surface molecularly imprinted polymers and the utilization of limonin [J]. Journal of chromatography B, 2019, 1104: 205-211.
- [5] KORE V T, CHAKRABORTY I. Efficacy of various techniques on biochemical characteristics and bitterness of pumelo juice [J]. Journal of food science & technology, 2015, 52(9): 6073-6077.
- [6] MCINTOSH C A, MANSELL R L, ROUSEFF R L. Distribution of limonin in the fruit tissues of nine grapefruit cultivars [J]. Journal of agricultural & food chemistry, 1982, 30(4): 689-692.
- [7] PEREIRA G A, ARRUDA H S, MORAIS D R D, et al. Mutamba (*Guazuma ulmifolia* Lam.) fruit as a novel source of dietary fibre and phenolic compounds [J/OL]. Food chemistry, 2019, 310: 125857 [2020-12-23]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125857>.
- [8] PUREWAL S S, SANDHU K S. Debitting of citrus juice by different processing methods: a novel approach for food industry and agro-industrial sector [J/OL]. Scientia horticulturae, 2021, 276: 109750 [2020-12-23]. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109750>.
- [9] LI L J, TAN W S, LI W J, et al. Citrus taste modification potentials by genetic engineering [J/OL]. International journal of molecular sciences, 2019, 20(24): 6194 [2020-12-23]. <https://doi.org/10.3390/ijms20246194>.
- [10] 孙志高, 黄学根, 焦必宁, 等. 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(6): 146-148. SUN Z G, HUANG X G, JIAO B N, et al. Studied on the distributing of main bitter components in citrus fruit and the debittering technology of orange juice [J]. Food science, 2005(6): 146-148 (in Chinese with English abstract).
- [11] PURI M, MARWAHA S S, KOTHARI R M, et al. Biochemical basis of bitterness in citrus fruit juices and biotech approaches for debittering [J]. Critical reviews in biotechnology, 1996, 16(2): 145-155.

