

國立臺灣大學生物資源暨農學院食品科技研究所

博士論文

Graduate Institute of Food Science and Technology

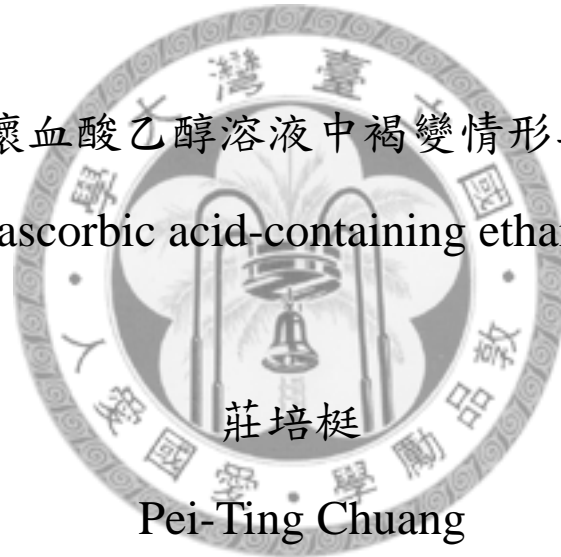
College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Doctoral Dissertation

含抗壞血酸乙醇溶液中褐變情形之研究

Browning of ascorbic acid-containing ethanolic solutions



Pei-Ting Chuang

指導教授：吳瑞碧 博士

James Swi-Bea Wu, Ph. D.

中華民國一百年七月

July, 2011

摘要

色澤是含酒精（乙醇）飲料（酒品）的品質要素之一，非酵素性褐變在酒品中容易發生而降低其價值，而抗壞血酸降解可能是含果汁成分酒品的主要褐變路徑之一。本研究以抗壞血酸為主要實驗對象，先分析市面上含果汁成分之酒品的組成，再根據此組成，建構不同濃度之乙醇溶液模式系統來模擬酒品。測定抗壞血酸在模式系統中之降解速率、分析降解產物，並探討酒品之組成分對抗壞血酸褐變之影響。

結果顯示，本研究模式系統中，抗壞血酸主要降解途徑為有氧降解，主要降解產物包括 2-furoic 及 3-hydroxy-2-pyrone。在貯藏過程中，2-furoic 及 3-hydroxy-2-pyrone 的總量隨著乙醇濃度增加而增加，而模式系統中之褐變情形與上述降解產物含量間之相關性不佳。在糖、胺基酸、單寧類、金屬離子及有機酸中，以兒茶素代表之單寧類為最主要影響抗壞血酸造成褐變的成分。不同乙醇濃度導致抗壞血酸降解產物之含量有所差異，主要原因來自於水活性的差異。高乙醇濃度（低水活性）利於抗壞血酸降解中間產物 L-xylosone 之脫水而繼續降解。L-xylosone 已被認定是抗壞血酸降解過程中唯一能與兒茶素作用產生褐變之物質，它的加速降解，減少了本身與兒茶素反應的機會，也就導致了抗壞血酸-兒茶素褐變速率的下降。

綜合以上結果，建議含抗壞血酸酒品，在長時間儲藏時應減少其單寧類化合物含量，以避免過度褐變。高乙醇濃度雖然造成低水活性，導致抗壞血酸降解速率增加，但卻可能因抗壞血酸-單寧褐變反應速率之減緩而降低褐變。

關鍵字：乙醇、褐變、抗壞血酸、兒茶素、水活性、酒精飲料。

Abstract

Color is a major quality attribute of alcoholic beverages (wine and related products). Nonenzymatic browning occurs in alcoholic beverages readily and downgrades their value. Ascorbic acid degradation can be a major browning pathway in alcoholic beverages that contain fruit juice as an ingredient. The present study took ascorbic acid as the major object in the experiments. The composition of various juice-containing alcoholic beverages on the market was analyzed for composition first. Model systems that contain the similar composition in proper buffer solutions at various ethanol concentrations were then constructed to simulate the real products. The degradation rate, the degradation products, and the relation between ascorbic acid and browning index were investigated.

In the result, the aerobic degradation pathway was found to dominate over the anaerobic pathway in all model solutions. The compounds 2-furoic and 3-hydroxy-2-pyrone were among the major degradation products. Higher ethanol concentrations corresponded with higher 3-hydroxy-2-pyrone plus 2-furoic acid contents among solutions. Bad correlation was found between browning index and the amount of degradation products. Tannins, as represented by catechin, were found to be more influential than other components, including sugars, amino acids, metal ions and organic acids. Different ethanol concentrations resulted in the formation of different profiles of ascorbic acid degradation products. It can be attributed to the difference in water activity (A_w) as the major cause. High ethanol concentrations, or low A_w , favor the dehydration and further degradation of L-xylosone, an intermediate compound in ascorbic

acid degradation. L-xylosone has been recognized as the only substance that may react with catechin to cause browning. The accelerated degradation of L-xylosone reduces its own availability to react with catechin in ascorbic acid-catechin browning.

The above-described results suggest that the tannin contents in ascorbic acid-containing alcoholic beverages would better be decreased for avoiding over-browning in long-term storage. A high ethanol concentration corresponds to a low A_w that although promotes the degradation of ascorbic acid may actually reduce browning as a consequence of the decreased rate in ascorbic acid-tannin reaction.

KEYWORDS: ethanol, browning, ascorbic acid, catechin, water activity, alcoholic beverage.



目次

口試委員審定書.....	I
中文摘要.....	II
英文摘要.....	III
圖次.....	IX
表次.....	X
前言.....	1
第一章、文獻整理.....	2
一、酒類中之變色反應.....	3
1. 背景.....	3
2. 乙醇飲料中的變色情形.....	4
(1) 焦糖化反應.....	5
(2) 梅納反應.....	5
(3) 單寧氧化縮合.....	6
(4) 單寧和糖之交互作用.....	6
(5) 抗壞血酸氧化裂解.....	7
(6) 抗壞血酸和單寧交互作用.....	9
二、抗壞血酸之穩定性.....	11
(1) 氧氣.....	11
(2) 酸鹼值.....	11
(3) 溫度.....	12
(4) 水活性.....	13
(5) 光線.....	13
(6) 金屬離子.....	14

(7) 糖.....	15
三、乙醇對變色之影響.....	16
第二章、市售產品成分分析.....	17
一、前言.....	18
二、材料與方法.....	18
1. 原料.....	18
2. 試藥.....	18
3. 實驗方法.....	19
(1) 褐變指標.....	19
(2) 酸鹼值測定.....	19
(3) 糖度.....	19
(4) CIE L*a*b*值測定.....	19
(5) 總酚類化合物含量測定.....	19
(6) 總糖含量測定.....	20
(7) 縮合單寧測定.....	20
(8) 糖類組成分析.....	20
(9) 游離胺基酸分析.....	21
(10) 金屬元素分析.....	21
(11) 有機酸組成分析.....	22
(12) 甲醇、乙醇含量測定.....	22
(13) 二氧化硫含量測定.....	23
4. 統計分析.....	23
三、結果與討論.....	24
四、結論.....	27

第三章、化學成分對乙醇溶液抗壞血酸裂解及褐變之影響.....	35
一、前言.....	36
二、材料與方法.....	36
1. 材料.....	36
2. 試藥.....	36
3. 實驗方法.....	37
(1) 模式系統配置.....	37
(2) 褐變指標.....	38
(3) 酸鹼值測定.....	38
(4) CIE L*a*b*值測定.....	38
(5) 抗壞血酸含量分析.....	38
(6) 抗壞血酸降解產物及兒茶素含量分析.....	39
4. 統計分析.....	40
三、結果與討論.....	41
1. 乙醇濃度之影響.....	41
2. 各化學成分之影響.....	43
四、結論.....	45
第四章、乙醇溶液中抗壞血酸-兒茶素褐變之機制.....	61
一、前言.....	62
二、材料與方法.....	62
1. 試藥.....	62
2. 實驗方法.....	63
(1) 模式系統配置.....	63

(2) 褐變指標.....	63
(3) 酸鹼值測定.....	63
(4) 抗壞血酸含量分析.....	64
(5) 抗壞血酸降解產物及兒茶素含量分析.....	64
(6) 水活性測定.....	65
3. 統計分析.....	66
三、結果與討論.....	67
1. 在乙醇模式溶液之褐變.....	67
2. 乙醇模式系統及甘油模式系統中水活性對褐變之影響.....	69
四、結論.....	73
總結.....	83
附錄、已發表之期刊論文.....	119



圖 次

圖 1-1、抗壞血酸降解生成 3-hydroxy-2-pyrone (3OH2P)、呋喃醛及 2-糠酸之途徑.....	8
圖 1-2、抗壞血酸氧化形成紅色或黃色色素的可能途徑.....	10
圖 3-1、實驗流程.....	46
圖 3-2、不同乙醇濃度模式溶液貯藏期間之褐變指標變化.....	47
圖 3-3、不同乙醇濃度模式溶液貯藏期間之亮度變化.....	48
圖 3-4、不同乙醇濃度模式溶液貯藏期間之 2-furoic acid 含量變化.....	55
圖 4-1、抗壞血酸-兒茶素褐變實驗流程.....	74
圖 4-2、水溶液及乙醇模式溶液於 45°C 儲存時之褐變指標變化.....	75
圖 4-3、水溶液與乙醇溶液中抗壞血酸於 45°C 儲存時之降解比例變化.....	76
圖 4-4、水溶液與乙醇溶液中兒茶素於 45°C 儲存時之降解比例變化.....	77
圖 4-5、添加或不添加抗壞血酸降解產物於兒茶素水溶液在 45°C 儲藏之褐變指標.....	78
圖 4-6、甘油溶液於 45°C 儲藏時之褐變指標.....	79

表次

表 2-1、市售涼酒之褐變指標、酸鹼度、糖度、色澤分析.....	28
表 2-2、市售涼酒之總酚含量、總糖含量、縮合單寧含量分析.....	29
表 2-3、市售涼酒之糖類組成.....	30
表 2-4、市售涼酒之胺基酸組成.....	31
表 2-5、市售涼酒之金屬元素組成.....	32
表 2-6、市售涼酒之有機酸組成.....	33
表 2-7、市售涼酒之乙醇、甲醇及二氧化硫含量分析.....	34
表 3-1、0% 乙醇濃度模式溶液貯藏期間之色相角度變化.....	49
表 3-2、5% 乙醇濃度模式溶液貯藏期間之色相角度變化.....	50
表 3-3、10% 乙醇濃度模式溶液貯藏期間之色相角度變化.....	51
表 3-4、25% 乙醇濃度模式溶液貯藏期間之色相角度變化.....	52
表 3-5、50% 乙醇濃度模式溶液貯藏期間之色相角度變化.....	53
表 3-6、含兒茶素模式溶液貯藏期間之兒茶素含量變化.....	54
表 3-7、0% 乙醇濃度模式溶液貯藏期間之 3-hydroxy-2-pyrone 含量變 化.....	56
表 3-8、5% 乙醇濃度模式溶液貯藏期間之 3-hydroxy-2-pyrone 含量變 化.....	57
表 3-9、10% 乙醇濃度模式溶液貯藏期間之 3-hydroxy-2-pyrone 含量變 化.....	58
表 3-10、25% 乙醇濃度模式溶液貯藏期間之 3-hydroxy-2-pyrone 含量 變化.....	59
表 3-11、50% 乙醇濃度模式溶液貯藏期間之 3-hydroxy-2-pyrone 含量 變化.....	60
表 4-1、模式溶液於 45°C 儲藏 26 天時之抗壞血酸降解產物 (Furfural、	

2-furoic acid 及 3-hydroxy-2-pyrone) 含量.....80

表 4-2、乙醇溶液及甘油溶液之水活性.....81

表 4-3、水活性與褐變指標於七天儲藏後在乙醇溶液或甘油溶液之相
關係數.....82



前言

水果一般富含抗壞血酸，在酒的發酵過程中會大量損失，在蒸餾過程中更是無法蒸出；但再製酒類，例如：水果利口酒、添加果汁或抗壞血酸的發酵酒、以及果汁調和酒，則可能留存相當量的抗壞血酸，對於這些酒品在貯藏期間的品質變化，尤其是色澤，經常造成重大的影響 (Kennedy et al., 1990; Rodriguez et al., 1991)。某些發酵酒類，如：白葡萄酒，也有人在裝瓶前直接添加抗壞血酸，做為抗氧化劑，期待幫助色澤之保存 (Sapers, 1993; Skouroumounis et al., 2005)。色澤是酒品最重要的品質因素之一。明瞭色澤變化之機制及其影響因子，會極有助於酒品製程色澤的控制及其貯存過程色澤劣變之預防，具有高度的應用價值。上述酒品之間，除抗壞血酸之外，其他與變色有關各成分含量之差異也可能很大，例如乙醇濃度就可以低至 2%、高到 60% (Hankin et al., 1996; Bradshaw et al., 2001; Grønbæk et al., 2005)，單寧、糖、游離胺基酸及有機酸的含量也常隨產品而異 (Shinoda et al., 2005)，這類系統的複雜性，更提供了廣大的學術研究空間。

本論文即以乙醇溶液中的抗壞血酸為研究對象，探討其穩定性、影響因子及其降解時所造成之褐變情形，與其他成分 (包括：單寧、檸檬酸、胺基酸) 之交互作用及其機制，以便能對含抗壞血酸酒品的變色反應有全面性的認知，並能提出有效改善之建議。

第一章

文獻整理

Review



一、酒類中之變色反應

1. 背景

依製造方法的不同，酒類製品可概括分為釀造酒、蒸餾酒及再製酒三大類。其中釀造酒係指以穀類、水果或其他含澱粉或糖分之原料，經微生物發酵所製成的含酒精（乙醇）飲料。未再以蒸餾酒「強化」的釀造酒，其乙醇含量常在 20% 以下，啤酒、紹興酒、清酒、葡萄酒等屬之。蒸餾酒則是將含有乙醇的發酵酒液或酒醪加以蒸餾，所得到的含乙醇飲料，其乙醇含量隨原料及製程而有不同，但一般在 20% 至 60% 之間，如國產的米酒、高粱酒，中國大陸產的茅台、五糧液、汾酒，外國的威士忌、白蘭地等均屬之。再製酒係以食用酒精、釀造酒或蒸餾酒為基酒，加添其他原料，加水或不加水調製而成的含酒精飲料，其酒精濃度，隨著配方而有所差異。再製酒又可分為利口酒 (liqueur)、香精調和酒 (essence-blended wine) 及果汁調和酒 (juice-blended alcoholic beverage) 等。利口酒，例如：梅子浸漬酒、茶酒、桂花酒、枸杞酒、當歸酒、五加皮酒、人蔘酒及虎骨酒，係將水果或其他動植物原料浸入基酒中，使特殊風味或機能性成分溶出，經熟成、調製而得。香精調和酒是以天然精油或合成香料等香氣物質與基酒混合調製而成；而果汁調和酒，則常是較低乙醇濃度的含果汁成分酒精飲料，如涼酒 (wine cooler，乙醇含量約 4%) 及甜味果酒 (alcopop，乙醇含量約 6%) 等 (Hankin et al., 1996；Grønbaek et al., 2005)。

某些水果由於 pH 值較低或者雜菌不易抑制等原因，釀造發酵酒時容易失敗，因此常以基酒浸漬，製成水果利口酒而取代之，梅酒即是一例。市面上梅酒的常見製程為將青梅子刺皮，以日本燒酒加冰糖浸漬數月，經分離梅子後裝瓶(溫，1990)，或不加糖純以 50-60% 濃度食用酒精浸漬兩週後，再加入糖 25-30%，浸漬三個月 (冉等，1978)。以乙醇浸漬水果方式或添加水果產品於烈酒中的水果利口酒，乙醇濃度約略於 15-50% 之間；抗壞血酸在水果酒製酒過程中可被當成氧清除劑 (oxygen scavenger) 使用，特別是含有 12% 乙醇濃度的白酒製作過程 (Bradshaw et al., 2001)。此外，發酵酒可能於發酵後添加原汁，以調整乙醇含量並增添其風味、色澤或機能性質 (例如：發酵荔枝酒、紅葡萄酒、李子酒等)。

2. 乙醇飲料中的變色情形

水果產品的變色反應包括酵素性反應及非酵素性反應兩種，但當含果汁成分酒品的乙醇濃度高達 25% 以上時，酵素性反應即被充分抑制 (Rossi and Singleton, 1996; Gomez-Plaza et al., 1999)，而當乙醇濃度比較低時，在裝瓶前可能施行超過濾，更常在裝瓶前後施行巴斯德滅菌，因此貯藏期間酒品之酵素性變色反應可以忽略。酒類中可能發生的非酵素性褐變又可分為焦糖化反應 (caramelization)、梅納反應 (Maillard reaction)、單寧氧化縮合 (oxidative condensation of tannins)、單寧和糖之交互作用、抗壞血酸氧化降解 (oxidative degradation of ascorbic acid) 及抗壞血酸和單寧之交互作用等六種。

(1) 焦糖化反應

焦糖化反應為食品中的碳水化合物（尤其是糖及糖漿）在酸及熱的催化下，經熱降解 (thermolysis)、異構化 (isomerization)、烯醇化 (enolization)、脫水 (dehydration)、斷裂 (fragmentation)、分子間或分子內之縮合 (condensation)、聚合 (polymerization) 等程序而形成不能溶解之高分子量聚合體-melanins。

影響焦糖化反應的因子有：糖的種類及濃度、pH 值、反應溫度、反應時間、金屬離子、水活性等 (Tannenbaum et al., 1985; del Pilar Buera et al., 1987a)。但焦糖化的活化能極高 (果糖為 24.8 kcal/mol; 蔗糖為 57.6 kcal/mol) (del Pilar Buera et al., 1987a)，一般認為需在高糖高溫下反應才易發生，故乙醇飲料中發生焦糖化反應的可能性不高。

(2) 梅納反應

梅納反應的基本反應是非環狀還原糖上的 carboxyl group 與胺基酸、蛋白質上的鹼性胺基作用，產生 glycosylamine 後，再經 Amadori 重組後形成 1-amino-1-deoxy-2-ketose，或經 Heyns 重組形成 2-amino-2-deoxyaldose，之後再經一系列的降解、縮合反應，形成黑褐色物質 (melanoidins) (Whistler and Daniel, 1985)。

影響梅納反應的因子，與糖與胺基酸的種類直接相關，其次為溫度、時間、pH 值、水活性、有機酸、金屬離子等 (Wofrom et al., 1974; Ashoor and Zent, 1984; Beveridge and Harrison, 1984; Lee et al., 1984; Toribio and Lozano, 1984; Tannenbaum et al., 1985; Petriella et al., 1985; del Pilar Buera et

al., 1987a; del Pilar Buera et al., 1987b; Lee and Nagy, 1988; Petriella et al., 1988; Bates et al., 1994; Ledward, 1995; Hill et al., 1996; Brands et al., 2000)，反應非常複雜。在浸漬酒中的梅納反應，Shen 及 Wu (2004) 的研究證實水活性並非影響 hydroxymethyl furfural (HMF) 形成的唯一因子。

(3) 單寧氧化縮合

單寧屬水溶性多酚類，是指分子量介於 500 至 3000 Da 之間的黃酮類酚化合物 (flavonoid phenolic compounds)，普遍存在植物性食品中。單寧易氧化成 quinone，其氧化性活潑，常作為氧化劑促進其他分子的氧化，本身也可快速聚合成為深色高分子聚合物，或與蛋白質等形成大分子複合物 (Loomis and Battaile, 1966)。

在果汁中單寧可能發生氧化縮合，主要是單寧與糖類形成之 hydroxymethyl furfural (HMF) 結合而產生。在酒中發生單寧之氧化縮合，其褐變程度與抗壞血酸、糖類、乙醇濃度及有機酸等之含量也有關 (Liu et al., 2003)。

(4) 單寧和糖之交互作用

低 pH 值不利於梅納反應發生，卻利於酸催化糖進行脫水反應，生成如 furfural、HMF 等反應性強的中間產物 (Lee and Nagy, 1988)，而後酚類化合物與 HMF 等反應，形成紅褐色物質 (Dubois et al., 1956)。在過去的研究中，果汁及乙醇溶液中之單寧和糖交互作用之褐變也有廣泛的討論 (林，1987；李，1995；鄭，1996；Liu et al., 2003)。

(5) 抗壞血酸氧化降解

一般水果富含抗壞血酸，是重要的營養成分，但抗壞血酸在果汁中相當不安定，易發生降解而造成褐變 (Handwerk and Coleman, 1988; Clegg, 1966)。降解方式可分成嫌氣降解 (anaerobic degradation) 及好氣降解 (aerobic degradation) 兩種途徑。在有氧環境中，抗壞血酸先氧化形成去氫抗壞血酸及過氧化氫，去氫抗壞血酸會脫去內酯而生成二酮古羅糖酸 (2,3-diketogulonic acid)，再經脫羧裂解生成呋喃醛 (furfural)，進而聚合生成黑褐色物質 (Euler and Hassequist, 1952; 1953)，結構並不十分清楚，然由 ^{14}C 同位素實驗得知其分子量皆小於抗壞血酸分子量 (Sawamura et al., 1991)；在無氧狀況下，抗壞血酸則先經由成酮作用 (ketonization) 形成同質異性物酮體 (keto-tautomer)，然後脫內酯 (delactonization) 而形成不具生理活性的二酮古羅糖酸 (Tannenbaum et al., 1985)。抗壞血酸在酸性溶液中主要降解產物為呋喃醛 (furfural) (Kurata and Sakurai, 1967; Tatum et al., 1969)。Huelin (1953) 指出，pH 2.2 之抗壞血酸溶液於 30°C 貯藏兩年後，一莫耳抗壞血酸可生成 0.48 莫耳之呋喃醛。

Shinoda 等 (2004) 於模式系統探討柳橙汁中抗壞血酸降解途徑，發現除了上述降解產物外，抗壞血酸還會生成 3-hydroxy-2-pyrone (3OH2P)，並指出柳橙汁中導致褐變的物質為 3OH2P 及 furfural。此外在柳橙汁模式系統中發現 2-糠酸 (2-furoic acid)、3OH2P 及 furfural，皆為抗壞血酸降解產物 (Kurata and Fujimaki, 1976; Yuan and Chen, 1998)，Shinoda 等並於 2005 年指出抗壞血酸降解途徑如圖 1-1。

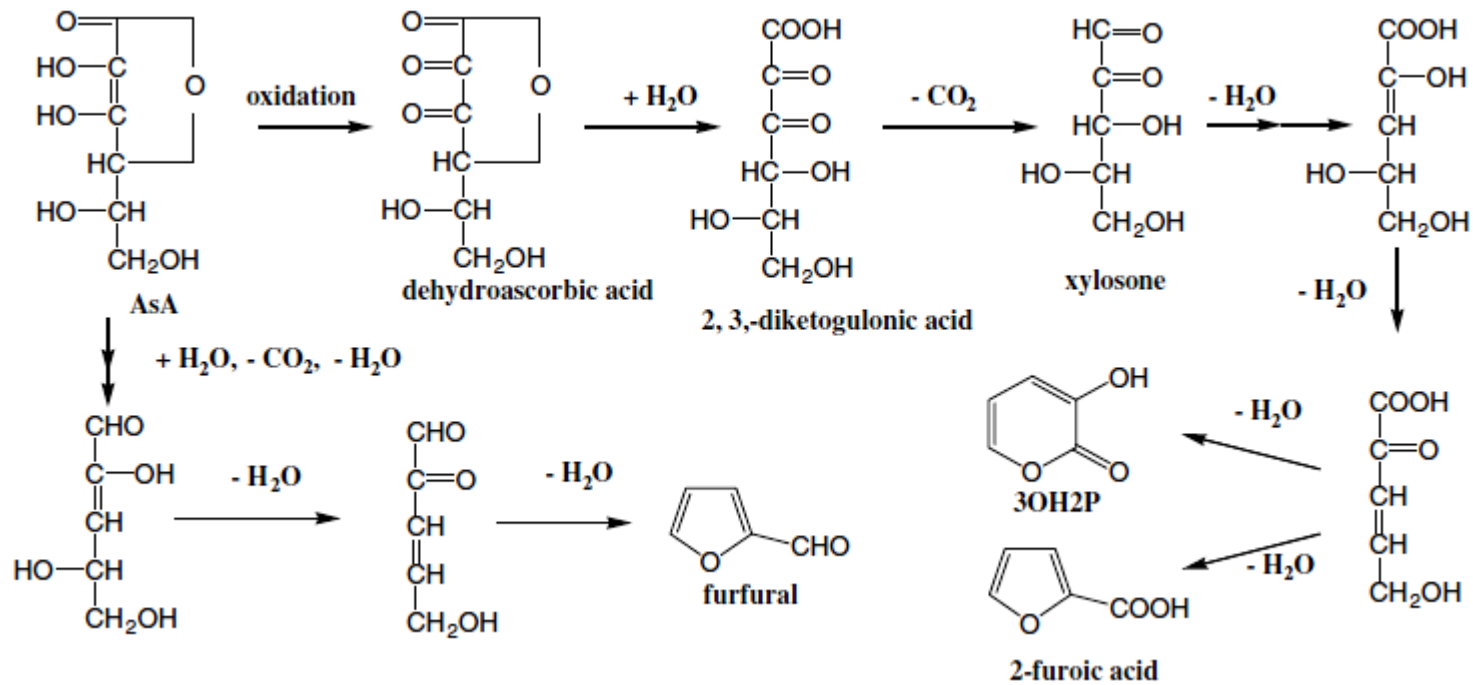


圖 1-1、抗壞血酸降解生成 3-hydroxy-2-pyrone (3OH2P)、呋喃醛及 2-糠酸之途徑。(Shinoda et al., 2005)

Fig 1-1. Formation Pathways of 3-hydroxy-2-pyrone (3OH2P), furfural, and 2-furoic Acid from ascorbic acid.

