中華農業研究(J. Agric. Res. China) 52:228~237 (2003)

利用酵素去除葡萄柚汁苦味之成分[1]

簡伯容[2,5]　徐源泰[3]　楊淑惠[4]

摘　要

簡伯容、徐源泰、楊淑惠。2003。利用酵素去除葡萄柚汁苦味之成分。中華農業研究：52:228-237。

本研究探討利用酵素應用於葡萄柚汁去苦味加工的可行性，以及去苦味葡萄柚汁的品質變化與接受度。研究結果顯示未經去苦味酵素處理之葡萄柚汁於加工過程中，柚苦苷含量並無顯著的變化；除此之外，更進一步探討國人對葡萄柚汁苦味的接受性及在加工過程中直接添加去苦味酵素柚苦苷酶(naringinase)、α-L-鼠李糖苷酶(α-L-rhamnosidase)與β-D-葡萄糖苷酶(β-D-glucosidase)於葡萄柚汁作用後之接受度，研究結果發現去苦味酵素處理可去除葡萄柚汁中的柚苦苷，但不改變果汁中的一般成分，而品評試驗發現利用去苦味酵素 α-L-鼠李糖苷酶降低葡萄柚汁的苦味，可顯著提高消費者喜好度。

關鍵詞：去苦味、α-L-鼠李糖苷酶、柚苦苷、葡萄柚汁。

前　言

葡萄柚在園藝分類上屬於芸香科多年生常綠果樹，其學名爲 *Citrus paradis* Macf. 。葡萄柚中主要物質爲柚苦苷(naringin)，其由一個配醣體(aglycone)及一個鼠李糖-葡萄糖苷(rhamnoglucoside)所構成(倪等 1999)，而苦味的有無主要在於所含的雙醣類(glycoside)的種類，大多數的類黃酮物質 (flavonoids)所含的雙醣類(glycoside)，由鼠李糖(rhamnose)和葡萄糖(glucose)所組成，主要的不同在於鼠李糖接在葡萄糖(glucose)上碳原子的位置不同，若鼠李糖與葡萄糖的連接是 1→2 鍵結，則具苦味，而 1→6 鍵結，則不具苦味(Horowitz & Gentili 1969)。

葡萄柚果汁中的主要苦味成分爲柚苦苷，可經柚苦苷酶(naringinase)水解去除之。一般而言，柚苦苷酶包括 α-L-鼠李糖苷酶(α-L-rhamnosidase, EC3.2.1.40)及β-D-葡萄糖苷酶(β-D-glucosidase)之活性，其水解柚苦苷之作用機制，主要分爲兩步驟，首先α-L 鼠李糖苷酶先作用，將柚苦苷水解爲鼠李糖及洋夸苷(prunin)，其中洋夸苷之苦味僅爲柚苦苷之三分之一。第二步驟β-D-葡萄糖苷酶作用，將洋夸苷水解爲葡萄糖及不具苦味之柚苷素(naringenin) (Remero 1985)。

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告 2165 號。接受日期：92 年 7 月 4 日。
2. 元培科學技術學院食品科學系助理教授。臺灣省　新竹市。
3. 臺灣大學園藝學研究所教授。臺北市。
4. 本所鳳山熱帶園藝試驗分所助理研究員。臺灣省　高雄縣　鳳山市。
5. 通訊作者，電子郵件：jungchien@mail.yust.edu.tw; 傳眞機:(03)5385353。

在果汁加工方法中，由於葡萄柚榨汁容易，果汁穩定，但含有苦味。葡萄柚果汁在加工上存在的問題，主要在於其中所含有過量的苦味成分爲柚苦苷(Hour *et al.* 1980 ; Ting *et al.* 1986)，有時過多的苦味成分，常會造成消費者對葡萄柚果汁難以接受。而降低柚苦苷含量的方法可分爲吸附法及酵素法兩種。在吸附法方面，Robert & Chandler (1982)曾使用 Amberlite XAD-7 及 Deacidite - FFIP 等離子交換樹脂來去除苦味；Barmore (1986) 等人亦使用 Florisil (activated magnnesium silicate)來降低葡萄柚果汁中之苦味。一般而言，利用吸附法降低苦味的程度十分有限，且須考量吸附劑安全性的問題、操作成本及果汁懸浮物影響品質與安定性等因素，使得果汁工業上應用吸附法的實用性並不高。

在酵素法方面，由於酵素特異專一性及安全上接受性高，故較易被一般人接受。早期許多研究者以商業用粗酵素柚苦苷酶爲來源，用不同材質加以不溶性化，如 DEAE-Sephadex (Ono1977), tannnin-aminohexylcellulose (Park & Chang 1978), glass beads (Olson 1979), hollow fiber (Yeh & Tsen 1987), chitin (Tsen 1984)。虞 (1989) 將柚苦苷酶嵌入醋酸纖維中水解葡萄柚汁的柚苦苷。亦可將柚苦苷酶固定於 hollow fiber 薄膜上進行連續處理，在流速 45 ml/min 下處理，可將葡萄柚汁中的柚苦苷由 885μg/ml 降低爲 285μg/ml。根據 1998 年文獻報告，利用固定柚苦苷酶於包裝膜(醋酸纖維膜)上來降低葡萄柚汁中的苦味(Soares & Hotchkiss 1998)。

