LA DÉSAMÉRISATION DES PRODUITS D'AGRUMES, EN PARTICULIER PAR VOIE ENZYMATIQUE

par **P. DUPAIGNE**

I. F. A. C.

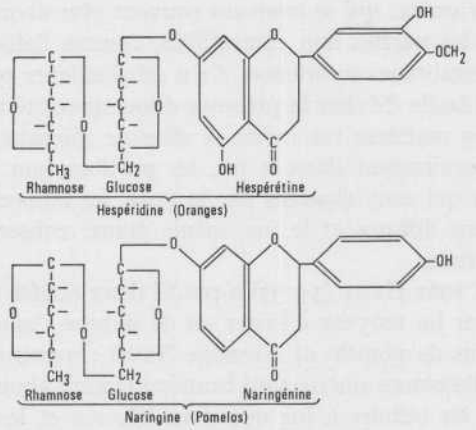

FIGURE 1 FLAVONOIDES DES AGRUMES (36)

LA DÉSAMÉRISATION DES PRODUITS D'AGRUMES

par P. DUPAIGNE

Fruits, vol. 24, n° 9-10, sept.-oct. 1969, p. 445 à 451.

RÉSUMÉ. — Beaucoup de fruits appartenant au groupe des agrumes possèdent une certaine amertume, caractéristique de leur saveur ; si elle devient excessive on doit s'efforcer de la diminuer ou de la supprimer en modifiant les composés amers. Deux de ces corps, particulièrement étudiés, sont : la Naringine que l'on trouve surtout dans le pomélo, et la Limonine qui se forme par vieillissement du jus d'oranges Navel.

Les divers procédés de désamérisation des jus, concentrés et conservés au sirop sont passés en revue, en mettant l'accent sur des travaux très récents, provenant surtout des États-Unis et du Japon, qui traitent de l'action enzymatique de certains produits du commerce : on arrive ainsi à hydrolyser partiellement les composés amers en résidus peu amers ou absolument sans goût ; mais cette action s'accompagne souvent d'effets non recherchés sur les produits de fruits, par suite du pouvoir pectolytique ou oxydasique du mélange enzymatique employé. C'est pourquoi des travaux récents visent à étudier et à produire des enzymes plus spécifiques, afin de mieux contrôler leurs effets. Une recherche fondamentale permettant d'accroître nos connaissances de base est nécessaire pour trouver la solution pratique de ce problème.

L'amertume est une des catacréristiques du goût de beaucoup d'espèces d'agrumes et constitue donc un avantage ou un inconvénient selon la qualité recherchée. Par exemple, les bourgeons floraux de *Citrus grandis* ont donné voici plus d'un siècle un principe amer qu'on a pu cristalliser. Les Oranges amères ou Bigarades qui étaient cultivées largement vers 1900 sur la Côte d'Azur pour la fleur, destinée à la parfumerie, fournissaient un fruit de peu de valeur dont on pouvait faire à la rigueur une confiture.

Pour la préparation de boissons toniques, on peut utiliser un extrait d'orange amère ou de pomélo ; à vrai dire, l'amertume de ces boissons est plus facilement obtenue au moyen de sulfate de quinine auquel on ajoute une essence de pomélo qui fournit le parfum.

Au contraire, l'amertume exagérée qui se produit dans certains jus d'orange conservés est considérée comme un grave inconvénient, à tel point que les plantations d'orangers Navel du Maroc, ont peu à peu fait place à des variétés dont le jus ne prend pas d'amertume au cours de sa conservation.

Composés de l'amertume des agrumes.

Les composés apers des agrumes ont cependant des constitutions très différentes. Celui qu'on trouve dans le pomélo est principalement la Naringine, corps dont la formule est assez voisine de celle de l'Hespéridine des Oranges et qui toutes deux sont dérivées des Flavones et possèdent ce pouvoir vitaminique que l'on désignait naguère, sous le terme générique de Vitamine P (32-36). Mais si la première est plus amère que la quinine (on peut la déceler à 100 ppm en solution), la seconde n'a pas de saveur particulière (47). Fischer (28) a prouvé récemment que le phényl-alanine des feuilles était à l'origine de ces flavonoïdes.

Quelques composés d'altération de ces flavonoïdes, comme la prunine ou la néohespéridine, sont légèrement amers, et d'ailleurs on trouve aussi de la Naringine dans l'orange du Japon, *Citrus aurantium*, qui est amère ; dans la bigarade, se trouve un glucoside, l'aurantiamarine, dans l'écorce d'orange douce la Nobiletine et la Sinensetine (25).