(6) 抗壞血酸和單寧之交互作用

抗壞血酸除自行降解造成褐變外，其降解產物亦可和胺基酸或單寧作用發生褐變。例如：去氫抗壞血酸和胺基酸的 α -或 ε -胺基反應，生成紅色的 2,2'-nitrilodi-2(2')-deoxyl-L-ascorbic acid monoammonium salt (Kurata et al., 1973a, b)，並能繼續氧化縮合為黃褐色產物（圖 1-2）(Hayashi et al., 1983)；呋喃醛亦可能與胺基酸作用而參與梅納反應。影響因子有氧氣、酸鹼值、溫度、水活性、金屬離子、糖或糖醇、光線及過氧化氫等，如在無菌包裝柳橙汁 (Kacem et al., 1987)、無菌包裝紅肉番石榴果漿 (Chan and Cavaletto, 1986)、混濁白肉種番石榴果漿 (林, 1987) 的褐變都被證實和抗壞血酸降解有關。



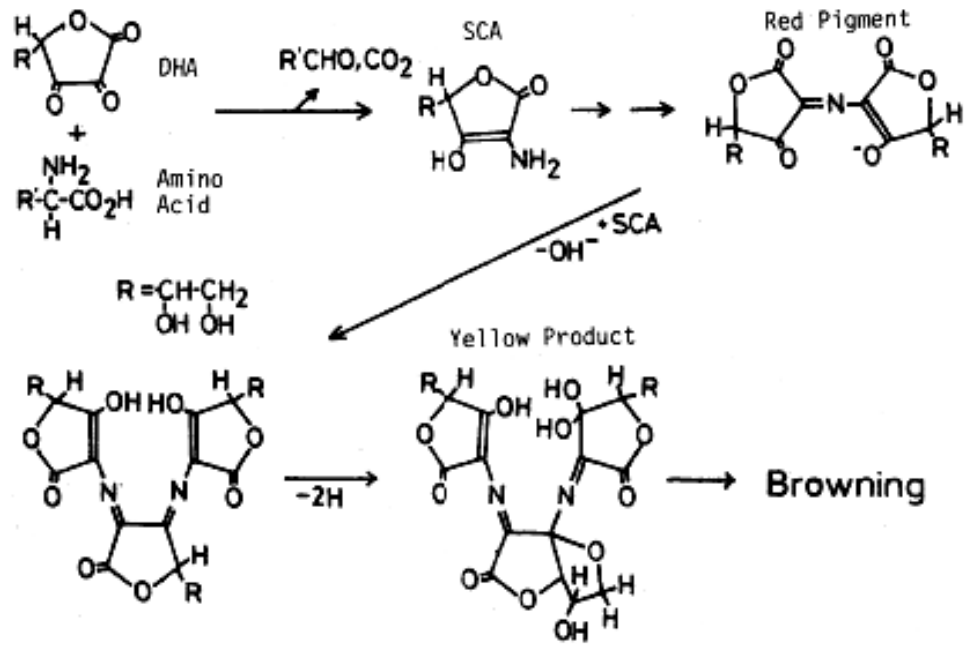
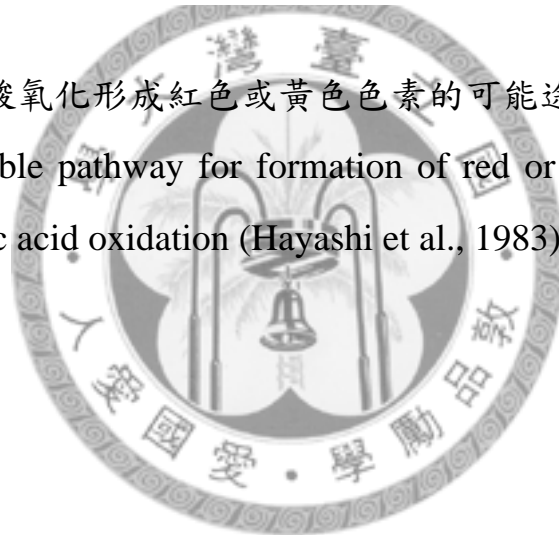


圖 1-2、抗壞血酸氧化形成紅色或黃色色素的可能途徑。

Fig. 1-2. A possible pathway for formation of red or yellow product in ascorbic acid oxidation (Hayashi et al., 1983).



二、抗壞血酸之穩定性

(1) 氧氣

食品加工過程中，氧氣容易與食品發生作用，而造成含抗壞血酸食品發生有氧降解。文獻指出，食品中抗壞血酸的降解速率與溶氧量呈正比 (Khan and Martell, 1967 ; Weissberger et al., 1944)；在柳橙汁加工過程中，玻璃罐裝柳橙汁去除上部空氣後於 24°C 儲藏 10 星期，其保留率仍有 70%，顯示去除氧氣使抗壞血酸的穩定性增加 (Kefford et al., 1959)。在無菌包裝番石榴果漿產品上，果漿成品之溶氧量及包裝時上部空隙的含氧量多寡是抗壞血酸降解的主要因素 (Chan and Cavaletto, 1986)。番石榴果漿在 30 °C 進行 12 週儲藏試驗下，初始含氧量對抗壞血酸的殘留及果漿的色澤有顯著的影響 (游, 1991)，顯示抗壞血酸降解可能影響色澤的呈現。然而，在檸檬汁儲藏於 36°C 的系統，初始溶氧濃度與抗壞血酸的降解無明顯相關 (Robertson and Samaniego, 1986)。

(2) 酸鹼值

酸鹼值 (pH) 是影響抗壞血酸的降解的主要因素，抗壞血酸在酸性溶液中的保留率較在鹼性溶液中好，當 pH 由 1.5 提高至 7.0 時，水溶液的抗壞血酸降解速率也隨著 pH 上升而上升，在柳橙汁系統下，當柳橙汁 pH 調整至 4.6，於 80°C 下加熱 40 分鐘，柳橙汁中抗壞血酸的保留率只剩下 72.1%，比其他較低 pH 的柳橙汁為差 (Roig et al., 1995)。另一方面，當溶液 pH 值超過 4 時，抗壞血酸保留率會有顯著的下降，而

在 pH 3 時，抗壞血酸會有最高的保留率 (Jeney-Nagymate and Fodor, 2008)。抗壞血酸的 pKa 在 4.04，使抗壞血酸於 pH 值 4 時有明顯的降解情形，而在厭氧條件下，抗壞血酸最大的降解速率發生在 pH 3-4 之間 (Tannenbaum et al., 1985)；而當 pH 由 3 降至 2 以下時，其無氧降解速率反而有提高的趨勢 (Huelin et al., 1971)。在酸性環境下，抗壞血酸的有氧和無氧降解會同時進行。在有氫離子催化的好氧環境下，抗壞血酸會氧化成去氫抗壞血酸，在經過一連串的反應，產生最終產物 2-furoic acid 和 3-hydroxy-2-pyrone；而在無氧環境下，抗壞血酸會直接降解成呋喃醛 (furfural) (Yuan and Chen, 1998)。因此，溶液酸鹼值的不同，除了會影響抗壞血酸降解的速率外，其降解路徑也可能不同。

(3) 溫度

不同加工條件造成溫度的改變，可能使抗壞血酸產生不同的降解速率。如：果汁在超過 60 °C 的巴斯德滅菌期間，抗壞血酸會快速流失 (Lohmann, 1987；Braddock and Sadler, 1989)；而在 90°C 進行 60 秒短時間殺菌時，抗壞血酸即降解 2.4%，殺菌時間越長則抗壞血酸降解越多 (Roig et al., 1995)。而蕃茄經過去皮程序後，先利用滲透壓脫水預處理，再經過熱風乾燥的抗壞血酸降解速率較無去皮對半切番茄直接經過熱風乾燥的抗壞血酸降解速率為慢；若提高乾燥溫度，也會加速抗壞血酸的降解速率 (Marfil et al., 2008)。除了加工時溫度的差異會影響抗壞血酸的降解，加工完成品的儲藏溫度也會造成產品中抗壞血酸的流失。在葡萄柚汁經過 10

°C 儲藏 12 週後抗壞血酸損失僅 1.3%，但在 50°C 儲藏 12 週的條件下，抗壞血酸損失卻高達 70.7 %，其 Q_{10} 值為 2.7 (Smoot and Nagy, 1980)。在柑橘汁中，儲藏溫度提高會使壞血酸濃度會下降，在 45°C 下儲藏時，抗壞血酸降解產物 -hydroxymethylfurfural (HMF) 的生成量比在 37 °C 下儲藏時高 2.7 倍，表示 HMF 的累積也和儲藏溫度有關 (Burdurlu et al., 2006)。從動力學角度，當儲藏溫度增加，抗壞血酸的降解速率常數會增加 (Uddin et al., 2002)。

(4) 水活性

抗壞血酸為水溶性的維生素，食品中的水活性直接影響抗壞血酸的穩定性。於去除氧氣的條件下，脫水食品中抗壞血酸的降解速率與其水活性、水分含量和儲藏溫度有關 (Kirk et al., 1977)。而於中溼性食品中，抗壞血酸的降解速率隨著水活性增加而增加。其原因推測為食品中水分含量的增加 (水活性增加) 降低了食品的黏度，因而增加了反應物的流動性 (Lee and Labua, 1975; Laing et al., 1978)。從動力學角度，當水活性從 0.43 增加到 0.97 或溫度從 30°C 增加到 50 °C 時，抗壞血酸的降解速率常數均有增加的情形 (Uddin et al., 2002)。

(5) 光線

抗壞血酸對光具有敏感性 (Karel, 1979; Lee and Nagy, 1988)。嬰兒配方溶液在光照下，初始溶氧量越高或光照強度越強，抗壞血酸的降解越快；而在避光時，抗壞血酸的降解

則與初始溶氧量無關 (Singh et al., 1976)。蘋果汁和柳橙汁暴露在不同光源 (照光或照 UV)，抗壞血酸的降解速率會有所不同。抗壞血酸不管儲藏於照光或避光的條件下都會降解，但在 UV 光照射下，抗壞血酸的降解速率較快 (Conrad, 2002)。光線強度增加會加速抗壞血酸對氧的吸收速率，進而加速抗壞血酸的降解作用 (Mack, 1974)。

當飲料包裝在光可穿透容器中，光的照射是造成抗壞血酸降解的主要因素 (Sahbaz and Somer, 1993)。在 PET 包裝中，柳橙汁於 20°C 避光條件時，抗壞血酸降解速率為每天 1.2 mg/L (Will et al., 2000)；在 250mL 利樂包包裝中，柳橙汁儲藏於 20 °C 避光條件時，抗壞血酸降解速率則為每天 0.65 mg/L (Sizer et al., 1988)；而在 1L 厚紙板包裝容器中，柳橙汁於 22 °C 儲藏條件下中，降解速率為每天 0.71 mg/L (Rassis and Saguy, 1995)。

(6) 金屬離子

金屬離子會催化氧氣對抗壞血酸的作用，特別是銅離子和鐵離子 (Martell, 1982；Tannenbaum et al., 1985)。水活性也為重要的環境因子，當水活性介於 0.1-0.4 時，銅離子和鐵離子對抗壞血酸氧化不具催化效力；而當水活性到達 0.65 時，銅、鐵離子對抗壞血酸氧化具有最強的催化效力 (Dennison and Kirk, 1982)。若於溶液中使用金屬螯合劑，如 ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) 和檸檬酸鹽，可以防止抗壞血酸的氧化作用 (Liao and Seib, 1987；Kanner and Shapira, 1989)。在葡萄汁系統中，添加金屬螯合劑 (EDTA)

可抑制抗壞血酸的氧化降解和褐變反應 (Kanner and Shapira, 1989)。然而，pH 值的差異會影響 EDTA 與金屬離子的螯合能力，在中性的 pH 值下，EDTA 會加速三價鐵離子對壞血酸的氧化作用 (Kanner et al., 1986; Mahoney and Graf, 1986; Beutter and Czapski, 1986)。

(7) 糖

糖 (酮糖) 的存在，會增加抗壞血酸厭氧性降解的速率 (Tannenbaum et al., 1985)，如：果糖 (Huelin, 1953)。然而，在檸檬汁系統中，可溶性固形物含量越高，抗壞血酸的降解卻越少，其原因被推測為水活性的降低 (Robertson and Samaniego-Esguerra, 1990)。此外，糖類可能對抗壞血酸有保護的作用。在不同果汁中，加工過程抗壞血酸降解程度有明顯的不同，如：柳橙汁和檸檬汁，會因果汁成分不同導致抗壞血酸降解程度不同的差異，但作用機制尚不清楚 (Roig et al., 1995)。

三、 乙醇對變色的影響

液態食品非酵素性褐變之研究大多以水相系統為對象，有關乙醇系統者很少，乙醇系統的變色反應與水相系統的變色反應有所不同，主要原因是：乙醇與水除了做為溶劑之外，彼此也都可以是反應物，與溶質交互作用，參與變色反應的進行，此論點在梅納反應 (Shen and Wu, 2004; Shen et al., 2007) 及花青素呈色反應的研究中已被發現 (Tseng et al., 2006)，而且證實有新產物之生成 (Shen et al., 2007)。傳統研究抗壞血酸褐變的反應系統多以水為溶劑，而在乙醇溶液中之研究極少，唯有 Bradshaw 等 (2001) 與 Liu 等 (2003) 觀察到乙醇溶液中，抗壞血酸會促進單寧的褐變，然此兩篇論文皆以單寧為主角，對於抗壞血酸本身的降解及其造成乙醇系統褐變的原因未多加討論。

在乙醇系統中補足抗壞血酸降解造成褐變之研究，包括其反應機制，將可較清楚地描繪出酒品貯藏過程中非酵素褐變之全貌，在製酒的學術面及產業面都會有很具體的貢獻，為此論文之主要預期。

第二章

市售產品成分分析

Compositions of Market Products



一、前言

欲瞭解抗壞血酸於乙醇系統中導致的變色情形，首要必須瞭解市面上含有抗壞血酸的酒類產品為何，並針對可能導致褐變的因子分析該產品的組成。本章先針對市面上之水果酒，尤其是水果利口酒、可能添加果汁或抗壞血酸的發酵酒、以及果汁調和酒進行成分分析。明瞭其乙醇、抗壞血酸、單寧類化合物含量，以及糖、游離胺基酸、有機酸、微量元素等之組成。

二、材料與方法

1. 原料：六種再製酒類係於 2009 年 2 月購自於台灣菸酒公司，包括玉泉荔枝酒 (乙醇濃度 13°)、玉泉梅酒 (乙醇濃度 13°)、玉泉烏梅酒 (乙醇濃度 13°) 及玉泉愛可涼酒系列 (紅葡萄、梅子、荔枝，乙醇濃度 3°)。樣品購回後隨即置於室溫避光陰涼處，貯藏備用。

2. 試藥

- (1) 醋酸 (acetic acid)、乙腈 (acetonitrile)、正丁醇 (*n*-butanol)、無水乙醇 (ethanol, 99.9%)、鹽酸 (hydrogen chloride)、甲醇 (methanol)、磷酸二氫鉀 (potassium dihydrogen phosphate, KH_2PO_4) 購自德國 Merck 公司 (Darmstadt, Germany)。

- (2) 抗壞血酸 (L-ascorbic acid)、兒茶素 ((+)-catechin)、檸檬酸 (citric acid)、甲酸 (formic acid)、果糖 (fructose)、半乳糖 (galactose)、沒食子酸 (gallic acid)、葡萄糖 (glucose)、福

林酚試劑 (Folin-Ciocalteu's reagent)、乳糖 (lactose)、蘋果酸 (L-malic acid)、麥芽糖 (maltose)、苯酚 (phenol)、碳酸鈉 (sodium carbonate)、琥珀酸 (succinic acid)、蔗糖 (sucrose)、酒石酸 (L-tartaric acid)、香草精 (vanillin)購自美國 Sigma 公司 (St Louis, MO, USA)。

3. 實驗方法

(1) 褐變指標 (browning index) 測定：參考 Gomez 等 (1995) 之方法，以分光光度計 (Herios α , Spectronic Unicam, Cambridge, UK)，直接測量酒液於 420 nm 之吸光值。

(2) 酸鹼值測定：以酸鹼度計 (PHM 290, pH-Stat Controller, Radiometer Analytical SAS, Lyon, France) 搭配同廠牌之玻璃電極 (pHG301-9) 及參考電極 (REF921) 測定之。

(3) 糖度：以手持式糖度曲折計 (N1, Atago, Tokyo, Japan) 測定之。

(4) CIE $L^*a^*b^*$ 值測定：利用色差儀 (ZE 2000, Color Meter, Nippon Denshoku, Tokyo, Japan) 測定。穿透式白板為 X: 93.18、Y: 95.18、Z: 112.18。 L^* 值表示明亮度，介於 0 (黑)-100 (白)； $+a^*$ 表示紅色度， $-a^*$ 表示綠色度； $+b^*$ 表示黃色度， $-b^*$ 表示藍色度。

(5) 總酚類化合物含量測定：樣品的總酚類化合物 (total polyphenolic compounds) 測定依據 Taga 等 (1984) 的方法

經修飾後進行。標準品 (沒食子酸, gallic acid) 或樣品 0.2mL 分別加入 1 mL Folin-Ciocalteu's reagent 及 0.8mL 碳酸鈉 (Na_2CO_3 , 7.5%) , 混勻放置 30 分鐘後, 使用分光光度計於 760nm 下測定其吸光值。並與沒食子酸之標準曲線對照, 計算樣品總酚類化合物含量。

(6) 總糖含量測定: 以苯酚-硫酸法 (Doubis et al., 1956) 測定之。取 1 mL 樣品加入 5 % 酚溶液後, 再迅速加入 5 mL 濃硫酸 (18 M), 於常溫水浴靜置 25 分鐘後, 測 490 nm 之吸光值。以葡萄糖 (0、10、30、50、70、90 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 當標準品, 製作檢量線。

(7) 縮合單寧測定: 參考 Julkunen-Tiitto (1985) 之方法, 取 0.2 mL 樣品加 0.3 mL 蒸餾水後, 再加入 3ml 4 % (w/v in methanol) vanillin 溶液混勻後, 加入 1.5 mL 濃鹽酸充分混合, 靜置於黑暗處 20 分鐘後, 測定樣品在 500 nm 的吸光值。另以(+)-catechin 作標準曲線, 以內插法求出樣品之縮合單寧量。

(8) 糖類組成分析:

- a. 樣品置備: 仿照方及張 (1982) 方法而略加修飾, 取酒液經 0.45 μm 濾膜過濾。
- b. 糖類標準品: 果糖 (fructose)、半乳糖(galactose)、葡萄糖 (glucose)、乳糖 (lactose)、麥芽糖 (maltose)、蔗糖 (sucrose) 共六種。

c. 分析儀器及操作條件：以高效能液相層析儀 (Series III pump, Lab Alliance, State College, PA, USA)，分離管柱為 Hypersil-100 amino (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m) (Thermo, Waltham, MA, USA)，移動相為 Acetonitrile/H₂O=75:25 (v/v)，溫度控制 35°C，流速 1 mL/min，樣品注入量 20 μ L，結合 Refractive Index (R.I.) 偵測器 (RI930, Jasco, Tokyo Japan) 檢測，並以各標準品以內插法求出樣品之糖類含量。

(9) 游離胺基酸分析

六種酒類樣品先以水楊酸 (40mg/mL) 以 1:3 的比例均勻混合十分鐘以去除蛋白質後，於 19,500 rpm (36,530 × g) 下離心 90 分鐘；離心完之上清液以 0.45 μ m 濾膜過濾後，取 20 μ L 加入胺基酸自動分析儀 (L-8900, Hitachi, Tokyo, Japan) 進行分析。分離管柱為 Hitachi HPLC Packed Column with Ion-exchanging Resin No. 2622 (4.6 x 60 mm) (Hitachi, Tokyo, Japan)，偵測器為 UV detector (570 & 440 nm)，樣品注射體積 20 μ L，管柱溫度 57°C，Reactor 溫度為 136°C。