- [12] MAHAWAR M K, JALGAONKAR K, BIBWE B, et al. Post-harvest processing and valorization of kinnow mandarin (*Citrus reticulata* L.): a review[J]. Journal of food science and technology-mysore, 2019, 57(3): 799-815.
- [13] 丁帆. 柑橘中几种苦味物质的检测及评价[D]. 武汉: 华中农业大学, 2009. DING F. Detection and evaluation of several bitter substances in citrus[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2009(in Chinese with English abstract).
- [14] ROUSEFF R L, MARTIN S F, YOUTSEY C O. Quantitative survey of narirutin, naringin, hesperidin, neohesperidin in citrus[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 1987, 35(6): 1027-1030.
- [15] PETERSON J J, BEECHER G R, BHAGWAT S A, et al. Flavanones in grapefruit, lemons, and limes: a compilation and review of the data from the analytical literature[J]. Journal of food composition and analysis, 2006, 19: S74-S80.
- [16] 李绮丽, 孙俊杰, 单杨, 等. 不同柑橘品种全果制汁适宜性分析[J]. 食品科学, 2019, 40(13): 36-44. LI Q L, SUN J J, SHAN Y, et al. Suitability evaluation of different citrus varieties for whole fruit juice processing[J]. Food science, 2019, 40(13): 36-44(in Chinese with English abstract).
- [17] VIKRAM A, JAYAPRAKASHA G K, PATIL B S. Simultaneous determination of citrus limonoid aglycones and glucosides by high performance liquid chromatography[J]. Analytica chimica acta, 2007, 590(2): 180-186.
- [18] ASHRAFUL A M, NUSRAT S, MAHBUBUR R M, et al. Effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, on metabolic syndrome and their mechanisms of action[J]. Advances in nutrition, 2014, 5(4): 404-417.
- [19] FISHER J F, WHEATON T A. A high-pressure liquid chromatographic method for the resolution and quantitation of naringin and naringenin rutinoside in grapefruit juice[J]. J Agric Food Chem, 1976, 24(4): 898-899.
- [20] CHEN R, QI Q L, WANG M T, et al. Therapeutic potential of naringin: an overview[J]. Pharmaceutical biology, 2016, 54(12): 3203-3210.
- [21] YUSOF S, GHAZALI H M, KING G S. Naringin content in local citrus fruits[J]. Food chemistry, 1990, 37(2): 113-121.
- [22] YANG R, SONG C, CHEN J, et al. Limonin ameliorates acetaminophen-induced hepatotoxicity by activating Nrf2 antioxidative pathway and inhibiting NF- κ B inflammatory response via upregulating Sirt1 [J/OL]. Phytomedicine, 2020, 69: 153211 [2020-12-23]. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2020.153211>.
- [23] MINAMISAWA M, SUZUKI K, KAWAI G, et al. Functional evaluation of yuzu (*Citrus junos*) extracts containing limonoids and polyamine for life extension[J]. Journal of functional foods, 2017, 38: 591-600.
- [24] CHATTERJEE T, BHATTACHARYYA D K. Biotransformation of limonene by *Pseudomonas putida*[J]. Applied microbiology & biotechnology, 2001, 55(5): 541-546.
- [25] OU P, HASEGAWA S, HERMAN Z, et al. Limonoid biosynthesis in the stem of citrus limon[J]. Phytochemistry, 1988, 27(1): 115-118.
- [26] WANG F, WANG M, LIU X, et al. Identification of putative genes involved in limonoids biosynthesis in citrus by comparative transcriptomic analysis[J]. Frontiers in plant science, 2017, 8: 782.
- [27] 沈雯, 许健. 柠檬苦素类似物及其D环内酯酶研究进展[J]. 医学研究杂志, 2010, 39(4): 111-113. SHEN W, XU J. Research progress of limonin analogue and its D-ring lactase[J]. Journal of medical research, 2010, 39(4): 111-113 (in Chinese with English abstract).
- [28] MONTOYA C, GONZALEZ L, PULIDO S, et al. Identification and quantification of limonoid aglycones content of citrus seeds[J]. Revista Brasileira de farmacognosia, 2019, 29(6): 710-714.
- [29] KIMBALL D. Bitterness in citrus juices[M]. Dordrecht: Springer Netherlands, 1991.
- [30] MANNERS G D. Citrus limonoids: analysis, bioactivity, and biomedical prospects[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2007, 55(21): 8285-8294.
- [31] ROYA, SARAF S. Limonoids: overview of significant bioactive triterpenes distributed in plants kingdom[J]. Biological & pharmaceutical bulletin, 2006, 29(2): 191-201.
- [32] MORIGUCHI T, KITA M, HASEGAWA S, et al. Molecular approach to citrus flavonoid and limonoid biosynthesis[J]. Journal of food agriculture & environment, 2003, 1(1): 22-25.
- [33] ARORA S, MOHANPURIA P, SIDHU G S, et al. Cloning and characterization of limonoid glucosyltransferase from Kinnow mandarin (*Citrus reticulata* Blanco)[J]. Food technology and biotechnology, 2018, 56(2): 228-237.
- [34] 王松林, 彭荣, 崔榕, 等. 类柠檬苦素生物转化与脱苦研究进展[J]. 食品科学, 2015, 36(9): 279-283. WANG S L, PENG R, CUI R, et al. Biotransformation and debittering of limonoids: an overview[J]. Food science, 2015, 36(9): 279-283(in Chinese with English abstract).
- [35] PREMI B R, LAL B B, JOSHI V K. Distribution pattern of bittering principles in Kinnow fruit[J]. Journal of food science & technology-mysore, 1994, 31(2): 140-141.
- [36] SANDHU K S, SINGH N. Studies on the factors affecting the physico-chemical and organoleptic properties of Kinnow juice[J]. Journal of food science & technology-mysore, 2001, 38(3): 266-269.
- [37] THAKUR N K, KAUSHAL B B L. Effect of level of juice extraction on physico-chemical characteristics and bitterness of heat processed Kinnow juice[J]. Journal of food science & technology, 2000, 37(4): 412-414.

