

東海大學食品科學研究所
Graduate Institute of Food Science
TUNGHAI UNIVERSITY

食品科技組碩士論文
Master Thesis of Food Technology Section

指導教授：蔡正宗 博士
Advisor：Tsun-Chung Tsai, Ph. D.

部分純化諾麗果膠酵素與諾麗果汁控溫發酵之研究
Study on partial purification of pectin methylesterase from noni
and temperature-controlled fermentation of noni juice

研究生：林昱成
Graduate Student：Yu-Cheng Lin

中華民國 九十九 年 七 月

July, 2010

碩士論文指導教授推薦書

食品科學研究所食品科技組 林昱成 君所提之論文

部分純化諾麗果膠酵素與諾麗果汁控溫發酵之研究

Study on partial purification of pectin methylesterase from noni
and temperature-controlled of fermentation of noni juice

係由本人指導撰述，同意提付審查

此致

食品科學研究所所長

李 松 永

指導教授：蔡正宗

中華民國九十九年七月二十三日

碩士論文考試委員審定書

食品科學研究所食品科技組 林昱成 君所提之論文

部分純化諾麗果膠酵素與諾麗果汁控溫發酵之研究

Study on partial purification of pectin methylesterase from noni
and temperature-controlled of fermentation of noni juice

經本委員會審定通過，特此證明。

論文考試委員會

委員：

李松永

東海大學食品科學系教授

江文德

東海大學食品科學系副教授

楊正善

工研院研究員

張毅尊

順天生物科技公司研發部經理

指導教授：蔡正宗

中華民國九十九年七月二十三日

謝誌

感謝恩師 蔡正宗博士兩年來的悉心指導、砥礪與肯定，尤其在實驗遇到瓶頭時所給予的支持與啟發，及提供完善的研究設備和充分的資源，並於論文撰稿期間細心的校閱斧正，使論文得以順利完成，師恩浩瀚，衷心感謝，謹於卷首致最深謝意。

文稿初成，承蒙本系所教授 李根永博士、副教授 江文德博士與工研院研究員 楊正憲博士、順天生物科技研發部經理 張毅偉博士撥冗詳加審閱及斧正，並於口試期間給予學生精闢的指導與寶貴意見，使論文更臻周嚴，特此致上由衷謝意。

學習期間，感謝學長姊崇聖、美燕、琪雅等的勉勵與指點以及摯友展維、豪駿、邦弘、立平、永翰、爾雅、沁玗、怡萱、琇茹、欣蓓等的鼓勵，學妹如裕、佳伶的協助，讓我順利完成修業，感謝大家。

最後，感謝我最親愛的家人，由於您的支持與鼓勵，尤其是多年辛苦培育我的父母親，和提供我方向的老姊，才能讓我順利完成學業而不致半途而廢。將此論文獻給你們，願與你們一同分享這份喜悅。

林昱成 謹致於

東海大學食品科學研究所

中華民國九十九年七月

中文摘要

諾麗 (*Morinda citrifolia*) 目前已知具有多種功能性，其果實呈強烈後熟現象，果實變軟並散發特殊風味，此過程可能與果膠分解有關。若能促進果膠分解，可望提高果汁產率及促進功能性成份釋放，有助於增強諾麗果汁之品質及縮短發酵時程。本研究分為三部分：

第一部份純化諾麗果中果膠甲酯酶 (Pectin methylesterase, PME)，並定性其溫度特性。諾麗果泥先以含鹽之緩衝溶液萃取，收集 35~75% 的硫酸銨沉澱物，再以透析除鹽後經過濾器濃縮，並以陰離子交換管柱去除部分雜質，可得兩種酵素同型體，比活性分別提高 1.65 倍和 14.57 倍。使用滴定法 (pH-Stat) 做最適溫度與溫度耐受性之測試，結果顯示諾麗果 PME-A 最佳活性溫度為 60°C，PME-B 經 70°C 加熱 5 分鐘後仍具有約 44% 的殘餘活性。

第二部份設計以 25、35、45、55°C 為期一個月之控溫發酵，每週取樣測試產品基本性質與功能性成分變化。初步研究結果指出，諾麗果汁的 pH 值約 3.6，室溫發酵的組別由於微生物生長，使得 pH 值和可溶性固形物降低，而高溫發酵組別物理性質相對較穩定。適當提高發酵溫度在初期能提高果汁產率，促進色素生成，提高抗氧化能力；然而過度提高溫度 (45 和 55°C) 可能因水分蒸散或酵素不安定而造成產率減損。高溫使褐變反應劇烈而色澤紮黑，且易使類黃酮、

芸香素等功能性成分受到破壞，造成 ACE 抑制活性之減損。

第三部份對室溫發酵之果汁進行不同殺菌條件之測試，傳統低溫長時殺菌法雖能確保果汁安全，然而其長時間熱處理卻改變果汁品質；使用膜過濾除菌或板式熱交換高溫短時殺菌，對果汁基本性質與功能性成分並無顯著影響，其中又以板式熱交換處理效率較高。

總體而言適當提高發酵溫度可促進諾麗果發酵，縮短發酵時間，輔以高溫短時的殺菌方法，可以縮短生產製程。

關鍵字：諾麗、果膠甲酯酶、控溫發酵、植物化學物質、抗氧化能力、ACE 抑制活性、殺菌。

Abstract

Noni (*Morinda citrifolia*) has been known to contain many functional phytochemicals. Noni fruit is climacteric. The fruit will ripe quickly and become soft and juicy. The ripe noni fruit gives strong foul flavor. The changes in texture and flavor during ripening are closely related to activity of its endogenous pectin methylesterase (PME). Enhancing the PME activity would leads to the increase in fruit juice yield and release of functional phytochemicals and also will shorten the juice production processing and improve the juice quality.

This project will focus on three subjects: (1) isolation and characterization of PME from noni juice, (2) production and characterization of noni juice fermented under anaerobic at four different temperature (25, 35, 45 and 55°C), and (3) evaluation the effectiveness of three pasteurization methods (Low Temperature Long Time, LTLT; High Temperature Short Time, HTST; and Ultrafiltration) on the quality of noni juice.

First, crude PME was extracted from ripe soft noni fruit with NaCl-Tris buffer, pH 8.0, and precipitated with ammonium sulfate. Precipitate of 35-75% ammonium sulfate was dialyzed and the solution was concentrated with Amicon filter for DEAE column chromatography. Two PME isomers (PME-A and PME-B) were isolated and optimal temperature for PME-A was found to be 60°C. PME-B showed better thermal stability than PME-A.

Second, noni juices from different temperature-controlled fermentations were subjected to the measurements of juice-yield, color

change, functional phytochemicals and physiological activity. Noni fermented under 35°C gave better juice yield than others at initial fermentation period. Both noni juices from noni fermented under lower temperature, 25 and 35°C, gave better antioxidant activity and lower acidity, probably due to microbial growth. Whereas noni juice from noni fermented under higher temperature, 45 and 55°C, gave lower juice yield, darker in color, less content of phytochemicals, lower ACE inhibitory activity and higher antioxidant activity, probably due to mallard reaction.

All three methods selected were found to reduce microorganism effectively and exhibited no significant effectiveness on the content of functional phytochemical and on physiological activity. However, HTST (95°C, 13 sec.) posses the advantage of easy operation and save the pasteurization time over ultrafiltration (0.45 µm) and LTLT (65°C, 24 + 24 hrs).

Key word: noni, pectin methylesterase, temperature-controlled fermentation, phytochemical, antioxidant activity, ACE inhibitory activity, pasteurization.

目錄

中文摘要.....	I
Abstract.....	III
目錄.....	V
圖索引.....	IX
表索引.....	XII
附錄索引.....	XIII
壹、緒言.....	1
貳、文獻回顧.....	3
一、諾麗之簡介.....	3
(一) 名稱.....	3
(二) 植物外觀.....	3
(三) 產地分佈.....	4
(四) 品種分類.....	4
(五) 傳統用途.....	6
(六) 基本成分性質.....	7
(七) 後熟現象.....	10
二、果膠之簡介.....	15
(一) 植物細胞壁.....	15

(二) 果膠的基本性質	15
(三) 果膠的組成與分類	19
(四) 果膠酵素	19
(五) 後熟期間的酵素作用	23
(六) 果膠甲酯酶 (PME) 的特性	24
三、諾麗果的生理功效與功能性成分	34
(一) 已被證實的生理活性	34
(二) 諾麗的功能性成分	39
四、諾麗果的商業應用	58
(一) 傳統諾麗果汁發酵	59
(二) 諾麗果汁之製程改良	60
五、本篇研究目的	63
參、材料與方法	65
一、實驗材料	65
(一) 原料	65
(二) 試劑與試藥	65
(三) 儀器設備	66
二、實驗方法	70
(一) 實驗大綱	70

(二) 諾麗果PME的萃取與純化—Part 1	70
(三) 諾麗果汁之控溫發酵—Part 2	77
(四) 不同殺菌方式之影響—Part 3	86
(五) 統計分析	88
肆、結果與討論	89
Part 1: 諾麗果PME的萃取與純化.....	89
一、諾麗果PME之萃取	89
二、諾麗果酵素粗萃液之硫酸銨劃分.....	90
三、DEAE A-25 離子交換層析之純化結果.....	91
四、純化總表.....	93
五、影響PME活性因子之討論	94
Part 2: 控溫發酵之應用	100
一、基本性質測試.....	100
二、功能性成分測試.....	112
三、生理活性測試.....	120
四、官能品評.....	130
Part 3: 不同殺菌方式之影響	137
一、對基本性質的影響.....	137
二、對功能性成分的影響.....	140

三、對生理活性的影響.....	140
伍、結論.....	145
陸、參考文獻.....	148
柒、附錄.....	173

圖索引

圖一、不同品種的諾麗果 (左：本土品種、右：大溪地品種).....	5
圖二、不同熟成階段的諾麗果 (上：生果、下：熟果).....	14
圖三、同質半乳糖醛酸的結構與修飾作用	17
圖四、同質半乳糖醛酸多醣與鈣交聯之蛋殼模型	18
圖五、聚半乳糖醛酸酶、果膠酸裂解酶、果膠裂解酶和果膠酯酶對果 膠分子的酵素降解作用.....	21
圖六、熟成期間果膠性狀變化與酵素作用情形	25
圖七、果膠甲酯酶的反應機制	26
圖八、諾麗分離物質的化學結構 (僅列果實部分).....	44
圖九、由苯丙胺酸產生苯丙酯類、烯類、木酚素、木質素、軟木質、 黏質、類黃酮、單寧等.....	47
圖十、膳食多酚於人體的可能路徑	50
圖十一、黃酮核心、槲皮酮、橙皮素、柚皮素之化學結構和其常見的 配醣體.....	51
圖十二、縮合單寧的基本重複單位	54
圖十三、縮合單寧的結構模型	54
圖十四、東莨菪素之結構	56
圖十五、芸香素之結構	56

圖十六、本研究實驗內容簡要	71
圖十七、諾麗果PME之萃取與純化流程圖	72
圖十八、諾麗果PME之DEAE A-25 離子交換管柱層析圖	92
圖十九、反應溫度對諾麗果PME活性的影響	96
圖二十、諾麗果PME之溫度耐受性	98
圖二十一、諾麗果汁於發酵期間的總產率變化	102
圖二十二、諾麗果汁於發酵期間的pH值變化	104
圖二十三、諾麗果汁於發酵期間的可溶性固形物變化	106
圖二十四、諾麗果汁於發酵期間的乳酸變化	107
圖二十五、諾麗果汁於發酵期間的醋酸變化	107
圖二十六、諾麗果汁於發酵期間的亮度 (L*值) 變化	109
圖二十七、諾麗果汁於發酵期間的顏色變化	111
圖二十八、諾麗果汁於發酵期間的總酚化合物變化	113
圖二十九、諾麗果汁於發酵期間的類黃酮變化	115
圖三十、諾麗果汁於發酵期間的縮合單寧變化	117
圖三十一、諾麗果汁於發酵期間的東莨菪素變化	119
圖三十二、諾麗果汁於發酵期間的芸香素變化	121
圖三十三、諾麗果汁於發酵期間的DPPH自由基掃除能力變化	123
圖三十四、諾麗果汁於發酵期間的ABTS ⁺ 自由基掃除能力變化	123

圖三十五、諾麗果汁中DPPH自由基清除能力與總酚類的關係.....	125
圖三十六、諾麗果汁中ABTS ^{·+} 自由基清除能力與總酚類的關係 ...	125
圖三十七、諾麗果汁於發酵期間的ACE抑制活性變化	129
圖三十八、初步發酵的諾麗果汁之順位法積分	132
圖三十九、後期發酵的諾麗果汁之順位法積分	135
圖四十、不同殺菌條件的諾麗果汁之亮度 (L*) 變化.....	138
圖四十一、不同殺菌條件的諾麗果汁之顏色變化.....	139
圖四十二、不同殺菌條件的諾麗果汁之功能性化合物變化 (1)	141
圖四十三、不同殺菌條件的諾麗果汁之功能性化合物變化 (2)	142
圖四十四、不同殺菌條件的諾麗果汁之生理活性變化	143

表索引

表一、諾麗的傳統用途	8
表二、諾麗果汁的物化特性	9
表三、不同果汁的鉀含量比較	11
表四、夏威夷果粉的特定營養成分分析	11
表五、基於單糖鍵結資料的多糖組成推論	12
表六、在熟成期間水果表面顏色與硬度之演變	12
表七、作用於果膠或果膠酸的果膠酵素分類表	22
表八、不同植物PME之分子量與等電點	28
表九、不同植物PME之最適反應溫度與溫度耐受性	29
表十、不同植物PME之最適反應pH值與離子濃度	33
表十一、從諾麗分離的化合物 (僅列果實部分).....	41
表十二、日常膳食的植物酚類來源	48
表十三、食物來源的主要類黃酮種類和其個別化合物	52
表十四、諾麗果PME之純化總表	95

附錄索引

附錄一、牛血清蛋白之標準曲線	173
附錄二、乳酸之標準曲線	173
附錄三、醋酸之標準曲線	174
附錄四、典型的有機酸分析之樣品層析圖譜	174
附錄五、沒食子酸之標準曲線	175
附錄六、槲皮酮之標準曲線	175
附錄七、兒茶素之標準曲線	176
附錄八、東莨菪素之標準曲線	176
附錄九、芸香素之標準曲線	177
附錄十、典型的東莨菪素與雲香素測定之樣品層析圖譜	177
附錄十一、BHA之標準曲線	178
附錄十二、Trolox之標準曲線	178
附錄十三、品評表	179
附錄十四、反應溫度對諾麗果PME活性的影響	180
附錄十五、諾麗果PME之溫度耐受性	180
附錄十六、不同發酵時間的諾麗果汁之產率 (%)	181
附錄十七、不同發酵時間的諾麗果汁之pH值	181
附錄十八、不同發酵時間的諾麗果汁之可溶性固形物 (以糖度表示)	

.....	182
附錄十九、不同發酵時間的諾麗果汁之乳酸含量	182
附錄二十、不同發酵時間的諾麗果汁之醋酸含量	183
附錄二十一、不同發酵時間的諾麗果汁之L*值	183
附錄二十二、不同發酵時間的諾麗果汁之a*值	184
附錄二十三、不同發酵時間的諾麗果汁之b*值	184
附錄二十四、不同發酵時間的諾麗果汁之總酚含量	185
附錄二十五、不同發酵時間的諾麗果汁之類黃酮含量	185
附錄二十六、不同發酵時間的諾麗果汁之縮合單寧含量	186
附錄二十七、不同發酵時間的諾麗果汁之東莨菪素含量	187
附錄二十八、不同發酵時間的諾麗果汁之芸香素含量	187
附錄二十九、不同發酵時間的諾麗果汁之DPPH自由基掃除能力 ..	188
附錄三十、不同發酵時間的諾麗果汁之總抗氧化能力	189
附錄三十一、不同發酵時間的諾麗果汁之ACE抑制活性 (%)	190
附錄三十二、初步發酵的諾麗果汁之順位檢定表	191
附錄三十三、後期發酵的諾麗果汁之順位檢定表	192
附錄三十四、不同殺菌條件的諾麗果汁之pH與色澤	193
附錄三十五、不同殺菌條件的諾麗果汁之功能性成分含量	193
附錄三十六、不同殺菌條件的諾麗果汁之生理活性	194

壹、緒言

隨著文明進步與社會環境的變遷，現代人對於健康保健的需求日益提升，然而化學合成之醫療藥品往往伴隨強烈的副作用，因此作用較為緩和之天然草本藥方便成為替代療法的新興選擇；藉由每日補充特定營養成分，逐步改變體質，以達提升免疫抵禦疾病之效果。目前市面上已有多種替代療法的產品問世，其中諾麗果汁為近年國內崛起的熱門保健飲品。

諾麗 (noni) (*Morinda citrifolia* L.) 為原產於南太平洋之常綠灌木，其生命力旺盛，因此在熱帶與亞熱帶地區皆能發現其蹤跡 (Yang *et al.*, 2007a)。波里尼西亞人已利用此植物達二千年之久，其根與樹皮常做為染劑，其他部位則具有多種藥療效果 (Palu *et al.*, 2008)，在當地作為“萬靈藥”使用 (Yang *et al.*, 2007b)。近十年已有多項對諾麗之研究，主要著重於果實與葉的機能成分與功效，大約有 200 多種植物化學成分被鑑定出 (Pawlus & Kinghorn, 2007)。研究指出，諾麗含蔥醌、東莨菪素、芸香素、類黃酮、多醣等多種酚類物質，能提供抗菌、抗癌、抗氧化、免疫調節、止痛及改善心血管疾病等功能 (Chan-Blanco *et al.*, 2006)。

諾麗果具多種療效，然而在熟成後會產生刺激性腐臭味，故諾麗果多以加工食品的形式流通於市面。世界第一罐商業諾麗果汁產品於

1996 年推出 (Deng *et al.*, 2009)，經發酵增長其機能成分，再調合以減少不適風味，數年前由直銷商引進國內，然而其價高而不易被國人接受。近年由國內廠商引進於南部栽種，期望以在地生產降低成本，進而將此產品推廣至消費大眾。

目前已有多篇針對諾麗果汁發酵製程的探討研究，討論熟成 (Yang *et al.*, 2007b)、製造貯存 (Yang *et al.*, 2007a)、光照 (Yang *et al.*, 2010) 等條件對產品品質之影響。諾麗果實富含果膠多醣，佔醣類組成之 81.6% (Bui & Bacic, 2006)，果膠多醣為一種存於植物組織中的膠狀基質，可將組織纖維中各種成分結合在一起 (Kohorn, 2000)。藉由控制果膠酵素以提昇產品品質已廣泛運用於釀酒與果汁工業 (Wu *et al.*, 2007)，若能控制諾麗果中之果膠酵素活性，可望能改善發酵製程提高產品價值。

本研究分為三部份：首先對諾麗果之果膠甲酯酶進行純化，對溫度特性測試，以了解溫度對酵素活性之影響；接著進行諾麗果汁控溫發酵，對其基本性質（產率、可溶性固形物、pH 值、有機酸和色澤）、功能性成分（總酚、類黃酮、縮合單寧、東莨菪素和芸香素）、生理活性（DPPH 自由基掃除能力、TEAC 總抗氧化能力和 ACE 抑制活性）進行測試，驗證控溫發酵對產品品質之影響；最後以不同殺菌條件測試果汁，期望找出較佳的諾麗果汁產製條件，以促進本土產業發展。

貳、文獻回顧

一、諾麗之簡介

(一) 名稱

諾麗是夏威夷對海巴戟天 (*Morinda citrifolia*) 的俗稱，該植物分類於茜草科 (Rubiaceae)、海巴戟天屬 (*Morinda*)；其廣泛分布於熱帶氣候地區，目前已發現約有80個品種 (Morton, 1992)。世界各地對諾麗皆有不同的俗名，如：India Mulberry, Ba Ji Tian, Nonu, Cheese Fruit, Nhau等 (Wang *et al.*, 2002)。台灣文獻則稱檄樹、水冬瓜、紅珠樹，其他別名還包括蘿梨、四季果、精力果或長壽果等 (陳等, 2007a)。

(二) 植物外觀

諾麗為一種生長於海岸線的長綠矮灌木，從海平面到海拔1300公尺的森林區域都可以發現其蹤跡 (Wang *et al.*, 2002)。其樹幹筆直而可達3至6公尺高，葉片為橢圓形、亮綠色且葉脈深、大小約10至30公分，花朵為白色而呈管狀，其中最具特色的為它的果實，外觀橢圓，表面由遍佈著多邊形的區塊，大小可達12公分，約馬鈴薯般大。未成熟的果實為亮綠色，成熟後果實逐漸軟化而轉為半透明的黃色或白色，熟果具有令人不悅的丁酸腐臭味和皂素觸感 (Morton, 1992; Dixon *et al.*, 1999)。事實上，諾麗的果實為白色小花的聚合體，每個

塊狀代表一朵小花，其中包含一顆暗褐色、三角形的種子，種子中心為中空子囊而具有浮力，在海上漂流一段時間後仍可發芽，這可能是諾麗可廣泛分布於世界各地的原因 (Potterat & Hamburger, 2007)。

(三) 產地分佈

傳說波里尼西亞人把諾麗果當做食物與藥物使用達二千年之久 (Earle, 2001)。諾麗果的食用紀錄於二十世紀前便有記載，而較新的文獻指出，這種水果遍及太平洋群島、東南亞、澳洲、印度等 (Wang *et al.*, 2002)。自太平洋諸島的夏威夷 (波里尼西亞)、大溪地，到中南美洲的巴拿馬，乃至東南亞的印度、印尼、海南島、馬來西亞、泰國，甚至於南半球的澳大利亞都可以發現其蹤跡。台灣亦有本土品種的諾麗，但多產於屏東、恆春半島一帶，而台南、嘉義、雲林則有少量栽種。不同區域的諾麗果具不同的形態，如圖一，圖左為本土品種的諾麗果，體型較小 (長約5 cm)，籽多肉少氣味濃郁；圖右為大溪地品種的諾麗果，體型較大 (長約10 cm)，肉多籽少氣味略淡，為目前商業上泛用的品種。本實驗初步研究本土與大溪地品種的諾麗果差異，結果發現本土品種的諾麗果具較高的功能性成分含量，因此目前本實驗室以本土品種作為主要的研究對象。

(四) 品種分類



圖一、不同品種的諾麗果 (左：本土品種、右：大溪地品種)

Figure 1. Two different species of noni fruits.

Left: Tahitian noni; right: Taiwan (native) noni.

一般來說，諾麗可被分為兩種可區別的品種 *M. citrifolia* (*M. citrifolia* var. *citrifolia* 與 *M. citrifolia* var. *bracteata*) 和一種培育的品種 (*M. citrifolia* cultivar *Potteri*)。較常見的品種為 *M. citrifolia* var. *citrifolia*，具有很高的經濟價值，其同時具有不同大小的果實，葉則呈大範圍的形狀和尺寸，從圓形、橢圓形、長形到帶狀皆有記載。*M. citrifolia* var. *bracteata* 則具有較小的果實，而被苞片包埋在其中。*M. citrifolia* cultivar *Potteri* 則為一種觀賞用的品種，具有白色和綠色的葉子 (McClatchey, 2002; Nelson, 2003)。不同品種的諾麗常被做為傳統的醫療藥物，當地的行醫者會選擇指定型態或氣味的樹種作為特定用途 (McClatchey, 2002)。然而，多數研究並沒有特別區別不同品種的諾麗 (Pawlus & Kinghorn, 2007)，這可能使不同文獻的結果有所出入，但這也意味著無論是何種品種的諾麗，多少都具有一定程度的機能性。

(五) 傳統用途

諾麗在印度與太平洋群島被作為藥用植物已經有一段很長的時間，包括葉、果實、樹皮、花和種子，整株植物都可被加以利用 (Potterat, & Hamburger, 2007)，外用常作為敷藥；內服則以泡浸液、直接食用或製備成發酵物服用為主 (Pawlus & Kinghorn, 2007)。傳統上常用於處理燒燙傷、咬傷、膿瘡、發炎、黴菌感染、便秘和腹瀉 (Dixon *et al.*,

1999; McClstchey, 2002)。諾麗的樹皮和根部因富含蒽醌，常被當作天然黃色素和紅色素，而用於傳統服飾的染色 (Potterat & Hamburger, 2007)。亦有文獻指出，波里尼西亞與澳洲的原住民，有生食或熟食諾麗果的習慣，然而可能是其熟果具有令人不悅氣味的緣故，故食用期間似乎僅限於飢荒時期 (McClstchey, 2002; Morton, 1992)。諾麗常見的傳統用途詳見表一，而以葉與果實的利用為大宗。

(六) 基本成分性質

目前尚未有關於諾麗完整物化性質的測定文獻，而僅有關於果汁的部分可利用資訊，可能是果實為目前諾麗大宗用途之緣故，其基本性質整理於表二。

諾麗果為酸性水果，其pH值介於3.4至3.7之間，主要的有機酸為己酸和辛酸 (Dittmar, 1993)。果實中含有約90%的水分，而乾燥物則為可溶性固形物、膳食纖維、蛋白質等；礦物質方面，主要為鉀、硫、鈣、磷、鈉與微量的硒 (Chunhieng, 2003)。其相對高的鉀含量與梅子汁、柳橙汁、番茄汁相當 (表三)，因此有學者建議腎臟疾病的患者應限制飲用 (West, 2006)。維生素方面以維生素C為主 (24 - 158 mg/100 g dry matter) (Morton, 1992; Shovic, 2001)；另含有大量的維生素A先質 (provitamin A) (Dioxin, 1999)，可望用於治療維生素A缺乏症狀 (Aalbersberg *et al.*, 1993)。

表一、諾麗的傳統用途

Table 1. Some traditional uses of noni.

Plant part	Preparation	Use
Leaf	Fresh	Wrap and flavor meat for cooling, livestock fodder, silkworm food, topical burns, headaches, fever, ghost medicine
	Tea	Malaria, fever, pain
	Poultice	Tuberculosis. sprains, deep bruising, rheumatism, sciatica, lever, stings from stonefish, bone fractures, dislocations
	Extract	Hypertension. bleeding caused by a bone puncture, stomach ache, fractures, diabetes, loss of appetite, urinary tract ailments, abdominal swelling, hernias, vitamin A deficiency
	Vapor of broken leaves	Sties
Fruit	Unripe	Sores or scabs around or in the mouth, ghost medicine
	Ripe	Famine food, sore throat gargle (mashed), peeling or cracking of the toes and feet (crushed). body or intestinal worms, cuts, wounds, abscesses, mouth and gum infections, toothaches. appetite and brain stimulant, pig food
	Poultice	Boils, carbuncles. tuberculosis, sprains deep bruising. rheumatism
	Oil	Stomach ulcers
	Extract	Hypertension
	Stem	Wood
	Decoction of bark	Jaundice
	Wood or bark extract	Hypertension
Seed	Oil	Scalp insecticide, insect repellent
Flowers		Sties
Roots	Wood	Carving
	Bark	Yellow pigment
	Juice	Badly infected cut
All parts of the plant		Mild laxative

The information in this table was gathered from a comprehensive review of published ethnobotanical literature about *Morinda citrifolia*.

(Nelson & Elevation, 2006)

表二、諾麗果汁的物化特性

Table 2. Physico-chemical composition of noni juice

Characteristics	Chunhieng (2003) ^a	Shovic & Whistler (2001) ^a	Nelson & Elevitch (2006) ^b	European Commission (2002) ^c
pH-value	3.72	—	3.43	3.4–3.6
Dry matter	9.87±0.4%	—	7.6 g/100 mL	10–11%
Total soluble solids (°Brix)	8	—	—	—
Protein content	2.5%	0.4 g/100 g	0.5 g/100mL	0.2–0.5%
Lipid	0.15%	0.30 g/100 g	< 0.1 g/100 mL	0.1–0.2%
Glucose	11.97±0.2 g/L	—	1.5 g/100 mL	3.0–4.0 g/100 g
Fructose	8.27±0.2 g/L	—	1.5 g/100 mL	3.0–4.0 g/100 g
Potassium	3900 mg/L	188 mg/100 g	150 mg/100 mL	30–150 mg/100 g
Sodium	214 mg/L	21 mg/100 g	9 mg/100 mL	15–40 mg/100 g
Magnesium	14 mg/L	14.5 mg/100 g	11 mg/100 mL	3–12 mg/100 g
Calcium	28 mg/L	41.7 mg/100 g	6 mg/100 mL	20–25 mg/100 g
Vitamin C	—	155 mg/100 g	53.2 mg/100 mL	3–25 mg/100 g
Vitamin E	—	—	0.05 mg/100 mL	—

^a Noni fruit.