(10) 金屬元素分析 (Ibanez et al., 2008)

取一定量樣品加入 3 倍體積的 pH 2.0 硝酸水溶液，震盪後經 Whatman #1 濾紙過濾，得到之濾液以感應耦合電漿質譜分析儀 (Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometer, Agilent 7500C, Agilent Technologies, Inc., CA, USA) 測定樣品中鈉、鎂、鉀、鈣、鐵、銅之含量。

(11)有機酸組成分析 (Zotou et al., 2004)

- a. 樣品置備：取樣品經 $2000 \times g$ 離心 10 分鐘後取上清液，再經 $0.45\mu\text{m}$ 濾膜過濾後備用。
- b. 有機酸標準品：醋酸 (acetic acid)、抗壞血酸 (L-ascorbic acid)、檸檬酸 (citric acid)、蘋果酸 (L-malic acid)、琥珀酸 (succinic acid)、酒石酸 (L-tartaric acid) 共六種。
- c. 分析儀器及操作條件：以高效能液相層析儀 (LC-20AT Prominence Liquid Chromatography, Shimadzu, Kyoto, Japan)，配以自動注射系統 (SIL-20A Prominence Auto Sampler, Shimadzu, Kyoto, Japan)；分離管柱為 Hypersil Gold C_{18} ($250\text{ mm} \times 4.6\text{ mm}, 5\mu\text{m}$) (Thermo, Waltham, MA, USA)，移動相為 $2.0\% \text{ KH}_2\text{PO}_4$ (pH 2.4)：甲醇=98：2，流速 1 mL/min ，樣品注射量 $20\mu\text{L}$ ，結合二極體陣列式檢測器 (SPD-M20A Prominence Diode Array Detector, Shimadzu, Kyoto, Japan)，在 210 nm 下測吸光，並以各標準品以內插法求出樣品之有機酸含量。

(12) 甲醇、乙醇含量測定

樣品中甲醇及乙醇含量依據酒類中甲醇之檢驗方法 (氣相層析法) (行政院衛生署，2003) 測定之。檢出器：火焰離子檢出器 (Flame ionization detector, FID)。層析管：DBWAX，內膜厚度 $0.25\mu\text{m}$ ，內徑 $0.25\text{ mm} \times 30\text{ m}$ ，兩支串聯。

氣相層析測定條件：

層析管溫度：初溫： 40°C ，8 min

溫度上升速率： 40°C/min

中溫：120°C，5 min

溫度上升速率：40°C/min

終溫：180°C，5 min

檢出器溫度：180°C

注入器溫度：180°C

移動相氮氣流速：20 mL/min

(13) 二氧化硫含量測定 (FOSS, 2008)

取 5g 樣品放入凱氏消化管內，將所有的凱氏消化管皆加入 50mL 二次去離子水和 60% 硼酸 25mL 後，以 Kjeldahl 自動蒸餾儀 (Model 2300, Foss tecator, Hoganas, Sweden) 進行二氧化硫蒸餾，餾出液以 0.05N 氫氧化鈉滴定之，並以 30 mg 亞硫酸鈉為正控制組進行確認。

$$\text{計算：} \quad SO_2(ppm) = \frac{(T - B) \times N \times 32000}{C}$$

B = 空白試驗所用之 0.05N 氫氧化鈉溶液量 (mL)

T = 本試驗所用之 0.05N 氫氧化鈉溶液量 (mL)

C = 試樣重量 (g)

4. 統計分析

本章之各實驗數值均為三重覆，所得之數據以平均值 (mean) ± 標準差 (standard deviation; S.D.) 表示，並使用 SAS (Statistical Analysis System V9.1, 2002) 之統計套裝軟體 (SAS Inc., NC, USA) 進行數據統計分析及相關性分析。數據分析先以單因子變異數分析 (One-way ANOVA) 比較各組之間之差異，再以鄧肯式多變域分析法 (Duncan's multiple range method) 作顯著性差異之比較。統計之顯著性均以 $p < 0.05$ 為標準。

三、 結果與討論

表 2-1 為市售樣品之褐變指標、酸鹼度、糖度及 $L^*a^*b^*$ 之數據，在六個被挑選的樣品中，若以同樣濃度乙醇為討論的基準，則於標示 13% 乙醇濃度下，玉泉烏梅酒具有最高的褐變指標，且具有最低的 L^* 值與最高的 a^* 及 b^* 值，顯示在產品中，玉泉烏梅酒的顏色比較偏黃褐色，且亮度較低，而於 pH 值方面，以玉泉荔枝酒之 pH 為最高，其次為玉泉烏梅酒及玉泉梅酒。於標示 3% 乙醇濃度下，玉泉愛可紅葡萄涼酒因產品特性的關係，本身顏色偏紅，也導致有較高的褐變指標、 a^* 值及 b^* 值， L^* 值則較低，然而於 pH 方面，皆於 3 以下。在一般果汁的酸鹼範圍內，pH 可影響抗壞血酸降解速率 (Tannenbaum et al., 1985; Champagne et al., 1990)，而在 pH 低於 2 時，抗壞血酸的厭氧降解速率有提高的趨勢 (Huelin et al., 1971)，後續模式系統中應首要固定 pH 值。

表 2-2 為市售產品中之總酚含量、總糖含量、縮合單寧含量分析，在玉泉愛可紅葡萄酒的樣品中，數據雖顯示具有高的總酚及縮合單寧含量，但仍因樣品特性的關係，酒色在未實驗前即偏紅褐色，於分光光度計測量時即易發生干擾，因此數值在此不考慮。除此之外，烏梅酒、梅酒具有較高的總酚類化合物含量，荔枝酒雖含有較低之總酚類化合物，但其縮合單寧佔總酚類化合物約 87.16%。單寧類化合物已知與多酚類容易進行偶合氧化及縮合反應，形成深色的高分子聚合物 (Liu et al., 2003)，在此批樣品檢測中，高比例的單寧含量 (荔枝酒) 及高濃度的酚類化合物 (烏梅酒) 皆具有高的褐變指標，因此單寧類化合物也應加入為後續模式系統之變因。而於 3% 乙醇濃度之產品中，總酚、縮合單寧的量皆少於 13% 乙醇濃度之組別，故不多加討論。

至於總糖含量，以梅酒及烏梅酒含量為最高，梅子在加工過程

中，可能經過刺皮後醃製，使糖液得以滲入梅子內部，因此梅子浸漬酒相關產品的糖濃度較高是可想見的，而其他酒類產品的糖度約為 10 度，顯示台灣菸酒公司的酒類產品於出廠時應有調整糖度，且目標糖濃度應該為 10 度。在果汁的觀念中，可溶性固型物的含量越高，抗壞血酸的降解速率可能越慢，其原因可能與水活性降低、糖類保護抗壞血酸之作用相關；糖濃度增加可提高食品黏度，而降低氧在基質中的溶解度及氣泡中的擴散速率，防止抗壞血酸的氧化 (Gordon and Samaniego-Esguerra, 1990)。因此，糖應也為探討抗壞血酸降解的重要因子。

表 2-3 為六項產品之糖類組成，以 13%乙醇濃度之組別而言，果糖含量皆明顯高於其他組別，其來源可能為水果原料本身具有的糖，而 3%乙醇濃度之組別，其蔗糖含量高於 13%乙醇濃度組，推測在成品中可能有添加蔗糖調整糖度。不同的糖種類對於抗壞血酸的降解可能有不同的作用，例如果糖在酸性環境下的開環比例大於葡萄糖 (del Pilar Buera et al., 1987b)，其影響褐變程度可能高於葡萄糖，因此後續實驗可以針對不同糖種類進行探討。

表 2-4 為六項產品之胺基酸組成，在 13%乙醇濃度的酒品系列，梅酒及烏梅酒之最高量胺基酸為天門冬胺酸 (Aspartic acid, Asp)，而荔枝酒之最高量胺基酸為丙胺酸 (Alanine, Ala)；但在 3%系列的荔枝酒中，Asp 為最高含量之胺基酸。在抗壞血酸果汁模式系統中，胺基酸有促進褐變的效果 (Shinoda et al., 2005)，其中 Asp 與抗壞血酸共同存在時，褐變更加劇烈 (陳，1989)，因此胺基酸也為抗壞血酸降解的重要因子之一。

市售產品之金屬元素組成如表 2-5 所示，高量的鉀在各樣品中皆明顯發現，其次為鈉。在梅納反應中，金屬離子可能為影響液體產品

變色的因子 (Tannenbaum et al., 1985; Petriella et al., 1988)，而 Liu 等 (2003) 也指出 Ca^{2+} 、 Sn^{2+} 可使 hydroxymethyl furfural (HMF) 的生成速率增加，造成褐變指標的變化，因此在後續實驗應考慮金屬離子存在時造成的褐變情形。

表 2-6 顯示六種樣品中有機酸組成之情形，在玉泉荔枝酒及玉泉烏梅酒中，較高量之有機酸為醋酸，其次為檸檬酸；而於玉泉梅酒中，較高量之有機酸為檸檬酸，其餘 3% 乙醇濃度系列之有機酸含量皆偏少。有機酸可能與糖的降解物產生聚合作用 (Akhavan and Wrolstad, 1980)，造成食品色澤變異的情形，而 Liu 等 (2003) 在酸溶液模式系統中也發現不同酸的褐變速率：檸檬酸 > 蘋果酸 > 草酸，因此不同酸的存在下可能對於抗壞血酸降解會有不同的影響，應列入考慮的變因中。

表 2-7 針對六種樣品中之乙醇、甲醇及二氧化硫含量進行分析，在果汁及果酒加工及貯藏過程中，可能產生甲醇 (Hou et al., 2008)；本實驗中六種樣品隨貯藏時間的增加，其標示的乙醇可能也與內容物有些微的差異；在酒類加工過程中，也可能添加二氧化硫以抑制雜菌生長，而二氧化硫會與抗壞血酸結合並氧化形成去氫抗壞血酸及 H_2O_2 (Deutsch, 1998; Peng et al., 1998; Chapon and Chapon, 1979; Bauernfeind and Pinkert, 1970)，因此瞭解酒類中甲醇、乙醇、二氧化硫的含量，可減少後續模式系統之結果套用回真實系統的誤差，並可更貼切地建構模式系統。

四、 結論

玉泉愛可涼酒系列，扣除紅色可能影響吸光值之產品（愛可紅葡萄酒）後，其餘兩樣品之胺基酸、總酚、單寧、有機酸皆偏低，顯示果汁成分可能偏少，故不列入後續實驗參考。其餘 13% 乙醇濃度之玉泉市售產品中之糖含量約 10-20%、胺基酸含量約 0.2-0.4 mg/mL、單寧含量約 36-85 mg/L、金屬元素含量約 460-500 mg/L、有機酸總含量約為 4.2-5 mg/mL，此些因子皆可能影響浸漬酒中色澤變化，此章產生之相關數據將作為後續研究之基礎。



表 2-1、市售涼酒之褐變指標、酸鹼度、糖度、色澤分析

Table 2-1. Browning index, pH, °Brix, L*a*b* values of commercial wine coolers

	browning index ¹	pH	°Brix	L*	a*	b*
玉泉荔枝酒	0.523	3.32	15.8	86.81	-1.44	29.09
玉泉梅酒	0.424	2.62	24.1	86.73	-1.99	25.67
玉泉烏梅酒	1.063	2.96	24.0	75.74	9.42	59.45
玉泉愛可紅葡萄酒	0.785	2.58	11.6	64.88	32.05	32.94
玉泉愛可荔枝酒	0.141	2.87	11.4	92.6	-1.74	9.79
玉泉愛可梅酒	0.052	2.45	11.0	93.92	-1.13	4.52

¹browning index: the absorbance at 420 nm.

表 2-2、市售涼酒之總酚含量、總糖含量、縮合單寧含量分析

Table 2-2. Total phenolics, total sugars, condensed tannins in commercial wine coolers

	total phenolics (mg/L)	total sugars (%)	condensed tannins (mg/L)
玉泉荔枝酒	54.20± 2.15	10.49 ± 0.03	47.24 ± 2.86
玉泉梅酒	107.24± 0.76	19.06 ± 0.03	36.29 ± 4.59
玉泉烏梅酒	199.46± 4.75	18.33 ± 0.05	83.90 ± 3.60
玉泉愛可紅葡萄酒	197.49± 3.16	10.49 ± 0.03	186.29 ± 7.33
玉泉愛可荔枝酒	12.68± 0.76	9.15 ± 0.06	15.33 ± 0.82
玉泉愛可梅酒	21.80± 1.14	10.22 ± 0.03	9.14 ± 1.65

*Each value represents mean ± S.D. (n=3).

表 2-3、市售涼酒之糖類組成 (g/100mL)

Table 2-3. Sugar contents of commercial wine coolers (g/100mL)

	Fructose	Galactose	Glucose	Lactose	Maltose	Sucrose
玉泉荔枝酒	5.84 ± 0.51	ND ¹	3.72 ± 0.22	ND	ND	0.43 ± 0.01
玉泉梅酒	11.22 ± 0.57	ND	8.21 ± 0.87	ND	ND	0.80 ± 0.16
玉泉烏梅酒	9.51 ± 0.51	ND	7.14 ± 0.34	ND	ND	0.08 ± 0.01
玉泉愛可紅葡萄酒	5.34 ± 0.57	ND	4.06 ± 0.23	ND	ND	2.47 ± 0.03
玉泉愛可荔枝酒	4.90 ± 0.06	ND	2.23 ± 0.26	ND	ND	1.87 ± 0.44
玉泉愛可梅酒	5.05 ± 0.33	ND	3.39 ± 0.12	ND	ND	2.32 ± 0.50

*Each value represents mean ± S.D. (n=3).

¹ND: not detectable.

表 2-4、市售涼酒之胺基酸組成 (mg/mL)

Table 2-4. Amino acid profiles of commercial wine coolers (mg/mL)

	玉泉 荔枝酒	玉泉 梅酒	玉泉 烏梅酒	玉泉愛可 紅葡萄酒	玉泉愛可 荔枝酒	玉泉愛可 梅酒
Asp	0.017	0.191	0.209	0.015	0.119	0.041
Thr	0.005	0.013	0.011	0.009	0.004	0.003
Ser	0.009	0.015	0.013	0.011	0.008	0.003
Glu	0.038	0.037	0.035	0.048	0.031	0.008
Pro	0.017	0.016	0.041	0.182	0.006	0.003
Gly	0.007	0.012	0.009	0.006	0.090	0.003
Ala	0.060	0.023	0.024	0.014	0.047	0.004
Cys	0.008	0.005	0.006	0.004	0.011	0.002
Val	0.011	0.015	0.012	0.008	0.008	0.004
Mel	ND ¹	ND	ND	ND	0.002	ND
Ile	0.006	0.010	0.007	0.004	0.004	0.002
Leu	0.005	0.020	0.014	0.007	0.003	0.004
Tyr	0.006	0.008	0.006	0.005	0.005	0.005
Phe	0.005	0.013	0.008	0.006	0.003	0.004
Lys	0.004	0.012	0.007	0.007	0.004	0.002
His	0.002	0.006	0.003	0.008	0.002	0.001
Arg	0.001	0.008	0.004	0.073	0.002	0.001
Total	0.199	0.402	0.409	0.408	0.350	0.092
NH ₃	0.068	0.151	0.164	0.058	0.079	0.319

¹ND: not detectable.

表 2-5、市售涼酒之金屬元素組成 (mg/L)

Table 2-5. Metal contents of commercial wine coolers (mg/L)

	Na	Mg	K	Ca	Fe	Cu
玉泉荔枝酒	834.0	288.8	4086.6	121.6	11.5	0.4
玉泉梅酒	575.1	180.5	4152.1	130.8	6.3	0.8
玉泉烏梅酒	384.1	248.2	4653.5	256.3	5.5	0.3
玉泉愛可紅葡萄酒	824.8	164.6	1979.6	332.7	20.8	0.2
玉泉愛可荔枝酒	328.3	162.8	3120.7	115.4	2.3	0.3
玉泉愛可梅酒	999.7	35.38	900.5	51.44	1.9	0.1

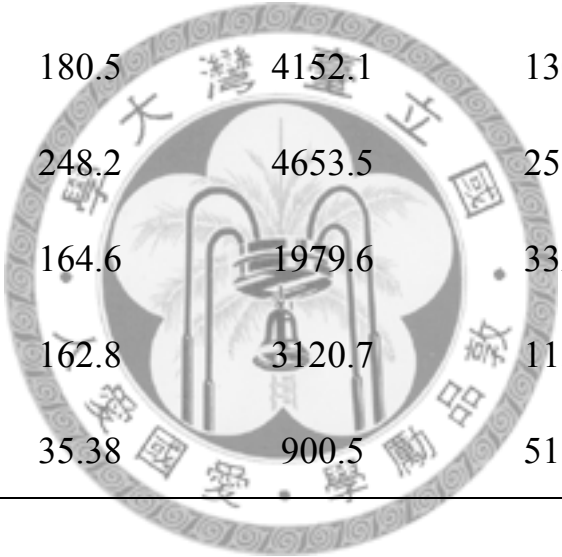


表 2-6、市售涼酒之有機酸組成 (mg/mL)

Table 2-6. Organic acid contents of commercial wine coolers (mg/mL)

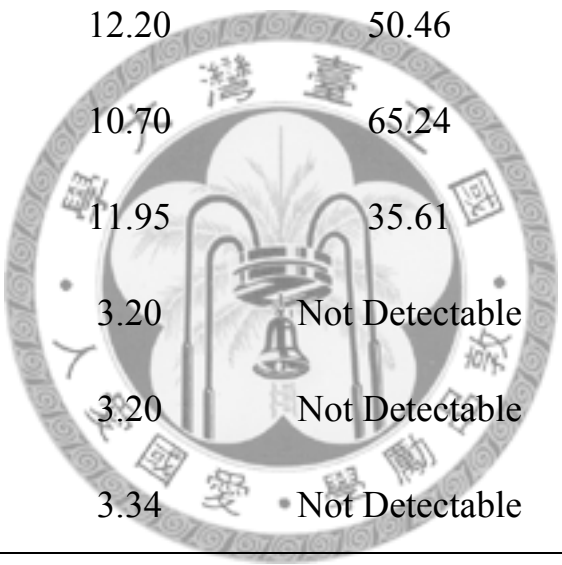
	Acetic acid	Citric acid	Formic acid	Malic acid	Oxalic acid	Succinic acid	Tartaric acid
玉泉荔枝酒	2.65 ± 0.13	0.83 ± 0.07	ND ¹	0.33 ± 0.01	0.30 ± 0.11	0.19 ± 0.01	0.37 ± 0.03
玉泉梅酒	0.81 ± 0.17	3.37 ± 0.74	ND	0.30 ± 0.04	0.57 ± 0.01	ND	ND
玉泉烏梅酒	2.24 ± 0.19	1.52 ± 0.14	ND	ND	0.58 ± 0.01	ND	ND
玉泉愛可紅葡萄酒	0.68 ± 0.05	ND	ND	ND	0.15 ± 0.00	ND	1.10 ± 0.13
玉泉愛可荔枝酒	0.78 ± 0.10	ND	ND	0.28 ± 0.07	0.27 ± 0.01	ND	ND
玉泉愛可梅酒	0.10 ± 0.00	ND	ND	ND	0.34 ± 0.01	ND	ND

¹ND: not detectable.