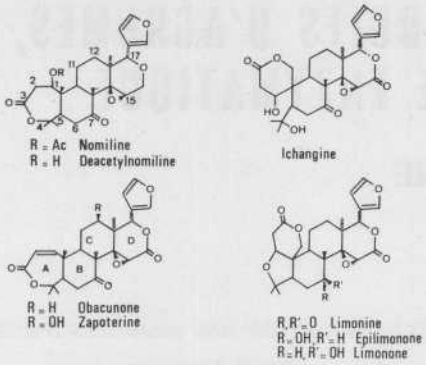

FIGURE 2 QUELQUES PRINCIPES AMERS DES AGRUMES PARMI UNE TRENTAINE DE DERIVES IDENTIFIES (19, 20)

Enfin, la formule exacte du principe amer qui se développe progressivement dans le jus d'orange Navel et qui existe d'ailleurs dans l'albédo de l'orange Valencia insuffisamment mûre, n'a été publiée que depuis 10 ans (8, 9, 11, 12, 33) : c'est un triterpénoïde désigné sous le nom de Limonine, dont le seuil de perception s'abaisse à 2 ppm. En réalité, il semble que la limonine se forme surtout par action de l'acidité et de la chaleur à partir d'un précurseur non amer contenu surtout dans l'albédo et les membranes intercarpellaires (64) et dépendant en particulier du porte-greffe (38, 43, 51).

D'ailleurs l'ensemble des principes amers terpéroïdes, étudié au Laboratoire de Pasadena et encore en cours de publication, montre que parmi les agrumes beaucoup de corps voisins et la Limonine peuvent se trouver aussi bien dans les pépins que dans l'albédo et le jus (15 à 20) ; ainsi, on constate la présence de Limonine même dans le jus de pomélo (45). Une trentaine de composés voisins ont déjà été étudiés, en particulier par résonnance magnétique nucléaire. Le dosage lui-même n'est pas facile, certains composés très différents comme les coumarines pouvant interférer (11, 12, 54, 76).

La désamérisation.

Pourquoi est-il parfois intéressant de réduire la quantité de ces divers constituants dans les produits d'agrumes ?

D'abord parce que les Hétérosides — Naringine et Hespéridine — se trouvent souvent en solution sursaturée selon les conditions d'extraction et de température, si bien que l'on risque d'obtenir au cours de la conservation des dépôts ayant une apparence boueuse et même de cristaux complexes désagréables à la vue et à la dégustation. Comme cet accident est découvert par le consommateur des conserves en boîtes (segments au sirop, jus) c'est un inconvénient majeur pour le commerce.

Ensuite, évidemment si l'amertume n'est pas recherchée (jus d'oranges ou de mandarines) tout au moins si on ne la veut pas exagérée (jus de pomélo, conserves et confitures).

Les procédés utilisables pour la désamérisation.

Comme il s'agit de jus de boissons d'agrumes, à la rigueur des conserves de quartiers d'agrumes, au sirop (mandarine, pomélo), la solution la plus simple qui vient à l'esprit est d'éviter d'incorporer aux parties comestibles, le plus complètement possible, des matières amères qui se trouvent souvent plus abondantes dans les parties non comestibles, comme l'albédo ou les membranes intérieures. Ce n'est d'ailleurs pas toujours facile d'éviter la présence d'une quantité notable de ces matières car même si elles ne séjournent que temporairement dans le jus, les portions non comestibles qui sont séparées par la suite, les laissent rapidement diffuser et le jus, même épuré, conserve son amertume.

En 1961 HUET (34, 35) a publié deux études au Maroc sur les moyens d'éviter ou de réduire l'amertume des jus de pomélo et d'orange Navel : montrant que les substances amères sont beaucoup moins abondantes dans les cellules à jus que dans l'écorce et les membranes intercarpellaires, mais qu'elles diffusent très rapidement dans le jus ; il a préconisé une extraction ménagée suivie d'un tamisage immédiat séparant le liquide de la pulpe.

Le matériel d'extraction a lui-même une influence selon qu'il écrase le fruit, ou effectue une séparation préliminaire ou presque instantanée des parties non comestibles (14, 31).

Les procédés de désamérisation proprement dite du jus, déjà amer ou risquant de devenir amer par la présence de précurseurs, ne sont pas nombreux.