而共同固定化酵素法的問題主要爲將酵素固定於材質上時，往往造成酵素大量失去活性，且加工時酵素的穩定性不佳，另一方面擔體材質顆粒太小，很容易於操作過程中造成管路阻塞，不但降低去除苦味的效果，也使得加工流程難以連貫。因此本研究以單一純酵素直接添加於葡萄柚汁中，探討其品質與接受度。

首先探討葡萄柚汁加工過程中，柚苦苷含量的變化；以及添加去苦味酵素後，對葡萄柚汁成分的影響，據此探討葡萄柚汁在去苦味加工前後的成分是否有顯著差異；除此之外，希望更進一步探討國人對葡萄柚汁苦味的接受性及在加工過程中添加去苦味酵素柚苦苷酶、α-L-鼠李糖苷酶與 β–D-葡萄糖苷酶於葡萄柚汁作用後，對去苦味葡萄柚汁的接受度，藉此了解去苦味葡萄柚汁是否具有廣受市場歡迎的潛力，以供未來生物技術研究發展的參考依據。

材料與方法

葡萄柚汁的製造

原料來源爲雲林縣古坑鄉農會省產葡萄柚 (*Citrus paradisi*, Macf.)，果肉顏色爲紅色系，購自台北超市。葡萄柚經切半榨汁，過濾並除果肉，接著以 8,000g 離心 10 分鐘，在 91°C 下殺菌 12.7 秒(Kew *et al* 1957)，冷卻後於 –20 °C 下貯藏四星期後，進行柚苦苷含量的測定與分析。

添加去苦味酵素於葡萄柚汁的加工

葡萄柚經切半榨汁，過濾並除果肉，接著以 8,000×g 離心 1 分鐘，加入去苦味酵素柚苦苷酶(300 IU/g, from *Penicillium decumbens*) 0.5 mg/ml 或同時加入α-L-鼠李糖苷酶(10 IU/g, from *Penicillium decumbens*) 0.1mg/ml 及 β-D-葡萄糖苷酶(30 IU/mg, from Almonds) 0.1 mg/m1 酵素購自 Sigma, St. Louis, Mo) 反應 30 分鐘。在 91 °C 作用下殺菌 12.7 秒 (Kew *et al* 1957)，冷卻後於 20 °C 下貯藏四星期後，進行柚苦苷含量的測定與分析。

柚苦苷含量的測定與分析

將上述葡萄柚汁樣品，分別取 50%(v/v)的果汁樣品加入等體積無水乙醇混合均勻，經 8,000×g 離心 10 分鐘後後取上清液，以微孔濾器(0.45 μm)過濾後進行 HPLC(購自 JASCO Japan)分析。移動相組成爲 acetonitrile : H_2O=30/70，以 0.45 μm 膜過濾並脫氣，流速爲 0.8 ml/min。 HPLC 層析管柱爲 C-18 reverse phase column 層析管柱(購自 Mecrk KGaA, Darmstadt, Germany)，偵測器(UV detector)以波長爲 280 nm。樣品注入爲 20 μl，由層析圖之滯留時間與其積分面積來判定(Chien *et al.* 2001)。

水分的測定

坩堝前處理：坩堝浸泡 10%鹽酸溶液中加熱，再以去離子水洗淨。烘乾後置於乾燥器內冷卻約 30 分鐘，再精秤。重覆烘乾、冷卻、精秤操作直到恆重。

水分之定量：將乾燥貯藏的樣品精秤 5g 放入坩堝內，於 110°C 烘箱內烘乾 4～6 小時，取出立即置入乾燥器中，冷卻 30 分鐘取出秤重，由前後之失重計算出樣品中水分之重量。重複以上操作直到恆重。

pH 值的測定

樣品爲經去苦味酵素處理過的葡萄柚汁，與經去苦味酵素處理過的葡萄柚汁，取適量樣品於室溫下以 pH meter 測定。

可溶性固形物的測定

樣品爲未經去苦味酵素處理過的葡萄柚汁，與經去苦味酵素處理過的葡萄柚汁，取適量樣品於室溫下以 Hand refractometer (ATAGO, Japan) 測定，以 °Brix 表示之。