表 2-7、市售涼酒之乙醇、甲醇及二氧化硫含量分析

Table 2-7. Ethanol, Methanol and Sulfur dioxide contents in commercial wine coolers

	乙醇標示含量	Ethanol (°)	Methanol (ppm)	二氧化硫 (ppm)
玉泉荔枝酒	13°	12.20	50.46	690 ± 2
玉泉梅酒	13°	10.70	65.24	140 ± 1
玉泉烏梅酒	13°	11.95	35.61	390 ± 8
玉泉愛可紅葡萄酒	3°	3.20	Not Detectable	270 ± 10
玉泉愛可荔枝酒	3°	3.20	Not Detectable	330 ± 2
玉泉愛可梅酒	3°	3.34	Not Detectable	370 ± 6



第三章

化學成分對乙醇溶液

抗壞血酸降解及褐變之影響

Effect of Chemical Components on Ascorbic Acid Degradation and Browning in Ethanolic Solutions



一、前言

由前章市售樣品之成分分析結果，得知 pH 值、糖種類及濃度、胺基酸、單寧類化合物、金屬元素、有機酸皆為可能影響抗壞血酸降解之因子。故本章選擇上述因子中可能促進褐變之種類，配製不同乙醇濃度之高濃度抗壞血酸溶液，於高於室溫的溫度下避光貯存，每週進行物理、化學測定，以推測含抗壞血酸酒類中可能造成褐變之機制。

二、材料與方法

1. 材料：第二章實驗中可能與抗壞血酸降解相關之因子包括 pH 值、糖種類及濃度、胺基酸、單寧類化合物、金屬元素、有機酸等。本章以 pH 3.0 模擬樣品酸鹼度、果糖代表糖類、天冬醯胺代表胺基酸、兒茶素代表縮合單寧、Ca 代表金屬元素、檸檬酸代表有機酸，以無水乙醇配製各乙醇模式溶液進行後續實驗。

2. 試藥

- (1) 醋酸 (acetic acid)、乙腈 (acetonitrile)、無水乙醇 (ethanol, 99.9%)、磷酸 (phosphoric acid) 購於德國 Merck 公司 (Darmstadt, Germany)。
- (2) 天冬醯胺 (asparagine)、抗壞血酸 (L-ascorbic acid)、氯化鈣 (calcium chloride)、兒茶素 ((+)-catechin)、檸檬酸 (citric acid)、果糖 (fructose) 購於美國 Sigma 公司 (St Louis, MO, USA)。

(3) Furfural、2-furoic acid、5-hydroxymethyl furfural (5-HMF)

購於美國 Chem Service 公司 (West Chester, PA, USA)。

(4) 3-Hydroxy-2-pyrone 購於美國 Tyger 公司 (Ewing, NJ, USA)。

3. 實驗方法

(1) 模式系統配製：根據第二章測得之各成分，以高濃度配製模式溶液，加入高濃度抗壞血酸溶液 (0.25 mg/mL) 中，並加入乙醇使成最終濃度為 0、5、10、25、50%，各成分之最終濃度如下：果糖 (2.4 mg/mL)、天冬醯胺 (0.3 mg/mL)、兒茶素 (0.25 mg/mL)、氯化鈣 (0.25 mg/mL，溶於水後 Ca 濃度約為 0.09 mg/mL)、檸檬酸 (10 mg/mL)，其模式溶液組別及實驗流程如圖 3-1，並於調配將近最終體積時調整 pH 至 3.0，緩慢添加二次水及調整 pH，以求最終濃度條件精準。

全部分為七組：

A：ascorbic acid 單獨存在組

B：ascorbic + fructose 組

C：ascorbic acid + asparagine 組

D：ascorbic acid + catechin 組

E：ascorbic acid + CaCl₂ 組

F：ascorbic acid + citric acid 組

G：ascorbic acid + fructose + asparagine + catechin + CaCl₂ +
citric acid 組

(2) 褐變指標 (browning index) 測定：參考 Gomez 等 (1995) 之方法，以分光光度計 (Herios α , Spectronic Unicam, Cambridge, UK)，直接測量酒液於 420 nm 之吸光值。

(3) 酸鹼值測定：以酸鹼度計 (PHM 290, pH-Stat Controller, Radiometer Analytical SAS, Lyon, France) 搭配同廠牌之玻璃電極 (pHG301-9) 及參考電極 (REF921) 測定之。

(4) CIE $L^*a^*b^*$ 值測定：利用色差儀 (ZE 2000, Color Meter, Nippon Denshoku, Tokyo, Japan) 測定。穿透式白板為 X: 93.18、Y: 95.18、Z: 112.18。 L^* 值表示明亮度，介於 0 (黑)-100 (白)； $+a^*$ 表示紅色度， $-a^*$ 表示綠色度； $+b^*$ 表示黃色度， $-b^*$ 表示藍色度；色相角度 (hue angle) 以 $\tan^{-1}(b^*/a^*)$ 表示。

(5) 抗壞血酸含量分析 (Zotou et al., 2004)

- a. 樣品製備：取樣品經 $2000 \times g$ 離心 10 分鐘後取上清液，再經 $0.45\mu\text{m}$ 濾膜過濾後備用。
- b. 分析儀器及操作條件：以高效能液相層析儀 (LC-20AT Prominence Liquid Chromatography, Shimadzu, Kyoto, Japan)，配以自動注射系統 (SIL-20A Prominence Auto Sampler, Shimadzu, Kyoto, Japan)；分離管柱為 Hypersil Gold C_{18} ($250\text{ mm} \times 4.6\text{ mm}$, $5\mu\text{m}$) (Thermo, Waltham, MA, USA)，移動相為 2.0 % KH_2PO_4 (pH 2.4)：甲醇=98：2，流速 1 mL/min，樣品注射量 $20\mu\text{L}$ ，結合二極體陣列式檢測

器 (SPD-M20A Prominence Diode Array Detector, Shimadzu, Kyoto, Japan), 在 244 nm 下測吸光, 並以內插法求出樣品之抗壞血酸含量。

(6) 抗壞血酸降解產物及兒茶素含量分析 (Lee and Nagy, 1988; Shinoda et al., 2005)

- a. 樣品製備：取樣品經離心後取上清液，再經 0.45 μ m 濾膜過濾後備用。
- b. 抗壞血酸降解產物及兒茶素標準品：Furfural、2-furoic acid、5-HMF 3-hydroxy-2-pyrone、catechin 共五種。
- c. 分析儀器及操作條件：以高效能液相層析儀 (LC-20AT Prominence Liquid Chromatography, Shimadzu, Kyoto, Japan)，配以自動注射系統 (SIL-20A Prominence Auto Sampler, Shimadzu, Kyoto, Japan)；分離管柱為 Hypersil Gold C₁₈ (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m) (Thermo, Waltham, MA, USA)，移動相為 0.05M acetic acid：acetonitrile=98：2，流速 0.7 mL/min，樣品注射量 20 μ L，結合二極體陣列式檢測器 (SPD-M20A Prominence Diode Array Detector, Shimadzu, Kyoto, Japan)，在 254、283、300 nm 下測吸光，並以內插法求出樣品之各抗壞血酸降解產物含量。
- d. 降解產物之最大吸光波長及滯留時間：furfural (283 nm, 12.4 min)、2-furoic acid (254 nm, 13.0 min)、5-HMF (283 nm, 9.0 min)、3-hydroxy-2-pyrone (300 nm, 7.3 min)、catechin (283 nm, 15.0 min)。

4. 統計分析

本章之各實驗數值均為三重覆，所得之數據以平均值 (mean) \pm 標準差 (standard deviation; S.D.) 表示，並使用 SAS (Statistical Analysis System V9.1, 2002) 之統計套裝軟體 (SAS Inc., NC, USA) 進行數據統計分析及相關性分析。數據分析先以單因子變異數分析 (One-way ANOVA) 比較各組之間之差異，再以鄧肯式多變域分析法 (Duncan's multiple range method) 作顯著性差異之比較。統計之顯著性均以 $p < 0.05$ 為標準。



三、 結果與討論

1. 乙醇濃度之影響

圖 3-2 為各模式溶液於貯藏期間之褐變指標變化，在不同乙醇濃度的條件下，褐變指標也有不同的差異。在 0%乙醇濃度時，所有成分全添加組 (G 組) 之褐變指標高於抗壞血酸+兒茶素組 (D 組)，並隨著乙醇濃度上升，褐變指標呈現下降的情形，但隨著乙醇濃度增加至 25%，其褐變指標與 50%組之間無顯著差異；而其他成分添加組之間則無顯著差異，褐變指標始終於吸光值 0 附近，顯示抗壞血酸與兒茶素共同存在時，可造成模式溶液之褐變情形，且褐變於其他成分皆存在時，可能有其他褐變情形同時產生 (如梅納反應)，使褐變有加成之作用。此結果也證明乙醇可能對抗壞血酸褐變有減緩的作用，且於 0-25%乙醇濃度時呈現濃度效應 ($p<0.05$)，此結果與 Shen 及 Wu (2004) 在 glucose-glycine 模式系統之實驗結果相反，因此可推測乙醇影響 ascorbic acid 模式系統的褐變與梅納反應系統褐變的機制不同。

圖 3-3 為各模式溶液於貯藏期間之亮度變化，於此實驗中，亮度變化與褐變指標的數值相關，當褐變指標越高，亮度值有越低的趨勢。當所有成分全添加 (G 組) 時，亮度隨著貯藏時間的增加而減少，且明顯低於次之的抗壞血酸與兒茶素組及其他組。於 0-25%乙醇濃度時，亮度與乙醇濃度呈現濃度效應 ($p<0.05$)，但於 25%與 50%乙醇濃度組之間無顯著差異，此與褐變指標之變化情形相同。

表 3-1 至 3-5 顯示各乙醇濃度模式溶液於貯藏期間色相角度之變化，D 組及 G 組之色相角度變化相同，且與其他組有顯著差異。然而，不同乙醇濃度下各組別色相角度的變化有相同的趨

勢，顯示色相角度不被乙醇濃度影響。色相角度相同表示眼睛看到的顏色也相同；同組別下，乙醇濃度的差異可能使顏色深淺發生變化，但不改變顏色。

表 3-6 為含兒茶素模式溶液中，不同乙醇濃度對貯藏期間兒茶素含量之影響，於添加抗壞血酸與兒茶素組，10%乙醇濃度於第一週對兒茶素的保留率最低，其次為 25%乙醇濃度；直到第五週，在 10%至 50%乙醇濃度之間，兒茶素保留量與乙醇濃度一直呈現正相關趨勢。於所有成分全添加組中，25%乙醇濃度組之兒茶素含量於貯藏期間皆高於 50%乙醇濃度組，且較高濃度乙醇 (10、25、50%) 對於兒茶素的保留率明顯優於較低濃度乙醇組 (0、5%) ($p < 0.05$)。兒茶素於低乙醇濃度溶液，可能容易聚合而使含量降低 (Liu et al., 2003)，且在本實驗中，各成分皆存在時可能使環境複雜，增加了兒茶素與各成分聚合的機率，使得保留量低於抗壞血酸與兒茶素組。

圖 3-4 為不同乙醇濃度模式溶液貯藏期間抗壞血酸降解產物 2-furoic acid 含量之變化，在 0%乙醇度時，2-furoic acid 主要存在於 ascorbic acid + fructose 及 ascorbic acid + catechin 組，而 5%乙醇濃度時，除了 ascorbic acid + CaCl_2 及所有產物皆添加組外，其餘組別皆有明顯的 2-furoic acid 產生，且隨著乙醇濃度的上升，2-furoic acid 的含量逐漸下降，但 25 及 50%組則下降至 0，而無顯著差異。顯示乙醇濃度不同，抗壞血酸降解反應速率可能有所不同。而於表 3-7 至 3-11，4-5 週時 3-hydroxy-2-pyrone 含量隨著乙醇濃度的提高 (0-25%) 而增加，且 25 及 50%組無顯著差異，顯示 0-25%乙醇濃度對於抗壞血酸降解具有濃度效應。在貯藏期間，梅納褐變產物 5-HMF 及抗壞血酸無氧降解產物 furfural 皆無

發現，顯示梅納褐變並不於此模式系統中產生，且本實驗中抗壞血酸降解途徑應為有氧降解。食品加工過程中，五碳糖產生之 5-HMF 及六碳糖產生之 furfural 會因氧化作用產生 2-furoic acid (Arribas-Lorenzo and Morales, 2010)，在此論文中應無此情形發生。另外，Kimoto 等 (1993) 指出，抗壞血酸會先變化成去氫抗壞血酸，不穩定的去氫抗壞血酸內部產生氧化還原反應，轉變成烯醇形式 (enolic form) 之 2-keto-3-deoxy-pentonic acid，而後脫水形成不飽和 α -keto acid，再脫水形成 furan 形式之 2-furoic acid 或 2-pyrone 形式之 3-hydroxy-2-pyrone。在本論文中在不同乙醇濃度下檢測抗壞血酸降解產物之生成，乙醇易與水結合的特性可能使其他分子脫水，而使 3-hydroxy-2-pyrone 含量增加，此假說在下一章有更詳盡的解釋，而 3-hydroxy-2-pyrone 與 2-furoic acid 的消長情形，應可建立另一套模式系統觀察。

2. 各化學成分之影響

在抗壞血酸單獨 (A 組) 存在時，其褐變指標 (圖 3-2)、亮度 (圖 3-3)、色相角度 (表 3-1 至 3-5)、2-furoic acid 含量 (圖 3-4)、3-hydroxy-2-pyrone 含量 (表 3-7 至 3-11) 之變化於各乙醇濃度下皆與抗壞血酸+果糖組 (B 組)、抗壞血酸+天冬醯胺組 (C 組)、抗壞血酸+氯化鈣組 (E 組)、抗壞血酸+檸檬酸組 (F 組) 的趨勢相似，顯示此四種化學成分對於抗壞血酸降解應無特別的影響。

在抗壞血酸+兒茶素組 (D 組) 及所有成分皆添加組 (G 組) 其褐變指標 (圖 3-2)、亮度 (圖 3-3)、色相角度 (表 3-1 至 3-5) 之變化皆相似，且於褐變指標與亮度之間，G 組變化程度明顯高於 D 組，顯示多種成分複合存在時，可使褐變作用更加顯著。2-furoic

acid (圖 3-4)、3-hydroxy-2-pyrone (表 3-7 至 3-11) 在 D 組的含量皆高於 G 組，此現象推測是在 G 組中抗壞血酸降解產物與其他成分結合，形成聚合物後導致含量降低，而使褐變程度增加及亮度減少，此結論與水相模式系統中的結論相同 (鄭，1996)。Shinoda 等 (2005) 指出，橘子汁模式系統中抗壞血酸存在時之褐變，與 3-hydroxy-2-pyrone 含量呈現正相關，但於本實驗中並無此情形，且隨著貯藏時間增加，其含量呈現下降的趨勢，應為模式系統成分不同，或是抗壞血酸褐變的全貌未被完整勾勒出造成之結果。



四、 結論

抗壞血酸與兒茶素共同存在時，容易形成褐變，且當乙醇濃度越高時，褐變情形有減緩的作用。實驗中所選擇的成分，除了兒茶素外，其他成分單獨存在時對抗壞血酸降解及褐變並無造成明顯的影響。而當各成分共同存在時，雖然抗壞血酸降解產物低於抗壞血酸+兒茶素組，但褐變情形明顯增加，可能原因為抗壞血酸降解產物與各成分互相聚合導致。此模式系統可略窺含抗壞血酸酒類相關產品褐變的機制，提供後續研究之參考。



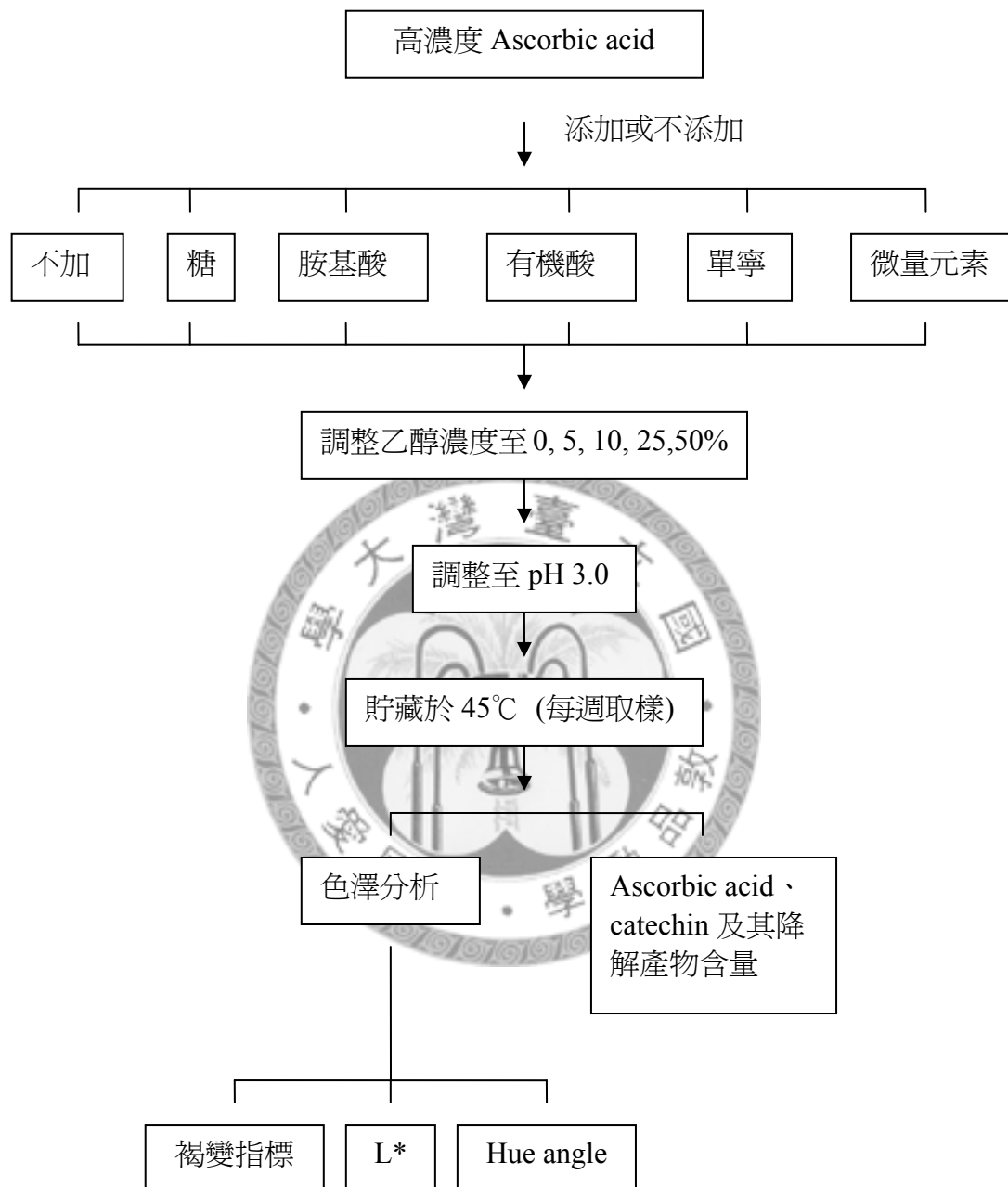


圖 3-1、實驗流程。

Figure 3-1. Flow chart of experiments.

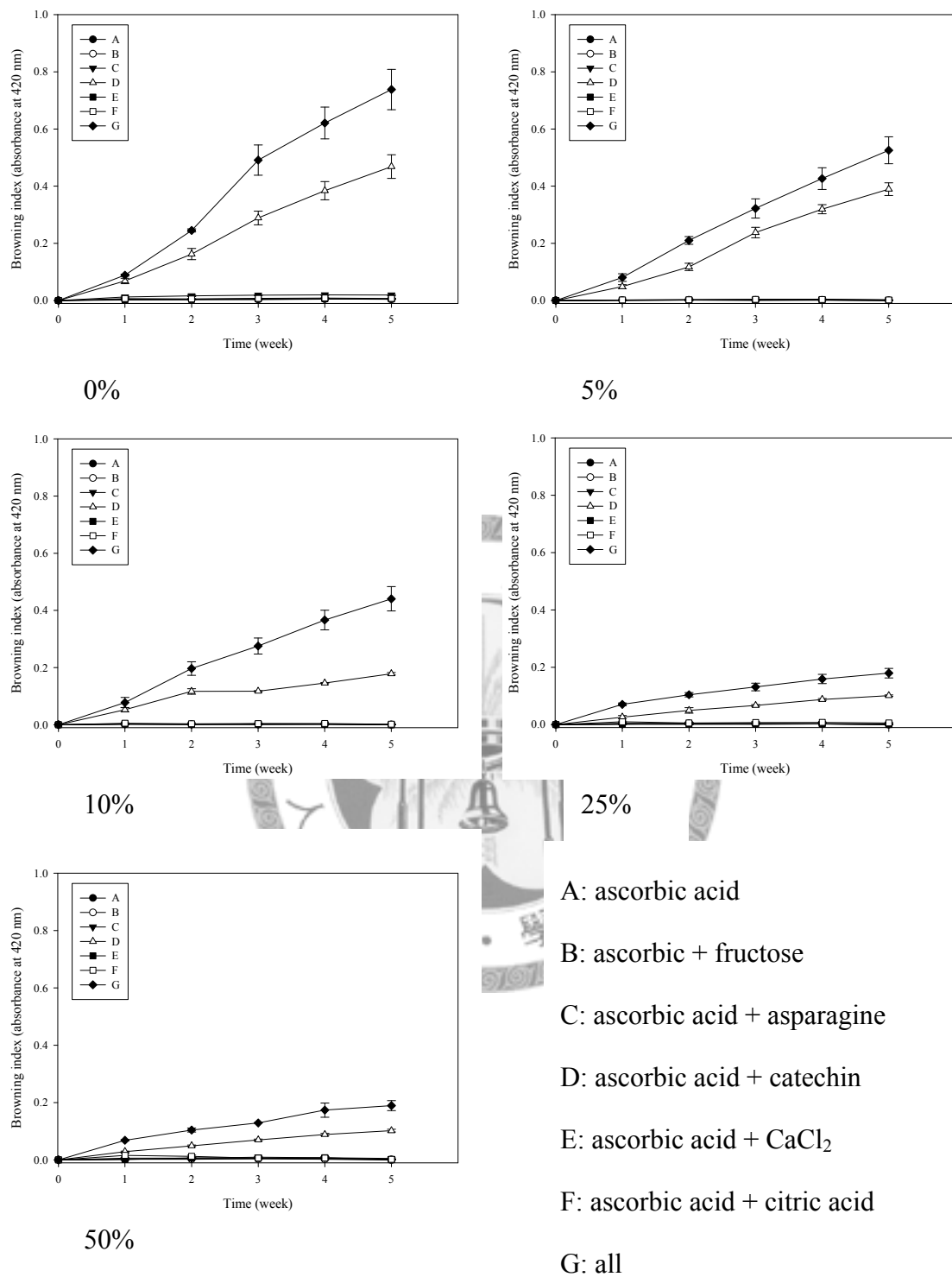


圖 3-2、不同乙醇濃度模式溶液貯藏期間之褐變指標變化。

Figure 3-2. Changes in browning index of model solutions with different ethanol concentrations during storage at 45°C.

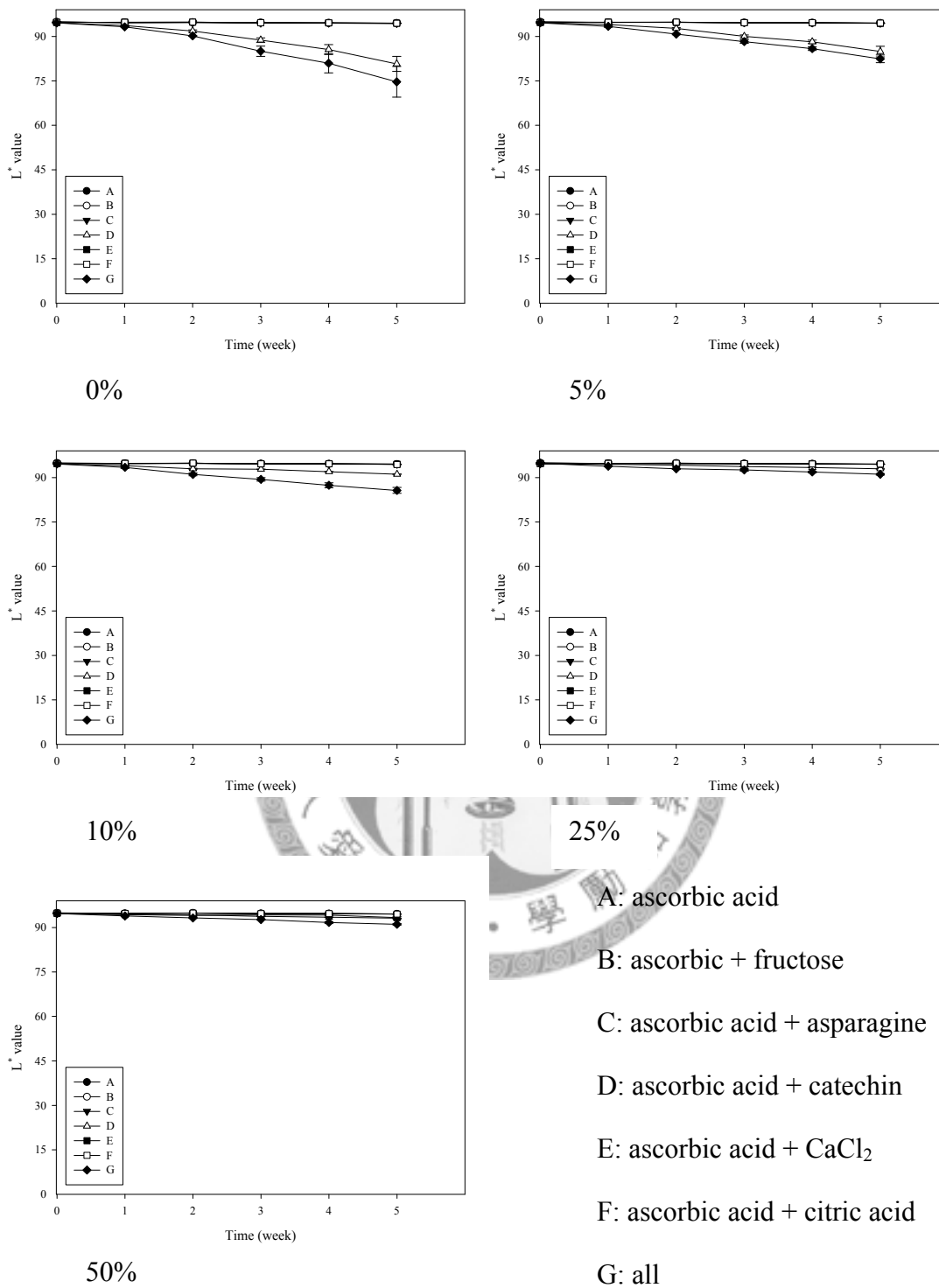


圖 3-3、不同乙醇濃度模式溶液貯藏期間之亮度變化。

Figure 3-3. Changes in L* value of model solutions with different ethanol concentrations during storage at 45°C.