On doit évidemment souligner que le jus de pomélo, naturellement riche en Naringine, peut être en partie débarrassé de ce produit qui s'y trouve souvent (comme l'hespéridine du jus d'orange) à l'état sursaturé. Un accident de conservation assez courant pour ces jus et pour les quartiers de pomélo au sirop est d'ailleurs la cristallisation naturelle, sous forme d'amas blanchâtres incorporant de la pulpe, de ces hétérosides : c'est un inconvénient grave de présentation lorsqu'il est découvert par le consommateur lui-même, insoupçonnable dans le cas d'emballages opaques.

On peut rapprocher cet accident de celui qui se produit occasionnellement pour les jus de raisin conser-

vés : si le détartrage a été insuffisant et si la température s'est temporairement abaissée pendant le stockage des récipients, le bitartrate de potassium se dépose à l'intérieur de ceux-ci sous forme de cristaux limpides ayant l'apparence de débris de verre.

Les procédés chimiques étant exclus, l'élimination de l'excès de Naringine (comme de bitartrate dans le jus de raisin), se fera assez simplement sur le jus lui-même conservé en cuves, par un abaissement de température. Mais ce stockage en cuves n'est pas courant pour les jus d'agrumes et d'ailleurs une élimination des cristaux dans le liquide de couverture de segments en conserve est impensable. Un sucrage masque partiellement l'amertume et la rend supportable ; il n'est réalisable que pour certains produits : confitures, bases concentrées pour boissons (5-7).

La dialyse permet de modifier la composition des jus d'agrumes en en retirant certains constituants, mais les constituants les plus simples passent les premiers (métaux, acides organiques), alors que les constituants amers possèdent un poids moléculaire trop élevé.

L'absorption sélective est, par contre, un procédé que nous avons déjà utilisé dans les jus limpides pour en corriger l'astringence (22). Nous avons essayé des poudres de polyamides, Rilsan et Divergan qui diminuent effectivement la teneur du jus en polyphénols. Récemment, CHANDLER, KEFFORD et ZIEMELIS (11) ont utilisé au Laboratoire de Conservation des aliments de North Ride (CSIRO) en Australie, des poudres de plastiques pour retirer l'amertume des jus d'oranges Navel : un Nylon 66 de la BASF et un polyvinyl pyrolidone (Polyclar) ; ces poudres vendues couramment pour fabriquer les objets par moulage ne sont pas inertes et peuvent absorber les composés actifs chimiquement, comme le sont aussi bien les flavanones que les triterpénoïdes. L'amertume a pu disparaître facilement des jus préalablement clarifiés afin d'éviter un rapide colmatage de la poudre fine, et les produits amers ainsi séparés ont pu être récupérés à partir de la poudre.

Procédés enzymatiques.

D'où vient l'idée d'une possibilité de dégradation enzymatique des facteurs amers contenus dans les agrumes ? Sans doute y a-t-on pensé dès que les principaux de ces facteurs ont pu être isolés, purifiés et identifiés. Il semble que les premiers essais publiés datent de la fin de l'année 1950 ; HUET (34) avait déjà cité en 1961 les premiers brevets sur l'hydrolyse de la naringine par un produit pectolytique complexe du

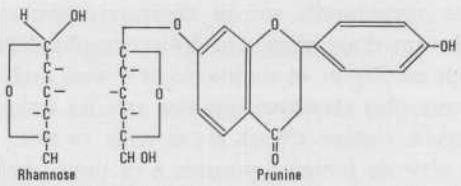

FIGURE 3 HYDROLYSE A 4' DE LA NARINGINE PAR LA NARINGINASE (36)

commerce, le Pectinol de Rohm and Haas Company (Philadelphia) utilisé depuis longtemps pour la clarification des jus pectiques : TING (74-76), THOMAS (73), SMYTHE (70) en Floride, GRIFFITHS (30) au Texas, MC COLLOCH (44) à Pasadena en Californie.

Dans notre rapport de 1962 au Symposium de Berne (21), nous avions de plus signalé les premiers travaux japonais de KISHI (40) et INAGAKI (37) sur l'emploi des extraits enzymatiques tirés du Soja et qui possédaient un effet pouvant diminuer l'amertume de certaines oranges, ou ce qui revient au même, pouvant empêcher la formation d'un trouble cristallin dans le sirop de couverture des conserves d'oranges.

Peut-être est-on allé un peu vite en appelant de tels produits Naringinase car il s'agit certainement de mélanges enzymatiques complexes sur les glucosides en plusieurs stades, et non d'un enzyme déterminé ; certains ont même nié l'existence d'une telle naringinase. Cependant, aujourd'hui on pense que certaines souches microbiennes peuvent produire, entre autres, des enzymes ayant une action réelle assez spécifique sur la naringine par exemple, En 1962, DUNLAP (24) a montré que la Naringinase C 100, produit du commerce, pouvait être scindée par électrophorèse en deux enzymes, une Rhamnosidase et une glucosidase.

