

不同二氧化碳濃度對'牛心柿'脫澀之影響

阮雅蘭¹⁾ 謝慶昌²⁾

關鍵字：'牛心柿'、脫澀、二氧化碳、乙醛

摘要：本試驗之目的在調查'牛心柿'經過不同二氧化碳濃度處理後，對果實品質之影響及生理之變化。結果顯示，'牛心柿'果實經氣體脫澀後，各處理組澀味指數皆下降，其中以二氧化碳處理者處理 3 天後，下降最多；對照於可溶性單寧含量以二氧化碳處理者皆低於 0.5%，且柿果所含可溶性固形物降低，主要可能來自於可溶性單寧含量下降引起。脫澀後各處理組較對照組可測得較高含量的酒精及乙醛，其中 100% 氮氣處理時柿果果肉亦可和二氧化碳處理組一樣累積酒精和乙醛，甚至高於 25% 二氧化碳處理者，但脫澀效果卻不及二氧化碳處理者，結果顯示，乙醛可能非促成脫澀之主要因子。

前 言

柿(*Diospyros kaki* L.)屬柿樹科之落葉果樹，柿樹科的種類大約有 400 個，其主要的原產地都近亞熱帶地區。根據民國 91 年台灣農業年報指出，目前台灣柿樹種植面積 3,277 公頃，年產量為 34,747 公噸。柿果主要可分為澀柿(astringent)及甘柿(non-astringent)二系統，主要栽培品種為'牛心柿'、'四周柿'及'富有柿'等。

Pesis 及 Ben-Arie (1986)利用 ¹⁴C 標定之二氧化碳處理柿果 48 小時後，發現約有 95% 的碳源轉變為羧酸(carboxylic acid)，其中羧酸以蘋果酸(malic acid)為主。因此推測二氧化碳處理柿果所誘發產生及累積的酒精及乙醛，可能是二氧化碳進入細胞內後，在 PEP(phosphoenolpyruvate) carboxylase 的催化下和 PEP 結合，並轉變為草醋酸(Oxalacetic acid, OAA)，而 OAA 經由 NADPH-malate dehydrogenase 的催化轉變為蘋果酸，而蘋果酸可經由蘋果酸酵素(malic enzyme)催化變成丙酮酸，再經由 PDC(pyruvate decarboxylase)酵

1) 國立中興大學園藝系碩士班研究生。

2) 國立中興大學園藝系副教授，通訊作者。

素作用產生乙醛(Tamura *et al.*, 1999)，而乙醛與柿果內之可溶性單寧作用，使之聚集成不可溶性單寧使柿果脫澀。

Pesis 等人(1988)分別使用二氧化碳、氮氣及真空處理柿果，結果發現二氧化碳處理脫澀效果最佳，氮氣處理最慢，顯示了在無氧或低氧環境下，除了導致柿果產生無氧呼吸外，二氧化碳在柿果脫澀中也扮演一個重要角色。Taira(1994)等人認為二氧化碳處理會累積乙醛，而使可溶性單寧成為不可溶性單寧，而脫澀可食，故可知二氧化碳對脫澀之重要性。本試驗探討不同二氧化碳及氮氣濃度對'牛心柿'脫澀之影響，調查在脫澀後品質和生理之變化。

材料及方法

一、材料來源

本實驗所選用之材料品種'牛心柿'('Bull Heart')採自台中市軍功里林氏果園。果實以一般園藝成熟度為準，採收後即送回實驗室，挑選果實大小及顏色一致，無外傷之果實為實驗材料。

二、試驗方法

將挑選出的'牛心柿'柿果，每 10 果分別置於呼吸缸中，並以流通方式通入 25、50、75、100% 二氧化碳(以氮氣充填)及 100% 氮氣，對照組通入空氣，置於 $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ 下處理 3 日後取出進行調查。