表 3-1、0%乙醇濃度模式溶液貯藏期間之色相角度變化

Table 3-1. Changes in hue angles of 0 % ethanol model solutions during storage at 45°C

	0 week	1 week	2 week	3 week	5 week
A ¹	313.41 ± 0.11b	315.75 ± 0.36a	122.36 ± 1.85a	118.42 ± 0.88a	113.72 ± 0.04a
B	314.06 ± 0.07b	314.78 ± 0.30a	126.11 ± 0.28a	120.65 ± 1.20a	114.00 ± 0.90a
C	313.36 ± 0.03b	324.21 ± 4.52a	113.74 ± 0.74b	112.43 ± 0.22b	110.80 ± 0.11b
D	318.60 ± 0.12a	38.63 ± 10.84b	93.82 ± 0.63c	88.65 ± 0.84c	82.30 ± 1.27c
E	314.43 ± 0.05b	314.64 ± 0.09a	126.37 ± 0.81a	120.28 ± 1.24a	113.58 ± 0.68a
F	314.53 ± 0.17b	315.26 ± 0.08a	123.56 ± 1.46a	117.82 ± 0.62a	111.75 ± 0.30a
G	319.07 ± 0.28a	57.89 ± 2.14b	91.73 ± 0.21c	85.41 ± 1.34c	79.17 ± 1.78c

*Each value represents mean ± S.D. (n=3).

**Means bearing different letters in the same column are significantly different ($p < 0.05$).

¹Groups: A: containing ascorbic acid; B: containing ascorbic + fructose; C: containing ascorbic acid + asparagine; D: containing ascorbic acid + catechin; E: containing ascorbic acid + CaCl₂; F: containing ascorbic acid + citric acid; G: containing ascorbic acid + fructose + asparagine + catechin + CaCl₂ + citric acid.

表 3-2、5%乙醇濃度模式溶液貯藏期間之色相角度變化

Table 3-2. Changes in hue angle of 5% ethanol model solutions during storage at 45°C

	0 week	1 week	2 week	3 week	5 week
A ¹	313.47 ± 0.17b	314.55 ± 0.12a	127.33 ± 0.47a	122.29 ± 0.55a	116.59 ± 0.20a
B	314.00 ± 0.10b	314.40 ± 0.12a	129.58 ± 1.54a	122.73 ± 0.96a	115.54 ± 0.44a
C	313.32 ± 0.03b	314.33 ± 0.22a	127.30 ± 1.73a	120.90 ± 0.30b	114.56 ± 0.39a
D	318.88 ± 0.08a	15.08 ± 0.89c	95.01 ± 0.59b	89.81 ± 0.76c	84.53 ± 0.96b
E	314.49 ± 0.04b	313.89 ± 0.14a	130.53 ± 2.12a	123.56 ± 0.52a	113.57 ± 2.04a
F	314.63 ± 0.10b	314.54 ± 0.09a	127.46 ± 0.96a	122.03 ± 0.79a	114.53 ± 0.73a
G	318.97 ± 0.25a	46.70 ± 13.10b	91.38 ± 0.33c	87.38 ± 0.70c	81.72 ± 0.82c

*Each value represents mean ± S.D. (n=3).

**Means bearing different letters in the same column are significantly different ($p < 0.05$).

¹Groups: A: containing ascorbic acid; B: containing ascorbic + fructose; C: containing ascorbic acid + asparagine; D: containing ascorbic acid + catechin; E: containing ascorbic acid + CaCl₂; F: containing ascorbic acid + citric acid; G: containing ascorbic acid + fructose + asparagine + catechin + CaCl₂ + citric acid.

表 3-3、10%乙醇濃度模式溶液貯藏期間之色相角度變化

Table 3-3. Changes in hue angle of 10% ethanol model solutions during storage at 45°C

	0 week	1 week	2 week	3 week	5 week
A ¹	313.55 ± 0.09b	314.50 ± 0.20a	124.66 ± 1.51a	122.75 ± 0.39a	116.29 ± 0.37a
B	313.89 ± 0.17b	314.76 ± 0.10a	128.71 ± 0.54a	122.61 ± 0.99a	114.68 ± 0.42a
C	313.91 ± 0.79b	314.53 ± 0.32a	128.06 ± 1.44a	122.56 ± 1.33a	115.47 ± 0.47a
D	317.66 ± 0.15a	16.13 ± 6.49b	96.27 ± 0.43b	95.26 ± 0.27b	90.79 ± 0.15b
E	314.54 ± 0.11b	314.21 ± 0.09a	129.90 ± 1.34a	122.80 ± 1.29a	115.27 ± 0.34a
F	314.70 ± 0.13b	315.09 ± 0.08a	127.36 ± 0.43a	121.76 ± 0.88a	113.98 ± 0.76a
G	320.00 ± 0.15a	38.26 ± 17.03b	91.66 ± 0.86b	88.79 ± 0.58b	83.83 ± 0.83c

*Each value represents mean ± S.D. (n=3).

**Means bearing different letters in the same column are significantly different ($p < 0.05$).

¹Groups: A: containing ascorbic acid; B: containing ascorbic + fructose; C: containing ascorbic acid + asparagine; D: containing ascorbic acid + catechin; E: containing ascorbic acid + CaCl₂; F: containing ascorbic acid + citric acid; G: containing ascorbic acid + fructose + asparagine + catechin + CaCl₂ + citric acid.

表 3-4、25%乙醇濃度模式溶液貯藏期間之色相角度變化

Table 3-4. Changes in hue angle of 25% ethanol model solutions during storage at 45°C

	0 week	1 week	2 week	3 week	5 week
A ¹	313.56 ± 0.15b	315.28 ± 0.35b	125.97 ± 0.37a	122.09 ± 0.34 a	115.19 ± 0.92a
B	313.62 ± 0.16b	315.29 ± 0.14b	127.82 ± 1.32a	121.65 ± 0.62a	115.42 ± 0.27a
C	314.90 ± 0.07b	315.23 ± 0.74b	124.66 ± 2.67a	120.60 ± 0.88a	114.09 ± 0.71a
D	318.28 ± 0.22a	331.20 ± 5.81a	102.48 ± 1.10b	99.87 ± 0.24b	96.36 ± 0.33b
E	314.54 ± 0.10b	314.34 ± 0.32b	127.89 ± 2.07a	122.68 ± 0.55a	114.02 ± 0.03a
F	314.93 ± 0.12b	315.99 ± 1.32b	124.15 ± 2.50a	118.66 ± 0.13c	113.22 ± 0.49a
G	320.98 ± 0.29a	15.06 ± 6.34c	99.87 ± 0.28b	97.51 ± 0.74b	94.64 ± 0.12b

*Each value represents mean ± S.D. (n=3).

**Means bearing different letters in the same column are significantly different ($p < 0.05$).

¹Groups: A: containing ascorbic acid; B: containing ascorbic + fructose; C: containing ascorbic acid + asparagine; D: containing ascorbic acid + catechin; E: containing ascorbic acid + CaCl₂; F: containing ascorbic acid + citric acid; G: containing ascorbic acid + fructose + asparagine + catechin + CaCl₂ + citric acid.

表 3-5、50%乙醇濃度模式溶液貯藏期間之色相角度變化

Table 3-5. Changes in hue angle of 50% ethanol model solutions during storage at 45°C

	0 week	1 week	2 week	3 week	5 week
A ¹	314.52 ± 0.15b	315.47 ± 0.02b	124.96 ± 0.68b	120.65 ± 0.19b	114.16 ± 0.52b
B	313.77 ± 0.10b	315.26 ± 0.27b	127.79 ± 0.68b	121.37 ± 1.41b	114.28 ± 1.42b
C	314.84 ± 0.18b	316.24 ± 0.35b	123.14 ± 0.99b	117.15 ± 3.32b	113.73 ± 1.41b
D	320.80 ± 0.14a	332.43 ± 1.76a	104.15 ± 0.27c	101.32 ± 0.17c	98.23 ± 0.42c
E	314.62 ± 0.09b	313.99 ± 0.44b	131.01 ± 1.77a	125.08 ± 0.99a	118.07 ± 1.20 a
F	314.65 ± 0.04b	318.69 ± 2.32b	120.87 ± 1.70b	119.29 ± 1.01	114.44 ± 1.08b
G	320.68 ± 0.17a	13.27 ± 1.08c	100.79 ± 0.17d	98.01 ± 0.44c	94.81 ± 0.18c

*Each value represents mean ± S.D. (n=3).

**Means bearing different letters in the same column are significantly different ($p < 0.05$).

¹Groups: A: containing ascorbic acid; B: containing ascorbic + fructose; C: containing ascorbic acid + asparagine; D: containing ascorbic acid + catechin; E: containing ascorbic acid + CaCl₂; F: containing ascorbic acid + citric acid; G: containing ascorbic acid + fructose + asparagine + catechin + CaCl₂ + citric acid.

表 3-6、含兒茶素模式溶液貯藏期間之兒茶素含量變化 (mg/L)

Table 3-6. Changes in catechin contents of catechin-containing model solutions during storage at 45°C (mg/L)

	0 week	1 week	2 week	3 week	4 week	5 week
D ¹						
0%	250 ± 0	127.21 ± 3.63b	105.57 ± 4.74b	69.39 ± 6.41b	53.54 ± 5.59c	39.62 ± 5.17c
5%	250 ± 0	127.96 ± 2.65b	108.63 ± 5.12b	72.37 ± 5.80b	56.00 ± 6.22c	41.58 ± 6.04c
10%	250 ± 0	72.71 ± 3.53d	56.11 ± 5.90d	61.27 ± 1.36c	52.66 ± 0.59c	43.21 ± 0.86c
25%	250 ± 0	96.45 ± 4.84c	84.45 ± 3.74c	74.87 ± 1.46b	65.48 ± 3.64b	59.17 ± 0.22b
50%	250 ± 0	175.45 ± 1.95a	151.73 ± 3.18a	131.46 ± 5.87a	121.19 ± 5.36a	109.38 ± 3.94a
G						
0%	250 ± 0	115.98 ± 0.57b	93.81 ± 0.94b	60.83 ± 11.04bc	47.73 ± 11.09c	35.46 ± 10.38c
5%	250 ± 0	94.97 ± 3.15c	73.95 ± 1.69c	57.26 ± 3.18c	45.96 ± 4.18c	35.31 ± 4.10c
10%	250 ± 0	124.16 ± 3.72a	100.51 ± 3.94a	87.03 ± 4.95b	73.21 ± 5.57ab	63.05 ± 7.49ab
25%	250 ± 0	125.97 ± 3.47a	107.58 ± 1.81a	92.41 ± 0.80a	83.94 ± 1.01a	74.97 ± 2.01a
50%	250 ± 0	116.22 ± 2.93b	98.44 ± 3.99b	81.00 ± 0.48b	73.92 ± 1.67b	66.58 ± 1.98b

*Each value represents mean ± S.D. (n=3).

**Means bearing different letters in the same column are significantly different ($p < 0.05$).

¹Groups: D: containing ascorbic acid + catechin; G: containing ascorbic acid + fructose + asparagine + catechin + CaCl₂ + citric acid.

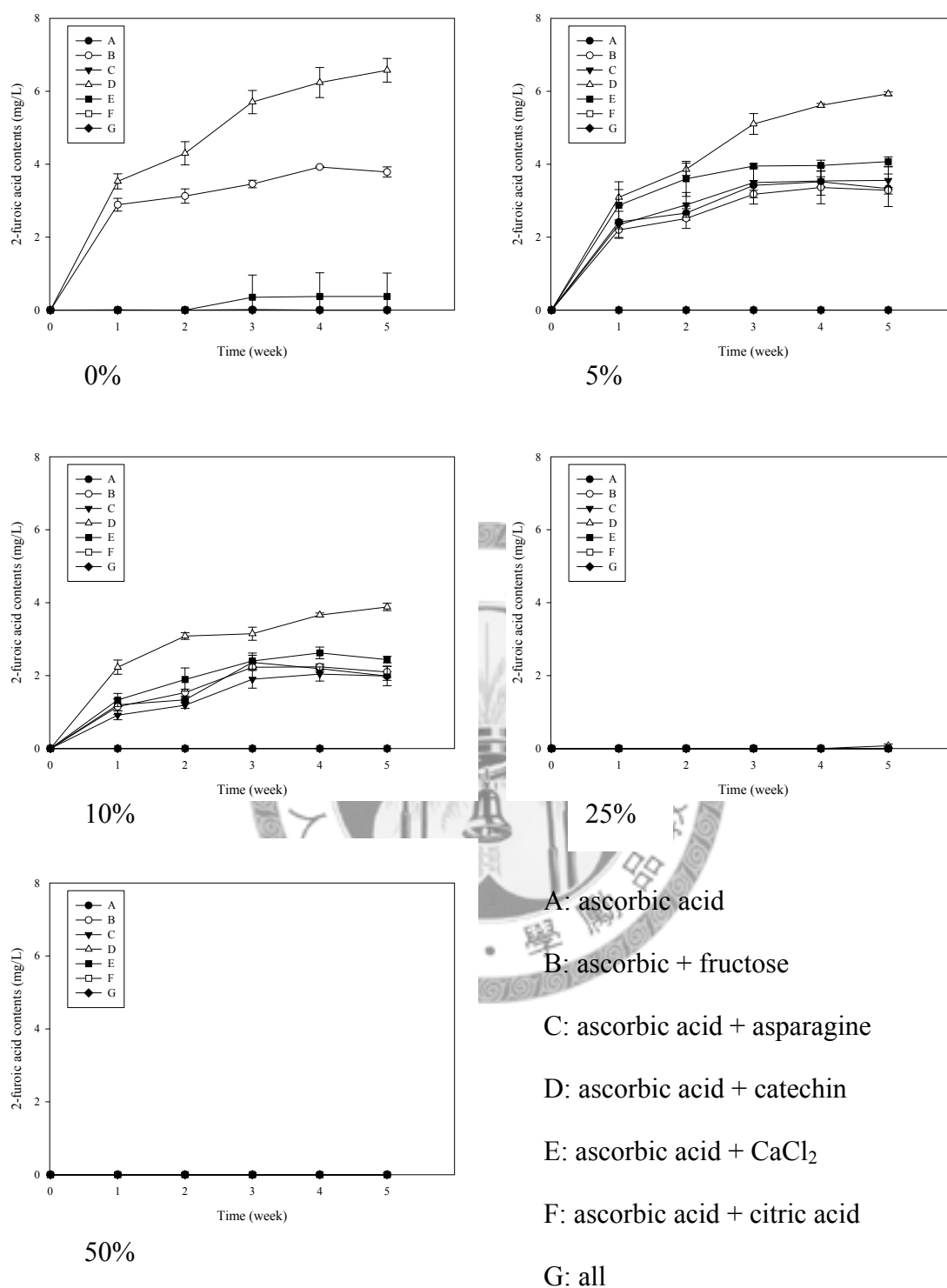


圖 3-4、不同乙醇濃度模式溶液貯藏期間之 2-furoic acid 含量變化。

Figure 3-4. Changes in 2-furoic acid contents of model solutions with different ethanol concentrations during storage at 45°C.

表 3-7、0%乙醇濃度模式溶液貯藏期間之 3-hydroxy-2-pyrone 含量變化 (mg/L)

Table 3-12. Changes in 3-hydroxy-2-pyrone contents of 0% ethanol model solutions during storage at 45°C

	1 week	2 week	3 week	4 week	5 week
A ¹	10.39 ± 5.68bc	1.59 ± 0.68c	0.57 ± 0.91c	0.00 ± 0.00c	0.00 ± 0.00c
B	6.84 ± 0.56c	1.11 ± 0.20c	1.70 ± 1.74c	0.46 ± 0.70c	0.00 ± 0.00c
C	5.31 ± 0.75c	1.13 ± 0.59c	0.90 ± 0.86c	0.09 ± 0.16c	0.00 ± 0.00c
D	34.82 ± 0.34a	29.75 ± 0.75a	24.47 ± 1.45a	20.23 ± 1.75a	16.97 ± 1.61a
E	8.76 ± 2.93c	2.80 ± 1.16c	0.88 ± 0.04c	1.51 ± 2.54c	0.67 ± 1.15c
F	7.99 ± 2.58c	3.20 ± 0.97c	2.60 ± 0.30c	1.82 ± 0.29c	1.01 ± 0.26c
G	20.32 ± 0.45b	18.57 ± 0.57b	15.04 ± 0.90b	12.90 ± 1.13b	10.44 ± 1.29b

*Each value represents mean ± S.D. (n=3).

**Means bearing different letters in the same column are significantly different ($p < 0.05$).

¹Groups: A: containing ascorbic acid; B: containing ascorbic + fructose; C: containing ascorbic acid + asparagine; D: containing ascorbic acid + catechin; E: containing ascorbic acid + CaCl₂; F: containing ascorbic acid + citric acid; G: containing ascorbic acid + fructose + asparagine + catechin + CaCl₂ + citric acid.

表 3-8、5%乙醇濃度模式溶液貯藏期間之 3-hydroxy-2-pyrone 含量變化 (mg/L)

Table 3-13. Changes in 3-hydroxy-2-pyrone contents of 5% ethanol model solutions during storage at 45°C

	1 week	2 week	3 week	4 week	5 week
A ¹	6.74 ± 2.00c	4.84 ± 1.75c	2.44 ± 2.78c	0.00 ± 0.00c	0.00 ± 0.00b
B	4.92 ± 1.71c	3.03 ± 1.69c	2.24 ± 2.06c	0.91 ± 1.10c	0.17 ± 0.29b
C	5.00 ± 3.51	4.33 ± 4.64c	3.04 ± 4.54c	1.76 ± 3.06c	0.98 ± 1.70b
D	37.99 ± 0.41a	34.48 ± 0.43a	27.70 ± 1.97a	23.45 ± 2.57a	19.44 ± 2.65a
E	5.34 ± 0.98	6.94 ± 1.51c	5.30 ± 2.24c	3.11 ± 1.99c	1.18 ± 1.03b
F	6.59 ± 1.85	4.73 ± 1.39c	3.74 ± 0.98c	2.36 ± 1.05c	0.96 ± 0.80b
G	23.11 ± 0.37b	20.94 ± 0.15b	19.46 ± 0.75b	17.28 ± 1.22b	14.81 ± 1.32a

*Each value represents mean ± S.D. (n=3).

**Means bearing different letters in the same column are significantly different ($p < 0.05$).

¹Groups: A: containing ascorbic acid; B: containing ascorbic + fructose; C: containing ascorbic acid + asparagine; D: containing ascorbic acid + catechin; E: containing ascorbic acid + CaCl₂; F: containing ascorbic acid + citric acid; G: containing ascorbic acid + fructose + asparagine + catechin + CaCl₂ + citric acid.

表 3-9、10%乙醇濃度模式溶液貯藏期間之 3-hydroxy-2-pyrone 含量變化 (mg/L)

Table 3-14. Changes in 3-hydroxy-2-pyrone contents of 10% ethanol model solutions during storage at 45°C

	1 week	2 week	3 week	4 week	5 week
A ¹	9.78 ± 2.37c	7.14 ± 4.51c	1.33 ± 0.20c	0.00 ± 0.00d	0.00 ± 0.00d
B	12.51 ± 0.45c	10.66 ± 1.23c	4.25 ± 0.38c	5.16 ± 1.58c	4.17 ± 0.34c
C	11.51 ± 2.42c	10.23 ± 5.06bc	6.10 ± 5.01c	5.45 ± 2.82cd	4.22 ± 0.39c
D	31.28 ± 1.73a	25.84 ± 2.95a	32.67 ± 0.64a	30.49 ± 0.20a	27.68 ± 0.05a
E	12.13 ± 4.39c	15.36 ± 0.97b	11.10 ± 0.96	8.09 ± 0.79c	5.14 ± 0.42c
F	9.42 ± 0.36c	9.15 ± 0.70c	5.78 ± 2.42c	3.97 ± 2.47cd	2.76 ± 0.99d
G	24.39 ± 1.39b	22.09 ± 0.86a	20.93 ± 1.12b	18.45 ± 1.38b	16.18 ± 1.48b

*Each value represents mean ± S.D. (n=3).

**Means bearing different letters in the same column are significantly different ($p < 0.05$).

¹Groups: A: containing ascorbic acid; B: containing ascorbic + fructose; C: containing ascorbic acid + asparagine; D: containing ascorbic acid + catechin; E: containing ascorbic acid + CaCl₂; F: containing ascorbic acid + citric acid; G: containing ascorbic acid + fructose + asparagine + catechin + CaCl₂ + citric acid.

表 3-10、25%乙醇濃度模式溶液貯藏期間之 3-hydroxy-2-pyrone 含量變化 (mg/L)

Table 3-15. Changes in 3-hydroxy-2-pyrone contents of 25% ethanol model solutions during storage at 45°C

	1 week	2 week	3 week	4 week	5 week
A ¹	21.73 ± 2.68b	17.26 ± 4.28bc	13.95 ± 5.36c	13.54 ± 5.76c	7.04 ± 4.33c
B	24.01 ± 1.56b	21.77 ± 1.79b	17.06 ± 1.24c	13.31 ± 0.66c	10.00 ± 0.49c
C	20.36 ± 10.74ab	20.90 ± 3.94bc	20.95 ± 3.84c	16.97 ± 3.78c	15.28 ± 1.78c
D	39.83 ± 1.07a	41.05 ± 1.45a	40.91 ± 0.59a	35.81 ± 6.78 a	37.01 ± 0.07a
E	18.61 ± 4.69b	13.11 ± 6.69bc	13.95 ± 2.74c	10.21 ± 2.26c	7.45 ± 2.25c
F	14.74 ± 5.61b	16.09 ± 1.59c	17.30 ± 0.38c	15.56 ± 0.23c	13.59 ± 0.40c
G	22.94 ± 0.20b	22.81 ± 0.60b	25.51 ± 0.67b	24.91 ± 0.40b	23.59 ± 0.29b

*Each value represents mean ± S.D. (n=3).