L'année siuvante, c'était STERN et BASKER (71) en Israël qui étudiaient les températures optimales pour désaméríser le jus de pomélo avec une Naringinase.

Parmi les auteurs américains, nous avons déjà signalé que SMYTHE et THOMAS (70) ont breveté en 1960 la production de Naringinase par culture d'*Aspergillus niger*. Plus tard, OLSEN et HILL (59, 60, 61), en Floride, ont étudié et publié les conditions d'action d'une Naringinase sur les jus de pomélo.

Par contre, les résultats publiés par les Russes sont essentiellement différents des précédents, pour lesquels la Naringinase accompagne souvent des enzymes pectolytiques (2). Un brevet russe de A. T. MARKH (46), technologue fort connu, obtient une désamérisation de jus de pomélo par action enzymatique, au moyen de l'addition d'extraits de chou ou même de pomme contenant des péroxydases.

Mais les travaux les plus abondants et, semble-t-il,

les plus approfondis sur la désamérisation enzymatique des jus d'agrumes, ont été accomplis depuis peu de temps au Japon, et commencent à nous arriver sous une forme plus classique que des articles uniquement en japonais comme c'était le cas voici 10 ans.

Une série de facteurs propres à ce pays peut expliquer le pourquoi de ces recherches (23) :

— La fabrication industrielle de quartiers de satsuma ou d'orange-mandarine au sirop est toujours florissante ; on peut lui adjoindre celle des quartiers épluchés de pomélo et une fabrication de jus d'agrumes.

— Parmi les agrumes, une sorte d'orange amère (C. NATSUDAIDAI) est largement cultivée ; son utilisation sous forme de jus en conserve ou congelé exige, si possible, une réduction de l'amertume.

— Des produits traditionnels utilisent le soja comme matière première, et les moisissures qui peuvent s'y cultiver (sauces, tofu) ; or, des enzymes pectolytiques et agisant sur les hétérosides, peuvent être tirés de ces produits.

Nous avons précédemment parlé du brevet pris par INAGAKI (37) en 1956 sur le moyen d'empêcher la formation d'une boue cristalline dans les conserves d'orange-mandarine, par destruction partielle au moyen d'un mélange pectolytique, et des essais de KISHI (40) en 1958 sur la production d'une Naringinase à base de soja. Un brevet antérieur avait été publié en 1955 (3). Après 1960, le terme de Naringinase est devenu courant.

NAKABAYASHI (50) examine en 1962 les conditions optimales de température pour l'action enzymatique sur le jus d'orange amère ; l'amertume de ces oranges (C. NATSUDAIDAI) est décrite par FUKUMOTO et OKADA (29) l'année suivante, et nous trouvons en même temps les études d'origines diverses sur la désamérisation enzymatique.

MATSUI (49) à la station de recherches d'Okitsu, montre que la dégradation de la Naringine est accompagnée d'une perte de Vit. C, dans le jus de Natsudaidai, ce qui risque d'en faciliter le brunissement.

NOMURA (51, 52, 53) de la Faculté de Yamaguti, détermine les conditions d'emploi de l'enzyme pour ce jus, l'activité maximale à 55º pour un *p*H de 4,3 ; mais le sucrage excessif du jus, utilisé pour masquer l'amertume, ralentit cette action.

Avec KISHI et FUKUMOTO déjà cités, nous trouvons cette fois OKADA comme chef de file ; la spécialité des deux enzymes de dégradation des flavonoïdes, l'hespéridinase et la naringinase, est soulignée (56) ; leur séparation à l'état pure ainsi que les hydrolases de la Prunine et de l'Hespéritine-Glucoside, est réalisée par électrophorèse (57) ; leur action peut être suivie par dosage photométrique des flavonoïdes restant (58). De leur côté, OMURA et CHIKANO (62, 63) dans l'île de Kyushu s'efforcent de supprimer des préparations commerciales de Naringinase l'action pectasique résiduelle ; ils obtiennent ce résultat par chauffage, les pectolytiques étant détruites à 100º, en en amenant le *p*H à neutralité. En effet, l'utilisation d'un mélange enzymatique contenant des galacturonases rend le traitement des jus troubles et pulpeux difficile, à cause de la précipitation des pectines qui entraîne les particules en suspension.

