

TURUNÇGİL SULARINDA ACILIK ETMENLERİ VE GİDERİLMESİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER

BITTERNESS in CITRUS JUICES and METHODS USED in DEBITTERING

Salih AKSAY¹, M. Ümit ÜNAL²

¹Mersin Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Mersin

²Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Adana

ÖZET: Turunçgil sularında acılık önemli bir sorundur. Naringin ve limonin acılık etmenlerinin en önemlileridir. Acılık etmenlerinin giderilmesinde değişik yöntemler kullanılmıştır. Bu derlemede turunçgil sularında görülen acılığın nedenleri ve giderilmesinde kullanılan fizikokimyasal ve biyoteknolojik yöntemler tartışılmıştır.

ABSTRACT: Bitterness in citrus juices is an important problem. Naringine and limonine are two primary bittering components. Different methods have been employed for debittering of citrus juice. This review aims at presenting biochemical basis of bitterness in citrus juice. Furthermore, different physicochemical and biotechnological methods used for debittering are discussed.

GİRİŞ

Altıntop ve Washington navel portakalı meyve sularında, işleme sırasında veya ekstraksiyondan bir süre sonra oluşan acı tat turunçgil sektöründe önemli bir sorundur. Bu acılık meyvenin kendi yapısından kaynaklanabileceği gibi meyvenin işlenmesi sırasında hatalı işlemlerden de kaynaklanabilir. Altıntopun kendine özgü acı tadı elde edilen meyve suyunda da hissedilir. Washington navel portakalından üretilen meyve suyunda ise ekstraksiyondan birkaç saat sonra belirgin bir acılık oluşmaktadır. Diğer çeşitlerde ise meyvenin sıkılmasında fazla basınç uygulanması, kabuk yağının yeterince uzaklaştırılmaması, elde edilen meyve suyunun hemen finişerden geçirilerek albedo ve fazla pulpundan arındırılmaması, eterik yağların yeterince uzaklaştırılmaması gibi durumlarda üründe acı tat oluşumu söz konusudur (ALTAN, 1983^a).

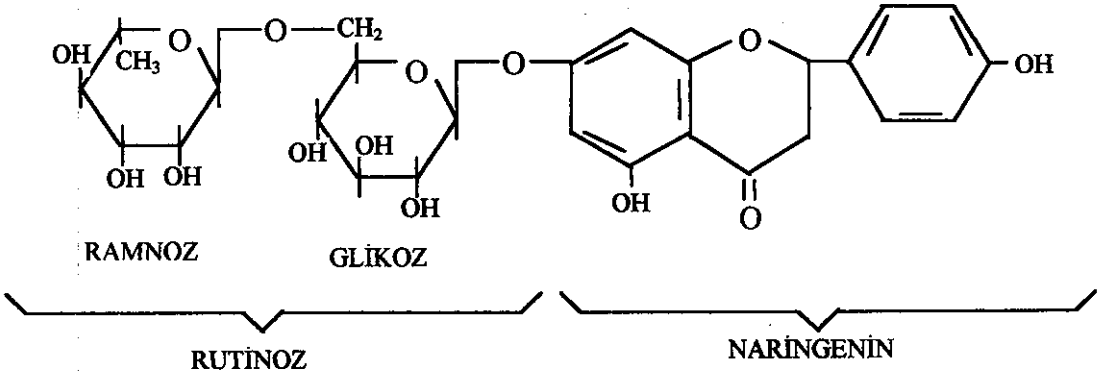
Turunçgil meyvelerinde ve ürünlerinde acılık etmenleri kimyasal açıdan flavonoidler ve turunçgil meyvelerindeki triterpenoid metabolizmasının ara ürünlerinden limonoidler olarak iki gruba ayrılmışlardır. Naringin, neohesperidin, ponsirin flavonoid grubundan, limonin ve nomilin ise limonoid grubundan örneklerdir (ALTAN, 1983^{a,b}; HERMAN ve ark., 1985).

Turunçgil sularının tüketici tarafından beğenisinde, meyve suyunun asit/şeker dengesi yanında acılık da önemli rol oynar. Bu nedenle tüketici beğenisini olumsuz yönde etkileyen bu acılık etmenlerinin uzaklaştırılması yönünde araştırmalar yapılmaktadır. Altıntopa kendine özgü tadı veren naringin (4-5,7 trihidroksi flavonon-7-ramnoglikozid) ve portakal sularında ekstraksiyondan bir süre sonra acılaşmaya neden olan limonin esas acılık etmenleri olarak kabul edilmişlerdir. Acılık sorununun giderilmesinde de çalışmalar bu iki bileşen üzerinde yoğunlaşmıştır.

