

釋迦酒發酵製程的最適化

蔡雅婷、林志輝*

國立臺東大學生命科學系

摘要

釋迦為臺東地區重要的經濟作物，具有特殊香氣且果實甜度高深受國人喜愛。然而釋迦屬後熟果實，對溫度相當敏感不利儲存，加上果肉易氧化褐變加工不易，易造成果農經濟損失，開發製成發酵果實酒的加工製程具發展潛力。酵母菌在釀造中扮演極為重要的角色，對於整個酒的風味、香氣及品質有決定性的影響。本研究以 *S. cerevisiae* Y006 作為釋迦酒發酵菌株，利用 Box-Behnken 反應曲面法設計因子，探討釋迦基質濃度、起始糖度及發酵溫度對釋迦酒酒精產量、發酵成本及甲醇含量之影響。結果發現釋迦基質濃度、初始糖度及發酵溫度對於釋迦酒酒精產量、發酵成本及甲醇含量皆具有顯著影響 ($p < 0.05$)。最適發酵條件為初始糖度 24 °Brix、釋迦基質濃度 28.62% 及發酵溫度 27.5°C。在此條件下產出的新鮮釋迦酒可溶性固形物為 10 °Brix、pH 3.72、酒精濃度 12.7%、可滴定酸 0.34% (以蘋果酸計)、甲醇 82.6 mg/L、總酚 344 mg/L、褐變度 0.1 及色度比 1.14，其外觀呈金黃色且帶有特殊果香。本研究的小量發酵成本每公升為 91 元，顯示本研究採用的發酵條件具有放大潛力，成為台東釋迦加工的新選擇，降低釋迦產業的生產風險。

關鍵字：釀酒、釋迦、反應曲面法

蔡雅婷，國立臺東大學生命科學系學生。

林志輝 (通訊作者)，國立臺東大學生命科學系副教授。E-mail: chlin@nttu.edu.tw

Optimization of apple sugar wine fermentation process

Ya -Ting Tsai, Chih-Hui Lin*

Department of Life Science, National Taitung University

Abstract

Sugar apple is an important economical crop of Taitung. Sugar apple has distinctive flavor with high sugar content thus a beloved Taiwan fruit. However, sugar apple is a temperature sensitive climacteric fruit and difficult to keep fresh while storage. Sugar apple flesh is also prone to oxidative browning which pose significant difficulty to processing and cause economical loss to farmer. For these reason, development of high economical sugar apple processing method such as wine brewing is necessary. Yeast is a crucial part of wine brewing and significantly affect flavor, fragrance and quality of wine. In this study, the effects of substrate concentration, initial °Brix and temperature on apple sugar wine cost, ethanol and methanol content were investigated with *S. cerevisiae* Y006 and response curve surface method of Box-Behnken design. Our results showed that substrate concentration, initial °Brix and temperature are all significant to sugar wine cost, ethanol and methanol content ($p < 0.05$). The optimal brewing condition includes 24 initial °Brix, 28.62% apple sugar substrate and 27.5 °C. The final sugar apple wine has 10 °Brix, pH 3.72, 12.7% ethanol, 0.34% titratable acid (as malic acid), 82.6 mg/L methanol, 344 mg/L total phenol, 0.1 browning, 1.14 chromacity, orang-gold appearance and distinctive aroma. The cost of our small-scale brewed apple sugar wine is 91 NTD/L, which indicates our brewing process is a potential option to reduce the production risk of apple sugar.

Keywords: Wine brewing, Sugar apple, Response surface methodology

Ya-Ting Tsai, Department
of Life Science, National Taitung University

Chih-Hui Lin (corresponding), Department of Life Science, National Taitung University. E-mail :
chlin@nttu.edu.tw

壹、前言

釋迦學名為 *Annona squamosa* L.，為番荔枝科 (*Annonaceae*) 番荔枝屬 (*Annona*) 作物，英文俗名有 Sweet Sop、Sugar Apple 及 Custard Apple 等名稱。釋迦原產於熱帶美洲和西印度群島之低海拔地區 (Orwa et al., 2009)，目前則是普遍種植於熱帶和亞熱帶地區。釋迦果形奇特，外形很像荔枝，又自國外「番邦」引入，故稱為「番荔枝」。其成熟的果實有很多突起之鱗目所組成，很像釋迦牟尼佛頭，因此國人習慣稱之為「釋迦」。根據臺灣府誌記載，釋迦在 17 世紀左右由荷蘭人引進臺灣栽培，起初只在臺南附近栽培種植，當時的產量少且不流行。1980 年代，由於臺東地區的氣候和土壤特性適合釋迦生長，因此引進種植，隨後便成為當地主要經濟果樹 (Chen et al., 2011)。釋迦果肉富含碳水化合物 (20.42%)、蛋白質 (2.34%)、脂肪 (0.3%) 和維生素 C (0.099%)。此外種子含油量達 20% (蔣和李, 1979)。

臺灣是世界上種植釋迦面積最大的地區，主要以臺南、彰化及臺東縣為產區，其中臺東縣以東河、太麻里、卑南鄉及臺東市為最大宗。根據行政院農委會於 2015 年統計資料顯示，臺東縣釋迦種植面積達 4,952 公頃，年產量為 49,712 公噸，種植面積及產量分別占全臺 94% 及 87%。臺東地區目前種植的釋迦主要以臺東一號 (*A. squamosa*, 都蘭種)、臺東二號 (*A. squamosa*, 大目種) 及鳳梨釋迦 (*A. cherimola* Mill. × *A. squamosa*) 為主 (盧和江, 2010)。臺東的鳳梨釋迦由於果實經由改良的關係能夠適應長途運輸，銷售通路從內銷逐漸轉型為以外銷市場為主。臺東地區產銷的臺東一號、臺東二號雖然無法像鳳梨釋迦一樣能夠銷售至國外，但在當地已屬於重要的經濟作物，每年產值可達 20 億以上。而 2014 年的釋迦總產值已超過 30 億元 (行政院農業委員會)。由於釋迦果實特性，在盛產期軟熟問題會更加明顯，臺東地區農會曾為了解決釋迦盛產期大量軟熟果實問題而成立食品加工廠，以市銷果價的 1/2 向農民收購軟熟果實，並將熟果加工成冰品。然而其收購量與加工能力不足，呂 (2007) 調查 2000-2005 年臺東地區農會收購的軟熟釋迦量，發現僅占全部的熟果量約 0.6-1.2%。