A partir de 1966, nous avons noté que OASHI (55) a étudié l'action de désamérisation enzymatique du jus d'une autre variété de Citrus, nommée Natsumikan, par dosage de la naringine résiduelle au moyen de la chromatographie sur papier. C'est alors que l'Institut de Technologie alimentaire (ancien Institut oriental de la Conserve) publie une série de travaux dont la série n'est, sans doute, pas terminée. Une équipe (MORI, OKU, SAWAYAMA, SHIMODA, etc.) a repris les essais de base sur l'intérêt de dégrader les flavonoïdes par voie enzymatique. La prévention du dépôt cristallin dans les conserves de *Citrus Unshu*, qui avait fait l'objet du brevet de 1956 de INAGAKI, a été améliorée et le simple trouble apparaissant dans le sirop, par formation lente de cristaux d'hespéridine, est mieux empêché par addition d'hespéridinase qu'au moyen d'un agent comme la méthyl-cellulose (65).

Revenant au jus de l'Orange amère, *C. Natsudaidai*, le mode d'action de la Naringinase est détaillé ; elle transforme d'abord la Naringine en Prunine et une Flavone-Glucosidase agit sur la Prunine pour donner finalement la Naringénine (53, 66). Sur les segments au sirop de cette orange, l'action de désamérisation est évidemment plus délicate, puisque l'action pectolytique doit être évitée (67).

Quel édulcorant employer dans les conserves d'Orange amère, puisque NAKABAYASHI (50), KUBO (41), puis NOMURA (52) avaient prouvé que le saccharose pouvait ralentir l'action diastasique ? Même après 3 mois de conservation, l'amertume persistait dans les jus sucrés (59) ; on a donc essayé des édulcorants de synthèse, mais ils possèdent aussi un effet d'inhibation, toutefois la saccharine a moins d'action que le cyclamate ; ces produits sont d'ailleurs couramment autorisés au Japon dans les produits alimentaires (60).

Pour résumer, il semble que les travaux soient avancés sur la destruction enzymatique de la Naringine, mais par contre presque inexistants sur celle de la Limonine et des autres Terpénoïdes amers. Les travaux américains sur l'orange Navel mentionnent cette possibilité, toujours par action des enzymes pectiques

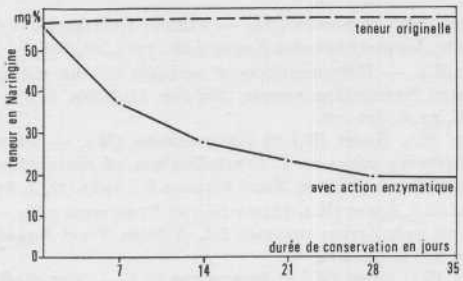

FIGURE 4 ALLURES DES COURBES D'HYDROLYSE DE LA NARINGINE A TEMPERATURE CONSTANTE DANS DES CONSERVES DE C. NATSUDAIDAI (59)

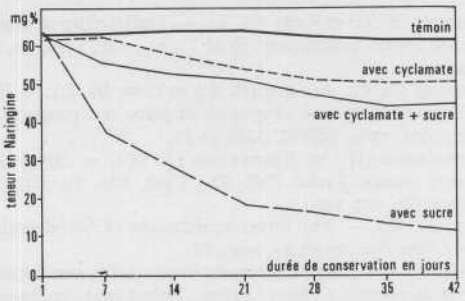

FIGURE 5 EFFETS DES EDULCORANTS SUR L'HYDROLYSE (69)

du commerce (44-48) ; mais comme on sait que ces produits sont en réalité des mélanges complexes, il faudrait en séparer chaque constituant et essayer son action sur des solutions modèles au début. Peut-être ces enzymes pectiques n'ont-ils un effet sur l'amertume que par une insolubilisation des matières colloïdales entraînant partiellement la limonine : c'est l'hypothèse rapportée par le travail de HUET (35) ; dans une réunion de travail récente, un auteur disait avoir obtenu des boissons contenant en suspension des cellules intactes d'Oranges, par action d'un produit ayant une action spécifique sur les pectines à faible degré de méthoxylation qui permettait de dissocier ces cellules sans en détruire la paroi. C'est donc un moyen d'éviter la formation de la limonine qui, comme on le sait, apparaît en solution dans les jus ou boissons d'oranges Washington Navel (*).

Mais il est certain que la voie reste libre pour des recherches de base sur les diverses possibilités de dégradation enzymatique de la limonine en composés non amers.

(*) Voir dans un prochain numéro de *Fruits* notre compte rendu du Symposium de la Commission Scientifique F. I. P. J. F. à Aarhus (Danemark).