ACILIK ETMENLERİ

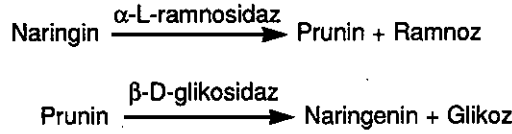
Acı Flavonoidler

Turunçgil sularında acılık etmenlerinden bir grubu oluşturan flavonoidlerden en önemlisi altıntopa kendine özgü tadını veren naringindir (Şekil-1). Yaklaşık %90'ı meyvenin albedo ve dilim zarlarında bulunan naringinin erime noktası 171°C olup suda ve alkolde çözünür karakterdedir. 20 ppm düzeyindeki bir derişimde tadılarak hissedilebilecek derecede yoğun bir acılığa sahiptir. (KESTERSON ve HENDRICKSON, 1957; BARMORE ve ark., 1986). Amerika'da üretilen altıntop sularında naringin %0.015-0.102 arasında değişmekte olup ülkemizde bu tür bir ölçüm yapılamamıştır.



Şekil 1. Naringenin kimyasal yapısı

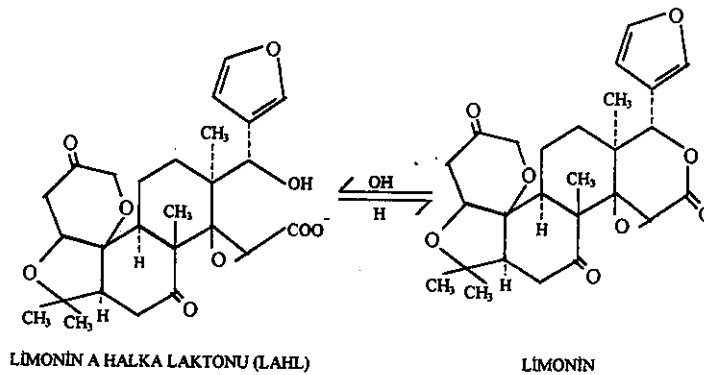
Meyvedeki naringenin derişiminin meyve olgunluğu ile ilişkili olup, meyve olgunlaştıkça α -L-ramnosidaz tarafından prunin ve L-ramnoza hidrolize edilmektedir. Hidroliz ürünü olan pruninin acılığı naringenin acılığının ancak %33'ü kadardır. Hidrolizin ikinci aşamasında prunin β -D-glikosidaz enzimi tarafından acı olmayan naringenin ve D-glikoza parçalanır (YUSOF ve ark., 1990; PURI ve ark., 1996b).



Limonoid Glikozidler

Limon (limonin dilakton) bu gruptaki en belirgin acılık etmenidir. Yapısında bir furan halkası, iki lakton grubu, beşli eter halkası, bir epoksit grubu ve iki karboksilik grubu bulunan fazla oksitlenmiş bir triterpenoidtir (KIMBALL, 1987; FELLERS, 1989; PURI ve ark., 1996b). Limoninin erime noktası 290°C civarında olup, beyaz kristalsi yapıdadır. Meyve suyunda 5 ppm'den fazla olduğunda acılığı hissedilmekte ve bu derişimin üzerinde ise tüketici tarafından kabul görmemektedir (JOHNSON ve CHANDLER, 1982).

Limonoid; turuncgil meyvesinde kesecikler içerisinde hücre sitoplazmasında yaklaşık nötral pH'da Limonat-A-halka laktonu (LAHL) (limonin mono lakton) formunda bulunmaktadır. Meyve suyu üretimi sırasında kesecikler parçalandığında LAHL asidik pH'da limonin dilaktona dönüşerek (Şekil-2) acılık oluşturmaktadır



Şekil 2. Limoninin oluşum mekanizması

(KIMBALL, 1991). Naringine göre daha acıdır. Amerika'da Florida'da yetiştirilen altıntop çeşitlerinde 6-7 ppm düzeylerinde limonin tespit edilmiştir. Meyvedeki limonin derişimi meyvenin çeşidine, olgunluğuna bağlı olduğu gibi hasat dönemi, ekstraktör türü ve basıncına da bağlıdır (FELLERS, 1989).

ACILIK ETMENLERİNİN UZAKLAŞTIRILMASI

Bu makalede esas olarak üzerinde durulan naringin ve limonin acılık etmenlerinin uzaklaştırılmasında adsorbantlar (BARMORE ve ark., 1986; FELERS, 1989; HERNANDEZ ve ark., 1992; JOHNSON ve CHANDLER, 1988; KIMBALL ve NORMAN, 1990; MANLAN ve ark., 1990; SHAW ve WILSON, 1983; SU ve YANG, 1991; WAGNER ve ark., 1988), süper kritik CO₂ ekstraksiyonu (KIMBALL, 1987), enzimler (HERMAN ve ark., 1985; JIMENO ve ark., 1987; MERINO ve ark., 1996; SOARES ve HOTCHKISS, 1998; TSEN ve TSAI, 1988; TSEN ve ark., 1989; TSEN ve YU, 1991) ve mikroorganizmalar (HASEGAWA ve ark., 1985; MANJON ve ark., 1991; PURI ve ark., 1996^b) kullanılmıştır. Bu yöntemler fizikokimyasal ve biyoteknolojik olmak üzere iki ana grup altında toplanabilir.

