

Joanna Bodakowska-Boczniewicz, Zbigniew Garncarek

Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu

e-mails: joanna.bodakowska@ue.wroc.pl; zbigniew.garncarek@ue.wroc.pl

ZASTOSOWANIE NARINGINAZY W TECHNOLOGII SOKÓW I WIN

THE APPLICATION OF NARINGINASE IN JUICE AND WINE INDUSTRIES

DOI: 10.15611/pn.2017.494.02

JEL Classification: L66

Streszczenie: Naringinaza jest kompleksem dwóch enzymów, α -L-ramnozydazy (EC 3.2.1.40) i β -D-glukozydazy (EC 3.2.1.21). Ze względu na swoją aktywność hydrolityczną naringinaza ma potencjalne duże zastosowanie w technologii żywności. Celem pracy jest przedstawienie możliwości zastosowania naringinazy w produkcji win i soków owocowych. W pracy dokonano przeglądu literatury wskazującego na możliwe zastosowania immobilizowanej naringinazy oraz zamieszczono wyniki pilotażowych badań własnych nad aplikacją enzymu. Przedstawione zastosowania enzymu wynikają ze zdolności naringinazy do deglikozylacji związków obecnych w żywności. Naringinaza pozwala przede wszystkim usunąć gorzki smak soków cytrusowych dzięki hydrolizie gorzkiego flawonoidu – naringiny oraz wzmocnić aromat win i soków owocowych poprzez uwalnianie lotnych związków zapachowych z ich glikozydowych prekursorów.

Słowa kluczowe: naringinaza, gorzki smak, aromat win, soki cytrusowe.

Summary: Naringinase is an enzyme complex containing of an α -L-rhamnosidase and a β -D-glucosidase. The aim of the study was to present the possibility of using naringinase in the wine and fruit juices industries. The paper is a review of the subject literature. The results of the pilot study were also presented. These applications are mainly based on the activity of naringinase to deglycosylation of compounds in the food. In view of naringinase activity, it has valuable applications in food technology, such as debittering citrus fruit juices by the hydrolysis of naringin and enhancing wine and juice aroma by the release of free aromatic compounds from natural glycoside precursors.

Keywords: naringinase, debittering, wine aroma, citrus juice.

1. Wstęp

Jakość produktów żywnościowych jest determinowana przez wiele cech jednostkowych. W branży soków owocowych i win szczególnie duże znaczenie przypisuje się wartościom odżywczym oferowanych produktów. Jednym z kluczowych czynników, który w znacznym stopniu determinuje akceptację win i soków owocowych, jest ich aromat [Pereira i in. 2006] i smak [Glanz i in. 1998; Nestle i in. 1998]. Jednak procesy zachodzące podczas produkcji żywności, a przede wszystkim koncentratów owocowych i soków pasteryzowanych, mogą powodować utratę cennych składników, w tym również związków odpowiadających za ich smak i zapach [Pabiś i in. 2015].

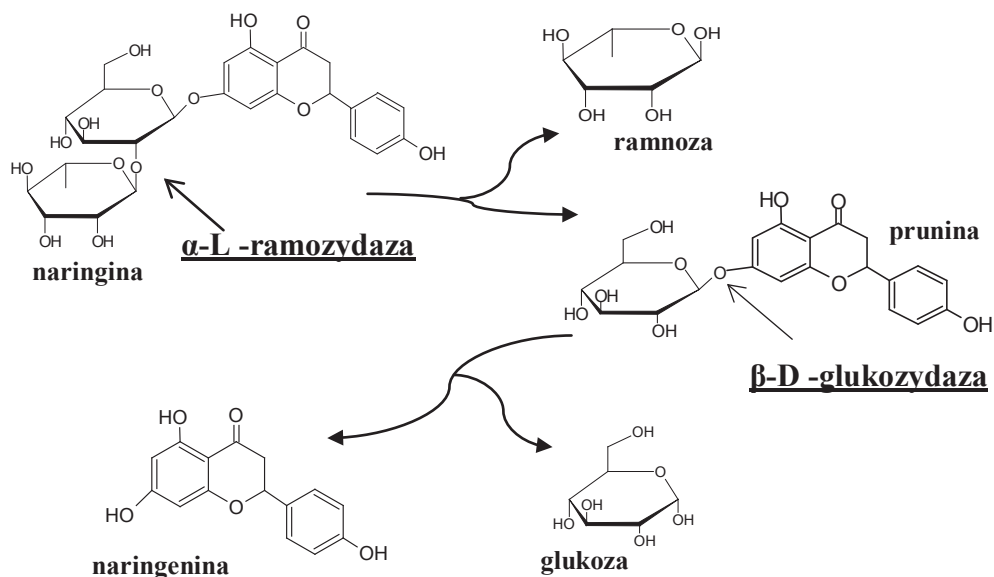
Część składników aromatycznych zawartych w produktach żywnościowych występuje w formie nietlotnych glikozydów. Glikozydy mogą być hydrolizowane na drodze enzymatycznej. Proces taki przebiega szybko i w sposób selektywny, bez zmian strukturalnych w budowie chemicznej związków [Sarry, Günata 2004].

