

# Libération biologique d'arômes à partir de fruits tropicaux

Y GUEGUEN  
P CHEMARDIN  
G JANBON  
A ARNAUD  
P GALZY

Chaire de microbiologie  
industrielle et de génétique  
des microorganismes  
Ensa  
Place Pierre-Viala  
34060 Montpellier cedex 01  
France

A PARFAIT  
Station de technologie  
des produits végétaux  
Inra  
BP 1232  
97184 Pointe-à-Pitre cedex  
France

## Libération biologique d'arômes à partir de fruits tropicaux.

### RÉSUMÉ

Le développement de technologies de pointe pour l'amélioration des qualités aromatiques des produits alimentaires a été l'objet de nombreuses recherches ces dernières années. L'objectif de notre travail est l'étude de la libération de terpènes à partir de précurseurs  $\beta$ -glycosylés par la mise en œuvre d'un complexe enzymatique de nature  $\beta$ -glucosidasiq. Les essais d'hydrolyse conduits avec la  $\beta$ -glucosidase exocellulaire de *Candida cacaoi* ont montré que cette enzyme était apte à libérer une certaine fraction de la composante liée. Le pH des jus ne coïncide pas avec le pH optimal de l'enzyme et celle-ci n'est pas stable au cours du traitement. C'est pourquoi des essais d'hydrolyse sont actuellement conduits avec la  $\beta$ -glucosidase de *Candida molischiana* 35M5N qui présente un pH optimal très proche de celui des jus de fruits et une très grande stabilité.

## Biological aroma release from tropical fruit.

### ABSTRACT

There have been many recent research investigations aimed at developing advanced technologies to improve the aromatic qualities of food products. The present study focused on the release of terpenes from  $\beta$ -glycosylate precursors using a  $\beta$ -glucosidase enzyme complex. Hydrolysis analyses using exocellular  $\beta$ -glucosidase from *Candida cacaoi* revealed that this enzyme was able to release a fraction of the bound component. The pH of fruit juices did not match the optimal enzymatic pH, which was not stable during treatment. Hydrolysis tests are therefore currently under way using  $\beta$ -glucosidase from *Candida molischiana* 35M5N, which has a highly stable optimal pH, very close to that of fruit juices.

## Liberación biológica de aromas a partir de frutas tropicales.

### RESUMEN

El desarrollo de tecnologías de punta para el mejoramiento de las calidades aromáticas de los productos alimentarios fue el objeto de numerosas investigaciones estos últimos años. El objetivo de nuestro trabajo es el estudio de la liberación de terpènes a partir de precursores  $\beta$ -glucosilados por la aplicación de un complejo enzimático de naturaleza  $\beta$ -glucosidásico. Las pruebas de hidrólisis conducidas con el  $\beta$ -glucosidase exocelular de *Candida cacaoi* mostraron que esta enzima era apta para liberar una cierta fracción de la componente ligada. El pH de los jugos no coincide con el pH optimal de la enzima y esta no es estable durante el tratamiento. Es por eso que unos ensayos de hidrólisis son actualmente conducidos con la  $\beta$ -glucosidase de *Candida molischiana* 35M5N que presenta un pH optimal muy cercano del de los jugos de fruta y una gran estabilidad.

Reçu le 9 octobre 1996  
Accepté le 26 février 1997

Fruits, 1996, vol 51, p 299-305  
© Elsevier, Paris

### MOTS CLÉS

Fruit tropical, précurseur  
d'arôme,  $\beta$ -glucosidase,  
immobilisation.

### KEYWORDS

Tropical fruits, aroma  
precursors,  $\beta$ -glucosidase,  
immobilisation.

### PALABRAS CLAVES

Frutas tropicales, precursor  
de aroma,  $\beta$ -glucosidasa,  
inmovilización.