^b Hawaiian noni juice (100% noni juice, data compliment of HawaiiPhytomedicine.com)

^c Tahitian Noni™ Juice (Commercial noni juice that contain 89% noni juice and 11% common grape and blueberry juice concentrates).

Table adapted from Chan-Blanco *et al.* (2006).

諾麗果中亦含有豐富的碳水化合物，在去除水分的夏威夷諾麗果粉中約佔了71% (表四)。越南的學者利用單糖與糖苷鍵對諾麗果的多糖組成進行分析，結果發現大量的阿拉伯糖、半乳糖、半乳糖醛酸、鼠李糖等構成果膠多糖的基本單糖，接著再以這些單糖鍵結數據推論其多糖成分，得出諾麗果中含有49.5%的同質半乳糖醛酸、12.3%的第一型阿拉伯糖醛酸、10.8%的鼠李糖醛酸和9.0%的阿拉伯糖，這些果膠多糖共佔了諾麗果81.6%的碳水化合物組成 (表五) (Bui *et al.*, 2006)。以上結果顯示出諾麗果中含有大量的果膠多糖，這些果膠多糖在水果熟成與加工過程中亦扮演重要角色。

(七) 後熟現象

由於諾麗果含有豐富的果膠多糖，其後熟現象明顯，果實於收穫後會繼續成熟而可分為幾個階段，在這段時間果實之色澤與硬度的變化列於表六。諾麗果在成熟時經人工選別摘採，在第一階段“深綠”時盛裝於籃或容器運送至加工業者手中，此階段的果實結實而禁得起碰撞，曝露在光或高熱均不會對果實的品質造成影響。接著在室溫熟成，此時果實迅速軟化，幾小時便會從第四階段轉為第五階段，果實呈部分液化，外觀為半透明狀態，只要一天至數日就可完成諾麗果的後熟過程 (Nelson, 2003)。圖二為諾麗果熟成前後的外觀變化，上圖為未後熟的果實，色澤綠而質地硬；經過幾日的室溫靜置後，轉變為

表三、不同果汁的鉀含量比較

Table 3. Potassium content comparison for various fruit juices.

Per 6 fl oz (177 mL) serving	
	Potassium (mg)
Prune juice	530
Orange juice	354
Tomato juKe	400
Noni juice	390-555

Data source: Hlgdon 2004

(Nelson & Elevitch, 2006)

表四、夏威夷果粉的特定營養成分分析

Table 4. An analysis of selected nutritional aspects of Hawaiian fruit powder.

per 100 grams	
Protein	5.8%
Fat	1.2%
Moisture	9.3%
Ash	10.3%
Carbohydrate	71%
Total dietary fiber	36%
per 1200 milligrams	
Protein	69.6 mg
Fat	15.5 mg
Carbohydrate	843 mg
Total dietary fiber	419 mg
Calories	3
Vitamin A	2.26 IU
Vitamin C	9.81 mg
Niacin	0.048 mg
Thiamin	~
Riboflavin	~
Iron	0.02 mg
Calcium	0.88 mg
Sodium	2.63 mg
Potassium	32.0 mg

Data provided compliments of the Hawaii noni industry.

(Nelson & Elevitch, 2006)

表五、基於單醣鍵結資料的多醣組成推論

Table 5. Deduced polysaccharide composition based on monosaccharide linkage data.

Polysaccharide type	Component	Mol% ^a
Pectic polysaccharides	Homogalacturonan	49.5
	Rhamnogalacturonan I	10.8
	Arabinan	9.0
	Type I arabinogalactan	12.3
Type II arabinogalactan	Arabinogalactan-protein	5.5
Xyloglucan		1.5
Heteroxylan		0.3
Heteromannan		0.4
Undefined		10.7

^a Based on sum of linkages as described by Sims and Bacic (1995).

(Bui *et al.*, 2006)

表六、在熟成期間水果表面顏色與硬度之演變

Table 6. Evolution of fruit skin colour and firmness in the course of ripening

Maturity stage	Colour	Firmness
1	Dark green	Very hard
2	Green-yellow	Very hard
3	Pale yellow	Very hard
4	Pale yellow	Fairly hard
5	Translucent- grayish	Soft

(Chan-Blanco *et al.*, 2006)

下圖已後熟的果實，質地軟化而些微出汁，表面灰白而呈半透明狀，熟成後的諾麗果收集至冷藏庫保存，待所有果實均完成後熟便可開始進行發酵作業。



圖二、不同熟成階段的諾麗果 (上：生果、下：熟果)

Figure 2. Different ripening stages of noni fruit appearance.

Up: unripe noni; down: ripe noni.

二、果膠之簡介

(一) 植物細胞壁

植物細胞壁是種細胞分泌的碳水化合物和蛋白質複合物，主要由原生質膜相關的纖維素合成酶所分泌的D型葡萄糖，以 β -1,4鍵結所構成 (Amor *et al.*, 1995; Pear *et al.*, 1996)，為一種圍繞和保護植物細胞的複雜巨型分子結構。其中含碳水化合物、芳香族和脂肪族物質 (Caffall & Mohnen, 2009)，另嵌進了膠狀果膠及多種功能蛋白和鍵結多醣 (Reiter, 1994; Cosgrove, 1997)，為植物生長發展中不可或缺的物質。

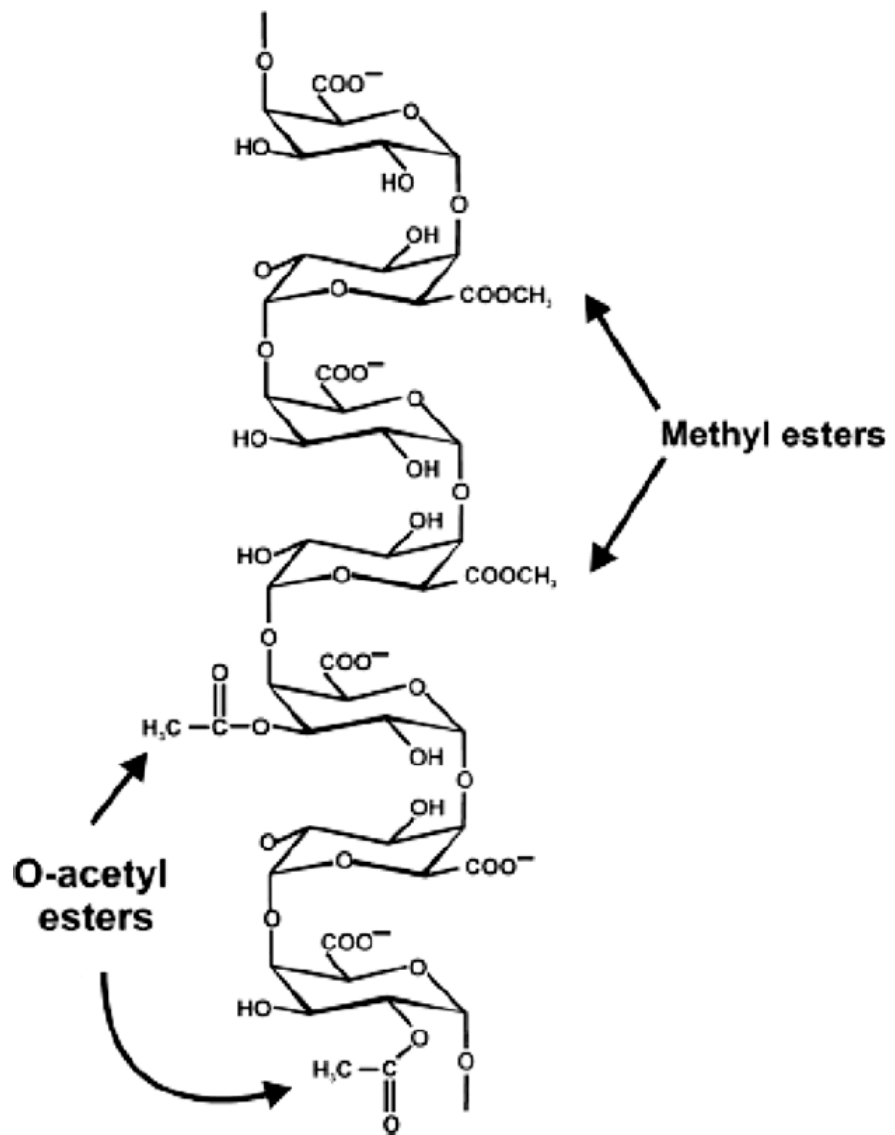
(二) 果膠的基本性質

果膠多醣由一群含半乳糖醛酸的多醣所組成，而大量存在於植物細胞壁中，約構成30%雙子葉植物、裸子植物、非禾本木單子葉植物的細胞壁 (Ridley *et al.*, 2001; O'Neill & York, 2003)。果膠也會藉由內膜系統 (endomembrane system) 分泌，形成膠狀基質 (jelly like matrix) 穿插於纖維素與半纖維素中 (Carpita & Gibeaut, 1993)，而幫助植物組織與其他物質結合在一起。果膠多醣的結構分類包含了同質半乳糖醛酸、木半乳糖醛酸、阿拉伯半乳糖醛酸、第一型鼠李半乳糖醛酸及第二型鼠李半乳糖醛酸等 (Ridley *et al.*, 2001)。

同質半乳糖醛酸 (Homogalacturonan, HG) 是半乳糖醛酸以 α -1,4

鍵結形成的多聚體，佔植物細胞壁中果膠多醣的60%以上，大部份的果膠特性皆能依此作為說明 (Ridley *et al.*, 2001)。根據免疫組織化學分析，HG主要集中於植物中膠層區域 (Zabackis *et al.*, 1995)，其半乳糖醛酸殘基的C-6羧基可被甲酯化，O-2或O-3號氧則可被乙醯化 (Ridley, 2001)，如圖三。殘基甲酯化或乙醯化的形態、程度會影響到HG的特性表現。高酯化度的果膠當可溶性固形物含量超過60%、pH值介於2.8至3.6時，受氫鍵和疏水性交互作用的影響，個別的果膠分子鏈會互相結合在一起，形成凝膠；低酯化度的果膠則可經由Ca²⁺的架橋作用產生凝膠，未甲基化的C-6帶有負電，當果膠分子有大於10個連續的未甲酯化殘基時，會與Ca²⁺產生離子交互作用而形成穩定膠狀，在生物體內的半乳糖醛酸與鈣之複合物有時會以蛋殼模型 (egg-box model) 表示 (Liners *et al.*, 1989)，如圖四所示。植物細胞壁的凝膠有70%是由緊密集合的HG和Ca²⁺所引起的，因而能提供組織彈性與保水性。

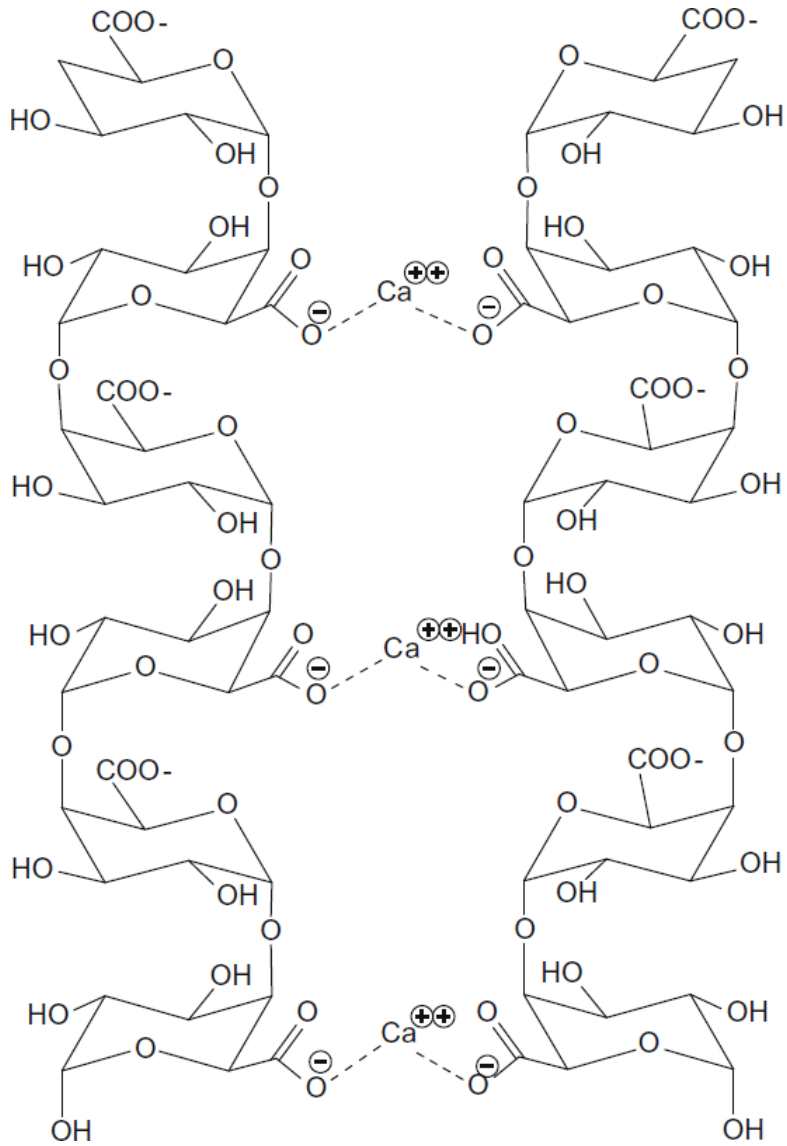
果膠分子以HG為主幹，與第一型鼠李半乳糖醛酸和第二型鼠李半乳糖醛酸以共價鍵結合，而和木葡聚醣、半纖維素多醣共價交聯 (Popper, 2007)，形成穩定的網狀結構。若以聚半乳糖醛酸內切酶 (endo-PG) 水解HG主幹的糖苷鍵，則會將果膠聚合物自細胞壁中釋放出來，而形成單體、雙體或寡體片段 (Benen *et al.*, 1999)，果膠因此



圖三、同質半乳糖醛酸的結構與修飾作用

Figure 3. Homogalacturonan structure and modification.

(Caffall & Mohnen, 2009)



圖四、同質半乳糖醛酸多醣與鈣交聯之蛋殼模型

Figure 4. The egg-box model of calcium crosslinking in HG polysaccharides.

(Caffall & Mohnen, 2009)

而瓦解。

(三) 果膠的組成與分類

果膠基質可依其修飾程度與骨幹而加以分類 (BeMiller, 1986)，美國化學協會 (American Chemical Society) 將果膠分為四個主要型態 (Kertesz, 1951)：

1. 原果膠 (protopectins)：水果在未熟成前，以原果膠的形式存於水果中，而為不溶性的狀態，隨著熟成進行，逐漸變成下列三種可溶性的果膠基質。
2. 果膠酯酸 (pectic acids)：包含微量甲氧基團的半乳糖醛酸，果膠酸酯 (pectates) 為果膠酯酸的鹽類。
3. 果膠酸 (pectinic acids)：含有不同甲氧基團含量的半乳糖醛酸，果膠酸塩 (pectinates) 為果膠酸的鹽類。
4. 果膠 (pectin)：以果膠酸為主要物質的混合物總稱。果膠在細胞壁會與結構多醣和蛋白質形成連續的自然型態，為不溶性原果膠；果膠的溶解度可由熱或酸降解來改變，經部份降解或參雜異質多醣 (heterogeneous polysaccharide) 的果膠，則轉變為可溶性果膠。

(四) 果膠酵素

果膠酵素由一群獨特的酵素所構成，可催化植物細胞壁的果膠聚

合物降解。各酵素對果膠分子的作用位置如圖五所示。果膠的去聚合作用一般與果實熟成有關，因此這些酵素在蔬果的後熟階段扮演重要的角色 (Wong, 1995)。

果膠酵素可依其行為模式進行分類 (如表七)：

1. 果膠甲酯酶 (Pectin methylesterase, PME, EC 3.1.1.11)

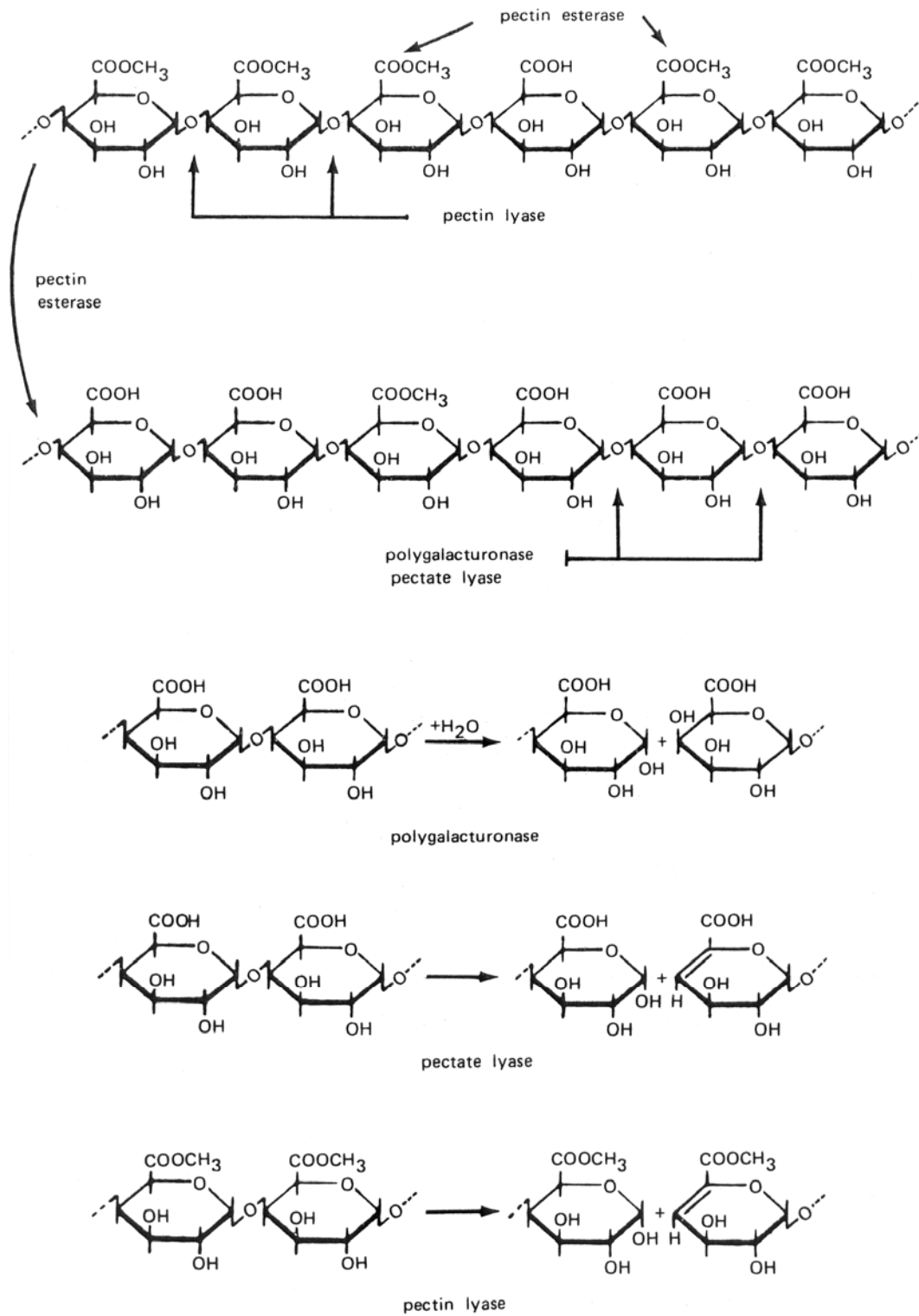
催化水解甲酯基團，而造成果膠分子的去酯化。PME廣泛存在於不同的水果植物中，通常具多種複合結構而存於細胞壁中，黴菌的PME也可從胞外酵素中分離出。一般而言，植物來源的PME在微鹼範圍時具最佳活性，存在低濃度的金屬離子時 (如： Ca^{2+})，傾向增強酵素活性 (Wong, 1995)。

2. 聚半乳糖醛酸酶 (Polygalacturonase, PG)

催化水解 α -1,4糖苷鍵，依其作用的部位分為兩種形式。其一為從非還原端水解的外切酶 (exo-PG, EC 3.2.1.67)；另一個則為隨機水解的內切酶 (endo-PG, EC 3.2.1.15)。早期對其研究，常見於致病的黴菌與細菌的胞外分泌物，而後來則以番茄 (vine-ripe fruit) 的基因工程為主 (Wong, 1995)。

3. 果膠酸酯裂解酶 (Pectate lysae, PEL)

以 β -elimination催化裂解未酯化的半乳糖醛酸。亦同時存在內切



圖五、聚半乳糖醛酸酶、果膠酸裂解酶、果膠裂解酶和果膠酯酶對果膠分子的酵素降解作用

Figure 5. Enzymic degradation of pectin by polygalacturonase, pectate lyase, pectin lyase, and pectinesterase. (Fennema, 1985)

表七、作用於果膠或果膠酸的果膠酵素分類表

Table 7. Classification of pectic enzymes acting on pectins or pectic acids

EC suggested name	Common name	EC number	Substrate	Action pattern
De-esterifying enzymes				
Polymethylgalacturonate esterase (PMGE)	Pectinesterase	3.1.1.11	Pectin	Random
Depolymerizing enzymes				
Hydrolases				
Endopolygalacturonase (Endo-PC)	Polygalacturonase	3.2.1.15	Pectate	Random
Exopolygalacturonase 1 (Exo-PGI)	Polygalacturonase	3.2.1.67	Pectate	Terminal
Exopolygalacturonase 2 (Exo-PG2)	Polygalacturonase	3.2.1.82	Pectate	Penultimate bonds
Endopolymethylgalacturonase (Endo-PMG)	Pectin hydrolase		Pectin	Random
Exopolymethylgalacturonase (Exo-PMG)	Pectin hydrolase		Pectin	Terminal
Lyases				
Endopolygalacturonate lyase (Endo-PGL)	Pectate lyase	4.2.2.2	Pectate	Random
Exopolygalacturonate lyase (Exo-PGL)	Pectate lyase	4.2.2.9	Pectate	Penultimate bonds
Endopolymethylgalacturonate lyase (Endo-PMGL)	Pectin lyase	4.2.2.10	Pectin	Random
Exopolymethylgalacturonate lyase (Exo-PMGL)	Pectin lyase		Pectin	Terminal

Pectic enzymes acting on homogalacturonates have not been included in this table because they are not very abundant and of little interest for industrial pectin degradation. Enzymes have been classified and named according to the Enzyme Commission (EC) (IUPAC-IUB recommendations).

(Alkorta *et al.*, 1998)

酶 (endo-PEL, EC 4.2.2.2) 與外切酶 (exo-PEL, EC 4.2.2.9) 兩種。果膠酸酯與低甲氧基果膠皆為其受質，一般而言，鹼性環境 (pH從8.0至11.0) 或存在Ca²⁺時會有較好的活性。果膠裂解酶並未在植物中被發現，其主要存在於細菌或黴菌中。這些微生物的胞外酵素在植物感染中佔很重要的角色，會造成細胞壁的組織降解或軟化，使植物腐壞 (Collmer & Keen, 1986)。

4. 果膠裂解酶 (Pectin lyase ,PNL)

以 β -elimination催化裂解酯化的半乳糖醛酸，而皆為為內切酶 (endo-PNL)。

(五) 後熟期間的酵素作用

纖維素酶 (cellulase) 可水解細胞壁減弱其結構，為軟化細胞壁的酵素之一。在水果軟化時，一般認為纖維素酶的活性與果膠酵素複合體是相輔相成的 (Rouse, 1953; Rouse *et al.*, 1965)。果膠酵素複合物牽涉水果質地的改變與軟化，在果實成熟時PME和PG的活性有數倍的提升，而與質地的表現有所關聯 (Ladaniya, 2008)。

在水果後熟時，首先，果膠酵素複合體中的原果膠溶解酵素 (protopectin-solubilizing enzymes) 會從原果膠釋放二種水溶性和高聚合度的果膠分子，其一為和半乳糖醛酸區域反應的A-type，另一個則

為連接細胞壁和半乳糖醛酸鏈的B-type。接著PME會催化果膠分子的甲氧基團去酯化，而形成果膠酸。然後果膠基質間的 α -1,4糖苷鍵會被去聚合酵素切斷（被PG水解或經PL行 β -elimination反應），而形成半乳糖醛酸單體（Alkorta *et al.*, 1998），整體過程如圖六所示。

Endo-PG會攻擊果膠分子鏈內的不同部位，exo-PG則會連續移除位於末端的半乳糖醛酸；相較之下，endo-PG在水果軟化扮演較重要的角色，因其可由中間切除分子使成為小片段，增加溶解性並造成軟化（Ladaniya, 2008）。然而上述兩種水解酵素均僅對果膠酸有作用，因此產生果膠酸的PME便是整個水果熟成過程中最重要的起始關鍵。

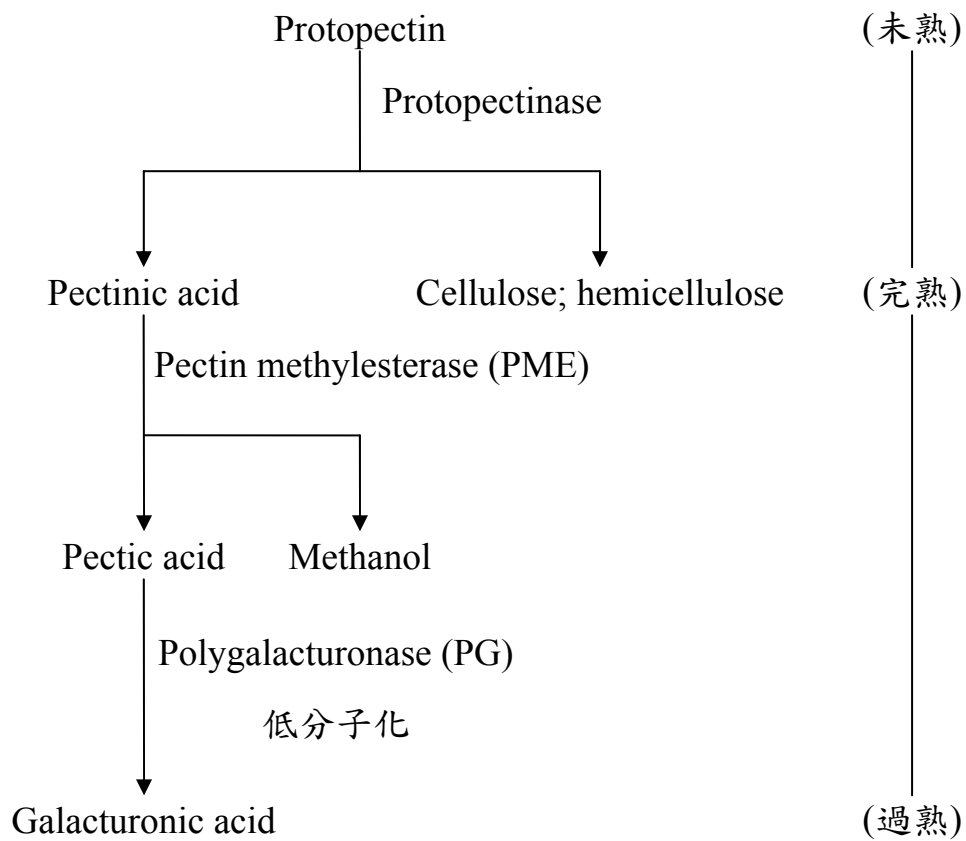
(六) 果膠甲酯酶 (PME) 的特性

1. 去甲基機制

PME是整個水果熟成現象的起始酵素，其藉由親核性攻擊 (nucleophilic attack) 果膠基質的酯鍵，形成醯基酵素中間物 (acyl-enzyme intermediate) 並釋放甲醇，接著進行去醯反應、水解中間物，而恢復酵素並生成一個羧酸 (Wong, 1995)，反應機轉如圖七所示。

2. 分子量與等電點

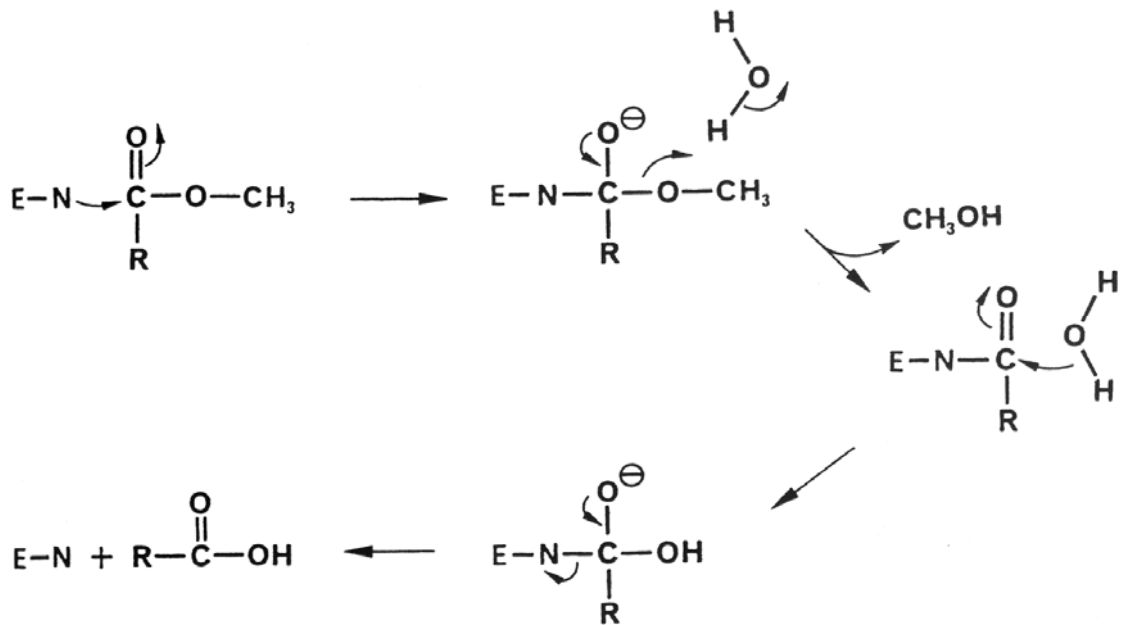
一般植物來源的PME分子量在20~40 kDa左右，亦有高分子量的



圖六、熟成期間果膠性狀變化與酵素作用情形

Figure 6. Change of pectin substances by enzymatic action during ripening.