Fizikokimyasal Yöntemler

Acılık etmenlerinden naringin, limoninin ve diğerlerinin uzaklaştırılmasında farklı adsorbantların kullanımı, süperkritik CO₂ ekstraksiyonu, ultrafiltrasyon ve değişik reçinelerden faydalanma yönünde çalışmalar yapılmıştır. Tablo 1'de bu çalışmalarda kullanılan adsorbantlar gösterilmiştir.

Adsorpsiyon yöntemi ile acılık gidermede JOHNSON ve CHANDLER (1982, 1985) polisitren iyon değiştirici reçineler kullanarak, naylon esaslı materyallerle (naylon-6 ve naylon-66), gözenekli polimerler (Amberlit XAD-2, XAD-7 ve XAD-12), diatome toprağı ve selüloz asetat kullanarak naringin ve limoninin adsorblanma özelliklerini incelemişlerdir. Kullanılan bu adsorbantlar içinde gözenekli polimerlerin diğerlerinden daha etkin olduğu belirlenmiştir. Selüloz asetatın naringini adsorblama yeteneğinin ihmal edilebilir düzeyde olduğu, limonini çok daha iyi adsorblayabildiği vurgulanmıştır. Selüloz asetatın limonine karşı iyi bir adsorplama materyali olduğu başka araştırmacılar tarafından da belirtilmiştir. (FELLERS, 1989; JIMENO ve ark., 1987; TSEN ve YU, 1991). Diğer yandan selüloz tri asetatın adsorplama etkisinin mono asetata göre daha zayıf olduğu ancak acılık gidermede kullanılan naringinaz enzminin immobilizasyonunda ise oldukça iyi sonuç verdiği bulunmuştur (JOHNSON ve CHANDLER, 1988; SOARES ve HOTCHKISS, 1998; TSEN ve YU, 1991).

BARMORE ve ark. (1986) kesikli bir sistemde altıntop suyunu aktif magnezyum silikat (Florisil) ile muamele ederek, limonin, naringin, narorutin, toplam asitlik ve meyve suyunun besin değeri üzerin (C vitamini ve şeker gibi...) etkisini incelemişlerdir. Sonuçta florisil işlem görmüş meyve suyunun besin değerinde herhangi bir kayıp olmadan acılık ve asitliğinde önemli oranda azalma gözlenmiştir. Ayrıca duysal analizde florisilin meyve suyu aromasına olumsuz yönde bir etkisinin olmadığı ve hatta florisil ile işlem gören meyve suyunun daha çok beğenildiği vurgulanmıştır.

Altıntop suyunda naringin, limonin ve nomilinden ileri gelen acılığın giderilmesinde β-siklodekstrin ve türevlerinin kullanımı da iyi sonuçlar vermiştir. β-siklodekstrin polimer jeli bir kolon içine konarak ve akışkan yatak prensibi ile çalışan bir sistem oluşturularak meyve suyundaki acılığın giderilmesi çalışmaları yapılmıştır. β-siklodekstrin farklı polimerleri naringini ve limonini farklı oranlarda adsorplama özelliği göstermektedir (WAGNER ve ark., 1988). Epiklorohidrin ile oluşturduğu çapraz bağlı polimeri PH 3 ile 10 arasında naringini %95'in üzerinde adsorblayabildiği bulunmuştur (SU ve YANG, 1991). β-siklodekstrin farklı polimerlerinin acılık gidermedeki etkisi naringin ve limoninin β-siklodekstrin ile kompleks oluşturması şeklinde açıklanmıştır. Bu arada işlem gören meyve sularının briks, toplam asitlik ve askorbik asit niceliklerinde önemli bir değişiklik gözlenmemiştir (SHAW ve WILSON, 1983).

Polisitren divinil benzen reçineler altıntop suyunda naringin ve limonin yanısıra neohesperidin üzerine de etkili olup acılıkta %80-90 oranlarında azaltıcı etki göstermektedir (HERNANDEZ ve ark., 1992). Polisitren

divinil benzen adsorbantlarının gözenek çapları, çapraz bağ oranları, spesifik yüzey alanları gibi fiziksel özellikleri ile naringin ve limonini adsorbe etme özellikleri arasında doğrusal bir ilişki vardır. Örneğin, çapraz bağ oranı %16'dan %50'ye çıktığında naringin uzaklaştırma etkinliği %36'dan %90'a kadar yükselmiştir (MANLAN ve ark., 1990). Çapraz bağlı divinilbenzen-sitren kompleksinin de acılık gidermede benzer etki gösterip kullanılan bu farklı adsorbantların meyve suyunun bileşimine önemli bir etkisi olmadığı ve hatta acılıktaki azalma sonucu tüketici beğenisinde artışa neden

Çizelge 1. Turunçgil Sularının Acılığının Giderilmesinde Kullanılan Bazı Adsorbantlar ve Etki Ettikleri Acılık Etmenleri

