

國立臺灣大學生物資源暨農學院園藝學研究所

碩士論文

Department of Horticulture

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

過濾方式與澄清處理對浸漬梅醋裝瓶後

澄清穩定性之影響

Effects of Filtration and Fining Processes on the  
Clear Stability of Bottled Mei (*Prunus mume* Sieb. et  
Zucc.) Vinegars

研究生：劉光漢 撰

Graduate Student : Kuang-Han Liu

指導教授：許明仁 博士

Advisor : Dr. Ming-Jen Sheu

中華民國九十七年七月

July, 2008

## 誌謝

感謝恩師許明仁博士之諄諄教誨，三年來在課業以及實驗上耐心之教導並批改論文，使論文以順利完成，師恩浩蕩永誌不忘。

論文初成，復蒙口試委員宜蘭大學園藝系教授石正中博士、大同大學生物工程學系教授李綉鈴博士之細心批閱，修正並賜與寶貴之意見，在此深深感謝。

實驗期間，復蒙徐源泰博士與許輔博士慷慨借用儀器設備，並細心指導，感激之恩不敢或忘。

在學期間，承蒙全加工館之學長姐、同學以及學弟妹之協助，使學業順利完成。特別感謝三堡學長之細心幫助，解答學業上許多疑惑，以助我實驗順利完成，同學艾真、榮軒與我互相鼓勵、切磋，使得學業及生活更加愉快。感謝同學思節對於我不餘遺力之幫助，以及學弟政哲、明哲之協助、也感謝學弟妹品光、巨倫、宇展、瑋筑、育明、麗文、紹亦處理實驗室之事務，使我得以心無旁騖專心致力於實驗之完成。

特別感謝學長豐銘在各方面對於我大立支持，幫助處理許多問題，使實驗進行得以更加順利。

最後感激雙親容忍我曲折的求學歷程，於我在學期間對我的支持、關懷與鼓勵，照顧生活起居，讓我得以專心致力於學業以及實驗之進展，得以順利完成學業。

光漢 謹誌於

臺灣大學園藝學研究所

民國九十七年七月三十一日

## 摘要

澄清飲料裝瓶後在儲存期間生成混濁沉澱是影響飲料品質之重大缺陷。以 8-10 分熟青梅浸漬糯米醋所製得之梅醋產品在室溫儲存 16 週後混濁度呈上升之現象，部分樣品中的懸浮顆粒會發生沉降而形成深褐色沉澱物。先以酵素分解果膠後之梅醋再以酸洗矽藻土進行抽氣過濾，混濁度可以降低至 1NTU 以下，色澤呈琥珀色。分析矽藻土過濾之梅醋發現單寧酸試驗(tannic acid test)引起之混濁度增加值為 51.34NTU，顯示樣品中含有大量起霧性蛋白質(haze-active protein)，而明膠試驗(gelatin test)引起之混濁度增加值則為 0.87NTU，顯示樣品中起霧性多酚物質(haze-active polyphenol)之含量極微。以矽藻土過濾之梅醋在室溫儲存 16 週後混濁度會上升，顯示矽藻土過濾之梅醋會有二次混濁之現象發生。在矽藻土過濾之梅醋中添加 2.5g/L 皂土(bentonite)即可將樣品中之起霧性蛋白質幾乎 100%移除，添加不同濃度之矽膠(silica gel)則只能移除 20-45%之起霧性蛋白質。皂土處理-矽藻土過濾梅醋在室溫儲存 16 週後混濁度仍可以維持在 1NTU 以下。研究結果證實起霧性蛋白質是造成矽藻土過濾梅醋發生二次混濁的主要因子，利用皂土處理移除起霧性蛋白質能有效維持矽藻土過濾梅醋之澄清安定性。不同澄清處理之矽藻土過濾梅醋樣品經過室溫儲存 16 週後皆會產生極輕微之褐變。

## Abstract

Haze formation and precipitation are critical quality defects for clear drinks. Mei vinegars, produced from the maceration of mei fruit with rice vinegars, showed increase in turbidity and presented dark brown sediments after storing at room temperature for 16 weeks. The turbidity of depectinized mei vinegars reduced less than 1NTU and present amber color after filtered by diatomaceous earth. The turbidity of diatomaceous earth filtered mei vinegars increased 51.34NTU and 0.87NTU after tannic acid test and gelatin test, respectively, which indicate mei vinegars may contain large quantities of haze-active (HA) proteins, but only few HA polyphenols. Diatomaceous earth filtrated mei vinegars treated with 2.5 g/L bentonite removed almost 100% of HA proteins, which kept the turbidity of mei vinegars to less than 1NTU throughout room temperature storage for 16 weeks. In contrast, the same vinegars samples treated with different doses of silica gel were able to removed only 20-45% of HA proteins. Result of this studies demonstrated that HA proteins in mei vinegars were the major factor to cause haze formation during room temperature storage, and bentonite treatment was able to remove the HA proteins and stabilize the clearness of bottled mei vinegars when storage at room temperature for 16 weeks.

# 目錄

中文摘要.....	I
英文摘要.....	II
目錄.....	III
圖目錄.....	VI
表目錄.....	VIII
壹、前言.....	1
貳、前人研究.....	3
一、梅子果實的成分.....	3
二、果汁的膠體性質.....	5
三、引起果汁混濁結塊或再沈澱之因子.....	7
(一) 生物性因子.....	7
(二) 物理性因子.....	7
(三) 化學性因子.....	8
四、果汁澄清之方法.....	16
(一) 酵素澄清處理.....	18
(二) 淨化劑處理.....	19
(三) 加熱處理.....	21
(四) 離心分離.....	23
(五) 過濾.....	24
五、環境因子對果汁混濁安定性之影響.....	25
(一) 氧氣.....	25
(二) 溫度.....	26
(三) pH 值.....	26

(四) 光照 .....	27
參、材料與方法.....	28
一、實驗原料.....	28
二、試藥.....	28
三、儀器設備.....	29
四、實驗方法.....	29
(一) 浸漬梅醋之一般理化特性分析.....	29
(二) 商業糯米醋與浸漬梅醋中潛在生成混濁成分之定性試驗 ..33	
(三) 浸漬梅醋中起霧性蛋白質和起霧性多酚含量之測定 .....	34
(四) 不同過濾方式對梅醋裝瓶後室溫儲存期間色澤、混濁度 、pH 值、可溶性固形物、起霧性蛋白質和起霧性多酚 含量之影響 .....	34
(五) 梅醋澄清處理條件之釐定.....	35
(六) 不同澄清處理對梅醋裝瓶後室溫儲存期間色澤、混濁度 、pH 值、可溶性固形物、起霧性蛋白質和起霧性多酚含 量之影響.....	36
(七) 統計分析.....	36
肆、結果與討論.....	39
一、浸漬梅醋之理化特性分析 .....	39
1. 色澤.....	39
2. 混濁度.....	39
3. 可溶性固形物、pH 值及可滴定酸度 .....	39
4. 水溶性蛋白質、總酚及水溶性果膠 .....	41
二、商業糯米醋與浸漬梅醋中潛在生成混濁之水溶性成分之定 性與定量試驗 .....	42

1. 商業糯米醋與浸漬梅醋中潛在生成混濁之水溶性成之定性 試驗.....	42
2. 浸漬梅醋中起霧性蛋白質與起霧性多酚含量之測定 .....	44
三、不同過濾方法對浸漬梅醋裝瓶後在室溫儲存 16 週間理化 特性、起霧性蛋白質與起霧性多酚含量之影響 .....	48
1. 色澤變化.....	49
2. 混濁度.....	49
3. 水溶性蛋白質與總酚 .....	52
4. 起霧性多酚與起霧性蛋白質 .....	52
5. 可溶性固形物、pH 值及可滴定酸度 .....	58
四、矽藻土過濾梅醋澄清處理條件之釐定 .....	58
1. 皂土處理.....	58
2. 矽膠處理.....	58
五、不同澄清處理對矽藻土過濾梅醋裝瓶後在室溫儲存 16 週 間理化特性、起霧性蛋白質與多酚含量之影響 .....	63
1. 色澤變化.....	63
2. 混濁度.....	63
3. 起霧性多酚與起霧性蛋白質 .....	66
4. 可溶性固形物含量與 pH 值 .....	69
伍、結論.....	73
陸、參考文獻.....	74

## 圖目錄

圖一、蛋白質與酚類化合物含量比例對混濁度之關係 .....	11
圖二、混濁粒子均勻懸浮及產生絮凝沈澱的作用機制 .....	13
圖三、酵素作用引起柳橙汁喪失混濁度而分層之原理 .....	14
圖四、(1) 果膠酯酶、(2) 果膠裂解酶及(3) 聚半乳糖醛酶之作用 位置.....	15
圖五、果膠鈣鹽結合造成柑桔果汁凝膠與喪失混濁度之機制 .....	17
圖六、本研究之試驗流程一 .....	37
圖七、本研究之試驗流程二 .....	38
圖八、以 tannic acid test 引起之混濁度增加值表示商業糯米醋與 浸漬梅醋起霧性蛋白質含量之比較 .....	45
圖九、不同劑量明膠處理對浸漬梅醋混濁度變化之影響 .....	46
圖十、不同劑量單寧酸處理對浸漬梅醋混濁度變化之影響 .....	47
圖十一、矽藻土過濾對梅醋在室溫儲存 16 週間混濁度之影響 .....	51
圖十二、以 tannic acid test 和 gelatin test 引起之混濁度增加值表 示矽藻土過濾對梅醋起霧性蛋白質與起霧性多酚含量 之影響.....	53
圖十三、以 tannic acid test 引起之混濁度增加值表示矽藻土過濾 對梅醋在室溫儲存 16 週間起霧性蛋白質含量之影響 .....	56
圖十四、以 gelatin test 引起之混濁度增加值表示矽藻土過濾對梅 醋在室溫儲存 16 週間起霧性多酚含量之影響 .....	57
圖十五、矽藻土過濾對梅醋在室溫儲存 16 週間可溶性固形物含 量之影響.....	59
圖十六、矽藻土過濾對梅醋在室溫儲存 16 週間 pH 值之影響 .....	60

圖十七、以 tannic acid test 引起之混濁度增加值表示不同劑量皂土與矽膠處理對矽藻土過濾梅醋起霧性蛋白質含量之影響.....	61
圖十八、皂土與矽膠處理對矽藻土過濾梅醋在室溫儲存 16 週間混濁度之影響 .....	67
圖十九、以 gelatin test 引起之混濁度增加值表示皂土與矽膠處理對矽藻土過濾梅醋在室溫儲存 16 週間起霧性多酚含量之影響.....	68
圖二十、以 tannic acid test 引起之混濁度增加值表示皂土與矽膠處理對矽藻土過濾梅醋在室溫儲存 16 週間起霧性蛋白質含量之影響 .....	70
圖二十一、皂土與矽膠處理對矽藻土過濾梅醋在室溫儲存 16 週間可溶性固形物含量之影響 .....	71
圖二十二、皂土與矽膠處理對矽藻土過濾梅醋在室溫儲存 16 週間 pH 值之影響.....	72

## 表目錄

表一、梅子的營養成分(每 100 克).....	4
表二、浸漬梅醋原液之理化特性 .....	40
表三、浸漬梅醋與商業糯米醋生成混濁之水溶性成分之定性試驗 ..	43
表四、矽藻土過濾前後梅醋理化特性之變化 .....	50
表五、浸漬梅醋與矽藻土過濾梅醋之混濁度與起霧性蛋白質及起 霧性多酚化合物含量的相關性分析 .....	55
表六、皂土與矽膠處理對矽藻土過濾梅醋理化特性之影響 .....	64
表七、皂土與矽膠處理對矽藻土過濾梅醋在室溫儲存 16 週後色 澤特性之影響 .....	65



## 壹、前言

醋是一種傳統的保健食品，具有消除疲勞、平衡血液酸鹼值、幫助消化、預防衰老、擴張血管、提高腸胃殺菌力、促進食慾等功能。早期人們主要將醋作為一種調味料用來料理提味。民國 70 年代，台灣的食品業者突破「醋是一種調味料」的傳統觀念，將健康醋概念引進台灣，發展出醋飲料產品，開啟國內飲用醋的風氣(許，2005)。

傳統食用醋具有的強烈酸味和刺激性氣味會影響其適飲性，造成消費者的購買意願降低。食品業者仿造美、日流行的蘋果醋產品，利用香草植物或水果原料進行釀造，或利用調味加工的方式在醋飲料中添加香草或水果的香氣和風味，製成各式香草醋與水果醋產品，增進醋飲料的風味和營養價值，並提高消費者的購買意願。目前市面上已可以看到蘋果醋、梅醋、薰衣草醋等產品。

梅，學名 *Prunus mume* Sieb. et Zucc，英文名為 mei 或 Japanese apricot，屬於薔薇科杏亞屬之核果類溫帶落葉果樹。原產於中國之華中、華南一帶。目前台灣地區的果梅栽培集中於中央山脈東西兩側海拔 300 至 1000 公尺之山坡地(歐，2005)。主要產地在南投縣信義鄉、國姓鄉、水里鄉、仁愛鄉、中寮鄉，台中縣和平鄉，台南縣楠西鄉，高雄縣桃源鄉，以及台東縣池上鄉等地(行政院農業委員會，2006)

梅子的香氣濃郁、滋味特殊，自古以來深受東方人的喜愛。梅子因酸度高甜度低，味酸澀故不適合鮮食，但由於梅子具有獨特的香氣並含有豐富的營養成分，其中鈣、磷、鐵等元素較其他水果高，並且有含量極高的檸檬酸、蘋果酸等有機酸成分，是一種優良水果，非常適合加工後食用，或製成成品與半成品以供內外銷(歐，2005)。

浸漬梅酒為利口酒(liqueur)的一種，係以梅子為原料浸泡於蒸餾

基酒中，一段時間後，梅子的成分逐漸被酒液抽出且經由緩慢的化學作用產生香氣，再藉由調和的技術調整酒液的口味而製成的產品。仿照浸漬梅酒的製造流程，將梅子浸泡於商業糯米醋而製成的浸漬梅醋產品，由於香氣濃郁、滋味特殊，不但具有特色且附加價值大，深具開發潛力。

然而浸漬梅醋經過一段時間的儲存後，會產生顯著的沉澱現象而嚴重影響商品的外觀，並進一步影響消費者的購買意願，使其商品價值降低。本研究之目的在探討浸漬梅醋經過不同的澄清與過濾處理後對產品在室溫儲存期間之澄清穩定性與品質之改善效果，以作為改進浸漬梅醋製造過程之參考。



## 貳、前人研究

### 一、梅子果實的成分

梅子果實中約含有 90%的水分，7.6%的碳水化合物，鈣、鎂、鉀、鈉、磷、鐵等礦物質含量豐富(表一)。梅子所含之糖類主要為果糖(fructose)、葡萄糖(glucose)、蔗糖(sucrose)及山梨醇(sorbitol)。梅子在果樹上隨著成熟度的增加，所有糖類也隨之提高，但採收後除了蔗糖含量稍有增加外，其餘三種糖類均有下降趨勢。

梅子約含有 5.5%的有機酸，主要以檸檬酸(citric acid)的含量最多，其次為蘋果酸(malic acid)，此外還含有少量的延胡索酸(fumaric acid)、琥珀酸(succinic acid)及草酸(oxalic acid)。果實成熟度越高，檸檬酸含量越多，而蘋果酸含量則漸趨減少。

梅子果肉中含有多種的酚類化合物，Huang (1986)提出梅子果肉中含量最多的酚類化合物為 chlorogenic acid 及(+)-catechin。陳(1994)以高效液相層析分析青梅汁中的酚類化合物，共鑑定出 7 種化合物，其中以 catechol 含量最高，其次為 chlorogenic acid 及(+)-catechin。餘(1995)在濃糖梅汁中測得的酚類化合物主要是 chlorogenic acid 及(+)-catechin。林(2001)以高效液相層析分析浸漬梅酒中的酚類化合物，共鑑定出 9 種化合物，其中以 catechin 含量最高。

梅子經過鹽醃製成的梅胚，其紅褐色色素主要是由梅子果肉中的 leucoanthocyanin 和(+)-catechin 所形成(黃，1980)。從日曬梅胚中抽出的 catechin 在吸收光譜波長 270nm 及 400-450nm 處有吸收高峰，分子量約為 200，其水溶液的外觀顏色亦為紅褐色。造成紅褐色色素的機構有兩種可能：一假說認為紅色素之前驅體(precursor)，主要是 catechin 經過 polyphenol oxidase 或在空氣中被氧分子氧化而形成黃褐

表一、梅子的營養成分(每 100 克)。

Table 1. The Nutritional values of mei (per 100g)

項目	
熱量 (kJ)	29
水分 (%)	90.1
蛋白質 (g)	0.7
脂肪 (g)	0.5
水溶性固形物 <sup>a</sup> (g)	7.6
纖維素 (g)	0.6
灰分 (g)	0.5
鈣 (mg)	12
磷 (mg)	14
鐵 (mg)	0.6
鈉 (mg)	2
鉀 (mg)	240
胡蘿蔔素 (μg)	120
維生素 A (國際單位)	65

<sup>a</sup> 有機酸 5.5%

(陳，2001)

色的聚合物，隨著聚合程度的增加，其顏色會加深而形成紅褐色，吸收光譜在波長 270nm 及 400-450nm 處有吸收高峰。另一假說認為天然存在的 leucoanthocyanin 和 catechin 在貯藏過程中可能發生聚合作用，由 leucoanthocyanin 和 catechin 的 reactive electrophile 在第 6 或第 8 號位置上的碳與另一分子 leucoanthocyanin 之第 4 號位置上的碳形成共價結合(covalent bond)，甚至進一步反應形成分子量約 2000 的紅色聚合物。

## 二、果汁的膠體性質

果汁中含有各種不同大小的分散粒子，小至 0.001 $\mu\text{m}$ ，大至 1000 $\mu\text{m}$  (Dickinson, 1994)。當這些粒子的平均粒徑介於 1nm 至 1 $\mu\text{m}$  之間時會在溶液中懸浮，不易沉降，而粒子大於 1 $\mu\text{m}$  時則易發生沉澱現象(Van Buren, 1989)。

果汁中的混濁顆粒依大小大致上可以區分為以下四大類(Carle, 1998)：

### 1. 粗大粒子(Coarsely dispersed cloud substances)

此類物質主要是果肉碎片、纖維及石細胞等。這些顆粒的大小大都在 1mm 以上。

### 2. 細小粒子(Finely dispersed cloud particles)

此類物質主要包括完整未受損之細胞、細胞質累積物(cell aggregates, chromoplasts)、澱粉以及部分的細胞碎片，其大小約在 1-100 $\mu\text{m}$  左右。

### 3. 膠體物質(Colloidal substances)

此類物質主要是果膠、半纖維素、蛋白質及可溶性澱粉(dissolved starch)。這些粒子的大小多在 0.1-0.001 $\mu\text{m}$  左右。

#### 4. 乳化物質(Emulsified substances)

此類物質主要是一些細小粒子，例如脂質、類胡蘿蔔素、精油等。由於其密度較低，因此若在高濃度時，常會導致乳狀上浮現象(creaming)，此現象較常見於柑橘果汁中。

果汁中粒子之間的作用力包括凡得瓦力(van der Waals attractive force)、電性作用、溶合力(solvation force)、柵籬作用(steric stabilization)與高分子架橋等，這些作用力會造成粒子間相互吸附連結而導致相分離，或是互相排斥而使粒子在溶液中穩定存在且均勻分散(呂及呂，1994)。

Dickinson (1994)提出一般飲料中粒子不穩定的現象大致可以分為以下五類：

##### 1. 乳狀上浮

密度比溶液低的粒子因重力作用導致的上浮現象，例如存放柑橘果汁的容器在瓶頸部位常會生成一圈油脂，即為精油的上浮。

##### 2. 沉降(sedimentation)

密度比溶液高的粒子因重力作用導致的沉澱現象。

##### 3. 絮凝(flocculation)

液體中的細小粒子或疏水性粒子間互相吸引，而聚結成較大的顆粒，此現象多為可逆的聚合，例如紅茶在低溫下所形成的茶乳(tea cream)。

##### 4. 凝聚(coagulation)

膠體粒子聚集沉澱或上浮析出，此為不可逆的聚合，例如熱變性的蛋白質。

##### 5. 相分離(phase separation)

絮凝或凝聚發生時會使聚集的顆粒變大而不穩定化。



若混濁果汁(cloud juice)中的粒子不穩定，則多會產生混濁不穩定的分層現象；在澄清果汁(clarified juice)中若發生粒子不穩定的現象，則易導致沉澱現象的發生。

### 三、引起果汁混濁結塊或再沉澱之因子

果汁混濁不穩定的原因可以分為生物性、物理性與化學性三類。

#### (一)生物性因子

通常指的是微生物在果汁中生長所引起的混濁結塊或再沉澱之現象。不管果汁受到活的或死的微生物污染，均會使果汁發生混濁度上升或結塊之現象。包裝後的果汁若含有大量的微生物，則可能是殺菌不完全或容器未密封所致(戴，1995)。

#### (二)物理性因子

果汁中粒徑較大之顆粒或是熱處理後粒子絮凝而形成的大顆粒，受到重力作用所導致的沉降現象，屬於物理性的因子。由於混濁果汁是一個包含著互不相溶的汁液與果肉顆粒的混合物，不同大小的顆粒具有不同的沉降速度，沉降速度較高的顆粒即較容易沉澱。利用史脫克定律(Stoke's law)可以簡單的計算粒子的沉降速率：

$$v_s = \frac{d^2 (\rho_p - \rho_s)}{18\mu} g$$

$v_s$ ：顆粒沉降速度 (m/s)

$\rho_p$ ：顆粒密度 ( $\text{kg/m}^3$ )

$\rho_s$ ：液體密度 ( $\text{kg/m}^3$ )

$d$ ：固體顆粒直徑 (m)

$g$ ：重力加速度 ( $\text{m/s}^2$ )

$\mu$ ：液體黏度 ( $\text{N}\cdot\text{s/m}^2$ )

因此欲使混濁果汁中不溶性的果肉顆粒能穩定均勻的存在於果汁中，則必須盡可能的降低液體中顆粒的粒徑及顆粒與溶液之密度差，或者是提高溶液的黏度。

### (三)化學性因子

果汁中的各個組成份與果汁中的粒子所產生的化學反應亦是導致混濁度升高與再沉澱的重要因子。

#### 1. 澱粉

Heatherbell (1976)分析澄清蘋果汁的再沉澱物後發現，澱粉佔了沉澱物乾重的 90%。未成熟的蘋果通常含有 5-8%的澱粉，成熟後則只剩下 1%，因此若是使用未成熟果做為蘋果汁的原料就容易發生由澱粉所引起的澄清蘋果汁再沉澱現象。由於澱粉顆粒的粒徑約在 1-16 $\mu\text{m}$ ，不易在澄清過濾加工過程中去除，因此當果汁進行殺菌而加熱到 60 $^{\circ}\text{C}$  以上時，約有 2%的澱粉顆粒會因糊化而形成起霧(haze)的現象(尤，1992)。澄清蘋果汁中因澱粉而生成混濁現象的主要原因為蘋果汁在製造過程中，熱處理使不溶性澱粉糊化轉變為可溶性澱粉，而果汁貯藏過程中可溶性澱粉老化(retrogradation)，因此發生再沉澱(Beveridge, 1997)。