(賴，1994)



圖七、果膠甲酯酶的反應機制

Figure 7. Reaction mechanism of pectin methyl esterase.

(Wong, 1995)

PME存在，Goldberg (1984) 測得綠豆芽PME的分子量高達75 kDa，為一般常見者的二倍左右；在PG有次單位 (subunit) 的存在，但目前PME則尚未發現。高等植物的PME大部分為高等電點 (isoelectric point, pI)，其pI值介於8~10左右，微生物來源的PME則屬低pI；但愛玉子則為例外，Komae (1968)和Lin (1989)分別對愛玉子PME進行測試，結果得到3.5和4.4的低pI值。不同植物PME的分子量與pI值整理於表八。

3. 溫度條件 (最適作用溫度與溫度耐受性)

PME與其他酵素相同，當反應溫度提升時，酵素活性也會有所提升，但若蛋白質變性的影響超過溫度提升所帶來的活化效益時，酵素活性便開始衰退。一般植物PME的最適活性溫度約於60°C左右，為中溫性或非熱敏感性的酵素。但是亦有耐熱性的PME被提出，Leite等人 (2006) 測試番石榴的PME特性，結果發現其最適作用溫度介於75~80°C；Assis等人 (2002) 測得西印度櫻桃PME的作用溫度甚至高達90°C以上。不同植物PME的最適作用溫度與溫度耐受性整理於表九。

4. 最適作用pH值

一般高等植物的PME，其最適作用pH值約為6~9之間，為中性偏鹼的範圍；當反應的果膠基質之pH值大於7時，除PME本身的去酯化

表八、不同植物 PME 之分子量與等電點

Table 8. Molecular weight and isoelectric point of PE different plants.

Sorce	MW (kDa)	pI	References
Apple	55, 28	--	Castaldo <i>et al.</i> , 1989
Banana	30	8.8, 9.3	Brady, 1976
Banana	--	9.3~9.5	陳, 2002b
Carrot	27	--	Markovic, 1978
Chayote	47.8-50	--	陳, 2002a
Grapefruit	51, 36	--	Seymour <i>et al.</i> , 1991
Guava	--	9.6, 3.5	郭, 2007
Jelly fig	42	4.4	Komae <i>et al.</i> , 1990
Jelly fig	38	3.5	Lin <i>et al.</i> , 1989
Kiwi fruit	57	7.3	Giovane <i>et al.</i> , 1990
Lemon	35, 33	9.0, >11	MacDonald <i>et al.</i> , 1993
Mung bena sprouts	23.7	--	林, 1990
Mung bean sprouts	75	--	Goldberg <i>et al.</i> , 1992
Orange	37	>8.65	Rillo <i>et al.</i> , 1992
Orange	36.2	10.05, >11	Versteeg <i>et al.</i> , 1978
Papaya	53	--	Lourenco & Catutani, 1984
Soybean	30	8.8, 9.3	Hultin <i>et al.</i> , 1966; Brady, 1976
Soybean sprouts	30, 47	> 9.3	楊, 1991
Tomato	24, 27	8.4	Delinc'ee & Radola, 1970
Tomato	27	8.6	Delinc'ee, 1976
Tomato	23	--	Lee and Macmillan, 1968
Tomato	27.5	--	Kohn <i>et al.</i> , 1983
Tomato	22	--	Markovic & Slezarik, 1969
Tomato	33.2	--	Markovic & Jornvall, 1986
Tomato	23.7, 35.5	--	Pressey & Avanes, 1972
Tomato	28	--	Theron <i>et al.</i> , 1977

表九、不同植物 PME 之最適反應溫度與溫度耐受性

Table 9. Optimum temperature for the reactions catalyzed and thermal stability by PME from different plants.

Source	Optimum temp. (°C)	Description of thermal stability	Reference
Acerola	> 90	The total acerola PME retained 13.49% of its specific activity after 90 min of incubation at 98°C. The partially purified acerola PME showed 125.54% of its specific activity after 90 min of incubation at 98°C.	Assis <i>et al.</i> , 2002
Acerola	--	The PME submitted at 50 and 80°C retained 90% of its activity during 100 and 50 min, respectively. The heating times necessary to total inactivation of PME at 98, 102 and 106°C were equal to 110, 10 and 2.17 min.	Assis <i>et al.</i> , 2000
Apple	--	The activity was unaffected up to 40°C/1min then a progressive activity loss was observed up to 90°C/1min where no activity was detected.	Castaldo <i>et al.</i> , 1989
Apple	63	--	Denes <i>et al.</i> , 2000
Apple	60	--	King, 1990
Apple	55-60	--	Lee & Wiley, 1970b
Banana	63	At 70°C, 50% of enzyme activity was lost after 5min of treatment, whereas at 75°C more than 90% of enzyme activity was lost.	Ly-Nguyen <i>et al.</i> , 2002b
Black carrot	55	The enzyme was stable between the temperatures of 30 - 50°C for 5 min. Above 55°C, the inactivation rate increased greatly. The enzyme lost nearly all of its activity at 70°C.	Unal & Bellur, 2009
Bramley apple	60	--	King, 1990
Carrot	49	The enzyme was stable up to 40°C/5 min, with a linear decrease in activity between 40-70°C. No enzymatic activity was detected in samples heated at more than 70°C/5min.	Alonso <i>et al.</i> , 2003

表九、不同植物 PME 之最適反應溫度與溫度耐受性 (續)

Table 9. Optimum temperature for the reactions catalyzed and thermal stability by PME from different plants (continued).

Source	Optimum temp. (°C)	Description of thermal stability	Reference
Carrot	50	--	Lee <i>et al.</i> , 2001
Carrot	77	--	Lee <i>et al.</i> , 1979a
Carrot	--	Above 50°C, a significant loss of carrot PME activity was observed. At 55°C, 50% of PME activity was lost after 10 min of treatment, whereas at 60°C about 95% of PME activity was lost.	Ly-Nguyen <i>et al.</i> , 2002a
Carrot	--	The enzyme was highly sensitive to heat at temperatures above 50°C/15 min. At 55°C, almost 50% of the activity of the enzyme was lost, whereas at 60°C, already 95% of the enzyme was inactivated.	Sila <i>et al.</i> , 2007
Chayote	60	--	陳, 2002a
Guava	75-80	The enzyme is very stable, showing activity even after 30 min of storage from 50 to 98°C. At 75°C, there is an increase of the specific activity after 30 min of storage.	Leite <i>et al.</i> , 2006
Hawthorn	55	About 50% of the relative activity still remained after 25 min at 60°C, and it was completely inactivated by incubation at 80°C during 10 min.	Vivar-Vera <i>et al.</i> , 2005
Mango	55	--	Azza <i>et al.</i> , 1995
Mung bean sprouts	--	在 50°C 水浴加熱 2 min 後，酵素活性幾乎沒有受到影響，當加熱溫度超過 60°C 時殘餘活性開始減損，兩種酵素同型體分別在加熱 65°C 和 75°C 失活。	林, 1990
Mung bean sprouts	65	--	Taylor <i>et al.</i> , 1981
Orange	60	--	Komae <i>et al.</i> , 1990
Orange	60	--	Korner <i>et al.</i> , 1980

表九、不同植物 PME 之最適反應溫度與溫度耐受性 (續)

Table 9. Optimum temperature for the reactions catalyzed and thermal stability by PME from different plants (continued).

Source	Optimum temp. (°C)	Description of thermal stability	Reference
Papaya	65	--	Fayyaz <i>et al.</i> , 1995
Papaya	35	--	Lim & Chung, 1989
Papaya	60	About 50% of the activity still remained after 5min at 65°C, but the enzyme was completely inactivated by incubation at 80°C for 1 min.	Lourenco & Catutani, 1984
Peach	60	A 2% loss of activity was observed upon heating for 5 min at 55°C. After heating for 5 min at 65° and 70°C, the residual activity was 23% and 0% of unheated control.	Javeri & Wicker, 1991
Plum	65	The enzyme retained minimally 90% of its initial activity after 5 min of heat treatment below 50°C, after which the enzyme activity started to decline gradually.	Nunes <i>et al.</i> , 2006
Potatoes	55-60	--	Puri <i>et al.</i> 1982
Shamouti and Valencia orange	55-60	--	Korner <i>et al.</i> , 1980
Valencia juice	55-60	--	Wicker <i>et al.</i> , 1987

作用外，亦有鹼水解的去酯化反應發生。不同植物PME的最適作用pH值整理於表十。

並非所有PME皆為鹼性蛋白質，Barön (1980) 發現微生物 (*Aspergillus niger*) 來源的PME在pH 4.5, 40°C時具最大活性，微生物的PME作用pH值範圍較植物寬裕，可能與其偏酸生長環境有關。

鹼性PME和酸性PME似乎會將果膠受質去酯化為不同的形態，前者生成的去酯化果膠與Ca²⁺的凝膠性較弱，後者生成的去酯化果膠能夠和Ca²⁺形成強力凝膠 (Ishii *et al.*, 1979)。

5. 金屬離子

金屬離子和受質的交互作用與PME活性表現有關 (Nari *et al.*, 1991)。半乳糖醛酸會競爭抑制PME催化水解的反應，果膠分子中的羧基區塊也會有相似的反應。若羧基基團與金屬離子結合，會傾向中和果膠受質對酵素的抑制效果，而提高活性表現；然而，過量的離子實際上會造成PME的不活化，因為鍵結在羧基基團的金屬離子，會抑制鄰近酯鍵的水解反應 (Wong, 1995)。林 (1990) 也指出，單價金屬離子可消除果膠分子的游離羧基和果膠酯酶之間的靜電引力，增加兩者移動碰撞的機率，但若二價金屬離子的濃度太高，則可能和果膠分子上的游離羧基之間形成架橋，產生凝膠，阻礙酵素與果膠質之間的接觸。不同植物PME的最適反應離子濃度整理於表十。

表十、不同植物 PME 之最適反應 pH 值與離子濃度

Table 10. Optimum pH and concentration of ion for the reactions catalyzed by PE from different plants

Source	pH	Concentration of ion		References
Alfalfa	--	Na	0.140 M	Lineweaver & Ballou, 1945
		K	0.140 M	
		Ca	0.140 M	
		Mg	0.035 M	
Apple	6.5-7.5	--	--	Castuldo <i>et al.</i> , 1989
Banana	6.0-9.5	Na	0.200M	Hultin <i>et al.</i> , 1966; Brady, 1971
Chayote	6.5	Na	0.200M	陳, 2002a
Grape	7.5	--	--	Lee <i>et al.</i> , 1979b
Jelly fig	6.5-7.5	--	--	Lin <i>et al.</i> , 1989
Jelly fig	8.0-8.0	--	--	Komae <i>et al.</i> , 1990
Mung bena sprouts	7.5	--	--	林, 1990
Orange	7.5	Na	0.100 M	MacDonnell <i>et al.</i> , 1945
		Ca	0.025 M	
		Mg	0.200 M	
Orange	7.6, 8.0	--	--	Versteeg <i>et al.</i> , 1978
Orange	7.5	--	--	Kohn <i>et al.</i> , 1983
Orange	9.0	--	--	Rillo <i>et al.</i> , 1992
Papaya	7.5	--	--	Chang <i>et al.</i> , 1965
Papays	--	Mg	0.200 M	Lourenco & Catutani, 1984
Tomato	--	Ca	0.030 M	Kulp, 1975
Tomato	--	Na	0.050 M	Lee & MacMillan, 1970a
		Ca	0.050 M	
Tomato	--	Mg	0.005 M	Markovic <i>et al.</i> , 1969
Tomato	7.8-8.0	Na	0.200 M	Markovic & Patocka, 1977
Tomato	8.0, 8.5	--	--	Nakagawa <i>et al.</i> , 1970
Tomato	--	Na	0.200M	Pressey & Avanes, 1972
		Ca	0.030 M	
Tomato	7.6	--	--	Tucker <i>et al.</i> , 1982

三、諾麗果的生理功效與功能性成分

諾麗在波里尼西亞、東南亞、澳大利亞、加勒比海等地被用作藥用植物已經有很長一段時間，常被用於治療廣泛的疾病，其傳統用途已於上述章節揭示。該植物全株皆有用途，但商業上較少利用根或葉等部份，而以果汁商品流通為主。基於人類植物學與商品的流行性，近百年內有大量關於其生理活性與化學性質的報告被提出。諾麗的多種植物二次代謝物已確立，其中包括鳶尾甘素配醣體 (iridoid glycosides)、三類烯 (triterpenoids)等為諾麗果的主要組成，另有一些微量的蒽醌被發現於果實中 (Pawlus & Kinghorn, 2007)。

(一) 已被證實的生理活性

目前已知諾麗的功能性眾多，本章節僅摘錄部份已被證實的果實生理活性：

1. 抗癌和癌症預防活性

Hirazumi *et al.* (1994) 認為，諾麗果汁的酒精不溶物為富含葡萄糖醛酸、半乳糖、樹膠醛糖、鼠李糖的多醣基質，而能刺激產生T細胞、胸腺細胞、巨噬細胞等細胞激素，提高免疫力和抗腫瘤能力。實驗證明，將諾麗果汁以腹腔注射的方式，每日注射15mg於感染肺癌細胞 (Lewis lung carcinoma cells) 的大鼠中，可顯著增加其119%的生

命週期，22隻癌末大鼠中有9隻存活超過50天。另外攝取諾麗果酒精不溶物搭配傳統化療藥劑，如：vincristine、5-fluorouracil、cisplatin、adriamycin等，則能增強整體的抗癌效果，增加存活率；但若同時施以2-chloradenosine或ciclosporin等抑制免疫力藥劑，則會妨礙諾麗果活性。

Wang和Su (2001) 則證明，在已餵食七日致癌物質的SD母鼠 (Sprague-Dawley rats) 和C57 BL-6公鼠之飲水中，加入10%的大溪地諾麗果汁，與陰性對照組相比，可降低其於特定臟器 (心、肺、肝、腎) 的化學致癌物質 (7,12-dimethyl[α]benzanthracene-DNA adducts) 之含量，因此證明有癌症預防的效果。

血管增生 (angiogenesis) 是許多腫瘤發生、生長、侵犯、轉移時的致病機轉。Hornick等人 (2003) 以胎盤靜脈外植體 (placental vein explants) 和人類乳癌外植體 (human breast cancer explants) 模擬體外血管增生模式，於生長培養基中加入5和10%的諾麗果汁，結果發現諾麗果汁能有效的抑制血管增生起始期，間接證明其抗癌效果。

2. 抗糖尿病活性

糖尿病的高血糖會使膠原蛋白交聯變性，導致血管表面失去彈性而微循環變差，代謝廢物無法排出使組織易壞死、傷口不能痊癒。

Nayak等人 (2007) 將發酵諾麗果的水萃物添加於飲水中，餵養罹患

鏈脛佐菌素誘發型糖尿病 (streptozotocin-induced diabetes) 的大鼠 (Sprague-Dawley rats)，結果發現能降低其血糖層級，亦能促進人為產生的傷口之修復。

3. 防治心血管疾病

Yamaguchi 等人 (2002) 發現諾麗果汁具有抑制血管收縮素轉化酶 (angiotensin I-converting enzyme, ACE) 的效果，原發性高血壓公鼠 (male spontaneously hypertensive rats) 口服諾麗生果或熟果的果汁後，皆能降低其血管收縮壓。

動脈硬化的形成與低密度脂蛋白 (low density lipoproteins, LDL) 的氧化有關。Kamiya 等人 (2004) 的研究指出，諾麗果的甲醇或乙酸乙酯萃取物在硫巴比妥酸反應基質 (thiobarbituric acid reactive substance method) 和銅離子誘導 LDL 氧化 (copper-induced LDL oxidation) 實驗中，展現了良好的抑制氧化表現，作者認為可能為果實中木酚素 (lignan) 和苯基丙酸雙體 (phenylpropanoid dimers) 的貢獻。

4. 抗氧化活性

Mohd 等人 (2001) 利用鐵硫氰化物 (ferric thiocyanate, FTC) 和硫巴比妥酸 (thiobarbituric acid, TBA) 測試諾麗果乙醇和乙酸乙酯萃

取物的抗氧化能力，結果發現其乙酸乙酯萃取物展現強烈抑制脂質氧化的能力，而媲美等重的 α -生育醇和BHT (butylated hydroxyl toluene)。

Wang 和 Su (2001) 證明大溪地諾麗果汁於超氧陰離子 (superoxide anion radicals, SAR) 和硝基藍四氮唑 (tetrazolium nitroblue, TNB) 試驗中，展現了良好的抗氧化活性。其SAR掃除能力較維生素C高出了2.8倍，而較碧蘿芷 (Pycnogenol[®]，一種商業抗氧化劑，主要成分為類黃酮) 高出了1.4倍，幾乎和葡萄籽具相同的抗氧化能力。

雖然目前已有多篇文獻證明諾麗果汁在體外試驗中展現了良好的抗氧化活性，然而Berg和Furusawa (2007) 在老鼠實驗中則認為，諾麗果汁或其多醣沉澱物對超氧化傷害 (superoxide-mediated tissue damage) 無保護作用。

5. 抗發炎和止痛活性

McKoy 等人 (2002) 利用前發炎物質—血管舒張素 (bradykinin) 引起局部急性發炎反應，來觀察諾麗果水萃物的抗發炎活性，結果顯示口服200 mg的諾麗果水萃物便可抑制大鼠的爪水腫。

第一型環氧合酶 (Cyclooxygenase-1, COX-1) 可將花生四醯酸 (arachidonic acid) 轉化為Thromboxane A₂來參與凝血反應；第二型環氧合酶 (Cyclooxygenase-2, COX-2) 則將花生四醯酸催化為前列腺素

(prostaglandin) 而引起嚴重發炎反應，兩種酵素名字相近，功能卻有很大的差異。Li等人 (2003) 的實驗結果指出，諾麗果粉較葉萃取物具更佳的COX-1抑制效果，而有抗凝血效果。

Wang等人 (2002) 則認為大溪地諾麗果汁除了對COX-2具有高選擇性抑制活性外，亦具有良好的止痛活性。將大鼠餵食10%和20%的大溪地諾麗果汁可分別提高162%和212%的疼痛耐受度。

6. 抑菌活性

Bushnell等人 (1950) 證明諾麗熟果的果汁可對 *Salmonella typhosa*、*Salmonella montevideo*、*Salmonella sachotmuelleri*、另外兩種 *Shigella paradys* 菌株、*Micrococcus pyogenes*、*Escherichia coli* 和 *Pseudomonas aeruginosa* 等產生10到20 mm的抑菌環，生果的果汁也會對 *S. typhosa* 和兩種 *S. paradys* 菌株產生相似的抑制情形。

Atkinson (1956) 亦報告諾麗果能抑制特定細菌的生長，如 *Pseudomonas aeruginosa*、*Proteus morgaii*、*Bacillus subtilis*、*Escherichia coli*、*Helicobacter pylori*、*Salmonella* 和 *Shigella* 等，該作者認為其抗微生物效果可能是由於存在酚類物質的緣故。

近年的研究，Locher等人 (1995) 亦指出諾麗乾果的乙腈萃取物能抑制 *Pseudomonas aeruginosa*、*Bacillus subtilis*、*Escherichia coli* 和 *Streptococcus pyrogene* 的生長。

諾麗果具有良好的抗菌能力，然而其抗病毒能力卻是有待商榷的。Locher等人 (1996) 認為諾麗果的水萃物和二氯甲烷萃取液，對HIV-1之感染細胞缺少抗病毒活性。

7. 膠原酶的影響

Kim等人 (2005) 於實驗中發現，諾麗果萃取物可經由誘導第一型前膠原 (type I procollagen) 而增加人類真皮纖維組織母細胞 (human dermal fibroblast cells) 的膠原產生，且能減少膠原酶和基質金屬蛋白酵素 (matrix metalloproteinase-1) 的作用

(二) 諾麗的功能性成分

1. 未被證實的賽洛寧

有部分的學者 (Heinicke, 1985; Solomon, 1999) 將諾麗的種種益處歸功於賽洛寧 (xeronine)。賽洛寧為是夏威夷學者Heinicke提出的化學物質，其為一種生物鹼而能結合蛋白質，改善酵素功能性。Heinicke認為諾麗果中含有許多賽洛寧原 (proxeronine)，可經人體攝食後於體內轉化形成賽洛寧，以達有益健康的效果。然而截至目前為止，賽諾寧的化學結構尚未被鑑定出來，其檢測方法也無法被確立，以此種不明確的化學物質作為諾麗的功能性成分是有其爭議的。

2. 植物化學組成

基於諾麗的植物化學研究，目前已分離接近200種化合物，其主要組成為一些蒽醌 (anthraquinones) 和蒽醌配糖體 (anthraquinone glycosides)、脂肪酸和其衍生物、鳶尾甘素 (iridoids) 和鳶尾甘素配糖體 (iridoids glycosides)、木酚素 (lignans)、新木脂體 (neolignans)、黃酮醇配糖體 (flavonol glycosides)、苯基丙酸 (phenylpropanoids)、碳水化合物、三類烯 (triterpenoids)和脂肪酸等 (Pawlus & Kinghorn, 2007)。諾麗果實含有的植物化學成分整理於表十一，化學結構列於圖八。有鑑於諾麗果的多種有效成分，我們必須確立幾種指標成分，以區別諾麗果汁品質之良莠。

3. 指標功能成分

(1) 總酚化合物

食物中的酚類化合物主要來自於一群衍生自酚基丙胺酸或酪胺酸的植物二次代謝物，其相對關係如圖九 (van Sumere, 1989; Shahidi, 2000; Shahidi, 2002)。酚類於化學上的定義，泛指芳香環上帶有一個或多個羥基的物質。植物中常包含多種酚類，如：酚單體、酚酸、香豆素、類黃酮、對稱二苯代乙烯 (stilbenes)、水解和縮合單寧、木酚素 (lignans)、木質素 (lignins)等，整理如表十二。酚類在食物中，具有苦味、收斂性、顏色、口味、香氣和氧化穩定性等功能 (Naczki & Shahidi, 2006)。另外，酚類物質對人體也有許多健康的防護功能，日

表十一、從諾麗分離的化合物（僅列果實部分）

Table 11. Compounds isolated from *Morinda citrifolia* (only fruit part)

Structural class	Name (code)
Acids	
	Acetic acid
	Ascorbic acid
	Benzoic acid
	Butanoic acid
	Decanoic acid
	(Z,Z,Z)-8,11,14-Eicosatrienoic acid
	Elaidic acid
	Heptanoic acid
	Hexanedioic acid
	Hexanoic acid
	Lauric acid
	Linoleic acid
	2-Methylbutanoic acid
	2-Methylpropanoic acid
	3-Methylthiopropoic acid
	Myristic acid
	Nonanoic acid
	Oleic acid
	Octanoic acid (2)
	Palmitic acid
	Undecanoic acid
Alcohols and phenols	
	Benzyl alcohol
	1-Butanol
	Eugenol
	1-Hexanol
	3-Methyl-2-buten-1-ol
	3-Methyl-3-buten-1-ol
	(Z,Z)-2,5-Undecadien-1-ol
Anthraquinones	
	Anthragallol 1,3-di- <i>O</i> -methyl ether (7)
	Anthragallol 2- <i>O</i> -methyl ether (9)
	Austrocortinin (10)
	5,15-Dimethylmorindol (14)
	6-Hydroxyanthragallol-1,3-di- <i>O</i> -methyl ether (17)
	2-Methoxy-1,3,6-trihydroxyanthraquinone (27)
	Morindone-5- <i>O</i> -methyl ether (34)
Esters	
	1- <i>n</i> -Butyl-4-(5'-formyl-2'-furanyl)methyl succinate (57)
	1- <i>n</i> -Butyl-4-methyl-2-hydroxysuccinate (58)
	1- <i>n</i> -Butyl-4-methyl-3-hydroxysuccinate (59)
	Ethyl decanoate
	Ethyl hexanoate
	Ethyl octanoate
	Ethyl palmitate
	Methyl decanoate
	Methyl elaidate
	Methyl hexanoate
	Methyl 3-methylthio-propoate
	Methyl octanoate
	Methyl oleate
	Methyl palmitate

(Pawlus & Kinghorn, 2007)

表十一、從諾麗分離的化合物 (僅列果實部分)(續)

Table 11. Compounds isolated from *Morinda citrifolia* (only fruit part) (continued)

Structural class	Name (code)	
Flavonoids	Kaempferol (62)	Quercetin (66)
	Narcissoside (64)	Rutin (69)
	Nicotifloroside (65)	
Iridoids	Asperuloside (70)	Deacetylasperulosidic acid methyl ester (82)
	Asperulosidic acid (71)	
	Asperulosidic acid methyl ester (72)	Dehydromethoxygaertneroside (84)
	Borreriagenin (previously morindacin) (73)	6 β ,7 β -Epoxy-8- <i>epi</i> -splendoside (85)
	4- <i>epi</i> -Borreriagenin (74)	6 α -Hydroxyadoxoside (86)
	Deacetylasperuloside (80)	1,3 α ,4,7 α -Tetrahydro-6-(hydroxymethyl)-3 <i>H</i> -furo[3,4- <i>c</i>]pyran-4-carboxylic acid (87)
	Deacetylasperulosidic acid (81)	
Ketones	2-Heptanone	3-Hydroxy-2-butanone
Lactones	(<i>E</i>)-6-Dodeceno- γ -lactone	(<i>Z</i>)-6-Dodeceno- γ -lactone
Lignans	Americanin A (88)	Isoprincepin (94)
	Americanoic acid (89)	Morindolin (95)
	Americanol A (90)	(-)-Pinoresinol (96)
	Balanophonin (91)	(+)-3,4,3',4'-Tetrahydroxy-9,7' α -epoxyli gnano-7 α ,9'-lactone (97)
	3,3'-Bisdemethylpinoresinol (92)	
	3,3'-Bisdemethyltanegool (93)	
Nucleosides	Cytidine (98)	
Saccharides	Nonioside A (99)	Nonioside H (106)
	Nonioside B (100)	α - and β -Glucose
	Nonioside C (101)	Methyl α - <i>D</i> -fructofuranoside (107)
	Nonioside D (102)	Methyl β - <i>D</i> -fructofuranoside (108)
	Nonioside E (103)	1- <i>O</i> -(3'-Methylbut-3'-enyl)- β - <i>D</i> -glucopy ranose (109)
	Nonioside F (104)	
	Nonioside G (105)	