## ● introduction

L'utilisation d'enzymes en technologie alimentaire, pour la transformation de la matière première, n'est pas une nouveauté technologique puisque la fabrication de pain, de boissons ou de fromages fait, depuis longtemps, appel à ces procédés. Cependant, depuis quelques années, le développement de nouveaux produits alimentaires d'une part, leurs exigences technologiques organoleptiques et nutritionnelles d'autre part ont créé de nouveaux besoins et un nouveau marché, celui des produits de synthèse utilisés dans les industries de seconde transformation : acides organiques, composés responsables des arômes et de la flaveur, édulcorants, corps gras à valeur nutritionnelle déterminée, etc. Parmi ces composés, les arômes prennent une place croissante dans l'industrie agroalimentaire.

Les constituants aromatiques sont des composés volatils. Ils appartiennent aux différentes classes de molécules. On trouve des hydrocarbures et des composés possédant un ou plusieurs groupements fonctionnels (alcool, éther-oxyde, aldéhyde, cétone, ester, amine, amide) et divers hétérocycles. Ils n'apportent aucune contribution nutritive à l'aliment dans lequel ils se trouvent. Mis à part les épices et les aromates, dont l'utilisation sert à rehausser la flaveur des aliments, les composés aromatiques ne représentent qu'une part infime de la masse du produit alimentaire à l'intérieur duquel ils se trouvent.

Cependant, les méthodes traditionnelles d'obtention des arômes naturels sont aujourd'hui trop coûteuses. Les arômes obtenus par synthèse chimique, s'ils conviennent pour la composition des parfums et des cosmétiques, soulèvent des difficultés d'ordre législatif et ont tendance à être boudés par le consommateur. Les recherches s'orientent donc vers l'obtention d'arômes, à un coût raisonnable, pouvant obtenir le label « naturel ». La voie enzymatique semble donc être intéressante pour répondre aux exigences d'ordre tant technique qu'économique et législatif. Ainsi, la synthèse de composés d'arômes par action d'enzymes sur des précurseurs non volatils est l'une des voies de

synthèse des composés volatils dans les aliments.

Il a été montré que les composants aromatiques majeurs qui contribuent notamment au caractère organoleptique des vins de muscat sont des monoterpènes, il s'agit principalement du linalol, nérol, et, dans de moindres proportions, du citronellol et de l' $\alpha$ -terpinéol (MARAIS, 1983 ; RAPP et al, 1984 ; GUNATA, 1984 ; GUNATA et al, 1990). D'autres variétés de raisin comme le Sauvignon blanc (AUGUSTYN et al, 1982) et le Chardonnay (SYMPSON et MILLER, 1984) contiennent aussi des monoterpènes, mais à de plus faibles concentrations. De tels composés ont été détectés, par ailleurs, dans d'autres fruits que le raisin : l'abricot et la mangue (CROUZET et al, 1983), la papaye (HEIDLAS et al, 1984), le fruit de la passion (ENGEL et TRESSL, 1983 ; SHOSEYOV et al, 1990), la tomate (CROUZET et SECK, 1982 ; BUTTERRY et al, 1990) et plus récemment la prune (KRAMMER et al, 1991).

Si de nombreux travaux ont été consacrés à l'étude des monoterpènes libres, en revanche, fort peu l'ont été à celle de leurs formes  $\beta$ -glycosylées. Ces composés ne sont pas volatils et sont inodores. La présence de ces précurseurs aromatiques dans les vins de muscat, soupçonnée pour la première fois par CORDONNIER (1956), a été depuis largement confirmée (CORDONNIER et BAYONOVE, 1974 ; WILLIAMS et al, 1980, 1982 a, b, 1983 ; WILSON et al, 1986 ; SALLES et al, 1990). Des glycosides terpéniques ont également été trouvés dans de nombreux végétaux (STAHL-BISKUP, 1987). On rencontre également ce genre de composé, par exemple, dans les pétales de rose (FRANCIS et ALLCOCK, 1969) et dans tous les fruits cités précédemment.