三、調查項目及方法

(一)澀味指數之調查

根據 Eaks(1967)之單寧印染法，以 5% FeCl_3 浸染 Whatman NO.1 濾紙，予以陰乾製成單寧試紙備用。將欲測定之柿果，自果頂 1/3 處橫切，再把切面印在單寧試紙上，濾紙上的 FeCl_3 會與柿果中的可溶性單寧作用，產生黑色呈色反應。當柿果中可溶性單寧含量愈高，濾紙上所呈現之黑色面積愈多。本試驗依黑色呈色反應面積所佔百分比，區分為五級：1 代表 10% 以下、2 代表 10~30%、3 代表 30~50%、4 代表 50~75%，而 5 代表 75% 以上，一般指數在 2 以下即具商品價值。

(二)硬度之測定

將待測柿果自果頂 1/3 處橫切後，以硬度計(Penetrometer F327)測定心室間穿刺果肉時單位面積內所需最大之重量。單位以牛頓(N)表示之。

(三)可溶性固形物之測定

將待測柿果自果頂 1/3 處橫切後，於心室間之果肉壓搾出果汁，以手持折射計(Hand refractometer, Atage, Model N1)，測定果汁中全可溶性固形物(total soluble solid, TSS)的含量為代表。單位以 $^{\circ}\text{Brix}$ 表示之。

(四)酒精、乙醛之測定

秤取柿果心室間果肉 1 g，切適當大小並以液態氮固定，置於 12 ml 試管中，以血清塞密封，樣品存放於-20℃凍箱中待測。冷凍樣品在 1℃下解凍 1 小時，再置於 30℃下振盪 1 小時，才以針頭抽取試管中氣體進行分析。酒精及乙醛的分析，採用氣相層析儀 (Shimadzu Model GC-8A-FID)。以 17.1 $\mu\text{mole/ml}$ 之酒精及 1.79 $\mu\text{mole/ml}$ 之乙醛為標準液，單位以 $\mu\text{mole/g F.W.}$ 表示。

(五)可溶性單寧之測定

採用 Folin-Denis(Swain and Hillis, 1959)之分析方法，秤取 1 g 之新鮮果肉，置於 50 ml 離心管中，加入 80% 甲醇 20 ml，以均質機(Polytron, KINEMATICA CH-6010)打碎混合均勻後，以 12,000 xg 離心 5 分鐘，取上層澄清液備用。分析方法為，將上清液適當稀釋後，取出 1 ml，加入 6 ml 去離子水振盪，再加入 0.5 ml 的 Folin-Ciocalteus reagent (Merck)混合均勻後靜置 3 分鐘，加入 1 ml 飽和 Na_2CO_3 振盪，最後再加入 1.5 ml 去離子水使體積達 10 ml 並混合均勻，靜置 1 小時，以分光光度計(Hitachi U-2000 double-beam spectrophotometer)於波長 725 nm 下測定吸收值。標準液以 100 ppm caffeic acid 為母液配製，測定後，單位換算為%。

(六)水分潛勢之測定

柿果以直徑 11 mm 的打孔器，在柿果心室部位取果肉圓片，其圓片厚約 2 mm，置於樣品盒內，將盒蓋蓋上，避免樣品水分喪失，待測定時再打開放入露點水分測定儀 (Dewpoint Potentia Meter, WP4; Decagon Devices, inc.) 中，測水分潛勢(water potential)，單位以 MPa 表示。