Kullanılan Adsorbant	Acılık Etmeni	Kaynaklar
Polisitren divinil benzen	Naringin	KIMBALL ve NORMAN, 1990
	Limonin	MANLAN ve ark., 1990
	Neohesperidin	HERNANDEZ ve ark., 1992
	Narirutin	
β-siklodekstrin polimerleri	Naringin	SHAW ve WILSON, 1983
	Limonin	WAGNER ve ark., 1988
	Nomilin	SU ve YANG, 1991
	Naringenin	
Selüloz mono asetat	Naringin	JOHNSON ve CHANDLER, 1988
	Limonin	TSEN ve YU, 1991
Selüloz tri asetat	Naringin	SOARES ve HOTCHKISS, 1998
	Limonin	BARMORE ve ark., 1986
Florisil (aktif magnezyum)	Naringin	
	Limonin	
Poliamid reçine	Limonin	PURI ve ark. 1996a
Naylon (nylon-6 ve nylon-66)	Naringin	JOHNSON ve CHANDLER, 182
Diatome toprağı	Limonin	JOHNSON ve CHANDLER, 1985
Polisitren iyon değiştirici reçine	Limonin	JOHNSON ve CHANDLER, 1985

olduğu belirtilmiştir (FELLERS, 1989; KIMBALL ve NORMAN, 1990).

Süperkritik CO₂ ekstraksiyon uygulaması da acılık gidermede üzerinde çalışılan başka bir fiziksel yöntemdir. KIMBALL (1987) 30-60°C sıcaklıkları ve 3000-6000 psi basınçları arasında yaptığı bir çalışmada ortalama 1.5 saatlik bir ekstraksiyonda limonin niceliğinin %25 oranında azaldığını kaydetmiştir. En iyi ekstraksiyon 40°C'de 4000 psi basınçta 4 saatlik işlem sonucunda elde edilmiş ve limonin niceliği 17.6 ppm'den 6.9 ppm'e düşürülmüştür. Süperkritik CO₂ ekstraksiyonu sırasında kullanılan washington navel portakalının askorbik asit, toplam titre edilebilir asit ve toplam amino asit niceliğindeki değişim ihmal edilebilir seviyedeysen yağ oranı biraz azalmıştır. Turunçgil meyvelerinin acılığının adsorpsiyon yöntemiyle giderilmesinde yukarıdaki bahsedilen materyallerin dışında pliamid reçine (PURI ve ark., 1996b) ve diatome toprağının (JOHNSON ve CHANDLER, 1982) etkileri üzerine de çalışmalar vardır.

Fizikokimyasal Yöntemlerin Dezavantajları

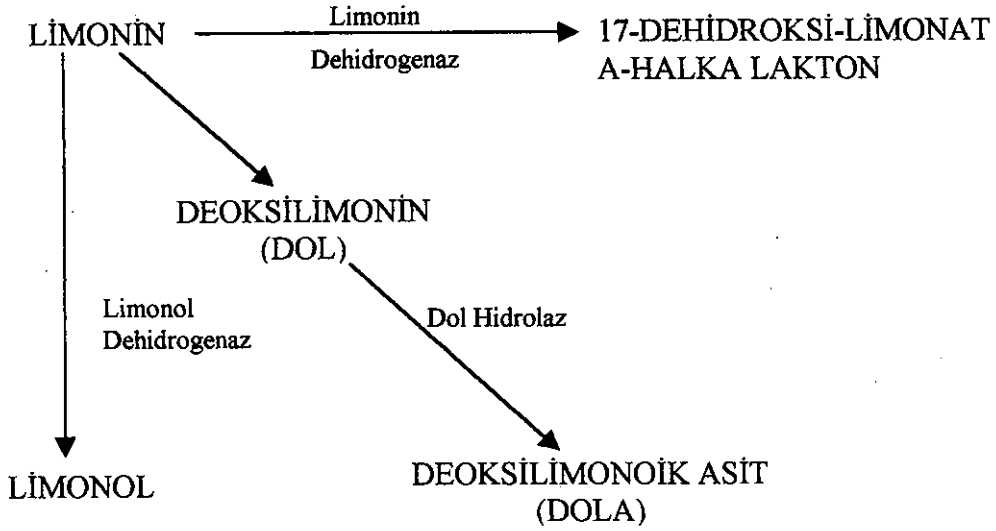
1. Kimyasal veya fiziksel adsorpsiyon sırasında meyve suyunun kimyasal yapısı da az da olsa etkilenmekte, besin kaybı, tat ve renkte kayıplar sözkonusu olmaktadır.
2. Bazı durumlarda kullanılan materyalden meyve suyuna bir bulaşı olabilmektedir. Bu da meyve suyunda yabancı madde varlığı demektir ki yasal düzenlemelerde izin verilmeyen bir durumdur.
3. Yöntemler genellikle kesikli çalıştığından zaman kaybı olmakta ve verim düşük olmaktadır.