**Means bearing different letters in the same column are significantly different ($p < 0.05$).

¹Groups: A: containing ascorbic acid; B: containing ascorbic + fructose; C: containing ascorbic acid + asparagine; D: containing ascorbic acid + catechin; E: containing ascorbic acid + CaCl₂; F: containing ascorbic acid + citric acid; G: containing ascorbic acid + fructose + asparagine + catechin + CaCl₂ + citric acid.

表 3-11、50%乙醇濃度模式溶液貯藏期間之 3-hydroxy-2-pyrone 含量變化 (mg/L)

Table 3-16. Changes in 3-hydroxy-2-pyrone contents of 50% ethanol model solutions during storage at 45°C

	1 week	2 week	3 week	4 week	5 week
A ¹	21.55 ± 0.76b	21.00 ± 1.15b	24.46 ± 0.42b	21.69 ± 0.55b	18.70 ± 0.43b
B	21.32 ± 0.90b	19.64 ± 2.27b	19.83 ± 3.82b	16.45 ± 4.62b	10.58 ± 1.34c
C	23.67 ± 2.72b	22.77 ± 2.16b	26.89 ± 3.48b	24.51 ± 3.75b	22.75 ± 4.20b
D	35.25 ± 3.21a	40.37 ± 2.43a	46.29 ± 1.12a	46.06 ± 1.28a	43.88 ± 0.70a
E	16.39 ± 4.92b	11.29 ± 4.83b	11.02 ± 2.50c	9.20 ± 2.43c	7.51 ± 2.10c
F	19.70 ± 2.28b	19.55 ± 1.92b	17.20 ± 3.28b	15.95 ± 3.11b	14.28 ± 2.86bc
G	20.27 ± 1.52b	20.35 ± 1.65b	22.89 ± 0.84b	22.76 ± 0.57b	21.88 ± 0.99b

*Each value represents mean ± S.D. (n=3).

**Means bearing different letters in the same column are significantly different ($p < 0.05$).

¹Groups: A: containing ascorbic acid; B: containing ascorbic + fructose; C: containing ascorbic acid + asparagine; D: containing ascorbic acid + catechin; E: containing ascorbic acid + CaCl₂; F: containing ascorbic acid + citric acid; G: containing ascorbic acid + fructose + asparagine + catechin + CaCl₂ + citric acid.

第四章

乙醇溶液中

抗壞血酸-兒茶素褐變之機制

Ascorbic Acid-Catechin Browning Mechanism in Ethanolic Solution



一、前言

由前章得知，抗壞血酸與兒茶素共同存在時，容易形成褐變，且當乙醇濃度越高時，褐變情形有減緩的作用。於實驗室過去的研究中，乙醇濃度是造成乙醇模式溶液造成變色的主要因子，在乙醇的存在下，梅納反應的機制與水溶液明顯不同 (Shen et al., 2007)；而在葉綠素 a 的系統下，隨著乙醇濃度的不同，葉綠素顏色的降解速率也有所不同，於 50°C 儲藏時，葉綠素於 40%乙醇濃度的降解速率為 10%乙醇濃度的 230 倍，並推測不同的乙醇/水濃度造成溶液中的化學環境不同，使葉綠素的安定性發生不同的差異 (Shen et al., 2010)。因此在抗壞血酸乙醇系統下，乙醇濃度的差異可能是導致褐變速率及機制改變的因子，本章即針對不同乙醇濃度搭配抗壞血酸及兒茶素進行褐變機制的討論。

二、材料與方法

1. 試藥

- (1) 醋酸 (acetic acid)、乙腈 (acetonitrile)、無水乙醇 (ethanol, 99.9%)、磷酸 (phosphoric acid) 購於德國 Merck 公司 (Darmstadt, Germany)。
- (2) 抗壞血酸 (L-ascorbic acid)、兒茶素 ((+)-catechin)、去氫抗壞血酸 (dehydroascorbic acid)、甘油 (glycerol) 及磷酸二氫鉀 (potassium dihydrogen phosphate) 購於美國 Sigma 公司 (St Louis, MO, USA)。
- (3) Furfural、2-furoic acid 購於美國 Chem Service 公司 (West Chester, PA, USA)。

(4) 3-Hydroxy-2-pyrone 購於美國 Tyger 公司 (Ewing, NJ, USA)。

2. 實驗方法

(1) 模式系統配製：模式溶液 A 為抗壞血酸 (0.5 mg/mL) 及兒茶素 (0.5 mg/mL) 溶於不同濃度乙醇之溶液 (10, 20, 30, 40, 50%) 及其水溶液；模式溶液 B 含抗壞血酸降解產物 dehydroascorbic acid (0.1 mg/mL)、2-furoic acid (0.1 mg/mL) 及 3-hydroxy-2-pyrone (0.1 mg/mL) 及兒茶素 (0.5 mg/mL)；模式溶液 C 為不同濃度甘油溶液之抗壞血酸 (0.5 mg/mL) 及兒茶素 (0.5 mg/mL)，甘油溶液之濃度依下述水活性測定之測定值配製。各模式溶液組別及實驗流程如圖 4-1。於調配將近最終體積時調整各模式溶液之 pH 至 3.0，於 45°C 下儲藏 26 天，模式溶液 A 及 B 每週取出進行褐變指標分析、抗壞血酸含量及兒茶素含量分析，並於第 26 天時測定抗壞血酸降解產物含量；模式溶液 C 每週取樣偵測褐變指標。

(2) 褐變指標 (browning index) 測定：參考 Gomez 等人 (1995) 之方法，以分光光度計 (Herios α , Spectronic Unicam, Cambridge, UK)，直接測量酒液於 420 nm 之吸光值。

(3) 酸鹼值測定：以酸鹼度計 (PHM 290, pH-Stat Controller, Radiometer Analytical SAS, Lyon, France) 搭配同廠牌之玻璃電極 (pHG301-9) 及參考電極 (REF921) 測定之。

(4) 抗壞血酸含量分析 (Zotou et al., 2004)

- a. 樣品製備：取樣品經離心後取上清液，再經 0.45 μ m 濾膜過濾後備用。
- b. 分析儀器及操作條件：以高效能液相層析儀 (LC-20AT Prominence Liquid Chromatography, Shimadzu, Kyoto, Japan)，配以自動注射系統 (SIL-20A Prominence Auto Sampler, Shimadzu, Kyoto, Japan)；分離管柱為 Hypersil Gold C₁₈ (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m) (Thermo, Waltham, MA, USA)，移動相為 2.0 % KH₂PO₄ (pH 2.4)：甲醇=98：2，流速 1 mL/min，樣品注射量 20 μ L，結合二極體陣列式檢測器 (SPD-M20A Prominence Diode Array Detector, Shimadzu, Kyoto, Japan)，在 244 nm 下測吸光，並以內插法求出樣品之抗壞血酸含量。

(5) 抗壞血酸降解產物及兒茶素含量分析 (Lee and Nagy, 1988; Shinoda et al., 2005)

- a. 樣品製備：取樣品經 2000 \times g 離心 10 分鐘後取上清液，再經 0.45 μ m 濾膜過濾後備用。
- b. 抗壞血酸降解產物及兒茶素標準品：Furfural、2-furoic acid、5-HMF 3-hydroxy-2-pyrone、catechin 共五種。
- c. 分析儀器及操作條件：以高效能液相層析儀 (LC-20AT Prominence Liquid Chromatography, Shimadzu, Kyoto, Japan)，配以自動注射系統 (SIL-20A Prominence Auto Sampler, Shimadzu, Kyoto,

Japan)；分離管柱為 Hypersil Gold C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5μm) (Thermo, Waltham, MA, USA)，移動相為 0.05M acetic acid：acetonitrile=98：2，流速 0.7 mL/min，樣品注射量 20μL，結合二極體陣列式檢測器 (SPD-M20A Prominence Diode Array Detector, Shimadzu, Kyoto, Japan)，在 254、283、300 nm 下測吸光，並以內插法求出樣品之各抗壞血酸降解產物含量。

- d. 降解產物之最大吸光波長及滯留時間：furfural (283 nm, 12.4 min)、2-furoic acid (254 nm, 13.0 min)、5-HMF (283 nm, 9.0 min)、3-hydroxy-2-pyrone (300 nm, 7.3 min)、catechin (283 nm, 15.0 min)。

(6) 水活性測定

- a. 乙醇溶液水活性的測定 (Ferro Fontan and Chirife, 1981；Miracco et al., 1981；Shen et al., 2004)：利用示熱差掃描分析儀 (Differential Scanning Calorimeter, Model DSC 822°, Mettler-Toledo GmbH, Matchar, Switzerland) 進行。將樣品 (14-18 克) 置於小鋁盤中並覆上鋁蓋後密封，小鋁盤先置於室溫，再以 5 °C/min 的速度降溫至 -70 °C，於 -70 °C 下維持 5 min，再以 5 °C/min 升溫至室溫，在降溫的過程中，樣品的熱分析圖譜上會出現一個向下的熔解熱波峰，以熔解熱波峰之正切線與空鋁盤所做出的基線之交叉點為其凍結點 (freezing point)，並依照下列公式

計算出溶液之水活性(Robinson and Stokes, 1970)：

$$\text{凍結點} = T_0 - T_F;$$

T_0 =純水之凍結點； T_F =樣品之凍結點；

$$\theta_F \text{ (freezing point depression)} = T_0 - T_F;$$

$$-\ln A_w = 9.6934 \times 10^{-3} \times \theta_F + 4.761 \times 10^{-6} \times \theta_F^2$$

- b. 甘油水活性的測定：以水活性測定儀 (Pawkit Water Activity Meter, Decagon Devices Inc., Pullman, WA, USA) 測定樣品之水活性。

3. 統計分析

本章之各實驗數值均為三重覆，所得之數據以平均值 (mean) \pm 標準差 (standard deviation; S.D.) 表示，並使用 SAS (Statistical Analysis System V9.1, 2002) 之統計套裝軟體 (SAS Inc., NC, USA) 進行數據統計分析及相關性分析。數據分析先以單因子變異數分析 (One-way ANOVA) 比較各組之間之差異，再以鄧肯式多變域分析法 (Duncan's multiple range method) 作顯著性差異之比較。統計之顯著性均以 $p < 0.05$ 為標準。乙醇溶液及甘油溶液之褐變指標並以 Pearson's 相關係數 (Pearson's correlation coefficient) 進行計算。

三、結果與討論

1. 在乙醇模式溶液之褐變

圖 4-2 為各模式溶液於貯藏期間之褐變指標變化，在不同乙醇濃度下，各模式溶液逐漸發生褐變。在單純只有抗壞血酸 (0.5 mg/mL) 的組別 (圖 4-2A)，褐變產生的速率非常慢。而在兒茶素 (0.5 mg/mL) 單獨存在組別及抗壞血酸 (0.5 mg/mL) 與兒茶素 (0.5 mg/mL) 共同存在組別，褐變情形皆比抗壞血酸 (0.5 mg/mL) 單獨存在組別為高 (圖 4-2B 及 C)。在 0-30%乙醇濃度下，抗壞血酸與兒茶素共同存在的組別 (圖 4-2C) 的褐變情形皆高於抗壞血酸或兒茶素單獨存在組別 (圖 4-2A 及 B)，此結果與過去單一乙醇濃度 (12%) 存在的研究相同 (Bradshaw et al., 2001; 2003)，於 0-30%乙醇濃度時，抗壞血酸與兒茶素共同存在組別之褐變隨著乙醇濃度上升而呈現下降的趨勢，而在乙醇濃度 30%以上，則無顯著差異 ($p > 0.05$) (Figure 4-2C)。

圖 4-3 為 45°C 儲藏條件下，抗壞血酸單獨存在組及抗壞血酸與兒茶素共同存在組之抗壞血酸降解比例，高乙醇濃度使抗壞血酸降解速率增加，直到儲藏 10 天後，抗壞血酸在模式系統中皆無法測得。

在單獨含有兒茶素的組別，褐變指標 (圖 4-2B) 與兒茶素降解比例 (圖 4-4A) 呈現正相關 ($r^2 = 0.9536$)，乙醇濃度越高，褐變情形與兒茶素降解速率也越快。兒茶素降解途徑的第一步驟為脫水 (dehydration) (Fulcrand et al., 1997)，乙醇分子與水分子的鍵結可能導致脫水作用的產生，因而使兒茶素降解作用加速。然而，較高的乙醇濃度使抗壞血酸與兒茶素共同存在組別的褐變速率及兒茶素降解速度下降 (圖 4-2C 及 4-4B)，在抗壞血

酸存在時，兒茶素降解的速度較單獨只有兒茶素存在組別為快 (圖 4-4)。水溶液 (0%乙醇濃度)，相較於乙醇溶液，抗壞血酸與兒茶素共同存在的組別具有最強的褐變速率及最高的兒茶素降解速度 (圖 4-2 及 4-4)。過去文獻中，抗壞血酸降解產物可能加速兒茶素氧化並形成褐色物質 (Bradshaw et al., 2003)；因此，在模式系統中，為了瞭解乙醇濃度造成褐變情形的差異，接下來該分析抗壞血酸降解產物在不同乙醇濃度下的差異。

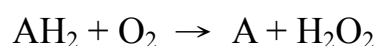
為了瞭解本章中抗壞血酸降解途徑，模式系統中抗壞血酸降解產物 (furfural、2-furoic acid 及 3-hydroxy-2-pyrone) 的含量於第 26 天進行分析 (表 4-1)。在抗壞血酸降解途徑中，furfural 為無氧降解的產物，而 2-furoic acid 及 3-hydroxy-2-pyrone 為有氧降解之產物 (Kurata and Sakurai, 1967；Kurata and Fujimaki, 1976；Yuan and Chen, 1998)。除此之外，過去文獻認定 furfural 及 3-hydroxy-2-pyrone 為褐變的主要貢獻因子，並在抗壞血酸降解時，可作為抗壞血酸溶液的褐變指標 (Kanner et al., 1981；Robertson and Samaniego, 1986；Shinoda et al., 2004；2005)。在本章中，於 45°C 下儲藏 26 天，所有模式系統下皆可測得 2-furoic acid 及 3-hydroxy-2-pyrone，但無法測得 furfural (表 4-1)。顯示在乙醇溶液下，有氧降解比無氧降解具優勢。當乙醇濃度上升，無論在抗壞血酸單獨存在組別或抗壞血酸與兒茶素共同存在組別，3-hydroxy-2-pyrone 的含量都呈現上升的現象；但在抗壞血酸與兒茶素共同存在時，乙醇濃度的上升卻使褐變程度下降 (圖 4-2C)。這個結果顯示 3-hydroxy-2-pyrone 在乙醇溶液中，並不適合作為抗壞血酸降解造成褐變的指標，因此假設乙醇可能造成抗壞血酸降解途徑的變動或造成抗壞血酸降解速率的改變，

因而造成 3-hydroxy-2-pyrone 在水系統與乙醇系統下的角色有所不同。

抗壞血酸降解途徑的第一步驟為轉換成氧化態的抗壞血酸：去氫抗壞血酸 (dehydroascorbic acid) (Kurata and Sakurai, 1967; Kurata and Fujimaki, 1976; Yuan and Chen, 1998)，去氫抗壞血酸在水溶液下非常不穩定，並且於不同反應機制下，可能降解成許多不同中間產物，如：2-furfural、2-furoic acid 及 3-hydroxy-2-pyrone 等 (Kimoto et al., 1993; Yuan and Chen, 1998)。在本章中，將去氫抗壞血酸及兩個可能造成褐變的中間產物 (2-furoic acid 及 3-hydroxy-2-pyrone) 加入至兒茶素水溶液模式溶液中。實驗結果如圖 4-5 所示，添加去氫抗壞血酸及 3-hydroxy-2-pyrone 可使所有含有兒茶素的水溶液的褐變速率上升；然而，依圖 4-2C 及表 4-1 所示，高含量的 3-hydroxy-2-pyrone 卻只對應低程度的褐變，證明上述假設乙醇可能造成抗壞血酸降解途徑的變動或造成抗壞血酸降解速率的改變。在本實驗室以往研究也發現乙醇的存在使梅納褐變反應途徑產生改變 (Shen and Wu, 2004; Shen et al., 2007)。

2. 乙醇模式系統及甘油模式系統中水活性對褐變之影響

抗壞血酸 (AH₂) 的氧化可簡單用下列的式子表示 (Bradshaw et al., 2001)：



A 為去氫抗壞血酸

過氧化氫 (H_2O_2) 在酒類產品中容易轉換成氫氧自由基 (hydroxyl free radicals, $\cdot OH$) 或分解成水及氧氣，為酒類產品的主要氧化劑 (Zoecklein et al., 1995)；而乙醇在橘子汁模式系統中，已被證實為氫氧自由基的清除劑，使得抗壞血酸降解途徑無法進行，進而抑制褐變情形的發生 (Shinoda et al., 2004；Shinoda et al., 2005)。因此，當乙醇濃度上升，乙醇清除氫氧自由基的作用可能是造成褐變情形下降的主要原因 (圖 4-2C)，但乙醇濃度上升時，抗壞血酸降解產物 3-hydroxy-2-pyrone 的生成量也上升 (表 4-1)，乙醇清除氫氧自由基的作用應該不是造成褐變差異的主要原因子。

在食品系統中，非酵素性褐變可能發生於加熱作用、脫水作用或濃縮作用，水活性為食品物質中產生褐變最有影響的因子之一 (Eichner and Karel, 1972；Toribio and Lozano, 1984；Cuzzoni et al., 1988)。因為乙醇溶液的易揮發特性，本章以凍結點下降測定法測定乙醇溶液的水活性 (Ferro Fontan and Chirife, 1981；Miracco et al., 1981；Shen et al., 2004)，將甘油溶液的水活性調整至與乙醇溶液相同，並以手持式水活性測定儀測定之，乙醇溶液與甘油溶液之水活性如表 4-2 所示。

圖 4-6 顯示在 $45^\circ C$ 儲藏條件下，甘油模式溶液的褐變指標變化。在乙醇模式溶液與甘油模式溶液中，低於七天的儲藏期間皆可發現褐變延遲的現象，此現象可能是無色或顏色較淺的褐變前驅物正在生成 (Bradshaw et al., 2001；Bradshaw et al., 2003)。在七天之後，高於水活性 0.86 (乙醇濃度 30%) 的相同水活性乙醇模式溶液及甘油模式溶液之褐變並無顯著差異 ($p > 0.05$)，顯示 0-30%的抗壞血酸/兒茶素乙醇溶液中，水活性是影

響褐變速率產生變化的因子。在不同乙醇濃度下，乙醇造成水活性不同程度之降低進而使褐變速率發生變化，而非乙醇自身參與褐變反應。

經過七天以上的儲藏期間，乙醇模式溶液及甘油模式溶液之水活性與褐變指標的的相關係數如表 4-3 所示。過去研究發現水活性對於非酵素性褐變有極大的影響，如：在糖類及胺基酸系統中，降低水活性可使梅納反應的褐變加速；但在焦糖化反應卻相反 (Eichner and Kare, 1972; Petriella et al., 1985; Buera et al., 1987; Shen and Wu, 2004)。本章的數據，發現降低水活性可使抗壞血酸-兒茶素系統的褐變情形降低。

在兒茶素單純存在的組別，乙醇濃度的上升，使褐變速率與兒茶素降解比例上升 (圖 4-2B 及 4-4A)，此現象如前所述，可能是乙醇對兒茶素造成脫水作用。然而，乙醇造成上述脫水作用並無法解釋抗壞血酸及兒茶素共同存在時，褐變速率及兒茶素降解比例呈現下降的情形 (圖 4-2C 及圖 4-4B); 在此兩個不同溶液系統中，乙醇濃度的改變可能使兩個系統的抗壞血酸降解途徑發生不同的變化。抗壞血酸降解的第一步為氧化降解成去氫抗壞血酸 (Kurata and Sakurai, 1967; Kurata and Fujimaki, 1976; Yuan and Chen, 1998; Bradshaw et al., 2003)，去氫抗壞血酸接著被水解、脫羧基，然後形成一個乙醛產物 (aldehyde) - xylosone (Whiting and Coggins, 1960; Yuan and Chen, 1998; Bradshaw et al., 2003; Shinoda et al., 2004)，中間產物 xylosone 再快速的轉換產生其他的乙醛產物及酮類物質 (ketone)，並且接著進行分子間氧化還原及脫水作用產生最終產物 2-furoic acid 及 3-hydroxy-2-pyrone (Yuan and Chen, 1998)。水活性是計量自由水

分子的方式，推測抗壞血酸模式系統無論含不含兒茶素，在高濃度乙醇（低水活性）條件下，皆可能發生脫水作用，使得抗壞血酸降解中間產物 L-xylosone 快速繼續降解，因而使抗壞血酸降解速率增加，並且產生高量的抗壞血酸有氧降解最終產物 (2-furoic 加上 3-hydroxy-2-pyrone) (圖 4-3 及表 4-1)。另一方面，過去文獻指出 L-xylosone 為唯一可與兒茶素作用的抗壞血酸有氧降解中間產物，其與兒茶素作用後可形成褐色的 xanthylum 陽離子，進而造成褐變 (Barril et al., 2009)。據此論點，更可推測在較低水活性（高乙醇濃度）環境中的抗壞血酸，L-xylosone 因脫水作用的快速進行，使其含量快速降低而少與兒茶素作用，造成褐變速率及兒茶素降解比例之減少 (圖 4-2C 及 4-4B)。



四、結論

本章結果發現，抗壞血酸於乙醇溶液中的降解為有氧降解；當乙醇濃度上升時，抗壞血酸/兒茶素溶液的褐變情形下降；乙醇濃度造成褐變情形的差異，主要因子是水活性。抗壞血酸及兒茶素在乙醇飲料中共存時，其褐變情形可能較共存於水溶液時為緩。後續實驗可針對 xylosone 與兒茶素褐變的途徑，純化出 xylosone 進行實驗，並於真實乙醇飲料系統上進行驗證。