以開發加工品的方式解決農產倉儲問題已成為當今主流 (Chilaka et al., 2010; Okunowo et al., 2005)。果酒的生產可以減少存放的損失，且能發展出各式各樣的產品，增加銷售多元性 (Okoro, 2007)。釋迦果實糖度可達 20-25 °Brix，具有特殊香氣，果實甜度高，適合酵母菌發酵製成酒精飲料。又酒精飲料的經濟價值高，可以使得農民過剩及過熟的果實創造出新的經濟價值。酵母菌水果酒的釀造中扮演最重要的角色，將水果中的糖分轉換成酒精，並且產生酯類和多種特殊香氣。不同的酵母菌株所產生的特殊風味及品質會有所差異。且需要能適應環境，如不同的糖和酒精濃度等。本研究自行篩選出的優良酵母菌株進行釋迦酒發酵，並以反應曲面法探討釋迦酒發酵製程的最適發酵條件。

貳、材料與方法

- 一、供試菌種：本研究以 *S. cerevisiae* 菌株共 10 株 (表一) 作為發酵能力對照，皆購自生物資源保存及研究中心 (Bioresource Collection and Research Center)。
- 二、釋迦：臺東當地市場購買尚未軟熟釋迦，於室溫下待其成熟軟化後，除去果皮及種子，留下白色果肉分裝並保存在 -20°C 下備用。

表一、本研究使用的酵母菌參考菌株。

Species	Strain	Source
<i>S. cerevisiae</i>	BCRC 21665	Bioresource Collection and Research Center

BCRC 21679
BCRC 21731
BCRC 21815
BCRC 22285
BCRC 22286
BCRC 22287
BCRC 22289
BCRC 22291
BCRC 20405

三、實驗方法

1. 具有釀酒潛力之酵母菌分離與保存：最終發酵酒醪經序列稀釋 (101-105) 後取 200 μ L 稀釋液塗盤於 yeast peptone dextrose (YPD) agar 在 20°C 下培養 24-48 小時。以四區畫線法分離單一菌落並繼代培養，菌株納入編號整理後以甘油保存於 -80°C。

2. 釋迦酒發酵條件測試

(1) 釋迦果汁滅菌測試：釋迦果肉加水均質配製成 40% 果汁，加入蔗糖調整糖度至 24 °Brix，總體積為 100 mL。果汁以 65°C 進行巴斯德滅菌測試 1、0.5 及 1 小時後，接種 5% 含 10^7 cells/mL 的酵母菌 *S. cerevisiae* Y006 於 20°C 下發酵 7 天。每天記錄糖度變化，並在發酵結束後以沸點法測定生成的酒精濃度。

(2) 單因子發酵條件探討

- i. 不同基質濃度對酒精產量的影響：釋迦果肉加水均質後分別配製成 5、15、25、35、45、55、65 及 75% 果汁進行基質濃度測試。發酵初始糖度皆調整成 24 °Brix，總體積為 100 mL。果汁經過 65°C 巴斯德滅菌 1 小時後接種 5% 10^7 cells/mL 的酵母菌 *S. cerevisiae* Y006，於 24°C 下發酵 7 天，每天記錄糖度變化，並在發酵結束後以沸點法測定生成的酒精濃度。
- ii. 不同發酵溫度對酒精產量的影響：發酵基質濃度為 25%，初始糖度為 24 °Brix，總體積為 100 mL，果汁經過 65°C 巴斯德滅菌 1 小時，接種 5% 10^7 cells/mL 的酵母菌 *S. cerevisiae* Y006，分別於 20、24、28、32、36 及 37°C 下發酵 7 天。每天記錄糖度變化，並在發酵結束後以沸點法測定生成的酒精濃度。
- iii. 不同接種量對酒精產量的影響：發酵基質濃度為 25%，初始糖度為 24 °Brix，總體積為 100 mL，果汁經過 65°C 巴斯德滅菌 1 小時，分別接種 1、3、5、7 及 9% 10^7 cells/mL 的酵母菌 *S. cerevisiae* Y006，於 24°C 下發酵 7 天。每天記錄糖度變化，結束發酵後以沸點法測定生成的酒精濃度。
- iv. 不同初始糖度對酒精產量的影響：發酵基質濃度為 25%，分別以蔗糖配製初始糖度 18、20、24、30、36 及 40 °Brix，總體積為 100 mL，果汁經過 65°C 巴斯德滅菌 1 小時，接種 5% 10^7 cells/mL 的酵母菌 *S. cerevisiae* Y006，於 24°C 下發酵 7 天。每天記錄糖度變化，結束發酵後以沸點法測定生成的酒精濃度。
- v. 不同搖瓶速度對酒精產量之探討：發酵基質濃度為 25%，初始糖度 24 °Brix，總體積為 100 mL，果汁經過 65°C 巴斯德滅菌 1 小時後，接種 5% 10^7 cells/mL 的酵母菌 *S. cerevisiae* Y006，分別於 0 rpm、50 rpm 及 100 rpm 的搖瓶速度下於 24°C 發酵 7 天。並在發酵結束後每天記錄糖度變化，以沸點法測定生成的酒精濃度。

(3) 以反應曲面法探討最適發酵條件之實驗設計：以 *S. cerevisiae* Y006 為實驗菌株，反應曲面法試驗設計中釋迦基質濃度、初始糖度及發酵溫度之實驗組合，根據 Box-Behnken 設計之三因子三 49 階層設計 (表二)。由單因子試驗中得知釋迦基質濃度 15-65% 最適合酵母菌發酵，故以釋迦基質濃度 40% 作為中心點。初始糖度則是在 24 °Brix 時有最高酒精產量，故以 24 °Brix 為中心點。酵母菌一般適合的生長溫度為 20-36°C，故以 28°C 為中心點，探討最適發酵條件。利用 Design-Expert 7.0.0 軟體 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA) 隨機挑選出 15 個組合進行實驗，如表三所示，試驗後分析各組發酵液中酒精產量 (Y1)、換算成本 (Y2) 及甲醇含量 (Y3) 作為反應曲面性狀，求出如下之三變數二次多項式： $Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_{12}X_1X_2 + a_{13}X_1X_3 + a_{23}X_2X_3 + a_{11}X_1^2 + a_{22}X_2^2 + a_{33}X_3^2$ (a 表示各項之係數) 進行變異數分析 (Analysis of variance, ANOVA) 以得到總回歸係數 (R^2)、欠和度 (lack of fit) 顯著性、複回歸方程式之各項係數及各因子對反應觀測值得顯著程度，再將求得之回歸方程式利用 Design-Expert 7.0.0 軟體與 Sigma Plot 12.3 繪製反應曲面圖與等高線圖，探討釋迦酒最適發酵條件。