- [38] ZID M B, DHUIQUE-MAYER C, BELLAGHA S, et al. Effects of blanching on flavanones and microstructure of citrus aurantium peels[J]. Food and bioprocess technology, 2015, 8(11):2246-2255.
- [39] JAGANNATH A, KUMA R, MANORANJAN K. Monitoring blanching induced debittering and storage losses of naringin in orange subjected to osmotic dehydration[J]. International journal of fruit science, 2016, 16(4):410-422.
- [40] WETHERN M. Citrus debittering with ultrafiltration/adsorption combined technology[J]. Transactions of the citrus engineering conference (USA), 1991, 37:48-66.
- [41] CASSANO A, BASILE A. Integrating different membrane operations and combining membranes with conventional separation techniques in industrial processes[M]. Cambridge, UK: Woodhead Publishing, 2013.
- [42] ILAME S A, SINGH S V. Physico-chemical properties of ultrafiltered Kinnow (mandarin) fruit juice[J]. Journal of food science & technology, 2018, 55(6):2189-2196.
- [43] CHANDLER B V, KEFFORD J F, ZIEMELIS G. Removal of limonin from bitter orange juice[J]. Journal of the science of food & agriculture, 2010, 19(2):83-86.
- [44] JOHNSON R L, CHANDLER B V. Reduction of bitterness and acidity in grapefruit juice by adsorptive processes[J]. Journal of the science of food & agriculture, 1982, 33(3):287-293.
- [45] SOGI D S, SINGH S. Studies on bitterness development in Kinnow juice, ready-to-serve beverage, squash, jam and candy[J]. Journal of food science and technology-mysore, 2001, 38(5):433-438.
- [46] DESHAWARE S, GUPTA S, SINGHAL R S, et al. Debittering of bitter gourd juice using β -cyclodextrin: mechanism and effect on antidiabetic potential[J]. Food chemistry, 2018, 262:78-85.
- [47] KONNO A, MISAKI M, TODA J, et al. Bitterness reduction of naringin and limonin by β -cyclodextrin[J]. Agricultural & biological chemistry, 1982, 46(9):2203-2208.
- [48] SHAW P E, BUSLIG B S. Selective removal of bitter compounds from grapefruit juice and from aqueous solution with cyclodextrin polymers and with Amberlite XAD-4[J]. Journal of agricultural & food chemistry, 1986, 34(5):837-840.
- [49] BINELLO A, ROBALDO B, BARGE A, et al. Synthesis of cyclodextrin-based polymers and their use as debittering agents[J]. Journal of applied polymer science, 2010, 107(4):2549-2557.
- [50] CAVIA-SAIZ M, MUNIZ P, ORTEGA N, et al. Effect of enzymatic debittering on antioxidant capacity and protective role against oxidative stress of grapefruit juice in comparison with adsorption on exchange resin[J]. Food chemistry, 2011, 125(1):158-163.
- [51] 张凤凤. 柚苷酶在柑橘类果汁脱苦中的应用[J]. 安徽农学通报, 2014, 20(12):39-44. ZHANG S S. Application of naringinase on debittering of citrus juice[J]. Anhui agricultural science bulletin, 2014, 20(12):39-44 (in Chinese with English abstract).
- [52] CHEN D X, NIU T G, CAI H N. Optimizing culture medium for debittering constitutive enzyme naringinase production by *Aspergillus oryzae* JMU316[J]. African journal of biotechnology, 2010, 9(31):4970-4978.
- [53] LUO J, LI Q, SUN X, et al. The study of the characteristics and hydrolysis properties of naringinase immobilized by porous silica material[J]. RSC advances, 2019, 9(8):4514-4520.
- [54] SRIKANTHA K, RANGANATH K, SEEVARATNAM V. Characterization of best naringinase producing fungus isolated from the citrus fruits[J]. International journal of biological research, 2016, 4(2):83-87.
- [55] PATIL S V, KOLI S H, MOHITE B V, et al. A novel screening method for potential naringinase-producing microorganisms[J]. Biotechnology and applied biochemistry, 2019, 66(3):323-327.
- [56] PEGU B K, CHUTIA J, KARDONG D, et al. Optimization of environmental parameters for enhancement of naringinase production of *Bacillus cereus*-K1 a bacterial strain[J]. Int J Adv Sci Res Manag, 2019, 4(7):68-73.
- [57] YADAV S, KUMAR D, YADAV K D S. α -L- Rhamnosidases produced under solid state fermentation by few *Aspergillus* strains[J]. Biotechnology journal international, 2018, 21(4):1-8.
- [58] LEI S, XU Y, FAN G, et al. Immobilization of naringinase on mesoporous molecular sieve MCM-41 and its application to debittering of white grapefruit[J]. Applied surface science, 2011, 257(9):4096-4099.
- [59] KIM J, GRATE J W, WANG P. Nanostructures for enzyme stabilization[J]. Chemical engineering science, 2006, 61(3):1017-1026.
- [60] SAALLAH S, NAIM M N, LENGGORO I W, et al. Immobilisation of cyclodextrin glucanotransferase into polyvinyl alcohol (PVA) nanofibres via electrospinning[J]. Biotechnology reports (Amsterdam, Netherlands), 2016, 10:44-48.
- [61] HUANG W, ZHAN Y, SHI X, et al. Controllable immobilization of naringinase on electrospun cellulose acetate nanofibers and their application to juice debittering[J]. International journal of biological macromolecules, 2017, 98:630-636.
- [62] LADOL E, MAYUR R, POKAL E, et al. One pot clarification and debittering of grapefruit juice using co-immobilized enzymes@chitosanMNPs[J]. International journal of biological macromolecules, 2020, 167:1297-1307.
- [63] NARNOLIYA L K, KAUSHAL G, SINGH S P, et al. De novo-transcriptome analysis of rose-scented geranium provides insights into the metabolic specificity of terpene and tartaric acid biosynthesis[J/OL]. BMC genomics, 2017, 18:74 [2020-12-