#### 2. 蛋白質

蛋白質單獨作用引起的混濁物沉澱，通常是在熱處理過程(如殺菌等)造成熱敏感性蛋白質(heat-sensitive protein)或稱熱不穩定性蛋白質(heat-unstable protein)變性而析出，再由小顆粒絮凝成大顆粒，然後因重力而沈澱，因此在混濁果汁會逐漸出現沉澱分層的現象。菠菜汁在熱處理後的成分變化中，以蛋白質含量下降最多，熱處理後的沉澱

物中亦以蛋白質所佔含量最高，達 73%，和一般所見的柳橙汁混濁物(蛋白質佔 50%)和檸檬汁混濁物(蛋白質佔 30%)的組成不同(Klavons and Bennett, 1985; Hsu and Heatherbell, 1987; Klavons *et al.*, 1994; 朱，2000)。曾(2000)以及戴(2006)指出，在澄清橫山梨果汁中，引起再沉澱現象為水溶性蛋白質所造成，蛋白質之變性程度隨加熱溫度上升而提高，且水溶性蛋白質含量明顯下降。Hsu 等人(1987)對 Granny Smith 品種蘋果汁進行蛋白質分析，結果發現形成不穩定及再沈澱現象的蛋白質分子量在 21~31kDa ( $\times 100$ Dalton)之間；而 Wall 等人(1996)對不同品種蘋果汁進行研究，發現 McIntosh、Golden Delicious 及 Jonagold 蘋果汁的水溶性蛋白質分子量大小為 32kDa。Waters 等人(1992)分析葡萄酒中熱敏感性蛋白質時發現，這些蛋白質含有高比例的 asparagine、aspartic acid、glycine、serine、threonine、phenylalanine 及 tyrosine 等胺基酸。

### 3. 蛋白質與酚類化合物

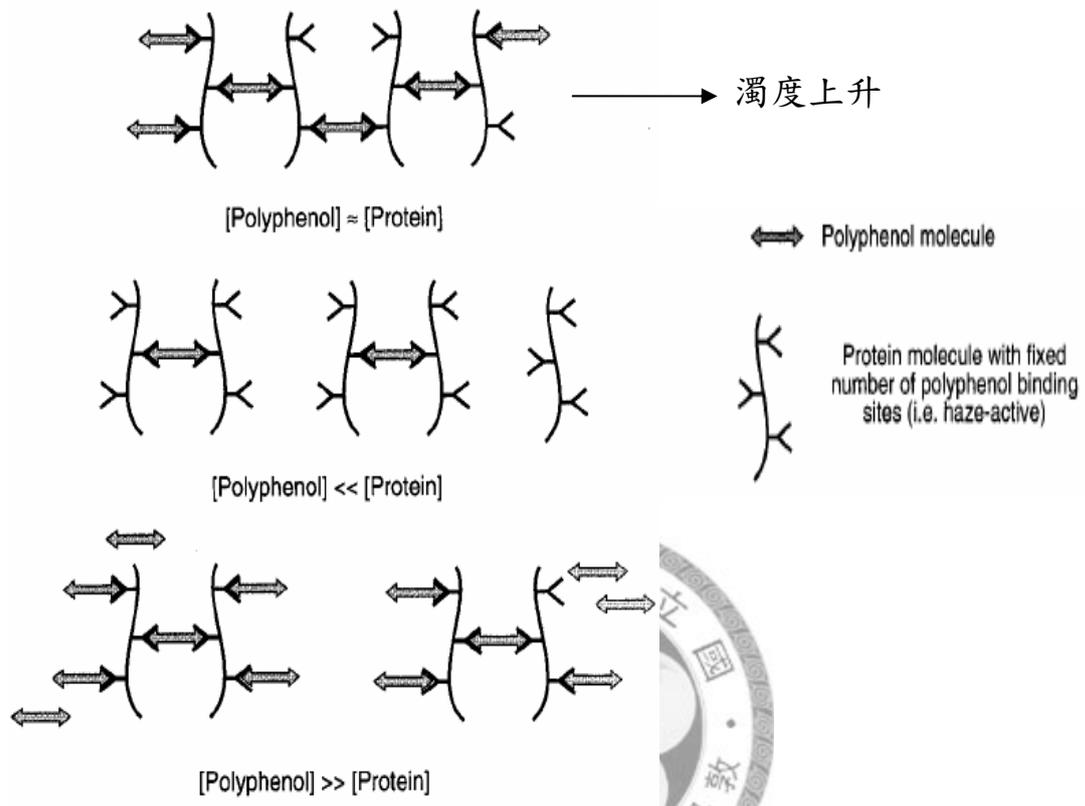
果汁中的水溶性蛋白質亦會與酚類化合物作用而生成混濁物或沉澱物。澄清蘋果汁產生再沉澱現象的起因除了澱粉老化外，也可能是由蛋白質與酚類化合物結合而造成(Beveridge and Tait, 1993)。Siebert (1999)將此類因相互結合而造成果汁或飲料混濁沈澱的酚類化合物和蛋白質分別命名為 haze-active (HA) polyphenol 和 haze-active protein。由澄清蘋果汁沉澱物中分析出 catechin 和 procyanidin 的聚合物為形成酚類化合物懸浮的先驅物質，這些先驅物質在貯存期間進行酵素性或非酵素性的氧化，聚合成更大的分子，而使果汁產生混濁沉澱。蛋白質與酚類化合物的可能結合方式包括：(1)蛋白質羰基之氧原子與多酚類的氫氧基以氫鍵結合，或是蛋白質分子的疏水區與多酚類的疏水區產生疏水性的結合(Asano *et al.*, 1982)；(2)多酚類和含脯胺酸

(proline)之胜肽形成複合物，使兩化合物結合(Bianco *et al.*, 1997)；(3) 在氧分子存在的環境下，再配合鹼性條件或多酚氧化酵素的催化作用，使酚類化合物氧化形成 quinone 化合物，再與蛋白質上的-SH 及 -NH<sub>2</sub> 基進行 1,4-加成作用(1,4-addition)形成共價鍵結(黃，1992)。

蛋白質與酚類化合物含量比例與混濁的生成有密切之關係(圖一)，當蛋白質和酚類化合物二者含量相當時，二者會結合形成大片的網狀結構，影響光線透射，使得混濁度上升；當蛋白質和酚類化合物含量差距很大時，則二者呈小粒子細密懸浮於溶液中，不易被察覺，混濁度增加值較低(Siebert *et al.*, 1996)。Heatherbell (1984)認為低分子量(16~24kDa)或高等電點(pI5.2~8.0)之蛋白質分子並不穩定，往往因為加熱變性或與其他物質結合，形成不溶性複合物而造成沉澱(Klavons and Bennett, 1985)。在許多啤酒、葡萄酒及蘋果汁的研究文獻中也指出，胺基酸組成中 proline 與 hydroxyproline 含量愈高，愈容易與單寧酸聚合而沈澱(Hagerman & Butler, 1981; Lehtonen, 1996; Siebert, 1999)。Proline 不僅可提供多酚類化合物結合的位置，還可使胜肽(peptide)延長，擴大可結合的表面積(Baxter *et al.*, 1997)。許多學者推測，水果榨汁時，procyanidins 經氧化聚合，再與富含 hydroxyproline 的蛋白質結合是澄清果汁生成再混濁現象的化學機制之一(Hagerman & Butler, 1981; Asquith & Butler, 1986; Ricardo-de-Silva *et al.*, 1991; Siebert, 1999; Wu & Siebert, 2002)。

#### 4. 果膠

一般果汁中膠體粒子表面常會帶有電荷，而大部分果汁的 pH 值約在 3.5~4.1 之間，在此 pH 值下水溶性蛋白質分子通常會帶正電荷，而果汁中之果膠則帶負電荷(Kilara, 1982; Carle, 1998)，果膠分子因電



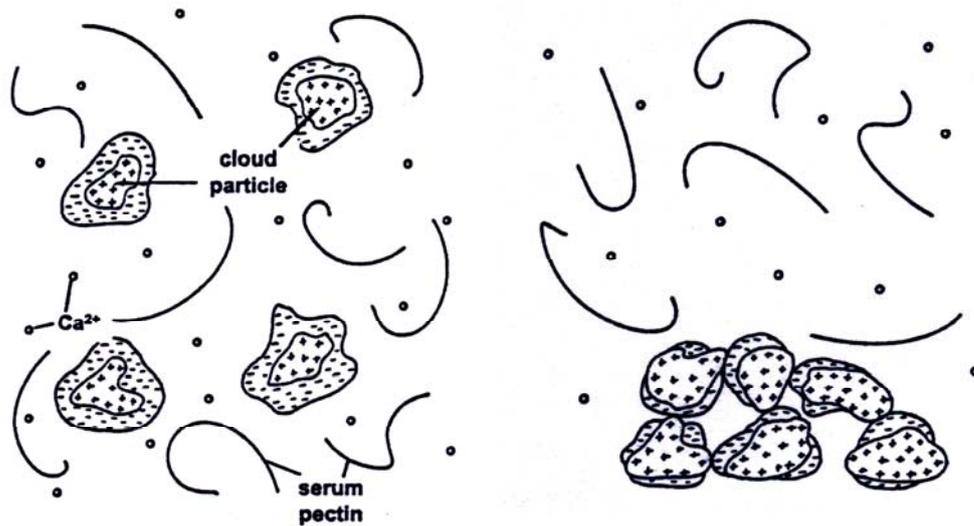
圖一、蛋白質與酚類化合物含量比例對混濁度之關係  
 Fig. 1. Conceptual mechanism of protein-polyphenol interaction.  
 (Siebert *et al.*, 1996)

荷吸引力包裹於帶正電荷的蛋白質外圍，形成一外層為負電的膠體物質(protein-pectin complexes)，水溶性果膠(soluble pectin)分子因粒子小且分子間以負電荷相斥，因此這些膠體粒子能穩定懸浮於果汁中(圖二)。倘若果膠被酵素分解，此時 protein-pectin complexes 會裸露出部分的蛋白質，使得膠體中心帶正電荷的蛋白質因靜電引力(electrostatic attraction)與帶負電荷之大分子結合，破壞了原本混濁懸浮的狀態而產生沈澱(Baker and Bruemmer, 1972)。

由果膠引起的混濁物沉澱現象，與果膠酯酶(pectinesterase; PE)的作用有密切的關係(圖三)。果膠酯酶通常與植物體內不溶於水的細胞成分緊密結合在一起，當果膠酯酶作用時將半乳糖醛酸上的甲氧基(methoxyl group)水解，釋出甲醇(methanol)，因而降低果膠的酯化程度(degree of esterification; DE)，變成較低甲氧基的果膠(low-methoxy pectin)或果膠酸(pectic acid)，此二者極易與二價陽離子(尤其是  $\text{Ca}^{2+}$ )進行架橋作用形成不溶性果膠而沉澱(圖四)。Cameron 等人(1998)認為柳橙汁混濁物生成的原因即是由於 PE 的作用，使果膠產生游離羧基，再與陽離子結合而導致沉澱發生。由果膠酵素所引起的混濁沉澱現象，亦發生在許多其他混濁系果汁中，例如：番茄汁因為 PE 的作用使得混濁物無法和果膠結合形成穩定的網狀混濁結構，因而產生絮凝及沉澱現象(Laratta *et al.*, 1995)；混濁胡蘿蔔汁則是由於 PE 的作用而使混濁物發生沉澱(Sims *et al.*, 1993)。

## 5. 多價金屬離子

多價金屬離子(如  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  等)因具有氧化還原及電性作用，會與蛋白質、果膠物質、多酚化合物或澱粉相結合而形成的複合物，因而造成果汁混濁生成與沉澱的現象。Baker 及 Bruemmer



**CLOUD PARTICLES  
IN SUSPENSION:**

Positively charged  
Protein-carbohydrate-complex  
Surrounded by negatively charged pectin

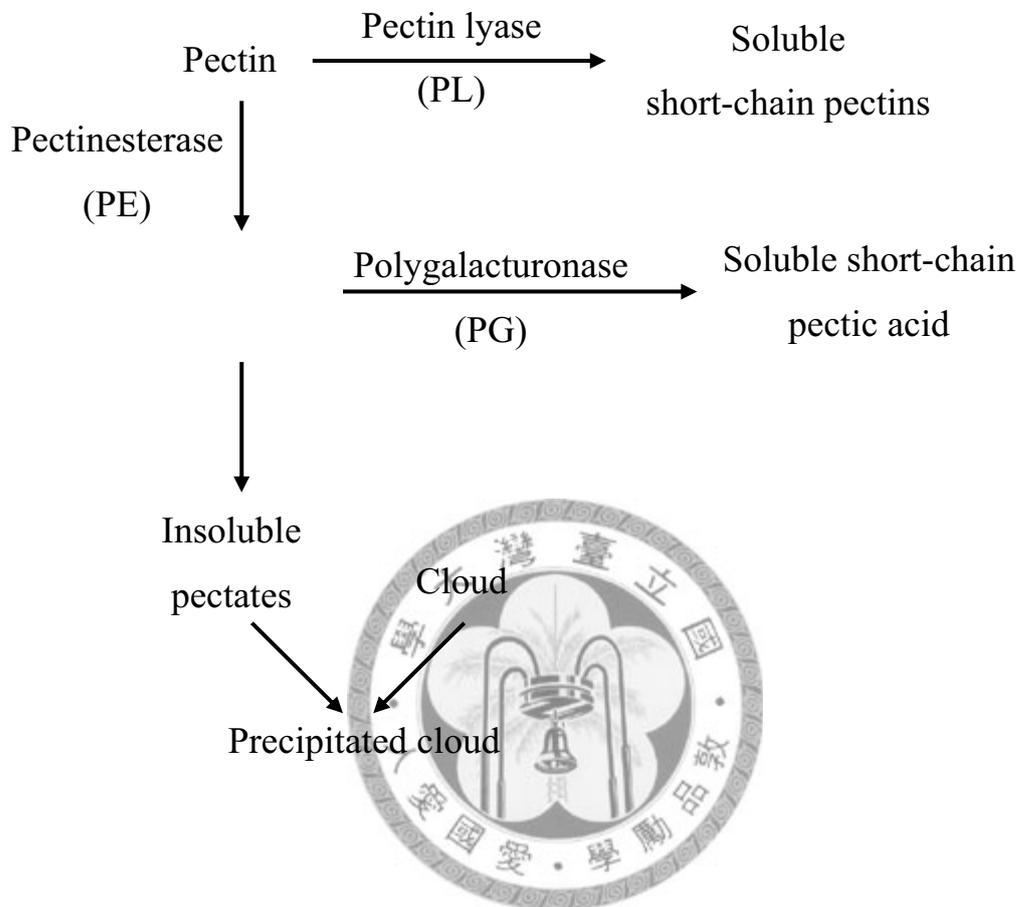
**COAGULATION AND SEDIMENTATION  
OF CLOUD PARTICLES:**

Following the action of polygalacturonases  
and partial degradation of pectin and release of  
the protein-carbohydrate-complex

圖二、混濁粒子均勻懸浮及產生絮凝沈澱的作用機制

Fig. 2. Cloud particles in suspension coagulation and sedimentation.

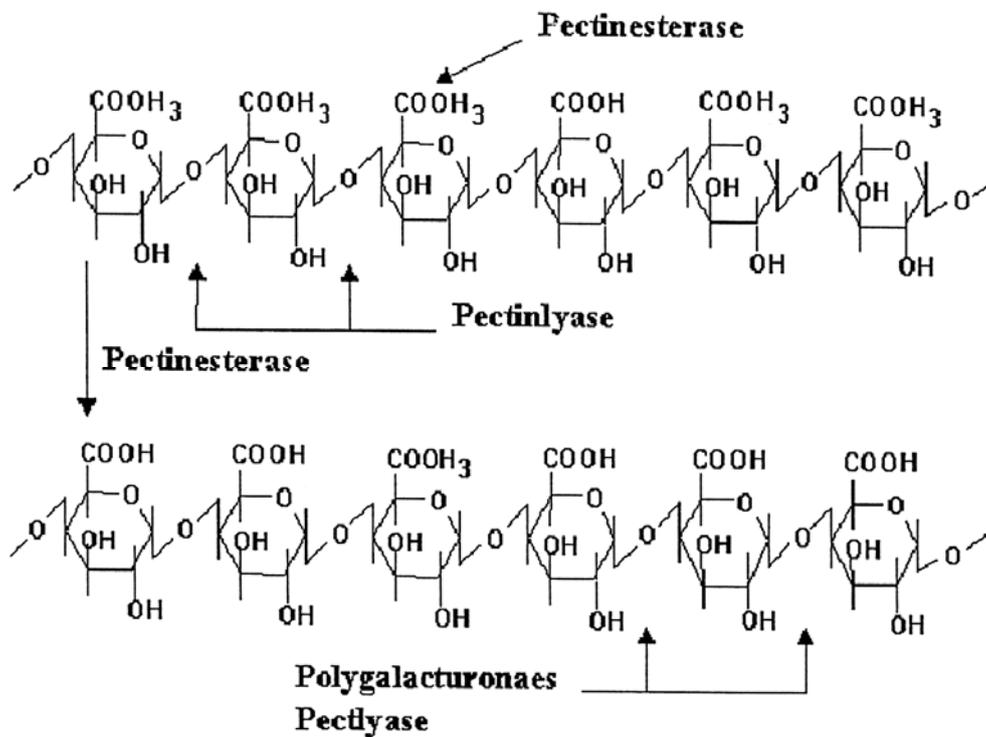
(Carle, 1998)



圖三、酵素作用引起柳橙汁喪失混濁度而分層之原理

Fig. 3. Theory of orange juice cloud loss via enzyme action.

(Crandall *et al.*, 1983)



圖四、(1)果膠酯酶、(2)果膠裂解酶及(3)聚半乳糖醛酶之作用位置  
 Fig. 4. The action mode of (1) pectinesterase, (2) pectin lyase, and (3) polygalacturonase.

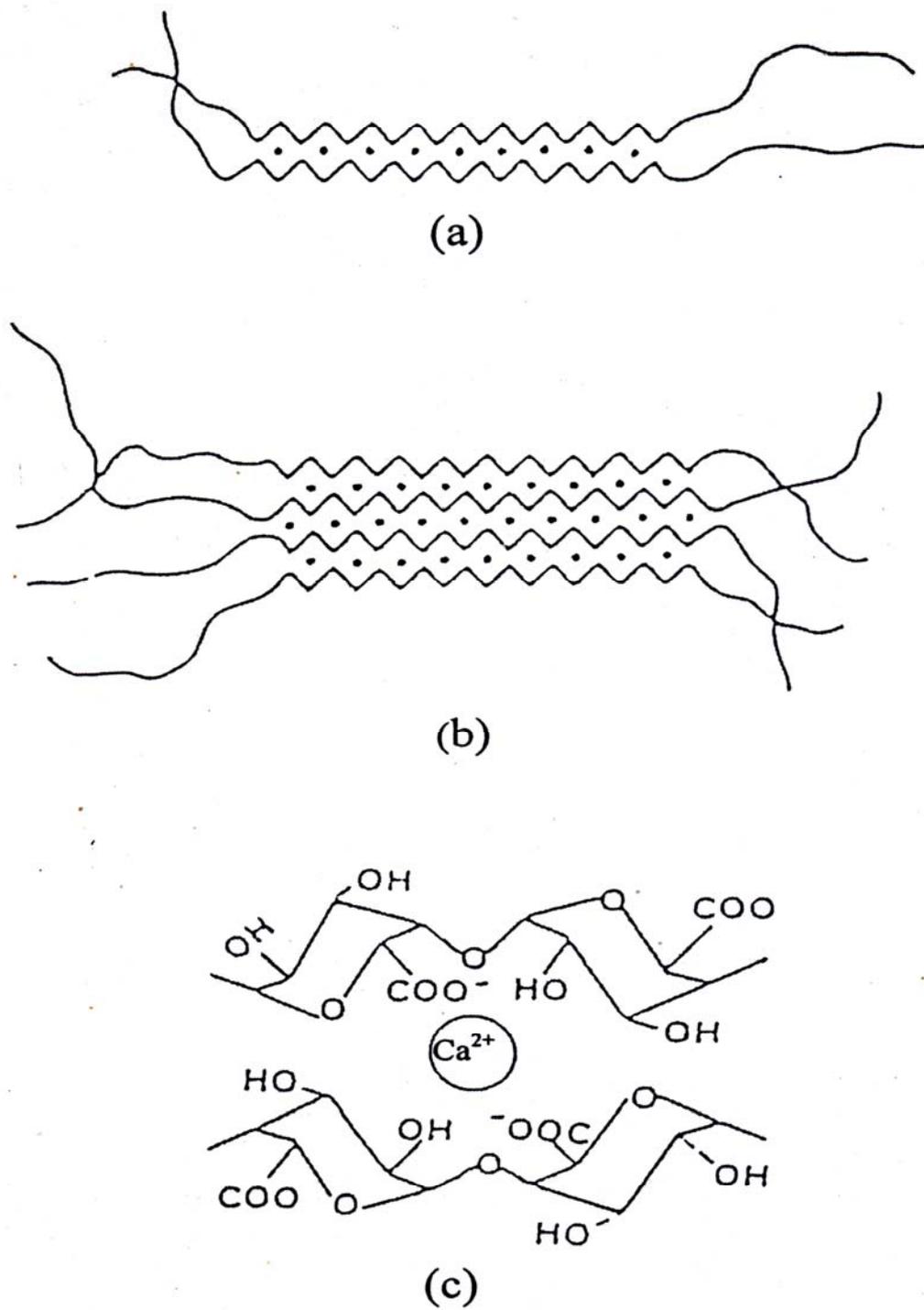
(黃，1992)

(1972)指出，若低甲氧基果膠和鈣離子間過度架橋，產生大分子之不溶性果膠質酸鈣(insoluble Ca-pectate)，則會造成柑桔果汁之沉澱分層(圖五)。賴(1985)認為番茄汁在殺菁前添加濃度 300ppm 以內的鈣離子，有活化果膠酯酶的效果，使果膠分子之游離羧基數目增加，並抑制聚半乳糖醛酶(polygalacturonase, PG)的作用。這些鈣離子可和新生的游離羧基結合，或與果膠分子上原本已和游離羧基結合的鈉、鉀、鎂及氫進行陽離子交換，造成適量架橋的形成，強化果膠分子的網狀結構，並提高其保水成膠能力，使果汁黏度上升。賴(1996)亦指出添加濃度 200~300ppm 之氯化鈣，可明顯提高泰國種芭樂汁之黏度，但若添加過量濃度(500ppm)則會使黏度下降，推測其並非所有結合態鈣均對芭樂汁黏度有正面的貢獻，可能須視這些鈣離子是否能在果膠分子上形成適量且方位正確之架橋而定，否則若導致過量之結合鈣形成，反而使固形顆粒不易分散於膠體溶液中，而導致膠體系統安定性與黏度的下降。



#### 四、果汁澄清之方法

澄清果汁加工的主要關鍵在於將果汁中任何肉眼可辨識之不溶性懸浮固形物及潛在導致澄清果汁包裝後會產生混濁或沈澱的物質去除。一般果汁的澄清處理包含澄清(clarification)及淨化(fining)兩大部分。所謂「澄清」是指用機械方法或物理、化學方法，將果汁中之不溶性固形物分離，其他包括添加酵素將果汁中之大型水溶性分子(如果膠、澱粉等)分解，以提高澄清加工之效率。澄清加工的方法包括靜置法、過濾法、離心分離、酵素處理(果膠分解酵素、蛋白質分解酵素、澱粉分解酵素等)。「淨化」則是在果汁中添加淨化劑，透過淨化劑與果汁中之潛在生成混濁及沈澱之不穩定成分進行化學或



圖五、果膠鈣鹽結合造成柑桔果汁凝膠與喪失混濁度之機制

Fig. 5. Calcium pectate structure responsible for most gelation and cloud loss in citrus juice: (a) "egg-box" dimer; (b) aggregation of dimmers; (c) an "egg-box" cavity.