(4) 酒醪特性分析

- i. 可溶性固形物：發酵後的釋迦酒離心 (6,000 xg, 1 min, 4°C) 取出 20 µL 上清液，以糖度計 (HAND-HELD REFRACTOMETER, N-1α, ATAGO, JAPAN) 測定可溶性固形物 (糖度)，單位以 °Brix 表示。
- ii. pH 值：取發酵上清液 5 mL，以 pH meter (PH500 pH/mV/TEMP Meter, First Clean Corporation, USA) 於室溫下測定 pH 值。
- iii. 可滴定酸 (AOAC, 1984)：取發酵上清液 5 mL，以 pH meter 為輔助，加入 2 滴酚酞，以 0.1 N 氫氧化鈉 (NaOH) 標準溶液進行滴定，當 pH 值達 8.1 時為滴定終點，紀錄 0.1 N 氫氧化鈉標準溶液滴定體積量。可滴定酸 (titratable acidity) 以蘋果酸 (malic acid) 含量計算，結果以 % (g/100 mL) 表示。Titratable acidity (as malic acid) g/100mL = (V1)(0.1)(F)(0.067)(100) (V) V1 : 0.1 N NaOH 之滴定體積 (mL) F : 0.1 N NaOH 之力價 V : 釋迦酒樣本體積 (mL)

表二、三因子三階層反應曲面設計之操作條件變數及階層。

Variable	Symbol	Coded-variable levels		
		-1	0	1
Substrate concentration (%)	X1	15	40	65
Initial brix (°Brix)	X2	12	24	36
Fermentation temperature (°C)	X3	20	28	36

表三、釋迦酒發酵之三因子三階層之 Box-Behnken 設計。

Runs	Response value			Code value		
	Substrate concentration (%)	Initial brix (°Brix)	Fermentation temperature (°C)	X1	X2	X3
1	65	36	28	1	1	0
2	40	12	36	0	-1	1
3	15	12	28	-1	-1	0
4	40	12	20	0	-1	-1
5	15	24	36	-1	0	1

Runs	Response value			Code value		
	Substrate concentration (%)	Initial brix (°Brix)	Fermentation temperature (°C)	X1	X2	X3
6	40	24	28	0	0	0
7	40	36	20	0	1	-1
8	65	24	20	1	0	-1
9	15	36	28	-1	1	0
10	65	24	36	1	0	1
11	40	24	28	0	0	0
12	40	24	28	0	0	0
13	40	36	36	0	1	1
14	15	24	20	-1	0	-1
15	65	12	28	1	-1	0

iv. 酒精蒸餾：取 100 mL 的釋迦酒醪加入 50 mL RO 水置於蒸餾瓶中，並加入一顆沸石防止突沸。蒸餾前先將冷凝管緩慢注滿冷水，避免產生過多氣泡導致冷凝效果降低，再進行加熱，將釋迦酒中的酒精和揮發酸等揮發性成分分離出來，共收集 40 mL 的蒸餾液進行後續分析。

v. 沸點法測定酒精濃度：取 20 mL 酒精蒸餾液加入 40 mL RO 水，記錄稀釋蒸餾液初沸點及最終沸點，並且測定當天水的沸點，利用 VinoCalc 網站 (<http://www.musther.net/vinocalc.html#alcoholcalculation>) 中 Alcohol by Ebulliometry 得出蒸餾液酒精濃度，並以下列公式回推發酵液中酒精濃度。發酵液酒精濃度(%) = (稀釋蒸餾液酒精濃度)(3)(V1) (V) V1：蒸餾液體積 (mL) V：發酵液體積(mL)

vi. 甲醇含量測定：根據 92 年 7 月 23 日行政院衛生署署授食字第 0929214397 號公告修正發布第 2 點的「酒類甲醇之檢驗方法之分光光度法」進行微調。

A. 試劑製備

a. 3% 過錳酸鉀-磷酸溶液：稱取 3 g 過錳酸鉀，加入 15 mL 85% 磷酸溶液再加水定容至 100 mL 儲於棕色瓶中備用。

b. 品紅亞硫酸溶液：稱取 0.1 g 鹼性品紅粉末 (Basic Fuchsin, Sigma-Aldrich) 加入 60 mL 80°C 的 RO 水溶解，再加入 10 mL 10% 亞硫酸鈉溶液及 1 mL 鹽酸，加水定容至 100 mL。如溶液有顏色則加入少許活性炭脫色並過濾，儲於棕色瓶內備用。

c. 含 0.1% 甲醇之 5% 乙醇溶液：精稱甲醇 0.1 g，加入無甲醇之 95% 乙醇溶液 5.26 mL，以水定容 100 mL。

B. 方法

a. 標準曲線製備：取 0、20、40、60、80 和 100 μL 甲醇標準應用溶液 (1 mg/mL)，每管加入 30 μL 無甲醇無甲醛的乙醇後將標準品的體積補水至 500 μL，最終標準品的甲醇濃度分別為 0、0.04、0.08、0.12、0.16 和 0.20 mg/mL。標準品各加入 3% 過錳酸鉀-磷酸溶液 200 μL 於 30°C 反應 15 分鐘後加入 5% 草酸-硫酸溶液 200 μL 脫色，再加入品紅亞硫酸溶液 500 μL，搖勻，於 30°C 反應 30 分鐘。利用分光光度計 (Thermo Labsystems Opsys MR, USA) 以波長 590 nm 測定吸光值，並製作出標準曲線。

b. 樣本檢測：取 100 μL 的樣品蒸餾液於微量離心管中，稀釋 5 倍後，依照上

述步驟操作，即可獲得檢測物中之吸光值，再以標準曲線推算出檢測物中的甲醇濃度，依下列計算公式求出發酵液中甲醇含量 (mg/L)。

$$\text{檢測物甲醇含量 (mg/L)} = C \times F \times 56$$

C：由標準曲線求得檢測物中甲醇之濃度 (mg/L) F：檢測物稀釋倍數

vii. 總酚測定：根據 Somers 及 Ziemelis (1972) 之方法進行修改。

A. 試劑

a. Folin-Ciocalteu 試劑 (Panreac, E.U.)。

b. 20% 碳酸鈉溶液：稱取 20 g 之碳酸鈉加水溶解後，定容至 100 mL 後儲於室溫。

c. 沒食子酸標準溶液配置：精稱 50 mg 沒食子酸 (Gallic acid, Scharlab S.L., European Union) 以 RO 水定容至 100 mL，最終濃度為 500 mg/L。