可滴定酸度的測定

樣品爲去苦味酵素處理過的葡萄柚汁，與經去苦味酵素處理過的葡萄柚汁。取 25 ml 的樣品並秤重加熱沸騰，冷卻後加入 100 ml 去離子水。以 0.1 N 氫氧化鈉溶液滴定至 pH 8.1 ，並以檸檬酸(分子量爲 192)爲計算標準， 其中 0.1N NaOH 的力價(f) = 1.004。公式如下：

$$\text{可滴定酸度(\%)} = \frac{\text{0.1 N NaOH 滴定的 ml 數} \times f \times 0.0064}{\text{樣本}} \times 100$$

醣類之分析

參考 Shaw & Wilson (1983)方法修改之。移動相組成爲水，以 0.45 μm 膜過濾並脫氣，流速爲 0.6 ml/min。 HPLC 層析管柱爲 Bio - Rad Aminex-HPX 87C (300×7.8 mm)，溫度爲 80 °C。偵測器爲 RI detector。樣品注入爲 20 μl，由層析圖之滯留時間與其積分面積來判定。

有機酸之分析

參考 Shaw & Wilson (1983)方法修改之。移動相組成爲 5 mM H_2SO_4，以 0.45 μm 膜過濾並脫氣，流速爲 0.6 ml/min。HPLC 層析管柱爲 Bio - Rad Aminex-HPX 87H (300×7.8 mm)，溫度爲 50 °C。偵測器(UV detector)以波長爲 210 nm。樣品注入爲 20 μl，由層析圖之滯留時間與其積分面積來判定。

蛋白質的含量

參照 PIERCE 公司 BCA Protein Assay Reagent 之方法。其原理利用 BCA (bicinchoninic acid)方法測定。於波長 562 nm 下測定其吸光值；以已知濃度 BSA (bovine serum albumin) 爲蛋白質標準品，繪製標準曲線，定量蛋白質含量。

維生素 C 的測定

主要參考參考 AOAC (1984) 第 43.064 節之方法。取 2 ml 抗壞血酸標準溶液(精秤 0.025 g 抗壞血酸，以 HPO_3 - HOAc 溶解並定量至 50 ml，使其濃度爲 50 mg/100 ml，每次使用時重新配置)，以 indophenol 溶液 (60 g HPO_3 及 160 ml 冰醋酸，加入 700 ml 蒸餾水並攪拌，待 HPO_3 完全溶解後定量至 1 L)滴定至粉紅色，且顏色維持三秒不變後，記錄所使用的 Indophenol 溶液體積，稱之爲標準溶液滴定數(A)。取 5 ml 果汁樣品並加入 5 ml HPO_3-HOAc，以 indophenol 溶液(0.042 g $NaHCO_3$ 以少許溫水溶解，再加入 0.05 g 2,6-dichlorophenol-indophenol,sodium salt 並攪拌使之溶解後定量至 200 ml，配置好的溶液過濾於褐色瓶中，於 5°C 貯存)滴定至粉紅色，且顏色維持三秒不變後，記錄所使用的 indophenol 溶液體積，稱之爲樣品滴定數(B)。

$$\text{抗壞血酸(mg/100 ml)} = \frac{\text{B ml} \times 2 \text{ ml} \times 50 \text{ mg /100 ml}}{\text{A ml} \times \text{樣品體積(ml)}}$$

色度的測定

取 15 mL 的果汁以色差儀(color and color difference meter, model ND-1001 DP, Nippon Denshoku KOGYO Co., LTD.)測定果汁中的 Hunter L、a、b 值(L 值爲亮度，當 L 值爲 100 時爲全白，L = 0 時，爲全黑；+a 表示紅色度，-a 表示綠色度；+b 表示黃色度，-b 表示藍色度)。所用之標準白板爲 X = 83.3, Y = 81.0, Z = 93.9，測定方法以透射方式進行。

品嚐試驗

果汁樣品經去苦味酵素加工後爲不同含量柚苦苷(0 ~ 600 ppm)的葡萄柚汁，以逢機方式供給 30 位台灣大學學生(男生 15 位，女生 15 位)，年齡範圍爲 20 ~ 35 歲。品評員的選擇對象爲對葡萄柚汁無特別喜好或厭惡者。依苦味接受程度給分，評分方式爲九分法，其中九分爲非常能接受，一分爲非常不能接受，並記錄與描述品評結果。品評實驗測定以 ANOVA 程式進行變域分析。

嗜好性品評

果汁樣品爲未經酵素處理與利用不同去苦味酵素處理的葡萄柚汁，以逢機方式供給 30 位台灣大學學生(男生 15 位，女生 15 位)，年齡範圍爲 20 ~ 35 歲。品評員的選擇對象爲對葡萄柚汁無特別喜好或厭惡者。依苦味、酸味、甜味及整體喜好程度給分，評分方式爲九分法，其中九分爲非常喜歡，一分爲非常討厭，並記錄與描述品評結果。品評實驗測定以 ANOVA 程式進行變域分析。