(Grant *et al.*, 1973)

物理反應，將懸浮物質或是可溶性成分絮凝沈澱的一切措施。因此淨化的目的就是使這些潛在生成混濁或沈澱之物質先絮凝和沈澱，再澄清過濾。而澄清僅有穩定與分離不溶性固形物的作用目的(杜，1992)。

## (一) 酵素澄清處理

### 1. 果膠分解酵素

果汁中的多醣類，除了粗纖維及澱粉外，則是以果膠質含量最高。果膠有增加黏稠度、穩定果汁混濁度之功效，但對於澄清果汁而言，大分子果膠卻會阻礙過濾效率，因此澄清果汁加工時通常會添加果膠酵素將其分解成小分子。常見的商業用果膠分解酵素包含以下幾種(劉和陳，1979；黃，1992)：

(1) 果膠酯酶(Pectinesterase, PE)：果膠酯酶可以水解果膠分子的酯化羧基(-OCH<sub>3</sub>)，釋出甲醇，降低果膠酯化程度(degree of esterification, DE)。但其不會分解聚半乳糖醛酸或是其他酯類。

(2) 聚半乳糖醛酸酶(Ploygalacturonase, PG)：聚半乳糖醛酸酶可以水解低酯化果膠的 $\alpha$ -1,4-糖苷鍵( $\alpha$ -1,4-glycosidic linkage)，將大分子果膠分解成為小分子果膠，但無法對高酯化程度的果膠作用。

(3) 果膠分解酶(Pectin lyase, PL)：果膠分解酶之作用是將大分子的高酯化果膠分解成為小分子果膠，而對於低酯化果膠或是果膠酸則沒有作用。

Flores 等人(1988)指出葡萄果汁在用超過濾處理之前若先用 pectinase 及 protease 可以增加超過濾處理時之透流速率(flux)。Pectolytic enzyme(如 PG、PL)也可用於蘋果汁之浸提萃取將榨汁率提高到 90% (Schimitt, 1988)。

### 2. 澱粉分解酵素

常見的澱粉分解酵素包含以下四種酵素：

- (1)  $\alpha$ -澱粉酶( $\alpha$ -amylase)：可隨意水解澱粉分子內部之  $\alpha$ -1,4-glucoside 鍵結，產生麥芽糖(87%)、葡萄糖(10%)和低聚糖(3%)等分子。
- (2)  $\beta$ -澱粉酶( $\beta$ -amylase)：由澱粉非還原端逐次水解  $\alpha$ -1,4-glucoside 鍵，產生麥芽糖。
- (3) 葡萄糖澱粉酶(glucoamylase)：由澱粉非還原端逐次水解  $\alpha$ -1,4-glucoside 鍵，產生葡萄糖。
- (4) 澱粉-1,6-葡萄糖苷酶(amylo-1,6-glucosidase)：作用於分解支鏈澱粉(杜，1992)。

## (二) 淨化劑處理

澄清果汁加工使用的淨化劑種類繁多，經常被使用的有以下數種：

### 1. 明膠(Gelatin)

明膠又稱動物膠，主要是由動物的膠原蛋白(collagen)經水解而來。A 型明膠是由豬皮經酸水解製得，等電點在 pH7~9 之間；而 B 型明膠是由動物之骨頭及獸皮經鹼液分解而得，等電點在 pH4.7~5.1 左右(Schrieber, 1976)。由於果汁通常在酸性條件下，使用 B 型明膠溶解度較低，且接近等電點易沈澱、成本貴，因此果汁淨化處理上常使用 A 型明膠(杜，1992)。

明膠在果汁加工中最常用於去除單寧物質。在果汁 pH 值的範圍內 A 型明膠帶正電，可以與帶負電荷的酚類物質結合，或與果汁中帶負電荷之膠體粒子作用，使果汁分子間維持懸浮狀態之電荷排斥力下降而析出(Calderon *et al.*, 1968；Heatherbell, 1984)。黃(1992)指出酚類的氫氧基與明膠分子的胜肽(peptide)鏈之間形成氫鍵，而降低溶解

度變成不溶性。據 Van Buren & Robinson(1969)指出明膠與單寧間之結合力很強，而明膠的等電點與果汁 pH 值的差值越大，明膠的正電性就越強，淨化效果就越好。當果汁中單寧含量高時較易形成不溶性之聚合物，此時使用明膠可降低單寧含量，增加果汁之澄清效果(蔡，1982；Bannach, 1984)。

明膠處理通常在果膠酵素處理前或其他淨化處理前進行，藉此可將干擾酵素作用或造成凝塊的物質如單寧(Waltdt, 1967)去除。雖然明膠具有淨化的效果，但使用過量則會造成過度淨化的反效果(Amerine *et al.*, 1976)。明膠的澄清效果受溫度、單寧含量、果汁前處理溫度、pH、金屬離子、氣體含量、糊精、明膠品質及用量等因子之影響(Hodgson & Beavers, 1981)。



## 2. 單寧(Tannin)

單寧淨化劑為黃色或褐色粉末，易溶於水，市售之單寧淨化劑的成分與果汁中所含的單寧成分不同。單寧溶液易發黴、氧化，因此不易貯藏，每次使用時再製備。單寧本身帶負電，可捕捉金屬離子，單寧與金屬離子結合後會形成不溶於水的化合物，導致果汁色澤產生很大的變化。單寧一般與明膠一起添加作用於單寧含量很低的果汁中進行淨化，一般會先將單寧加入果汁中吸附帶正電之物質，再加入明膠將單寧及其吸附的物質去除。單寧添加量一般為 20-100g/1000L。

## 3. 皂土(Bentonite)

皂土為一種黏土，分子式為  $Al_2O_3 \cdot 4SiO_2 \cdot nH_2O$ ，為果汁中去除水溶性蛋白質最常用的淨化劑。皂土帶負電荷，利用此負電性進行吸附反應與離子交換作用將帶正電荷的水溶性蛋白質吸附，再過濾去除。此外，皂土亦可吸附果汁中作用過的明膠或過多的明膠，防止「過

白葡萄酒中添加皂土(5pounds/1000gal)可使水溶性蛋白質含量由 50-100mg/L 降至 2-10mg/L (Blade & Boulton, 1988)。Hsu & Heatherbell (1987)也指出皂土處理所移除果汁中之水溶性蛋白質的分子量大多在 32-45 kDa 之間。

#### 4. 矽膠

矽膠(silica sol)為矽酸(silicic acid)的水溶液，呈乳濁狀，SiOH 含量在 29~31%之間，pH 值約 9~10。矽膠粉末平均粒子之直徑在 30~100nm 之間，比表面積約 250m<sup>2</sup>/g。果汁淨化時所用之矽膠溶液粒子平均直徑約 5~10nm，比表面積在 100~460m<sup>2</sup>/g 之間。有些矽膠溶液在低溫下不穩定，會出現不可逆的絮凝反應，使得淨化能力下降，適合的作用溫度在 10~25°C 之間，使用溫度最高可達 40~45°C (杜，1992；林，1996)。矽膠粒子(silica gel)帶負電性，可吸附帶正電之粒子，例如多酚物質、蛋白質和糠醛(furfural)。矽膠粒子亦可以利用其表面的氫氧基(-OH)與蛋白質羰基之氧原子以氫鍵結合，或是與 proline 與 hydroxyproline 等胺基酸上的疏水區產生疏水性的結合，吸附蛋白質分子(Siebert and Lynn, 1997c)。

#### 5. 聚乙烯聚吡咯啉酮(Polyvinyl polypyrrolidone; PVPP)

PVPP 是由聚乙烯吡咯啉酮(polyvinyl pyrrolidone; PVP)經架橋作用後，所得之非水溶性聚合物，外觀為白色粉末狀，可用來吸附多酚化合物，其效果較 PVP 佳。PVPP 在葡萄酒工業中被廣泛地應用於穩

定白葡萄酒之色澤及降低澀味上。PVPP 是由一個飽和的碳鏈為基本骨架，在此骨架的固定間隔上有向外突出的 pyrrolidone 環，而這些環剛好在於 PVPP 粒子的表面上，且其最外表的羰基(carbonyl group)又與同環上的氮原子相鄰，具有極強的負電性，因此可對類單寧上的羥基產生氫鍵或電荷轉移之結合作用。這種結合對於單寧構造上第 4 位置(最遠位置)的羥基分子吸引力特強，此位置也是多酚化合物最容易與醇溶蛋白結合之位置，因此 PVPP 可模仿醇溶蛋白與多酚化合物先發生反應。PVPP 與多酚化合物的結合速度是醇溶蛋白的十倍，而可快速將多酚化合物吸附去除，避免它們再與蛋白質結合造成混濁(林，1996)。

不回收型的 PVPP 一般是與矽藻土併用；回收型 PVPP 則是在第一次矽藻土過濾後才添加，兩者添加後均需要至少五分鐘的反應時間，使其充分將多酚化合物吸附住才可進行過濾(林，1996)。

### (三)加熱處理

葡萄酒經加熱處理後，熱不穩定之蛋白質會加速與酚類物質結合而沉澱，然後再配合過濾處理將果汁中之蛋白質去除，防止再沉澱的現象發生(Van Buren, 1972；Heatherbell, 1984)。Wilson & Burns(1983)以加熱處理奇異果汁，將果汁中之蛋白質沉澱下來，然後以超過濾方法過濾而得到澄清度極佳的奇異果汁。劉和陳(1979)將鳳梨酒在 65°C 加熱 5 分鐘，然後過濾，可以達到良好的澄清效果。Hsu 等人(1989)將 Granny Smith 蘋果汁以高溫短時間殺菌後，再配合澄清處理，再進行二次殺菌、裝瓶，經貯藏 9 個月後，蘋果汁仍可維持澄清透明的狀態。

#### (四)離心分離

離心分離，或稱離心過濾，主要是將大顆粒物質去除，例如不溶性纖維、酵母等，而更小顆粒的物質則需要較高轉速離心處理(10000rpm 以上)才可分離(李，1996)。離心分離的原理係利用重力加速度與離心力分離溶液中之懸浮固體或是液狀微粒子。由於混濁物顆粒的密度大於液體的密度，所以它承受的重力和離心力也就大於液體，因此混濁物顆粒就沿著它所受的各個外力之合成力方向向外運動。在大多數情況下，重力比離心力小得多，所以混濁物往往橫向地沉澱於滾筒內壁上。再經由排渣將混濁物分離(杜，1992)。

曾(2000)以 40000×g 離心橫山梨果汁，果汁的混濁度可由 10.4NTU 降為 1.6NTU，但果汁加熱後仍因熱不穩定蛋白質變性而發生混濁度劇烈上升的現象。

#### (五)過濾

過濾是一種以機械方式將果汁飲料中之固形物與液體分離的澄清工作。澄清或淨化處理後的果汁可直接過濾，或經沉降、離心後再過濾。而過濾可分為有表層過濾(surface filtration)、深層過濾(deep bed filtration)、膜過濾(membranes filtration)等方式。表層過濾是將較濾網或濾材孔隙大的粒子擋在濾材表面的過濾操作；深層過濾是利用懸浮液通過高厚度之粒狀多孔濾材(如矽藻土)時，其懸浮固形物附著於多孔粒子濾材內以獲得澄清濾液的過濾操作。近十年來各種不同分離孔徑的高分子薄膜及陶磁膜逐漸被開發出來，其分離孔徑從幾奈米至數微米皆有，使微米級(micron sized)、次微米級(sub-micron sized)的膠體粒子可用十分簡易的膜過濾操作來將之與液體分離(呂和呂，1994)。

## 1. 矽藻土(Diatomaceous earth)過濾

矽藻土為一種助濾劑，是由單細胞植物矽藻(diatom)的骨骼所形成，當矽藻死後殘留的骨骸沈入海底而成矽藻土。矽藻土外觀呈白色或灰白色，為軟而脆的矽質礦物，有各種不同形狀，但通常是針狀或平板狀的(呂和呂,1994)。它的化學組成有70~90%的氧化矽，與3~12%的水分。矽藻土顆粒大小約為0.5~1.2 $\mu\text{m}$ ，顆粒愈小，愈能捕捉懸浮的固體，使濾液的澄清度愈高，但過濾流速則會下降。每1公克矽藻土之過濾表面積可達20至25 $\text{m}^2$ ，粒子硬度高，微細組織內部都是孔洞，故質輕(重量有只有水的四分之一至十分之一)，可吸附4倍重量的水(杜,1992)。以葡萄酒為例，使用時先在底部鋪上纖維素濾紙或濾布做底，再鋪上矽藻土打底，每一百公斤的矽藻土，可處理100至150公噸的酒，若酒中膠質實在太多，則可先行添加果膠酵素分解果膠(李,1996)。

## 2. 超過濾(Ultrafiltration; UF)

超過濾是利用高分子薄膜進行物質分離之加工技術，薄膜的種類是以膜的孔隙(pore size)大小來作區分，通常以分子量劃分極限(Molecular weight cut-off; MWCO)來表示薄膜大部分孔隙允許通過溶質之最大分子量。目前工業及科技界所使用超過濾薄膜分子量劃分極限大約在2kDa~500kDa MWCO的範圍，果汁利用超過濾澄清處理所使用薄膜之分子量劃分極限約在20kDa~200kDa之間，可以去除果汁中較小的懸浮粒子，使果汁達到較佳的澄清度。

超過濾亦常被用來去除果汁中之蛋白質。Hsu & Heatherbell(1987)指出以10kDa MWCO超過濾薄膜處理葡萄果汁時可除去約90%的蛋白質，使澄清果汁中的蛋白質含量降至3~20mg/L。雖然有少部分分

子量在 12~30kDa 之間，pI 在 4.1~5.8 之蛋白質無法去除，但至少可減少 80~95% 的皂土用量。

## 五、環境因子對果汁混濁安定性之影響

果汁的澄清加工，除了將肉眼可辨識的懸浮物、沈澱物去除外，亦將潛在可能發生再混濁之物質一併去除，方可得到穩定澄清品質的果汁。澄清果汁由蛋白質-多酚化合物聚合作用形成的再沈澱現象，常與果汁所處的環境有密切的關係。可能影響混濁安定性之環境因子有以下四項：

### (一) 氧氣

氧氣存在可促使多酚物質氧化聚合而形成混濁(Siebert, 2006)。Mulkay 及 Jerumanis (1983)指出聚合度越大的酚類化合物越易產生混濁，且聚合度大的酚類化合物也容易與蛋白質結合，形成多酚化合物-蛋白質的混濁或沈澱(林, 1996)。Gao 等人(1997)以 0.45 $\mu$ m hydrophilic Durapore 薄膜過濾和 10k MWCO Amicon ultra cell 超過濾之蘋果汁充填在預留不同上部空間的玻璃瓶中進行室溫儲存試驗，結果顯示儲存 6 週後 0.45 $\mu$ m hydrophilic Durapore 薄膜過濾之蘋果汁的混濁度隨著上部空間的增加而有顯著上升，10k MWCO Amicon ultra cell 超過濾之蘋果汁的混濁度亦隨著上部空間的增加而有顯著上升但仍小於 1 NTU。Wall 等人(1996)比較蘋果汁製程中氧氣對混濁度生成之影響，結果顯示無氧下所製成的澄清蘋果汁混濁度較低；而在有氧環境下所生產的澄清蘋果汁在相同貯藏條件下，濁度卻高出 13 倍，其原因可能係多酚化合物(如 chlorogenic acid、catechins、procyanidins 等)在有氧環境下易聚合成較大的聚合物，雖然果汁在裝瓶後雖然無氧氣存在，但聚合現象仍然持續發生；反之，無氧環境下所製成的果汁則因

多酚化合物之聚合程度較小，所以較不易生成混濁物質。

## (二) 溫度

溫度可提供潛在生成混濁之物質彼此鍵結與作用之能量。當溫度升高時，所提供較高的潛能可使果汁成分間的鍵結與作用增加，且溫度增加也會提高分子碰撞機率，增加絮凝或凝集的機率，促進混濁與沈澱反應的進行。Padill & Mclellan (1989)將澄清蘋果汁分別置於 18°C 與 43°C 進行貯藏試驗，結果顯示於 43°C 貯藏的蘋果汁，於六個月內混濁度由 3NTU 升高至 90NTU；而貯藏於 18°C 的果汁僅升高至 7NTU。陳(1994)以不同分子量劃分極限的超過濾膜澄清過濾青梅汁，濃縮之後於不同溫度下進行貯藏實驗，結果發現果汁使用較小分子量劃分極限(30kDa)的超過濾膜處理並貯藏於 5°C 下可防止再沈澱發生；然而同樣使用 30kDa 的超過濾膜過濾，貯藏在 25°C 至第三週依舊有沈澱產生。

## (三) pH 值

Siebert 等人(1996)以單寧-穀膠蛋白(tannin-gliadin)模式溶液對 pH 值與混濁度之關係進行研究，結果顯示 pH 於 4.2 左右時，模式溶液有最大的混濁生成，因為此 pH 值接近穀膠蛋白的等電點。Wu & Siebert (2002)探討蘋果汁 pH 值及加熱時間對濁度生成之影響，結果發現蘋果汁的 pH 值在 3.0 和 3.5 時濁度生成都明顯高於 pH5.0 的蘋果汁。因此果汁 pH 值愈接近其成分中蛋白質的等電點時，蛋白質溶解度下降，易與多酚化合物以氫鍵或疏水鍵結合，因而使果汁容易發生混濁沈澱；當 pH 值高於蛋白質的等電點時，蛋白質帶有較多的負電荷，而帶負電的蛋白質彼此相互排斥，因此混濁度較低(Siebert, 1999)。

#### (四) 光照

Tajchakavit 等人(2001)以氙燈照射模式試驗對澄清蘋果汁的混濁度與光照之關係進行研究，結果顯示不論有無遠氙燈照射，在室溫儲存 35 週後，澄清蘋果汁的混濁度僅上升 0.90 NTU，且兩處理間沒有顯著差異，故推論光罩可能不是引起混濁之主要因子。



## 參、材料與方法

### 一、實驗原料

#### 1. 梅子

本實驗所使用之梅子品種為大青梅(Ta-Ching)，購自南投縣水里鄉王國欽先生的果園。採收後原料由產地直接運送至台大園產加工館，進行選別、清洗、晾乾後備用。

#### 2. 商業糯米醋

本實驗所使用之商業糯米醋含有 4.5%醋酸，購自大安工研食品工廠股份有限公司。

### 二、試藥

1. Bovine serum albumin (BSA)、Carbazole、Coomassie brilliant blue G-250、Diatomaceous earth (acid-washed, not further calcined)、Gallic acid、D-Galacturonic acid monohydrate、Iodine、Potassium iodide 為美國 Sigma 公司產品。
2. Fluoraldehyde<sup>TM</sup> Reagent Solution (o-phthalaldehyde, OPA) 為美國 Pierce Biotechnology 公司產品。
3. Folin-Ciocalteu phenol reagent、Hydrochloric acid、Isopropyl alcohol、Potassium ferrocyanide、Sodium carbonate 為日本林純公司產品。
4. Bentonite、Gelatin、Phosphoric acid、Sodium hydroxide、Tannic acid 為日本 Nacalai Tesque 公司產品。
5. MN-Kieselgel G (silica gel G) 為德國 Macheret-Nagel 公司產品。
6. Pectinase<sup>®</sup> 5XL 為瑞士 Novo Nordisk Ferment 公司產品。

7. 95%乙醇 (95% ethanol)為台灣菸酒股份有限公司產品。

### 三、儀器設備

1. 酸鹼度計(pH meter)：美國 JENCO 公司出品，Microcomputer pH/mV/TEMP Meter 6171 型。
2. 色差儀(Color and color differentiator)：Model 985917，BYK-Gardner，AC ADAPTER AC-A12 型。
3. 屈折計(Refractometer)：美國 Bausch and Lomb 公司出品，Abbe-3L 型。
4. 分光光度計(Spectrophotometer)：台灣 Metertech 公司出品，SP8001 型。
5. 濁度計(Turbidimeter)：美國 HACH 公司出品，2100AN 型。
6. 超過濾系統(Ultrafilter system)：台灣宗洋公司出品。過濾膜：ROMICON, CTG, 1" HF1.0-43-PM100。
7. 螢冷光分析儀：美國 Perkin Elmer 公司出品，PE Victor3 型。
8. 96 孔微量操作盤(ELISA plate)：美國 Nagle Nunc International 公司出品。

### 四、實驗方法

參考梅子再製酒之製造過程，以梅子：商業糯米醋 = 1：1.2 之重量比例，盛裝於 20 公升塑膠白桶中加蓋，於常溫下進行浸漬約 4 個月，以 US 80mesh 震動篩分離去除果肉、果核與果渣，再依序以 US 200mesh 與 US 325mesh 篩網進行過濾，得到浸漬梅醋原液。