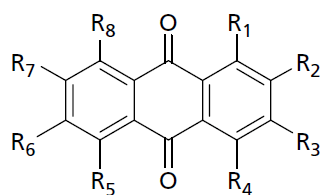
(Pawlus & Kinghorn, 2007)

表十一、從諾麗分離的化合物 (僅列果實部分)(續)

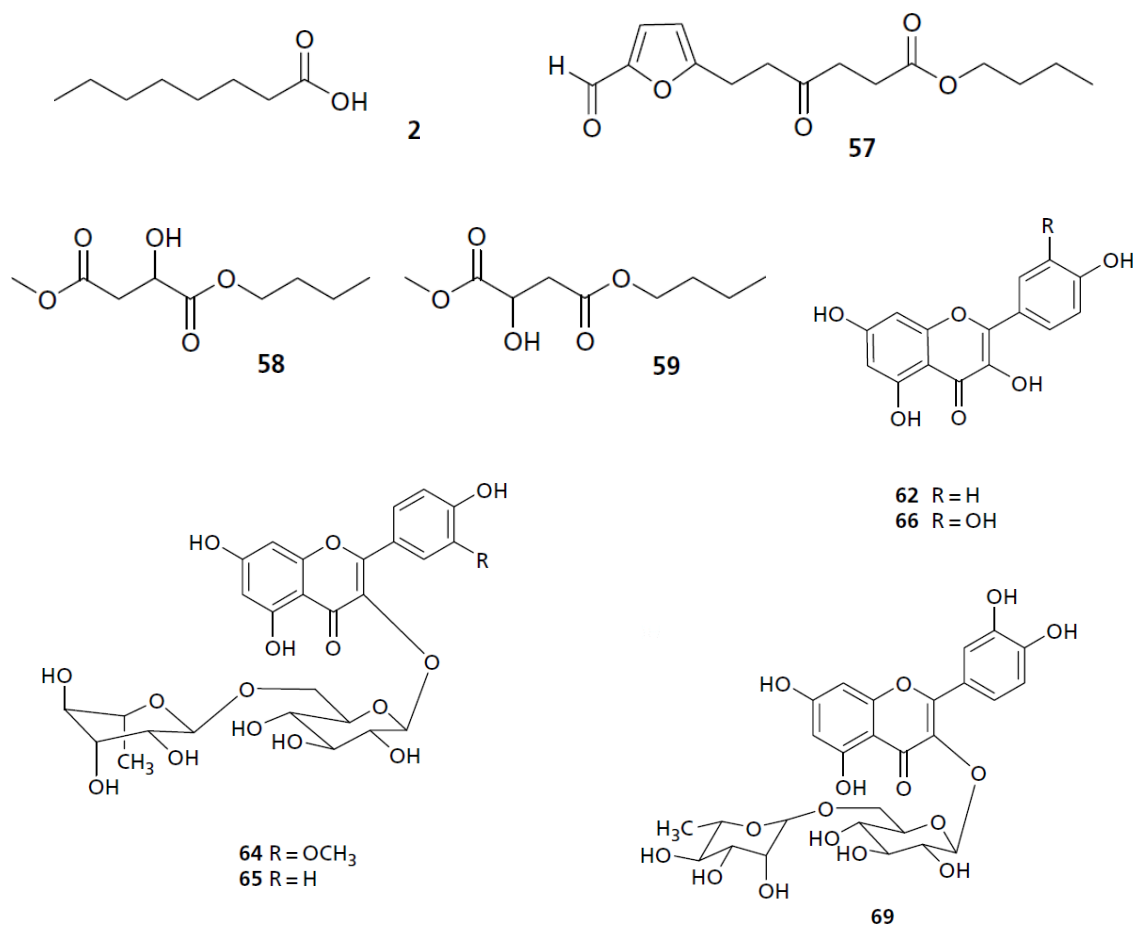
Table 11. Compounds isolated from *Morinda citrifolia* (only fruit part) (continued)

Structural class	Name (code)
Triterpenoids and sterols	
	3,19-Dihydroxyursolic acid
	19 α -Methylursolic acid (117)
Miscellaneous compounds	
	(Ethylthiomethyl) benzene
	Hexanamide (122)
	β -Hydroxypropiovanillone (123)
	4-Hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde (124)
	Isoscopoletin (125)
	Limonene (126)
	1-Palmitin (127)
	Potassium
	Scopoletin (132)
	Vanillin (133)
	Vomifoliol (134)

(Pawlus & Kinghorn, 2007)

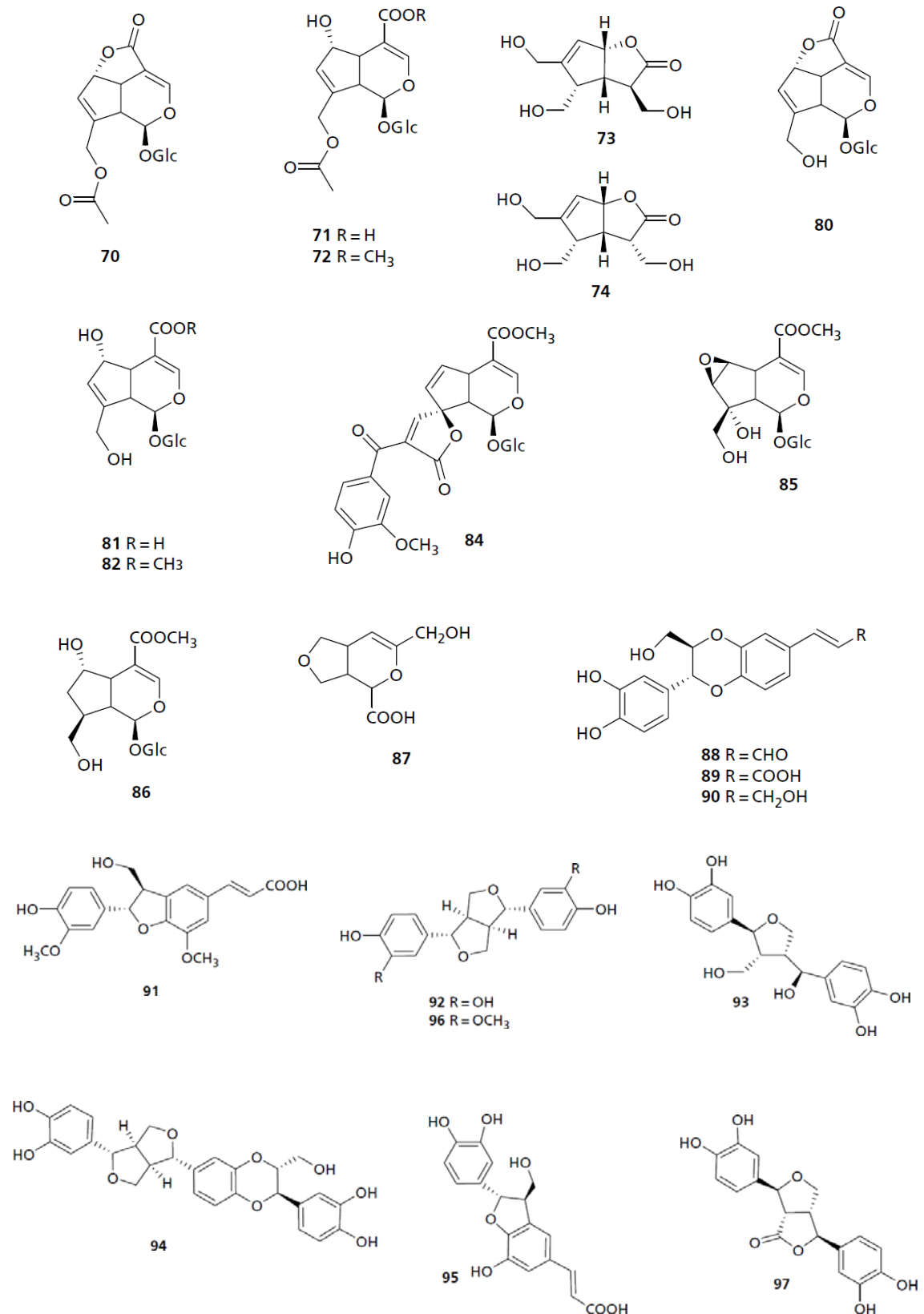


	R₁	R₂	R₃	R₄	R₅	R₆	R₇	R₈
7	OCH ₃	OH	OCH ₃	H	H	H	H	H
9	OH	OCH ₃	OH	H	H	H	H	H
10	OH	OCH ₃	H	OH	H	H	CH ₃	H
14	OH	CH ₂ OCH ₃	H	H	OCH ₃	OH	H	H
17	OCH ₃	OH	OCH ₃	H	H	OH	H	H
27	OH	OCH ₃	OH	H	H	OH	H	H
34	OH	CH ₃	H	H	OCH ₃	OH	H	H



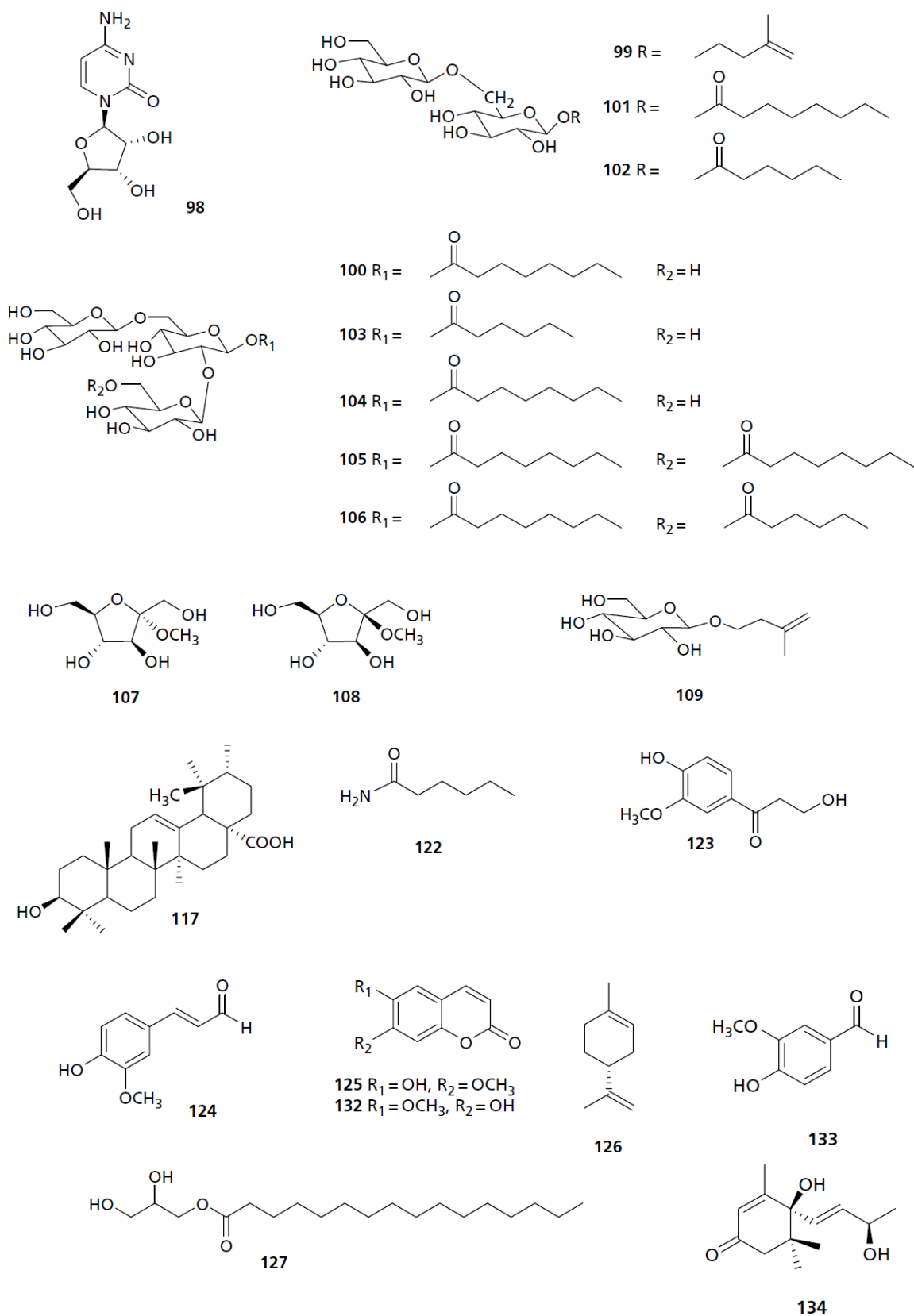
圖八、諾麗分離物質的化學結構 (僅列果實部分)

Figure 8. Chemical structures of compounds isolated from *Morinda citrifolia* (only fruit part). (Pawlus & Kinghorn, 2007)



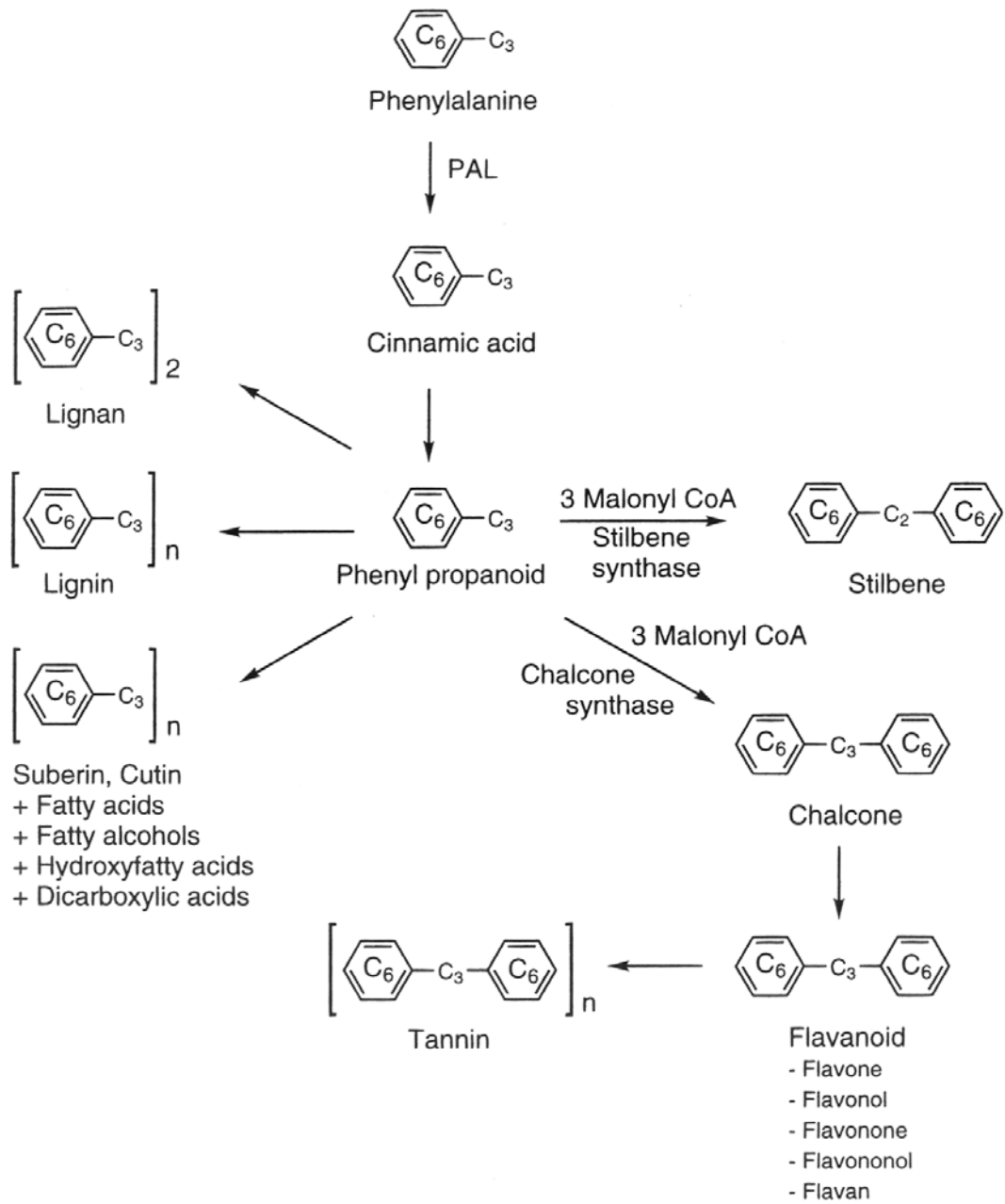
圖八、諾麗分離物質的化學結構 (僅列果實部份)(續)

Figure 8. Chemical structures of compounds isolated from *Morinda citrifolia* (only fruit part) (continued). (Pawlus & Kinghorn, 2007)



圖八、諾麗分離物質的化學結構 (僅列果實部份)(續)

Figure 8. Chemical structures of compounds isolated from *Morinda citrifolia* (only fruit part) (continued). (Pawlus & Kinghorn, 2007)



圖九、由苯丙胺酸產生苯丙酯類、烯類、木酚素、木質素、軟木質、黏質、類黃酮、單寧等

Figure 9. Production of phenylpropanoids, stilbenes, lignans, lignins, suberins, cutins, flavonoids and tannins from phenylalanine. PAL denotes phenylalanine ammonia lyase.

(Shahidi & Naczki, 2004)

表十二、日常膳食的植物酚類來源

Table 12. Dietary sources of plant phenolics

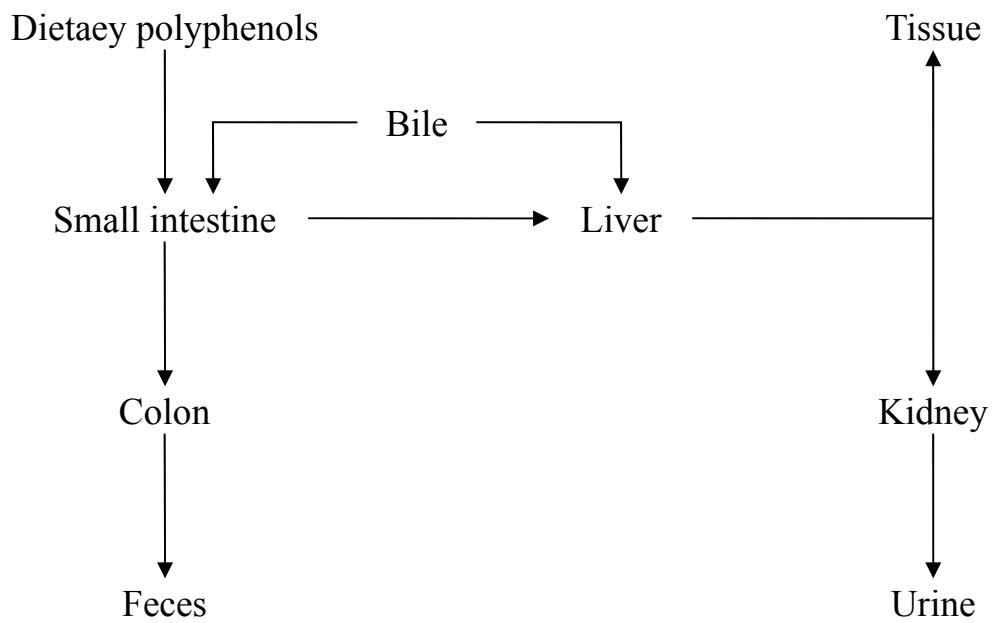
Phenolic compounds	Dietary source
Phenolic acids	
Hydroxycinnamic acids	Apricots, blueberries, carrots, cereals, pears, cherries, citrus fruits, oilseeds, peaches, plums, spinach, tomatoes, eggplants
Hydroxybenzoic acids	Blueberries, cereals, cranberries, oilseeds
Flavonoids	
Anthocyanins	Bilberries, black and red currants, blueberries, cherries, chokecherries, grapes, strawberries
Chalcones	Apples
Flavanols	Apples, blueberries, grapes, onions, lettuce
Flavanonols	Grapes
Flavanones	Citrus fruits
Flavonols	Apples, beans, blueberries, buckwheat, cranberries, endive, leeks, lettuce, onions, olive, pepper, tomatoes
Flavones	Citrus fruits, celery, parsley, spinach, rutin
Isoflavones	Soybeans
Xanthones	Mango, mangosteen
Tannins	
Condensed	Apples, grapes, peaches, plums, mangosteens, pears
Hydrolyzable	Pomegranate, raspberries
Other phenolics	
Alk(en)ylresorcinols	Cereals
Arbutin	Pears
Avenanthramides	Oats
Capsaisinoids	Pepper
Coumarins	Carrots, celery, citrus fruits, parsley, parsnips
Lignans	Buckwheat, flaxseed, sesame seed, rye, wheat
Secoiridoids	Olives
Stilbenes	Grapes

(Naczka and Shahidi, 2006)

常膳食中的多酚物質於小腸被吸收，透過多種路徑經酵素作用（如：phenol sulfotransferases、catechol-O-transferases、 β -glucosidases、lactase-phloridzin oxidases和UDP glucuronosyl transferases等）而進入人體的代謝系統（可能代謝路徑如圖十），帶給我們抗氧化、抗突變、抗腫瘤、抗發炎、保護心血管、調節免疫等多種有益健康的功能（Ames *et al.*, 1993; Amin & Buratovich, 2007; Chavez *et al.*, 2006; Gee *et al.*, 2000; Hertog *et al.*, 1993; Kupeli *et al.*, 2007; Lam *et al.*, 2007; Piskula & Terao, 1998; Ren *et al.*, 2001; Sfakianos *et al.*, 1997; Spencer *et al.*, 1999; Walle *et al.*, 1999; Yen & Chem, 1995)。相關文獻指出，蘋果、藍莓、蔓越莓、葡萄、石榴、柑橘等水果都富含酚類化合物，而酚類化合物更是諾麗果汁中主要的機能微營養素（functional micronutrients）（Chan-Blanco *et al.*, 2006）。

(2) 類黃酮

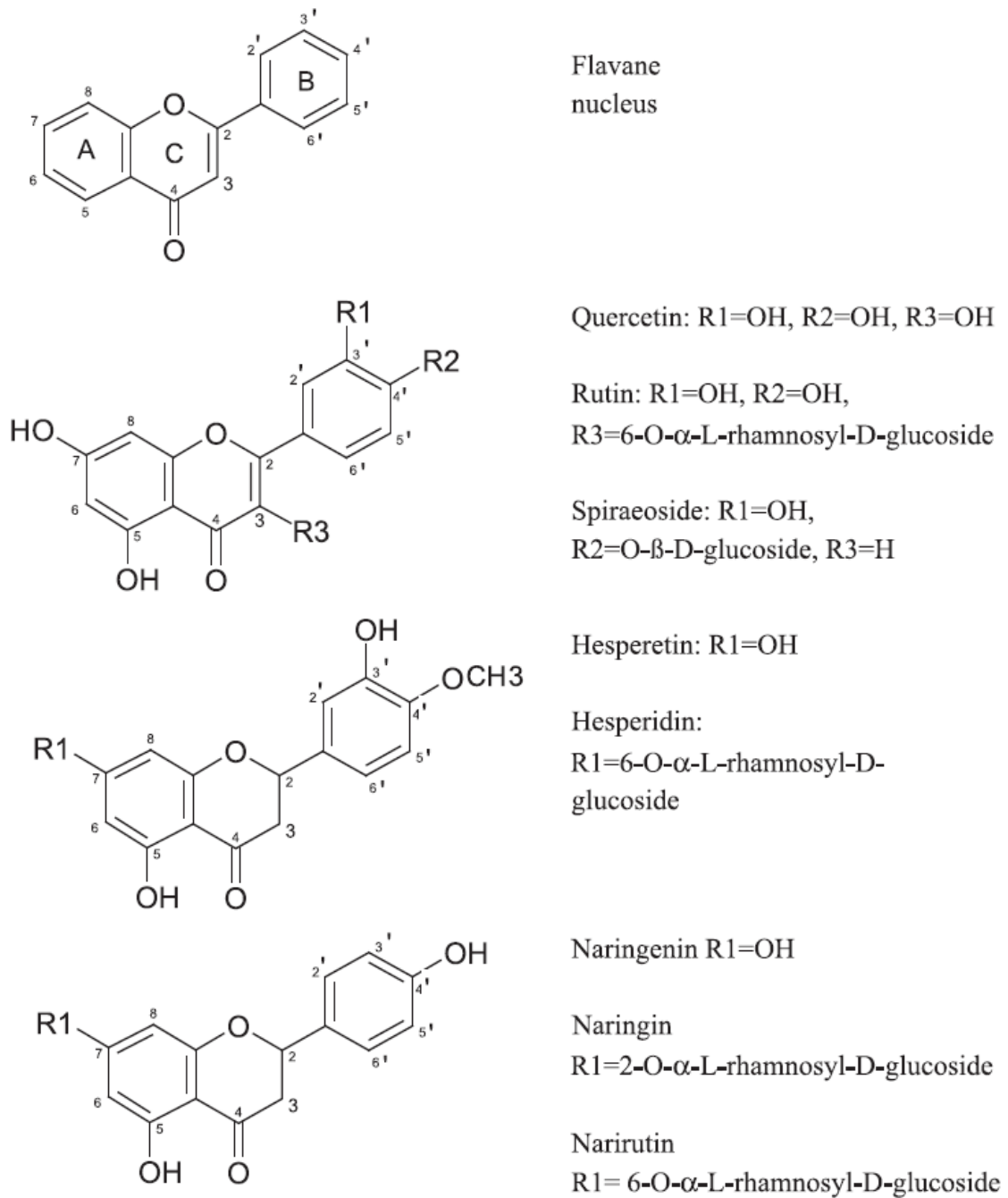
類黃酮為植物酚類成分中的一種，至2000年已鑑定多達6000種類黃酮化合物（Harborne & Williams, 2000）。類黃酮由兩個苯環所組成（A, B），中間由一個帶氧的環（C）所連接，其結構如圖十一所示，依其分子結構區分為四個主要群組（表十三）。類黃酮主要以配醣體的形式存在於植物中，配醣基（結構缺少糖的部份）則較少發生（Erlund,



圖十、膳食多酚於人體的可能路徑

Figure 10. Possible routes for dietary polyphenols in humans.

(Shahidi & Maczk, 2004)



圖十一、黃酮核心、槲皮酮、橙皮素、柚皮素之化學結構和其常見的配糖體

Figure 11. Chemical structures of the flavane nucleus, quercetin, hesperetin, and naringenin, and some of their most common glycosides.