(七)酒精去氫酵素之同功異構酶電泳分析

柿果經氣體處理 3 日後，去皮後取心室間之果肉秤重，每果秤 5 g，經液態氮急速冷凍後，置於經預冷之研鉢中並加 5 ml 的緩衝液(含有 100 mM HPEPS (2-[4-(hydroxyethyl)-1-piperazinyl-ethanesulfonic acid] KOH (pH 7.4)、0.5 mM ZnCl_2 、10 mM 2-mercaptoethanol、1 mM DTT (DL-Dithiothreitol)、12.5% glycerol 及 0.1 g PVPP (polyvinylpyrrolidone))研磨均勻，爾後於 4℃下以 12,000 xg 離心 20 分鐘，取上清液供 ADH 同功異構酶分析用。電泳分析參考 Shields 等人(1983)之測定方法，並作適度之修正。以 5 mM L-histidine 緩衝溶液(pH 7.0)配製 5.6% (w/v) polyacrylamide 80 ml，含 2% 澱粉之膠體，混合均勻後加入 1 g ammonium persulfate、0.78 mM $\beta\text{-NAD}^+$ (β -Nicotinamide adenine dinucleotide)及 120 μl TEMED (N, N, N', N' -tetramethyl ethylenediamine)，並迅速將膠體倒入製膠槽內，覆蓋平板玻璃，作成長*寬*高=20*20*0.3 cm^3 的電泳膠片。以長*寬=0.8*0.3 cm^2 之濾紙片沾濕上述之酵素萃取液(約為 10 μl)，插入預先切好的齒痕處，將膠片置於冰枕上，並在左右兩端齒痕處插入沾有 0.1% bromophenol blue 溶液的濾紙片作為電泳分析距離及時間之指標；並留一齒痕處插入沾有 ADH 標準溶液(100 unit/ml)的濾紙片作為對照。最後利用沾有電極液(0.13 M Tris-acetate, pH7.0)的不織布連接電場，置於 4℃低溫下，

以 170 伏特電壓進行電泳分離，直到 0.1% bromophenol blue 追蹤劑剛好離開膠體末端。將膠片取下進行染色，染色方法參考 Vallejos (1983)之方法，染液組成份為 0.175 M Na-phosphate buffer (pH7.0)、0.9 mM MTT(3- [4,5-dimethylthiazol-2-yl] -2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)、1.1 mM NAD⁺、1.1 mM PMS(phenazine methosulfate)及 90%(v/v)酒精 10 ml，總體積為 80 ml；於黑暗下進行染色至少 5 小時。最後經去離子水退染，拍照並乾燥保存。

結 果

柿果經氣體流通處理三天後，果肉硬度略微下降，其中以 75%、100% 二氧化碳及 100% 氮氣下降較顯著，較對照組空氣下降約 20%。各處理組可溶性固形物明顯的較對照組低，其中以二氧化碳處理者，下降約 3°Brix(表 1)。澀味指數方面，處理三天後對照組仍維持 5，經二氧化碳及氮氣處理者，澀味指數顯著下降，其中以以 50、75% 二氧化碳處理者較其他處理組低，澀味指數降至 1.5(表 2)。ADH 電泳條帶表現量亦以 50 及 75% 二氧化碳處理組有較高的表現(圖 1)。可溶性單寧濃度方面，經氣體流通脫澀處理者，皆有明顯減少的現象，二氧化碳處理優於氮氣處理，其中又以 75% 二氧化碳處理者可溶性單寧濃度最低為 0.1%(表 2)；另外，二氧化碳及氮氣處理者，乙醇及乙醛皆明顯的累積，以 75% 二氧化碳處理者最多(表 3)。水分潛勢則無論處理組和對照組皆無明顯差異(表 1)。整體而言，本試驗以 50% 二氧化碳+50% 氮氣及 75% 二氧化碳+25% 氮氣處理者，有較快的脫澀速率，其中 50% 二氧化碳+50% 氮氣處理者有較高的果肉硬度。

表1. 不同二氧化碳及氮氣濃度處理對'牛心柿'可溶性固形物、硬度及水分潛勢之影響

Table 1. Effect of carbon dioxide and nitrogen treatment on the total soluble solid (TSS), firmness and water potential of 'Bull Heart' persimmon fruits.

Treatments	TSS (°Brix)	Firmness (N)	Water potential (MPa)
CK	16.8a*	99.5a	-2.1a
25% CO ₂	13.4c	92.2ab	-2.0a
50% CO ₂	13.4c	93.5ab	-2.1a
75% CO ₂	13.3c	84.5b	-2.2a
100% CO ₂	13.7c	80.4b	-2.2a
100% N ₂	15.4b	78.6b	-2.8a

* Mean separation within column was by Duncan's multiple range test at 5% level.