B. 方法

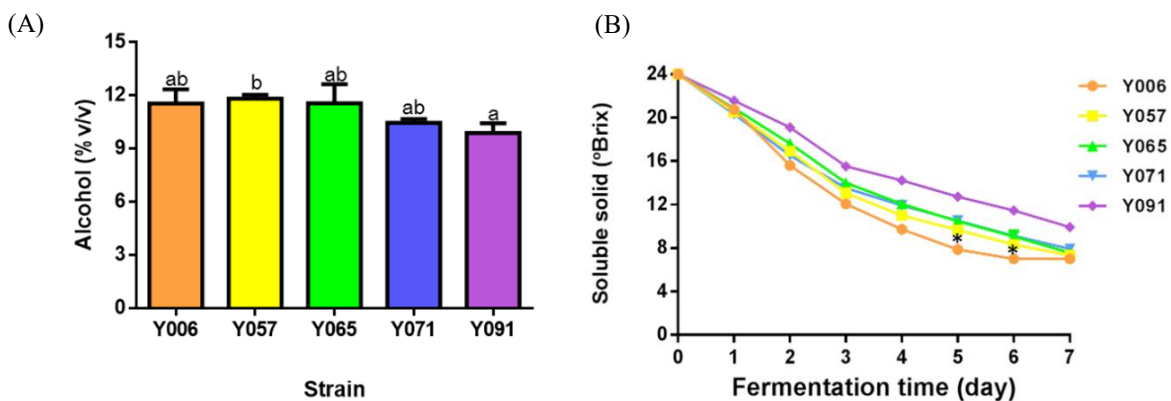
a. 標準曲線製備：將沒食子酸標準溶液稀釋至 0、50、100、150、250 及 500 mg/L，分別各取 10 μ L 加入 600 μ L RO 水，再加入 50 μ L Folin-Ciocalteu 試劑混勻後，8 分鐘內再加入 150 μ L 碳酸鈉溶液，並以 RO 水補體積至 1 mL。標準品於 20°C 下反應 2 小時後以波長 765 nm 測定其吸光值並繪製標準曲線。

b. 樣本分析：取 10 μ L 樣本加入 600 μ L 水，並以上述步驟進行分析，所測的吸光值與標準曲線比對並換算濃度，總酚含量以 gallic acid mg/L 表示。

viii. 褐變度：釋迦發酵液經離心 (12,000 \times g, 3 min, 4°C) 後取上清液，利用全波長微孔盤分光光度計 (Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer) 測定 420 nm 吸光值，作為褐變度指標。

ix. 色度比：釋迦酒以 1:9 比例加水稀釋，以全波長微孔盤分光光度計測定波長 420 nm 及 520 nm 下的吸光值，並求得色度比(A₄₂₀/A₅₂₀)。

(5) 統計分析：所有試驗皆以三重複進行，實驗結果皆以較均值 \pm 標準誤差 (mean \pm SD) 表示。使用 SPSS 12.0 軟體以單因子變異分析 (One-way ANOVA) 進行統計分析，並以杜克多重比較檢驗 (Tukey's multiple comparisons test) 作組間的差異性比較， $p < 0.05$ 表示具有顯著差異。



圖一、*S. cerevisiae* 分離株 Y006、Y057、Y065、Y071 及 Y091 之酒精產量及發酵糖度下降趨勢比較。

參、結果

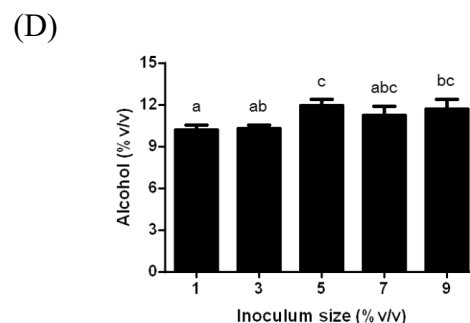
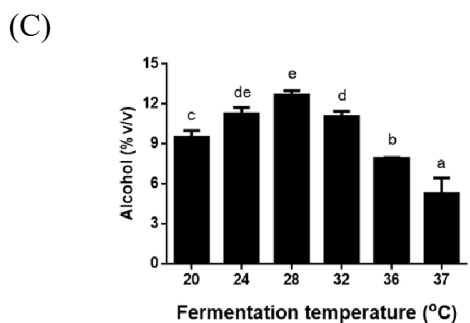
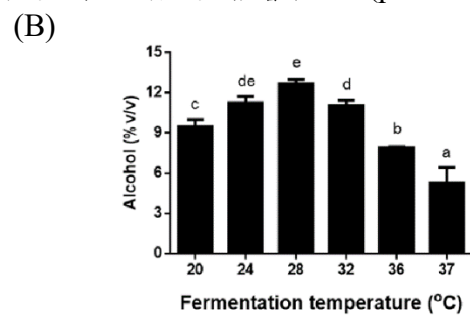
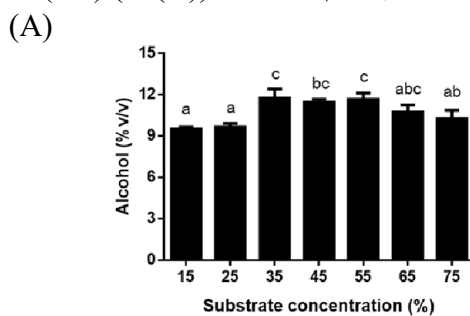
一、酒精產率與發酵速率測試

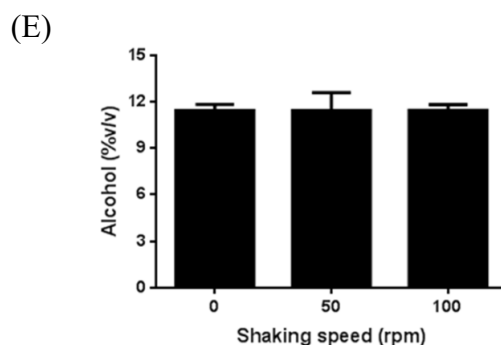
S. cerevisiae 分離株 Y006、Y057、Y065、Y071 及 Y091 於基質濃度 25%、發酵溫度 24°C、初始糖度 24 °Brix 及接種 10^7 cells/mL 酵母菌 5% (v/v) 的初始條件下進行發

酵。酒精產量分別為 11.56、11.84、11.57、10.47 及 9.9% (v/v) (圖一 (A))。其中 Y071 及 Y091 的酒精產量偏低，而 Y006、Y057 及 Y065 則較接近，其中 *S. cerevisiae* Y057 是從市售菌醃中所分離出的工業菌種，顯見本研究自天然水果所篩選出的 *S. cerevisiae* 菌株具有生產潛力。分離株 *S. cerevisiae* Y006 的發酵過程中糖度下降速度最快，第六天就能達發酵終點 (圖一 (B))，因此後續實驗將使用發酵速率快及酒精產量高的 *S. cerevisiae* Y006 進行釋迦酒最適發酵條件測試。