Les copules glucidiques intervenant dans la synthèse des hétérosides terpéniques peuvent être regroupées au sein de deux grands groupes (VASSEROT et al, 1995) :

- les copules monosaccharidiques (le  $\beta$ -D-glucopyranose qui est le plus fréquemment rencontré, le  $\beta$ -L-arabinopyranose et le  $\beta$ -D-galactopyranose),
- les copules disaccharidiques (rhamno-glucosidiques, arabino-glucosidiques, galacto-glucosidiques et apio-glucosidiques).

Lors de la maturation des fruits, ces précurseurs ne sont que partiellement transformés en composés d'arôme (WILSON et al, 1984). Ils restent donc présents en quantité non négligeable dans les vins et les jus de fruit. Le rapport de la quantité de monoterpènes liés à des glycosides sur celle des monoterpènes libres a pu être estimé dans la plupart de ces produits. Il est compris entre 1/1 et 5/1 (WILLIAMS et al, 1985). Ces précurseurs d'arômes représentent donc une source importante d'arôme potentiel. La transformation de ces précurseurs en composés odorants rehausserait l'arôme des produits alimentaires et améliorerait d'autant leurs qualités.

L'hydrolyse enzymatique des glycosides terpéniques fait l'objet de nombreuses études et de nombreux chercheurs ont utilisé des  $\beta$ -glucosidases (SHOSEYOV et al, 1990; GUNATA et al, 1990; VASSEROT et al, 1993). Les résultats ont montré que ces enzymes sont capables de libérer les monoterpénols de leurs formes liées. Différents brevets ont déjà été déposés en ce sens, aussi bien à destination de la parfumerie (AMBIB, 1987) que de l'agroalimentaire (SHOSEYOV, 1989). C'est dans le cadre de cette application d'amélioration de la qualité aromatique que différents essais d'hydrolyse de précurseurs d'arômes ont été entrepris avec les  $\beta$ -glucosidases de *Candida cacaoi* et *Candida molischiana* 35M5N sur des fruits tropicaux.

### ● étude des composés terpéniques présents chez certains fruits tropicaux

Tout d'abord, la présence de divers composés terpéniques et autres alcools cycliques aromatiques a été recherchée chez plusieurs fruits tropicaux (tableau I). Les résultats obtenus montrent que les productions étudiées possèdent, dans leur état naturel, de nombreux composés terpéniques sous forme libre. Par ailleurs, d'autres auteurs ont montré que ces composés existaient aussi sous forme  $\beta$ -glycosylées chez ces mêmes fruits :

CROUZET et al (1983) chez la mangue, HEIDLAS et al (1984) pour la papaye, ENGEL et TRESSL (1983), SHOSEYOV et al (1990) pour le fruit de la passion.

Nous avons alors effectué l'hydrolyse de ces précurseurs chez le fruit de la passion et chez la mangue, avec la  $\beta$ -glucosidase de *Candida cacaoi*.

### ● étude de l'hydrolyse de précurseurs d'arômes de fruits tropicaux avec la $\beta$ -glucosidase de *Candida cacaoi*

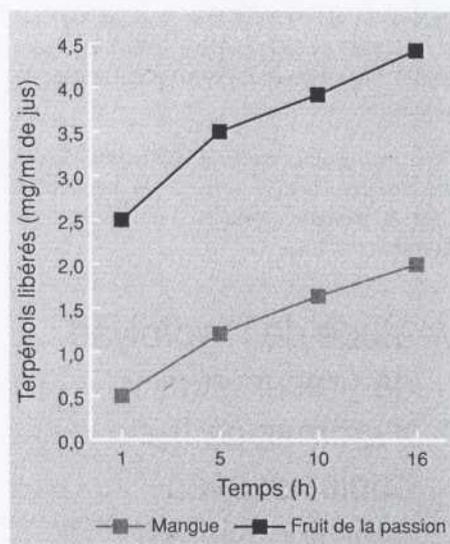
#### avec l'enzyme libre

Les résultats obtenus après hydrolyse enzymatique des jus de fruits sont illustrés par la figure 1. Ils montrent que les terpénols, jusqu'alors liés, sont hydrolysés et libérés en majorité au cours des premières heures

Tableau I  
Terpènes et autres composés volatils aromatiques rencontrés dans différents fruits tropicaux (MORTON et MACLEOD, 1990).