BIBLIOGRAPHIE

(1) Anonyme. — Improved products made from Navel orange. Rep. AIC, A. R. A., USDA, 1960.
(2) Anonyme. — Désamérisation des jus d'agrumes. *Rev. Cons.*, février 1954, *9*, 2, 84.
(3) Anonyme. — New fruit technique. *Food Eng.*, ang 1963, *35*, 8, 78.
(4) Anonyme. — Bitterness in Citrus fruits. *Food Proc. Pack.*, fev. 1964, *33*, 389, 66.
(5) Anonyme. — Citrus processing. Brev. Jap., 65, 848, 14 juin 1965.
(6) Anonyme. — Grapefruit juice preparation. *Brev. Jap.*, 1968, 28.1. 1965.
(7) Anonyme. — Non bitter orange base. U. S. Pat., N. 2.834.687, 1965.
(8) ARIGONI (D.) et Coll. — The constitution of Limonin. *Experientia*, 1960, *16*, 41-49.
(9) ARNOTT (S.) et Coll. — The structure of Limonin. *Experientia*, 1960, *16*, 49-51.
(10) BURDICK (E. M.) et MAURER (R. M.). — Renoval of Naringine from solutions. US Pat 2.510.191, Jan. 1950.
(11) CHANDLER (B. V.), KEFFORD, (J. F.) et LENZ (F.). — Determination of Limonin. *Nature*, 1966, *210*, 868.
(12) CHANDLER (B. V.), KEFFORD (J. F.) et ZIEMELIS (G.). — Chem. assay of Limonin, the bitter principle of oranges. *J. Sci Food Agr.*, mai 1966, *17*, 6, 193-197.
(13) CHANDLER, (B. V.), KEFFORD (J. F.) et ZIEMELIS (G.). — Renoval of Limonin from bitter orange juice. *J. Sci. Food Agr.*, fév. 1968, *19*, 2, 83-86.
(14) DANTZIGER (H. T.) et MANNHEIM (C. M.). — Correlation between orange juice quality and different conditions of extraction. *Israël J. Technol.*, 1967, *5*, 3, 216-220.
(15) DREYER (D. L.). — Citrus Bitter principle II. Application of NMR to structural problem. *Tetrahedron*, 1965, *21*, 1, 15, 87.
(16) DREYER (D. L.). — Citrus bitter principle III. Isolation of Deacetyl and Deoxylimonin. *J. Org. Chen.*, mars 1965, *30*, 3, 749, 751.
(17) DREYER (D. L.). — Citrus bitter principle VI. Ichangin. *J. Org. Chen.*, *31*, 7, 2219-81, jul. 1966.
(18) DREYER (D. L.). — Citrus bitter principle VII. Rutaevin. *J. Org. Chem.*, nov. 1967, *32*, 11, 3342-5.
(19) DREYER (D. L.). — Citrus bitter principle VIII. Application to stereochemical problems. *Tetrahedron*, 1968 avril, *24*, 8, 3273-3283.
(20) DREYER (D. L.). — Citrus bitter principle IX. Zapoterin. *J. Org. Chem.*, nov. 1968, *33*, 9, 3377-85.
(21) DUPAIGNE (P.). — Arômes, précurseurs d'arômes et enzymes. IFU. Sympos. *Fruchtaromen*, Bern 1962, 7-24.
(22) DUPAIGNE (P.). — Kläversuche an Getränken mit Polyamidpulver. *Flüssiges Obst*, oct. 1964, *31*, 10, 504-10.
(23) DUPAIGNE (P.). — Quelques observations sur la production fruitière au Japon. *Fruits*, déc. 1964, *19*, 11, 620-622.
(24) DUNLAP (W. J.), HAGEN (E. S.) et WENDER (S. M.). — Preparation and properties of rhamosidase and glucosidase fractions from Naringinase. *J. Food Sci.*, nov. 1962, *27*, 6, 597-601.
(25) EDWARDS (J. A.). — Bitter flavour in Orange peel. *Food Manuf.*, nov. 1964, *39*, 11, 60.
(26) EMERSON (O. H.). — Bitter principles of Citrus fruits. I. Nomilin. *J. Am. Chem. Soc.*, 1948, *70*, 543.
(27) EMERSON (O. H.). — The bitter principle of Navel orange. *Food. Techn.*, juill. 1949, *3*, 7, 248-50.
(28) FISHER (J. R.). — Radioactive Naringin from Grapefruit leaves. Proc. Conf. Citrus Chem., Winter Haven, 1968, ARS 72-66, p. 3.
(29) FUKUMOTO (J.) et OKADA (S.). — Bitter taste of C. Natsudaidai. *Kagaku* 1963, *18*, 614-617.