二、釋迦酒發酵單因子條件探討

1. 釋迦基質濃度對釋迦酒中酒精產量之影響：以釋迦基質濃度 15、25、35、45、55、65 及 75% 進行的發酵測試，發酵溫度 24°C，初始糖度 24°Brix，*S. cerevisiae* Y006 接種量 5% (v/v) 的初始條件下發酵 7 天，酒精濃度分別為 9.54、9.68、11.75、11.47、11.68、10.76 及 10.30% (v/v) (圖二 (A))。
2. 發酵溫度對釋迦酒中酒精產量之影響：以發酵溫度為 20、24、28、32、36 及 37°C 進行的發酵測試，基質濃度 25%，初始糖度 24°Brix，*S. cerevisiae* Y006 接種量 5% (v/v) 的初始條件下發酵 7 天。酒精濃度分別為 9.49、11.25、12.65、11.03、7.92 及 5.29% (v/v) (圖二 (B))。發酵溫度對於釋迦酒酒精發酵具有顯著的影響，最適發酵溫度為 28°C。當發酵溫度達到 37°C 時，酒精濃度偏低且發酵液有不良味道，顏色亦偏深黃色。
3. 初始糖度對釋迦酒中酒精產量之影響：以初始糖度為 18、20、24、30、36 及 40°Brix 進行發酵測試，在基質濃度 25%，發酵溫度 24°C，*S. cerevisiae* Y006 接種量 5% (v/v) 的初始條件下發酵 7 天，酒精濃度分別為 7.37、8.13、11.78、10.21、9.70 及 8.77% (v/v) (圖二 (C))。結果發現，初始糖度在 18°Brix 時酒精產量最低，而初始糖度為 24°Brix 時酒精產量最高。當初始糖度增加超過 24°Brix 的樣本，發現其酒精產量是遞減的。由此可知初始糖度對於釋迦酒酒精發酵具有顯著的影響 ($p < 0.05$)。
4. 接種量對於釋迦酒酒精產量的影響：以酵母菌 *S. cerevisiae* Y006 接種量 1、3、5、7 及 9% (v/v) 進行的發酵測試，在基質濃度 25%，發酵溫度 24°C，初始糖度 24°Brix 的初始條件下發酵 7 天。酒精產量分別為 10.22、10.31、11.94、11.26 及 11.70% (v/v) (圖二 (D))。由統計結果顯示酵母菌接種量對酒精產量影響較小 ($p < 0.05$)。





圖二、(A) 基質濃度、(B) 發酵溫度、(C) 初始糖度、(D) 接種量與 (E) 搖瓶速度對釋迦酒酒精產量之影響。

5. 搖瓶速度對釋迦酒中酒精產量之影響

以搖瓶速度為 0、50 及 100 rpm 進行的發酵測試，在基質濃度 25%，發酵溫度 24°C，初始糖度 24 °Brix，*S. cerevisiae* Y006 接種量為 5% (v/v) 的初始條件下發酵 7 天。酒精產量分別為 11.44、11.43 及 11.45% (v/v) (圖二 (E))。結果顯示搖瓶速度對於酒精產量無顯著影響 ($p > 0.05$)。綜合上述五種條件之結果，發現釋迦基質濃度、發酵溫度及初始糖度對於釋迦酒的酒精生成濃度具有顯著影響，所以本研究將利用以上三個變數作為反應曲面法的變數因子以探討釋迦酒最適發酵條件。釋迦基質濃度範圍為 15-65%、發酵溫度範圍為 20-36°C，初始糖度範圍為 12-36 °Brix。

表四、三因子三階層反應曲面實驗結果。

Runs	Factors			Results		
	Substrate concentration (%) X1	Initial brix (° Brix) X2	Fermentation temperature (°C) X3	Alcohol (% v/v) Y1	Cost (NTD/g/L) Y2	Methanol (mg/L) Y3
1	65	36	28	12.31	0.86	178.51
2	40	12	36	4.09	1.70	270.22
3	15	12	28	5.28	0.59	91.87
4	40	12	20	5.80	1.20	305.86
5	15	24	36	10.96	0.32	50.67
6	40	24	28	13.74	0.53	101.51
7	40	36	20	8.00	0.96	123.89
8	65	24	20	11.68	0.88	265.55
9	15	36	28	8.83	0.47	78.81
10	65	24	36	11.27	0.91	274.60
11	40	24	28	13.18	0.55	114.12
12	40	24	28	12.74	0.57	103.65
13	40	36	36	9.40	0.82	112.37
14	15	24	20	6.84	0.51	84.73
15	65	12	28	3.85	2.61	718.00

三、反應曲面法探討釋迦酒最適發酵條件

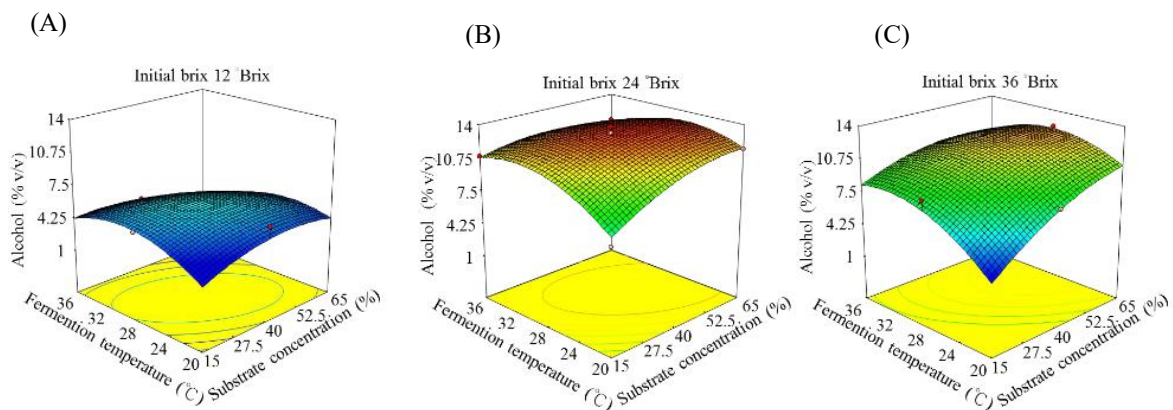
以反應曲面法三因子三階層探討最適條件，三因子分別為基質濃度、初始糖度及發酵溫度，其各因子階層與對應濃度如表二及三所示。不同發酵條件下的釋迦酒酒精產量、換算成本及甲醇含量如表四所示，將釋迦酒酒精產量、換算成本及甲醇含量之數據以