(Erlund, 2004)

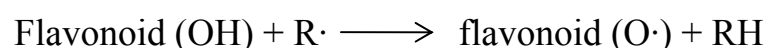
表十三、食物來源的主要類黃酮種類和其個別化合物

Table 13. Main groups of flavonoids, the individual compounds, and food sources

Group	Compound	Food sources
Flavones	Apigenin	Apple skins
	Chrysin	Berries
	Kaempferol	Broccoli
	Luteolin	Celery
	Myricetin	Fruit peels
	Rutin	Cranberries
	Sibelin	Grapes
	Quercetin	Lettuce Olives Onions Parsley
Flavanones	Fisetin	Citrus fruit
	Hesperetin	Citrus peel
	Narigin	
	Naringenin	
	Taxifolin	
Catechins	Catechin	Red wine
	Epicatechin	Tea
	Epigallocatechin gallate	
Anthocyanins	Cyanidin	Berries
	Delphinidin	Cherries
	Malvidin	Grapes
	Pelargonidin	Raspberries
	Peonidin	Red grapes
	Petunidin	Red wine Strawberries Tea Fruit peels with dark pigments

(Nijveldt, 2001)

2004)。對所有類黃酮化合物之功效最好的描述，就是它們都有良好的抗氧化能力，其具易反應的羥基結構，根據下列方程式而使自由基失活 (Korkina & Afanas'ev, 1997)：



藉由掃除自由基，可達到多種有益健康的生理功效。

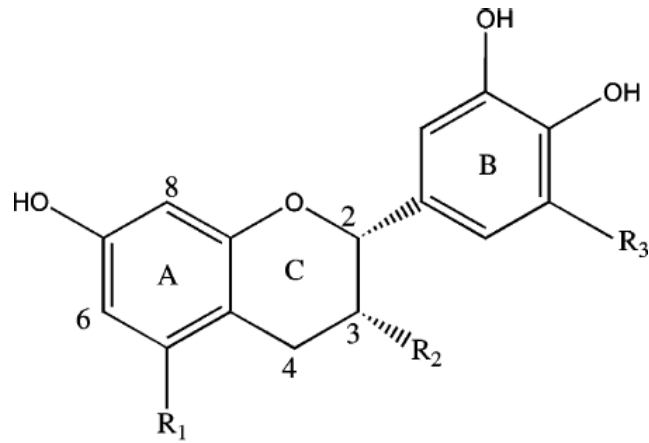
在膳食中最常見的類黃酮化合物為槲皮酮 (quercetin)，其富含於蔬果之中，而具抗氧化 (Chopra *et al.*, 2000)、抗癌 (Pereira *et al.*, 1996)、抗發炎 (Ferry *et al.*, 1996)、抗聚集 (Pignatelli *et al.*, 2000)、血管舒張 (Perez-Vizcaino *et al.*, 2002)等生理功效，有治療心血管疾病的潛力。

(3) 縮合單寧

單寧為一種水溶性的酚類化合物，因其能將獸皮鞣化成皮革，故又稱為鞣質 (Beta-smith, 1962)。單寧可依其結構與性質區別為兩種：水解單寧和縮合單寧。

水解單寧 (hydrolysable tannin) 的中央分子為一碳水化合物 (通常為D型葡萄糖)，其羥基會被部分或完全酯化為酚類基團。

縮合單寧 (proanthocyanidins)，為多個聚羥基黃烷-3-醇寡聚體 (polyhydroxy-flavan-3-ol oligomers) 以碳-碳鍵結結合在一起 (圖十二、圖十三)，不容易被水解而分裂。大部分的縮合單寧為水溶性，

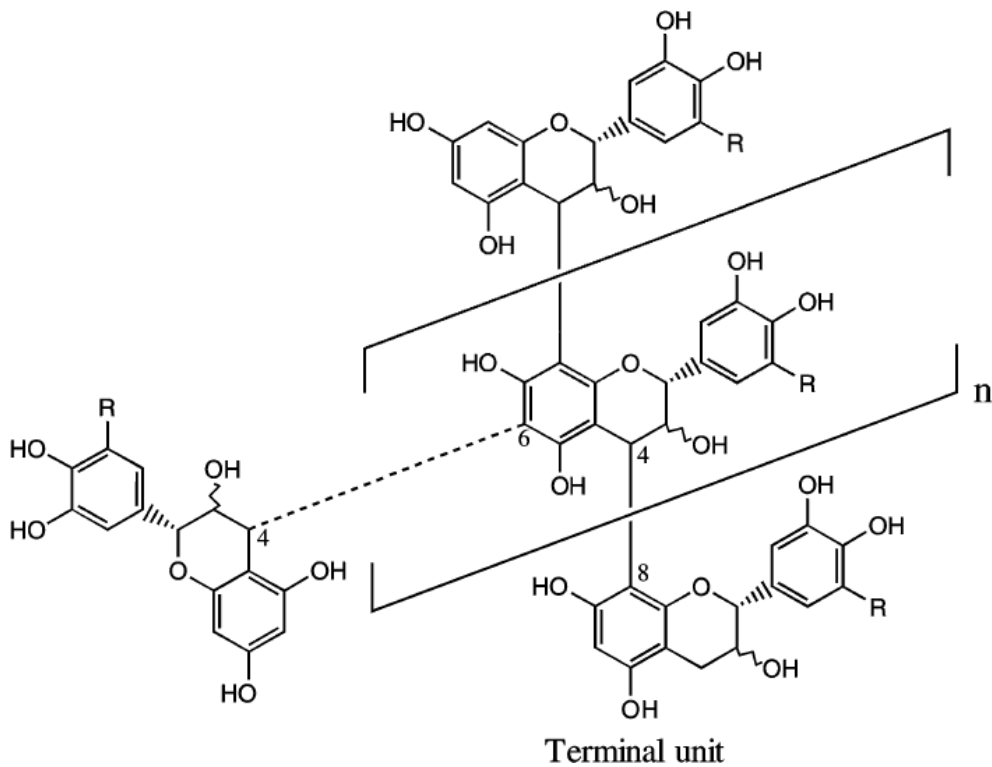


R_1	R_3	Class
OH	H	Proanthocyanidin
OH	OH	Prodelfinidin
H	H	Profisetinidin
H	OH	Prorobinetinidin

圖十二、縮合單寧的基本重複單位

Figure 12. The basic repeating unit in condensed tannins.

(Schofield *et al.*, 2001)



圖十三、縮合單寧的結構模型

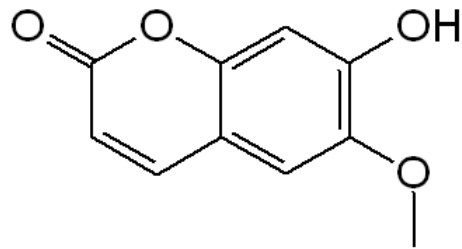
Figure 13. Model structure for a condensed tannin.

(Schofield *et al.*, 2001)

若大量聚集則會轉為非可溶性而沉澱下來。由於縮合單寧的結構複雜，因此難以被研究，目前已知其具有抗氧化、抗癌、抗凝血、預防心血管疾病等功效 (Bagchi *et al.*, 2000; Santos-Buelga & Scalbert, 2000)。

(4) 東莨菪素

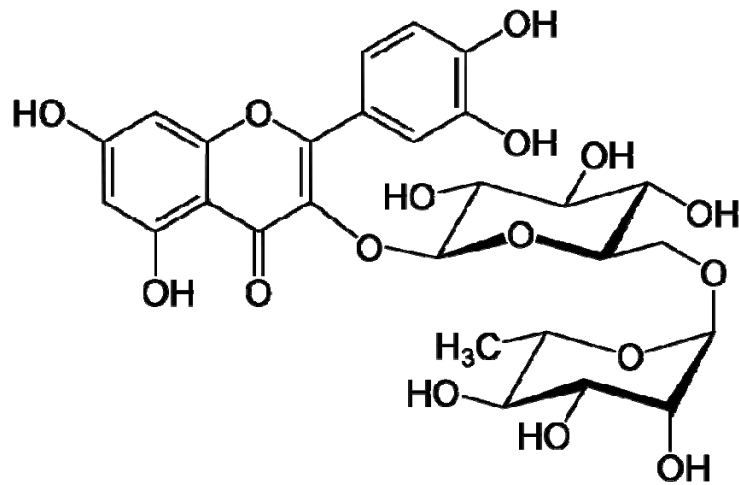
東莨菪素 (scopoletin, 7-hydroxyl-6-methoxycoumstin, $C_{27}H_{30}O_{16}$) 屬香豆素 (coumarin) 的一種，為一種酚類衍生物，其化學結構如圖十四所示。和其他香豆素相同，這種植物殺菌素的產生和環境壓力有關，特別是遭受黴菌感染時，植物中的香豆素含量會急劇提升 (Zobel *et al.*, 1991)。不同的環境化學物質 (如酸或乙醛) 及飽和與否，也會誘發東莨菪素的產生 (Zeringue, 1992)。這種酚類物質於一般的植物中並不常見，然而卻被發現大量存在於諾麗中，Farine (1996) 認為可能與諾麗中的豐富醛酸有關，這些成分在果實中形成交互防禦機制，以抵禦黴菌感染或蟲類攻擊。東莨菪素於臨床上有許多功能性，如：抗菌特性 (Atkinson, 1956; Dittmar, 1993; Leach *et al.*, 1988; Locher *et al.*, 1995)、抗發炎活性 (Kim, 2004)、止痛能力 (Huang *et al.*, 1993)、保肝 (Sang *et al.*, 2001; Sung *et al.*, 1998)、預防高血壓 (Solomon, 1999)、控制體內血清素層級 (Levand & Larson, 1979) 等。



圖十四、東莨菪素之結構

Figure 14. Structure of scopoletin.

(<http://en.wikipedia.org/wiki/Scopoletin>)



圖十五、芸香素之結構

Figure 15. Structure of rutin.

(<http://en.wikipedia.org/wiki/Rutin>)

(5) 芸香素

芸香素 (rutin, 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone-3-rutinoside, $C_{27}H_{30}O_{16}$) 為1973年從橘類分離出來的新物質，當時認為它是屬於維生素的一種而稱作“維生素P”，現在我們知道它是屬於類黃酮化合物的一種 (Nijveldt *et al.*, 2001)。芸香素是由黃酮醇槲皮酮 (flavonol quercetin)和芸香二糖 (disaccharide rutinose) 所組成的類黃酮配糖體 (Ribéreau-Gayon, 1968)，圖十五為其化學結構，於人體腸胃道中會被代謝分解為槲皮酮 (Chan-Blanco *et al.*, 2007)。芸香素的結構較不穩定，在很多時候易被氧化或水解，換句話說，它是一種強力的抗氧化劑 (Raffo *et al.*, 2006)。另外，它還具有抗發炎 (Guardia *et al.*, 2001; Selloum, 2003)、抗微生物 (Cushnie & Lamb, 2005) 等生理活性。

四、諾麗果的商業應用

1985 年太平洋熱帶園藝期刊 (pacific tropical garden bulletin) 刊登了一篇關於諾麗的文章 (Heincke, 1985)，宣稱其具有神奇的生物鹼——賽洛寧，諾麗果便開始受到大眾的重視，並在最近幾年逐漸成為一種風靡世界的新興營養補給品。由於諾麗果的濃郁且獨特的風味，因此多以調味果汁做為商品形式。世界上第一支商業化諾麗果汁產品於 1990 年上市 (Deng *et al.*, 2009)，如今除了可在健康食品商店購得外，甚至可透過網路取得世界各國的不同產品 (Dixon *et al.*, 1999)；歐盟並於 2002 年認可諾麗果汁為一種新型食品，且可在歐洲各國自由貿易 (European Commission, Scientific Committee for food, 2002)。儘管近年有少數關於諾麗果汁可能引起急性肝炎的案例 (Millonig, 2005; Stadlbauer, 2005)，而且有學者認為諾麗中的高含量蔥醌可能與肝中毒有關。但是歐洲食品管理機構 (European Food Safety Authority, EFSA) 參考多篇化學成分文獻後，於 2006 年認定沒有諾麗果汁與肝中毒有關的直接證據；而歐洲檢驗單位 AGES (Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH) 經過化學分析，亦認定諾麗果汁中沒有可測得的蔥醌含量，並表示諾麗果汁為安全無虞的飲品。

(一) 傳統諾麗果汁發酵

諾麗果產品主要製成發酵果汁、未發酵果汁、粉末、膠囊等產品型態，其中以發酵果汁為主流。傳統發酵流程主要分為四個步驟：

1. 熟果採收

挑選新鮮且達成熟期的果實送至果汁加工場所，此時果實大部分仍呈綠中帶白的未熟成狀態，表皮堅硬而禁得起運送途中的碰撞。

2. 清洗與風乾

利用改造自蔬菜洗滌操作的自動清洗機來大量清洗果實，新鮮果實清洗後懸空於桌面室溫風乾。

3. 熟果裝罐發酵

將諾麗果置於玻璃、不鏽鋼或食品級塑料容器，密封後儲放二個月或更久，果實外觀由原本的琥珀色或金色逐漸轉暗，而在裡面慢慢發酵並滲出汁液，待發酵完成後將累積於底部的汁液自罐底排出收集，則為發酵半成品。

4. 充填裝罐

經過發酵熟成的諾麗果汁，呈現類似醬油的深褐色質感，其 pH 值低而散發特殊的酸臭味。將上述的發酵半成品充填裝罐後，便成為

完整的產品。

(二) 諾麗果汁之製程改良

傳統的果汁製程並未對果汁品質加以驗證，其加工方法也是依循經驗傳承而沒有科學根據，如今利用現代儀器檢測果汁的指標成分和生理活性，可修飾諾麗果汁的生產流程，以製造出更具健康效益的果汁產品。目前已有多篇關於諾麗果產品製程探討的相關研究。

傳統發酵製程並未注重果實的熟成度，而直接將生果熟果通通置入罐內密封發酵。Yang 等人 (2007b) 分別比較以生果和熟果製成的果汁，結果發現熟果製成的發酵果汁具有更亮的色澤，其總酚化合物、縮合單寧、類黃酮化合物、東莨菪素含量皆高於生果組。此外，熟果發酵果汁也展現了較佳的抗氧化活性與 ACE 抑制活性。因此作者建議在發酵前應將諾麗果之生熟果區別，而以熟果作為發酵的原料。

傳統發酵製程並未對發酵場所有所規範，對發酵後產品的存放沒有特別要求，發酵成品的加工方式亦沒有被探討，而採取常規傳承的方式。Yang 等人 (2007a) 對諾麗果的發酵過程提出改良，作者首先對室內與室外的發酵場所進行比較，結果發現可能是高溫與紫外光傷害的緣故，室外發酵的產品在經過 1 天後，其抗氧化活性便有大幅度

的降低；接著作者再對諾麗果汁產品儲存條件作測試，結果發現，室溫存放的果汁在八天後抗氧化活性便有顯著的降低，冷藏存放的果汁要到第 16 天後才有明顯的抗氧化活性減損，而冷凍存放的果汁要到第 32 天才會有略微的下降；然後作者對諾麗果汁的熱殺菌進行探討，比較以 65°C 和 75°C 殺菌 24 hr 對果汁抗氧化活性的影響，結果顯示殺菌 24 hr 確實會降低果汁的抗氧化活性，然而不同殺菌溫度對果汁抗氧化活性的影響不大；最後作者對諾麗果粉的脫水製程進行測試，結果發現以高溫對諾麗果泥進行脫水，雖會破壞產品的抗氧化活性（且 60°C 較 50°C 破壞更劇），但製成果粉後於儲藏期間，其抗氧化活性較果汁安定。因此作者建議，將諾麗果汁製成粉末，或以冷凍冷藏保存果汁可確保諾麗果產品的抗氧化活性。

傳統製程雖對諾麗果的容器有所建議，不過許多廠家基於容器成本和便於觀察產品變化的考量，而採用玻璃容器作為盛裝的器皿。Yang 等人 (2010) 研究光照對諾麗果產品的影響，經過 2 週室溫存放後，結果發現光照組別諾麗果汁的總酚含量、維生素 C、抗氧化活性均大幅低於避光組別，經過四週後，光照組別幾乎損失了所有的維生素 C 含量；接著對果粉進行光照儲藏測試，經過 12 週的存放，其功能成分與抗氧化活性降低的情形優於果汁於第 4 週時的儲藏表現，但光照組同樣有較避光組更嚴重的活性減損情形。因此作者認為，無論

是果汁或果粉，使用褐色罐填裝會較透明罐具有更佳的保存效果，避光可有效減少產品的抗氧化活性減損情形，以果汁而言可保存 2 週，但若製成果粉則可保存至少 3 個月以上。

五、本篇研究目的

諾麗果中含有豐富的果膠多醣，除提供食品生理活性外，亦對果實的後熟與後續加工階段有重要影響。目前世界對諾麗果的生理活性與化學功能物質已有廣泛的研究，也有多篇關於諾麗果汁產品的改良文獻被提出。然而，尚未有人對諾麗中的果膠酵素進行研究，也沒有人將諾麗自身的果膠酵素特性應用於發酵製程中。諾麗果汁的發酵過程可能為果膠的分解作用，經過長時間的反應水解，果膠分子被分解，而原本被果膠結合在植物組織中的功能成份便被釋放出來。果膠酵素運用於果汁與釀酒工業已行之有年，一般認為果膠酵素可軟化果實、澄清果汁、促進酚類等功能成份釋放，增加產率並提高產品品質 (Alkorta *et al.*, 1997; Kashyap, *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2007)。郭 (2006) 將商業果膠酵素在諾麗果汁發酵期間添加於其中，結果發現商業果膠酵素除了可促進產率的增進外，亦能提升產品的生理活性。與其冀望外源性的果膠酵素效益，不如探究諾麗果本身的酵素潛力，利用自身果膠酵素的功能促進發酵、提高品質。

本研究分為三部份進行，綜合實驗結果整合出改善諾麗果發酵的改良製程：

Part 1. 酵素純化—首先自諾麗果實中分離並純化影響果膠自分解的關鍵酵素果膠酯酶 (PME)，並測定其溫度因子參數 (最適作

用溫度與溫度耐受性)，了解溫度對提升酵素活性的影響。

Part 2. 控溫發酵—接著再將上部實驗所得的溫度參數應用於諾麗果控溫發酵，以了解溫度因子對整體果汁品質的影響。果汁的品質評估則分為四部份。

1. 基本性質：產率、可溶性固形物含量、pH 值、有機酸 (乳酸和醋酸)、色澤變化。

2. 功能性成分：

(1) 分光法：總酚化合物、類黃酮化合物、縮合單寧。

(2) 液相層析法：東莨菪素、芸香素。

3. 生理活性：

(1) 抗氧化能力：DPPH 自由基掃除能力、TEAC 總抗氧化能力。

(2) 降血壓效果：ACE 抑制能力。

4. 官能品評：初步發酵與後期發酵 (氣味、顏色)。

Part 3. 殺菌測試—最後比較利用三種不同殺菌方法 (巴斯德殺菌、超膜過濾、板式熱交換) 對果汁品質 (基本性質、功能性成分、生理活性) 的影響。

參、材料與方法

一、實驗材料

(一) 原料

本土品種諾麗果，購自雲林縣東豐景觀園藝公司與屏東縣珍果生技股份有限公司。

(二) 試劑與試藥

1. Tris (hydroxymethyl) aminomethane ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$, Tris) 購自西班牙 usb 公司。
2. Sodium chloride (NaCl)、trifluoroacetic acid (CF_3COOH , TFA)、potassium acetate (CH_3COOK) 購自德國 Riedel-de Haën 公司。
3. Sodium azide (NaN_3)、pectin from citrus fruits (DE ~60%)、albumin bovine (BSA)、angiotensin converting enzyme (ACE from rabbit lung, EC 3.4.15.1)、Hippuryl-L-histidyl-L-leucine (HHL)、Folin-Ciocalteu's phenol reagent (2N)、gallic acid ($(\text{HO})_3\text{C}_6\text{H}_2\text{CO}_2\text{H}$)、quercetin ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$)、vanillin ($\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$)、2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt ($\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_6\text{S}_4$, ABTS)、peroxidase from horseradish、(±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid ($\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_4$, TroloxTM)、butylated hydroxyanisole

$((\text{CH}_3)_3\text{CC}_6\text{H}_3(\text{OCH}_3)\text{OH}$, BHA)、2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl, free radical ($\text{C}_{34}\text{H}_{44}\text{N}_5\text{O}_6$, DPPH)、rutin trihydrate ($\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$, vitamin P trihydrate)、L-(+)-Lactic acid ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$) 購自美國 Sigma-Aldrich 公司。

4. Ammonium sulfate ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)、sodium hydroxide solution Titrisol[®] 0.1N、sodium carbonate (NaCO_3)、aluminium nitrate nonahydrate ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3\cdot 9\text{H}_2\text{O}$)、hydrogen peroxide (H_2O_2) 購自德國 Merck 公司。
5. Protein assay dye reagent concentrate 購自美國 Bio-Rad Laboratories。
6. (+)-Catechin ($\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$) 購自日本 OSAKA 島久藥品株式會社。
7. Scopoletin ($\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_4$) 購自比利時 ACROS 公司。
8. Acetonitrile (CH_3CN , HPLC grade) 購自美國 HY BIO CARE 公司。

(三) 儀器設備

1. 諾麗果膠酯酶純化之儀器設備—Part 1

破碎機：MP80，德國 BRAUN 公司。

均質機：Blender 7012，美國 DYNAMICS 公司。

機械式攪拌器：RZR 2021，美國 Heidolph 公司。

酸鹼計：PHM82 STANDARD pH METER，丹麥 Radiometer corenhamen 公司。

高速低溫離心機：himac CR22G II，日本 HITACHI 株式會社。

超音波細胞打碎機：SONIFIER 250，美國 Branson 公司。

透析膜：Spectra/Pro[®] molecularporous membrane tubing (MWCO = 12~14,000)，希臘 SPECTRUMLABS 公司。

攪拌過濾器：Model 8050，美國 anicon[®] bioseparation 公司。

— 濾膜：YM10 (NMWL = 10,000)，美國 MILLIPORE 公司。

離子交換樹脂管柱：DEAE-Sephadex[®] A-25，瑞士 Pharmacia 公司。

— 幫浦與梯度混合器：L-6200 Intelligent Pump，日本 HITACHI 株式會社。

— 分液收集器：FC 203，美國 GILSON 公司。

分光光度計：UV-2100，美國 Unicon 公司。

PE 比色管：台灣伯豐儀器公司。

自動滴定儀：DL 25，瑞士 METTLER 公司。

2. 諾麗果汁控溫發酵之製備與檢測儀器設備—Part 2 & 3

發酵罐：G-706 優鮮密封罐 (圓)，以食品級 PS 材質製成，可耐熱 80°C，容量 1500 mL，台灣聯府塑膠股份有限公司。

商用食品脫氧劑：DR 級，台灣小嵩無氧化學股份有限公司。

高速低溫離心機：himac CR22G II，日本 HITACHI 株式會社。

恆溫培養箱：MIR-153，日本 SANYO 株式會社。

FIRSTEK RI-150，台灣一升科技股份有限公司。

TKS LTI601，台灣健鑫儀器有限公司。

酸鹼度計：PHM82 STANDARD pH METER，丹麥 Radiometer
corenhagen 公司。

色差儀：UV-VISIBLE RECORDING SPECTROPHOTOMETER
UV-2100，日本 Shimadzu 株式會社。

分光光度計：UV-2100，美國 Unicon 公司。

數位折射計：PR-101 (Brix = 0.0-45.0%)，日本 ATAGO 株式會社。

高效能液相層析儀 (HPLC) — 乳酸與醋酸：

— 超音波水浴槽：BRANSON 5200，美國 Branson 公司。

— 送液幫浦：765 HPLC COMPACT POMP，瑞士 ALCOTT 公
司。

— 管柱：Transgenomic™ ICsep ICE-ORH-801 (300 mm × 6.5
mm)，美國 Transgenomic 公司

— 管柱保溫箱：655A-52，日本 HITACHI 株式會社。

— 折光偵測器：ERC-7515A，日本 ERC 株式會社。

— 積分儀：Chromatocorder 21，日本 SIC 株式會社。

高效能液相層析儀 (HPLC) — 東莨菪素、芸香素與 ACE 抑制力：

— 送液幫浦：1100 series Quaternary Pump，美國 Agilent 公司。

— 除氣裝置：GASTORR AG-14，日本 FLOM 株式會社。

—管柱：Synergi 4 μ Fusion-RP 80 (250 × 4.6 mm, 4 μ m)，美國

Phenomenex 公司。

LiChrospher[®] 100 RP-18e (250 × 4 mm, 5 μ m)，美國

Agilent 公司。

—紫外光可見光偵測器：S-3702，日本 Soma 株式會社。

—積分儀：Chromatocorder 21，日本 SIC 株式會社。

3. 不同殺菌方式之設備—Part 3

恆溫循環水浴槽：HOTTECH[®]，台灣和德科儀企業有限公司。

膜過濾裝置：Sterifil holder 47 mm，美國 Milipore 公司。

—濾膜：GN-6 Metricel[®] Grif 47 mm (0.45 μ m)，美國 PALL 公司。

板式熱交換器：MC43-，日本 YOKOGAWA 電子株式會社。

二、實驗方法

(一) 實驗大綱

本實驗以本土諾麗果為材料，主要分為兩部份：首先進行諾麗果 PME 純化，並測試其酵素溫度特性，以了解溫度對酵素活性之影響；再將溫度特性運用於諾麗果汁控溫發酵，並測試其物化特性，了解控溫發酵是否對其基本性質與功能性成分有所影響，最後進行官能品評與殺菌測試，以達改善諾麗果汁產品之目標。本研究實驗內容簡要示於圖十六。

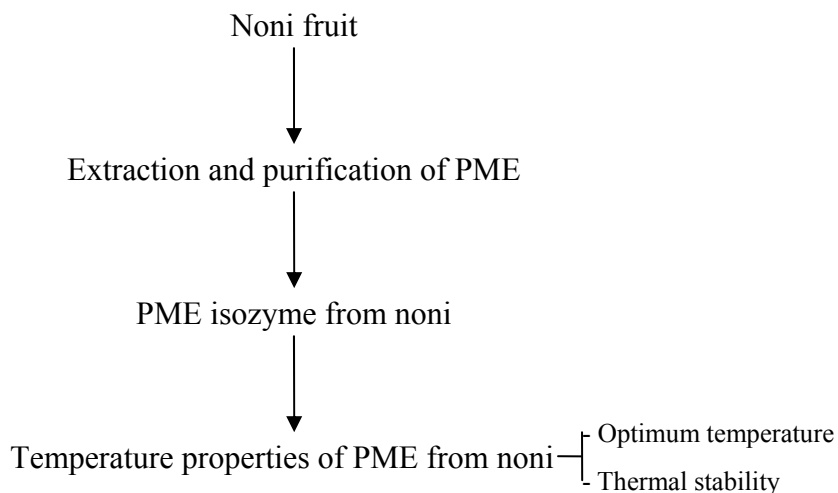
(二) 諾麗果 PME 的萃取與純化—Part 1

以含氯化鈉之緩衝液進行萃取，經破碎均質，離心過濾後，將所得之粗萃液經硫酸銨劃分與透析除鹽，以攪拌過濾器濃縮後，進行陰離子交換管柱分離，每個步驟測試酵素活性與蛋白質含量，以及各步驟酵素純化效率。並對純化後之果膠甲酯酶測試最適活性溫度與溫度耐受性等酵素性質。

1. 諾麗果 PME 之萃取

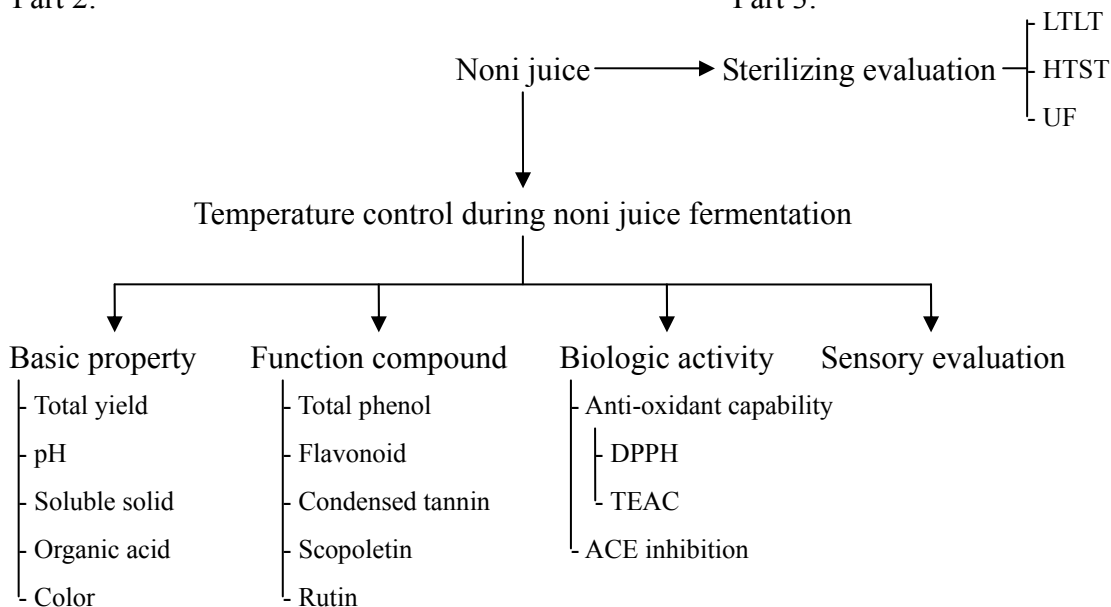
新鮮諾麗果實運抵後立即洗淨風乾，靜置隔夜後收集已熟成之果實作實驗樣品。參考 Cameron 和 Grohmann (1995) 所提之方法並加以修飾，實驗步驟如圖十七所示，所有純化步驟都在 4°C 下操作。一

Part 1:



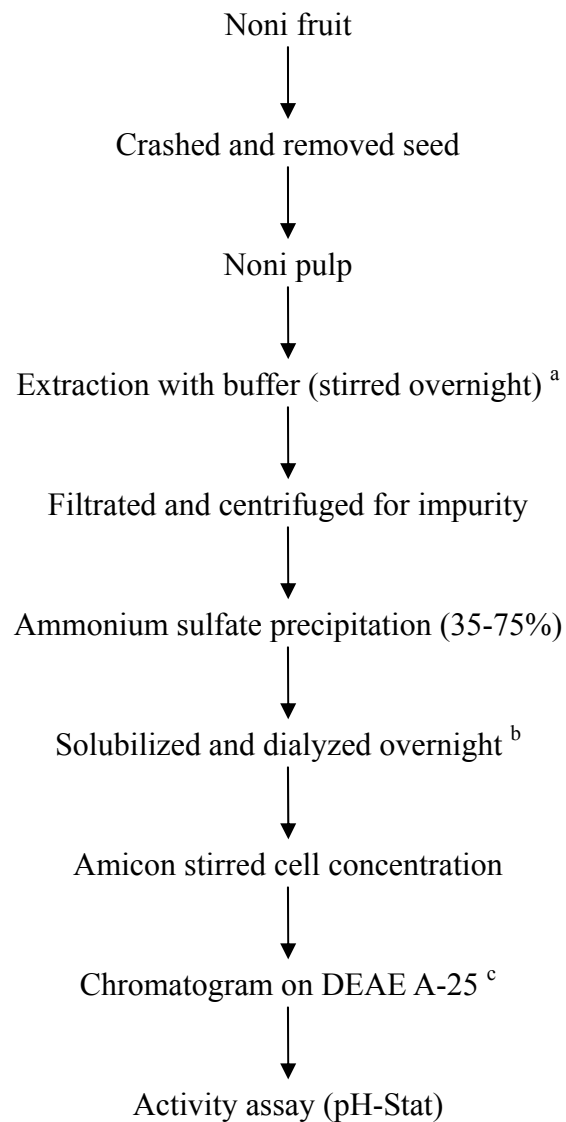
Part 2:

Part 3:



圖十六、本研究實驗內容簡要

Figure 16. A summary scheme for the experiments of carried out in this study.



a. Extract buffer

0.1 M Tris (pH 8.0 at 27°C)

1 M NaCl

b. Dialysis buffer

0.01 M Tris (pH 7.5 at 27°C)

0.02 M NaCl

0.02 % NaN₃

c. TBS buffer

0.01 M Tris (pH 7.5 at 27°C)

0 – 1 M NaCl

0.02% NaN₃

圖十七、諾麗果PME之萃取與純化流程圖

Figure 17. Flow chart of extraction and purification of PME from noni.