統計分析

每一處理將進行三重覆(triplicate, n=3)分析(品評試驗 n=30)，所有實驗將至少進行重覆兩次(repeated at least twice)。若重覆之結果相符，則擇一表示。實驗數據以套裝統計軟體 PC-SAS (Statistical Analysis System, SAS Institute Inc., USA)進行 one-way ANOVA 組間差異分析(Least Significant Difference, LSD)。若兩組相符之機率 $p < 0.05$,則視爲具顯著差異。

結　果

加工過程對葡萄柚汁苦味降低之效果

研究結果顯示葡萄柚汁加工過程中，去除果渣後，柚苦苷大約降低 10 ppm，經離心分離、加熱殺菌及-20°C 貯藏後，洋夸苷幾乎沒有改變(如圖 1)。當去除果肉且經添加去苦味酵素處理(步驟三)後，柚苦苷明顯去除，而經離心、殺菌後洋夸苷沒有明顯變化，但柚苷素在殺菌後卻明顯降低，顯示去苦味酵素可以去除柚苦苷，除此之外，柚苷素在高溫下並不穩定，且易被破壞。至於冷凍貯藏後對於洋夸苷及柚苷素並無明顯變化(如圖 2)。

去苦味酵素加工處理後葡萄柚汁之成分變化

添加去苦味酵素作用於葡萄柚汁時，結果由表一顯示添加去苦味酵素與未添加酵素的葡萄柚汁的 pH 值並無顯著改變，pH 值約皆爲 3.3。經實驗結果葡萄柚汁中的有機酸主要爲檸檬酸和蘋果酸，前者量約爲 1.46g/100 ml，後者量約爲 0.2 g/100 ml，不論是否有添加去苦味酵素，檸檬酸和蘋果酸的含量沒有顯著差異(p>0.05)。但抗壞血酸因加熱殺菌後明顯被破壞，而添加去苦味酵素對其並無任何影響。至於可滴定酸度皆約爲 1.1%。葡萄柚汁醣類分析主要爲蔗糖、葡萄糖及果糖，於其添加去苦味酵素與否都沒有顯著改變。而於未添加去苦味酵素與添加去苦味酵素的葡萄柚汁中的可溶性固形物之差異並不大，大約爲 8.3 °Brix。同時去苦味酵素加工處理後葡萄柚汁之蛋白質的總量亦沒有顯著差異(p>0.05)。

葡萄柚汁於不同去苦味酵素處理後果汁的色度變化，係利用色差儀測得結果顯示加工後的葡萄柚汁(L=73.4)比新鮮的葡萄柚汁(L=65.9) (fresh squeezed grapefruit juice, NO.1)的 L 值高(表 2)。但經商業用去苦味酵素柚苦苷酶處理後(如圖 3, NO.3)，顏色明顯變黃，而 α-L-鼠李糖苷酶(如圖 3, NO.4)的加入時，葡萄柚汁的顏色與加工後(如圖 3, NO.2)的顏色相近，同時加入 α-L-鼠李糖苷酶和 β-D-葡萄糖苷酶(如圖 3, NO.5)比單獨加入 α-L-鼠李糖苷酶的顏色稍淺(如圖 3)。

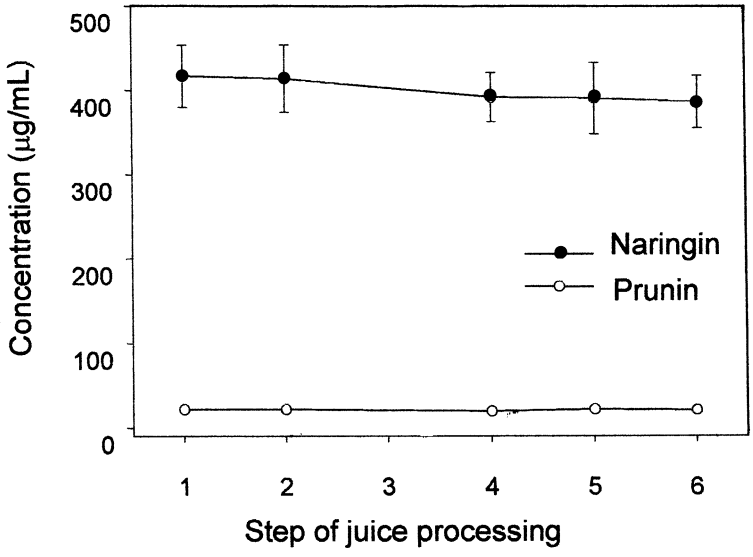


圖 1. 葡柚汁加工處理過程中苦味物質之變化 。

Fig 1. The changes of bittering components in grapefruit juice during juice processing. (1. squeezed; 2. filtration; 3. debittering enzymatic treatment by an enzyme mixture of α-L-rhamnosidase (0.1 mg/mL) and β-D-glucosidase (0.1 mg/mL); 4. centrifugation ; 5. pasteurization ; 6. after 4 weeks of storage at -20 °C).