Biyoteknolojik Yöntemlerle Acılık Giderme

Acılık gidermede fizikokimyasal yöntemlerin yukarıda bahsedilen sakıncaları yeni yöntemlerin aranmasını zorunlu kılmıştır. Fermentasyon proseslerinde, nişasta üretiminde ve hidroliz ürünlerinde ve buna benzer proseslerde mikroorganizma ve enzimlerin serbest veya immobilize formlarda kullanımı, acılık gidermede de benzer bir yöntemin kullanılabileceği fikrini doğurmuştur. Bu yönde yapılan çalışmalar sonunda naringin ve limonin gibi acılık etmenlerinin mikroorganizma veya enzimler yardımıyla kısmen veya tamamen parçalandığı veya acı olmayan formlarına modifiye edilebildikleri görülmüştür.

Mikroorganizma kullanımı

Limonin acılığının giderilmesinde mikroorganizmaların kullanımı 1970'lerde başlamıştır (PURI ve ark., 1996β). Limoninin *Arthrobacter globiformis* hücreleri ile parçalanmasında hücre içi enzim olan limonin dehidrogenaz tarafından tersinir olarak 17-dehidroksilimonat'a dönüştürüldüğü ve *Pseudomonas* 321-18 ve *Bacterium* 342-152-1 bakteri izolatlarının limonin uzaklaştırılmasında başarılı sonuçlar verdiği belirtilmiştir. Toprakta izole edilen *Acinebacter* hücreleri sezon başında daha acı olan meyvelerden elde edilen meyve sularının acılığının giderilmesinde kullanılmıştır (PURI ve ark., 1996b). Sonuçta 120 mg bakteri hücresi ile bir litre meyve suyunun yeterince içilebilir oranda iyileştirilebildiği bulunmuştur. Limonin acılığının giderilmesi temelde aşağıda verilen reaksiyon şeklinde olduğu düşünülmektedir. Tablo 2'de limonoidinin bakterilerle parçalanma görülmektedir.



Şekil 3. Limoninin acı olmayan metabolitlerine parçalanma mekanizmaları

Yukarıda verilen limonin parçalanma mekanizması *Pseudomonas* ve *Arthrobacter globiformis*-II ve bunların diğer türleri için de aynı olduğu düşünülmekle beraber Şekil 3'de limoninin diğer acı olmayan metabolitlere parçalanmaları da gösterilmiştir. Bu organizmalar bir kolon içine immobilize edildiğinde, kolondan geçirilen turunçgil sularındaki limonini acı olmayan metabolitlere parçalamaktadırlar. Bu metabolitler 17-dehidroksilimonat-A-halkalakton ve limonoldur. HASEGAWA ve ark. (1985) topraktan izole ettikleri *Corynebacterium fascians*'ın limonini limonole katalizleyen limonol dehidrogenaz ürettiğini tespit etmişlerdir. Bu bakteriler akrilamid jelde immobilize edilerek, turunçgil sularında sitrik asit, askorbik asit, fruktoz ve glikoz içeriklerine etki etmeden limoninin önemli bir kısmını nomiline dönüştürerek acılığı azaltılmıştır.

Bir başka mikroorganizma *Rhodococcus fascians* hücreleri k-karreganan kullanılarak immobilize edilerek limoninin parçalanması incelenmiştir (MANJON ve ark., 1991). Limoninin parçalanmasında pH'ın etkisi üzerinde durulan bu çalışmada optimum parçalanmanın 4.5-5.0 pH'larda olduğu bulunmuştur. Bu durum

Çizelge 2. Limonoidler Parçalayan Bakteriler ve Parçalanma Ürünleri (Puri ve ark., 1996b)

Bakteri	Parçalanma Ürün
<i>Arthrobacter globiformis</i>	17-dehidrolimonoid
<i>Pseudomonas</i> 321-18	Deoksilimonoid, 17-dehidrolimonoid
<i>Bacterium</i> 342-152-1	17-dehidrolimonoid, Deoksilimonoid
<i>Arthrobacter</i> sp.	Deoksilimonoid
<i>Arthrobacter globiformis</i> II	17-dehidrolimonoid, 7-hidroksilimonoid
<i>Corynebacterium fascians</i>	17-dehidrolimonoid, trans-19-HBA
<i>Rhodococcus fascians</i>	—

hücrenin metabolik aktivitesinin yanısıra limoninin pH'ya bağlı formunun hücreiçi enzim tarafından seçiciliğine bağlanmıştır. Organizma düşük pH'da aktivitesini giderek kaybetse ve uzun süre direnç gösterebilmiş ve pH yeniden 7.0'ye gelince tüm aktivitesini kazanmıştır. Düşük pH'da immobilize hücrelerin limonini parçalayabilmesi için uygun seyreltme oranı ve optimum işlem parametreleri araştırılmıştır.

Enzim Kullanımı

Turunçgil sularındaki acılık etmenlerinin uzaklaştırılmasında model substrat ve doğrudan meyve suyu üzerinde serbest ve immobilize enzim sistemlerinin kullanımı üzerine çalışmalar yapılmıştır. Çizelge 3'de görüldüğü gibi naringin acılığının giderilmesinde naringinaz, limonin acılığının giderilmesinde Limonin-D-halka-lakton hidrolaz (limonin dehidogenaz) immobilize enzimlerinden, nomilin acılığının giderilmesinde de serbest nomilin asetil liyazdan faydalanılmaktadır. Çizelge 3'de çalışmalarda kullanılan reaktör tipleri ve immobilizasyonda kullanılan destek materyalleri de verilmiştir.