Design-Expert 7.0.0 軟體進行反應曲面分析，以得釋迦酒酒精產量、換算成本及甲醇含量模式之回歸係數值；並求得下列之三因子二次方程式： $\text{Alcohol (\%v/v)} = 13.22 + 0.90X_1 + 2.44X_2 + 0.42X_3 + 1.23X_1X_2 + (-1.13) X_1X_3 + 0.77X_2X_3 + (-1.14) X_{12} + (-4.51)X_{22} + (-1.89) X_{32}$ $\text{Cost (NTD/g/L)} = 0.55 + 0.42X_1 + (-0.37) X_2 + 0.024X_3 + (-0.41) X_1X_2 + 0.056 X_1X_3 + (-0.16) X_2X_3 + 0.034X_{12} + 0.55X_{22} + 0.71X_{32}$ $\text{Methanol (mg/L)} = 106.43 + 141.32X_1 + (-111.55) X_2 + (-9.02)X_3 + (-131.61) X_1X_2 + 10.78 X_1X_3 + 6.03 X_2X_3 + 63.09X_{12} + 97.28X_{22} + (-0.63) X_{32}$ 結果進行變異數分析如表五所示，其中酒精濃度、發酵成本及甲醇含量模式回歸具有顯著差異，表示其模式適合反應性狀之探討，且 R^2 值分別高達 96%、92% 及 95%，這表示三者的變異大部分可由所選取的控制條件的變異來解釋，可信度相當高，因此可將所得的回歸方程式進行繪製反應曲面圖。

表五、反應曲面試驗設計之變異數分析。

Source	df	Alcohol	Cost	Methanol (mg/L)
		(% v/v)	(NTD/g/L)	
Sum of squares				
Regression	9	154.73	4.41	376800
Residual	5	6.25	0.37	18696.81
Lack of fit	3	5.75	0.37	18605.84
Pure error	2	0.5	0.0008593	90.97
Variability explain (R^2)		0.9612	0.9223	0.9527

df = degree of freedom



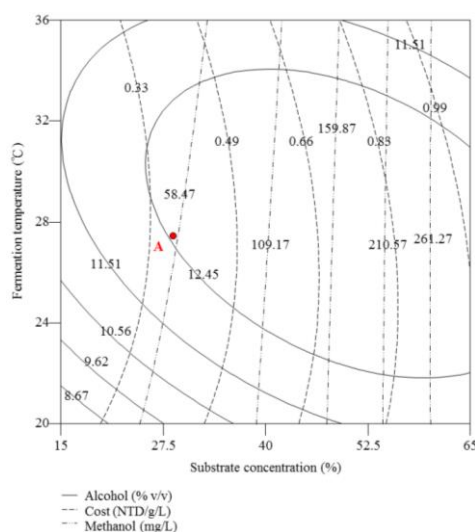
圖三、基質濃度與發酵溫度對釋迦酒酒精產量之反應曲面圖。

圖三(A)為初始糖度在 12 °Brix 下探討基質濃度與發酵溫度對釋迦酒酒精產量之反應曲面圖。結果顯示釋迦酒酒精濃度雖然隨著基質與發酵溫度升高而增加，但在極值條件時酒精產量下降。在初始糖度為 12 °Brix 下最高酒精濃度僅有 5.8% (v/v)，初始糖度為 24 及 36 °Brix 時也有相同趨勢，最高酒精產量分別為 13.74 及 12.31% (v/v) (圖三(B)與(C))，由此可發現較低的初始糖度不利於酒精生成，也可觀察到在最低溫及基質濃度下酒精濃度分別只有 6.84 及 5.28% (v/v)，顯示低溫及低基質濃度不利酒精生成。

綜合上述結果，釋迦酒酒精產量在初始糖度 24 °Brix 時有最大值，發酵成本及甲醇含量有最小值；在基質濃度 40% 發酵溫度 28°C 有最大值，甲醇含量和發酵成本在基質濃度為 15% 有最小值 (圖四)。由於發酵溫度對甲醇含量和發酵成本影響不大，所以發酵溫度就根據酒精產量來設定。

由於本實驗的甲醇含量結果皆未超過法定水果酒標準 (< 4000 mg/L)，因此選用能獲得較高酒精濃度的基質濃度及發酵成本較低的條件，以 Design-Expert 7.0.0 軟體推算反

應曲面法最適發酵條件為初始糖度 24 °Brix、發酵溫度 27.5°C 及基質濃度為 28.62%。



圖四、基質濃度與發酵溫度對釋迦酒酒精產量、甲醇含量及發酵成本之等高線疊圖 (Initial brix = 24 °Brix)。

表六、釋迦酒的特性分析。

Property	100 mL	10 L
Alcohol (% v/v)	12.35 ± 0.33	12.72 ± 1.14
Soluble solid (°Brix)	7.13 ± 0.15	10 ± 0.00
pH value	3.80 ± 0.00	3.72 ± 0.01
Titrateable acidity (%)	0.43 ± 0.01	0.34 ± 0.01
Methanol (mg/L)	83.58 ± 0.62	82.59 ± 12.34
Total phenol (mg/L)	269.09 ± 3.75	344.00 ± 9.38
Browning (A ₄₂₀)	0.11 ± 0.00	0.10 ± 0.00
A ₄₂₀ /A ₅₂₀	1.12 ± 0.01	1.14 ± 0.01 88

四、釋迦酒成分分析

以反應曲面回歸模型推算出的最適發酵條件為初始糖度 24 °Brix、發酵溫度 27.5°C 及基質濃度為 28.62%，經由 65°C 巴斯德滅菌冷卻後接種 5% (v/v) *S. cerevisiae* Y006 進行釋迦酒發酵，分析發酵過程中糖度、酒精濃度、pH 值、可滴定酸、甲醇含量、總酚、色度比及褐變度變化。表六分別為 100 mL 及 10 L 發酵之最終產物化性分析結果圖五(A) 為 10 L 釋迦酒發酵過程中酒精濃度及可溶性固形物的變化。可溶性固形物由 24 °Brix 下降至 11.4 °Brix，而酒精濃度則上升至 12.09% (v/v)。圖五(B)為 10 L 釋迦酒發酵過程中 pH 值及可滴定酸的變化。釀造之初 pH 值為 5.18，發酵第 1 天 pH 值下降至 3.92，而之後 pH 值界在 3.72-3.91 趨近穩定，釋迦酒酒醪中的可滴定酸由 0.04% 上升至 0.34%。