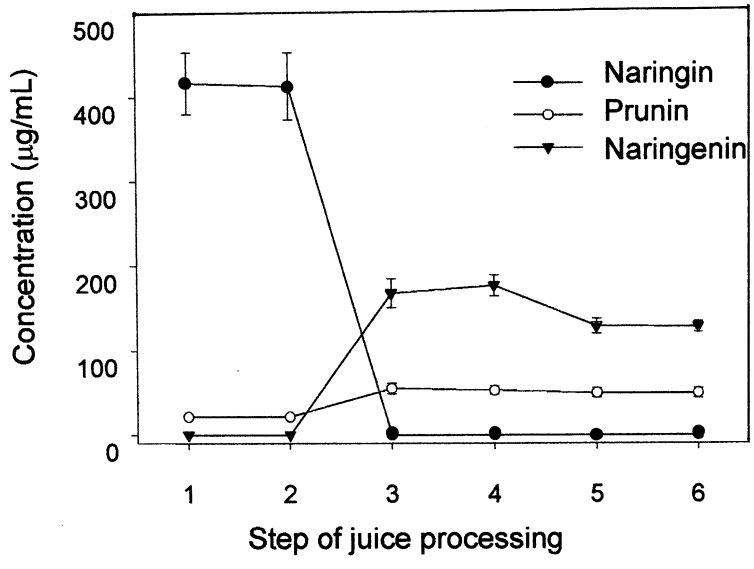


圖 2. 柚苦苷於葡萄柚汁經去苦味酵素加工處理後之變化。

Fig 2. The hydrolytic conversions of naringin to prunin and prunin to naringenin during debittering processing for grapefruit juice. (The naringin level in the juice blank was determined as 418.5 mg/mL. 1. squeezed; 2. filtration; 3. debittering enzymatic treatment by an enzyme mixture of α-L-rhamnosidase (0.1 mg/mL) and β-D-glucosidase (0.1 mg/mL); 4. centrifugation ; 5. pasteurization ; 6. after 4 weeks of storage at -20 °C).

表 1. 去苦味加工處理後葡萄柚汁之成分變化

Table 1. The changes of some components in grapefruit juice during debittering processing

Type of juice [z]	Water (%)	Total protein (mg/ml)	Sugars			
			Sucrose (%)	Glucose (%)	Frucose (%)	◦ Brix
Gra juice (fresh)	89.8±0.4 [y] a [x]	2.0±0.4a	1.8±0.2a	2.0±0.2a	2.3±0.1a	8.0±0.2a
Gra juice (processing)	90.2±0.3a	1.9±0.7a	1.8±0.2a	2.0±0.2a	2.3±0.1a	8.0±0.2a
Nar juice	89.8±0.4 [y] a [x]	2.0±0.4a	1.8±0.2a	2.0±0.2a	2.3±0.1a	8.0±0.2a
R juice	89.8±0.4 [y] a [x]	2.0±0.4a	1.8±0.2a	2.0±0.2a	2.3±0.1a	8.0±0.2a
RG juice	89.8±0.4 [y] a [x]	2.0±0.4a	1.8±0.2a	2.0±0.2a	2.3±0.1a	8.0±0.2a
G juice	89.8±0.4 [y] a [x]	2.0±0.4a	1.8±0.2a	2.0±0.2a	2.3±0.1a	8.0±0.2a

Type of juice [z]	Acids				
	Titratable Acidity (%)	Citric acid (g/100 ml)	D,L-malic acid (g/100 ml)	Vit C (MG/100 ML)	pH
Gra juice (fresh)	1.1±0.2a	1.1±0.1a	0.2±0.1a	73.1±3.9a	48.7±2.5b
Gra juice (processing)	1.5±0.2a	1.5±0.3a	0.2±0.1a	3.2±0.2a	3.3±0.1a
Nar juice	1.1±0.2a	1.1±0.1a	0.2±0.1a	73.1±3.9a	48.7±2.5b
R juice	1.5±0.2a	1.5±0.3a	0.2±0.1a	3.2±0.2a	3.3±0.1a
RG juice	1.1±0.2a	1.1±0.1a	0.2±0.1a	73.1±3.9a	48.7±2.5b
G juice	1.5±0.2a	1.5±0.3a	0.2±0.1a	3.2±0.2a	3.3±0.1a

[z] Gra juice: Grapefruit juice; Nar juice: juice debittering by naringinase; R juice: juice debittered by a-L-rhamnosidase; RG juice debittered by a-L-rhamnosidase and β-D-glucosidase; G juice: juice debittered by β-D-glucosidase.

[y] Results are presented as mean ± S. D. The experiments were performed 3 times.

[x] Values within a column with the same letter are not significantly different (p>0.05).