Naringinaza jest kompleksem dwóch enzymów α -L-ramnozydazy (EC 3.2.1.40) i β -D-glukozydazy (EC 3.2.1.21) [Puri 2012]. Ze względu na swoją aktywność hydrolityczną enzym ten ma potencjalne duże zastosowanie w technologii żywności i farmacji. Ma on szczególne znaczenie w biotransformacji steroidów [Elujoba, Hardman 1987] i antybiotyków [Sankyo 1988], a przede wszystkim w hydrolizie glikozydów [Vila-Real i in. 2010]. Naringinaza pozwala na zwiększenie aromatu i usunięcie gorzkiego smaku soków owocowych, wina, moszczy i innych napojów [Olsen, Alfred 1974; Puri i in. 1996; Busto i in. 2007; González-Pombo i in. 2014; Alvarenga i in. 2013]

Wiele naturalnych glikozydów, w tym naringina, rutyna, hesperydyna, diosmina, kwercetyna, zawierające na końcach cząsteczki α -ramnozę lub β -glukozę, może być substratami naringinazy [Ribeiro 2011]. Szczególną reakcją katalizowaną przez naringinazę jest hydroliza naringiny, flawonoidu nadającego gorzki smak sokom z owoców cytrusowych. Naringina może być hydrolizowana przez α -L-ramnozydazę (składnik naringinazy) do ramnozy i pruniny, a następnie przez β -D-glukozydazę do glukozy i naringeniny (rys. 1).

Naringinaza może być syntezowana przez organizmy, a głównie przez: pleśnie z rodzaju *Aspergillus* [Puri i in. 2005a] i *Penicilium* [Norouzian i in. 2000], drożdże *Williopsis californica* [Ni i in. 2011], a także bakterie *Staphylococcus* [Puri i in. 2011] i *Streptomyces* [Caraveo i in. 2014]. Należy jednak podkreślić, że ze względu na zastosowanie naringinazy w przemyśle spożywczym enzym ten powinien pochodzić z mikroorganizmów zaliczonych do grupy GRAS (Generally Recognized As Safe), do których należą m.in. gatunki: *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Pichia angusta*.

Celem pracy jest przedstawienie możliwości zastosowania naringinazy w produkcji soków i win. Na podstawie literatury oraz wyników badań własnych przed-



Rys. 1. Hydroliza naringiny do pruniny, ramnozy, naringeniny i glukozy przez naringinazę

Źródło: opracowanie własne na podstawie [Ribeiro 2011].

stawiono enzymatyczne metody usuwania gorzkiego smaku soków owocowych oraz wzmacniania aromatu win i soków owocowych poprzez uwalnianie lotnych związków zapachowych z ich glikozydowych prekursorów.

2. Usunięcie gorzkiego smaku soków owocowych

Gorzki smak wielu produktów jest kluczowym czynnikiem związanym z ich niską akceptacją przez konsumentów [Drewnowski, Gomez-Carneros 2000]. Można to zaobserwować w przypadku soków owocowych, przede wszystkim pomarańczowego i grejpfrutowego. Za gorzki smak owoców cytrusowych odpowiedzialna jest głównie naringina – glikozyd flawonidowy oraz triterpenowa pochodna – limonina [Puri i in. 1996]. Zawartość naringiny w soku grejpfrutowym wynosi ok. 470-900 $\mu\text{g ml}^{-1}$ [Ribeiro, Ribeiro 2008a; Ribeiro, Ribeiro 2008b]. Mimo że związek ten występuje w bardzo niewielkich ilościach, nadaje on wyczuwalny, nieprzyjemny dla konsumenta smak. Olson i in. [1979] zaobserwowali wysoką korelację między percepcją gorzkiego smaku soku grejpfrutowego a zawartą w nim naringiną.

Zmniejszenie stężenia naringiny w wyniku jej hydrolizy przez naringinazę wpływa na poprawę jakości i wartości handlowej soków cytrusowych, z zachowaniem ich właściwości prozdrowotnych. Podaje się, że gorycz pruniny, produktu rozpadu naringiny, jest już o ponad 2/3 mniejsza niż naringiny [Yadav i in. 2010].

Opracowano wiele metod obniżenia gorzkiego smaku soków cytrusowych z użyciem immobilizowanej naringinazy. Naringinaza stosowana do usunięcia gorzkiego smaku z soków owocowych może być unieruchamiana na szkle porowatym [Romero, Jimeno 1985], chitynie [Tsen, Tsai 1998], celicie [Şekeroğlu i in. 2006], wiórach drzewnych [Puri i in. 2005b], w kapsułkach alginianu [Puri i in. 1996; Pedro i in. 2007] czy żelu alkoholu poliwinylowego [Busto i in. 2007].