- 23]. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3437-0>.
- [64] ORBOVIC V, CALOVIC M, DUTT M, et al. Production and characterization of transgenic citrus plants carrying p35 anti-apoptotic gene[J]. *Scientia horticulturae*, 2015, 197: 203-211.
- [65] PONS E, PERIS J E, PENA L. Field performance of transgenic citrus trees assessment of the long-term expression of uidA and nptII transgenes and its impact on relevant agronomic and phenotypic characteristics[J/OL]. *BMC biotechnology*, 2012, 12: 41 [2020-12-23]. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-12-41>.
- [66] LI L J, WU Z Y, YU Y, et al. Development and characterization of an α -L-rhamnosidase mutant with improved thermostability and a higher efficiency for debittering orange juice[J]. *Food chemistry*, 2017, 245: 1070-1078.
- [67] LI L, LIAO H, YANG Y, et al. Improving the thermostability by introduction of arginines on the surface of α -L-rhamnosidase (r-Rha1) from *Aspergillus niger*[J]. *International journal of biological macromolecules*, 2018, 112: 14-21.

Bitter substances and progress of debittering technology in citrus juice

ZHANG Nawei, PAN Siyi, FAN Gang, REN Jingnan

Key Laboratory of Environment Correlative Dietology of Ministry of Education/College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract Citrus juice is rich in various minerals and vitamins and has high nutritional value. However, the debittering in citrus juice has always been a main problem faced by the industry of processing citrus. A small amount of bitterness can provide a specific flavor for citrus juice, but the strong bitterness will affect the quality and sales of citrus products. We overviews the biochemical properties, structure, enzymes involved in the catabolic pathway of naringin causing the ‘immediate’ bitterness and limonin causing ‘delayed’ bitterness of citrus juice. It discusses the progress of different physical chemistry and biotechnology of debittering in recent years. The mechanism, advantages and disadvantages of corresponding debittering methods are briefly described. The development trend of debittering technology in citrus juice is prospected.

Keywords citrus juice; naringin; limonin; debittering; citrus juice; deep processing; bitter substances

(责任编辑:赵琳琳)