表 2. 去苦味酵素加工處理後葡萄柚汁 L, a, b 值之變化

Table 2. Changes of L、a、b values in grapefruit juice during debittering processing

The types of juice [z]	L	a	b
Fresh squeezed juice	65.9±1.5	6.6±0.9	7.6±1.1
Grapefruit juice processing	73.4±3.1	5.5±0.8	8.2±1.0
Nar juice	51.8±2.0	14.4±1.2	22.4±1.7
R juice	53.2±2.1	14.3±1.1	15.5±1.3
RG juice	53.2±2.4	13.3±0.9	13.8±1.1

[z] Nar juice; juice debittering by naringinase; R juice: juice debittering by α-L-rhamnosidase; RG juice: juice debittering by α-L-rhamnosidase and β-D-glucosidase. Values within a column with the same letter are not significantly different (p>0.05). The experiments were performed 3 times.

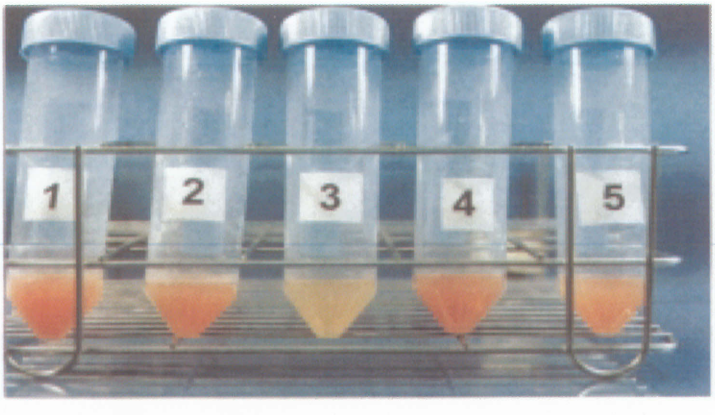


圖 3. 葡萄柚汁經去苦味酵素加工處理後之顏色變化。

Fig 3. The color changes of grapefruit juice debittered by different enzymes. (1. frseh grapefruit juice; 2. undebittered processing grapefruit juice; 3. naringinase debittered grapefruit juice; 4. α-L-rhamnosidase debittered grapefruit juice; 5. α-L-rhamnosidase and β-D-glucosidase debittered grapefruit juice.).

不同濃度柚苦苷之葡萄柚汁的接受度

根據美國農部(USDA)所屬的佛羅里達柑橘研究所(Florida Citrus Department)認爲 A 級的葡萄柚果汁其柚苦苷含量應低於 600ppm 以下(虞, 1989)，而歐洲的標準認爲柚苦苷應介於 300~700ppm 間 (Buffu *et al.* 1962)。而本研究依苦味喜好程度給分，評分方式爲九分法，其中九分爲非常喜歡，一分爲非常討厭，並記錄與描述品評結果。表 3 結果顯示國人對苦味的接受範圍爲小於 100ppm，苦味物質若大於 200ppm 便無法接受，故國人對苦味的接受性遠低於美國與歐洲，由此可知不同種族的人類對苦味的接受度有很大的差異。柚苦苷濃度於 100~200ppm 時，苦味平均接受性大爲提高。當柚苦苷小於 100ppm 時，國人平均接受度爲 6.4±1.2 分，其中男性接度爲 7.1±1.1 分，女性性接度爲 5.8±1.0 分。

不同酵素添加於葡萄柚汁之接受性

添加去苦味酵素降低苦味是本研究重點，根據表 4 之研究結果顯示添加去苦味酵素於葡萄柚汁的接受度較高。而未添加去苦味酵素的分數只有 2.0±0.8 分，其中以單獨添加 α-L-鼠李糖苷酶的喜好度最高，分數爲 6.5±1.2 分，其次是柚苦苷酶及同時加入 α-L-鼠李糖苷酶與 β-D-葡萄糖苷酶，分數依次爲 5.7±0.8 分及 6.0±0.8 分，且兩者並無顯著差異。

表 3. 品嚐者對葡萄柚汁含不同濃度柚苦苷之果汁的接受度

Table 3. The mean ratings of bitterness recipient for grapefruit juices with different concentrations

Concentration of naringin (ppm)	Male	Female	Average
≧ 500 ppm	1.6±0.9 [z] c [y]	1.6±0.9 b	1.6±0.9 c
200 ~ 300 ppm	2.1±0.8 c	1.9±1.0 b	2.0±0.9 c
100 ~ 200 ppm	5.7±1.4 b	5.5±1.5 a	5.6±1.4 b
≦ 100 ppm	7.1±1.1 a	5.8±1.0 a	6.4±1.2 a
0 ppm	6.5±1.4 a	6.3±1.1 a	6.4±1.3 a

[z] The score sheet was used numbered 0 through 9, where 0 indicated no intensity and 9 indicated extreme intensity (Hedonic scale).

[y] Values within a column fallowed by same letter sare not significantly different (p>0.05), according to sensory evaluation.