Romero i Jimeno [1985] unieruchomili naringinazę z *Penicillium spicies* na szkle porowatym i wskazali możliwość zastosowania takiego preparatu do usuwania gorzkiego smaku soków zawierających naringinę. Puri i in. [1996], poprzez zastosowanie naringinazy z *Penicillium spicies* uwięzionej w alginianie, zhydrolizowali 82% naringiny zawartej w soku mandarynkowym. Mishra i Kar [2003], za pomocą naringinazy z *Aspergillus niger* unieruchomionej w alginianie, zmniejszyli natężenie gorzkiego smaku soku grejpfrutowego poprzez hydrolizę 84% zawartej w nim naringiny. Z kolei Ribeiro i Ribeiro [2008b], unieruchamiając naringinazę w κ -karaginie, spowodowali rozpad 95% naringiny zawartej w soku grejpfrutowym. Naringinaza z *Penicillium decumbens* adsorbowana na celicie pozwoliła na hydrolizę 83% naringiny w układzie modelowym, w optymalnych warunkach aktywności enzymu. Aktywność tak unieruchomionej naringinazy nie zmieniała się po pięciu cyklach jej stosowania [Şekeroğlu i in. 2006]. Lei i in. [2011], wykorzystując naringinazę z *Penicillium deumbens* unieruchomioną na żelu krzemionkowym MCM-41, zredukowali prawie 96% naringiny zawartej w soku białego grejpfruta.

Zastosowanie taniej, prostej i skutecznej metody unieruchomienia enzymu w połączeniu z wysokim ciśnieniem może stanowić kluczowy czynnik w usuwaniu gorzkiego smaku soków cytrusowych. Pedro i in. [2007] wykorzystali naringinazę z *Penicillium decumbens*, unieruchomioną w alginianie, do zmniejszenia gorzkiego smaku soków owocowych w warunkach wysokiego ciśnienia. Zaobserwowali oni pozytywny wpływ ciśnienia na hydrolizę naringiny przez immobilizowaną naringinazę. Ribeiro i in. [2010], poprzez zastosowanie unieruchomionej w kapsułkach alginianu naringinazy, zhydrolizowali 81% naringiny zawartej w modelowym roztworze soku podczas 30 minut reakcji przebiegającej pod ciśnieniem 205 MPa. Podobnie Ferreira i in. [2008], używając naringinazę immobilizowaną w alginianie, uzyskali zmniejszenie natężenia gorzkiego smaku soku grejpfrutowego w efekcie hydrolizy 75% naringiny zawartej w tym soku. Reakcja przebiegała pod ciśnieniem 160 MPa w ciągu 20 minut.

Busto i in. [2007] unieruchomili naringinazę z *Aspergillus niger* w żelu alkoholu poliwinylowego. Taki sposób immobilizacji powodował jednak straty aktywności naringinazy. Po sześciu cyklach hydrolizy modelowego układu soku cytrusowego preparat z unieruchomioną naringinazą zachowywał jedynie 36% wyjściowej aktywności. W eksperymencie przeprowadzonym przez Puri i in. [2005b] 76% naringiny uległo hydrolizie w ciągu 1 godziny procesu z zastosowaniem naringinazy z *Penicillium spicies* kowalencyjnie związanej na wiórach drzewnych. Nie zaobserwowano natomiast dalszej hydrolizy nawet po 5 godzinach reakcji.

Na przebieg procesu enzymatycznej hydrolizy naringiny zawartej w sokach wpływało zwiększone stężenie cukrów uwolnionych w wyniku prowadzonej reakcji oraz obecność kwasu cytrynowego. Ramnoza, glukoza i fruktoza oraz kwas cytrynowy mogą być inhibitorami zarówno wolnej, jak i unieruchomionej naringinazy podczas usuwania gorzkiego smaku soków owocowych w pH 3 i 4,5, co ogranicza jej przydatność w technologii soków i win [Busto i in. 2007; Tsen, Tsai 1998].

Autorzy niniejszej publikacji unieruchomili naringinazę otrzymaną z hodowli wgłębnej szczepu *Aspergillus niger* KMS na aktywowanym polietylenoiminą, magnetycznym polisacharydowym nośniku. Tak unieruchomiony enzym został wykorzystany do hydrolizy naringiny soku grejpfrutowego. Świeżo wyciśnięty sok grejpfrutowy poddano reakcji z unieruchomionym preparatem naringinazy w temperaturze 30°C. Stopień hydrolizy naringiny zawartej w soku grejpfrutowym wyniósł 90% (dane niepublikowane).

W ostatnich latach zainteresowanie bioaktywnymi związkami zawartymi w owocach i warzywach wzrosło ze względu na ich prozdrowotne właściwości, a zwłaszcza prewencyjne oddziaływanie w chorobach sercowo-naczyniowych, nowotworowych i chorobach neurodegeneracyjnych [Ribeiro 2011]. Zastosowanie naringinazy do usunięcia gorzkiego smaku soków cytrusowych nie zmienia ich właściwości prozdrowotnych. Zarówno naringina, prunina, jak i naringenina uznawane są za związki o potencjalnych właściwościach przeciwutleniających, przeciwnowotworowych i przeciwwzapalnych [Bodakowska-Boczniewicz, Garncarek 2016].