Çizelge 3. Acılık Gidermede Kullanılan Enzim Sistemleri

Enzim	Destek Materyali	Kullanım Şekli	Substrat	Kaynak
Naringinaz	Selüloz asetat	Kolon reaktör	PNPR*	TSEN ve ark., 1989 TSEN ve YU, 1991
		Kesikli sistem	Naringin	SOARES ve HOTCHKISS, 1998
	Çitin	Kolon reaktör	PNPR	TSEN ve TSAI, 1988
	Glikofaj kaplı cam	Kolon reaktör	Naringin Prunin	JIMENO ve ark., 1987
Limonin-D-halka-lakton hidrolaz	Puliakrilamid jel	Kesikli sistem	Naringin	PURI ve ark., 1996a
	Ca-alginat			
Nomilin	serbest enzim	Kolon reaktör	Limoinin	MERINO ve ark., 1996
asetil-liyaz		Kesikli sistem	Nomilin	HERMAN ve ark., 1985

* PNPR: p-nitrofenil- α -ramnozid

Naringinin Uzaklaştırılması

Naringinaz, α -rhamnosidaz ve β -glukosidaz aktivitesine sahip bir enzim olup, naringini ramnoz, glikoz ve naringenine kadar hidrolizleyerek turunçgil sularında naringinden kaynaklanan acılığı gidermektedir (TSEN ve YU, 1991). TSEN ve ark. (1989) *Penicillium sp.*'den elde ettikleri naringinazı selüloz tri asetatı immobilize ederek bir kolon reaktörde aktivitesini incelemişlerdir. Serbest ve immobilize enzimlerin substrat olarak p-nitrofenil- α -ramnozid'i hidrolizleme yetenekleri karşılaştırılmıştır. Sonuçta enzimin optimum pH 3.7 ve 55°C'de çalıştığı fakat immobilize enzimin ısıl stabilitesinin ve Michaelis sabiti (Km) serbest enzimden daha yüksek olduğu bulunmuştur.

TSEN ve YU (1991) selüloz mono asetat ve selüloz tri asetatı immobilize ettikleri *Penicillium* naringinazını bir paket kolon reaktöründe kullanarak naringinin hidrolizlenerek, limoninin ise adsorblanarak ortamdan uzaklaştırıldığını kaydetmişlerdir. Bu işlem sırasında reaktöre verilen altıntop suyundaki naringinin %35 ve limoninin de %58 oranında uzaklaştırıldığı, şeker, toplam organik asit niceliğinde ve bulanıklığında bir kayıp olmadığı vurgulanmıştır. SOARES ve HOTHKISS (1998) yaptıkları benzer bir çalışmada naringinazın immobilizasyonunda selüloz tri asetatın daha başarılı sonuç verdiğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada immobilize enzimin optimum çalışma pH'sı 3.5-4.0 arasında bulunurken; Km değeri ve aktivasyon enerjisi serbest enzimden daha düşük olarak bulunmuştur (Serbest ve immobilize enzimlerin Km değerleri sırasıyla 3.6 mM ve 2.1 mM. aktivasyon enerjileri ise 14.2 Kcal/mol ve 11.0 Kcal/mol'dur). Çalışmanın devamında naringinaz immobilize edilmiş selüloz asetat filmi ile ambalajlanan altıntop suyunun naringin içeriği ise 7°C sıcaklıkta 15 günde yaklaşık %80 azalmıştır.

Glikofaj kaplı gözenekli cam üzerine immobilize edilen naringinaz enzimi paketli kolon reaktör sisteminde naringini hidroliz yeteneği incelendiğinde Km değerinin serbest enzimle aynı olduğu bulunmuştur. Diğer yandan reaktör altıntop suyu ile beslendiğinde kolon stabilitesinin de oldukça iyi olduğu gözlenirken; kolonda süspanse parçacıkların kalması sonucu tıkanmalar gözlenmiştir. Meyve suyunun kolona verilmeden önce durultulmasının bu uygulama sorununu kaldıracağı ve endüstriyel kullanımının mümkün olabileceği düşünülmüştür (JIMENO ve ark., 1987).

Penicillium ve *Aspergillus niger* kaynaklı naringinaz enzimlerinin kinetiği ve aktivitelerine etki eden etmenler incelenmiştir (TSEN ve TSAI, 1988). Çitin ile immobilize edilen enzimlerin stabiliteleri karşılaştırıldığında *Penicillium* kaynaklı enzimin daha stabil olduğu gözlenmiştir. Kinetik çalışmalarında Linaweaver-Burk eğrileri incelendiğinde glikoz, fruktoz ve ramnozun *Penicillium* naringinazının α -ramnosidaz aktivitesine kompetatif inhibisyon etkisi gösterirken, *A. niger* kaynaklı enzime non-kompetatif inhibisyon etki gösterdiği belirtilmiştir. *Penicillium* naringinazının inhibisyon sabitleri glikoz, fruktoz ve ramnoz için sırasıyla 178 mM, 68 mM ve 12 mM olarak bulunmuştur. JIMENO ve ark. (1987) yaptıkları inhibisyon çalışmalarında immobilize enzimde inhibisyon değerlerini ramnoz için 6.12 mM, glikoz için 260 mM, serbest enzimde ise bu değerler ramnoz için 4.27 mM ve glikoz için 430 mM olarak bulmuşlardır. Bu sonuçlardan ramnozun diğer şekerlere göre daha fazla inhibisyon etkisi gösterdiği söylenebilir.