表2. 不同二氧化碳及氮氣濃度處理對'牛心柿'澀味指數及可溶性單寧濃度之影響

Table 2. Effect of carbon dioxide and nitrogen treatment on the astringency index and soluble tannin concentration of 'Bull Heart' persimmon fruits.

Treatments	Astringency index	Soluble tannin (%)
CK	5.0a*	1.7a
25% CO ₂	2.0c	0.2c
50% CO ₂	1.5d	0.2c
75% CO ₂	1.5d	0.1c
100% CO ₂	1.8cd	0.4c
100% N ₂	2.6b	0.9b

* Mean separation within column was by Duncan's multiple range test at 5% level.

表 3. 不同二氧化碳及氮氣濃度處理對'牛心柿'酒精及乙醛含量之影響

Table 3. Effect of carbon dioxide and nitrogen treatment on the ethanol and acetaldehyde content of 'Bull Heart' persimmon fruits.

Treatments	Acetaldehyde (μmole/g/F.W.)	Ethanol (μmole/g/F.W.)
CK	0.1d*	0.7d
25% CO ₂	0.8c	49.5b
50% CO ₂	1.8bc	59.2a
75% CO ₂	2.2a	80.2a
100% CO ₂	2.1bc	55.3a
100% N ₂	1.9b	61.7a

* Mean separation within column was by Duncan's multiple range test at 5% level.

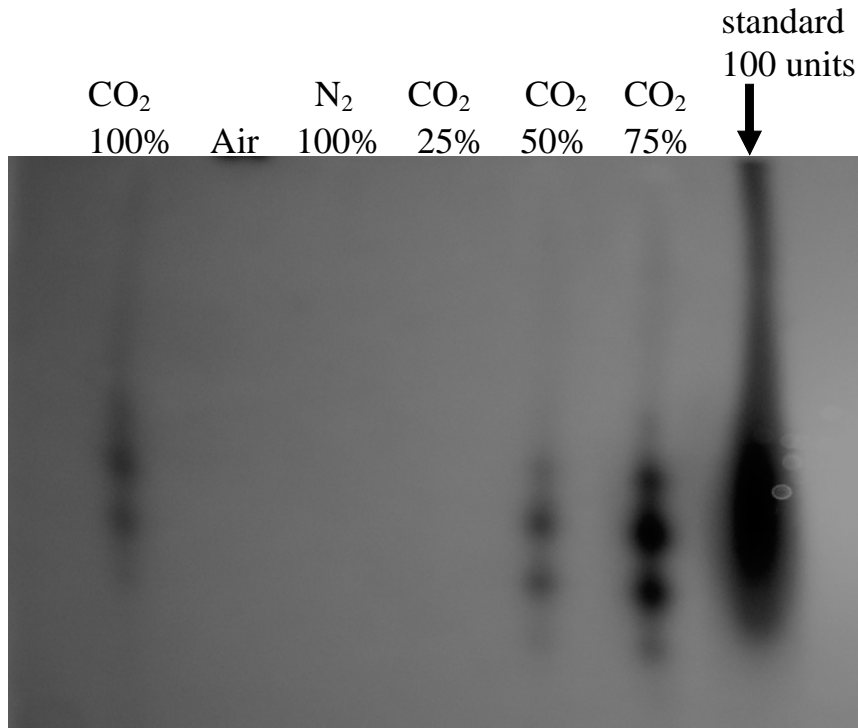


圖 1. '牛心柿'以不同二氧化碳及氮氣濃度處理酒精去氫酵素電泳圖譜

Fig. 1. Electrophoresis of isozymes of alcohol dehydrogenase extracted from 'Bull Heart' persimmon fruits during treated with various concentration of carbon dioxide and nitrogen.