3. Wzmocnienie aromatu win i innych napojów

Istotną rolę w kształtowaniu aromatu wina i soków odgrywają lotne związki zapachowe, takie jak linalol, geraniol i nerol. Związki nadające aromat mogą także występować w formie nielotnych, bezwonnnych glikozydów, tzw. prekursorów aromatu, z których w procesie produkcji napojów owocowych lub ich przechowywania uwalniane są lotne aglikony [Maicas, Mateo 2005]. Podaje się, że ilość związków zapachowych w formie glikozydowej jest od dwóch do pięciu razy większa niż ich wolnych odpowiedników [Winterhalter, Skouroumounis 1997]. Prekursory aromatu znajdują się głównie w skórce owoców, a w mniejszej ilości także w miąższu i soku [Gomez i in. 1994]. Ich ilość i rodzaj zależy przede wszystkim od odmiany owoców, dla winogron zmienia się w zakresie od 500 do 1700 $\mu\text{g dm}^{-3}$ [Villena i in. 2007].

Prekursory aromatu zbudowane są z reszty aglikonowej i cukrowej połączonych wiązaniem β -D-glikozydowym. Strukturę aglikonu najczęściej stanowią monoterpenoidy i alkohole, a także metabolity kwasu szikimowego, C-13 norizoprenoidy oraz seskwiterpenoidy [Winterhalter, Skouroumounis 1997]. Aglikony bezpośrednio połączone są z β -D-glukopiranozą, która może być podstawiona także drugą jednostką cukrową, taką jak α -L-arabinofuranoza, β -D-ksylopiranoza, β -D-apiofuranosa, α -L-ramnopiranoza [Winterhalter, Skouroumounis 1997; Gallego i in. 2001].

Uwalnianie związków zapachowych z ich glikozydowych prekursorów może się odbywać naturalnie, podczas ich dojrzewania, przez działanie endogennych enzymów. Jednak hydroliza enzymatyczna wywołana naturalnie jest bardzo ograniczona, ponieważ w warunkach fermentacji wina enzymy te wykazują niską aktywność [Palomo i in. 2005]. Lotne związki z form bezwonnnych odłączane są poprzez działanie egzogennych enzymów, m.in. β -glukozydazy, która rozkłada wiązania pomiędzy cząsteczką aglikonu i cukru, co przyczynia się do zwiększenia intensywności aromatu win i soków owocowych [Palomo i in. 2005]. Aromatyczne terpeny mogą być uwalniane także na drodze hydrolizy sekwencyjnej, która polega na zastosowaniu dwóch różnych enzymów w dwóch różnych etapach procesu [Günata i in. 1998].

W celu poprawy aromatu wina i soków wielu autorów badało możliwości enzymatycznej hydrolizy prekursorów aromatu poprzez zastosowanie egzogennych enzymów takich jak: β -D-glukozydaza, α -L-arabinozydaza, α -L-ramnozydaza, β -D-apiozydaza [Ni i in. 2014; Spagna i in. 1998; Günata i in. 1998].

Dzięki zastosowaniu unieruchomionej β -glukozydazy z *Candida molishiana* znacznie zwiększono zawartość wolnych związków aromatycznych w sokach z mango, kiwi, brzoskwiń, wiśni, truskawek, marakui, papai, pomarańczy i jabłek [Gueguen i in. 1996]. Shoseyov i in. [1990] uzyskali znaczny wzrost stężenia związków aromatycznych, takich jak linalol, alkohol benzyłowy i benzaldehyd, w soku z marakui oraz alkoholi monoterpenowych i linalolu w winie, przez zastosowanie immobilizowanej β -glukozydazy z *Aspergillus niger*.

Na aktywność enzymów, a w konsekwencji na zwiększenie intensywności aromatu, niekorzystny wpływ może mieć środowisko reakcji. Aktywność tych biokatalizatorów może być hamowana m.in. przez zawartość etanolu, cukrów oraz pH i temperaturę. Jednak α -L-ramnozydaza pochodząca z *Pichia angusta* wykazywała dużą tolerancję w stosunku do glukozy i etanolu [Spagna i in. 2000]. Etanol (12% v/v) i glukoza (21% w/v) zmniejszyły aktywność α -L-ramnozydazy z *Aspergillus terreus* o około 20% [Gallego i in. 2001]. Na aktywność α -L-ramnozydazy z *Aspergillus nidulans* także w niewielkim stopniu wpływała glukoza i SO₂, a ponadto enzym ten ulegał tylko częściowej inhibicji pod wpływem etanolu, co wskazuje na jego przydatność do uwalniania składników aromatu wina [Orejas i in. 1999].

Spagna i in. [2000] uzyskali ponaddwukrotne zwiększenie zawartości terpenoli i aromatu modelowego roztworu wina zawierającego aromatyczne prekursorzy wyekstrahowane ze skórki winogron *Muscato*, z zastosowaniem oczyszczonego preparatu α -L-ramnopiranozydazy z *Aspergillus niger*.

Dzięki działaniu β -glukozydazy z *Candida molischiana* Gueguen i in. [1996] zwiększyli stężenia wolnych alkoholi monoterpenowych, takich jak geraniol, nerol, linalol, i cyklicznych alkoholi w winie Muscat.