	Goyave	Mangue	Papaye	Fruit de la passion	Kiwi
$\alpha$ -Pinène	+	+	-	+	+
$\beta$ -Pinène	+	+	+	-	+
$\alpha$ -Terpinène	-	-	-	+	-
$\gamma$ -Terpinène	-	+	-	+	-
Myrcène	+	+	-	+	-
Limonène	+	+	+	-	-
$\alpha$ -Terpinéol	+	+	-	+	+
Linalol	+	+	+	+	+
Nérol	-	-	+	+	-
Géranol	-	-	+	+	-
Citronellol	-	-	-	+	-
Oxyde de linalol	-	+	+	+	+
Benzyl-alcool	-	-	+	+	-
2-Phényl-éthanol	+	-	+	+	+
Hotriénol	-	-	-	+	+
Camphor	-	-	-	-	-

Figure 1  
Cinétique d'extraction  
des terpénoles libérés après  
hydrolyse enzymatique chez le  
fruit de la passion et la mangue  
(DRIDER et al, 1994).



d'hydrolyse. Ensuite, la quantité de terpénoles libérés continue d'augmenter jusqu'à atteindre une valeur maximale au bout de 16 h d'hydrolyse. Les résultats obtenus, exprimés en mg/l de jus de fruit, indiquent alors 4,5 mg/l pour le fruit de la passion et 2 mg/l pour la mangue.

### avec l'enzyme immobilisée

Les résultats obtenus montrent que l'immobilisation de l'enzyme augmente la longévité du catalyseur. Cependant, elle libère moins de terpénoles que l'enzyme libre. Deux explications peuvent être proposées pour ce résultat :

- une affinité apparente plus faible de l'enzyme vis-à-vis du substrat après immobilisation, en raison de la présence de zones de Nerst (ZABORSKY, 1974),
- la faible charge enzymatique des billes, qui conduit à introduire moins d'unités enzymatiques dans le milieu réactionnel que dans le cas de l'enzyme libre.

D'après les résultats, il apparaît que, même si l'hydrolyse des précurseurs d'arômes a été efficace avec la  $\beta$ -glucosidase de *Candida cacaoi*, deux problèmes majeurs se posent.

D'une part, le pH des jus ne coïncide pas avec le pH optimal de l'enzyme et, d'autre part, celle-ci n'est pas stable au cours du traitement (40 % de perte après une incubation de 4 h à 40 °C dans le jus de fruits). C'est pourquoi des essais d'hydrolyse sont actuellement conduits avec la  $\beta$ -glucosidase de *Candida molischiana* 35M5N qui présente un pH optimal de 3,5 (très proche de celui des jus de fruits) et une très grande stabilité (75 % d'activité conservée après 145 h à pH 3,5, à température ambiante). Cette souche mutante partiellement déréprimée est, par ailleurs, capable de produire en grande quantité une enzyme exocellulaire sur un substrat peu coûteux (le glucose); son immobilisation sur une résine Duolite A-568 est rapide (1 h) et les rendements d'immobilisation obtenus sont élevés (86 %) (JANBON et al, 1994, 1995).

### ● étude de l'hydrolyse de précurseurs d'arômes de fruits tropicaux avec la $\beta$ -glucosidase de *Candida molischiana* 35M5N

Des essais d'hydrolyse de précurseurs d'arômes ont été entrepris sur quatre fruits tropicaux (fruit de la passion, papaye, mangue et kiwi) avec la  $\beta$ -glucosidase exocellulaire de *Candida molischiana* 35M5N, sous forme libre et immobilisée. L'analyse en CPG des jus traités, comparés aux jus non traités, montre une forte augmentation de certains composés aromatiques (tableau II). Il n'est apparu aucune différence entre les jus traités avec l'enzyme libre et ceux traités avec l'enzyme immobilisée et 100 % de l'activité de la  $\beta$ -glucosidase immobilisée ont été récupérés en fin de traitement.