討 論

二氧化碳處理是普遍用於柿果脫澀的方法之一，如'牛心柿'以 60% 以上二氧化碳處理 2 天即可脫澀(林等人, 1987)，'平核無'在 100% 二氧化碳下，1 天即可脫澀(Taira *et al.*, 1989)，而二氧化碳的脫澀機制有學者認為是二氧化碳經由暗固定，形成有機酸，再轉化為乙醛所促成(Tamura *et al.*, 1999; Matsuo and Ito, 1977; Yamada *et al.*, 2002)。本試驗柿果在常溫下，以 25% 二氧化碳處理 3 天即可造成柿果可溶性單寧下降及脫澀，且濃度提高可使脫澀更完全，但 50% 至 100% 間並無明顯差異(表 2)，另外，100% 氮氣雖然亦可造成脫澀，但其程度不及有添加二氧化碳者(表 2)。如同多數學者所作之調查(Matsuo *et al.*, 1976; Pesis *et al.*, 1988; Ben-Arie and Sonego, 1993; Pesis and Ben-Arie, 1984)，二氧化碳處理後果肉乙醛含量會增加(表 3)，而乙醛再經 ADH 作用形成酒精，在本試驗調查結果中，ADH 電泳條帶表現在 50% 二氧化碳處理者即顯著上升(圖 1)，75% 二氧化碳處理者更明顯，此

時果肉內酒精濃度亦有累積的現象(表 3)，但是若以 100% 氮氣處理，其果肉乙醛含量亦有累積現象且稍低於 50、75 及 100% 二氧化碳處理者，不過差異不顯著(表 3)，卻明顯高於 25% 二氧化碳處理者一倍多(表 3)，而此時脫澀情形，無論是可溶性單寧或是澀味指數(表 2)，下降幅度卻不及 25% 二氧化碳處理者。因此，在二氧化碳處理下，乙醛濃度的高低似乎和脫澀速率無明確的關連。

Fukushima 等人(1991)以 35% 酒精處理'平核無'柿果發現，在酒精脫澀期間果肉之結合水(bound water)及滲透壓(osmotic pressure)皆會增加，提出一假說：酒精處理時，會造成細胞壁多醣類(polysaccharides)的斷裂，細胞間的自由水參與水解作用，且與親水性之斷裂成分結合，造成滲透壓上升使水分外移，造成細胞之脫水(osmotic dehydration)而達到脫澀。當'牛心柿'以不同脫澀方法處理時，脫澀過程中皆可發現果肉逐漸乾燥及果汁量減少；以二氧化碳脫澀法為例，柿果含水量約 83%，此量在處理過程中，無論處理組或對照組皆無差異，亦無減少現象，但可離心水(centrifugal water)在二氧化碳處理下，8 小時後即見下降，而在 16 小時可降 37%，往後則維持在 30% 左右，對照組則無此現象(謝等, 1997)。為了進一步證明水分含量與柿果脫澀相關之推論，謝等(1997)將柿果果肉切成圓片，放入由蔗糖所配製成之不同濃度之高張溶液中，在 28°C 下 24 小時，30% 蔗糖處理者已有脫澀現象，而 40%、50% 蔗糖處理者脫澀現象更明顯，同時柿肉圓片有脫水縮小現象，可見以高張溶液所造成之脫水，亦可誘發脫澀。傅氏(1994)以二氧化碳處理柿果後指出，柿果經二氧化碳處理後，環境中高濃度二氧化碳經吸收後，溶解於組織細胞間產生碳酸，而碳酸在水中會解離成碳酸根離子及氫離子，使細胞的酸鹼值降低，造成離子梯度，同時在低 pH 下，容易造成細胞壁鬆軟，而使細胞壁多醣類水解，促使細胞內水分外移，造成細胞脫水。可見二氧化碳對脫澀具有一定程度之影響。在二氧化碳處理下，柿果果肉硬度有下降現象，顯示細胞有鬆軟情形，細胞壁部分分解，依此結果推測脫澀時，二氧化碳可能活化相關酵素，因此酵素催化細胞壁部分水解，使胞外組織的水分潛勢下降，水分由胞內往外移動，產生脫水造成脫澀。本試驗於脫澀期間，偵測'牛心柿'果肉圓片組織的水分潛勢，結果顯示並無顯著變化(表 1)，可能與所使用之測定材料為組織塊，無法偵測到胞內的變化所致，故仍需進一步研究。