Poprzez działanie β -glukozydazy z *Aspergillus niger* i *Aspergillus oryzae* chińscy badacze zwiększyli ilości lotnych związków zapachowych występujących w winie i intensywność jego aromatu, oznaczanego sensorycznym testem Kramera [Zhu i in. 2014].

Caldini i in. [1994] do wzmocnienia aromatu wina wykorzystali komercyjny preparat Cytolase PCL5. Preparat ten, zawierający β -glukozydazę, α -arabinozydazę i α -ramnozydazę z *Aspergillus niger*, został unieruchomiony na bentonicie aktywowanym aldehydem glutarowym.

Palomo i in. [2005] zaobserwowali zmianę profilu zapachowego wina otrzymanego z czterech odmian winogron, *Chardonnay*, *Albillo*, *Airen* i *Macabeo*, poddanych działaniu handlowego preparatu enzymatycznego AR 2000 (Gist Brocades) wykazującego, oprócz aktywności pektynolitycznej, także aktywność glikozydazy. Dzięki uwolnieniu aglikonów za pomocą egzogennych glikozydaz zwiększono kwiatowy i owocowy aromat wina. W przypadku tego preparatu występowały zapewne dwa zjawiska. Enzymy pektynolityczne degradujące ściany komórek roślinnych uwalniały prekursorzy aromatyczne [Sieiro i in. 2014], a następnie glikozydazy hydrolizowały glikokoniugaty, przyczyniając się do zwiększenia intensywności aromatu wina.

Autorzy niniejszego artykułu w pilotażowych badaniach sprawdzali przydatność naringinazy do wzmocnienia intensywności aromatu wina i soku. W tym celu do wina otrzymanego z winogron odmiany *Pinot noir* oraz do świeżego soku grejpfrutowego dodano preparat naringinazy z *Penicillium decumbens*. Tak otrzymane próby, wraz z próbami kontrolnymi (bez dodatku enzymu), inkubowano w temperaturze pokojowej przez 4 godziny. Po tym czasie zespół pięciu osób, o sprawdzonej wrażliwości i sprawności sensorycznej, ocenił intensywność aromatu napojów w 10-punktowej skali. Przeprowadzone badania wykazały, że użycie wolnej naringinazy spowodowało 1,5-krotne zwiększenie wrażenia intensywności aromatu wina *Pinot noir*. Podobny efekt uzyskano w przypadku świeżo wyciśniętego soku grejpfrutowego poddanego działaniu preparatu naringinazy (dane niepublikowane).

Inni autorzy również badali wpływ naringinazy na intensywność aromatu soków owocowych. W eksperymencie przeprowadzonym przez Ni i in. [2015], łączącym chromatografię gazową, spektrometrię mas (GC-MS) i ocenę sensoryczną, stwierdzono, że po dodaniu naringinazy do soku z pomelo wrażenia zapachowe wzrosły ponaddwukrotnie. Zastosowanie naringinazy i preparatu enzymów pektynolitycznych w produkcji soków z owoców cytrusowych poprawia także wydajność procesu otrzymywania soku [Ni i in. 2014b].

Znaczna ilość związków zapachowych w formie glikozydowej, w połączeniu z niskim progiem wyczuwalności zapachu oraz z właściwościami sensorycznymi aglikonów, sprawia, że podczas przetwórstwa soków i win związki glikozydowe uznawane są za bardzo dobre źródło lotnych związków zapachowych [Maicas, Mateo 2005]. Jednak zastosowanie enzymatycznych metod w przemyśle jest ograniczone. Wiąże się to przede wszystkim z możliwym niekorzystnym wpływem niektórych parametrów fizykochemicznych moszczu, soków i win (pH, temperatura, zawartość etanolu, cukrów, polifenoli itp.) na aktywność enzymatyczną [Pogorzelski, Wilkowska 2007]. W odniesieniu do win dodatkowym aspektem jest także tradycjonalizm winiarzy [Colagrande i in. 1994].

4. Pozostałe zastosowania

Poza opisanymi zastosowaniami naringinazy, do usuwania gorzkiego smaku soków owocowych oraz wzmacniania aromatu napojów owocowych, poszukiwane są inne potencjalne aplikacje tego enzymu.

Nobile i in. [2003] stworzyli aktywną folię, mającą komercyjny potencjał, do poprawy wartości sensorycznej soku grejpfrutowego. Folia składała się z usiecionej matrycy aktywowanej aldehydem glutarowym, na której została unieruchomiona naringinaza z *Penicillium decumbens*, dzięki czemu zmniejszono zawartość naringiny w soku grejpfrutowym podczas jego przechowywania przez bezpośrednią interakcję folii z produktem.

Wykazano także, że naringinaza z *Penicillium decumbens* chroni także przed stresem oksydacyjnym, przyczynia się do zwiększenia potencjału antyoksydacyjnego i zdolności wychwytywania wolnych rodników w soku [Zhu i in. 2017].

L-ramnozydaza znajduje potencjalne zastosowanie w produkcji napojów funkcjonalnych, takich jak sok z czarnej porzeczki, sok pomarańczowy i napar z zielonej herbaty. Napoje te charakteryzują się zwiększoną ilością bioaktywnych flawonoidów [Gonzalez-Barrio i in. 2004].