Poliakrilamid jel, k-karregenan ve farklı derişimlerdeki Ca-alginat gibi farklı destek materyallerine immobilize edilen *Penicillium* naringinazının stabilitesinin incelendiği bir çalışmada en iyi immobilizasyonun %2'lik Ca-alginat ile elde edildiği bulunmuştur (PURI ve ark., 1996^a). Stabilizasyon çalışması sonunda pH 4.0 ve 55°C sıcaklığın optimum parametreler olduğu ve yedi saatlik inkübasyon sonunda 150-200 dev/dak karıştırmada ortamdaki naringinin %82 oranında hidrolizlenebildiği belirtilmiştir. 6°C sıcaklıkta 3 ay saklama sonunda immobilize enzimin stabilitesini aynen koruduğu gözlenmiştir.

Limonoidlerin uzaklaştırılması

Limonin mono lakton meyve suyu üretimi sırasında ortam pH'sının etkisi ile limonine dönüşerek sonradan acılığa neden olmaktadır. Portakal meyve dokularından ve değişik bakterilerden izole edilen limonat dehidrogenaz limonin mono laktonu dehidro formuna dönüştürerek limonin oluşumunu engellemektedir. Turunçgil çekirdeğinden izole edilen limonin-D-halka-lakton hidrolazının Q-sepharose destek materyaline immobilize edilerek limoninin hidrolizinin incelendiği bir çalışmada limoninin %98'e varan oranda hidrolizlendiği, immobilize enzim kolonunun 60-70 defa yeniden kullanılabilirdiği ve 4°C sıcaklıkta 6 ay boyunca stabilitesini koruyabildiği bulunmuştur (MERİNO ve ark., 1996). Ancak, immobilize enzimin çalışma pH'sı 8.0 gibi çok yüksek olması, meyve suyunda uygulanabilirliğini engellemektedir.

Nomilin de limonoid glikozid grubundan bir acılık etmenidir. *Corynebacterium fascians*'dan izole edilen nomilin asetil-liyaz enzimi nomilini obakunon'a çevirerek acılığı giderme özelliği göstermektedir. Ancak bu bakteriyel enzimin de optimum pH'sı 8.5 olduğundan endüstriyel kullanıma pek uygun değildir. HERMAN ve ark. (1985) yaptıkları bu çalışmada düşük pH değerlerinde nomilin asetil-liyaz'ın aktivitesini incelemişler ve pH 6.0 değerinde aktivitesinin %65'ini kaybettiğini bulmuşlardır.

Biyoteknolojik Yöntemlerin Dezavantajları

1. İmmobilizasyon teknikleri enzim aktivitesinin incelenmesi yönünde kullanışlı olurken acılık giderme kinetiği oldukça yavaş olduğundan ölçek büyütme için uygun değildir.
2. Optimum şartlardan biraz sapma immobilize enzimin kolondan yıkanmasına veya inaktivasyonuna neden olabilmektedir.
3. Turunçgil sularının pulplu yapısı limonin ve naringinin uzaklaştırılmasında engel olabilmektedir. Bu sorunun meyve suyunun işlem öncesi durultulmasıyla önlenilebileceği düşünülmektedir.
4. Kolonda birikinti olması, basınç düşmesi gibi sorunlar doğru akış debisinin bulunması, dengeye ulaşılabilmesi için mühendislik parametrelerin bilinmesini gerektirmektedir.