參 考 文 獻

- 林宗賢、謝慶昌、繆八龍。1987。二氧化碳與石灰懸浮液對柿果脫澀、軟化與乙烯產生之比較。中國園藝 33: 274-283。
- 傅琦燉。1994。柿果二氧化碳脫澀之生理變化及微細構造。國立中興大學園藝學研究所碩士論文。79p。

- 謝慶昌、林慧玲、傅琦嫩、李國權。1997。水分狀態和柿果脫澀之關係。國立中興大學台中夜間部學報 3: 553-558。
- Ben-Arie, R. and L. Sonogo. 1993. Temperature affects astringency removal and recurrence in persimmon. *J. Food Sci.* 58: 1397-1400.
- Fukushima, T., T. Kitamura, H. Murayama, and T. Yoshida. 1991. Mechanisms of astringency removal by ethanol treatment in 'Hiratanenashi' kaki fruits. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 60: 685-694.
- Matsuo, T., J. Shinohara, and S. Ito. 1976. An improvement on removing astringency in persimmon fruits by carbon dioxide gas. *Agric. Biol. Chem.* 40: 215-217.
- Matsuo, T. and S. Ito. 1977. On mechanisms of removing astringency in persimmon fruits by carbon treatment I. Some properties of the two processes in the de-astringency. *Plant Cell Physiol.* 18: 17-25.
- Overholser, E. L. 1927. Some studies upon the ripening and removal of astringency in Japanese persimmons. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 24: 256-266.
- Pesis, E., L. Aharon, and R. Ben-Arie. 1988. Role of acetaldehyde production in the removal of astringency from persimmon fruits under various modified atmospheres. *J. Food Sci.* 53: 153-156.
- Pesis, E. and R. Ben-Arie. 1984. Involvement of acetaldehyde and ethanol accumulation during induced deastringency of persimmon fruits. *J. Food Sci.* 49: 896-899.
- Pesis, E. and R. Ben-Arie. 1986. Carbon dioxide assimilation during postharvest removal of astringency from persimmon fruit. *Physiol Plant.* 67: 644-648.
- Taira, S., K. Onodera, H. Itamura, and S. Watanabe. 1994. Differences between the Japanese persimmon 'Denkuro' and 'Hiratanenashi' on acetaldehyde production by their flesh discs. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 62: 897-902.
- Tamura, F., K. Tanabe, A. Itai, and M. Hasegawa. 1999. Characteristics of acetaldehyde accumulation and removal of astringency with ethanol and carbon dioxide treatment in 'Saijo' persimmon fruit. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 68: 1178-1183.
- Yamada, M., S. Taira, M. Ohtsuki, A. Sato, H. Iwanami, H. Yakushiji, R. Wang, Y. yang, and G. Li. 2002. Varietal differences in ease of astringency removal by carbon dioxide gas and ethanol vapor treatments among Oriental astringent persimmons of Japanese and Chinese origin. *Sci. Hort.* 94: 63-72.

Effect of Carbon Dioxide Treatment on the Deastringency of 'Bull Heart' Persimmon Fruits

Ya-Lan Ruan ¹⁾ Ching-Chang Shiesh ²⁾

Key words : 'Bull Heart', Deastringency, Carbon dioxide, Acetaldehyde

Summary

The objectives of this studied were to investigate the effect of carbon dioxide and nitrogen treatment on the quality and physiology change of 'Bull Heart' persimmon fruits. The results indicated the persimmon fruits deastringency with carbon dioxide and nitrogen which tended to have a reduce of astringency index and soluble tannin concentration, and the carbon dioxide deastringency treatment fruits which reduced a lot. The deastringency fruits which have a reduce of total soluble solids which may resulted from the reduced of soluble tannin. Further studied showed that fruits treated with 100% nitrogen, as in the case of carbon dioxide, accumulated acetaldehyde and ethanol in fruits but the rate of deastringency was low and the method was less effective. Results indicated that acetaldehyde is not a key factor in the process.

1) Graduate student, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

2) Associate Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

Corresponding author.