5. Zakończenie

Charakterystyczną reakcją naringinazy, jaką jest hydroliza naringiny, flawonoidu nadającego gorzki smak owocom cytrusowym, można wykorzystać do poprawy jakości sensorycznej soków, z jednoczesnym zachowaniem ich właściwości prozdrowotnych. Hydroliza wiązań glikozydowych przez naringinazę przyczynia się także do uwolnienia aglikonów z ich prekursorów, co zwiększa ilość związków aromatycznych w produktach spożywczych. Glikozydy mogą być hydrolizowane na drodze enzymatycznej w wyniku dodania do napoju egzogennych preparatów lub przez zastosowanie immobilizowanego enzymu. Proces taki przebiega szybko i w sposób selektywny, bez zmian struktury związków chemicznych.

Zwiększenie aktywności immobilizowanej naringinazy oraz rozwój nowych materiałów o mikro- i nanostrukturze może prowadzić do nowych aplikacji enzymu, np. zastosowania w opakowaniach żywności. Deglikozyłacja innych, niezbadanych jeszcze substratów naringinazy może prowadzić do otrzymania bardziej efektywnych związków bioaktywnych o nowych zastosowaniach w przemyśle spożywczym.

Literatura

Alvarenga A.E., Romero C.M., Castro G.R., 2013, *A novel α -l-rhamnosidase with potential applications in citrus juice industry and in winemaking*, European Food Research and Technology, vol. 237, no. 6, s. 977-985.

- Bodakowska-Boczniewicz J., Garncarek Z., 2016, *Znaczenie gorzkich aktywnych biologicznie związków żywności w prewencji chorób*, International Journal of Food Science and Bioprocessing, vol. 1, no. 1, s. 9-24.
- Busto M.D., Meza V., Ortega N., Perez-Mateos M., 2007, *Immobilization of naringinase from Aspergillus Niger CECT 2088 in poly(vinyl alcohol) cryogels for the debittering of juices*, Food Chemistry, vol. 104, no. 3, s. 1177-1182.
- Caldini C., Bonomi F., Pifferi P.G., Lanzarini G., Galente Y.M. 1994, *Kinetic and immobilization studies on fungal glycosidase for aroma enhancement in wine*, Enzyme and Microbial Technology, vol. 16, no. 4, s. 286-291.
- Caraveo L., Medina H., Rodríguez-Buenfil I., Montalvo-Romero C., Evangelista-Martínez Z., 2014, *A simple plate-assay for screening extracellular naringinase produced by streptomycetes*, Journal of Microbiological Methods, vol. 102, s. 8-11.
- Colagrande O., Silva A., Fumi M., 1994, *Recent applications of biotechnology in wine production*, Biotechnology Progress, vol. 10, no. 1, s. 2-18.
- Drewnowski A., Gomez-Carneros C., 2000, *Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: A review*, The American Journal of Clinical Nutrition, vol. 72, no. 22, s. 1424-1435.
- Elujoba A.A., Hardman R., 1987, *Diosgenin production by acid and enzymatic hydrolysis of fenugreek*, Fitoterapia, 58, s. 299-304.
- Ferreira L., Afonso C., Vila-Real H., 2008, *Evaluation of the effect of high pressure on naringin hydrolysis in grapefruit juice with naringinase immobilised in calcium alginate beads*, Food Technology and Biotechnology, vol. 42, no. 2, s. 146-150.
- Gallego M.V., Pinaga F., Ramon D., Valles S., 2001, *Purification and characterization of an alpha-L-rhamnosidase from Aspergillus terreus of interest in winemaking*, Journal of Food Science, vol. 66, no. 2, s. 204-209.
- Glanz K., Basil M., Maibach E., Goldberg J., Snyder D., 1998, *Why Americans eat what they do: Taste, nutrition, cost, convenience, and weight control concerns as influences on food consumption*, Journal of the American Dietetic Association, vol. 98, no. 10, s. 1118-1126.
- Gomez E., Martinez A., Laencina J., 1994, *Localization of free and bound aromatic compounds among skin, juice and pulp fractions of some grape varieties*, Vitis, vol. 33, no. 1, s. 1-4.
- González-Barrio R., Trindade L.M., Manzanares P., de Graaff L.H., Tomás-Barberán F.A., Espín J.C., 2004, *Production of bioavailable flavonoid glucosides in fruit juices and green tea by use of fungal alpha-L-rhamnosidases*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 52, no. 20, s. 6136-6142.
- González-Pombo P., Fariña L., Carrau F., Batista-Viera F., Brena B.M., 2014, *Aroma enhancement in wines using co-immobilized Aspergillus niger glycosidases*, Food Chemistry, vol. 143, s. 185-191.
- Guegen Y., Chemardin P.J.G., Arnaud A., Galzy P.A., 1996, *Very efficient beta-glucosidase catalyst for the hydrolysis of flavor precursors of wines and fruit juices*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 44, s. 2336-2340.
- Günata Z., Blondeel C., Vallier M.J., Lepoutre J.P., Sapis J.C., Watanabe N., 1998, *An endoglycosidase from grape berry skin of cv. M. Alexandria hydrolyzing potentially aromatic disaccharide glycosides*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 46, no. 7, s. 2748-2753.
- Lei S., Xu Y., Fan G., Xiao M., Pan S., 2011, *Immobilization of naringinase on mesoporous molecular sieve MCM-41 and its application to debittering of white grapefruit*, Applied Surface Science, vol. 257, no. 9, s. 4096-4099.
- Maicas S., Mateo J.J., 2005, *Hydrolysis of terpenyl glycosides in grape juice and other fruit juices: A review*, Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 67, no. 3, s. 322-335.
- Mishra P., Kar R., 2003, *Treatment of Grapefruit Juice for Bitterness Removal by Amberlite IR 120 and Amberlite IR 400 and Alginate Entrapped Naringinase Enzyme*, Journal of Food Science, vol. 68, no. 4, s. 1229-1233.
- Nestle M., Wing R., Birch L., DiSogra L., Drewnowski A., Middleton S., Economos C., 1998, *Behavioral and social influences on food choice*, Nutrition Reviews, vol. 56, no. 5, s. 50-64.