Le système « $\beta$ -glucosidase immobilisée» est donc très stable dans les conditions des jus de fruits. Par ailleurs, l'enzyme a été testée sur une plus longue période et aucune perte

Tableau II  
Effets de la  $\beta$ -glucosidase de *Candida molischiana* 35M5N sur la teneur en composés volatils aromatiques de différents jus de fruits tropicaux. 50 ml de jus sont traités avec 50 U de  $\beta$ -glucosidase immobilisée de *Candida molischiana* 35M5N, 10 h à 30 °C.

	$\alpha$ -Pinène		$\beta$ -Pinène		$\alpha$ -Terpinène		$\gamma$ -Terpinène		$\alpha$ -Terpinéol		Linalol		Benzyl-alcool	
	Témoin	Traité	Témoin	Traité	Témoin	Traité	Témoin	Traité	Témoin	Traité	Témoin	Traité	Témoin	Traité
Papaye	/	0,1			0,11	0,67					1,8	2,2		
Mangue											0,1	1,3	/	0,05
Kiwi			/	0,1			0,11	0,11	0,1	0,3	1,5	1,5		
Fruit de la passion			/	0,15			0,1	0,3	3,7	3,7	1,8	2	2,5	5

d'activité n'a été observée après cinq opérations répétées d'hydrolyse.

Les essais entrepris ont mis en évidence qu'il était possible d'augmenter la teneur en composés aromatiques de différents jus de fruit par hydrolyse enzymatique de précurseurs glycosylés. D'autres essais devront être entrepris afin de déterminer les paramètres opératoires (température, temps d'hydrolyse, charge en enzyme, agitation) à utiliser pour une utilisation en continu du système.

Nous envisageons d'étendre notre travail à l'étude d'un réacteur permettant l'hydrolyse en continu de précurseurs d'arômes dans les jus de fruits.

## ● conclusion

La libération des composés d'arôme terpéniques, présents dans les vins et dans certains jus de fruits, pour une grande part sous une forme glycosylée inodore et non volatile, est un moyen d'améliorer les qualités organoleptiques de ces boissons. Cette hydrolyse peut être réalisée par voie enzymatique et implique alors l'utilisation de  $\beta$ -glucosidases comme catalyseur de la réaction.

Le programme de recherche suivi pour l'instant n'est, en fait, que la première étape d'un travail de recherche futur. La construction d'une souche de levure telle que *Saccharomyces cerevisiae* sécrétant une  $\beta$ -glucosidase

apte à hydrolyser des composés d'arôme glycosylés est le but final de cette étude. En effet, l'hydrolyse des précurseurs d'arômes est aussi d'un grand attrait pour l'oenologie : posséder une souche de *Saccharomyces cerevisiae* capable de fermenter et d'excréter une  $\beta$ -glucosidase permettant l'amélioration de la qualité aromatique des vins est une perspective très intéressante. Il serait aussi possible d'obtenir des boissons fermentées très aromatiques à partir de fruits tropicaux.

Pour cela, le gène de la  $\beta$ -glucosidase, cloné et séquencé par JANBON et al (1995), devra être sous l'influence d'un promoteur constitutif chez la souche hôte. De plus, ce gène devra être stabilisé dans la cellule. Le génome de *Saccharomyces cerevisiae* ne devant plus contenir de séquence étrangère non indispensable comme des marqueurs de sélection, l'intégration du gène dans le génome de la souche hôte semble être la voie la plus logique pour le stabiliser. La souche de *Saccharomyces cerevisiae* utilisée devra être une souche classiquement utilisée en industrie agroalimentaire.