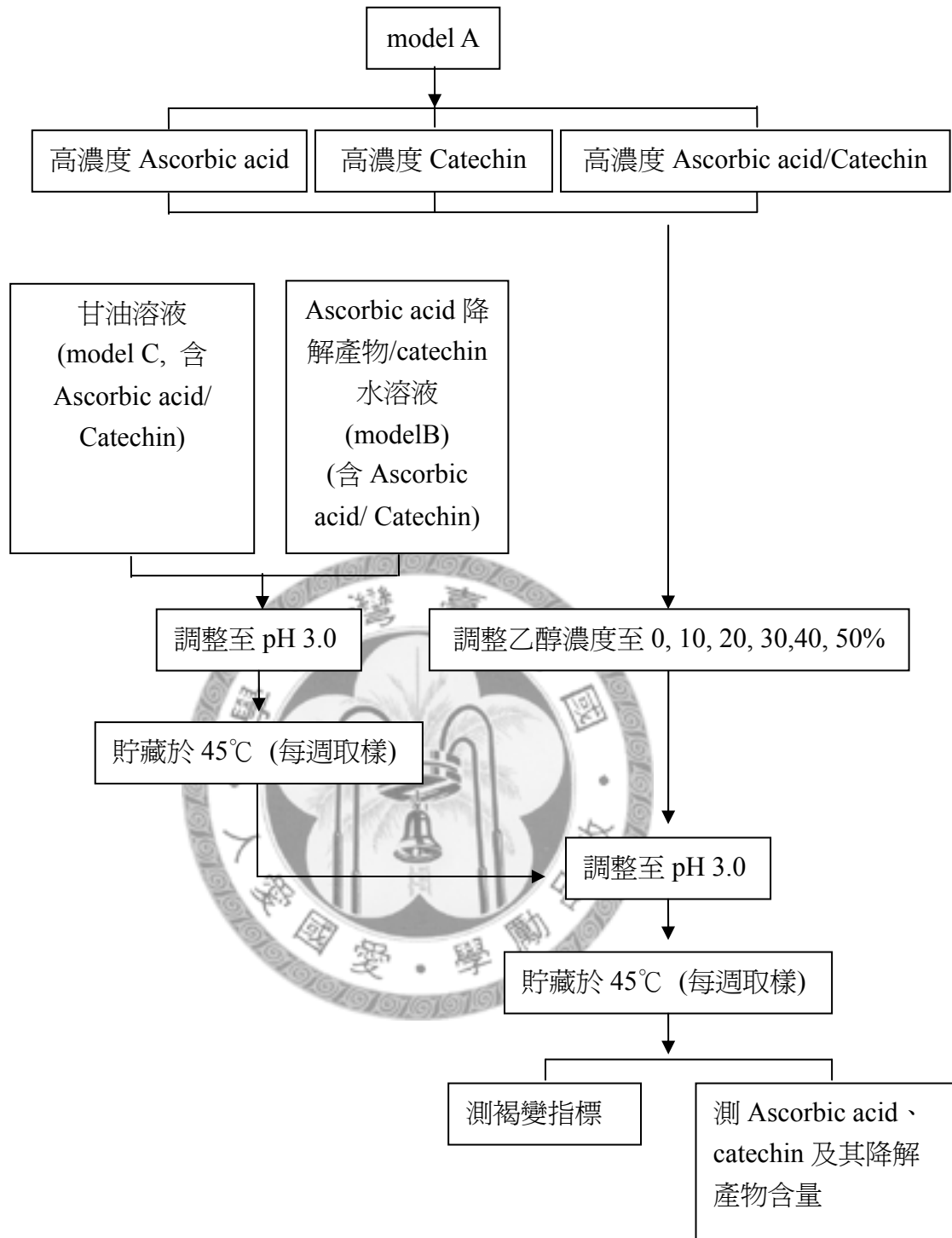
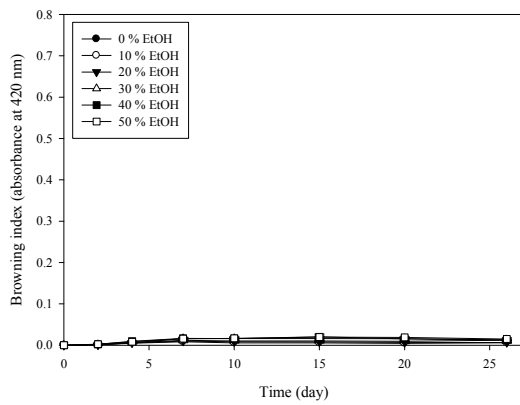
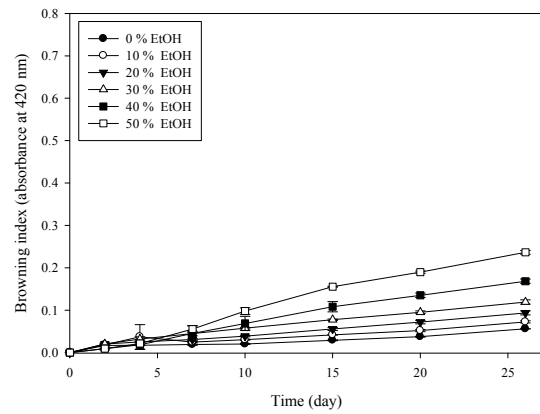


圖 4-1、抗壞血酸-兒茶素褐變實驗流程。

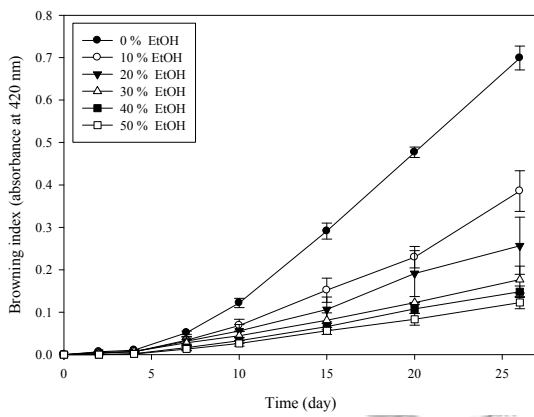
Figure 4-1. Flow chart of ascorbic acid-catechin browning experiments.



(A) ascorbic

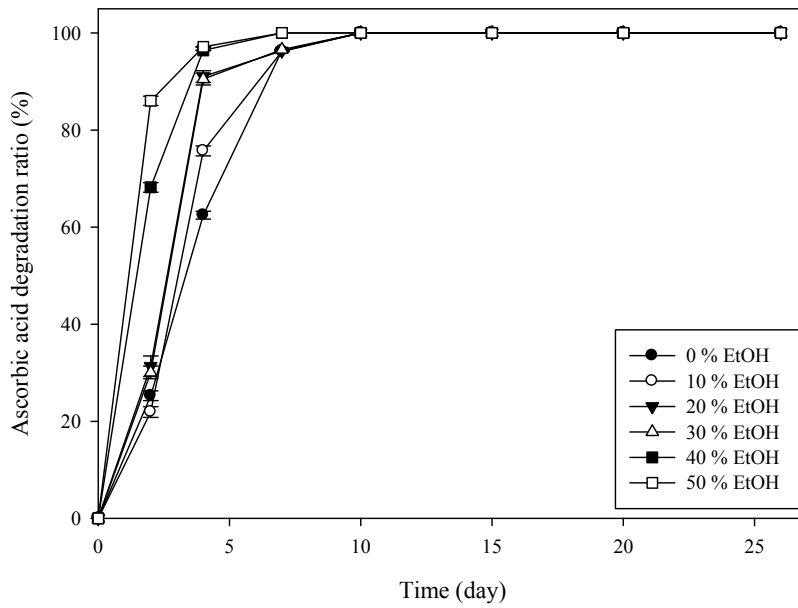


(B) catechin

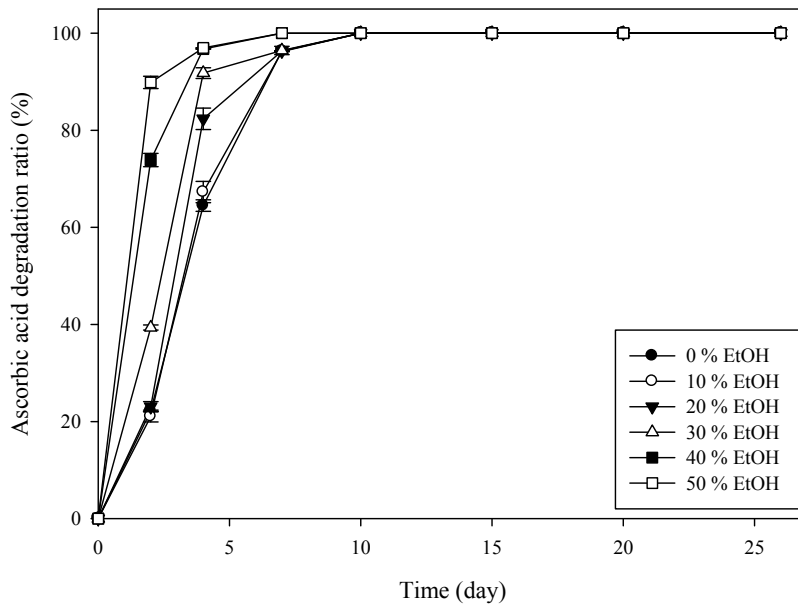


(C) ascorbic acid + catechin

圖 4-2、水溶液及乙醇模式溶液於 45°C 儲存時之褐變指標變化。
 Figure 4-2. Changes in browning index in aqueous and ethanolic model solutions during storage at 45°C.



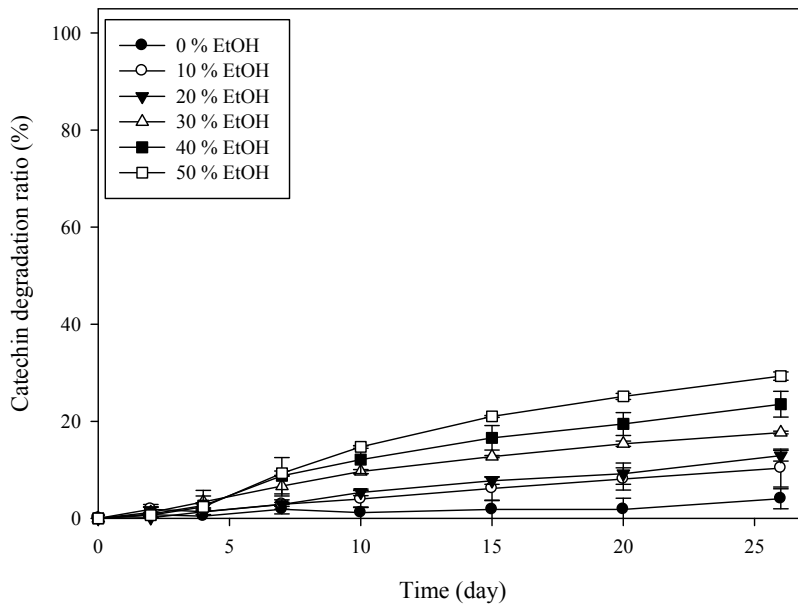
(A) ascorbic



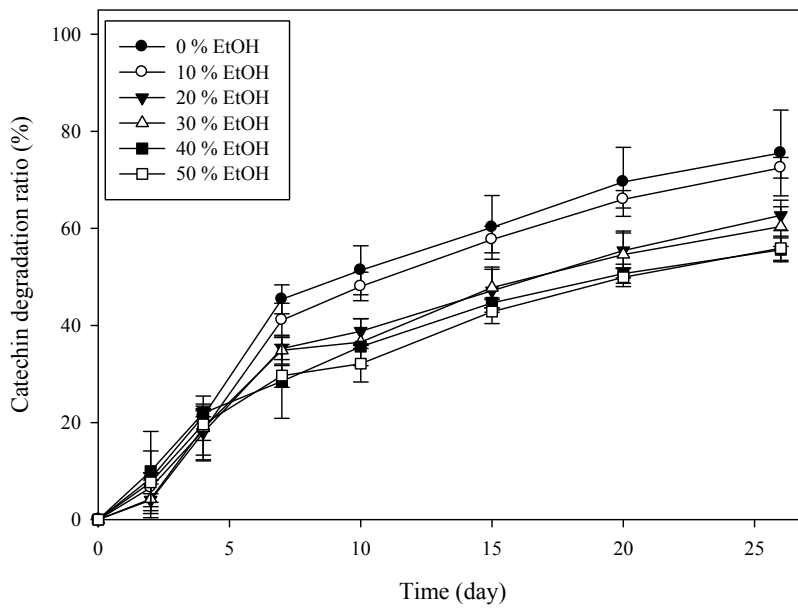
(B) ascorbic acid + catechin

圖 4-3、水溶液與乙醇溶液中抗壞血酸於 45°C 儲存時之降解比例變化。

Figure 4-3. Changes in ascorbic acid degradation ratio in aqueous and ethanolic model solutions during storage at 45°C.



(A) catechin



(B) ascorbic acid + catechin

圖 4-4、水溶液與乙醇溶液中兒茶素於 45°C 儲存時之降解比例變化。
 Figure 4-4. Changes in catechin degradation ratio in aqueous and ethanolic model solutions during storage at 45°C.

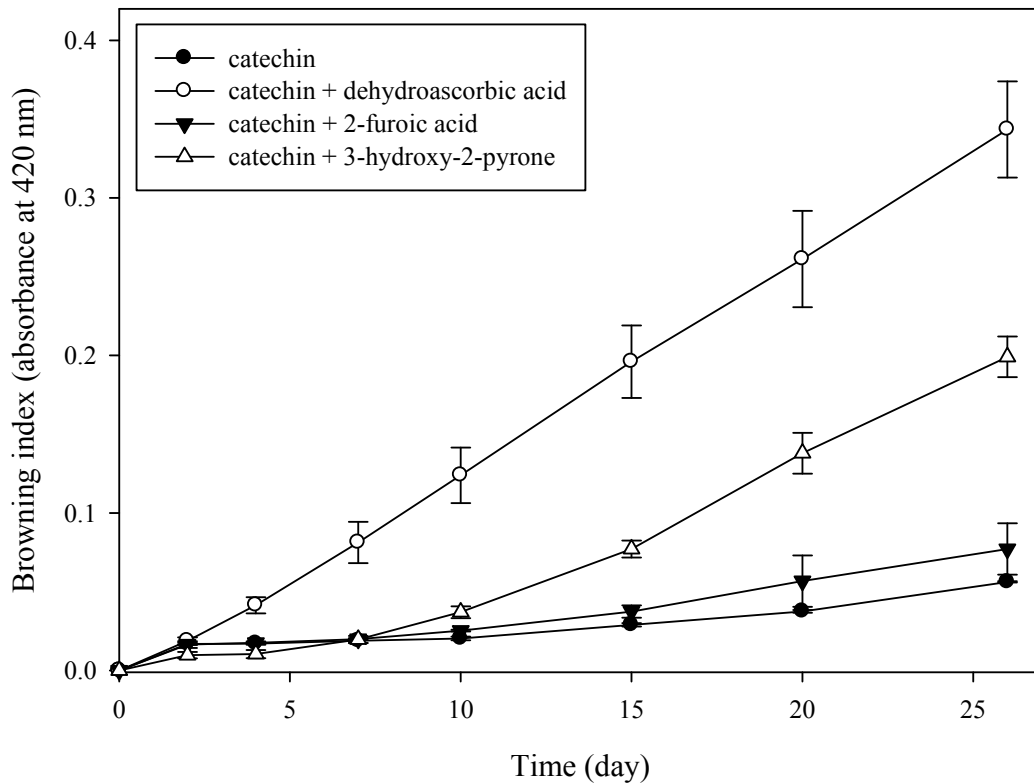


圖 4-5、添加或不添加抗壞血酸降解產物於兒茶素水溶液在 45°C 儲藏之褐變指標。

Figure 4-5. Browning in catechin-containing aqueous model solutions added with and without ascorbic acid degradation products in storage at 45°C.

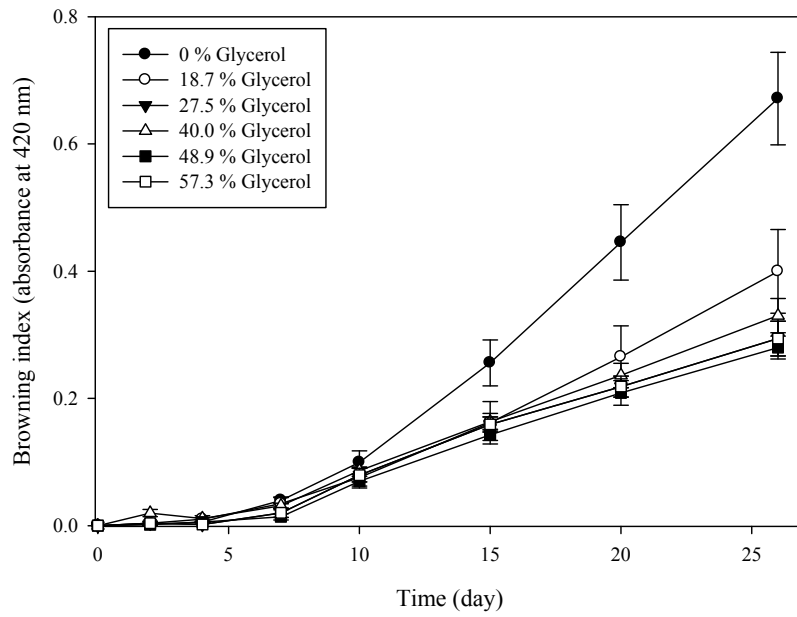


圖 4-6、甘油溶液於 45°C 儲藏時之褐變指標

Figure 4-6. Browning of glycerolic model solutions in storage at 45°C.



表 4-1、模式溶液於 45°C 儲藏 26 天時之抗壞血酸降解產物 (Furfural、2-furoic acid 及 3-hydroxy-2-pyrone) 含量 (ppm)

Table 4-1. Furfural, 2-furoic acid and 3-hydroxy-2-pyrone contents (ppm) in model solutions after 26 days of storage at 45°C

Solution	Furfural	2-furoic acid	3-hydroxy-2-pyrone	total final products (2-furoic acid + 3-hydroxy-2-pyrone)
Containing ascorbic acid (0.5 mg mL ⁻¹) alone,				
0% EtOH	ND	10.55 ± 0.20c	0.90 ± 0.79g	11.45 ± 0.99g
10 % EtOH	ND	6.74 ± 0.73e	11.04 ± 4.20f	17.78 ± 3.93ef
20 % EtOH	ND	4.75 ± 0.42f	20.64 ± 6.26e	25.39 ± 6.47e
30 % EtOH	ND	3.58 ± 0.26fg	45.67 ± 8.55d	49.25 ± 8.80d
40 % EtOH	ND	0.60 ± 0.58h	44.93 ± 10.54d	45.53 ± 11.12d
50 % EtOH	ND	0.00 ± 0.00h	46.43 ± 11.49d	46.43 ± 11.49d
Containing ascorbic acid (0.5 mg mL ⁻¹) and catechin (0.5 mg mL ⁻¹),				
0% EtOH	ND	18.83 ± 1.82a	50.61 ± 5.67d	69.44 ± 4.61c
10 % EtOH	ND	13.00 ± 0.94b	59.59 ± 1.68c	72.59 ± 1.14c
20 % EtOH	ND	8.38 ± 1.31d	74.64 ± 1.45b	83.02 ± 1.76b
30 % EtOH	ND	4.87 ± 0.25f	83.95 ± 0.78a	88.83 ± 1.03ab
40 % EtOH	ND	2.24 ± 0.29g	91.73 ± 2.94a	93.97 ± 2.65a
50 % EtOH	ND	0.05 ± 0.09h	91.87 ± 2.95a	91.93 ± 3.02a

Values are presented as means ± standard deviation.

Values in each column followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$).

^aND: not detected.

表 4-2、乙醇溶液及甘油溶液之水活性

Table 4-2. Water activities of ethanolic and glycerolic solutions

Ethanol concentration (v/v)	Water activity	Glycerol concentration (v/v)
0%	1	0%
10%	0.96	18.7%
20%	0.92	27.5%
30%	0.86	40.0%
40%	0.8	48.9%
50%	0.73	57.3%



表 4-3、水活性與褐變指標於七天儲藏後在乙醇溶液或甘油溶液之相關係數

Table 4-3. Pearson correlation coefficients between A_w and browning index (A_{420}) in ethanolic solutions or glycerolic solutions after 7 days storage

		A_w	Browning index in ethanolic solutions	Browning index in glycerolic solutions
	A_w	1.0000		
Day 7	Browning index in ethanolic solutions	-0.9771 (0.0008) ^a	1.0000	
	Browning index in glycerolic solutions	-0.9863 (0.0003)	0.9799 (0.0006)	1.0000
	A_w	1.0000		
Day 10	Browning index in ethanolic solutions	-0.9864 (0.0003)	1.0000	
	Browning index in glycerolic solutions	-0.9855 (0.0003)	0.9758 (0.0009)	1.0000
	A_w	1.0000		
Day 15	Browning index in ethanolic solutions	-0.9875 (0.0002)	1.0000	
	Browning index in glycerolic solutions	-0.9898 (0.0002)	0.9740 (0.0010)	1.0000
	A_w	1.0000		
Day 20	Browning index in ethanolic solutions	-0.9853 (0.0003)	1.0000	
	Browning index in glycerolic solutions	-0.9795 (0.0006)	0.9516 (0.0035)	1.0000
	A_w	1.0000		
Day 26	Browning index in ethanolic solutions	-0.9827 (0.0004)	1.0000	
	Browning index in glycerolic solutions	-0.9734 (0.0011)	0.9422 (0.0049)	1.0000

^aP value of Pearson correlation coefficient.