- Ni H., Hong P., Ji H.F., Sun H., Chen Y.H., Xiao A.F., Chen F., 2015, *Comparative analyses of aromas of fresh, naringinase-treated and resin-absorbed juices of pummelo by GC-MS and sensory evaluation*, Flavour and Fragrance Journal, vol. 30, no. 3, s. 245-253.
- Ni H., Li L., Xiao A., Cao Y., Chen Y., Cai H., 2011, *Identification and characterization of a new naringinase-producing strain, Williopsis californica JMUdeb007*, World Journal of Microbiology and Biotechnology, vol. 27, no. 12, s. 2857-2862.
- Ni H., Yang Y.F., Chen F., Ji H.F., Yang H., Ling W., Cai H.N., 2014, *Pectinase and naringinase help to improve juice production and quality from pummelo (Citrus grandis) fruit*, Food Science and Biotechnology, vol. 23, no. 3, s. 739-746.
- Nobile M.A., Piergiovanni L., Buonocore G.G., Fava P., Puglisi M.L., Nicolais L., 2003, *Naringinase immobilization in polymeric films intended for food packaging applications*, Journal of Food Science, vol. 68, no. 6, s. 2046-2049.
- Norouzian D., Hosseinzadeh A., Inanlou N., Moazami N., 2000, *Production and partialcation of naringinase by Penicillium Ddcumbens PTCC 5248*, World Journal of Microbiology and Biotechnology, vol. 16, s. 471-473.
- Olsen R.W., Alfred L., 1974, *Debittering of concentrated grapefruit juice with naringinase*, Florida Agricultural Experiment Stations Journal Series, vol. 77, s. 321-325.
- Olson A.C., Gray G.M., Guadagni D.G., 1979, *Naringin bitterness of grapefruit juice debittered with naringinase immobilized in a hollow fiber*, Journal of Food Science, vol. 44, no. 5, s. 1358-1361.
- Orejas, M., Ibanez E, Ramón D., 1999, *The filamentous fungus Aspergillus nidulans produces an α -L-rhamnosidase of potential oenological interest*, Letters in Applied Microbiology vol. 28, no. 5, s. 383-388.
- Pabiś S., Bonikowski R., Kula J., 2015, *Aromat sposobem na sukces produktu. Trendy w aromatach spożywczych*, Przemysł Spożywczy, vol. 69, no. 5, s. 12-17.
- Palomo E., Hidalgo M., Gonzalezvinas M., Perezcoello M., 2005, *Aroma enhancement in wines from different grape varieties using exogenous glycosidases*, Food Chemistry, vol. 92, no. 4, s. 627-635.
- Pedro H., Alfaia A.J., Marques J., Vila-Real H.J., Calado A., Ribeiro M.H.L. 2007, *Design of an immobilized enzyme system for naringin hydrolysis at high-pressure*, Enzyme and Microbial Technology, vol. 40, no. 3, s. 442-446.
- Pereira C.C., Ribeiro C.P., Nobrega R., Borges C.P., 2006, *Pervaporative recovery of volatile aroma compounds from fruit juices*, Journal of Membrane Science, vol. 274, no. 1-2, s. 1-23.
- Pogorzelski E., Wilkowska A., 2007, *Flavour enhancement through the enzymatic hydrolysis of glycosidic aroma precursors in juices and wine beverages: A review*, Flavour and Fragrance Journal, vol. 22, no. 4, s. 206-213.
- Puri M., 2012, *Updates on naringinase: Structural and biotechnological aspects*, Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 93, no. 1, s. 49-60.
- Puri M., Banerjee A., Banerjee U.C., 2005a, *Optimization of process parameters for the production of naringinase by Aspergillus niger MTCC 1344*, Process Biochemistry, vol. 40, no. 1, s. 195-201.
- Puri M., Kaur A., Barrow C.J., Singh R., 2011, *Citrus peel influences the production of an extracellular naringinase by Staphylococcus xylosus MAK2 in a stirred tank reactor*, Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 89, no. 3, s. 715-722.
- Puri M., Kaur H., Kennedy J.F., 2005b, *Covalent immobilization of naringinase for the transformation of a flavonoid*, Journal of Chemical Technology and Biotechnology, vol. 80, no. 10, s. 1160-1165.
- Puri M., Marwaha S., Kothari R., 1996, *Studies on the applicability of alginate-entrapped naringinase for the debittering of kinnow juice*, Enzyme and Microbial Technology, vol. 22, no. 95, s. 281-285.
- Ribeiro I.A.C., Ribeiro M.H.L., 2008a, *Naringin and naringenin determination and control in grapefruit juice by a validated HPLC method*, Food Control, vol. 19, no. 4, s. 432-438.
- Ribeiro I.A.C., Ribeiro M.H.L., 2008b, *Kinetic modelling of naringin hydrolysis using a bitter sweet α -L-rhamnopyranosidase immobilized in k-carrageenan*, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, vol. 51, no. 1-2, s. 10-18.