般植物 PME 以離子鍵與細胞壁結合在一起，高鹽濃度可使酵素易被萃取出。

先將諾麗果破碎後以篩網去籽收集果泥，與已預冷之萃取緩衝液以 1:2 (w/v) 比例混合，經均質機攪拌 2 min (每 30 sec 停止攪拌並移至冰上冷卻片刻，以免溫度過於升高) 後，以機械式攪拌器攪拌整夜，使萃取液與果泥充分混合。隔日以二層紗布過濾去除粗纖維，再用高速離心機於 13,000 rpm 離心 30 min，取上清液作為諾麗果 PME 粗萃液。

2. 硫酸銨劃分

取諾麗果 PME 粗萃液，緩慢加入硫酸銨粉末，每次少量加入，待其顆粒溶解再加入少許粉末，防止局部過飽和現象，待其完全溶解後，以氫氧化鈉溶液調整 pH 值至 7.5，繼續攪拌 2 hr，使其達到平衡。以 13,000 rpm 離心 30 min 後，小心倒出懸浮液繼續添加硫酸銨粉末，使其達到設定之更高飽和度，重複上述攪伴、離心步驟；沉澱則以少量透析緩衝液輔以超音波溶解，經上列步驟可收得不同飽和度之蛋白質沉澱覆溶物。

由於高濃度鹽類可能破壞酵素活性且不利於後續的滴定測試，故使用透析法去除鹽類。新透析膜在使用前，先以沸水浸煮 10 min，再用去離子水沖洗，以清除膜上之甘油或其他可能影響酵素活性之物

質。文獻指出 (Wong, 1995) 一般植物之 PME 分子量介於 20~50 kD，故本實驗採用 MWCO = 12~14,000 之透析膜，以 20 倍體積之透析液 (同覆溶液) 進行隔夜透析，並換液 2 次使其充分透析。將所得之各部位酵素劃分液進行活性測定及蛋白質含量測定並計算其比活性。本實驗先將蛋白質粗分為三個不同飽和度之沉澱區塊 (0~35%, 35~75%, 75~100%)，找出諾麗果 PME 主要活性沉澱區，再進行大量收集。

3. 離子交換管柱層析

一般高等植物 PME 為高 pI 蛋白質，於中性環境下帶正電，無法被陰離子交換管柱吸附而迅速被沖出，本實驗利用此特性採用 DEAE A-25 陰離子交換樹脂管柱分離酵素。由於分離過程中會稀釋試樣，故先以攪拌過濾器 (NMWL = 10,000) 於冰浴中濃縮經透析後之酵素液。

取 50 mL DEAE A-25 樹脂充填於開放式管柱 (內徑 2.5 cm)，以 TBS 沖提液充分平衡後，每次加入 9 mL 濃縮酵素液並以 40 mL TBS 沖提液將未被樹脂吸附的正電荷蛋白質沖提出，然後用 75 mL TBS 沖提液以 0-1 M 氯化鈉濃度梯度沖提，使較不具正電荷之蛋白質逐步被沖出。洗提液以分液收集器收集之，流速為 1 mL/min，每管收集 2 mL。將所得之收集部份分別測試蛋白質濃度與酵素活性，繪製管柱層析圖並區別活性區塊。

4. PME 活性測定方法

PME 作用於果膠酯酸，會切除其酯鍵，而使原先的甲氧基轉為羧基，而形成果膠酸。目前常用的 PME 活性測定法有比色法與滴定法兩種，都是利用 PME 產生的羧基加以測定，然而諾麗果含豐富的色素，會影響比色法之判讀，故本實驗採酸鹼滴定法 (pH-stat) 量測 PME 活性，參考 Lee 和 MacMillan (1968) 的方法並加以修飾。

取 40 mL 含 0.1 M 氫化鈉的 0.5% 柑橘果膠質 (DE = 60%) 溶液，調整至 pH 7.5。以循環水浴控溫，於 30°C 下加入 1 mL 的酵素溶液，用自動滴定儀隨時滴加 0.01 N 氫氧化鈉溶液，以 pH-stat 方式使反應液維持在 7.5。紀錄固定時間 (10 min) 內所消耗的氫氧化鈉溶液 mL 數，由此換算出單位時間內酵素反應所釋出之羧基微毫當量數 (microequivalent)，而以每 min 釋放 1 meq 羧基的酵素量定為一活性單位，即 1 PME unit = 1 μ mole COOH/min。活性單位之計算如下：

$$\text{PME activity (unit)} = \frac{A \times F \times 0.01}{T} \times 1000 \quad (1)$$

A：所消耗之 0.01 M 氫氧化鈉溶液 mL 數

F：氫氧化鈉溶液之力價

T：反應或滴定時間

空白試驗以覆溶液取代酵素溶液，於相同條件下進行滴定。

5. 蛋白質含量測定

蛋白質定量採商業試劑測定之，根據 Bradford protein-binding assay 的方法。利用 Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBG) 的特性，CBG 是種指示劑，在不同酸鹼度有不同顏色；在酸性條件下呈紅色，與蛋白質結合後，由於蛋白質提供一個相對中性的環境，故變為藍色，而在波長 595 nm 下有吸光。

取適當稀釋之澄清樣品 800 μL ，加入 200 μL 濃縮染劑，室溫反應 5 min 後，以分光光度計測定波長 595 nm 之吸光值。以 BSA 為標準品並製作標準曲線 (附錄一)，不添加染劑之反應為空白組，樣品組減去空白組為實測值。樣品中蛋白質含量由此標準曲線求得相對 BSA 之量，以 $\mu\text{g BSA equivalent/mL}$ 表示。

6. PME 溫度活性因子之探討

(1) 反應溫度對酵素活性之影響

利用循環水浴控溫，分別測試不同溫度下 (30、40、50、60、70 $^{\circ}\text{C}$) 活性表現之改變，以 30 $^{\circ}\text{C}$ 的活性作為比較基準，結果以相對活性百分比表示之。

(2) 溫度耐受性之影響

將酵素以水浴控溫，於不同溫度下 (30、40、50、60、70、80、90 $^{\circ}\text{C}$) 加熱 5 min，立即轉移至冰浴終止反應，隨後統一於 30 $^{\circ}\text{C}$ 進行

活性測試，以未加熱組別 (30°C) 作為比較基準，結果以相對活性百分比表示之。

(三) 諾麗果汁之控溫發酵—Part 2

1. 發酵諾麗果汁製備

新鮮諾麗果實運抵後立即洗淨風乾，靜置數日待所有果實成熟後，統一將果實切為四等分並分作四堆混合，分別置入發酵罐中，加入商用食品脫氧包 (吸氧量 350 mL)，緊閉罐蓋置於設定溫度 (25、35、45、55°C) 之恆溫培養箱中，進行 1、2、3、4 週等不同時間控溫發酵。發酵完成後經 8,000 rpm, 15 min 離心處理 2 次使汁渣分離，過篩後為發酵諾麗果汁。再離心 13,000 rpm, 10 min 去除雜質作為後續物化性質測試之樣品。每個溫度採 3 重複平行試驗，加上第 0 週控制組共 51 個樣品。

2. 基本性質測試

(1) 果汁產率

將過篩後的發酵諾麗果汁秤重，計算所得之果汁量，結果以百分比表示之。

$$\text{果汁產率 (\%)} = \frac{\text{諾麗果汁重 (g)}}{\text{諾麗果實重 (g)}} \times 100\% \quad (2)$$

(2) pH 值分析

利用電位差原理測試 pH 值。取 10 mL 離心後果汁，以酸鹼度計於室溫下測定之。

(3) 可溶性固形物含量

利用光折射原理測試可溶性固形物含量，以糖度 ($^{\circ}$ Brix) 表示之。先以去離子水對數位折射計校正歸零，拭乾後滴加 100 μ L 樣品於儀器上，待其顯示數值紀錄之。

(4) 乳酸與醋酸測定

由於此次實驗之諾麗果，於發酵後有微生物生長反應，故使用高效能液相層析法 (HPLC) 分離並定量果汁中的乳酸和醋酸含量，與微生物檢測結果相比較。諾麗果汁經離心過濾後，注射 20 μ L，以 IC Sep ICE ORH-801 管柱分析 (控溫於 35 $^{\circ}$ C)，流速為 0.6 mL/min，移動相為 0.01 N H₂SO₄ 等梯度沖提，以折光偵測器偵測。以乳酸標準品和冰醋酸製作標準曲線 (附錄二、三)，諾麗果汁中乳酸與醋酸含量由此標準曲線求得，分別以 mg lactic acid/mL 和 mg acetic acid/mL 表示。典型的樣品層析圖譜如附錄四所示。

(5) 色澤分析

利用色差儀測定諾麗果汁於發酵過程之顏色變化。以 CIE 1976 color space (CIELAB) 作為測色標準 (傳統的 Hunter Lab 僅以平方根演算，以立方根演算的 CIELAB 值更能準確的表示顏色)，結果以 lightness (L^* ，明亮度)、 a^* (綠紅軸參數)、 b^* (藍黃軸參數) 表示。 L^* 接近 100 時表偏白，接近 0 時表偏黑；+ a^* 表越趨於紅色，- a^* 表越趨於綠色；+ b^* 表越趨於黃色，- b^* 表越趨於藍色。

3. 功能性成分測試

(1) 總酚化合物

參考 Julkunen-Titto (1985) 之方法。福林酚試劑 (Folin-Ciocalteu's phenol reagent) 可與酚類化合物之羥基行還原反應，使其中的磷鉬酸與磷鎢酸複合物產生電子轉移，產生由黃至藍的顏色變化，而於波長 735 nm 下有吸光。

取 50 μ L 離心後果汁，加入 1 mL 去離子水和 500 μ L 福林酚試劑，混合後再加入 2.5 mL 20%碳酸鈉提供鹼性環境，混合均勻後室溫反應 20 min，以分光光度計測試 735 nm 之吸光值。以沒食子酸 (gallic acid) 為標準品並製作標準曲線 (附錄五)，不添加福林酚試劑之反應為空白組，樣品組減去空白組為實測值。諾麗果汁中總酚類化合物含量由此標準曲線求得相對沒食子酸之量，以 mg gallic acid equivalent/mL 表示。

(2) 類黃酮

參考 Wang (1997) 之方法。黃酮類在鹼性條件下會與鋁鹽生成螯合物，呈紅色變化，於 415 nm 下有吸光。

取 250 μL 離心後果汁，加入 50 μL 10% 硝酸鋁提供鋁鹽，加入 50 μL 1 M 醋酸鉀提供鹼性環境，加入 1.4 mL 去離子水後均勻混合，於室溫下反應 40 min，以分光光度計測試 415 nm 之吸光值。以槲皮酮 (quercetin) 為標準品並製作標準曲線 (附錄六)，不添加硝酸鋁之反應為空白組，樣品組減去空白組為實測值。諾麗果汁中類黃酮含量由此標準曲線求得相對槲皮酮之量，以 $\mu\text{g quercetin equivalent/mL}$ 表示。

(3) 縮合單寧

參考 Julkunen-Titto (1985) 之方法。原花青素 (proanthocyanidin) 與其他酚類不同，在酸性環境中可與香草醛 (vanillin) 作用，產生紫色顏色變化，而於 500 nm 下有吸光。

取 250 μL 離心後果汁，加入 1 mL 4% 香草醛 (w/v 溶於甲醇中) 避光搖勻，再加入 500 μL 濃鹽酸提供酸性環境，混合均勻後於室溫反應 20 min，以分光光度計測試 500 nm 之吸光值。以兒茶素 (catechin) 為標準品並製作標準曲線 (附錄七)，不添加香草醛之反應為空白組，

樣品組減去空白組為實測值。諾麗果汁中縮合單寧含量由此標準曲線求得相對兒茶素之量，以 mg (+)-catechin equivalent/mL 表示。

(4) 東莨菪素 (scopoletin) 與芸香素 (rutin)

參考王 (2008) 之方法並加以修飾。使用逆向層析法 (RP-HPLC) 分離並定量諾麗果汁中的東莨菪素與芸香素含量。諾麗果汁經離心過濾後，注射 20 μ L，以 Synergi 4 μ Fusion-RP 80 管柱分析，流速為 1 mL/min，移動相梯度條件為 0–30 min 由 100%去離子水至 30%乙腈，30–40 min 由 30%乙腈回復至 100%去離子水，維持 100%去離子水平衡至 50 min 完成一個循環，以 UV 340 nm 偵測。以東莨菪素和芸香素標準品製作標準曲線 (附錄八、九)，諾麗果汁中東莨菪素與芸香素含量由此標準曲線求得，分別以 μ g rutin/mL 和 μ g scopoletin/mL 表示。典型的樣品層析圖譜如附錄十所示。

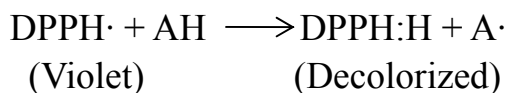
4. 生理活性

(1) 抗氧化能力

I. DPPH 自由基掃除能力

參考 Robak (1988) 之方法並加以修飾。DPPH 為一種較穩定的自由基，其甲醇溶液呈紫色，在 517nm 下有吸光。當 DPPH 自由基與抗氧化物質作用後，由抗氧化物質提供氫，而使 DPPH 自由基失去顏

色，使吸光值降低。吸光值減少越多則抗氧化能力越強。其反應機制：



取 600 μL 離心後果汁，加入 600 μL 0.008% DPPH 甲醇溶液，混合均勻後避光反應 30 min，以分光光度計測試 517 nm 之吸光值。以 BHA 為標準品並製作標準曲線 (附錄十一)，不添加 DPPH 自由基之反應為空白組，樣品組減去空白組為實測值；不添加抗氧化物為控制組，計算因抗氧化物所減少之自由基吸光值可得相對掃除能力，算式如下：

$$\text{DPPH 自由基掃除能力 (\%)} = \left[\frac{(A_C - A_{CB}) - (A_S - A_{SB})}{(A_C - A_{CB})} \right] \times 100\% \quad (3)$$

A_C = 不添加抗氧化物而添加 DPPH 自由基組之吸光值

A_{CB} = 不添加抗氧化物與 DPPH 自由基組之吸光值

A_S = 添加抗氧化物與 DPPH 自由基組之吸光值

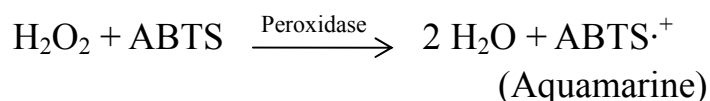
A_{SB} = 添加抗氧化物而不添加 DPPH 自由基組之吸光值

諾麗果汁中 DPPH 自由基掃除能力由此標準曲線求得相對 BHA 之量，以 $\mu\text{g BHA equivalent/mL}$ 表示。

II. TEAC 總抗氧化能力

參考 Miller (1993) 之方法。Horseradish peroxidase 會催化 H_2O_2

與 ABTS 形成穩定的 $\text{ABTS}\cdot^+$ 自由基，其反應式如下：



ABTS^{·+}自由基呈藍綠色，在 734 nm 下有吸光。當 ABTS^{·+}自由基與抗氧化物質作用後，會使 ABTS^{·+}自由基失去顏色而吸光值降低。吸光值減少越多則抗氧化能力越強。

將 peroxidase、ABTS 與 H₂O₂ 混合均勻，使最後濃度分別為 4.4 unit/mL、100 μM、50μM，於室溫下避光反應 1 hr，使其成為穩定的 ABTS^{·+}自由基反應試劑。取 0.25 mL 離心後果汁，加入 2.25 mL ABTS^{·+}自由基反應試劑，混合均勻後避光反應 10 min，以分光光度計測試 734 nm 之吸光值。以 Trolox 為標準品並製作標準曲線（附錄十二），不添加 ABTS^{·+}自由基之反應為空白組，樣品組減去空白組為實測值；不添加抗氧化物為控制組，計算因抗氧化物所減少之自由基吸光值可得相對掃除能力，算式如下：

$$\text{ABTS}^{\cdot+} \text{ 自由基掃除能力 (\%)} = \left[\frac{(A_C - A_{CB}) - (A_S - A_{SB})}{(A_C - A_{CB})} \right] \times 100\% \quad (4)$$

A_C = 不添加抗氧化物而添加 ABTS^{·+}自由基組之吸光值

A_{CB} = 不添加抗氧化物與 ABTS^{·+}自由基組之吸光值

A_S = 添加抗氧化物與 ABTS^{·+}自由基組之吸光值

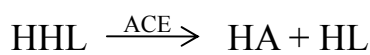
A_{SB} = 添加抗氧化物而不添加 ABTS^{·+}自由基組之吸光值

諾麗果汁中 ABTS^{·+}自由基掃除能力由此標準曲線求得相對 Trolox 之量，以 μg Trolox equivalent/mL 表示。

(2) ACE 抑制能力

腎素-血管收縮素系統 (renin-angiotensin system, RAS) 為調節人

體血壓平衡的重要機制，第一型血管收縮素 (angiotensin I) 本身無生物活性，當受到血管收縮素轉化酶 (angiotensin converting enzyme, ACE) 作用後，則會轉為具有活性的第二型血管收縮素，引發一連串提高血壓的生理反應。參考Cushman和Cheung (1971)之方法。Hippuryl-L-histidyl-L-leucine (HHL) 為人工合成的第一型血管收縮素類似物，會受到ACE的作用而被分解為馬尿酸 (hippuric acid, HA) 和 His-Leu (HL)，而在波長228 nm有吸光。若ACE受到抑制時，則HA和HL的生成量就會減少。與不受抑制的控制組相比，HA減少的量越多，則ACE受到樣品抑制的效果越好。其反應式如下：



取 45 μL 5 mM HHL 基質溶液 (溶於含 0.4 M 氯化鈉之 0.1 M 硼酸鈉緩衝液，pH 8.3)，加入 5 μL 之離心過濾後果汁，於 37°C 水浴下預熱 5 min，再加入 15 μL 60 mU/mL ACE 溶液 (溶於含 0.4 M 氯化鈉之 0.1 M 硼酸鈉緩衝液，pH 8.3)，於 37 °C 水浴下反應 30 min 後，立即加入 65 μL 0.1% TFA 終止反應。隨後以 13,000 rpm，離心 1 min，取上清液冰入-18°C 冷凍，確保酵素完全失活。後續以 RP-HPLC 進行測試，注射 20 μL ，以 LiChrospher® 100 RP-18e 管柱分析，流速為 0.7 mL/min，移動相條件為含 0.1% TFA 的 50% 甲醇，以 UV 228 nm 偵測。ACE 抑制活性百分比算式如下：

$$\text{ACE 抑制活性 (\%)} = \frac{\text{HA}_C - \text{HA}_S}{\text{HA}_C} \times 100\% \quad (5)$$

HA_C = 不添加諾麗果汁組之 HA 波峰面積

HA_S = 添加諾麗果汁組之 HA 波峰面積

5. 官能品評

諾麗果汁經控溫發酵後，產品色澤與氣味均產生極大差異，且隨著發酵時間的增長而有些微變化。為了解消費者是否可接受此類健康飲品，故進行官能品評測試。由於產品未經殺菌而有衛生疑慮，而若使用常規殺菌法可能有破壞產品品質之疑慮，故初步僅測試視覺（顏色）與嗅覺（氣味）兩種感官。

本實驗參考食品官感檢驗手冊 (1984) 採取順位法 (Ranking test) 進行測試。順位法常用於迅速的篩選樣品而從中挑出最好的，適合視覺或嗅覺的評測。

首先進行初步發酵之喜好排位測試，取第 0 週與第 1 週各溫度之產品共 5 組進行品評，逢機挑選 15 名本系研究生作測試，再取與第 4 週後期發酵組別進行排位，找出受試者最能接受的產品，並比較發酵初期與發酵後期之品質變化是否一致。綜合上述兩者實驗結果，歸納出最符合消費者之發酵果汁條件。

(1) 初步發酵品質評斷

將第 0 週（控制組）與第 1 週各發酵溫度（25、35、45、55°C）之

三重複產品各取 5 mL 混合成 15 mL 為 1 樣品，共 5 組樣品，以亂數表之末 3 碼進行編號，待果汁回復至室溫後隨機挑選 15 名受試者，分作色澤與氣味兩種測試項目填寫品評表，品評表如附錄十三。依品評結果之彙整表，樣品計有 5 種，重複數 15，查 Kramer 順位檢定表，取捨點 ($P = 0.05$) = 32~58。得分低於 32，顯著受到肯定 (受試者可以接受的風味)；得分高於 58，顯著不受肯定 (受試者不能接受的風味)。

(2) 後期發酵品質評斷

將第 4 週各發酵溫度 (25、35、45、55°C) 之三重複產品各取 5 mL 混合成 15 mL 為 1 樣品，共 4 組樣品，以亂數表之末 3 碼進行編號，待果汁回復至室溫後隨機挑選 15 名受試者，分作色澤與氣味兩種測試項目填寫品評表，品評表如附錄十三。依品評結果之彙整表，樣品計有 4 種，重複數 15，查 Kramer 順位檢定表，取捨點 ($P = 0.05$) = 26~47。得分低於 26，顯著受到肯定 (受試者可以接受的風味)；得分高於 47，顯著不受肯定 (受試者不能接受的風味)。

(四) 不同殺菌方式之影響—Part 3

由於常溫發酵諾麗果汁有微生物生長之疑慮，而一般商業上使用之殺菌方法可能對產品品質造成影響，故本實驗擬採用三種不同殺菌

方法 (低溫長時殺菌、高溫短時殺菌、膜過濾除菌)，殺菌後比較物化特性的改變。由於殺菌過程需消耗大量樣品，故直接向廠商購買未殺菌之半成品果汁，而不使用自行發酵之少量果汁作為實驗材料。

1. 低溫長時殺菌 (low temperature long time, LTLT)

參照市面廠商之商業營運模式，將果汁半成品裝入容器密封，以 65°C 水浴加熱 1 天，隔日移至室溫靜置後，再以 65°C 水浴加熱 1 天，總計共加熱 2 天。以確保能完全消除產孢菌與其他病原菌。

2. 高溫短時殺菌 (high temperature short time, HTST)

本實驗使用板式熱交換器做為高溫短時殺菌裝置，先以熱水浴預實驗以設定符合需求的殺菌溫度，再以水量測流速與樣品滯留時間，最後設定殺菌條件為 95°C, 13 sec。操作時全程監控出口與入口溫度，樣品不經循環直接流出收集，只取中段流出液確保產品質與殺菌條件穩定。

3. 膜過濾除菌 (ultra filtration, UF)

將膜過濾裝置之出口以鋁箔紙密封後，送入滅菌釜 121°C, 15 min 殺菌，移至無菌操作台，使用含有過濾去菌裝置之真空幫浦抽氣，使果汁通過預殺菌之 0.45 μm 濾膜，達到分離除菌之目標。

(五) 統計分析

本實驗之實驗數據以平均值 \pm 標準偏差 (mean \pm standard deviation) 表示，並採用 Statistical Analysis System (SAS) 8.0 版之統計軟體進行變異數分析 (analysis of variance, ANOVA)、Duncan's multiple range test 等統計分析，比較結果是否有顯著差異性， $p < 0.05$ 即視為具顯著差異。

肆、結果與討論

Part 1: 諾麗果 PME 的萃取與純化

一、諾麗果 PME 之萃取

由於諾麗果後熟現象明顯，亦有文獻提及其含有高比率之果膠多醣 (Bui *et al.*, 2006)，故 PME 可能在諾麗果發酵中扮演重要的角色。高等植物的 PME 為高 pI 之蛋白質，於酸性的水果環境中會帶正電荷，並與果膠質以離子鍵的方式緊密結合，所以利用高濃度的鹽緩衝液來降低離子鍵結，進而將 PME 從植物組織中萃取出來。Ali (2004) 以含 1 M 氯化鈉之緩衝液萃取番石榴、番茄、香蕉、番木瓜、芒果、楊桃的果膠酵素，Espachs-Barroso 等人 (2005) 則利用含 1 M 氯化鈉之緩衝液萃取香蕉、柑橘、番茄、紅蘿蔔的果膠酵素，Guiavarc'h 等人 (2005) 亦使用含 1 M 氯化鈉之緩衝液萃取葡萄柚的果膠酵素。整體而言，多以 1M 濃度之氯化鈉緩衝液萃取植物組織中的果膠酵素，然而亦有其他文獻報導以不同鹽濃度的緩衝液萃取之。Draye 和 Cutsem (2008) 以 2M 之氯化鈉緩衝液萃取草莓果膠酵素；Assis 等人 (2002) 則以含 0.6M 氯化鈉緩衝液萃取西印度櫻桃的果膠酵素。本實驗參考 Cameron 和 Grohmann (1995) 的方法，將諾麗果破碎成泥過篩去籽後，以兩倍體積之含 1M 氯化鈉緩衝液混合均質，經過隔夜攪拌後充份萃取，離心去除不溶物與雜質得到酵素粗萃液。