表 4. 品嚐者對不同酵素添加於葡萄柚汁之接受度

Table 4. The mean ratings of acceptance for grapefruit juice added the naringinase、α-L-rhamnosidase、α-L-rhamnosidase and β-D-glucosidase

Type of juice [z]	Male	Female	Average
Ori juice	2.1±0.9 c[y]	1.8±0.8 c	2.0±0.8 c
Nar juice	5.7±0.9 b	5.7±0.7 b	5.7±0.8 b
R juice	7.1±1.1 a	5.9±0.9 ab	6.5±1.2 a
RG juice	5.6±0.6 b	6.2±0.8 a	6.0±0.8 b

[z] Ori juice:fresh grapefruit juice; Nar juice:juice debittering by naringinase; R juice:juice debittering by α-L-rhamnosidase ; RG juice : juice debittering by α-L-rhamnosidase and β-D-glucosidase.

[y] The score sheet was used numbered 0 through 9, where 0 indicated no intensity and 9 indicated extreme intensity (Hedonic scale).

[x] Values within a column fallowed by the same letter sare not significantly different (p>0.05), according to sensory evaluation.

討　論

葡萄柚汁中主要的苦味物質爲柚苦苷，過去研究曾以添加-柚苦苷酶水解柚苦苷(方 1968)及共同固定化酵素法去除葡萄柚汁的苦味，其主要問題爲將酵素固定於材質上時，往往造成酵素大量失去活性，且加工時酵素的穩定性不佳，另一方面擔體材質顆粒太小，很容易於操作過程中造成管路阻塞，不但降低去除苦味的效果，也使得加工流程難以連貫(Yeh *et al.* 1987 ; Tsen 1984)。

本研究以單一純酵素直接添加於葡萄柚汁去除苦味，探討其品質變化與接受度。在加工過程中苦味物質柚苦苷並無明顯改變，且柚苦苷在加熱過程中非常穩定。去苦味酵素α-L-鼠李糖苷酶可以去除柚苦苷，除此之外，柚苷素在高溫下並不穩定，且易被破壞。至於冷凍貯藏後對於洋夸苷及柚苷素並無明顯變化。而去苦味酵素在葡萄柚汁中作用，對於葡萄柚汁的基本營養成分並沒有顯著差異。至於酵素處理葡萄柚汁之色澤問題，結果顯示加工後的葡萄柚汁(L=73.4)比新鮮的葡萄柚汁(L=65.9) (fresh squeezed grapefruit juice, NO.1)的 L 值高，可能是因爲加熱殺菌、離心後使蛋白質變性沈澱，導致透明度增加。

由此可知，添加去苦味酵素會影響果汁的呈色，且添加不同的去苦味酵素會有不同的影響。以商業用去苦味酵素柚苦苷酶處理葡萄柚汁，造成果汁顏色明顯變黃的情形，推測其原因可能是商業用去苦味粗酵素含有多種酵素活性，破壞了葡萄柚汁中的色素成分，例如可能將花青素(anthocyanin) 中的糖苷水解爲花青配質(anthocyanidins)，進而造成花青物質的色澤改變。

添加去苦味酵素於葡萄柚汁中，顯示國人男性對苦味的接受度及喜好度較女性佳，所以除了人類種族的不同外，不同性別對苦味的接受度也有很大差異。當葡萄柚汁未添加任何酵素處理時，苦味呈現非常強烈，遮掩了葡萄柚汁的酸味；當加入柚苦苷酶或同時加入α-L-鼠李糖苷酶和β-D-葡萄糖苷酶，都比單獨加入 α-L-鼠李糖苷酶於葡萄柚汁的喜好度低，原因可能是葡萄柚汁的苦味物質完全去除時，相對上果汁的酸味表現增強，而使果汁的喜好度降低。因此適度的降低苦味，比完全去除苦味的喜好度佳，且不失葡萄柚汁的原始風味。

因此，本研究結果顯示，一般葡萄柚汁的加工過程前後柚苦苷的含量並無顯著變化；然而添加去苦味酵素後，葡萄柚汁中的苦味成分可顯著降低，而且果汁的一般營養成份均無顯著改變。另一方面，品評試驗發現利用去苦味酵素降低葡萄柚汁的苦味，可顯著提高消費者喜好度，因此直接利用去苦味酵素α-L-鼠李糖苷酶作用於葡萄柚汁具有相當程度之可行性。

引用文獻

方祖達。1968。柚苷酶柑桔 flavanone-glycoside 水解之研究(Ⅰ)(Ⅱ)。中國園藝 14(1, 2): 137-147。

倪元穎, 張欣, 葛毅強。1999。溫帶、亞熱帶果蔬汁原料及飲料製造。中國輕工業出版。中國大陸。150 pp。

虞積凱。1989。利用纖維不溶性化柚苦苷酶去除果汁中之苦味-水解柚苦苷及移除檸檬苦素。國立中興大學食品科學研究所碩士論文。110 pp。

A.O.A.C., 1984, Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists , 14th. Washington, DC. No. 43.064.