圖五(C)為 10 L 釋迦酒發酵過程中甲醇含量及總酚的變化。尚未接種酵母菌的釋迦果汁中所含的甲醇含量為 120.2 mg/L，發酵第 1 天甲醇含量提升至 363.7 mg/L，第 2 天則下降至 158.4 mg/L 而後慢慢遞減 82.6 mg/L。釋迦酒發酵之初的總酚含量約為 430.7 mg/L，發酵第 1 天總酚含量下降至 324.1 mg/L，發酵 2-4 天總酚含量界在 293.5-272.4 mg/L，發酵第 5 天總酚含量則上升至 334 mg/L。圖五(D)為 10 L 釋迦酒發酵過程中褐變度及色度比的變化。褐變度與色度比的變化趨勢相近，發酵之初的吸光值分別為 0.55 及 1.30，發酵第 1 天兩者吸光值分別降至 0.09 和 1.14，直到發酵結束兩者的吸光值沒有顯著變化。

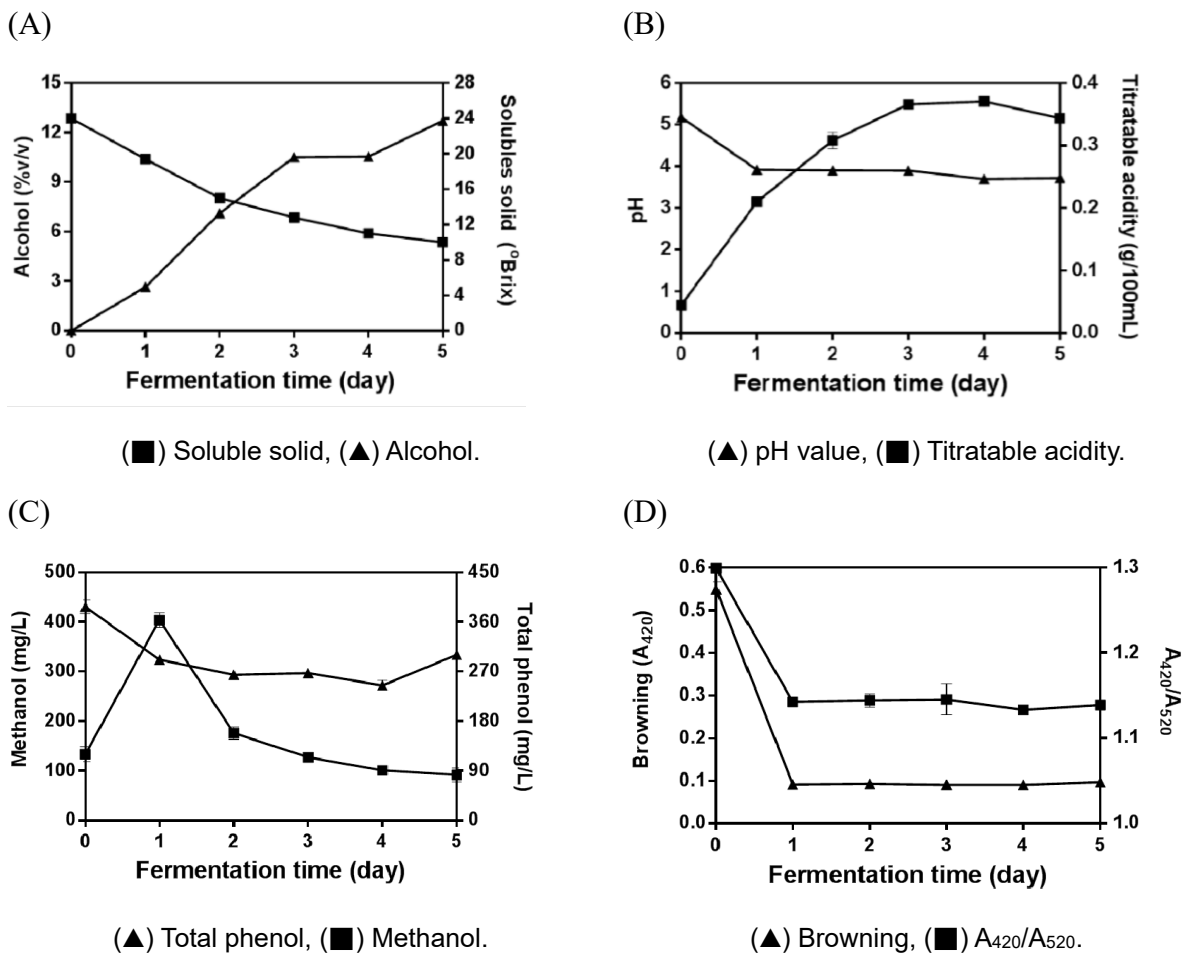
圖六為 10 L 釋迦酒發酵過程中外觀變化。發酵第 0 天釋迦果汁經滅菌後呈現乳白色，發酵第 1 天可以觀察到酒醪中的果泥形成酒帽，隨著發酵時間越長酒帽會慢慢消失，發酵結束時果泥會沉降於發酵桶底部。

肆、討論

一、釋迦酒最適發酵條件探討

釋迦果肉 pH 值約 5.3-5.5，接近酵母菌最適生長 pH 值(4.5-6)，又加上富含碳水化合物(18-25 °Brix)且營養成分高，相當適合酵母菌發酵。本研究經由多種單因子發酵條件測試發現最顯著影響釋迦酒酒精產量變化的因子分別為發酵基質濃度、發酵溫度及初始糖度。發酵基質和酒精產量呈 96 現正相關，當基質增加時 *S. cerevisiae* 所生產的酒精濃度也相對跟著提高，且 *S. cerevisiae* 為兼性厭氧，增加基質濃度有利於酵母菌生長及提升產物。*S. cerevisiae* 喜歡生長於含糖量較高的環境，然而糖度過高 (>40%) 會抑制酵母菌生長，初始糖度為 60% 時 *S. cerevisiae* 則不會生長 (Benítez et al., 1983; Tofalo et al., 2009)。

發酵溫度會影響酵母菌在釀造過程中的生長及代謝產物的速率，酵母菌最適生長溫度一般在 20-30°C。過去有人發現當發酵溫度由 24°C 提升至 28°C 時酵母菌的特定代謝物(總酚量) 隨之增加 (Yin et al., 2010)。



圖五、10 L 釋迦酒發酵過程中酒精濃度及可溶性固形物 (A)、pH 值及可滴定酸 (B)、甲醇含量及總酚 (C) 及甲醇含量及總酚之變化。



圖六、10 L 釋迦酒發酵過程中外觀變化。

而本研究發現發酵溫度在 24-28°C 時酒精濃度遞增，然而發酵溫度超過 30°C 時則開始遞減，再更高的溫度會開始不利於酵母菌生長且發酵的釋迦酒會呈深黃色並有異味產生。由本實驗的單因子發酵測試結果發現，發酵基質濃度、發酵溫度及初始糖度是釋迦酒發酵過程中最重要的控制因子。