#### (一) 浸漬梅醋之一般理化特性分析(圖六)

取上述之浸漬梅醋原液測量其色澤、混濁度(turbidity)、可溶性固

形物(soluble solid)含量、pH 值、可滴定酸(titratable acid)度、水溶性蛋白質(Soluble protein)含量、總酚(total phenol)含量、水溶性果膠(soluble pectin)含量。

#### 1. 色澤

樣品離心後，取上清液以色差儀(Model 985917, BYK-Gardner, AC ADAPTER AC-A12)在室溫下測定之。

Hunter L、a、b、C、Hue 值：L 值表示亮度，L 值為 100 時為全白，L 值為 0 為全黑。a 值為正時為紅色，a 值為負時為綠色。b 值為正時為黃色，b 值為負時為藍色。C 值表示色彩濃度，C 值越大色彩越濃，C 值為 0 時為灰階。Hue 值表示色度(hue angle)。L、a、b、C、Hue 值為色差儀之測定值。

#### 2. 混濁度

樣品充分搖勻後，以濁度計(HACH, 2100AN)在室溫下測定之。單位以 NTU (nephelometric turbidity unit)表示。

#### 3. 可溶性固形物含量

樣品離心(3500×g, 20min)後，取上清液以屈折計(Bausch and Lomb, Abbe-3L)在室溫下測定之，再以溫度及酸度校正表校正數值。單位以°Brix 表示。

#### 4. pH 值

樣品離心後，取上清液以酸鹼度計(JENCO, Microcomputer pH/mV/TEMP Meter 6171)在室溫下測定之。

#### 5. 可滴定酸度(AOAC, 1984)

樣品離心後，取上清液以蒸餾水稀釋 10 倍，取 20g 稀釋液以 0.1N 之  $\text{NaOH}_{(\text{aq})}$  (力價 = 1.005) 滴定至 pH 8.1，記錄  $\text{NaOH}_{(\text{aq})}$  之消耗量 (mL)，套入下列公式計算樣品之可滴定酸度。單位以% (w/w, as acetic

acid)表示。

$$\text{可滴定酸度} = \frac{\text{NaOH 消耗量} \times 0.1005 \times 0.060}{2.0} \times 100\%$$

## 6. 水溶性蛋白質含量

### (1) Coomassie blue method (Boys *et al.*, 1997)

精秤 100mg Coomassie brilliant blue G，溶於 50mL 95%酒精中，再加入 100mL 之 85%(w/v)磷酸水溶液，並以去離子水稀釋至 1 升即得到 Coomassie brilliant blue 溶液。

樣品離心後，取 0.1mL 上清液，先加入 0.05mL 之 0.1N NaOH，再加入 3mL 之 Coomassie brilliant blue 溶液，充分混合後靜置 30 分鐘，以分光光度計 (JASCO, Model 7800) 測定 595nm 下之吸光值。

標準溶液以 bovine serum albumin (BSA)配製：精秤 100mg BSA，溶於 0.15M 氯化鈉 (NaCl)水溶液中，定量至 100mL，再分別取 0、1、2、3、4、5mL，加水定量至 10mL 而配製得。由各濃度標準溶液之吸光值繪製標準曲線後，以內插法計算樣品之蛋白質濃度。單位以 mg/100mL (as BSA)表示。

### (2) 螢光法 (莊，2006)

樣品離心後，以蒸餾水稀釋至可偵測範圍，取 20 $\mu$ L 稀釋液加入黑色 96 孔微量操作盤 (96-well ELISA plate) 中，再於每個 well 待測物中加入 200 $\mu$ L 預先回溫至室溫之 Fluoraldehyde<sup>TM</sup> Reagent Solution，於 5 分鐘內以 Perkin Elmer Victor3 螢冷光分析儀偵測激發光 330-390nm/放射光 436-745nm 之螢光值。

標準溶液以 BSA 配製：精秤 500mg BSA 溶於蒸餾水中，以蒸餾水定量至 1L，再分別取 0、2、4、6、8、10mL 以蒸餾水定量至 10mL 而配製得。由各濃度標準溶液之螢光值繪製標準曲線後，以內插法計

算樣品之蛋白質濃度。單位以  $\mu\text{g/mL}$  (as BSA)表示。

#### 7. 總酚含量(Julkunen-Titto, 1985)

樣品離心後，取上清液以蒸餾水稀釋 10 倍，取 2mL 稀釋液加入 1mL 之 Folin-Ciocalteu phenol reagent 搖勻，最後加入 2.5mL 之 20% (w/v)碳酸鈉溶液，充分混合後靜置 20 分鐘，以分光光度計(JASCO, Model 7800)測定其於 765nm 下之吸光值。

標準溶液以 gallic acid 配製：精秤 100mg gallic acid 溶於蒸餾水中，以蒸餾水定量至 100 mL，再分別取 0、2、4、6、8、10mL 以蒸餾水定量至 10mL 而配製得。由各濃度標準溶液之吸光值繪製標準曲線後，以內插法計算樣品之總酚濃度。單位以  $\text{mg}/100\text{mL}$  (as gallic acid)表示。

#### 8. 水溶性果膠含量(Ting and Rousegg, 1986)

精秤 0.1g carbazole 溶於 95%乙醇中，再以 95%乙醇定量至 100mL 即得到 0.1% (w/v) carbazole reagent。

取 15g 樣品加入 30mL 95%乙醇，混和均勻後以  $10000\times g$  離心 10min，去除上清液後沉澱物以 60%異丙醇溶液洗 2 次，再加入 30mL 蒸餾水混合均勻，以  $3500\times g$  離心 15min，收集上清液，再加入 30mL 蒸餾水混合均勻，以  $3500\times g$  離心 15min，收集 2 次上清液混合均勻，加入 1N NaOH 溶液 5mL，再以蒸餾水定量至 100mL，即為樣品溶液。取 1mL 樣品溶液，加入 0.5mL carbazole reagent 搖勻，再加入 6mL 濃硫酸，在  $85^{\circ}\text{C}$  水浴恆溫反應 25min，冷卻至室溫後以分光光度計(JASCO, Model 7800)測定其於 525nm 下之吸光值。

標準溶液以 galacturonic acid 配製：精秤 100mg galacturonic acid 溶於蒸餾水中，以蒸餾水定量至 1L，再分別取 0、2、4、6、8、10mL 以蒸餾水定量至 10mL 而配製得。由各濃度標準溶液之吸光值繪製標

準曲線後，以內插法計算樣品之水溶性果膠濃度。單位以 mg/L (as galacturonic acid)表示。

## (二) 商業糯米醋與浸漬梅醋中潛在生成混濁成分之定性試驗(圖六)

商業糯米醋與浸漬梅醋原液分別以 0.45 $\mu$ m 濾膜抽氣過濾除去構成混濁現象之粒子後，進行導致混濁之潛在成分的定性分析。

### 1. 澱粉與糊精：以 iodine test 偵測(Van Buren, 1989)

精秤 1g 碘與 2g 碘化鉀溶解於蒸餾水中，再以蒸餾水定量至 100mL 即得到碘試劑。碘試劑需避光保存。

取 10mL 樣品於沸水浴中加熱 5min，冷卻至室溫後加入 1mL 碘試劑混合均勻，若果汁呈藍色或紫色即為陽性反應，表示有澱粉存在。另取 2mL 樣品加入 2mL 碘試劑混合均勻，若果汁呈紅棕色或紅色亦為陽性反應，表示有糊精存在。

### 2. 水溶性果膠：以 alcohol test 偵測(Van Buren, 1989)

取 15g 樣品加入 30mL 95%乙醇，混和均勻後以 10000 $\times$ g 離心 10min，若以肉眼觀察到有膠狀沉澱物即為陽性反應，表示有水溶性果膠存在。

### 3. 起霧性多酚：以 gelatin test 偵測(Siebert and Lynn, 1997)

精秤 1.2g 明膠溶解於蒸餾水中，再以蒸餾水定量至 100mL，即得到 12 g/L 明膠試劑。

取 100mL 樣品加入 2mL 明膠試劑，使樣品溶液中含有 240mg/L 明膠，均勻混合後在室溫靜置反應 30min，若樣品混濁度比未添加明膠者大於 10NTU 以上即為陽性反應，表示有起霧性多酚存在。

### 4. 起霧性蛋白質：以 tannic acid test 偵測(Hsu and Heatherbell, 1987; Siebert and Lynn, 1997)

精秤 8.35g 單寧酸溶解於 20mL 95%乙醇，再以蒸餾水定量至

100mL，即得到 83.5 g/L 單寧酸試劑。

取 100mL 樣品加入 2mL 單寧酸試劑，使樣品溶液中含有 1.67g/L 單寧酸，混合搖勻後在室溫靜置反應 30min，若樣品混濁度比未添加單寧酸者大於 10NTU 以上即為陽性反應，表示有起霧性蛋白質存在。

5. 鐵離子與銅離子：以 Metals-ferrocyanide test 偵測(Van Buren ,1989)

取 20mL 樣品加入 2mL 0.5% ferrocyanide 溶液混合均勻，若有紅棕色沉澱物產生即為陽性反應，表示有銅離子存在。另取 20mL 樣品加入 2mL 3N HCl 溶液與 2mL 0.5% ferrocyanide 溶液混合均勻，若有藍色產生亦為陽性反應，表示有鐵離子存在。

### (三) 浸漬梅醋中起霧性蛋白質和起霧性多酚含量之測定(圖六)

浸漬梅醋以 0.45 $\mu$ m 濾膜抽氣過濾除去構成混濁現象之粒子後，進行起霧性蛋白質和起霧性多酚含量之估測。

#### 1. 起霧性蛋白質含量

取 100mL 樣品加入 5mL 單寧酸試劑，使樣品溶液中含有 0、2、4、6、8、10g/L 單寧酸，混合搖勻後在室溫靜置反應 30min，以濁度計測量混濁度，並以混濁度增加值表示樣品中起霧性蛋白質之含量(Siebert and Lynn1997)。

#### 2. 起霧性多酚含量

取 100mL 樣品加入 5mL 明膠試劑，使樣品溶液中含有 0、200、400、600、800、1000mg/L 明膠，混合搖勻後在室溫靜置反應 30min，以濁度計測量混濁度，並以混濁度增加值表示樣品中起霧性多酚之含量(Siebert and Lynn1997)。

### (四) 不同過濾方式對梅醋裝瓶後室溫儲存期間色澤、混濁度、pH 值、可溶性固形物、起霧性蛋白質和起霧性多酚含量之影響(圖七)

添加 25 $\mu$ L/kg 之果膠酵素(Pectinase<sup>®</sup> 5XL)於浸漬梅醋原液中，在室溫下作用 50 分鐘後，轉置於 4°C 下絮凝 16 小時 (曾，2000)，再依序以 US 200mesh 和 US 325mesh 的篩網過濾。反應完成後測量其水溶性果膠含量，以確定果膠是否完全分解。酵素處理去除果膠後之樣品，以下稱為「浸漬梅醋」(sieve filtrated mei vinegars, SF)。

取內徑 15 公分的瓷製漏斗，鋪上 Whatman No.5 的濾紙，並預覆 15 克的酸洗矽藻土，取一部份上述之浸漬梅醋以減壓過濾法過濾所得之濾液，以下稱為「矽藻土過濾梅醋」(diatomaceous earth filtrated mei vinegars, DF)。另取一部份浸漬梅醋以分子劃分極限(Molecular Weight Cut-off, MWCO) 100,000 (100k)的中空纖維膜管(Hollow fiber tube)過濾，以此方法過濾得到的濾液以下稱為「超過濾梅醋」(Ultra filtrated mei vinegars, UF)。

取上述三種梅醋樣品，分析其混濁度、可溶性固形物含量、pH 值、可滴定酸度、水溶性蛋白質含量、總酚含量；另取一部份上述三種方法過濾之梅醋於常溫下進行儲存試驗，在儲存第 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16 週取樣，測定混濁度、可溶性固形物含量、pH 值、起霧性蛋白質和起霧性多酚含量，並於儲存第 0 及 16 週測定其色澤。

#### (五) 梅醋澄清處理條件之釐定(Siebert and Lynn, 1997)

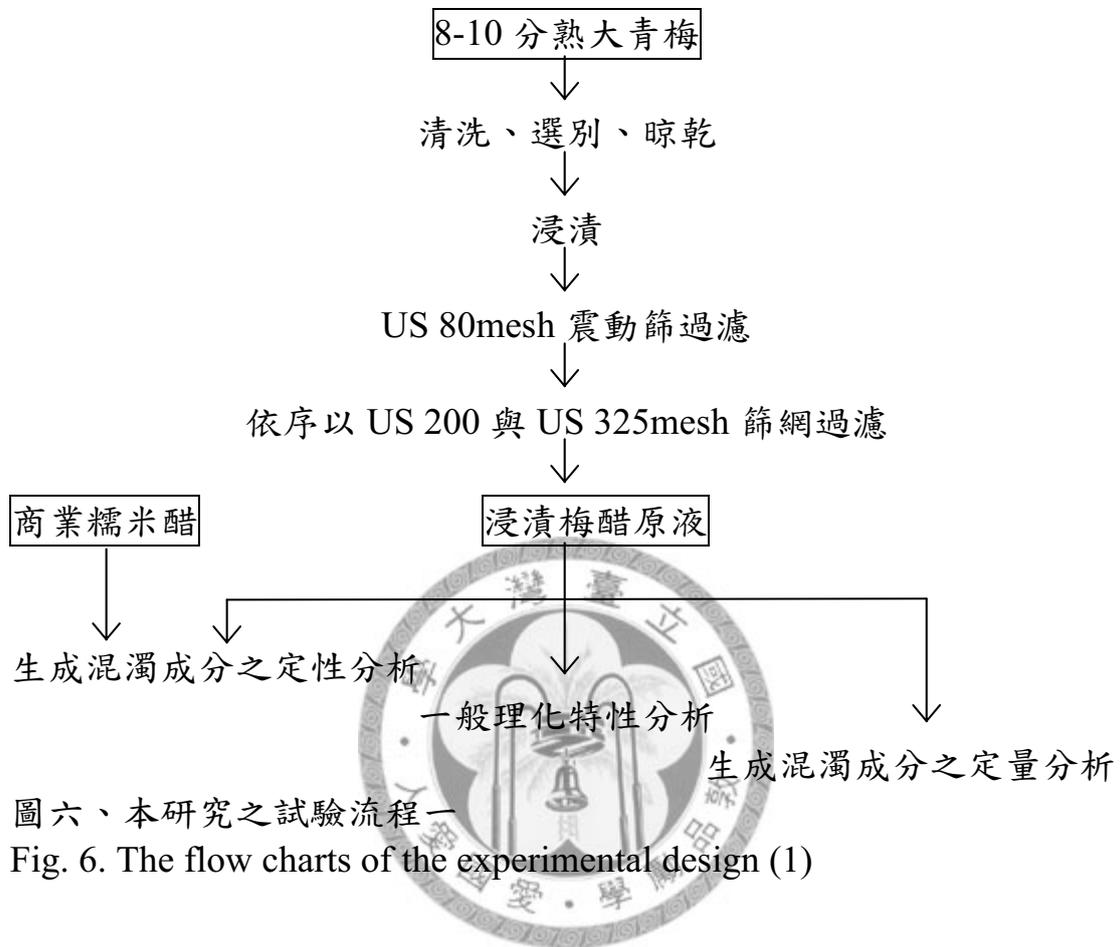
取浸漬梅醋分別加入 0、2.5、5.0、10.0g/L 之皂土與矽膠，以固定轉速攪拌 30min 後，再以酸洗矽藻土進行抽氣過濾。取 100mL 濾液加入 2mL 單寧酸試劑，使溶液中含有 1.67g/L 單寧酸，混合搖勻後在室溫靜置反應 30min，以濁度計測量其混濁度，並以混濁度增加值來估測樣品中起霧性蛋白質之清除效果。

(六) 不同澄清處理對梅醋裝瓶後室溫儲存期間色澤、混濁度、pH 值、可溶性固形物、起霧性蛋白質和起霧性多酚含量之影響(圖七)

取浸漬梅醋分別加入 2.5g/L 之皂土與矽膠，以固定轉速攪拌 30min 後，再以酸洗矽藻土進行抽氣過濾，所得到之濾液分別稱為「皂土處理-矽藻土過濾梅醋」(bentonite treatment-diatomaceous earth filtrated mei vinegars, B-DF)與「矽膠處理-矽藻土過濾梅醋」(silica gel treatment-diatomaceous earth filtrated mei vinegars, S-DF)。取上述二種方法澄清處理與未經澄清處理之矽藻土過濾梅醋，於常溫下進行儲存試驗，並於儲存第 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16 週取樣，測定混濁度、可溶性固形物含量、pH 值、起霧性蛋白質和起霧性多酚含量，另於儲存第 0 及 16 週測定其色澤。

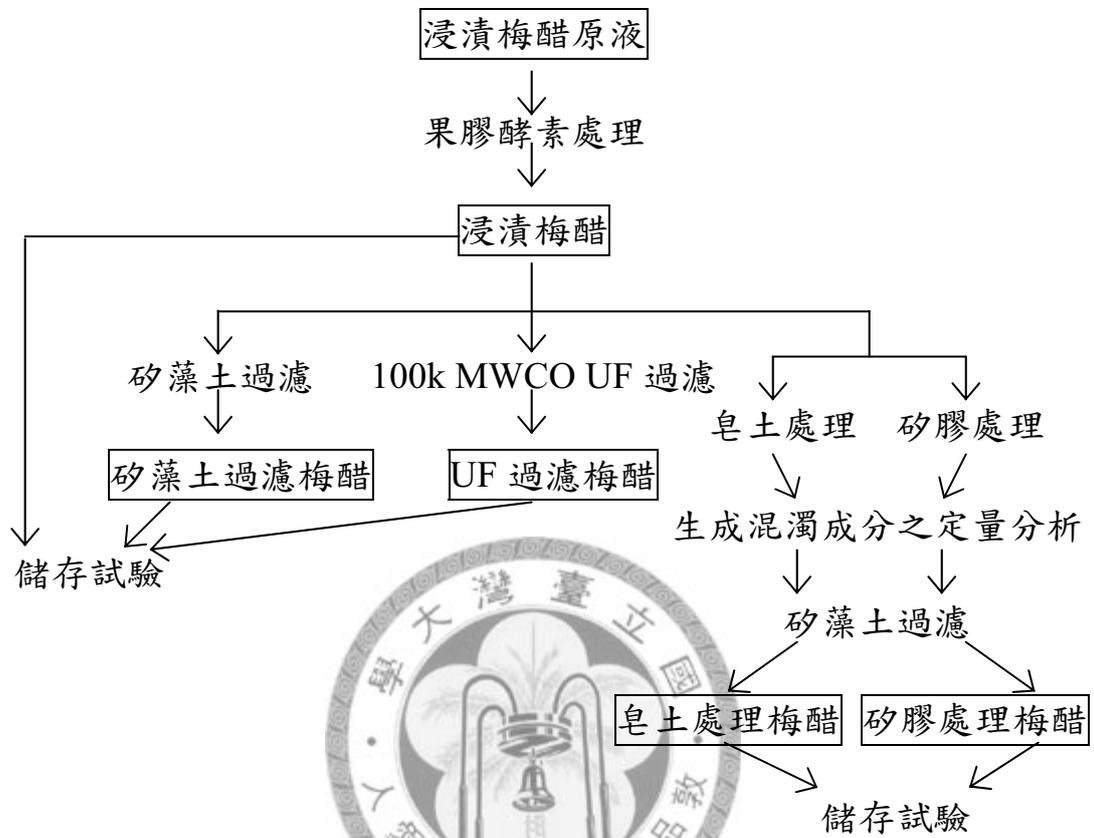
(七) 統計分析

上述所有試驗均進行三重複。使用統計分析系統(Statistic Analysis System, SAS)，以變方分析(AVOVA)及差異性分析(Duncan's multiple range test)進行各項分析數據之統計分析，獨立性變數與依賴性變數間的相關性分析(correlation analysis)亦以 SAS 軟體分析。



圖六、本研究之試驗流程一

Fig. 6. The flow charts of the experimental design (1)



圖七、本研究之試驗流程二  
 Fig. 7. The flow charts of the experimental design (2)

## 肆、結果與討論

### 一、浸漬梅醋之理化特性分析

表二中顯示本試驗製備之浸漬梅醋之各項理化特性成分。

#### 1. 色澤

浸漬梅醋外觀上為紅褐色(reddish-brown)之液體，與偏黃褐色之商業糯米醋在外觀上具有顯著差異。比較商業糯米醋與浸漬梅醋之 Hunter 各項數值，L 值由 94.68 降低為 91.45，a 值與 b 值分別由 -0.08 與 8.54 增加為 1.19 與 13.14，C 值由 9.01 增加為 13.19，Hue 值則由 91.31 變為 84.84。在浸漬過程中緩慢發生的梅納反應與多酚物質的酵素性褐變都可能是造成浸漬前後亮度降低和褐變現象之原因。

#### 2. 混濁度

浸漬梅醋的混濁度為 46.77NTU，遠高於商業糯米醋(小於 1NTU)。浸漬後之梅子會出現果肉軟化、破碎之現象，故推測除了在浸漬過程由梅子抽提(extract)出之果膠、半纖維素、蛋白質等膠體物質外，梅子果實破碎後釋放之果肉碎片、纖維、完整未受損的細胞、細胞碎片等粒子都可能是造成混濁度上升之原因。

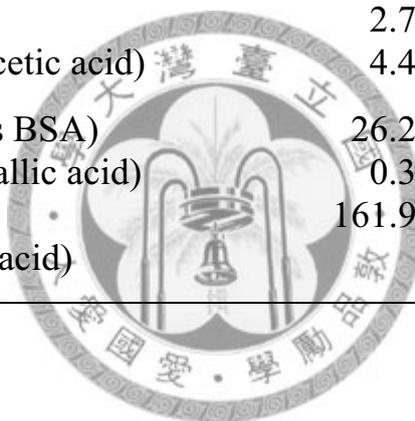
#### 3. 可溶性固形物、pH 值及可滴定酸度

浸漬梅醋的可溶性固形物含量為 6.12°Brix，高於商業糯米醋之 3.57°Brix。pH 值為 2.75，與商業糯米醋相同。可滴定酸度以醋酸計為 4.44%，商業糯米醋之可滴定酸度則為 4.5%，但以 SAS 軟體進行

表二、浸漬梅醋原液之理化特性

Table 2. Physico-chemical characteristics of original mei vinegars

項目	平均分析值
L*	91.45± 0.61
a*	1.19± 0.21
b*	13.14± 0.87
Chroma	13.19± 0.88
Hue	84.84± 0.56
Turbidity (NTU)	46.77± 3.61
Soluble solids (°Brix)	6.12± 0.13
pH value	2.75± 0.04
Titratible acid (% as acetic acid)	4.44± 0.27
Soluble protein (g/L as BSA)	26.28± 1.78
Total phenol (g/L as gallic acid)	0.36± 0.02
Soluble pectin (mg/L as galacturonic acid)	161.97±12.16