Malgré cela, il faudra tenir compte des contraintes liées à l'utilisation des organismes génétiquement modifiés (OGM) dans un tel contexte, car il n'existe, à l'heure actuelle, aucun exemple d'utilisation d'OGM dans ce secteur industriel.

Les contraintes à prendre en compte sont de deux ordres : les contraintes humaines et les contraintes liées à la réglementation française et européenne dans ce domaine.

## références

- Ambib C (1987) Procédé de préparation d'un extrait de jasmin et extrait obtenu. *French Patent* 2, 620-726
- Augustyn OPH, Rapp A, Van Wyk CJ (1982) Some volatile aroma components of *Vitis vinifera* L cv Sauvignon blanc. *S Afr J Enol Vitic* 3, 53-60
- Buttery RG, Takeoda G, Ternishi R, Ling LG (1990) Tomato aroma components: identification of glycoside hydrolysis volatils. *J Agric Food Chem* 38, 2050-2053
- Cordonnier R (1956) Recherches sur l'aromatization et le parfum des vins doux naturels et des vins de liqueur. *Ann Technol Agric* 1, 75-110
- Cordonnier R, Bayonove C (1974) Mise en évidence dans la baie de raisin, variété muscat d'Alexandrie, de monoterpènes liés, révélables par une ou plusieurs enzymes du fruit. *CR Acad Sci Paris* 278, 3387-3390
- Crouzet J, Seck S (1982) L'arôme de la tomate, mécanisme de formation des constituants par voies biochimique et chimique. *Parfums Cosmétiques Arômes* 44, 71-84
- Crouzet J, Chairote G, Rodriguez F, Seck S (1983) Volatile components modification heat treatment of fruit juices. In: *Instrument Analysis of Food*. Orlando, FL, USA, Academic Press Inc, Charalambous G et Inglett G, eds, volume 2G, 119-135
- Drider D, Janbon G, Arnaud A, Galzy P (1994) Enzymatic hydrolysis of monoterpene glycosides of passion fruit and mango with a  $\beta$ -glucosidase from yeast. *Bioresource Technol* 49, 243-246
- Engel KH, Tressl R (1983) Formation of aroma components from non volatil precursors in passion fruit. *J Agric Food Chem* 31, 998-1002
- Francis MJO, Allcock C (1969) Geraniol  $\beta$ -glucoside; occurrence and synthesis in rose flowers. *Phytochem* 8, 1339-1347
- Gunata YZ (1984) Recherches sur la fraction liée de nature glycosidique de l'arôme du raisin : importance des terpénylglycosides, action des glycosidases. Montpellier, France, USTI, thèse de docteur ingénieur en sciences alimentaires, 195 p
- Gunata YZ, Bayonove C, Cordonnier RE, Arnaud A, Galzy P (1990) Hydrolysis of grape monoterpényl- $\beta$ -D-glucosides by *Candida molischiana* and *Candida wickerhamii*  $\beta$ -glucosidases. *J Sci Food Chem* 38, 1232-1236
- Heidlas J, Lehr M, Idstein H, Schreier P (1984) Free and bound terpene compounds in Papaya (*Carica papaya* L) fruit pulp. *J Agric Food Chem* 32, 1020-1021
- Janbon G, Arnaud A, Galzy P (1994) Selection and study of a *Candida molischiana* mutant derepressed for  $\beta$ -glucosidase production. *FEMS Microbiol Lett* 118, 207-212
- Janbon G, Derancourt J, Chemardin P, Arnaud A, Galzy P (1995) A very stable  $\beta$ -glucosidase from a *Candida molischiana* mutant strain: enzymatic properties, sequencing and homology with other yeast  $\beta$ -glucosidases. *Biosci Biotechnol Biochem* 59, 1320-1322
- Krammer G, Winterhalter P, Schwab M, Schreier P (1991) Glycosidically bound aroma compounds in the fruit of *Prunus* species, apricot (*P armeniaca*), peach (*P persica*), yellow plum (*P domestica*, L sp *Syriaca*). *J Agri Food Chem* 39, 778-781
- Marais J (1983) Terpenes in the aroma of grapes and wines: a review. *S Afr J Enol Vitic* 4, 49-58
- Morton ID, Macleod AJ (1990) The flavours of fruit. In: *Development in Food Science. Food Flavours*. Amsterdam, the Netherlands Elsevier, 473 p
- Rapp AH, Mandery H, Guntert M (1984) Terpene compounds in wine. In: *Proc Alko Symp Flavor Res Alcoholic Beverages*. Kauppakirjapino oy. Helsinki, Finland, Nyakanen L and Lehtonen P, eds, FBIFR 3, 255-274
- Salles C, Jallageas JC, Crouzet J (1990) Chromatographic separation and partial identification of glycosidically bound volatile components of fruit. *J Chromatogr* 552, 255-265
- Shoseyov O (1989) Flavor and fragrance enhancing enzymes. *European Patent* 0, 307-071
- Shoseyov O, Bravdo BA, Siegel D, Goldman A, Cohen S, Shoseyov L, Ikan R (1990) Immobilized endo  $\beta$ -glucosidase enriches flavor of wine and passion fruit juice. *J Agri Food Chem* 38, 1387-1390
- Stahl-Biskup E (1987) Monoterpene glycosides, state of the art. *Flav Frag J* 2, 75-82
- Sympton RF, Miller GC (1984) Aroma composition of Chardonnay wine. *Vitis* 23, 143-158
- Vasserot Y, Arnaud A, Galzy P (1993) Evidence for marc monoterpényl glycosides hydrolysis by free or immobilized yeast  $\beta$ -glucosidase. *Bioresource Technol* 43, 269-271
- Vasserot Y, Arnaud A, Galzy P (1995) Monoterpenes heterosides in plants and their biotechnological transformation. *Acta Biotechnol* 15, 77-95