(30) Griffiths (F. P.) et Lime (B. J.). — Debittering of grapefruit products with naringinase. *Food Techn.*, aug. 1959, *13*, 8, 430-433.

(31) Griffiths (F. P.), Albach (R. F.) et Lime (B. J.). — Factors influencing bitterness of grapefruit juice and products. *Proc. Citr.*, conf. 1964, USDA, ARS 72-43.

(32) Hendrickson (H.) et Kesterton (J. W.). — Hesperidin in Florida orange. *Techn. Bull. 684, Univ. Fla. Ag. Exp.* Saint-Gainesville, oct. 1964.

(33) Higby (R. H.). — The bitter constituant of Navel orange. *J. Am. Chem. Soc.*, 1938, *60*, 3013-18.

(34) Huet (R.). — Influence du mode d'extraction sur l'amertume du jus de pomélo. *C. Rech. Agron.*, Rabat 1961, 11, 83-92.

(35) Huet (R.). — L'amertume du jus d'orange Navel. *C. Rech. Agron.*, Rabat 1961, 11, 94-101.

(36) Huet (R.). — Les flavonoïdes d'agrumes. *Al Awamia*, avr. 1962, 3, 87-101.

(37) Inagaki (N.) et Fukura (M.). — Prevention of the development of white turbidity of canned Citrus fruits. *Jap. Pat.*, 56-390, janv. 1956.

(38) Kefford (J. F.), Chandler (B. V.) et Lynch (L. J.). — Influence du porte-greffe à l'amertume du jus d'orange Navel. *C. Sci. Techn.* FIJU, Paris 1959 (I. F. A. C.).

(39) Kefford (J. F.). — Composition of bitter principles of orange, *Austr. J. Agr. Res.*, *12*, 1, 56-68, 1961.

(40) Kishi (K.). — Naringinase. III The Soybean-Constituent effective for the formation of naringinase. *Kagatu to kogyo*, 1958, *32*, 389-392.

(41) Kubo (S.), Bessho (Y.) et Manabe (T.) — Utilization of C. Natsudaidai, V. Changes of temperature and sugar composition. *Nippon Shokuhin Kogyo Gak.*, 1966, *13*, 6, 230-236.

(42) Kubo (S.) et Bessho (Y.). — Utilization of C. Natsudaidai, VI. Renoval of bitter taste by maringinase. *Nippon Shokuhin Kogyo Gak.*, 1967, *14*, 12, 511-517.

(43) Lenz (F.). — Vorkommen von Bitterstoffe in Apfelsinnensäften. *Flüssiges Obst.*, oct. 1966, *33*, 10, 468-9.

(44) Mc Colloch (R. J.). — Debittering Navel Orange Products. *Calif Citrog.*, mai 1950, *35*, 7, 290.

(45) Maier (V. P.) et Dreyer (D. L.). — Citrus bitter principles IV. Occurence of Limonin in grapefruit juice. *J. Food Sci.*, sept. 1965, *30*, 5, 874-75.

(46) Markh (A. T.). — Altération biochimique des jus d'agrumes. *Trudy Odessk. Teknol. Inst.*, 1953, *5*, 2, 80-7 (CA mai 1955, *49*, 9, 6499).

(47) Marsh (G. L.) et Cameron (S. M.). — Bitterness in Orange juice. *Citrus leaves*, juill. 1950, *30*, 7, 7-30.

(48) Marsh (G. L.). — Bitterness in Navel Orange. *Food Techn. Avr.*, 1953, 7, 4, 145-50.

(49) Matsui (S.). — Processing and storage of some fruit juice products in Japan. *Okitsu Hort. Res. Sta. Bull.*, mars 1963, *B2*, 95-179.

(50) Nakabayashi (T.). — Removal of bitter substances in orange with naringinase. *Nippon Shok. Kogyo Gak.*, 1962, *9*, 7, 284-9.

(51) Nankivell (W. I.). — Rootstock controlling bitterness. *Rur. Res. CSIRO*, 1961, *36*, 10-12.

(52) Nomura (D.), Akiyama (K.), Shinmoto (S.). — Perfect utilization of Citrus fruits I. Canning of C. Natsudaidai debittered by naringinase. *Nippon Shokuhin Kogyo Gak.*, 1963, *10*, 4, 115-118.

(53) Nomura (D.). — Chemical characteristics of commercial naringinase preparations in Japan. *Bull. Fac. Agr. Yamaguti Univ.*, 1953, 14, 397-408.

(54) Nomura (D.) et Santo (J.). — Perfect Utilizatıon of Citrus Fruits. *Nippon Shokuhin Kogyo Gak.*, 1965, *12*, 100.