差異性分析之分析結果顯示兩者沒有差異。

#### 4. 水溶性蛋白質、總酚及水溶性果膠

利用 Coomassie blue method 測量浸漬梅醋中水溶性蛋白質含量時，會因為其中含有的大量有機酸而造成嚴重干擾。此法是利用 Coomassie brilliant blue 試劑在接近中性或弱鹼性的環境下，會與蛋白質反應而呈色，再測定 595nm 下之吸光值而得知蛋白質濃度。在蘋果汁、橫山梨汁、新興梨汁與新世紀梨汁中，添加樣品一半體積之 0.1N NaOH 溶液即可使待測溶液形成中性或弱鹼性之 pH 值而進行測定(曾，2000；戴，2006；盧，2006)，但在浸漬梅醋中添加相同濃度之 NaOH 溶液後，待測溶液仍為 pH 3-4 的酸性環境，而使試劑無法與蛋白質反應呈色。若將添加之 NaOH 溶液濃度提高為 1N，待測溶液會形成 pH 值大於 12 之強鹼性環境，亦使試劑無法與蛋白質反應呈色。

利用螢光衍生試劑鄰本二甲醛(o-phthalaldehyde, OPA)會與胺基酸、多肽、蛋白質、胺等物質發生化學反應，形成螢光衍生物，即可藉由偵測激發光 330-390nm/放射光 436-745nm 之螢光值，得知蛋白質濃度。本試驗所使用之試劑為 Fluoraldehyde™ Reagent Solution，內含 0.8mg/mL 之 OPA，其可偵測之蛋白質濃度範圍為 10-500 $\mu$ g/mL。此法不受還原劑及金屬離子之干擾，且因偵測螢光，因此理論上亦不會受到樣品本身顏色之干擾，但樣品緩衝液若含一級胺(primary amine，例如 glycine)則會影響數值之準確性(莊，2006)。將 BSA 溶解於 4.5%醋酸溶液，配製成含大量醋酸之已知濃度蛋白質溶液後，以此法測定蛋白質含量，其測定值與實際值沒有顯著差異(數據未列出)，顯示此法亦不受大量有機酸之干擾。浸漬梅醋稀釋之可偵測範

圍後利用螢光法進行測量，再換算回原液之水溶性蛋白質含量為 26.28g/L，此數值遠高於梅子的 7g/kg (表一)和商業糯米醋的 1g/L，可能還需要進一步設計試驗判斷浸漬梅醋中是否有大量一級胺存在而造成干擾。

浸漬梅醋中總酚與水溶性果膠含量分別為 0.36g/L 與 161.97mg/L，此二種成分在商業糯米醋中皆沒有被檢測到，故推測是浸漬期間來自於梅子的抽提物。

## 二、商業糯米醋與浸漬梅醋中潛在生成混濁之水溶性成分之定性與定量試驗

### 1. 商業糯米醋與浸漬梅醋中潛在生成混濁之水溶性成分的定性試驗

浸漬梅醋的 pH 值與可溶性固形物含量都較一般果汁飲料為低，且含有大量醋酸，一般微生物在此條件下生長均會受到抑制，因此初步排除微生物繁殖造成混濁現象之可能性。由於各樣品中之不溶性粒子之含量不一定相同，故樣品先以 0.45 $\mu$ m 濾膜進行抽氣過濾之前處理，移除不溶性粒子，再進行後續試驗偵測各項潛在生成混濁之水溶性成分。

表三中顯示商業糯米醋與浸漬梅醋中潛在生成混濁成分之定性試驗的結果。兩者的 iodine test 與 metals-ferrocyanide test 之結果均呈現陰性反應，顯示在商業糯米醋與浸漬梅醋中皆沒澱粉、糊精和金屬離子的存在。在商業糯米醋中，alcohol test 呈現陰性反應，但在浸漬梅醋中則為陽性反應。商業糯米醋的 gelatin test 結果呈現陰性，浸漬梅醋在 gelatin test 前後混濁度僅上升 8.00NTU (數據未列出)，未達到上升 10NTU 之標準(Hsu and Heatherbell, 1987; Siebert and Lynn, 1997)，因此判斷浸漬梅醋中起霧性多酚物質僅有少量存在。商業糯

表三、浸漬梅醋與商業糯米醋生成混濁之水溶性成分之定性試驗  
 Table 3. Qualitative analysis of haze formation by substances in mei vinegars and commercial rice vinegars

項目	浸漬梅醋	商業糯米醋
	定性反應	
澱粉與糊精 Iodine test	—	—
水溶性果膠 Alcohol test	+	—
起霧性多酚物質 Gelatin test	trace	—
起霧性蛋白質 Tannic acid test	+	+
金屬離子 Metals-ferrocyanide test	—	—

＋：陽性反應    —：陰性反應



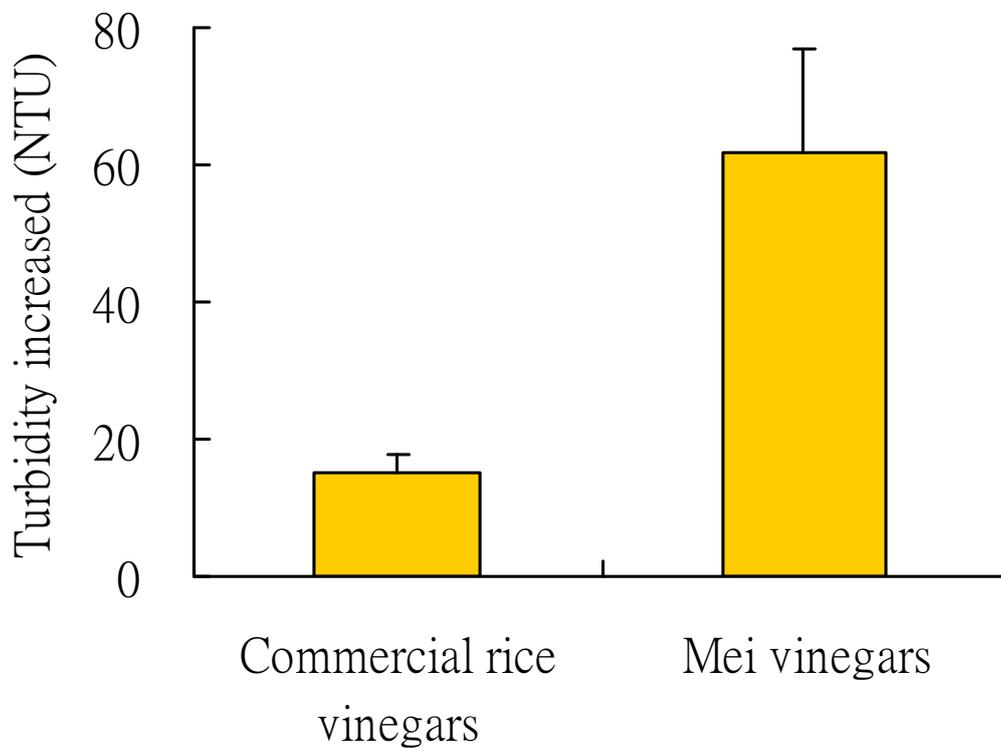
米醋與浸漬梅醋的 tannic acid test 結果皆為陽性反應，顯示兩者皆含有起霧性蛋白質。

Siebert and Lynn (1997)提出並非所有蛋白質與所有多酚物質都會互相作用生成混濁和沉澱物，因此測量水溶性蛋白質與總酚的含量並不能代表溶液中起霧性蛋白質與起霧性多酚物質的含量。起霧性蛋白質與起霧性多酚物質會分別與富含氫氧基的多酚物質以及富含疏水性基團的蛋白質作用而生成混濁，使混濁度上升。利用此項性質，外加單寧酸或明膠，使其與樣品中的起霧性蛋白質與起霧性多酚物質反應，並以反應前後之混濁度增加值(反應後混濁度-反應前混濁度)來表示起霧性蛋白質或起霧性多酚物質之含量，混濁度增加值越高即表示樣品中起霧性蛋白質或起霧性多酚物質之含量越高。

商業糯米醋與浸漬梅醋在 tannic acid test 後混濁度增加值分別為 15.31NTU 與 61.93NTU (圖八)，顯示浸漬梅醋的起霧性蛋白質含量約為商業糯米醋的 4 倍，並依此現象推測浸漬梅醋中的起霧性蛋白質大部分來自梅子抽提物，而有少部分來自於商業糯米醋。

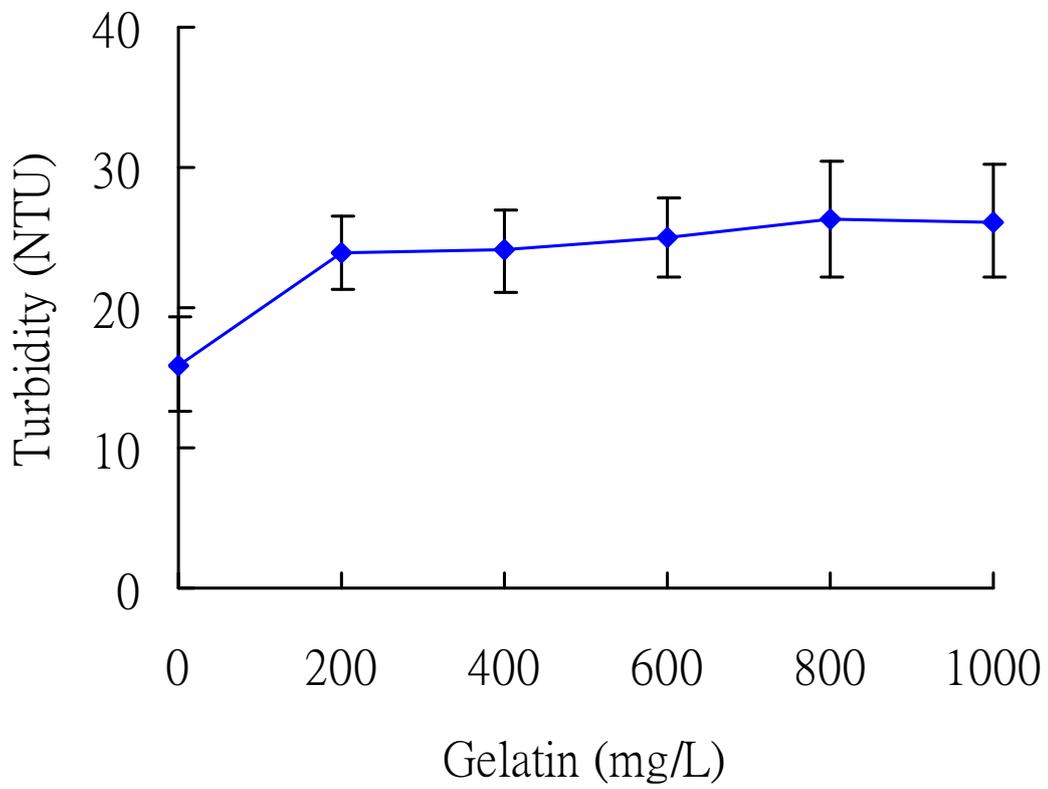
## 2. 浸漬梅醋中起霧性蛋白質與起霧性多酚含量之測定

Siebert 等學者(1996)曾提出當起霧性蛋白質與起霧性多酚在濃度相近時，會形成網狀結構之蛋白質-多酚複合物大分子，會使樣品溶液的混濁度增加值有最大值，若蛋白質濃度遠高於多酚或相反時，則形成許多的蛋白質-多酚寡體(protein-polyphenol oligomer)，而不會產生網狀結構(圖一)，此時樣品溶液的混濁度增加值反而會低於兩者濃度相近之溶液(Siebert *et al.*, 1996; Siebert, 1999; 黃, 2000)分別在浸漬梅醋中添加不同濃度之單寧酸和明膠試劑來測定起霧性蛋白質與起霧性多酚物質之含量。圖九中可以觀察到明膠添加量為 800mg/L 時

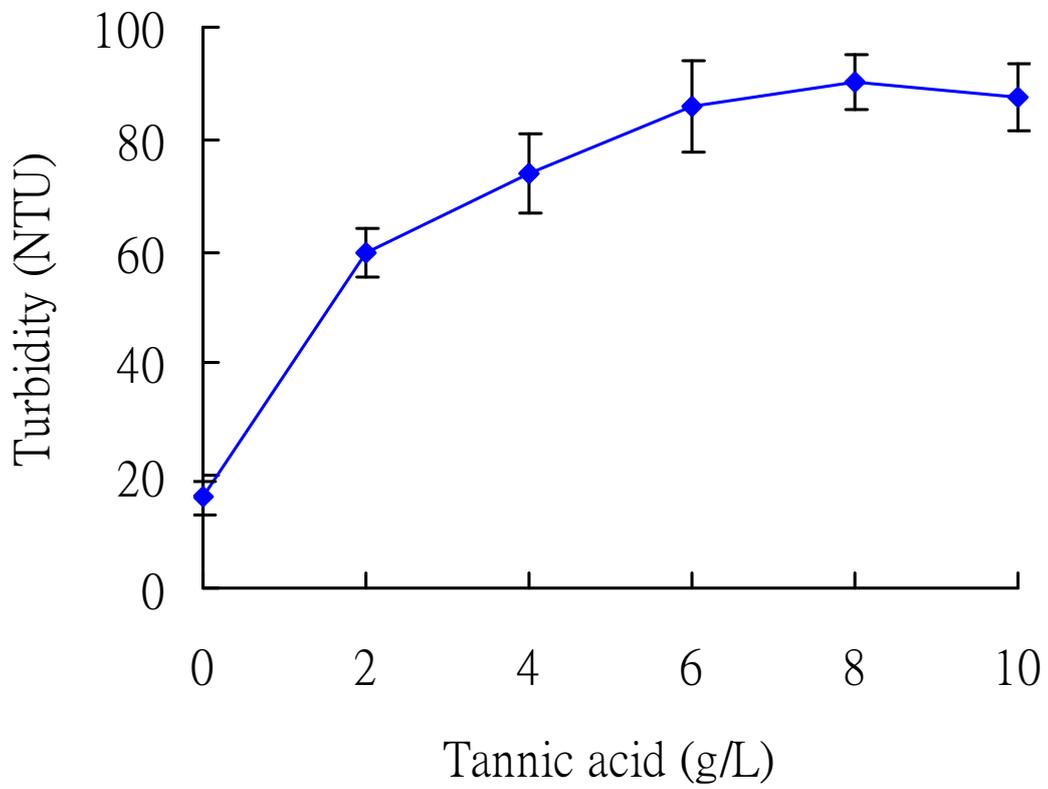


圖八、以 tannic acid test 引起之混濁度增加值表示商業糯米醋與浸漬梅醋起霧性蛋白質含量之比較

Fig. 8. The haze-active (HA) protein content of commercial rice vinegars and mei vinegars represented by turbidity increased after tannic acid test



圖九、不同劑量明膠處理對浸漬梅醋混濁度變化之影響  
Fig. 9. Effect of gelatin addition on the turbidity of mei vinegars



圖十、不同劑量單寧酸處理對浸漬梅醋混濁度變化之影響

Fig. 10. Effect of tannic acid addition on the turbidity of mei vinegars

樣品溶液之混濁度增加值有最大值，但明膠添加量在 200-1000mg/L 之間溶液混濁度增加值之差異並不顯著，故推測浸漬梅醋中僅有少量起霧性多酚存在。單寧酸添加量為 8g/L 時樣品溶液之混濁度增加值有最大值(圖十)。試驗結果顯示浸漬梅醋中含有大量的起霧性蛋白質，且其含量遠多於起霧性多酚物質。

### 三、不同過濾方法對浸漬梅醋裝瓶後在室溫儲存 16 週間理化特性、起霧性蛋白質與起霧性多酚含量之影響

浸漬梅醋經過 US 325mesh 篩網過濾(網孔直徑 = 0.0044mm)之後，粒徑大於網孔直徑之粒子會被分離移除。但粒徑小於 0.0044mm 之細小粒子仍會存在於濾液中，這些粒子在儲存期間仍可能會因為重力沉降而導致沉澱之發生。另外浸漬梅醋中亦含有之水溶性果膠，於裝瓶後可能會與蛋白質因電性互相吸引、凝聚進而引起再混濁現象，這些物質都需進一步過濾或以其他處理移除之。

添加 25 $\mu$ L/kg 之果膠酵素(Pectinase<sup>®</sup> 5XL)於浸漬梅醋原液中，在室溫下作用 50 分鐘使酵素作用，再轉置於 4<sup>o</sup>C 下絮凝 16 小時，然後依序以 US 200mesh 和 US 325mesh 的篩網過濾即得到「浸漬梅醋」(sieve filtrated mei vinegars, SF)。測量浸漬梅醋的水溶性果膠含量，結果顯示浸漬梅醋中的果膠物質已被完全分解。取上述之浸漬梅醋以酸洗矽藻土進行減壓過濾，得到之濾液即為「矽藻土過濾梅醋」(diatomaceous earth filtrated mei vinegars, DF)。另取一部份浸漬梅醋以 100k MWCO 的中空纖維膜管進行加壓過濾，得到的濾液即為「超過濾梅醋」(Ultra filtrated mei vinegars, UF)。上述三種方法過濾之梅醋分裝於 300mL 之透明玻璃瓶，再以金屬蓋封瓶，於常溫下進行儲存試驗。

## 1. 色澤變化

矽藻土過濾梅醋外觀上為明亮的琥珀色(amber)液體。比較過濾前後 Hunter 各項數值，L 值 91.45 由提高為 94.42，a 值與 b 值分別由 1.19 與 13.14 降低為 0.12 與 9.44，C 值由 13.19 降低為 9.37，Hue 值則由 84.84 變為 89.45，顯示矽藻土過濾前後梅醋之色澤特性有顯著差異(表四)。

浸漬梅醋以 100k MWCO 的中空纖維膜管進行超過濾時，會有類似脫色之現象發生，得到之濾液外觀上會呈現近似無色的透明液體，與一般消費者認知中梅醋產品應有之黃色至深褐色有極大差異，故未繼續以超過濾梅醋進行後述之各項試驗。初步推測浸漬梅醋中大部分呈色物質無法通過 100k MWCO 濾膜是造成超過濾梅醋產生脫色現象之可能原因，但仍須進一步設計試驗證實之。

## 2. 混濁度

浸漬梅醋以酸洗矽藻土抽氣過濾後，混濁度會由 46.77NTU 降低為 0.49NTU，外觀上呈現透明之澄清液體，顯示原來懸浮於梅醋中之不溶性細小粒子均被分離移除。

浸漬梅醋裝瓶後於室溫儲存期間混濁度有緩慢上升之趨勢，經過 16 週儲存後可以觀察到其混濁度由 46.77NTU 增加為 60.70NTU (圖十一)，且在儲存 1-2 週後即可觀察到有沉澱物沉降在玻璃瓶底部。儲存 16 週後玻璃瓶底部可以觀察到明顯之深褐色沉澱物。試驗結果顯示以 200 與 325mesh 篩網過濾的方式無法有效移除梅醋中的不溶性細小粒子，梅醋飲料在裝瓶後產生混濁不穩定之現象。

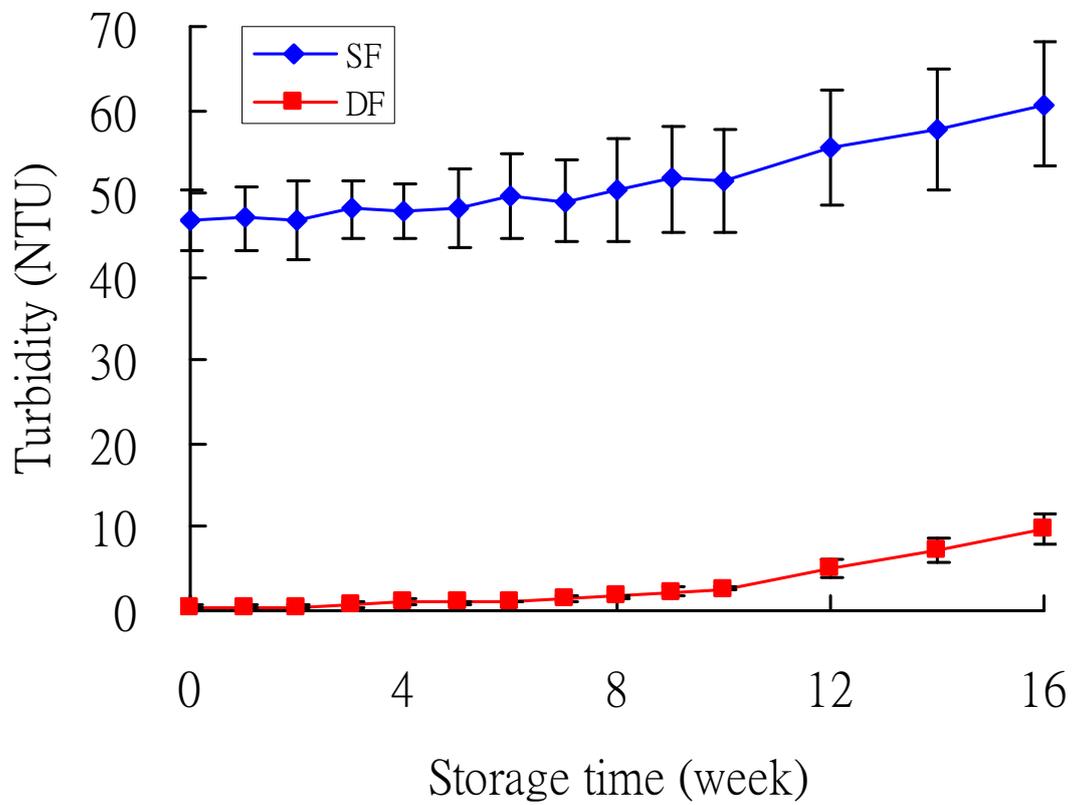
圖十一中可以觀察到矽藻土過濾梅醋裝瓶後於室溫儲存期間混濁度亦有緩慢上升之趨勢，經過 16 週儲存後其混濁度由 0.49NTU 增

表四、矽藻土過濾前後梅醋理化特性之變化

Table 4. Physico-chemical characteristics of mei vinegars (SF) and diatomaceous earth filtered mei vinegars (DF)

	SF	DF
L*	91.45±0.61 <sup>a</sup>	94.42±0.27 <sup>b</sup>
a*	1.19±0.21 <sup>a</sup>	0.12±0.05 <sup>b</sup>
b*	13.14±0.87 <sup>a</sup>	9.44±0.28 <sup>b</sup>
Chroma	13.19±0.88 <sup>a</sup>	9.37±0.18 <sup>b</sup>
Hue	84.84±0.56 <sup>a</sup>	89.45±0.15 <sup>b</sup>
Turbidity (NTU)	46.77±3.61 <sup>a</sup>	0.49±0.06 <sup>b</sup>
Soluble solids (°Brix)	6.12±0.13 <sup>a</sup>	6.02±0.03 <sup>a</sup>
pH value	2.75±0.04 <sup>a</sup>	2.75±0.03 <sup>a</sup>
Titratible acid (% as acetic acid)	4.44±0.27 <sup>a</sup>	4.36±0.03 <sup>a</sup>
Soluble protein (g/L as BSA)	26.28±1.78 <sup>a</sup>	25.12±1.96 <sup>a</sup>
Total phenol (g/L as gallic acid)	0.40±0.01 <sup>a</sup>	0.36±0.03 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup> Different superscripts among means of the same row indicate significantly different at 5% level.