- Ribeiro M.H.L., 2011, *Naringinases: Occurrence, characteristics, and applications*, Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 90, no. 6, s. 1883-1895.
- Ribeiro M.H., Afonso C., Vila-Real H.J., Alfaia A.J., Ferreira L., 2010, *Contribution of response surface methodology to the modeling of naringin hydrolysis by naringinase Ca-alginate beads under high pressure*, LWT-Food Science and Technology, vol. 43, no. 3, s. 482-487.
- Romero C., Jimeno A., 1985, *Immobilization of naringinase on glycophase-coater porous glass*. Biotechnology Letters, vol. 7, no. 7, s. 477-482.
- Sankyo C., 1988, *Preparation of antibiotic chloropolysporin-C*, Japanese Patent 63, 146.
- Sarry J.E., Günata Z., 2004, *Plant and microbial glycoside hydrolases: Volatile release from glycosidic aroma precursors*, Food Chemistry, vol. 87, no. 4, s. 509-521.
- Şekeroğlu G., Fadiloğlu S., Fahrettin G., 2006, *Immobilization and Characterization of naringinase for the hydrolysis of naringin*, European Food Research and Technology, vol. 224, no. 1, s. 55-60.
- Shoseyov O., Bravdo B.A., Siegel D., Goldman A., Cohen S., Shoseyov L., Ikan R., 1990, *Immobilized endo- β -glucosidase enriches flavor of wine and passion fruit juice*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 38, no. 6, s. 1387-1390.
- Sieiro C., Villa T.G., da Silva, A.F., García-Fraga B., Vilanova M., 2014, *Albariño wine aroma enhancement through the use of a recombinant polygalacturonase from Kluyveromyces marxianus*, Food Chemistry, vol. 145, s. 179-185.
- Spagna G., Romagnoli D., Angela M., Bianchi G., Pifferi P.G., 1998, *A simple method for purifying glycosidases: alpha-L-arabinofuranosidase and beta-D-glucopyranosidase from Aspergillus niger to increase the aroma of wine, Part I*, Enzyme and Microbial Technology, vol. 22, no. 97, s. 298-304.
- Spagna G., Barbagallo R.N., Martino A., Pifferi P.G., 2000, *A simple method for purifying glycosidases: α -L-rhamnopyranosidase from Aspergillus niger to increase the aroma of Moscato wine*, Enzyme and Microbial Technology, vol. 27, no. 7, s. 522-530.
- Tsen H.Y., Tsai S.Y., 1998, *Comparison of the kinetics and factors affecting the stabilities of chitin-immobilized naringinases from two fungal sources*, Journal of Fermentation Technology, vol. 66, no. 2, s. 193-198.
- Vila-Real H., Alfaia A.J., Rosa M.E., Calado A.R., Ribeiro M.H.L., 2010, *An innovative sol-gel naringinase bioencapsulation process for glycosides hydrolysis*, Process Biochemistry, vol. 45, no. 6, s. 841-850.
- Villena M.A., Iranzo J.F.Ú., Pérez A.I.B., 2007, *β -Glucosidase activity in wine yeasts: Application in enology*, Enzyme and Microbial Technology, vol. 40, no. 3, s. 420-425.
- Winterhalter P., Skouroumounis G.K., 1997, *Glycoconjugated aroma compounds: occurrence, role and biotechnological transformation*, [w:] *Biotechnology of Aroma Compounds*, Springer, Berlin-Heidelberg, s. 73-105.
- Yadav V., Yadav P.K., Yadav S., Yadav K.D.S., 2010, *α - l -Rhamnosidase: A review*, Process Biochemistry, vol. 45, no. 8, s. 1226-1235.
- Zhu F.M., Du B., Li J., 2014, *Aroma enhancement and enzymolysis regulation of grape wine using β -glycosidase*, Food Science & Nutrition, vol. 2, no. 2, s. 139-145.
- Zhu Y., Jia H., Xi M., Yang L., Li X., 2017, *Characterization of a naringinase from Aspergillus oryzae 11250 and its application in the debitterization of orange juice*, Process Biochemistry, <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio> (12.07.2017).