二、諾麗果酵素粗萃液之硫酸銨劃分

初步以硫酸銨進行沉澱時，各部份沉澱物均無比活性提升的現象，酵素活性於此階段損失劇烈。經比對各學者實驗方法，發現 Cameron 和 Grohmann (1995) 在純化紅葡萄柚的果膠酵素時，於硫酸銨沉澱時加入調整 pH 值的步驟。可能是紅葡萄柚為酸性水果，雖然在萃取酵素時以 Tris 緩衝液維持其整體 pH 值，然而該水果酸性劇烈，可能使 Tris 的緩衝效果不佳而造成 pH 改變，因而影響酵素活性表現。諾麗果與紅葡萄柚同屬熱帶水果，同時具高酸性質，可能有類似表現，故嘗試於沉澱階段調整 pH 值。未調整的混合液 pH 值介於 4~5 之間，與緩衝液設定的 pH 7.5 差異甚大，可能足以影響酵素性質。隨著氫氧化鈉的添加，沉澱液逐漸改變顏色而越趨深色，比較調整前和調整後的離心沉澱物，在色澤與產量均有明顯差異。

參考 Cameron 和 Grohmann (1995) 的方法，初步實驗將諾麗果粗萃液以硫酸銨粗分為三個區域，分為 0~35%、35~75%、75~100% 等飽和度進行沉澱劃分，經透析後分別測定各劃分部位活性。結果發現主要活性集中於 35~75% 的硫酸銨沉澱區段，比活性較粗萃液提升 1.78 倍，且活性回收率達 77.82%；而 0~35% 之沉澱區段，由於雜蛋白多，故比活性僅為粗萃液的 0.05 倍而遠低於 35~75% 區段之活性；文獻指出(莊，2005)，於 80% 飽和度時大部份的蛋白質都會被沉澱

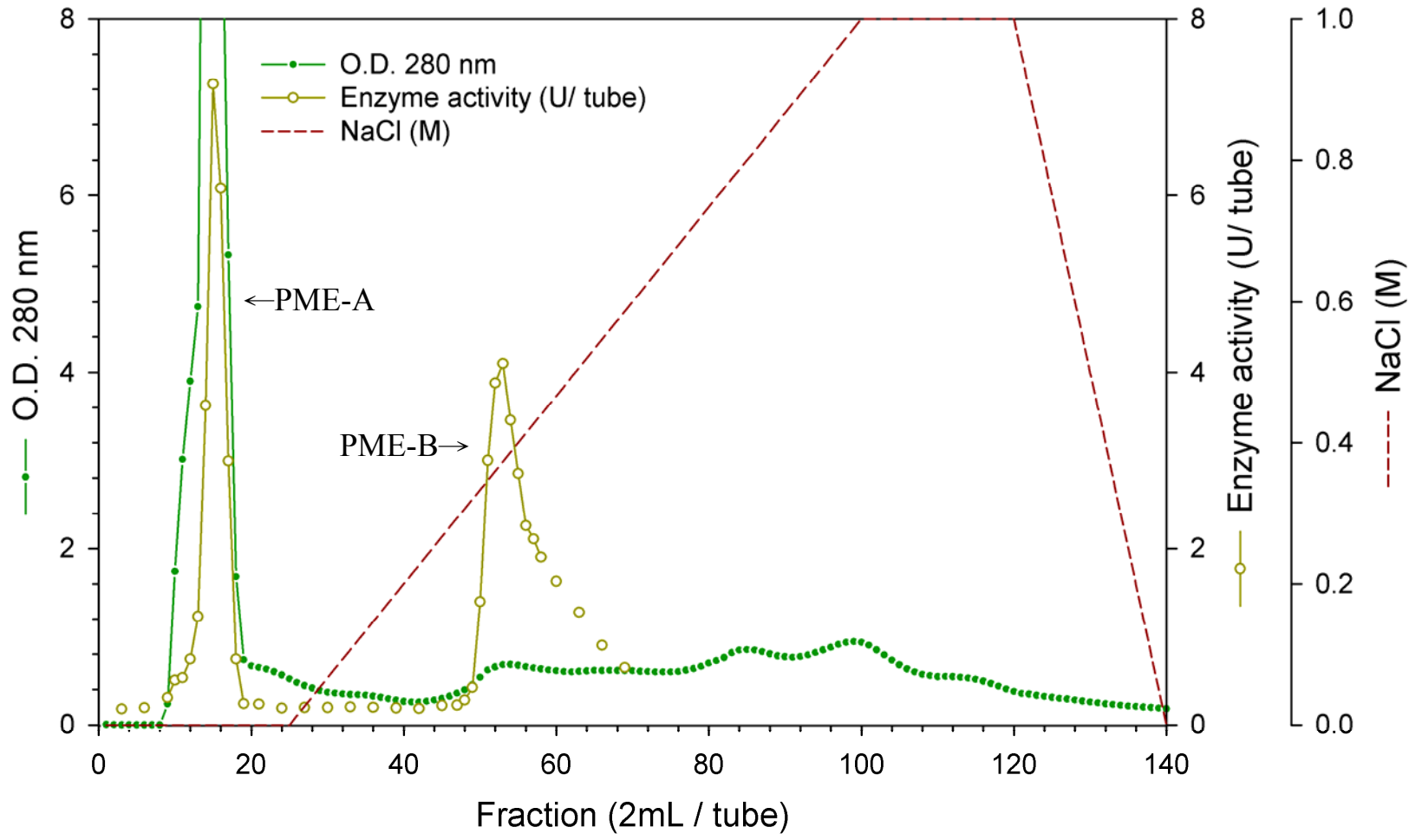
出來，故 75~100%的區段蛋白質含量低，回收率僅 1.14%。綜合以上結果，採用 35~75%之硫酸銨沉澱區段作為後續實驗的操作條件。

三、DEAE A-25 離子交換層析之純化結果

將 35~75 %飽和度之硫酸銨沉澱物進行後續離子管柱純化。由於管柱層析的過程中，樣品會被沖提液加以稀釋，故需於層析前先行濃縮，以提昇單位體積之酵素濃度，便於後續的層析與量測。文獻指出 PME 的分子量大致分布於 20~50 kDa (Wong, 1995)，本實驗採用攪拌過濾器 (MWCO: 10 kDa) 濃縮硫酸銨沉澱物之覆溶透析液，於此階段，雖然提昇單位體積的蛋白質濃度，不過總體的蛋白質濃度與活性表現均有流失，造成酵素比活性略為下降。

綜合文獻結果，高等植物之 PME 為高 pI 值(大致分布於 8~10)，故 PME 在中性條件下為帶正電之蛋白質。本實驗採用陰離子交換樹脂以 pH 7.5 之緩衝液沖提，可迅速捕捉帶負電之雜蛋白，使帶正電之 PME 迅速通過流出，而後續再輔以鹽梯度將其他較不帶正電之蛋白質依序沖出，DEAE 管柱之層析圖如圖十八所示。

於 15 管左右時，帶正電的蛋白質由於無法被陰離子管柱捕捉，因此快速流出，蛋白質濃度高、酵素活性反應亦高，而將此區塊命名為 PME-A。諾麗中含有大量色素，傳統上常做為衣物染劑 (Wang et al, 2002)，於此階段諾麗果色素會大量吸附於初次使用的新膠體上，緊



圖十八、諾麗果PME之DEAE A-25離子交換管柱層析圖

Figure 18. Ion exchange chromatogram on DEAE A-25 of PME from noni.

密的結合而無法被沖提出來；重覆回收使用的膠體因無法繼續結合更多色素，故一開始色素便隨著帶正電的蛋白質一起被沖出，而影響 O.D. 280 的蛋白質指標量測，故實際上 PME-A 的蛋白質波峰高度可能無層析圖所繪之高，而在蛋白質定量時，會以不加反應試劑的空白組加以修正色素造成的干擾。在 25 管後以鹽梯度沖提，逐步提高氯化鈉濃度至 1 M，此階段又陸續區分出零星的蛋白質區塊，由於高鹽濃度會影響 pH 值偵測，進而影響滴定結果，故本實驗酌取 0.5 M 氯化鈉前之收集區塊作活性測試，結果在 52 管附近發現第二個酵素活性區塊 PME-B，雖然其於層析圖的活性表現較 PME-A 略低，但其蛋白質濃度顯著低於 PME-A，故計算所得之比活性高於 PME-A 甚多。

PME 常以多種構形存於細胞壁組織中，目前已有多篇文獻證實蘋果 (Castaldo *et al.*, 1989)、龍鬚菜 (陳, 2002a)、葡萄柚 (Seymour *et al.*, 1991)、檸檬 (MacDonald *et al.*, 1993)、綠豆芽 (楊, 1991)、番茄 (Delinc'ee & Radola, 1970; Theron *et al.*, 1977) 等水果都具有二種以上的 PME 同功酶。而諾麗果 PME 經 DEAE 管柱純化後，前後分離出 PME-A 和 PME-B 兩種酵素同型體。

四、純化總表

若以 1000 mL 之酵素鹽水萃取液作為基準，經過 35~75% 的硫酸銨沉澱劃分後，蛋白質濃縮而提高單位濃度，而去除前後飽和度的雜

蛋白也初步提升酵素比活性至 1.38；再以攪拌過濾器濃縮，於操作過程中損失部分蛋白質濃度與酵素活性，比活性略為降低至 1.28；再經由 DEAE 管柱分離，得到兩個同功酶為 PME-A 和 PME-B，比活性分別提高至 1.65 和 14.57，回收率則為 8.46%和 6.97%。其詳細之酵素純化表如表十四所示。

五、影響 PME 活性因子之討論

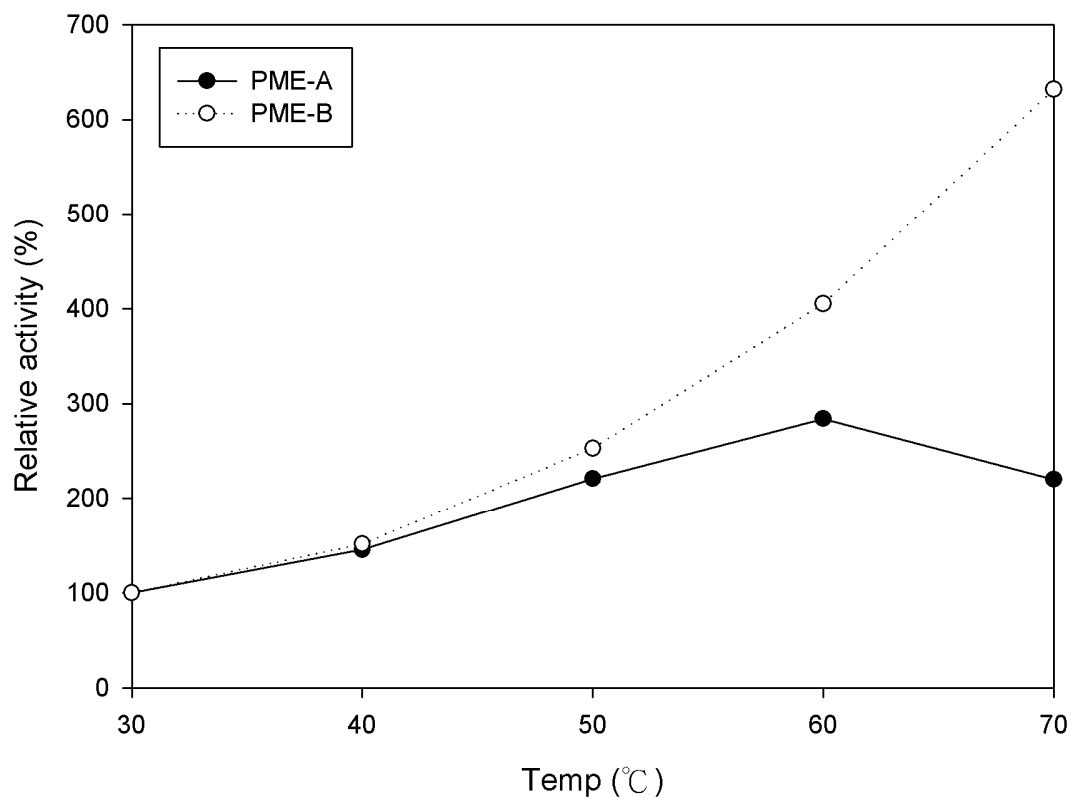
(一) 反應溫度對酵素活性之影響

本實驗以循環水浴控溫，將果膠酵素分別於不同溫度條件下進行滴定測試，以了解反應溫度對其活性之影響，結果如圖十九 (附錄十四) 所示。隨著溫度的增加，PME 活性逐漸提升。而實驗過程中亦可觀察到，當溫度提高時果膠基質的黏稠度也隨之降低，有助於酵素於基質中分散混合，進而提高其活性。PME-A 在 60°C 時有最佳活性，活性較 30°C 時提升至 284.25%；繼續提升溫度，蛋白質可能產生變性，當變性對酵素構型的影響大於溫度提升對反應活性的助益時，酵素活性表現開始下降，於 70°C 時，PME-A 的活性開始下降，而呈現與 50°C 時相同水準之活性。PME-B 於 60°C 時活性甚佳而沒有衰退之趨勢，當 70°C 時仍表現持續上揚的活性，相較於 30°C 時活性提升達 631.69%。欲繼續提高溫度量測酵素活性，則超過 pH 電極的溫度耐

表十四、諾麗果 PME 之純化總表

Table 14. Purification of PME form noni.

Step	Volume (mL)	Total protein (mg)	Total activity (Unit)	Specific activity (U/mg)	Purification fold	Recovery (%)
Crude Extract	1000.0	494.00	265.25	0.54	1.00	100.00
35~75% (NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation	70.0	268.10	198.97	0.74	1.38	75.01
Concentration (MWCO: 10 kDa)	30.0	246.03	168.48	0.68	1.28	63.52
DEAE column PME-A	14.0	25.24	22.43	0.89	1.65	8.46
DEAE column PME-B	12.0	2.36	18.49	7.82	14.57	6.97



圖十九、反應溫度對諾麗果PME活性的影響

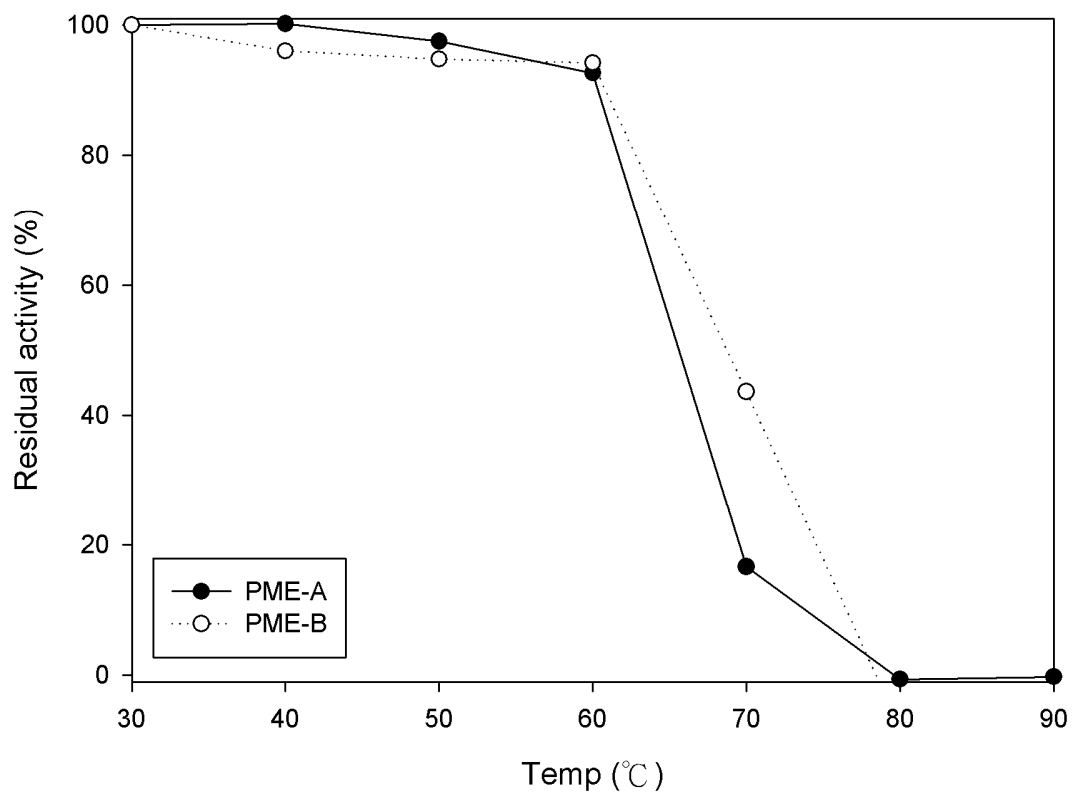
Figure 19. Effect of temperature on activity of PME from noni.

受極限，讀數浮動無法偵測，故 PME-B 最佳活性溫度大於 70°C。

研究指出，柑橘 (Korner *et al.*, 1980)、木瓜 (Lourenco & Catutani, 1984; Fayyaz *et al.*, 1995)、蘋果 (Lee & Wiley 1970b; King, 1990)、桃子 (Javeri & Wicker, 1991)、香蕉 (Ly-Nguyen *et al.*, 2002b) 等一般水果的 PME 最佳活性介於 50~70°C，諾麗果 PME 也有相似表現；但是 Lim 和 Chung (1989) 的研究指出，亦有熱敏感性的 PME，其實驗中發現木瓜的最佳活性溫度只有 35°C。對照上文結果顯示諾麗果 PME 為非熱敏感性之酵素，在 70°C 的環境亦具有良好的酵素活性。

(二) 溫度耐受性之影響

接著測試其溫度耐受性，將果膠酵素先行以不同溫度之水浴處理加熱 5 min，隨後立即移至冰浴中止加熱反應，並於固定 30°C 下測試活性，以未加熱組別做對照，結果如圖二十 (附錄十五) 所示。在 60°C 前，PME-A 和 PME-B 對溫度皆沒有明顯的影響，在加熱 5 min 後均殘存 90% 以上的活性。而經 70°C 加熱 5 min 後，PME-A 的活性有顯著的下降而僅存 16.64%，經 80°C 加熱 5 min 後則完全失活；相較於 PME-A，PME-B 具有較高之溫度耐受性，經 70°C 加熱 5 min 後尚殘存 43.63% 的活性，然而在 80°C 下加熱 5 min 亦完全失活。於實驗過程中可觀察到，經 70°C 加熱 5 min 後的組別，樣品已產生色澤加



圖二十、諾麗果PME之溫度耐受性

Figure 20. Thermal stability of PME from noni.

深且呈些許渾濁的狀態；以 80°C 加熱 5 min 後，樣品產生明顯的深色沉澱，從外觀上就可以感受到樣品性質已受到改變。顯示諾麗果的 PME 在 80°C 的環境下滯留 5 min，蛋白質會受高溫作用而完全變性，使酵素功能喪失。

文獻指出，蘿蔔類的蔬果在 30~50°C 下加熱 5 min 呈現穩定，之後活性開始減損，而在 70°C 加熱 5 min 下完全失活 (Alonso *et al.*, 2003; Unal & Bellur, 2009)；梅子在低於 50°C 下的溫度處理 5 min，尚殘 90% 以上的活性，超過該溫度則活性直線下降 (Nunes *et al.*, 2006)；木瓜在 65°C 下加熱 5 min 則損失半數活性，僅需 80°C 加熱 1 min 便完全失活 (Lourenco & Catutani, 1984)；桃子經 55°C 加熱 5 min 僅減少 2% 的活性，而經 65°C 加熱 5 min 活性劇烈減損，在 75°C 加熱 5 min 則完全失活；香蕉以 70°C 處理 5 min 損失大半活性，而以 75°C 處理則使超過 90% 的活性流失。此實驗結果證明，諾麗果 PME 在溫度耐受性方面，與大部份的水果表現相似，甚至還勝於部分對溫度較敏感的水果。

綜合上述實驗結果，諾麗果 PME 不是一個熱敏感的酵素，其酵素活性隨著溫度提高而有所提升，且對於 60°C 的短時間處理具有良好的穩定性，此活性可運用於諾麗果汁發酵的製程，提高發酵溫度可望提升酵素活性表現，進而促進產率提升與功能性成分釋放，增進產品品質。

Part 2: 控溫發酵之應用

由上述諾麗果膠酵素的純化與溫度因子的測試結果，我們可得知諾麗果 PME 的活性隨溫度提高而提升，且在 60°C 以下時具穩定性，然而長時間的提高溫度是否仍有良好效力，需加以驗證。

基於上述酵素實驗結果，設計以下諾麗果控溫發酵實驗。將成熟的諾麗果切塊分堆後，平均放入 PS 材質的密封罐，以恆溫培養箱控溫，分別於 25、35、45、55°C 進行發酵，整體作業時間為期一月並每週採樣，每個測試組為三重複的平行試驗，加上未發酵的起始點(控制組)，共有 51 個獨立發酵樣品。每罐在發酵完成後，分別進行基本特性與化學成分的測定，以了解諾麗果汁在控溫發酵過程的變化。

一、基本性質測試

(一) 果汁產率

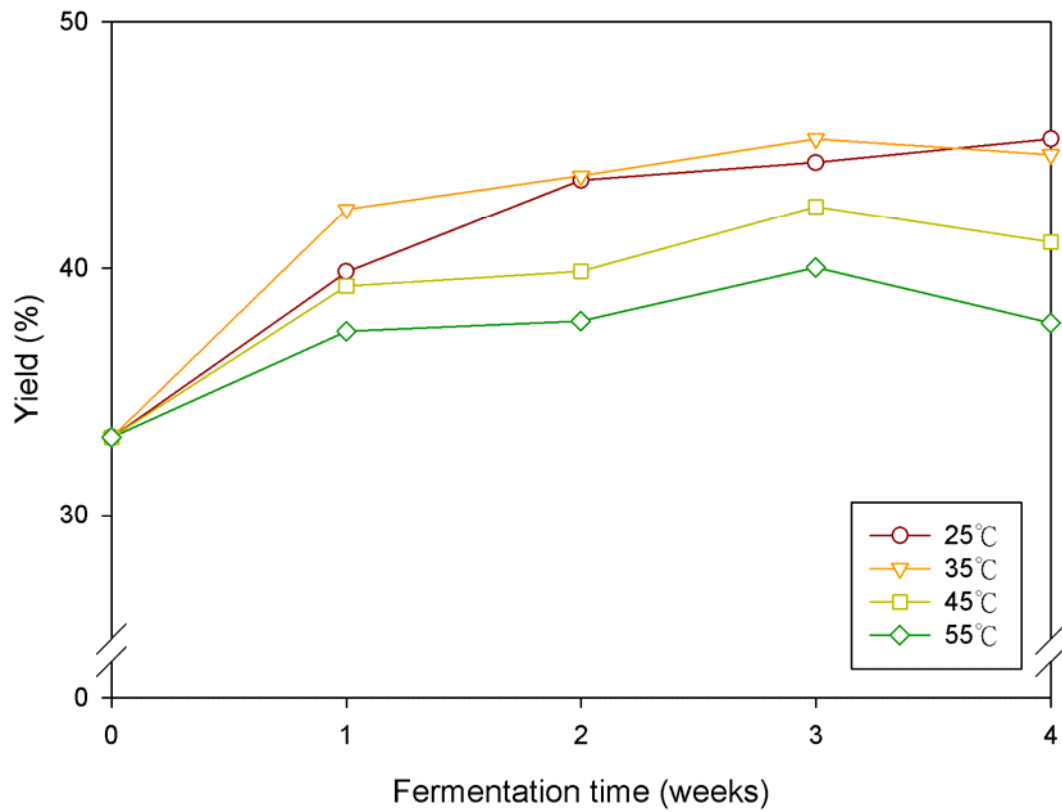
諾麗果在尚未完全成熟時便摘取下來，此時果實質地堅硬，可保護於運送過程中不會遭受傷害，待到達加工場所時予以清潔並風乾，並於室溫下自然熟成，成熟後呈半透明柔軟狀，可輕易用刀具切開，但尚能維持果實形體。裝罐發酵後，隨著發酵時間的進行，果膠酵素作用，果膠逐漸被分解而釋出汁液。

大約在發酵一週後，外觀上可明顯觀察到果汁自果泥滲出，果泥

在底部沉積，汁液於頂部聚集形成小水灘。發酵首週各組的果汁產率均有提升（圖二十一、附錄十六），產率從未發酵時的 33.17% 提升至 40% 左右。35°C 的組別在發酵首週便達到 42.38% 的產率，25°C 的組別需至第二週才能達到相同水準的產率。整體來說，25 和 35°C 的組別隨發酵時間的增加，果汁產率逐漸提升，而在第二週後達到穩定，之後的發酵雖然有些微增加產率，但在統計學上沒有顯著差異；略微提升溫度可促進果膠酵素的作用，使 35°C 的組別提早達到穩定的產率階段。

然而溫度過高可能對果膠酵素造成傷害而抑制活性，或使水分蒸散加劇，因而降低產率。45 和 55°C 的組別普遍呈現產率不佳的情形，雖然產率仍較未發酵時提升許多，但始終低於 25 和 35°C 的組別。而在發酵完成開罐離心時，也可發現高溫發酵組別的果泥呈現乾澀，仍有部份果肉維持塊狀，顯示果膠酵素的作用可能不佳。雖然在先前的溫度因子測試時，諾麗果 PME 短時間於 60°C 下維持穩定，但可能長期高溫仍不利於酵素的活性。

經過一個月的發酵，常溫發酵的組別產率達到 45.25%，低於文獻記載的 57.8% (Newton, 2003)，可能與產品製程及果實品種有關。本實驗發酵完成後僅以離心處理而未經壓榨，若再加上壓榨的步驟，應能些許提高產率。而本土品種的諾麗果較大溪地品種果實小而籽



圖二十一、諾麗果汁於發酵期間的總產率變化

Figure 21. Change of total yield in noni juice during fermentation.

多，原料的差異也會影響到產率。

(二) pH 值分析

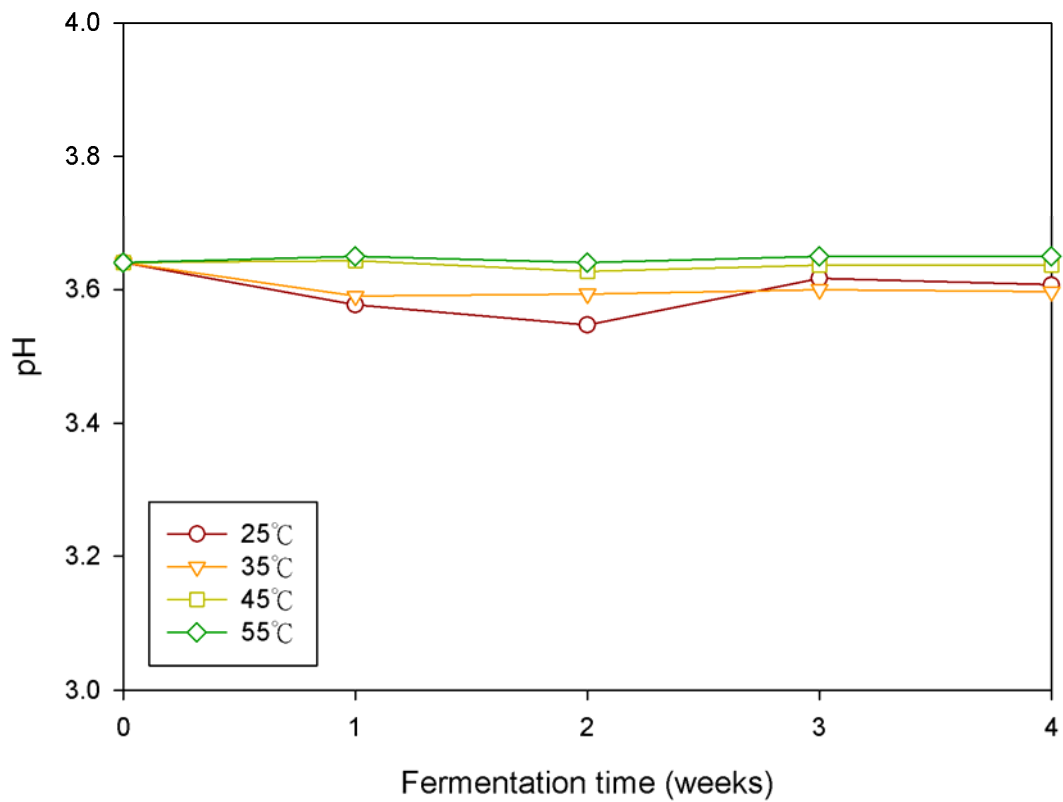
諾麗果於發酵過程中的 pH 值都維持在 pH 3.6 左右 (圖二十二、附錄十七)。參考其他文獻，一般諾麗果汁的 pH 值介於 3.4 到 3.9 左右 (Chunhieng, 2003; European Commission, 2002; Newton, 2003; 陳, 2007b; 羅, 2008; 王, 2008)，為酸性果汁。

相較於 45 和 55°C 組別，25 和 35°C 組別的 pH 值呈現較不穩定的狀態，於發酵過程中有略為下降的情形，可能是微生物及果膠酵素在室溫條件下作用的結果，而高溫發酵的組別因微生物無法生長，故呈現較穩定的 pH 值。張 (2007) 推測諾麗果於發酵其間的 pH 值變化，可能與微生物生長代謝產生酸性物質有關。

本實驗對所有組別的諾麗果汁做生菌數測試，25 和 35°C 的組別均有微生物生長的反應，25°C 的菌數較 35°C 多，與 pH 值下降的趨勢符合，再經菌種鑑定，發酵諾麗果汁中的微生物以醋酸菌為大宗。45 和 55°C 的組別可能因環境溫度高而一般微生物不易生長，故該果汁於實驗中未測得生菌含量 (張, 2010)。

(三) 可溶性固形物含量

本實驗以糖度來表示可溶性固形物的變化，結果顯示經首週發酵



圖二十二、諾麗果汁於發酵期間的pH值變化

Figure 22. Change of pH value in noni juice during fermentation.