圖十一、矽藻土過濾對梅醋在室溫儲存 16 週間混濁度之影響

Fig. 11. The turbidity of mei vinegars (SF) and diatomaceous earth filtered mei vinegars (DF) stored at room temperature for 16 weeks

加為 9.86NTU。矽藻土過濾梅醋在儲存前 6 週混濁度並沒有顯著之增加，儲存 6 週後其混濁度為 1.21NTU，外觀仍為透明澄清之液體，10 週以後混濁度上升之現象漸趨明顯，且儲存 16 週後仍有持續上升之可能。儲存第 16 週之梅醋已可由肉眼觀察到溶液發生混濁，並可以在玻璃瓶底部觀察到有少量沉澱物。試驗結果顯示矽藻土過濾梅醋在裝瓶後會發生二次混濁(post-bottling haze)之現象，需要搭配其他澄清處理才能達到維持飲料混濁穩定性之目的。

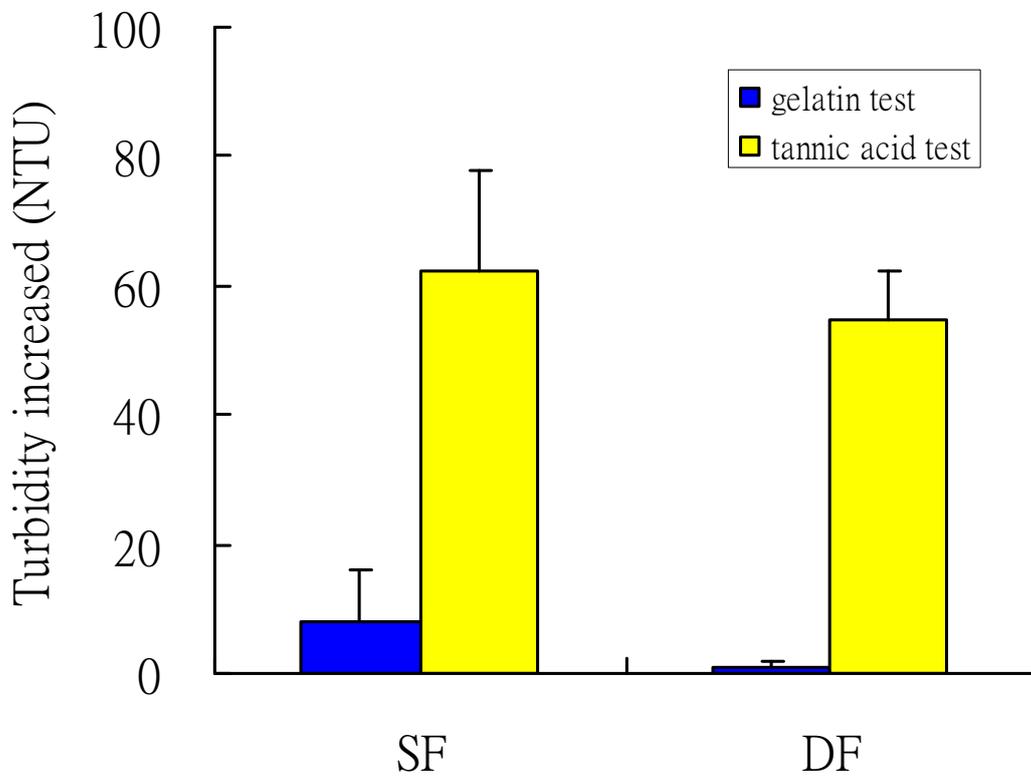
### 3. 水溶性蛋白質與總酚

矽藻土過濾後梅醋的總酚含量會由 0.40g/L 降低為 0.36g/L，水溶性蛋白質含量會由 26.28g/L 降低為 25.12g/L (表四)，顯示梅醋利用矽藻土過濾後僅有少量蛋白質、多酚等膠體物質會被移除，大部分膠體物質仍會存在於濾液中。由於水溶性蛋白質與多酚之含量並不能完全代表起霧性蛋白質與起霧性多酚之含量，故在後續試驗中改以測量 tannic acid test 與 gelatin test 引起之混濁度增加值來評估起霧性蛋白質與起霧性多酚之含量(Siebert and Lynn, 1997)。

### 4. 起霧性多酚與起霧性蛋白質

矽藻土過濾後 gelatin test 引起之混濁度增加值會由 8.00NTU 降低為 0.85NTU，tannic acid test 引起之混濁度增加值則由 62.07NTU 降低為 54.61NTU (圖十二)，顯示梅醋經過矽藻土過濾後仍有大量之起霧性蛋白質存在，而起霧性多酚之含量極微。

梅醋以篩網過濾與矽藻土過濾、裝瓶後於室溫儲存期間可以觀察 16 週後其 tannic acid test 引起之混濁度增加值分別由 64.40NTU 與 51.34NTU 降低為 31.10NTU 與 19.84NTU (圖十三)，顯示梅醋中起霧性蛋白質含量隨著儲存時間增加而逐漸下降。以 SAS 軟體進行「混



圖十二、以 tannic acid test 和 gelatin test 引起之混濁度增加值表示矽藻土過濾對梅醋起霧性蛋白質與起霧性多酚含量之影響

Fig. 12. Effect of diatomaceous earth filtration (DF) on the haze-active (HA) protein and HA polyphenol content of mei vinegars represented by turbidity increased after tannic acid test and gelatin test

濁度」與「tannic acid test 引起之混濁度增加值」兩項變數之相關性分析，結果顯示在篩網過濾與矽藻土過濾梅醋中「混濁度」與「tannic acid test 引起之混濁度增加值」兩項變數之相關係數分別為-0.9451 與 -0.8249，皆為高度負相關(表五)，故推測在篩網過濾梅醋與矽藻土過濾梅醋中，起霧性蛋白質皆是導致室溫儲存期間混濁度上升之主要因子。許多研究報告中指出在未經過熱處理的飲料中，蛋白質需要與水溶性果膠因電性互相吸引或與起霧性多酚結合形成大分子結構後才會在飲料中引起混濁生成之現象(Hagerman and Butler, 1981; Kilara, 1982; Asquith and Butler, 1986; Ricardo-de-Silva *et al.*, 1991; Beveridge and Tait, 1993; Lehtonen, 1996; Carle, 1998; Siebert, 1999; Wu and Siebert, 2002)。浸漬梅醋以果膠酵素處理後果膠物質已被完全分解，再經過酸洗矽藻土過濾後，大部分的起霧性多酚也已經被移除，因此在儲存試驗前預期裝瓶後之梅醋飲料不會發生二次混濁現象，但試驗結果並未符合預期。

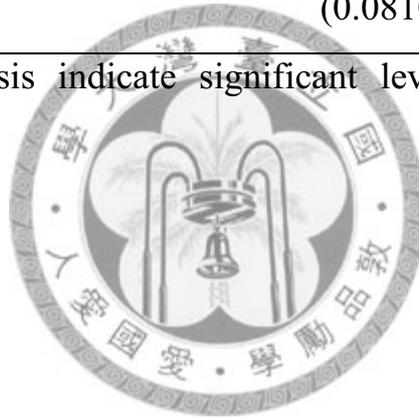
圖十四中可以觀察到篩網過濾梅醋裝瓶於室溫儲存期間 gelatin test 引起之混濁度增加值呈現下降之趨勢，儲存 16 週後其混濁度增加值由 4.73NTU 降低為 1.10NTU，而矽藻土過濾梅醋中 gelatin test 引起之混濁度增加值在室溫儲存期間並沒有顯著差異，其混濁度增加值儲存 16 週前後分別為 0.87NTU 與 0.48NTU。以 SAS 軟體進行「混濁度」與「gelatin test 引起之混濁度增加值」兩項變數之相關性分析，結果顯示篩網過濾與矽藻土過濾梅醋中兩項變數之相關係數分別為 -0.4819 與 0.0312，故推測起霧性多酚並非導致梅醋在儲存期間混濁度上升之主要因子，矽藻土過濾梅醋中起霧性多酚含量之變化與儲存期間混濁度之變化沒有相關。

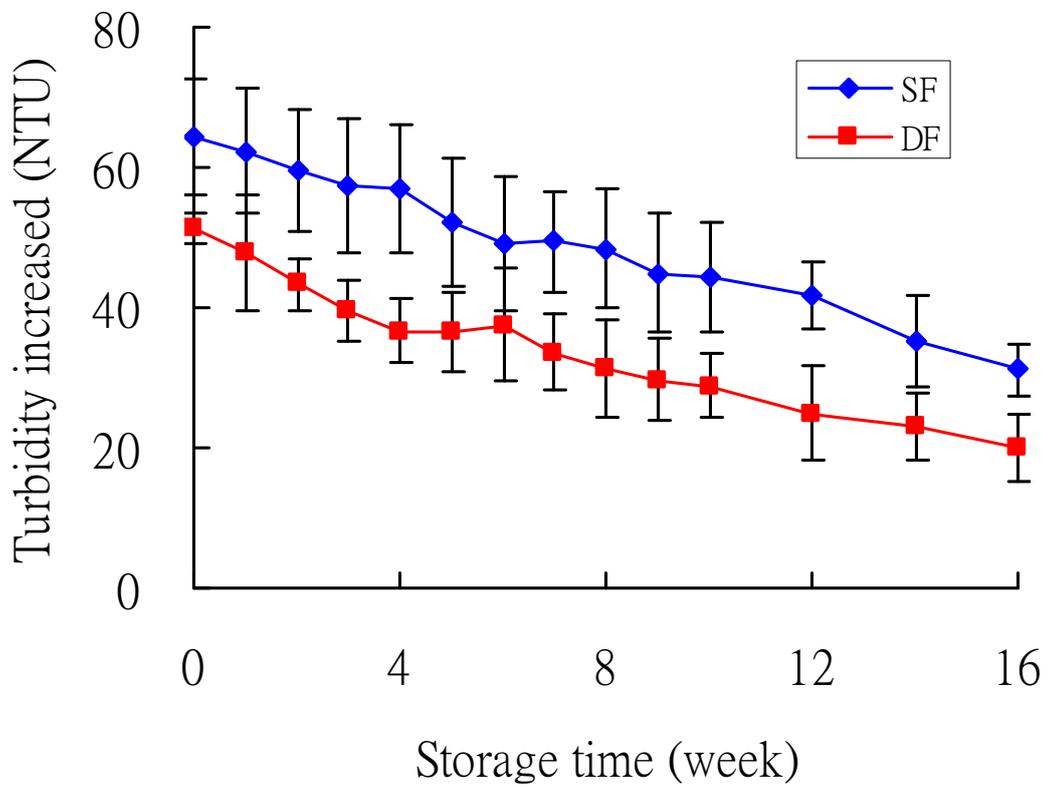
表五、浸漬梅醋與矽藻土過濾梅醋之混濁度與 tannic acid test 及 gelatin test 引起之混濁度增加值的相關性分析

Table 5. Correlation coefficients of the turbidity, turbidity increased after tannic acid test and gelatin test of mei vinegars (SF) and diatomaceous earth filtered mei vinegars (DF)

項目	SF	DF
	混濁度	
Tannic acid test 引起之混濁度增加值	-0.9451 (0.0001)*	-0.8249 (0.0003)
Gelatin test 引起之混濁度增加值	-0.4819 (0.0810)	0.0312 (0.9157)

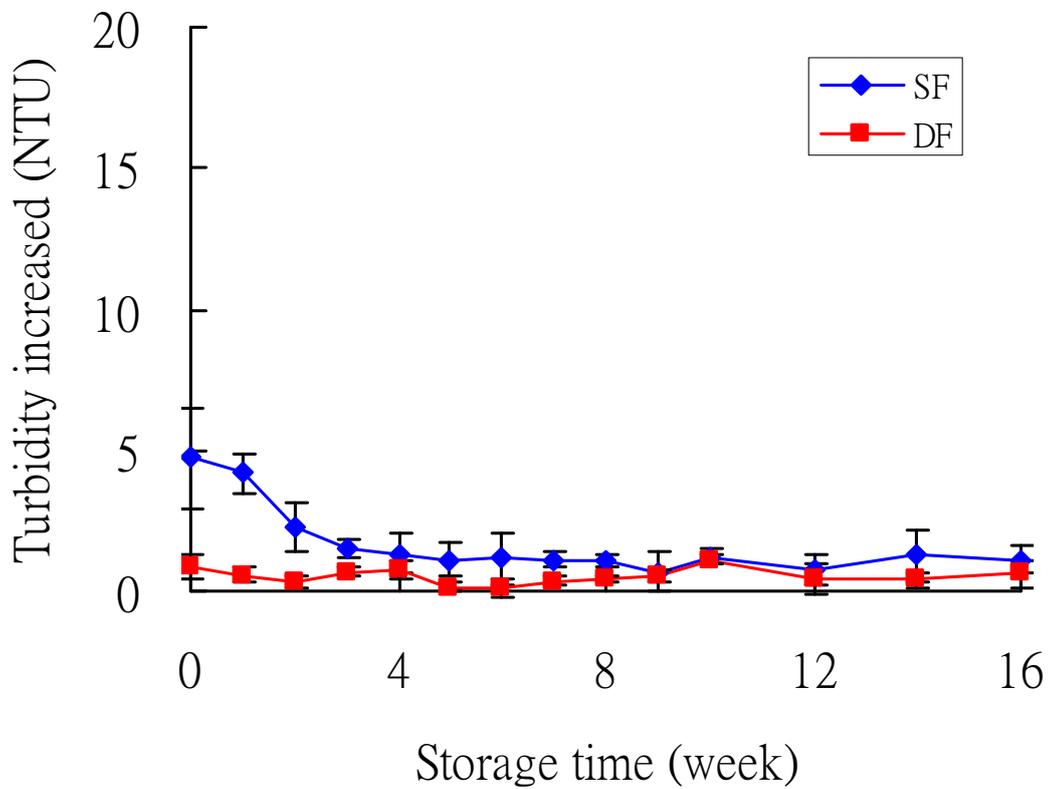
\*Figures in parenthesis indicate significant levels of the correlation coefficients.





圖十三、以 tannic acid test 引起之混濁度增加值表示矽藻土過濾對梅醋在室溫儲存 16 週間起霧性蛋白質含量之影響

Fig. 13. The haze-active protein content of mei vinegars (SF) and diatomaceous earth filtered mei vinegars (DF) stored at room temperature for 16 weeks represented by turbidity increased after tannic acid test



圖十四、以 gelatin test 引起之混濁度增加值表示矽藻土過濾對梅醋在室溫儲存 16 週間起霧性多酚含量之影響

Fig. 14. The haze-active polyphenol content of mei vinegars (SF) and diatomaceous earth filtered mei vinegars (DF) stored at room temperature for 16 weeks represented by turbidity increased after gelatin test

## 5. 可溶性固形物、pH 值及可滴定酸度

矽藻土過濾後梅醋的 pH 值沒有改變，可溶性固形物含量與可滴定酸度則分別由 6.12°Brix 與 4.44% 略微降低至 6.02°Brix 與 4.36% (表四)，但差異並不顯著。圖十五與十六中顯示，無論有無經過矽藻土過濾，在室溫儲存 16 週間梅醋之可溶性固形物含量與 pH 值都沒有顯著差異。

## 四、矽藻土過濾梅醋澄清處理條件之釐定

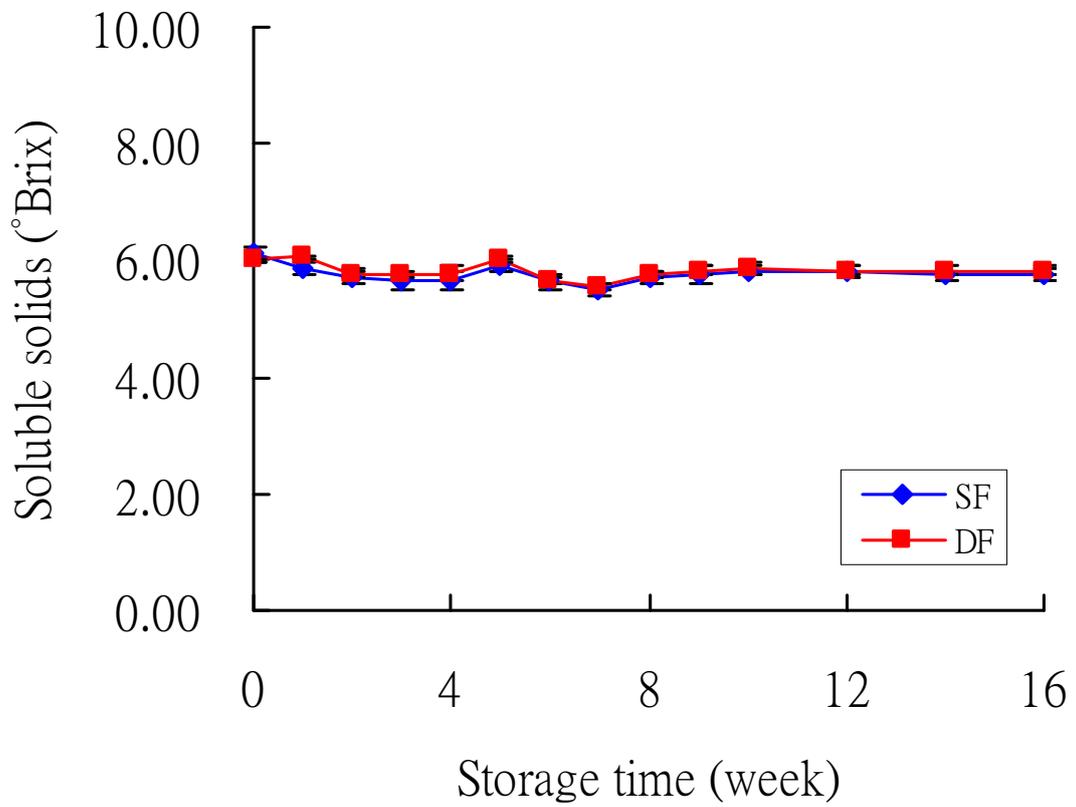
上述試驗結果顯示起霧性蛋白質應為導致矽藻土過濾梅醋在裝瓶儲存期間發生二次混濁現象的主要因子，因此選擇飲料澄清加工上常用之皂土與矽膠做為蛋白質吸附劑來進行澄清處理之試驗。

### 1. 皂土處理

圖十七中顯示添加 2.5、5.0、10.0g/L 皂土進行澄清處理後，tannic acid test 引起之混濁度增加值皆降低至 1NTU 以下，顯示皂土能有效吸附梅醋中的起霧性蛋白質。由於添加過量皂土可能會釋出微量的金屬離子使飲料中帶有土味(杜，1992)，因此選擇 2.5g/L 做為後續儲存試驗中澄清劑的添加劑量。

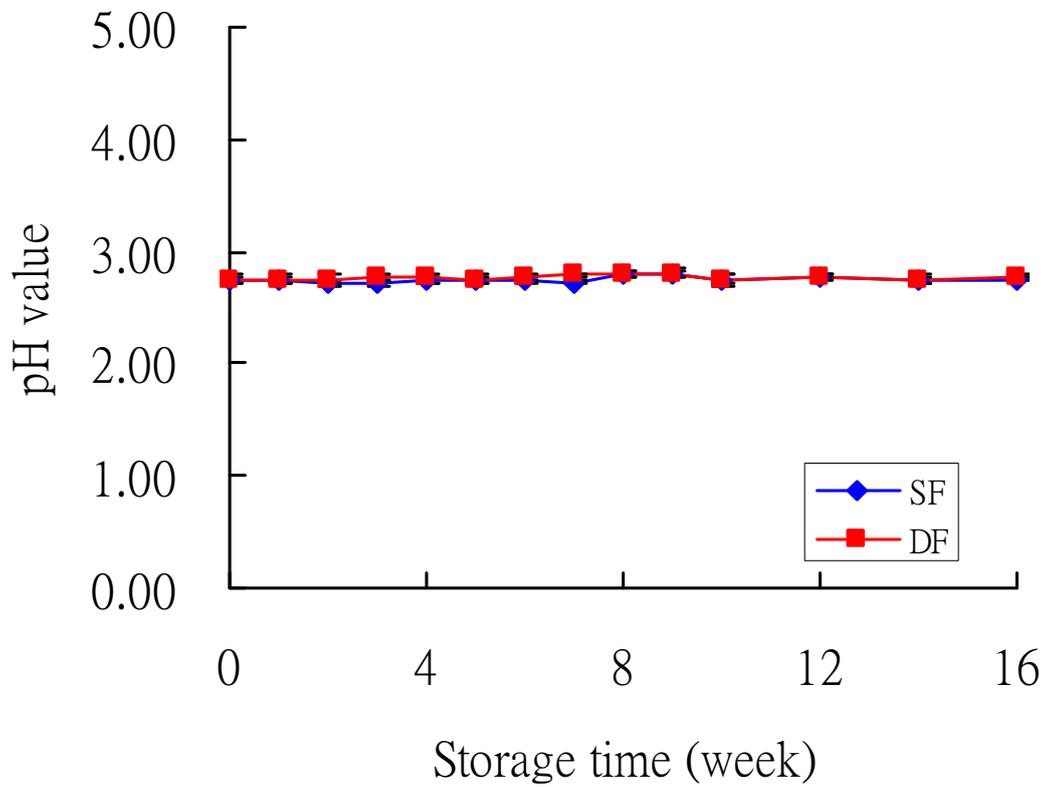
### 2. 矽膠處理

Siebert and Lynn (1997b)指出，在啤酒等起霧性蛋白質濃度高於起霧性多酚之飲料中，利用矽膠進行澄清處理可以移除約 80%之起霧性蛋白質，但圖十七中可以觀察到添加 2.5、5.0、10.0g/L 矽膠進行澄清的效果最佳，混濁度增加值僅由 47.10NTU 降低至 26.63NTU，矽膠添加量提高添加至 5.0 和 10.0g/L 之澄清效果與添加 2.5g/L 時沒有