總結

1. 在市售產品中，分析出胺基酸、單寧、金屬元素、有機酸等相關物質含量，皆為可能影響抗壞血酸降解，進而產生褐變的物質。
2. 在乙醇模式溶液系統下，單寧類物質為影響抗壞血酸降解的主要成分，其中又以兒茶素 (catechin) 為最能影響抗壞血酸降解最有效率的單寧類物質。
3. 在抗壞血酸/兒茶素乙醇模式溶液系統中，抗壞血酸進行的降解途徑主要為有氧降解，乙醇濃度明顯影響抗壞血酸降解產物的生成，尤其是 2-furoic acid 及 3-hydroxy-2-pyrone 此兩個抗壞血酸最終產物的消長，但此兩者的總產生量隨著乙醇濃度上升而上升。
4. 過去的文獻中，3-hydroxy-2-pyrone 被認定為含抗壞血酸水溶液的褐變指標，但本研究發現在乙醇溶液系統中，此點並不成立。
5. 乙醇濃度的上升，使抗壞血酸/兒茶素模式溶液的褐變情形下降，推論造成此現象的主要原因為乙醇與水分子鍵結，使模式溶液的水活性降低，產生脫水作用，使抗壞血酸降解速率增加，減少與兒茶素反應的機會，因而降低了褐變情形的發生。
6. 建議含壞血酸之酒類產品或半成品之貯存，在可能的狀況下應減少其單寧化合物含量，以延緩抗壞血酸降解並減輕褐變；提高乙醇濃度會降低水活性而加速抗壞血酸降解，但卻可以降低抗壞血酸與兒茶素共存時之褐變。

參考文獻

- 方祖達，張康榮，1982。天然果汁檢驗標準之研究四、天然果汁中有機酸類型分布之測定。台灣大學農學院研究報告，22: 1-9。
- 冉亦文，闕信玉，徐涵明，1978。梅李製酒之研究第二報。台灣省菸酒公賣局酒類試驗所研究年報，67: 7-16。
- 行政院衛生署，2003。甲醇之檢驗方法 (氣相層析法)，行政院衛生署 92 年 7 月 23 日署授食字第 0929214397 號公告修訂，台北，台灣。
- 李哲瑜，1995。酸味種楊桃果汁貯藏期間品質之變化及非酵素性褐變機制之探討。國立台灣大學食品科技研究所博士論文。台北，台灣。
- 林淑玲，1987。番石榴單寧對果汁儲藏期間顏色變化之影響及其分布、組成，萃取方法之研究。國立台灣大學食品科技研究所碩士論文。台北，台灣。
- 陳美玲，1989。以模式系統探討混濁番石榴果汁非酵素性褐變之機制。國立台灣大學食品科技研究所碩士論文。台北，台灣。
- 游玉文，1991。氧氣對無菌包裝番石榴果漿品質的影響及番石榴之脫氣條件的探討。輔仁大學食品營養研究所碩士論文。台北，台灣。
- 溫紹功，1990。梅子的加工利用。食品工業，22: 39-46。
- 鄭怡琳，1996。果汁中抗壞血酸及單寧類化合物相互作用造成褐變之研究。國立台灣大學食品科技研究所博士論文。台北，台灣。

- Akhavan, I., and Wrolstad, R.E. 1980. Variation of sugars and acids during ripening of pears and in the production and storage of pear concentrate. *J. Food Sci.* 45: 499-501.
- Arribas-Lorenzo, G., and Morales, F.J. 2010. Estimation of dietary intake of 5-hydroxymethylfurfural and related substances from coffee to Spanish population. *Food Chem. Toxicol.* 48: 644-649.
- Ashoor, S.H., and Zent, J.B., 1984. maillard browning of common amino acids and sugars. *J. Food Sci.* 49: 1206-1207.
- Barril, C., Clark, A.C., Prenzler, P.D., Karuso, P., and Scollary, G.R. 2009. Formation of pigment precursor (+)-1"-methylene-6"-hydroxy-2Hfuran-5"-one-catechin isomers from (+)-catechin and a degradation product of ascorbic acid in a model wine system. *J. Agric. Food Chem.* 57: 9539-9546.
- Bates, L., Ames, J.M and MacDougall, D.B., 1994. The use of a reaction cell to model the development and control of colour in extrusion cooked foods. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie.* 27: 375-379.
- Bauernfeind, J.C., and Pinkert, D.M., 1970. Food Processing with Added Ascorbic Acid. *Adv. Food Res.* 18: 219-315.
- Beutter, G.R., and Czapski, P.G., 1986. Ascorbate autoxidation in the presence of iron and copper chelates. *Free Rad. Res. Comms.* 1: 349-353.
- Beveridge, T., and Harrison, J.E., 1984. Nonenzymatic browning in pear juice concentrate at elevated temperatures. *J. Food Sci.* 49: 1335-1336.

- Braddock, R.J., and Sadler, G.D. 1989. Chemical changes in citrus juices during concentration processes. *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.* 405: 293-304.
- Bradshaw, M.P., Prenzler, P.D., and Scollary, G.R., 2001. Ascorbic acid-induced browning of (+)-catechin in a model wine system. *J. Agric. Food Chem.* 49: 934-939.
- Bradshaw, M.P., Cheynier, V., Scollary, G.R., and Prenzler, P.D. 2003. Defining the ascorbic acid crossover from anti-oxidant to pro-oxidant in a model wine matrix containing (+)-catechin. *J. Agric. Food Chem.* 51: 4126-4132.
- Brands, C.M.J., Alink, G.M., van Boekel, M.A.J.S., and Jongen, W.M.F., 2000. Mutagenicity of heated sugar-casein systems: Effect of the Maillard reaction. *J. Agric. Food Chem.* 48: 2271-2275.
- Buera, M.P., Chirife, J., Resnik, S.L., and Wetzler, G. 1987. Nonenzymatic browning in liquid model systems of high water activity: kinetics of color changes due to Maillard's reaction between different single sugars and glycine and comparison with caramelization browning. *J. Food Sci.* 52: 1063-1067.
- Burdurlu, H.S., Koca, N., and Karadeniz, F. 2006. Degradation of vitamin C in citrus juice concentrates during storage. *J. Food Eng.* 74: 211-216.
- Champagne, E.T., Hinojosa, O., and Clemetson, C.A.B., 1990. Production of Ascorbate Free Radicals in Infant Formulas and Other Media. *J. Food Sci.* 55: 1133-1136.
- Chan, H.T., and Cavaletto, C.G., 1986. Effects of deaeration and storage temperature on quality of aseptically packaged guava puree. *J. Food*

- Sci. 51: 165-168.
- Chapon, L., and Chapon, S., 1979. Peroxidatic Step in Oxidation of Beers. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 37: 96-104.
- Clegg, K.M., 1966. Citric acid and the browning of solutions containing ascorbic acid. *J. Sci. Food Agric.* 17: 546-549.
- Conrad, K.R., 2002. Light degradation of juices packaged in polyester bottles. *Univ. Guelph.* 130.
- Cuzzoni, M.T., Stoppini, G., Gazzani, G., Mazza, P., 1988. Influence of water activity and reaction temperature of ribose-lysine and glucose-lysine Maillard systems on mutagenicity, absorbance and content of furfurals. *Food Chem. Toxic.* 26: 815-822.
- del Pilar Buera, M., Chirife, J., Resnik, S.L., and Lozano, R.D., 1987a. Nonenzymatic browning in liquid model systems of high water activity: kinetics of color changes due to caramelization of various single sugars. *J. Food Sci.* 52: 1059-1062.
- del Pilar Buera, M., Chirife, J., Resnik, S. L., and Lozano, R.D., 1987b. Nonenzymatic browning in liquid model systems of high water activity: kinetic of color changes due to reaction between glucose and glycine peptides. *J. Food Sci.* 52: 1068-1070.
- Dennison, D.B., and Kirk, J.R., 1982. Effect of trace mineral fortification on the storage stability of ascorbic acid in a dehydrated model food system. *J. Food Sci.* 47: 1198-1200.
- Deutsch, J.C., 1998. Ascorbic Acid Oxidation by Hydrogen Peroxide. *Anal. Biochem.* 255: 1.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Revers, A.P., and Smith, F., 1956. Calorimetric

- method for determination of sugars and related substance. *Anal. Chem.* 28: 350-356.
- Eichner, K., and Karel, M., 1972. Influence of water content and water activity on the sugar-amino browning reaction in model systems under various conditions. *J. Agric. Food Chem.* 20: 218-223.
- Euler, H.V., and Hassequist, H., 1952. The mechanism of decarboxylation. *Ark. Kemi* 4: 479.
- Euler, H.V., and Hassequist, H., 1953. Ascorbic acid, dehydroascorbic acid and dioxogulonic acid. *Ark. Kemi* 5: 49.
- Ferro Fontan, C., and Chirife, J., 1981. The evaluation of water activity in aqueous solutions from freezing point depression. *J. Food Technol.* 16: 21-30.
- FOSS, 2008. Determination of Total Sulphite in Beer. In "Handbook for Kjeldahl Digestion", 4th ed. Hilleroed, Denmark.
- Fulcrand, H., Cheynier, V., Oszmianski, J., and Moutounet, M. 1997. An oxidized tartaric acid residue as a new bridge potentially competing with acetaldehyde in flavan-3-ol condensation. *Phytochemistry* 46: 223-227.
- Gomez, E, Martinez, A, and Laencina, J., 1995. Prevention of oxidative browning during wine storage. *Food Res. Int.* 28: 213-217.
- Gomez-Plaza, E., Gil-Munoz, R., Lopez-Roca, J.M., and Martinez, A., 1999. Color and phenolic compounds of a young red wine as discriminating variables of its aging status. *Food Res. Int.* 32: 503-507.
- Gordon, L.R., and Samaniego-Esguerra, M.C., 1990. Effect of soluble solids

- and temperature on ascorbic acid degradation in lemon juice stored in glass bottles. *J. Food Qual* 13: 361-374.
- Grønbaek, H., Flyvbjerg, A., Winding, P., Frystyk J., and Hey, H., 2005 Effects of pure ethanol and alcopops on glucose, insulin, and the insulin-like growth factor system in healthy subjects. *Growth Horm. IGF Res.* 15: 243-250.
- Handwerk, R.L., and Coleman, R.L., 1988. Approaches to the citrus browning problem. A review. *J. Agric. Food Chem.* 36: 231-236.
- Hankin, J.R., Sloan, J.J., Firestone, I.J., Ager, J.W., Sokol, R.J., and Martier S.S., 1996. Has awareness of the alcohol warning label reached its upper limit? *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 20: 440-444.
- Hayashi T., Hoshii Y., and Namiki M., 1983. On the yellow product and browning of the reaction of dehydroascorbic acid with amino acids. *Agric. Biol. Chem.* 47: 1003-1008.
- Hill, V.M., Ledward, D.A., and Ames, J.M., 1996. Influence of high hydrostatic pressure and pH on the rate of Maillard browning in a glucose-lysine systems. *J. Agric. Food Chem.* 44: 594-598.
- Hou, C.Y., Jiang, C.M., Wang, Y.T., Lin, J.S., and Wu, M.C., 2008. Effect of storage conditions on methanol content of fruit and vegetable juices. *J. Food Compos. Anal.* 21: 410-415.
- Huelin, F.E., 1953. Studies on anaerobic decomposition of ascorbic acid. *Food Res.* 18: 633-639.
- Huelin, F.E., Coggiola, I.M., Sidhu, G.S., and Kennett, H., 1971. The anaerobic decomposition of ascorbic acid in the pH range of foods and in more acid solutions. *J. Sci. Food Agric.* 22: 540-542.

- Ibanez, J.G., Carreon-Alvarez, A., Barcena-Soto, M., and Casillas, N., 2008. Metals in alcoholic beverages: A review of sources, effects, concentrations, removal, speciation, and analysis. *J. Food Compos. Anal.* 21: 672-683.
- Jeney-Nagymate, E., and Fodor, P., 2008. The stability of vitamin C in different beverages. *Brit. Food J.* 110: 296-309.
- Julkunen-Tiitto, R., 1985. Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *J. Agric. Food Chem.* 33: 213-217.
- Kacem, B., Cornell, J.A., Marshall, M.R., Shireman, R.B., and Matthews, R.F., 1987. Nonenzymatic browning in aseptically packaged orange drinks: effect of ascorbic acid, amino acids and oxygen. *J. Food Sci.* 52: 1668-1672.
- Kanner, J., and Shapira, N., 1989. Oxygen- and metal- ion- dependent nonenzymatic browning of grapefruit juice. *Am. Chem. Soc.* 405: 55-64.
- Kanner, J., Harel, S., and Hazan, B., 1986. Muscle membranal lipid peroxidation by an iron redox cycle system: initiation by oxy radicals and site-specific mechanism. *J. Agric. Food Chem.* 34: 506-510.
- Kanner, J., Harel, S., Fishbein, Y., and Shalom, P. 1981. Furfural accumulation in stored orange juice concentrates. *J. Agric. Food Chem.* 29: 948-949.
- Karel, M. 1979. Prediction of nutrient losses and optimization of processing conditions. In "Nutritional and safety aspects of food processing". Tannenbaum, S. R. (Ed). 233-263.

- Kefford, J.F., Mckenzie, H.A., and Thompson, P.C.O., 1959. Effects of oxygen on quality and ascorbic acid retention in canned and frozen orange juices. *J. Sci. Food Agric.* 10: 51-63.
- Kennedy, J.F., Rivera, Z.S., Lloyd, L.L., Warner, F.P., and Jumel, K., 1990. Studies on non-enzymic browning in orange juice using a model system based on freshly squeezed orange juice. *J. Sci. Food Agric.* 52: 85-95.
- Khan, M.M.T., and Martell, A.E., 1967. Metal ion and metal chelate catalyzed oxidation of ascorbic acid by molecular oxygen. I. Cupric and ferric ion catalyzed oxidation. *J. Am. Chem. Soc.* 89: 4176-4185.
- Kimoto, E., Tanaka, H., Ohmoto, T., and Choami, M. 1993. Analysis of the transformation products of dehydro-L-ascorbic acid by ion-pairing high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 214: 38-44.
- Kirk, J., Dennison, D., Kokoczka, P., and Heldman, D., 1977. Degradation of ascorbic acid in a dehydrated food system. *J. Food Sci.* 42: 1274-1279.
- Kurata T., and Sakurai, Y., 1967. Degradation of L-ascorbic acid and mechanism of nonenzymic browning reaction. part II. Nonoxidative degradation of L-ascorbic acid including the formation of 3-deoxy-1-pentosone. *Agric Biol. Chem.* 31: 170-176.
- Kurata, T., Fujimaki, M., and Sakurai, Y., 1973a. Red pigment produced by the reaction of dehydro-L-ascorbic acid with α -amino acid. *Agric. Biol. Chem.* 37: 1471-1477.
- Kurata, T., Fujimaki, M., and Sakurai, Y., 1973b. Red pigment produced by the oxidation of L-ascorbic acid. *J. Agric. Food Chem.* 21: 676-680.

- Kurata, T., and Fujimaki, M., 1976. Formation of 3-keto-4-deoxypentosone and 3-hydroxy-2-pyrone by the degradation of dehydro-L-ascorbic acid. *Agric. Biol. Chem.* 40: 1287-1291.
- Laing, B.M., Schluter, D.L., and Labuza, T.P., 1978. Degradation kinetics of ascorbic acid at high temperature and water activity. *J. Food Sci.* 43: 1440-1443.
- Ledward, D.A., 1995. High pressure processing-the potential. In *High Pressure Processing of Foods*, eds, Ledward D.A., Johnston, D.E., Earnshaw R.G., and Hasting, A.P.M. Nottingham University Press, Sutton Bonington, pp. 1-5.
- Lee, C.M., Sherr, B., and Koh, Y.N., 1984. Evaluation of kinetic parameters for a glucose-lysine Maillard reaction. *J. Agric. Food Chem.* 32: 379-382.
- Lee, H.S., and Labuza, T., 1975. Destruction of ascorbic acid as a function of water activity. *J. Food Sci.* 40: 370-384.
- Lee, H.S., and Nagy, S., 1988. Quality changes and nonenzymic browning intermediates in grapefruit juice during storage. *J. Food Sci.* 53: 168-172.
- Liao, M.L., and Seib, P.A., 1987. Selected reactions of L-ascorbic acid related to foods. *Food Technol.* 41: 104-107.
- Liu, S. C., Chang, H. M. and Wu, J. S. B., 2003. A study on the mechanism of browning in mei liqueur using model solutions. *Food Res. Int.* 36: 579-585.
- Lohmann, W., 1987. Ascorbic acid and cancer. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 498: 402-417.

- Loomis, W.D., and Battaile, J., 1966. Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. *Phytochemistry* 5: 423-438.
- Mack, T.B., 1974. Kinetics of oxygen uptake in a liquid food. M.S. thesis, Dept. of Food Science & Human Nutrition, Michigan State Univ., East Lansing, MI 48824.
- Mahoney, J.R., and Graf, E., 1986. Role of alpha-tocopherol, ascorbic acid, citric acid and EDTA as oxidants in model systems. *J. Food Sci.* 51: 1293-1296.
- Marfil, P.H.M., Santos, E.M., and Telis, V.R.N., 2008. Ascorbic acid degradation kinetics in tomatoes at different drying conditions. *Food Sci. Technol.* 41: 1642-1647.
- Martell, A.E., 1982. Chelates of ascorbic acid: Formation and catalytic properties. *Adv. Chem.* In "Ascorbic acid chemistry metabolism and uses". Seib, P. A.; Tolbert, B. M. (Eds). Am. Chem. Soc. 153-178.
- Miracco, J.L., Alzamora, S.M., Chirife, J., Ferro Fontan, C., 1981. On the water activity of lactose solutions. *J. Food Sci.* 46: 1612-1613.
- Peng, Z., Duncan, B., Pocock, K. F., and Sefton, M. A., 1998. The effect of ascorbic acid on oxidative browning of white wines and model wines. *Aust. J. Grape Wine Res.* 4: 127-135.
- Petriella, C., Chirife, J., Resnik, S. L., and Lozano, R. D., 1988. Solute effects at high water activity on nonenzymatic browning of glucose-lysine solutions. *J. Food Sci.* 53: 987-988.
- Petriella, C., Resnik, S. L., Lozano, R. D., and Chirife, J., 1985. Kinetics of deteriorative reactions in model food systems of high water activity: color changes due to non-enzymatic browning. *J. Food Sci.* 50:

622-626.

- Rassis, D., and Saguy, I.S., 1995. Kinetics of aseptic concentrated orange juice quality changes during commercial processing and storage. *Int. J. Food Sci. Technol.* 30: 191-198.
- Robertson, G.L., and Samaniego, C.M.L., 1986. Effect of initial dissolved oxygen levels on the degradation of ascorbic acid and the browning of lemon juice during storage. *J. Food Sci.* 51: 184-187.
- Robertson, G.L., and Samaniego-Esguerra, C.M., 1990. Effect of soluble solids and temperature on ascorbic acid degradation in lemon juice stored in glass bottles. *J. Food Qual.* 13: 361-374.
- Robinson, R.A., and Stokes, R.M. 1970. *Electrolyte Solutions*. 2nd revised ed., Butterworths, London, U.K., pp 183-184.
- Rodriguez, M., Sadler, G.D., Sims, C.A., and Braddock, R.J., 1991. Chemical changes during storage of an alcoholic orange juice beverage. *J. Food Sci.* 56: 475-479.
- Roig, M.G., Rivera, Z.S., and Kennedy, J.F., 1995. A model study on rate of degradation of L-ascorbic acid during processing using home-produced juice concentrates. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 46: 107-115.
- Rossi, J.A. and Singleton, V.L., 1996. Contribution of grape phenols to oxygen absorption and browning of wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 47: 231-239.
- Sapers, G.M., 1993. Scientific status summary: Browning of foods, control by sulfites, antioxidants and other means. *Food Technol.* 47: 75-84.
- Sahbaz, F.; and Somer, G., 1993. Photosensitized decomposition of ascorbic acid in the presence of riboflavin. *Food Chem.* 46: 177-182.

- Sawamura, M., Takemoto, K. and Li, Z.F., 1991. Carbon-14 studies on browning of dehydroascorbic acid in an aqueous solution. *J. Agric. Food Chem.* 39: 1735-1737.
- Shen, S.C., Tseng, K.C., and Wu, J.S.B., 2007. An analysis of Maillard reaction products in ethanolic glucose-glycine solution. *Food Chem.* 102: 281-287.
- Shen, S.C. and Wu, J.S.B., 2004. Maillard browning in ethanolic solution. *J. Food Sci.* 69: FCT273-279.
- Shen, S.C., Hsu, H.Y., Huang, C.N., and Wu, J. S. B., 2010 Color loss in ethanolic solutions of chlorophyll *a*. *J. Agric. Food Chem.* 58: 8056-8060.
- Shinoda, Y., Komura, H., Homma, S., and Murata, M., 2005. Browning of model orange juice solution: factors affecting the formation of decomposition products. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69: 2129-2137.
- Shinoda, Y., Murata, M., Homma, S., and Komura, H., 2004. Browning and decomposed products of model orange juice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68: 529-536.
- Singh, R.P., Heldman, D.R., and Kirk, J.R., 1976. Kinetics of quality degradation: ascorbic acid oxidation in infant formula during storage. *J. Food Sci.* 41: 304-308.
- Sizer, C.E., Waugh, P.L., Edsta, S., and Ackermann, P., 1988. Maintaining flavor and nutrient quality of aseptic orange juice. *Food Technol.* 42: 152-159.
- Skouroumounis, G.K., Kwiatkowski, M.J., Francis, I.L., Oakey, H., Capone, D.L., Peng, Z., Duncan B., Sefton, M.A., and Waters, E.J., 2005. The

- influence of ascorbic acid on the composition, colour and flavour properties of a riesling and a wooded chardonnay wine during five years' storage. *Aust. J. Grape Wine Res.* 11: 355-368.
- Smoot, J.M., and Nagy, S., 1980. Effects of storage temperature and duration on total vitamin C content of canned single-strength grapefruit juice. *J. Agric. Food Chem.* 28: 417-421.
- Taga, M.S., Miller, E.E., and Pratt, D.E., 1984. Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 62: 928-931.
- Tannenbaum, S.R., Young, V.R., and Archer, M.C., 1985. Vitamins and minerals. In "Food Chemistry", 2nd ed. Fennema, O. R. (Ed.) Marcel Dekker, Inc., N.Y., NY, U.S.A.
- Tatum, J. H., Shaw, P.E., and Berry, R.E., 1969. Degradation products from ascorbic acid. *J. Agric. Food Chem.* 17: 38-40.
- Toribio, J. L., and Lozano, J. E., 1984. Nonenzymatic browning in apple juice concentrate during storage. *J. Food Sci.* 49: 889-892.
- Tseng, K. C., Chang, H. M., and Wu, J. S. B., 2006. Degradation kinetics of anthocyanin in ethanolic solutions. *J. Food Proc. Preserv.* 30: 503-514.
- Uddin, M.S., Hawlader, M.N.A., Ding, L., and Mujumdar, A.S., 2002. Degradation of ascorbic acid in dried guava during storage. *J. Food Eng.* 51: 21-26.
- Weissberger, A., LuValle, L. E., and Thomas, D. S., 1944. Oxidation Processes. XVII. The autoxidation of ascorbic acid in the presence of copper. *J. Am. Chem. Soc.* 66: 700-705.
- Whistler, R. L., and Daniel, J. R., 1985. Carbohydrates. In " Food

Chemistry", 2nd ed. New York, NY, U.S.A.

Whiting, G.C., and Coggins, R.A. 1960. Formation of L-xylosone from ascorbic acid. *Nature* 185: 843-844.

Will, F., Schopplein, E., Ludwig, M., Steil, A., Turner, A., and Dietrich, H., 2000. Analytical and sensorial alterations of orange juice after hot bottling in PET and glass. *Deutsche. Lebens. Und.* 96:279-284.

Wolfrom, M. L., Kashimura, N., and Horton, D., 1974. Factors affecting the Maillard browning reaction between sugars and amino acids: studies on the nonenzymic browning of dehydrated orange juice. *J. Agric. Food Chem.* 22: 796-799.

Yuan, J.-P., and Chen, F., 1998. Degradation of ascorbic acid in aqueous solution. *J. Agric. Food Chem.* 46: 5078-5082.

Zoecklein, B.W., Fugelsang, K. C., Gump, B. H., and Nury, F. S. 1995. Sulfur dioxide and ascorbic acid in wine analysis and production. Chapman and Hall, London, U.K., pp 178-191.

Zotou, A., Loukou, Z., and Karava, O., 2004. Method development for the determination of seven organic acids in wines by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Chromatographia* 60: 39-44.