Barmore, C. R., J. F. Fisher, P. J. Fellers, and R. L. Rouseff. 1986. Reduction of bitterness and tartness in grapefruit juice with florisik. J. Food Sci. 51: 415-416.

Buffu, A., and P. Bellenot. 1962. Variation de la teneur on naringine du jus de pomelo par rapport a la technologie de fabriication fruits. J. Food Sci. 17:497-483.

Chien, P. J., F. Sheu, and Y. T. Shyu. 2001. Monitoring enzymatic debittering in grapefruit juice by high performance liquid chromatography. J. Food Drug Anal. 9: 22–27.

Fisher, J. F., and T. A. Wheaton. 1976. A high-pressure liquid chromatographic method for the resolution and quantitation of naringin and naringenin rutinoside in grapefruit juice. J. Agric. Food Chem. 24: 898-899.

Horowitz, R. M., and B. Gentili. 1969. Taste and structure in phenolic glycosides. J. Agric. Food Chem. 17: 696-700.

Hour, S. S., E. M. Ahmed, R. D. Carter, and K. C. Huggart. 1980. Color and flavor qualities of white grapefruit watermelone juice mixture. J. Food Sci. 45:1419-1421.

Kew, T. J., M. K. Veldhuis, O. W. Bissett, and R. Patrick. 1957. The Effect of Time and Temperature of Pasteurization on the Quality of Canned Citrus Juices. U. S. Depantment of Agaicultire No. 77. Washington, D. C. 220 pp.

Olson, A. C., G. M. Gray, and D.G. Guadagni, 1979. Naringin bitterness of grapefruit juice debittered with naringinase immobilized in a hollow fiber. J. Food Sci. 44:1358-1360.

Ono, M. T., and C. Ichiro, 1977. Preparation and properties of naringinase immobilized by ionic binding to DEAE-sephadex. J. Ferment. Technol. 55:493-500.

Park, N. H., and H. N. Chang. 1978. Preparation and characterization of immobilized naringinase on porous glass beads. J. Ferment. Technol. 57:310-316.

Rober, L. J., and B. V. Chandler. 1982. Reduction of bitterness and acidity in grapefruit juice by adsorptive processing. J. Sci. Food Agric. 33:287-293.

Romero, C., A. Manjon, J. Bastida, and J. L. Iborra. 1985. A method for assaying the rhamnosidaes activity of naringinase. Anal. Biochem. 149:566-571.

Soares, N. F. F., and J. H. Hotchkiss. 1998. Naringinase immobilization in packaging films for reducing naringin concentration in grapefruit juice. J. Food Sci. 63:61-65.

Shaw, P. E., and C. W. Wilson. 1983. Debittering citrus juices with β-cyclodextrin polymer. J.Food Sci. 48:646-647.

Tsen, H. Y. 1984. Debittering of grapefruit juice with immobilized naringinase. Natl. Sci. Counc. 9:871-888.

Yeh, C. M., and H. Y. Tsen. 1987. Characterization of naringinase from *Penicillum sp.* immobilized on chitin. J. Chinese Agric. Chem. Soci. 25:378-386.

Utilizing Enzyme for Reducing Bitterness in Grapefruit Juice[1]

Po - Jung Chien[2,5], Yuan - Tay Shyu[3] and Shu - Hui Yang[4]

Summary

Chien, P. J., Y. T. Shyu, and S. H. Yang. 2003. Utilizing enzyme for reducing bitterness in grapefruit juice. J. Agric. Res. China 52:228-237.

The objectives of this study were to evaluate the applicability of α-L-rhamnosidase in debittering grapefruit juice and to investigate the quality and acceptance of the enzymaticly debittered juice. When the processed juice was not enzymaticly debittered, its naringin content was not significant'y changed ($p>0.05$). In addition, the acceptance of processed juices that were debittered using naringinase, α-L-rhamnosidase and β-D-glucosidase, respectively, were further studied. Results show that the processes of enzymatic debittering can hydrolyze the bitter flavanones, but not interfere the other constitutions of the juice Compared with the undebittered juice, the acceptance of debittered one was significantly increased. These results suggest that enzymatic debittering using α-L-rhamnosidase could promote the acceptance of people for grapefruit juice.

Key words : Debittering, , α-L-Rhamnosidase , Naringin and Grapefruit juice.

1. Contribntion No,2165 from Agricultural Research Institute, Council of Agriculture. Accepted : July 4, 2003.

2. Assistant Professor, Department of Food Science, Yuanpei University of Science and Technology, Hsinchu, Taiwan, ROC.

3. Professor, Department of Horticulture, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, ROC.

4. Assistant Researcher, Fengshan Tropical Horticultural Experiment Station, ARI, Fengshan, Kaohsiung, Taiwan, ROC.

5. Corresponding author, e-mail : jungchien@mail.yust.edu.tw ; Fax : (03) 5385353.