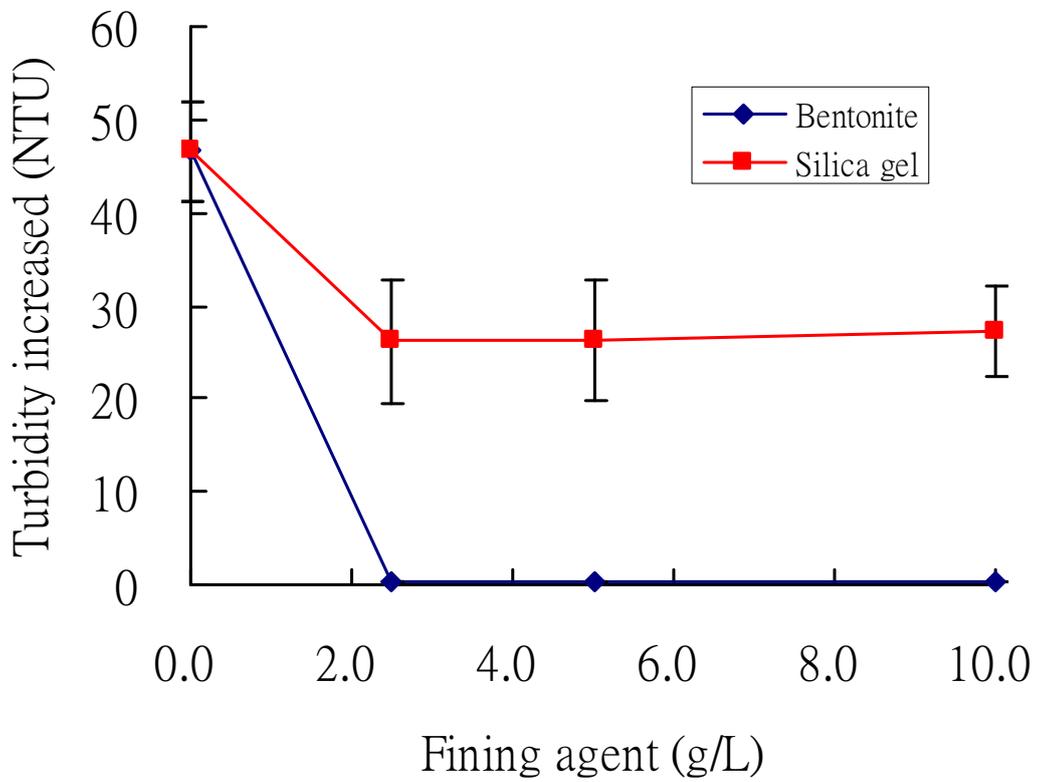
圖十五、矽藻土過濾對梅醋在室溫儲存 16 週間可溶性固形物含量之影響

Fig. 15. The soluble solid content of mei vinegars (SF) and diatomaceous earth filtered mei vinegars (DF) stored at room temperature for 16 weeks



圖十六、矽藻土過濾對梅醋在室溫儲存 16 週間 pH 值之影響

Fig. 16. The pH value of mei vinegars (SF) and diatomaceous earth filtered mei vinegars (DF) stored at room temperature for 16 weeks



圖十七、以 tannic acid test 引起之混濁度增加值表示不同劑量皂土與矽膠處理對矽藻土過濾梅醋起霧性蛋白質含量之影響

Fig. 17. Effect of bentonite and silica gel treatment on the HA protein content of diatomaceous earth filtrated mei vinegars represented by turbidity increased after tannic acid test

顯著差異，顯示矽膠處理僅能移除梅醋中約 45% 之起霧性蛋白質。此結果不同於預期，反而與矽膠在蘋果汁等起霧性多酚濃度高於起霧性蛋白質之飲料中的澄清效果較為相近(Siebert and Lynn, 1997c)。矽膠吸附起霧性蛋白質之原理為利用其表面的氫氧基與蛋白質羰基之氧原子以氫鍵結合，或是與 proline 與 hydroxyproline 等胺基酸上的疏水區產生疏水性的結合，類似於起霧性多酚與起霧性蛋白質之結合，因此在樣品溶液中矽膠會與起霧性多酚競爭起霧性蛋白質上之結合區，因此起霧性多酚含量會影響矽膠吸附蛋白質之能力。

將本試驗之材料方法與相關研究報告進行比較後發現，相關研究中多以蘋果、梨等水果進行榨汁後得到之新鮮果汁為試驗材料，並於榨汁後短時間內即進行後續之試驗步驟，因此在進行試驗時，樣品中的起霧性多酚與起霧性蛋白質分別來自不同部位之果肉組織中，共同存在於果汁中的時間極短，兩種物質多為單獨存在，僅有極少部分可能形成蛋白質-多酚複合物。而在本試驗中起霧性多酚與起霧性蛋白質自梅子中被抽出後，由於浸漬時間長達 4 個月以上，使兩種物質在有足夠反應時間在醋液中結合，因此推測本試驗之浸漬梅醋原液中起霧性多酚大多是以蛋白質-多酚複合物存在，並且因為起霧性蛋白質含量較多，使得起霧性多酚上的結合區多已形成鍵結，所以 gelatin test 引起之樣品混濁度增加值極少，起霧性蛋白質則有相當數量之結合區未形成鍵結，故能以 tannic acid test 偵測其存在於樣品中。利用矽藻土過濾只有將已形成大分子結構之蛋白質-多酚複合物移除，仍有許多小分子結構之蛋白質-多酚複合物存在於樣品中，在裝瓶後儲存期間持續進行反應，緩慢凝聚成大分子結構，並在儲存一段時間之後引起成二次混濁現象。另一方面，因為部分起霧性蛋白質上的結合區已有與起霧性多酚鍵結，因此矽膠只能游離之起霧性蛋白質反應，而對

蛋白質-多酚複合物的吸附效果甚微，此結果間接驗證了「在浸漬期間梅醋中之起霧性多酚已經與起霧性蛋白質結合，而以蛋白質-多酚複合物之形式存在於梅醋中」之假設。

## 五、不同澄清處理對矽藻土過濾梅醋裝瓶後在室溫儲存 16 週間理化特性、起霧性蛋白質與多酚含量之影響

根據前述試驗結果，取果膠酵素處理後之梅醋分別以 2.5g/L 之皂土(bentonite)與矽膠(silica gel)進行澄清處理，再以酸洗矽藻土抽氣過濾後裝瓶於室溫下進行儲存試驗。

### 1. 色澤變化

杜(1992)指出皂土處理可能會吸附一部份色素而使飲料的色澤發生變化。本試驗中矽藻土過濾梅醋經過皂土處理後外觀上會琥珀色變為類似商業糯米醋之黃色。表六中可以觀察到矽藻土過濾梅醋經過矽膠處理後，L 值由 94.42 提高為 96.07，a 值與 b 值分別由 0.12 與 9.44 降低為-0.39 與 7.62，C 值由 9.37 降低為 7.50，Hue 值則由 89.45 變為 92.54，以 SAS 軟體進行差異性分析之結果顯示皂土處理-矽藻土過濾梅醋與未經澄清處理之矽藻土過濾梅醋的色澤有顯著差異。而矽膠處理-矽藻土過濾梅醋的 Hue 值有顯著變化、L 值僅有輕微變化，a 值、b 值和 C 值則沒有顯著變化。表七中顯示皂土處理-矽藻土過濾梅醋與矽膠處理-矽藻土過濾梅醋在室溫儲存 16 週後都會發生輕微之褐變現象。

### 2. 混濁度

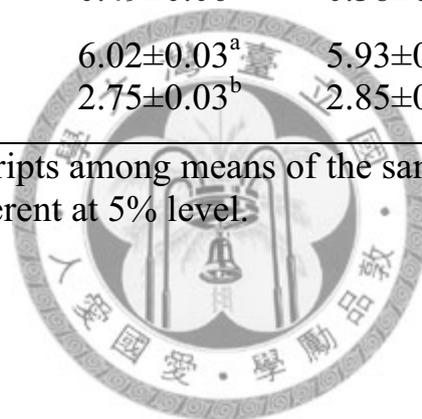
皂土處理-矽藻土過濾梅醋與矽膠處理-矽藻土過濾梅醋之混濁

表六、皂土與矽膠處理對矽藻土過濾梅醋理化特性之影響

Table 6. Effect of bentonite treatment (B-DF), silica gel treatment (S-DF), and non-fingnig treatment (DF) on the Physico-chemical characteristics of diatomaceous earth filtrated mei vinegars

	DF	B-DF	S-DF
L*	94.42±0.27 <sup>b</sup>	96.07±0.65 <sup>a</sup>	95.31±0.46 <sup>ab</sup>
a*	0.12±0.05 <sup>a</sup>	-0.39±0.04 <sup>b</sup>	-0.07±0.07 <sup>a</sup>
b*	9.44±0.28 <sup>a</sup>	7.62±0.04 <sup>b</sup>	8.63±0.19 <sup>a</sup>
Chroma	9.37±0.18 <sup>a</sup>	7.50±0.11 <sup>b</sup>	8.61±0.23 <sup>a</sup>
Hue	89.45±0.15 <sup>c</sup>	92.54±0.23 <sup>a</sup>	90.89±0.23 <sup>b</sup>
Turbidity (NTU)	0.49±0.06 <sup>a</sup>	0.38±0.08 <sup>a</sup>	0.32±0.06 <sup>a</sup>
Soluble Solids (°Brix)	6.02±0.03 <sup>a</sup>	5.93±0.33 <sup>a</sup>	6.02±0.10 <sup>a</sup>
pH value	2.75±0.03 <sup>b</sup>	2.85±0.02 <sup>a</sup>	2.85±0.02 <sup>a</sup>

<sup>a,b,c</sup> Different superscripts among means of the same row indicate significantly different at 5% level.



表七、皂土與矽膠處理對矽藻土過濾梅醋在室溫儲存 16 週後色澤特性之影響

Table 7. Effects of bentonite treatment (B-DF), silica gel treatment (S-DF), and non-fingnig treatment (DF) on color-characteristics of diatomaceous earth filtrated mei vinegars stored at room temperature after 16 weeks

Color measurement	Treatment	Initial	After 16 week
L*	DF	94.42±0.27 <sup>a</sup> <sub>y</sub>	93.94±0.43 <sup>a</sup> <sub>y</sub>
	B-DF	96.07±0.65 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	94.97±0.07 <sup>b</sup> <sub>x</sub>
	S-DF	95.31±0.46 <sup>a</sup> <sub>xy</sub>	94.32±0.26 <sup>b</sup> <sub>y</sub>
a*	DF	0.12±0.05 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	0.54±0.32 <sup>a</sup> <sub>x</sub>
	B-DF	-0.39±0.04 <sup>a</sup> <sub>y</sub>	-0.21±0.04 <sup>b</sup> <sub>y</sub>
	S-DF	-0.07±0.07 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	0.24±0.14 <sup>b</sup> <sub>x</sub>
b*	DF	9.44±0.28 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	10.48±0.82 <sup>a</sup> <sub>x</sub>
	B-DF	7.62±0.04 <sup>a</sup> <sub>y</sub>	8.33±0.13 <sup>b</sup> <sub>y</sub>
	S-DF	8.63±0.19 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	9.68±0.47 <sup>a</sup> <sub>x</sub>
Chroma	DF	9.37±0.18 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	10.49±0.83 <sup>a</sup> <sub>x</sub>
	B-DF	7.50±0.11 <sup>a</sup> <sub>y</sub>	8.34±0.13 <sup>b</sup> <sub>y</sub>
	S-DF	8.61±0.23 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	9.68±0.48 <sup>b</sup> <sub>x</sub>
Hue	DF	89.45±0.15 <sup>a</sup> <sub>z</sub>	87.14±1.47 <sup>a</sup> <sub>x</sub>
	B-DF	92.54±0.23 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	91.96±0.82 <sup>a</sup> <sub>y</sub>
	S-DF	90.89±0.23 <sup>a</sup> <sub>y</sub>	88.62±0.77 <sup>b</sup> <sub>x</sub>

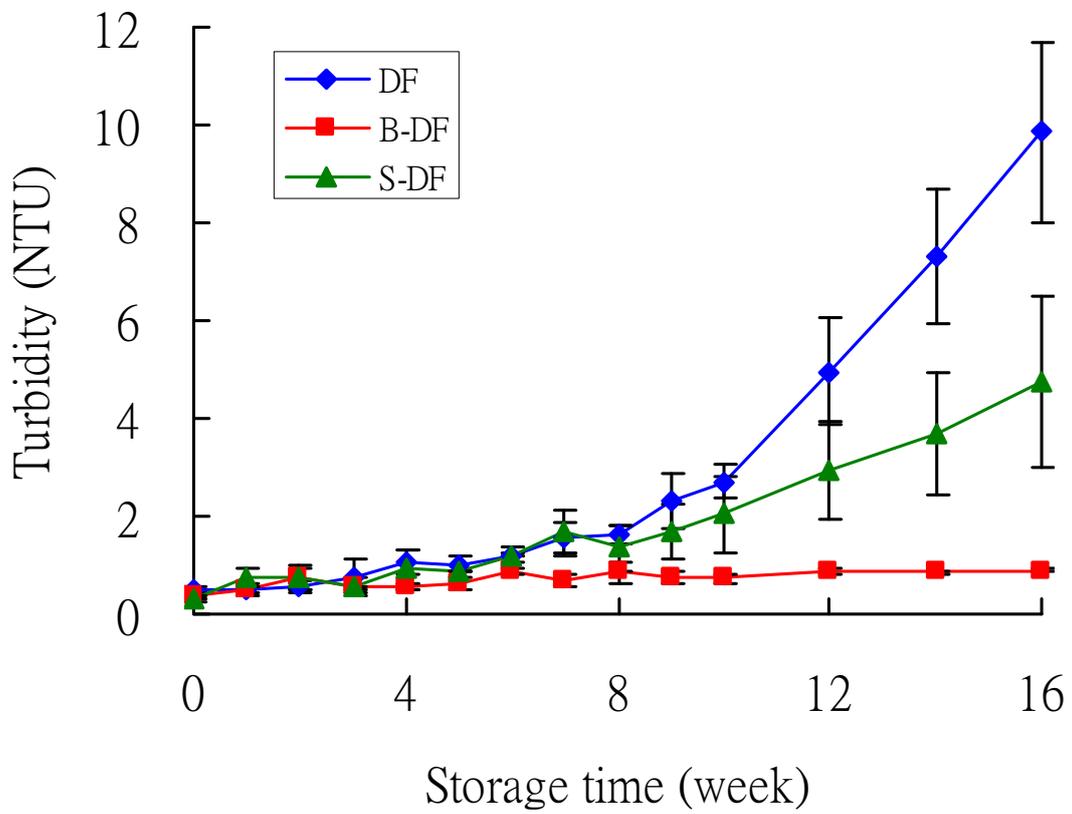
<sup>a,b</sup> Different superscripts among means of the same row indicate significantly different at 5% level.

<sup>x,y,z</sup> Different superscripts among means of the same column of color measurements indicate significantly different at 5% level.

度分別為 0.38NTU 與 0.32NTU，和未經澄清處理之矽藻土過濾梅醋沒有顯著差異(表六)，三者在外觀上呈現透明之澄清液體。皂土處理-矽藻土過濾梅醋於室溫儲存 16 週後，其混濁度由 0.38NTU 略微上升至 0.90NTU (圖十八)，但以 SAS 軟體分析顯著性差異之結果顯示並沒有顯著差異，而以肉眼觀察其外觀仍為透明澄清之液體。圖十八中顯示矽膠處理-矽藻土過濾梅醋與未經澄清處理之矽藻土過濾梅醋在儲存前 6 週混濁度沒有顯著之增加，混濁度皆為 1.21NTU，外觀仍為透明澄清之液體；儲存 10 週以後混濁度上升之現象漸趨明顯，且儲存 16 週後仍有持續上升之可能。儲存 16 週後矽膠處理-矽藻土過濾梅醋之混濁度由 0.32NTU 上升為 4.76NTU，雖然低於未經澄清處理之矽藻土過濾梅醋(9.86NTU)，但強光照與黑色背景下已可由肉眼觀察到溶液發生混濁；人類在強光照與黑色背景下對混濁現象之閾值(threshold)約為 2.2NTU (Siebert, 2006)。試驗結果顯示皂土處理能使矽藻土過濾梅醋在室溫儲存期間維持其澄清穩定性，矽膠處理僅能減緩混濁度上升之趨勢而不能完全防止二次混濁之發生。

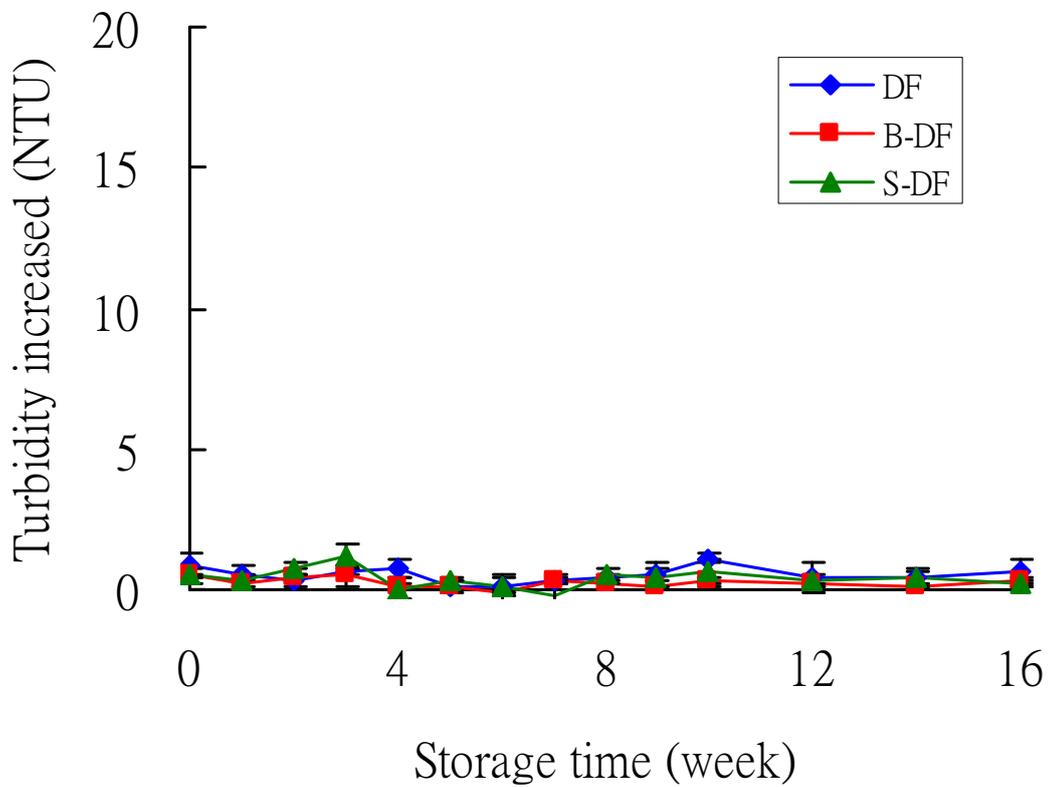
### 3. 起霧性多酚與起霧性蛋白質

皂土處理-矽藻土過濾梅醋與矽膠處理-矽藻土過濾梅醋之 gelatin test 引起的混濁度增加值分別為 0.50NTU 與 0.49NTU，與未經澄清處理之矽藻土過濾梅醋沒有顯著差異，兩種澄清處理之梅醋於室溫儲存期間 gelatin test 引起之混濁度增加值亦沒有顯著之變化，儲存 16 週後其混濁度增加值分為 0.28NTU 與 0.23NTU (圖十九)，顯示無論有進行澄清處理，室溫儲存期間起霧性多酚物質都僅有微量存在於梅醋中。



圖十八、皂土與矽膠處理對矽藻土過濾梅醋在室溫儲存 16 週間混濁度之影響

Fig. 18. Effects of bentonite treatment (B-DF), silica gel treatment (S-DF), and non-fingning treatment (DF) on the turbidity of diatomaceous earth filtrated mei vinegars stored at room temperature for 16 weeks



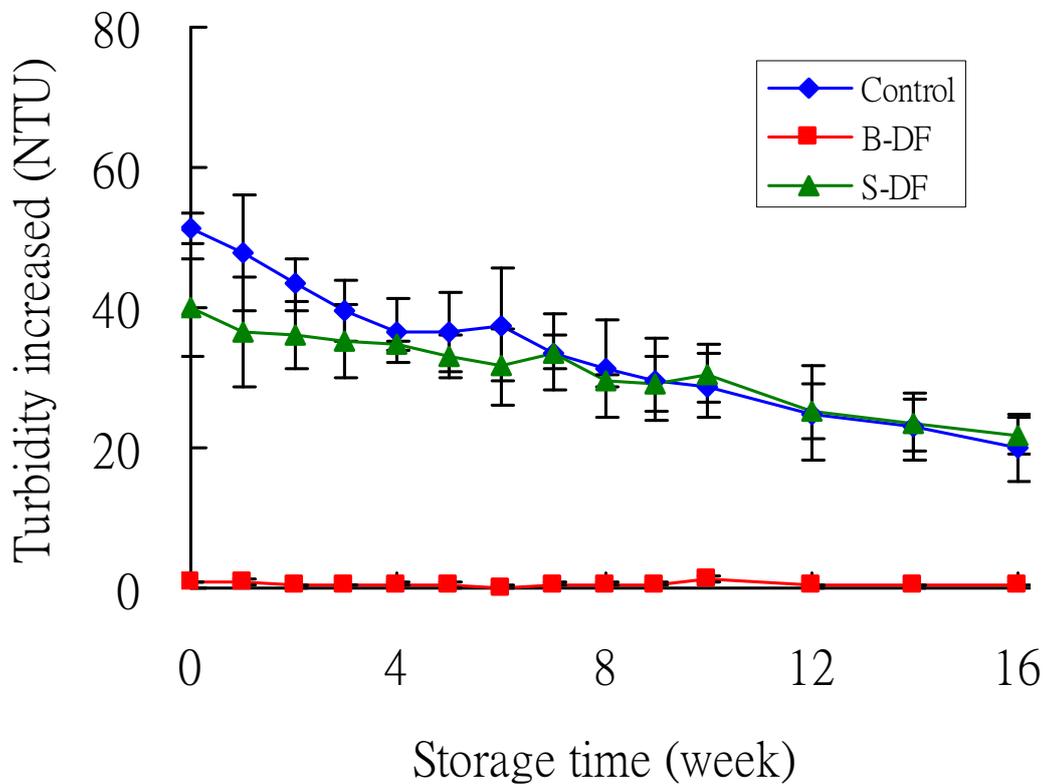
圖十九、以 gelatin test 引起之混濁度增加值表示皂土與矽膠處理對矽藻土過濾梅醋在室溫儲存 16 週間起霧性多酚含量之影響