(55) Oashi (S.). — Determination of naringin in the naringinase treated Natsumikan orange. *Nippon Shokuhin Kogyo Gak.*, 1966, *13*, 6, 230-236.

(56) Okada (S.), Kishi (K.) et Nigashihara (M.). — Flavonoid hydrolyring enzymes I. Crystallization of naringinase and hesperidinase. *Nippon Nogei Kagaku K.*, 1963, *37*, 2, 84-89.

(57) Okada (S.), Kishi (K.), Itaya (K.) et Fukumoto (J.). — Flavonoïd hydrolyring enzymes III. *Nippon Nogei Kagaku K.*, 1963, *37*, 3, 146-150.

(58) Okada (S.), Yano (M.) et Fukumoto (J.). — New method of naringine determination and its applications. *Kagaku to Kogyo*, 1965, *39*, 2, 96, 101.

(59) Olsen (R. W.) et Hill (E. C.). — Debittering of concentrated grapefruit juice with naringinase. *Proc. Fla. St. Hort. Sci.*, 1964, *77*, 32, 1-5.

(60) Olsen (R. W.). — Enzymatic debittering of processed grapefruit products A. *Rep. Univ. Fla. Agr. Exp. St.*, 1966, 244.

(61) Olsen (R. W.) et Hill (E. C.). — Enzymatic debittering. *Proc. Fla. Stato Hort. Soc.*, 1967, *80*, 266.

(62) Omura (H.), Chikano (T.) et Hatano (S.). — Pectic enzyme in naringinase preparations. *Kyushu Daig. Nog. Gaku. Z.*, 1963, *20*, 4, 309-319.

(63) Omura (H.), Chikano (T.) et Ishizaki (K.). — Removal of pectinase activity in naringinase preparations. *Kyushu Daig. Nog. Gaku. Z.* 1963, *20*, 4, 321-327.

(64) Samish (Z.) et Gang (D.). — Bitterness in Shamouti oranges. Canner, juin 1950, *110*, 23, 7-24, 36-25, 12.

(65) Sarvayama (Z.), Shimoda (Y.) et Oku (M.). — Muddiness prevention in canned mandarine, orange with enzyme, I. *Ann. Rep. Toyo Inst. Food Techn.*, 1966, *7*, 126-134.

(66) Shimoda (Y.), Oku (M.) et Sawayama (Z.). — Debittering of Natsudaidai with naringinase, I. Problems of analysis. *Ann. Rep. Toyo Inst. Food Tech.*, 1966, *7*, 108-116.

(67) Shimoda (Y.), Oku (M.) et Sawayama (Z.). — Debittering of Natsudaidai with naringinase, II. Canned Natsudaidai. *Ann. Rep. Toyo Inst. Food Techn.*, 1966, *7*, 117-125.

(68) Shimoda (Y.), Oku (K.) et Mori (D.). — Debittering of Natsudaidai with naringinase, III. Effect on products. *Ann. Rep. Toyo Inst. Food Techn.*, 1968, *8*, 140-147.

(69) Shimoda (Y.), Oku (M.) et Mori (D.). — Debittering of natsudaidai with naringinase, IV. Effect on sweetened products. *Ann. Rep. Toyo Inst. Food Techn.*, 1968, *8*, 148-158.

(70) Smythe (C. V.), et Thomas (D. W.). — Conversion of flavonoïd glycoside. U. S. Pat., 2, 950-974, 30 aug. 1960.

(71) Stern (F.), Basker (M. B.) et Berkovits (S.). — Enzymatic hydrolysis of naringine. *Israël J. Technol.*, déc. 1963, *1*, 2, 59.

(72) Takeda chem. Ind. — Procédé pour supprimer l'amertume naturelle des fruits Brevet F. Nº 1. 484. 768.

(73) Thomas (D. W.), Smythe (C. V.) et Labbee (M. D.). — Enzymatic hydrolysis of naringin. *Food Res.*, nov. 1958, *23*, 6, 592-8.

(74) Ting (S. V.). — *Ann. Rep. Univ. Fla. Agr. Exp. Sta.*, juin 1953, 214-216.

(75) Ting (S. V.). — Enzymic Hydrolysis of naringine in grapefruit. *J. Agr. Food Chem.*, juil. 1958, *6*, 7, 546-9.

(76) Wilson (K. W.) et Crutchfield (C. A.). — Spectrophotometric determinations of limonin in Orange Juice. *J. Agr. Food Chem.*, jan. 1968, *16*, 1, 118-125.