- Williams PJ, Strauss CR, Wilson B (1980) Hydroxylated linalool derivatives as precursors of volatile monoterpenes of muscat grapes. *J Agric Food Chem* 28, 766-771
- Williams PJ, Strauss CR, Wilson B, Massy-Westropp RA (1982a) Novel monoterpenes disaccharide glycosides of *Vitis vinifera* grapes and wines. *Phytochem* 21, 2013-2020
- Williams PJ, Strauss CR, Wilson B, Massy-Westropp RA (1982b) Studies on the hydrolysis of *Vitis vinifera* monoterpene precursor compounds and model monoterpene  $\beta$ -D-glucosides rationalizing the monoterpene composition of grapes. *J Agric Food Chem* 30, 1219-1223
- Williams PJ, Strauss CR, Wilson B, Massy-Westropp RA (1983) Glycosides of 2-phenylethanol and benzyl alcohol in *Vitis vinifera* grapes. *Phytochem* 22, 2039-2041
- Williams PJ, Strauss CR, Wilson B, Dimitriadis E (1985) Recent studies into grape terpene glycosides. In: *Progress in Flavor Research*. Amsterdam, the Netherlands, J Adda (ed) Elsevier Science Publishers, 349-357
- Wilson B, Strauss CR, Williams PJ (1984) Changes in free and glycosidically bound monoterpenes in developing muscat grapes. *J Agric Food Chem* 32, 919-924
- Wilson B, Strauss CR, Williams PJ (1986) The distribution of free and glycosidically-bound monoterpenes among skin, juice, and pulp fractions of some white grape varieties. *Am J Enol Vitic* 37, 107-111
- Zaborsky OR (1974) Properties of covalently bounded water-insoluble enzyme-polymer conjugates (chapter 3). In: *Immobilized Enzymes*. Cleveland, USA, Weast RC (ed), CRC-Press, 2nd ed, 54-56