二、釋迦酒

釋迦果富含酚類化合物，Jagtap 和 Bapat (2014) 等人曾利用 *S. cerevisiae* NCIM 3282 進行釋迦酒發酵，發現釋迦酒中所含的沒食子酸、原兒茶酸及龍膽酸等酚類化合物能有效清除自由來達成抗氧化之函效。本研究釋迦酒中可滴定酸由 0.04% 上升至 0.34%，可能是酵母菌發酵有助於有機酸物質溶離。一般 dry table wine 可滴定酸範圍在 0.6-0.9%，sweet wine 則在 0.4-0.65%，本研究的釋迦酒酸度為 0.34% 較葡萄酒低，表示在味覺酸度上表現較為不酸。水果酒中甲醇主要來源是果膠酯酶將果膠分子中半乳糖醛酸 C6 上的甲基酯鍵水解，進而釋出甲醇 (Kohn et al., 1968)。紅酒在釀造過程中是將葡萄果肉均質與汁液一起進行發酵，此方法會使果膠酯酶 (pectinesterase; 簡稱 PE) 有較長的時間與果膠作用產生大量甲醇，所以發酵初期甲醇含量較高。本研究的釋迦果經過均質後進行發酵，發酵第 1 天甲醇含量高達 363.4 ppm，隨著發酵天數增加，甲醇含量減少至 82.6 ppm 與葡萄酒發酵過程類似。發酵最終的釋迦酒甲醇含量皆符合衛生署公告標準範圍 (< 4000 ppm)。發酵初期釋迦酒褐變度偏高，可能是因果肉經過滅菌促使酚類化合物氧化聚合，產生褐變物質使酒液顏色變深。後經由酵母菌發酵後褐變度就降低。色度比與褐變度兩者的變化與酚類化合物含量息息相關。

本研究選用釋迦鮮果進行釋迦酒發酵，依市價每台斤 65 元購入。採取反應曲面法所推算的最適條件：發酵初始糖度 24°Brix、發酵溫度 27.5°C 及基質濃度為 28.62%。100 mL 規模釋迦酒發酵所需成本為 7.3 元，其酒精濃度為 12.4%，每公升發酵 1 克的酒精約需要 0.48 元。10 L 規模釋迦酒發酵總成本為 726.2 元，其酒精濃度為 12.7% (v/v)，每公升發酵 1 克的酒精約需要 0.46 元，由以上結果可以發現小量發酵及大量發酵的釋迦酒成本相似，顯示本研究所採用的發酵條件具有放大潛力。本研究雖然以小量購入成本較高的市售品質釋迦為原料，但對照現有釋迦酒產品每公升售價為 875 元，本研究每公升釋迦酒成本為 91 元，顯見具有相當的利潤及銷售潛力。

伍、結論

釋迦是台東地區重要的經濟作物，因果實後熟且對溫度敏感的特性，鮮果保存不易，這些果實的狀況都不利銷售。本研究自行篩選優良酵母菌 *S. cerevisiae* Y006 以反應曲面

法進行最適釋迦酒發酵探討，由反應曲面模型回歸最適發酵條件為初始糖度 24 °Brix、發酵溫度 27.5°C 及基質濃度為 28.62%，接種 5% (v/v) *S. cerevisiae* Y006 能獲 12.7% (v/v) 的酒精濃度，酒外觀呈現金黃色，且帶有特殊果香味。本研究的小量發酵及大量發酵的釋迦酒成本相似，每公升成本為 91 元。顯示本研究所採用的發酵條件具有放大潛力。對照市售釋迦酒產品，本研究的釋迦酒具有相當的利潤及銷售潛力且成果將可提供釋迦產業一個新的加工選項，降低釋迦產業的生產風險。

陸、參考文獻

- 蔣英、李秉滔。1979。中國植物誌。30: 171-172。
- 盧柏松、江淑雯。2010。釋迦生產管理手冊。臺東區農改場技術專刊。特 41: 2-4。
- 呂碧卿。2007。臺東竹原釋迦產業的產銷社會空間。國立臺灣師範大學地理學系在職進修碩士論文。臺北。臺灣。
- Orwa C, Mutua A, Kindt R, Jamnadass R, Anthony S. 2009. Agroforestry database: a tree reference and selection guide version 4.0. World Agroforestry Centre. 1-5.
- Chen J, Chen Y, Li X. 2011. Beneficial aspects of custard apple (*Annona squamosa* L.) seeds. *Nuts & Seeds in Health and Disease Prevention*. 439-445.
- Chilaka CA, Uchekukwu N, Obidiegwu JE, Akpor OB. 2010. Evaluation of the efficiency of yeast isolates from palm wine in diverse fruit wine production. *African Journal of Food Science*. 4: 764-774.
- Okunowo WO, Okotore RO, Osuntoki AA. 2005. The ethanol fermentative efficiency of indigenous yeast strains of different origin on orange juice. *African Journal of Biotechnology*. 4: 1290-1296.
- Okoro CE. 2007. Production of red wine from roselle (*Hibiscus sabdariffa*) and pawpaw (*Carica papaya*) using palm-wine yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Nigerian Food Journal*. 25: 158-164.
- Jagtap UB, Bapat VA. 2014. Phenolic composition and antioxidant capacity of wine prepared from custard apple (*Annona squamosa* L.) fruits. *Journal of Food Processing and Preservation*. 39: 175-182.
- Benítez T, Del Castillo L, Aguilera A, Conde J, Cerdáolmedo E. 1983. Selection of wine yeasts for growth and fermentation in the presence of ethanol and sucrose. *Applied and Environmental Microbiology*. 45: 1429-1436.
- Tofalo R, Chaves-López C, Di Fabio F, Schirone M, Felis GE, Torriani S, Paparella A, Suzzi G. 2009. Molecular identification and osmotolerant profile of wine yeasts that ferment a high sugar grape must. *International Journal of Food Microbiology*. 130: 179-187.
- Yin H, Fan G, Gu Z. 2010. Optimization of culture parameters of selenium-enriched yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) by response surface methodology (RSM). *LWT - Food Science and Technology*. 43: 666-669.
- Jagtap UB, Bapat VA. 2014. Phenolic composition and antioxidant capacity of wine prepared from custard apple (*Annona squamosa* L.) fruits. *Journal of Food Processing and Preservation*. 39: 175-182.
- Kohn R, Furda I, Kopec Z. 1968. Distribution of free carboxyl groups in the pectin molecule after treatment with pectin esterase. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*. 33: 264-269.