KAYNAKLAR

- ALTAN, A., 1983^a. Turunçgil sularında acılık ögesi olarak naringin. *Gıda* 8 (1) 19-32.
- ALTAN, A., 1983^b. Turunçgil sularında acılık ögesi olarak limonin. *Gıda* 8 (3) 125-129.
- BARMORE, C.R., FISHER, J.S., FELLERS, P.J., ROUSEFF, R.L., 1986 Reduction of bitterness and tartness in grapefruit juice with florisol. *J. Food Sci.* 51(2) 415-416, 439.
- FELLERS, P.J., 1989. A review of limonin in grapefruit (*Citrus paradisi*) juice, its relationship to flavour and efforts to reduce it. *J. Sci. food Agric.* 49: 389-404.
- HASEGAWA, S., VANDECOOK, C.E., CHOI, G.Y., HERMAN, Z., OU, P., 1985. Limonoid debittering of citrus juices sera by immobilized cells of *Corynebacterium fascians*. *J.Food Sci.* 50:330-332.
- HERMAN, Z., HASEGEWA, S., OU, P., 1985. Nominin acetyl-Lyase, a bacterial enzyme for nomilin debittering of citrus juices. *J. Food Sci.* 50: 118-120,124.
- HERNANDEZ, E., COUTURE, R., ROUSEFF, R., CHEN, C.S., BARROS, S., 1992. Evaluation of ultrafiltration and adsorption to debitter grapefruit juice and grapefruit pulp wash. *J. Food Sci.* 57 (3) 664-666, 670.
- JIMENO, A., MANJON, A., CANOVAS M., IBORRA, J.L.,1987. Use of naringinase immobilized on glycophasse-coated porous glass for fruit juice debittering. *Process Biochemistry*, February, 13-16.
- JOHNSON, R.L.L, CHANDLER, B.V., 1982. Reduction of bitterness and acidity in grapefruit juice by adsorptive proceses. *J. Sci. Food Agric.* 33: 287-293.
- JOHNSON, R.L., CHANDLER, B.V., 1985. Ion exchange and adsorbent resins for removal of acids and bitter principles from citrus juices. *J. Sci. Food Agric.* 36: 480-484.
- JOHNSON, R.L., CHANDLER B.V., 1988. Adsorptive removal of bitter principles and titratable acid from citrus juices. *Food Tech. S:* 130-137.
- KESTERSON, J.K., HENDRICKSON, R., 1957 Naringin, a bitter principle of grapefruit. Florida Agricultural Experiment Station, Technical Buletin, 511 A, Gainsuille, Florida, Agricultural Experiment Station, Technical Buletin, 511 A, Gainsuille, Florida, p: 29.
- KIMBALL, D.A., 1987. Debittering of citrus juices using supercritical carbon dioxide *J. Food Sci.* 52 (2) 481-482.
- KIMBALL, D.A., 1991. Naringin. In: *Citrus processing Quality Control and Technology*. Van Nostrand Reinhold, New York, p: 102-107.
- KIMBALL, D.A., NORMAN, S.I., 1990. Changes in California novel orange juice during commercial debittering. *J. Food Sci.* 55 (1) 273-274.
- MANJON, A., BASTIDA, J., ROMERO, C., JIMENO, A., IBORRA, J.L., 1991. pH control of limonin debittering with entrapped *Rhodococcus fascians* cells. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 35: 176-180.
- MANLAN, M., MATHEWS, R.F., ROUSEFF, R.L., LITTELL, R.C., MARSHALL, M.R., MOYE, H.A., TEIXEIRA, A.A., 1990. Evaluation of properties of polystyrene divinylbenzene adsorbents for debittering grapefruit juice. *J. Food Sci.* 55 (2) 440-445.
- MERINO, M.T., HUMANES, L., ROLDAN, J.M., DIEZ, J., RUIZ, A.L., 1996. Production of limonoate A-ring lactone by immobilized Limonin d-ring Lactone Hidrolase. *Biotechnology Letters*, 18 (10) 175-1180.
- PURI, M., MARWAHA, S.S., KOTHARI, R.M., 1996a. Studies on the applicability of alginate-entrapped naringinase for the debittering of kinnow juice. *Enzyme and Microbial Technology*, 18: 281-285.
- PURI, M., MARWAHA, S.S., KOTHARI, R.M., KENNEDY, J.F., 1996b. Biochemical basis of bitterness in citrus fruit juices and biotechnologicla approaches for debittering. *Critical Reviews in Biotechnology*, 16(2): 145-155.
- SHAW, P.E., WILSON, C.W., 1983. Debittering citrus juices with b-cyclodextrin polymer *J. Food Sci.* 48: 646-647.
- SOARES, N.F.F., HOTCHKISS, J.H., 1998. Naringinase immobilization to packaging films for reduing naringin concentration in grapefruit juice. *J. Food Sci.* 63 (1): 61-65.
- SU, C.S, YANG, C.P., 1991. Partial removal of various food components from aqueous solution using crosslinked polymers of cyclodextrins with epichlorohydrin. *J. Sci. Food Agric.* 54: 635-643.
- TSEN, H.Y., TSAI, S.Y., 1988. Comparison of the kinetics and factors affecting the stability of chitin immobilised naringinase from two fungal sourse. *J. Ferment Technol.* 66 (2) 193-198.
- TSEN, H.Y., YU, G.K., 1991. Limonin and naringin removal from grapefruit juice with naringinase entrapped in cellulose triacetate fibers. *J. Food Sci.* 56 (1): 31-34.
- TSEN, H.Y., TSAI, S.Y., YU, G.K., 1989. Fiber entrapment of naringinase from penicillium sp. and application to fruit juice debittering. *Journal of Fermentation and Bioengineering.* 67 (3): 186-189.
- WAGNER, J.S., WILSON, C.W., SHAW, P.E. 1988. Reduction of grapefruit bitter components in a fluidised b-cyclodextrin polymer bed. *J. Food Sci.* 53 (2) 516-518.
- YUSOF, S., GHAZALI, H.M., KING, G. S., 1990. Naringin content of local citrus fruit. *Food Chem.* 37: 113-121.