Fig. 19. The haze-active polyphenol content of bentonite treatment (B-DF), silica gel treatment (S-DF), and non-fingnig treatment (DF) diatomaceous earth filtrated mei vinegars stored at room temperature for 16 weeks represented by turbidity increased after gelatin test

皂土處理-矽藻土過濾梅醋的 tannic acid test 引起之混濁度增加值為 0.92NTU，遠低於未經澄清處理之矽藻土過濾梅醋(51.34NTU)，顯示梅醋中的起霧性蛋白質大部分被移除。矽膠處理-矽藻土過濾梅醋的 tannic acid test 引起之混濁度增加值為 40.07NTU，較未經澄清處理之矽藻土過濾梅醋為低，但高於皂土處理之樣品(0.92NTU) (圖二十)，顯示矽膠處理僅能移除約 20%之起霧性蛋白質，澄清效果較少量試驗中為低(圖十七)。皂土處理-矽藻土過濾梅醋於室溫儲存期間其 tannic acid test 引起之混濁度增加值沒有顯著之變化。矽膠處理-矽藻土過濾梅醋與未經澄清處理之矽藻土過濾梅醋後的 tannic acid test 引起之混濁度增加值隨著儲存時間呈現下降之趨勢，分別由 40.07NTU 與 51.34NTU 降低為 21.91NTU 與 19.84NTU (圖二十)。以 SAS 軟體分析矽膠處理-矽藻土過濾梅醋中「混濁度」與「tannic acid test 引起之混濁度增加值」兩項變數之相關性分析，其相關係數為-0.9317，呈現高度負相關，顯示矽膠處理-矽藻土過濾中起霧性蛋白質仍是導致室溫儲存期間混濁度上升之主要因子。

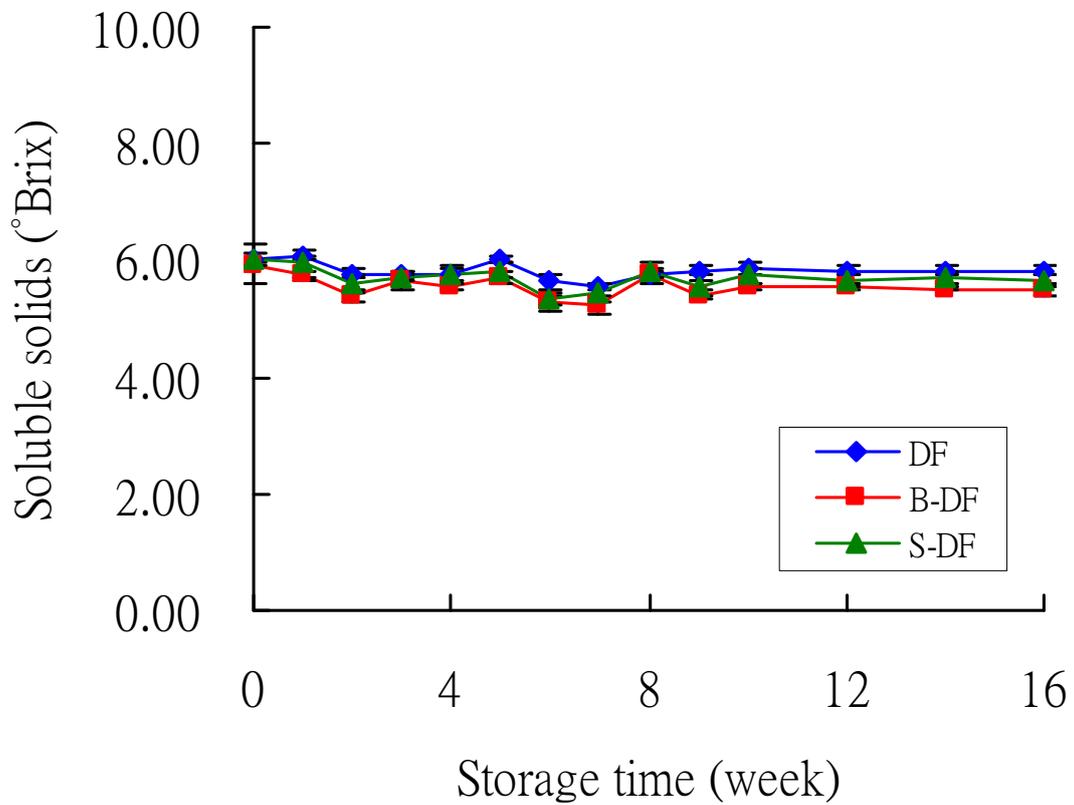
#### 4. 可溶性固形物含量與 pH 值

表六中顯示皂土處理-矽藻土過濾梅醋與矽膠處理-矽藻土過濾梅醋之 pH 值皆為 2.85，低於未經澄清處理之矽藻土過濾梅醋；皂土處理-矽藻土過濾梅醋與矽膠處理-矽藻土過濾梅醋之可溶性固形物含量為 5.93 與 6.02°Brix，與未經澄清處理之矽藻土過濾梅醋沒有顯著差異。圖二十一與二十二中顯示，不論有無經過澄清處理，矽藻土過濾後梅醋的可溶性固形物含量與 pH 值在室溫儲存期間都沒有顯著變化。



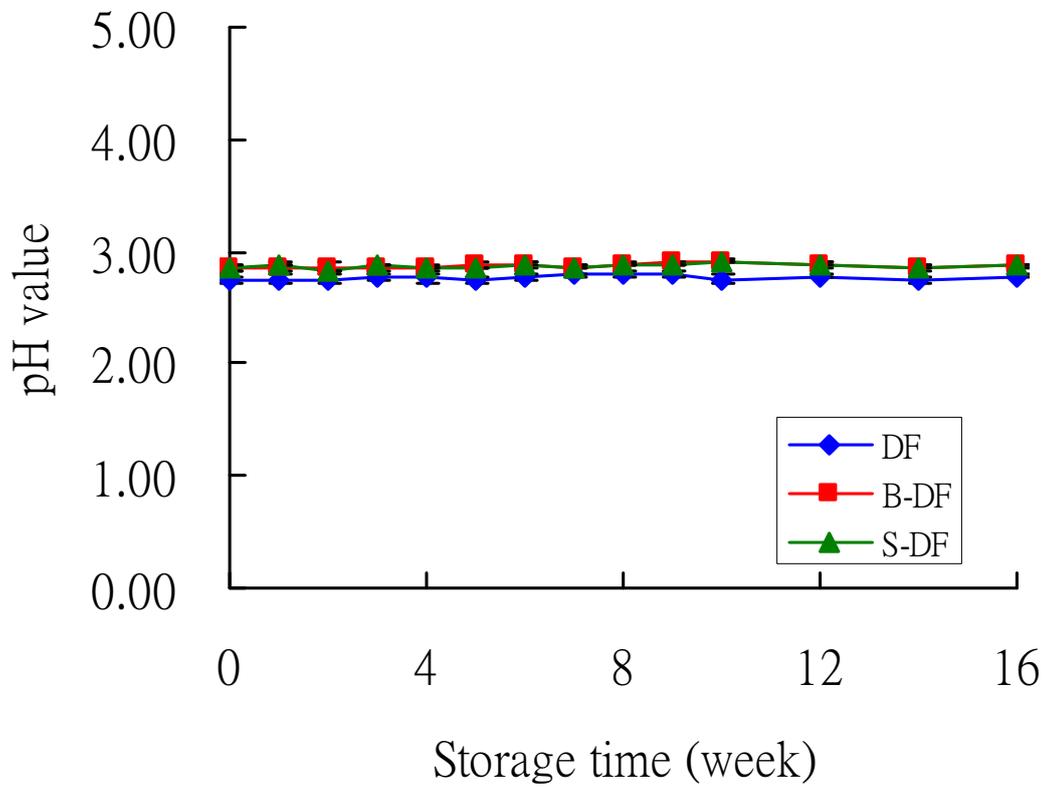
圖二十、以 tannic acid test 引起之混濁度增加值表示皂土與矽膠處理對矽藻土過濾梅醋在室溫儲存 16 週間起霧性蛋白質含量之影響

Fig. 20. The haze-active protein content of bentonite treatment (B-DF), silica gel treatment (S-DF), and non-fingnig treatment (DF) diatomaceous earth filtrated mei vinegars stored at room temperature for 16 weeks represented by turbidity increased after tannic acid test



圖二十一、皂土與矽膠處理對矽藻土過濾梅醋在室溫儲存 16 週間可溶性固形物含量之影響

Fig. 21. The soluble solid content of bentonite treatment (B-DF), silica gel treatment (S-DF), and non-fingnig treatment (DF) diatomaceous earth filtrated mei vinegars stored at room temperature for 16 weeks



圖二十二、皂土與矽膠處理對矽藻土過濾梅醋在室溫儲存 16 週間 pH 值之影響

Fig. 22. The pH value of bentonite treatment (B-DF), silica gel treatment (S-DF), and non-fingnig treatment (DF) diatomaceous earth filtrated mei vinegars stored at room temperature for 16 weeks

## 伍、結論

1. 矽藻土過濾梅醋在室溫儲存 16 週後混濁度會有顯著之上升，顯示有二次混濁之現象產生。
2. 矽藻土過濾梅醋以矽膠處理後僅能移除 20-45%之起霧性蛋白質。矽膠處理僅能延緩矽藻土過濾梅醋於室溫儲存 16 週期間混濁度之上升趨勢，不能完全防止二次混濁現象之產生。
3. 矽藻土過濾梅醋以皂土處理後幾乎可以移除 100%之起霧性蛋白質。皂土處理能有效維持矽藻土過濾梅醋在室溫儲存 16 週期間之澄清安定性，故推論起霧性蛋白質是導致矽藻土過濾梅醋發生二次混濁的主要因子。
4. 皂土處理後矽藻土過濾梅醋會由琥珀色轉變為黃色，可能需要進行差異性官能品評來評估此項變化是否會影響其商品價值。



## 陸、參考文獻

- 尤新輝 1992 蘋果汁加工與品質變化之探討 食品工業 24(5): 18-29
- 林以巋 2001 利口梅酒製造過程中果實成份溶出之研究 國立台灣大學園藝學研究所碩士論文
- 朱芸芳 1999 菠菜汁混濁安定性之研究 國立台灣大學食品科技研究所碩士論文
- 行政院農業委員會 2006 農業統計年報 行政院農業委員會 110
- 林讚峰 1996 啤酒品質的安定化(二)化學性混濁之預防 製酒科技專論彙編 18: 38-52.
- 李元震 1996 葡萄酒混濁之處理 製酒科技專論彙編 18: 122-131.
- 杜朋 1992 果蔬汁飲料工藝學 農業出版社 北京
- 呂維明、呂文芳 1994 過濾技術 高立圖書有限公司 台北
- 莊文儀 2006 靈芝多醣PSG與蛋白LZ8調節免疫與其機制之研究 國立台灣大學園藝學研究所碩士論文
- 陳信君 2000 梅子再製酒製造過程中可溶性成分與揮發性成分溶出之研究 國立台灣大學園藝學研究所碩士論文
- 陳雪娥 1994 青梅汁之熟成研究及沉澱之防止 行政院國科會專題研究計畫成果報告
- 陳惠蓉 1989 番石榴果汁之澄清加工 國立台灣大學食品科技研究所碩士論文
- 許嘉彬 2005 臺灣健康醋飲料與市場與發展性概談 食品資訊 205: 30-32
- 曾昭宏 2000 防止澄清橫山梨果汁混濁生成之研究 國立台灣大學園藝學研究所碩士論文

- 黃淑媛 1980 酒類色香味的形成 製酒科技專論彙編 2: 4
- 黃錦誠 1992 最新果汁飲料加工技術 食品工業發展研究所 新竹
- 黃錦城 2000 酸性果汁形成雲霧狀懸浮物之原因 食品工業 32(3): 24-31
- 劉居富、陳文凱 1979 防止水果酒沈澱之研究 II. 防止鳳梨酒沈澱效果比較 酒廠研究年報 68 年度 p.85-96.
- 蔡碧仁 1982 葡萄果汁沈澱問題的探討 國立台灣大學園藝學研究所碩士論文
- 歐錫坤 2005 梅 台灣農家要覽農作篇(二) 增修訂三版 p.189-196 財團法人豐年社
- 餘聯誠 1995 濃糖梅汁褐變反應之研究 屏東技術學院食品科學研究所碩士論文
- 盧伊屏 2006 澄清新興梨及新世紀梨汁中水溶性蛋白質安定性之研究 國立台灣大學園藝學研究所碩士論文
- 賴麗旭 1985 金屬離子對番茄汁粘度之影響及其可能作用機制 國立台灣大學食品科技研究所碩士論文
- 賴麗旭 1996 添加氯化鈣對芭樂汁黏度之影響及其可能作用機制 行政院國家科學委員會專題研究企劃成果報告
- 戴三堡 2006 澄清橫山梨果汁加熱後混濁生成機制之研究 國立台灣大學園藝學研究所博士論文
- 戴宏桂 1995 澄清荔枝果汁製備與其品質之研究 國立台灣大學園藝學研究所碩士論文
- Amerine, M. A., Berg, H. W., and Cruess, W. V. 1976. The technology of wine making, 3<sup>rd</sup> ed. AVI Publishing Co. Inc.
- Asano, K., Shinagawa, K., and Hashimoto, N. 1982. Characterization of haze-forming proteins of beer and their roles in chill haze formation.

- J. Am. Soc. Brew. Chem. 40(4): 147-157.
- Asquith, T. N. and Butler, L. G. 1986. Interactions of condensed tannins with selected protein. *Phytochem.* 25: 1591-1593.
- Baker, R. A. and Bruemer, J. H. 1972. Pectinase stabilization of orange juice cloud. *J. Agric. Food Chem.* 20(6): 1169-1173.
- Bannach, W. 1984. Food gelatin in the beverage industries - an important help in juice and wine fining. *Confructa.* 28(3): 198-206.
- Baxter, N. J., Lilley, T. H., Haslam, E., and Williamson, M. P. 1997. Multiple interactions between polyphenols and a salivary praline-rich protein repeat result in complexation and precipitation. *Biochemistry.* 36: 5566-5577.
- Beveridge, T. 1997. Haze and cloud in apple juices. *Crit. Rev. in Food Sci. and Nutri.* 37(1): 75-91.
- Beveridge, T. and Tait, V. 1993. Structure and composition of apple juice haze. *Food Structure.* 12: 195-198.
- Bianco, A., Chiacchio, U., Rescifina, A., Roneo, G., and Uccella, N. 1997. Biomimetic supramolecular biophenol-carbohydrate and biophenol-protein models by NMR experiments. *J. Agric. Food Chem.* 45(11): 4281-4285.
- Blade, W. H. and Boulton, R. 1988. Adsorption of protein by bentonite in a model wine solution. *Am. J. Enol. Vitic.* 39(3): 193-197.
- Boyes, S., Striubi, P., and Dawes, H. 1997. Measurement of protein content in fruit juices, wine and plant extracts in the presence of endogenous organic compounds. *Lebensm. Wiss. u. -Technol.* 30: 778-785.
- Calderon, P., Van Buren, J., and Robinson, W. B. 1968. Factors influencing formation of precipitates and hazes by gelatin and condensed and hydrolyzable tannins. *J. Agric. Food Chem.* 16(3): 479-482.

- Cameron, R. G., Baker, R. A., and Grohmann, K. 1998. Multiple forms of pectinmethylesterase from citrus peel and their effects on juice cloud stability. *J. Food Sci.* 63(2): 253.
- Carle, R. 1998. Cloud stability of pulp-containing tropical fruit nectars. *Fruit Processing.* 7: 266-272.
- Crandall, P. G., Matthews, R. F., and Baker, R. A. 1983. Citrus beverage clouding agents- review and status. *Food Technol.* 12: 106-109.
- Dickinson, E. 1994. Colloidal aspects of beverages. *Food Chemistry.* 51: 343-347.
- Flores, J. H., Heatherbell, D. A., Hsu, J. C., and Watson, B. T. 1988. Ultrafiltration (UF) of white riesling juice : effect of oxidation and pre-UF juice treatment on flux , composition and stability. *Am. J. Enol. Vitic.* 39(2): 180-187.
- Gao, L., Beveridge, T., and Reid, C. A. 1997. Effects of processing and packaging conditions on haze formation in apple juices. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.* 30: 23-29.
- Grant, G. T., Morries, E. R., Rees, D. A., Smith, P. J. C., and Thom, D. 1973. Biological interactions between polysaccharides and divalent cation: The egg-box model. *FEBS Lett.* 32: 195-198.
- Hagerman, A. E. and Butler, L. G. 1981. The specificity of proanthocyanidin-protein interaction. *J. Biol. Chem.* 256(9): 4494-4497.
- Heatherbell, D. A. 1976. Haze formation from starch degradation products in apple wine and clarified apple juice. *Confructa.* 21: 36-42.
- Heatherbell, D. A. 1984. Fruit juice clarification and fining. *Confructa.* 28: 192-197.
- Hodgson, J. and Beavers, D. 1981. Gelatin clarification of juice. Oregon State Univ. Agric. Exp. Station Technical Publication. No.6234:

110-116.

- Hsu, J. C. and Heatherbell, D. A. 1987. Isolation and characterization of soluble proteins in grape, grape juice and wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 38(1): 6-10.
- Hsu, J. C., Heatherbell, D. A., and Yorgey, B. M. 1989. Effect of fruit storage and processing on clarity, proteins, and stability of Granny Smith apple juice. *J. Food Sci.* 54(3): 660-662.
- Huang, H. M., Johannig, G. L., and ODELL, B. L. 1986. Phenolic-acid content of food plants and possible nutritional implications. *J. Agri. Food Chem.* 34(1): 48-51.
- Kaneko K., Otogura C., Yoshida N., Utada M., Tsuji K., Kikuchi S., and Cha H.-S. 1998. Influence of the maturity of the fruit material on various components and taste of ume liquor. *J. Food Sci. Technol. Int.* 4(1): 59-65.
- Kilara, A. 1982. Enzyme and their uses in the processed apple industry: Review process. *Biochem.* 7: 77-82.
- Klavons, J. A. and Bennett, R. D. 1985. The nature of the protein constituent of commercial lemon juice cloud. *J. Agri. Food Chem.* 33(4): 708-712.
- Klavons, J. A., Bennett, R. D., and Vannier, S. H. 1994. Physical/chemical nature of pectin associated with commercial orange juice cloud. *J. Food Sci.* 59(2): 399.
- Laratta, B., Fasanaro G., De Sio F., Castaldo D., Palmieri A., Giovane A., and Servillo L. 1995. Thermal inactivation of pectin methylesterase in tomato puree: implications on cloud stability. *Process Biochemistry.* 30(3): 251-259.
- Lehtonen, P. 1996. Determination of amines and amino acids in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 47(2): 127-133.
- Mulkay, P. and Jerumanis, J. 1983. Effects of molecular weight and

- degree of hydroxylation of proanthocyanidins on the colloidal stability of beer. *Cerevisia*. 8: 29-35.
- Padill, O. I. and Mclellan, M. R. 1989. Molecular weight cut-off of ultrafiltration membranes and the quality and stability of apple juice. *J. Food Sci.* 54(5): 1250-1254.
- Ricardo-de-Silva, J. M., Cheynier, V., Souquet, J. M., and Moutouenet, M. 1991. Interaction of grape seed procyanidins with various proteins in relation to wine fining. *J. Sci. Food Agric.* 57: 111-125.
- Schmitt, R. 1988. Enzyme in the fruit juice industry. *Confructa* 32: 138-159.
- Schrieber, R. 1976. Edible gelation: types, properties, use and application in the food industry. *Gordian*. 76(12): 356-364.
- Siebert, K. J. 1999. Effects of protein-polyphenol interactions on beverage haze, stabilization, and analysis. *J. Agric. Food Chem.* 47(2): 353-362.
- Siebert, K. J. 2006. Haze formation in beverages. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.* 39: 987-994.
- Siebert, K. J., Carrasco, A., and Lynn, P. Y. 1996. Formation of protein-polyphenol haze in beverage. *J. Agric. Food Chem.* 44(8): 1997-2005.
- Siebert, K. J. and Lynn, P. Y. 1997a. Haze-active protein and polyphenols in apple juice assessed by turbidimetry. *J. Food Sci.* 62(1): 79-84.
- Siebert, K. J. and Lynn, P. Y. 1997b. Mechanisms of beer colloidal stabilization. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 55: 73-78.
- Siebert, K. J., and Lynn, P. Y.. 1997c. Mechanisms of adsorbent action in beverage stabilization. *J. Agric. Food Chem.* 45: 4275-4280.
- Sims, C. A., Balaban M. O., and Matthews R. F. 1993. Optimization of carrot juice color and cloud stability. *J. Food Sci.* 58(5): 1129-1131.
- Tajchakavit, S., Boye, J. I., Bélanger, D., and Couture, R. 2001. Kinetics

- of haze formation and factors influencing the development of haze in clarified apple juice. *Food Res. Int'l.* 34: 431-440.
- Van Buren, J. P. 1972. Turbidity and precipitates in juice in relation to tannins and proteins. *Voedingsmiddelen Technology.* 3(13): 57-59.
- Tajchakavit, S., Boye, J. I., and Couture, R. 2001. Effect of processing on post-bottling haze formation in apple juice. *Food Res. Int'l.* 34: 415-424.
- Van Buren, J. P. 1989. Causes and prevention of turbidity in apple juice. In "Processed Apple Products", D.L. Downing (Ed.), p.97-120, Van Nostrand Reinhold, New York, NY, U.S.A.
- Van Buren, J. P. and Robinson W. B. 1969. Formation of complex between protein and tannic acid. *J. Agric. Food Chem.* 17(4): 772-777.
- Waldt, L. M. and Mahoney, R. D. 1967. Depectinizing guava juice with fungal pectinase. *Food Tech. Mar.:* 87-89.
- Wall, K. M., Tait, V. M., Eastwell, K. C., Reid, C. A., and Beveridge, T. 1996. Haze development in aerobically or anaerobically produced clarified apple juices. *J. Food Sci.* 61(1): 92-96.
- Waters, E. J., Wallace, W., and Williams, P. J. 1992. Identification of heat-unstable wine proteins and their resistance to peptidase. *J. Agric. Food Chem.* 40(9): 1514-1519.
- Wilson, E. L. and Burns, D. J. W. 1983. Kiwifruit juice processing using heat treatment techniques and ultrafiltration. *J. Food. Sci.* 48(4): 1101-1105.
- Wu, L. C. and Siebert, K. J. 2002. Characterization of haze-active proteins in apple juice. *J. Agric. Food Chem.* 50(13): 3828-3834.