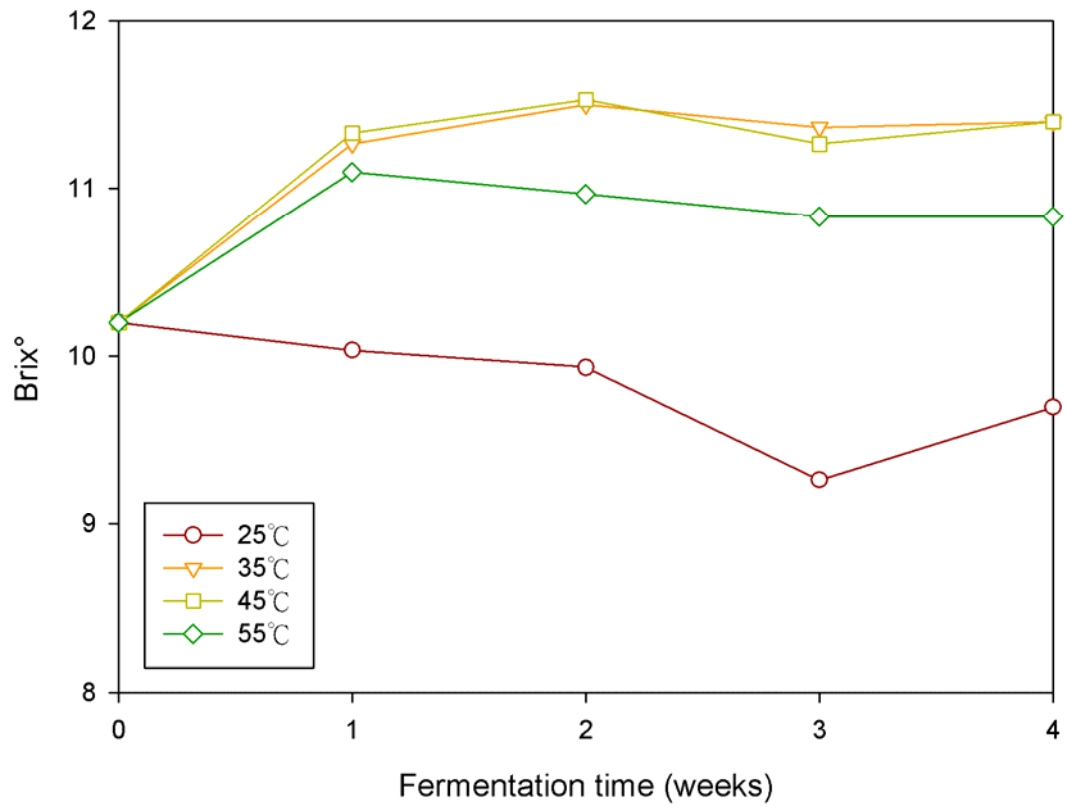
後，除 25°C 的組別外，各組可溶性物形物均有顯著的增加（圖二十三、附錄十八），而在第二週後達到穩定，此結果與產率表現有相同趨勢。果實中的果膠質經酵素作用後，分解為可溶性的半乳糖醛酸，因而增加可溶性固形物，而與產率互相呼應。然而較高溫的組別，因果膠酵素活性受到抑制，因此產生的半乳糖醛酸亦少，糖度增加的幅度受限，此現象高溫的組別（55°C）表現更為明顯。

而 25°C 的組別，可能因微生物生長旺盛的緣故，果汁內的醣類被生長利用，因此使可溶性固形物的表現量降低。諾麗果於發酵過程中的可溶性固形物變化，可能與其中的微生物菌相變化有關，亦有其他文獻表示相同看法（羅，2009）。

（四）乳酸與醋酸之測定

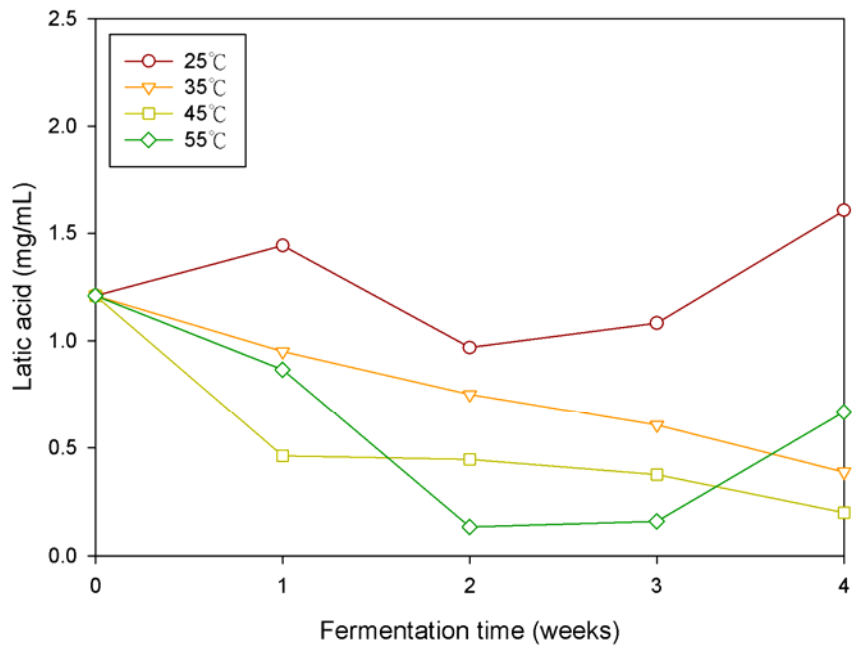
由於低溫發酵的組別具有微生物反應，pH 值較不穩定且總固形物減少，故對發酵諾麗果汁的乳酸與醋酸含量進行檢測，以更進一步了解其中基本性質的變化。

結果顯示，低溫發酵的組別似乎有較多乳酸的趨勢，但於發酵過程中，果汁的乳酸含量並不會有顯著的變化，其乳酸含量介於 1 mg/mL 左右（圖二十四、附錄十九），表示在本次發酵實驗中，乳酸菌所參與的反應可能有限，諾麗果汁本身即具有些許乳酸，不會隨著菌數的增長而產生乳酸。



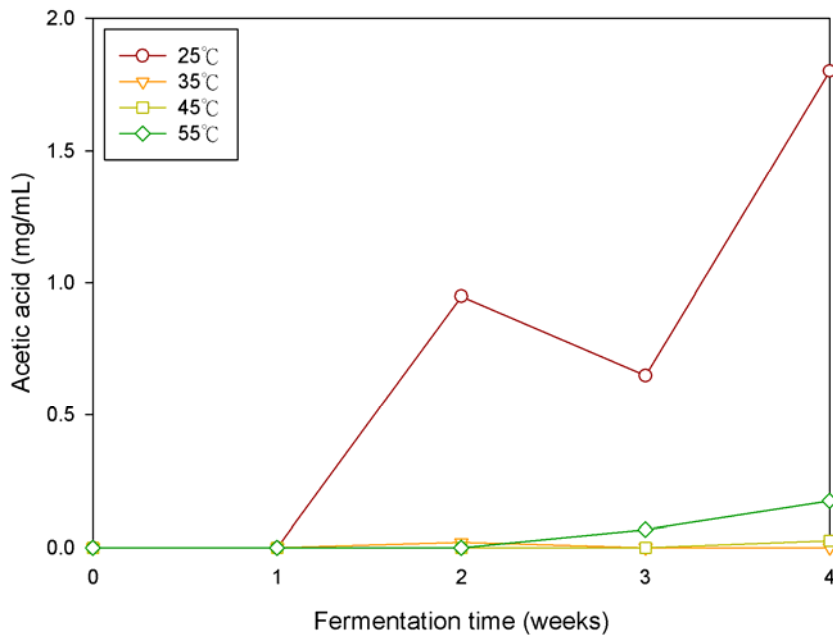
圖二十三、諾麗果汁於發酵期間的可溶性固形物變化

Figure 23. Change of soluble solid in terms of Brix in noni juice during fermentation.



圖二十四、諾麗果汁於發酵期間的乳酸變化

Figure 24. Change of lactic acid content in noni juice during fermentation.



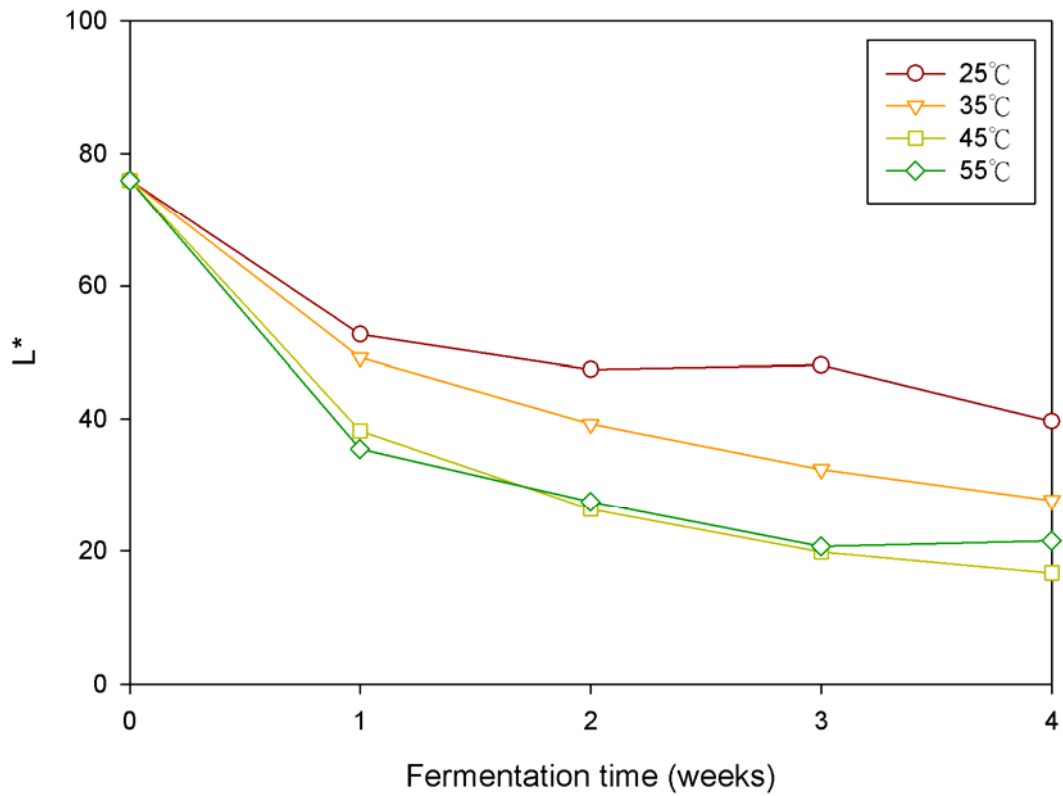
圖二十五、諾麗果汁於發酵期間的醋酸變化

Figure 25. Change of acetic acid content in noni juice during fermentation.

而醋酸含量檢測中則發現，未發酵和發酵第一週的諾麗果汁中無醋酸反應，至第二週起各組均開始檢測到醋酸產生（圖二十五、附錄二十），其中部分組別雖有測得醋酸反應，但代入檢量線後為負值，表示極其微量而無法量化，故以“微量”表示之。室溫發酵組（25°C）的醋酸含量於第二週開始提升而有顯著差異，顯示醋酸含量隨發酵時間增加而提升。室溫發酵組可測得微生物生長，經菌種鑑定後以醋酸菌為優勢菌種，經有機酸檢測亦得知醋酸於發酵過程中有增加的現象，此二種結果可相互應證，室溫發酵組確實有醋酸菌生長，且可能因此影響果汁品質。施（2009）對諾麗果自然發酵過程進行研究，也得到類似結果，諾麗果於室溫狀態下發酵，會有醋酸菌的生長而產生高於乳酸含量的豐富醋酸，進而影響諾麗果汁的品質與風味。

（五）色澤分析

未經發酵的諾麗果汁呈現金黃色而近似於茶飲的色澤，隨著發酵的進行色素逐漸生成，褐變反應則使色澤加深，其亮度變化如圖二十六（附錄二十一）所示。L*值為亮度表現，值越高表示色澤越淡。隨著發酵時間的增加，諾麗果汁的色澤也越趨深色，越高溫的組別，其褐變現象更為激烈，而使亮度減低加劇。45 和 55°C 的高溫發酵組別，其 L*值表現相當而沒有顯著差別；直至第四週時，55°C 組因強烈反



圖二十六、諾麗果汁於發酵期間的亮度 (L*值) 變化

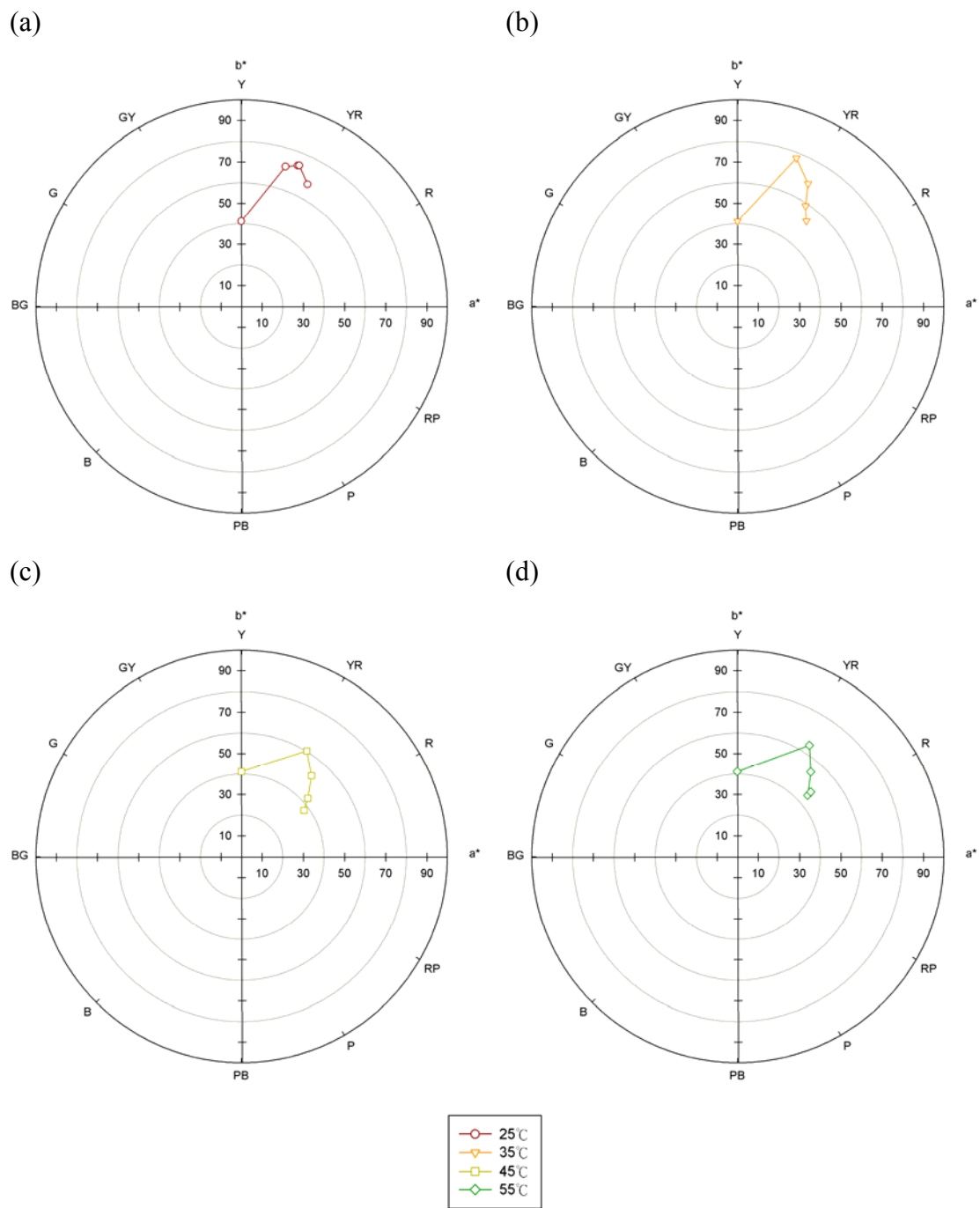
Figure 26. Change of L* value in noni juice during fermentation.

應造成褐變產物聚集，產生大量的深色懸浮，而在離心過程中被去除，因此 L^* 值測試結果略為提高，但在視覺外觀上兩組並沒有明顯差異。

經過一週的發酵，諾麗果汁的色澤從原本的金黃色轉變為紅褐色，其色澤變化如圖二十七所示。

a^* 值越大表示越偏紅色 (附錄二十二)，室溫發酵 (25°C) 的組別，紅色素生成量較少，因此第一週的 a^* 值明顯較他組少，隨著溫度提升，色素生成量也隨之增加；第二週後，除室溫發酵組外，各組的 a^* 值均達到穩定階段而沒有繼續增加。一般認為葡萄酒的紅色色澤與單寧類化合物有關 (Recamales *et al.*, 2006)；然而有學者作進一步的研究指出，紅酒的紅色色澤與單寧類的關聯有限，而與花青素有較密切的關聯 (Cliff *et al.*, 2007; Versari *et al.*, 2008)。諾麗果經發酵後，縮合單寧之含量雖有增加，但與 a^* 值的變化無明顯關聯。

b^* 值越大表示越偏黃色 (附錄二十三)，發酵首週所有組別的 b^* 值都有提升的情形，然而隨著發酵的進行， b^* 值逐漸減少，尤其是高溫發酵的組別 (45 和 55°C) 更為明顯，在第二週後的 b^* 更減損至低於發酵前的數值 ($b^* < 41$)。類黃酮是種普遍存在於植物蔬果中的黃色素 (Tripoli *et al.*, 2007)，諾麗果汁的 b^* 值與類黃酮含量具相同趨勢的表現，高溫的組別在發酵過程中，所測得之 b^* 值較低且下降迅速，



圖二十七、諾麗果汁於發酵期間的顏色變化

(a) 25°C; (b) 35°C; (c) 45°C; (d) 55°C。

Figure 27. Change of color in noni juice during fermentation.

(a) 25°C; (b) 35°C; (c) 45°C; (d) 55°C.

而類黃酮的含量也有同樣快速減少的情形。

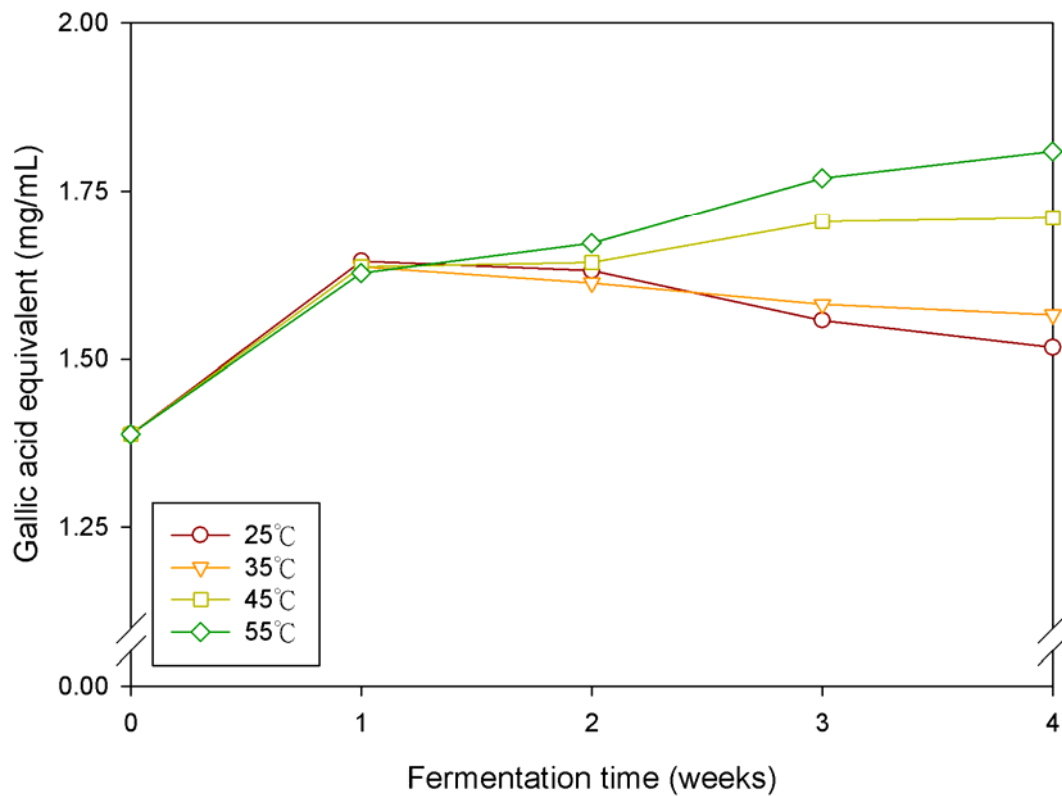
整體色澤變化可分為低溫發酵組 (25 和 35°C) 與高溫發酵組 (45 和 55°C) 兩種趨勢。在低溫發酵組中，較高的發酵溫度有較好的色素產生情形，使色彩數值提升。高溫發酵組則可能由於溫度過高，反而使色素被破壞，促使色彩數值迅速降低，而其中兩組具類似表現而較沒有顯著差異。無論是哪個發酵溫度，其最終色澤都具有相同的軌跡傾向，表示提高發酵溫度可能加速色素的釋放與破壞，但最後都會形成相同的結果。

二、功能性成分測試

(一) 總酚化合物

諾麗果經首週發酵後，果膠酵素作用使功能成分自植物組織中釋放出來，各組的總酚含量都有明顯提高的情形 (圖二十八、附錄二十四)，從未發酵時的 1.39 mg/mL gallic acid equivalent 增加至 1.64 mg/mL gallic acid equivalent 的平均水準。第二週發酵，各組總酚含量略有變化，但沒有顯著差異；第三、四週後低溫發酵的組別 (25、35°C) 總酚含量呈現下降的趨勢，但高溫發酵的組別 (45、55°C) 總酚含量則繼續提升，55°C 於第四週發酵時，總酚含量達 1.81 mg/mL gallic acid equivalent，較未發酵前提高了 30%。

造成此差異的原因，可能是本次發酵的過程中，諾麗果於容器只



圖二十八、諾麗果汁於發酵期間的總酚化合物變化

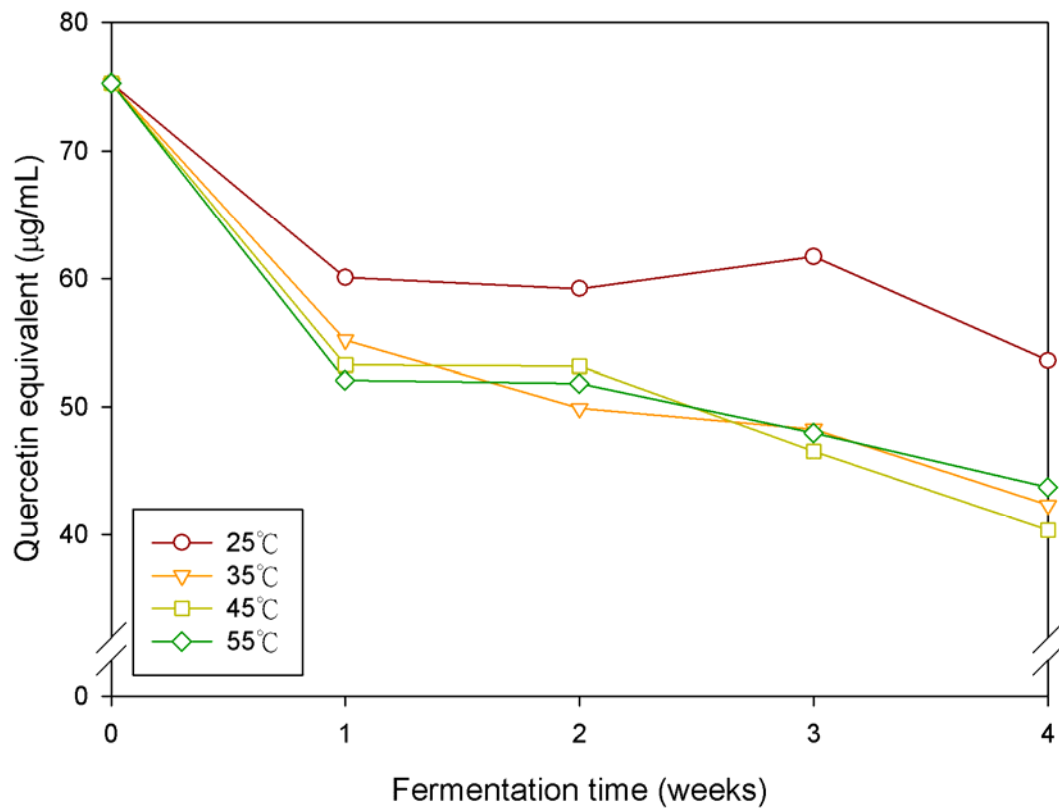
Figure 28. Change of total phenol content in terms of gallic acid equivalent in noni juice during fermentation.

佔有 1/2 的體積，雖然上部空間已加入脫氧包，但可能脫氧包效率不彰或容器密合度不足，造成低溫發酵的組別於後期有氧化現象產生，使部分酚類物質降解或聚集形成其他物質，使總酚含量略為下降。楊 (2005)、王 (2008)、羅 (2008) 於室溫發酵諾麗果汁時，也測得類似結果，此結果證明短時間發酵對果汁中酚類物質沒有明顯的影響，然而長時間發酵則可能造成酚類含量些微下降。

高溫發酵時，可能水分蒸發使體積減少，除了造成產率下降外，也產生了些許濃縮作用。單位體積的果汁濃度提高，間接增加總酚的測得量，此可能是高溫組別在發酵後期總酚表現較佳的原因。

(二) 類黃酮

隨著發酵的進行，諾麗果汁中的類黃酮含量逐漸減少 (圖二十九、附錄二十五)。從未發酵前的 75.27 mg/mL quercetin equivalent 開始降低，室溫發酵組 (25°C) 類黃酮減損的情形較為輕微，前三週尚維持在 60 mg/mL quercetin equivalent 左右，直至第四週才減損至 53.59 mg/mL quercetin equivalent。楊 (2005)、王 (2008)、羅 (2008) 於室溫發酵諾麗果汁時，也觀察到相似變化。其餘三組控溫組 (35、45、55°C) 在第二週便已降至 53 mg/mL quercetin equivalent 左右，經過四週的發酵後僅存約 40 mg/mL quercetin equivalent，顯示諾麗果中的類黃酮化合物極易受到環境因子影響而於發酵過程中逐漸減少，尤其是



圖二十九、諾麗果汁於發酵期間的類黃酮變化

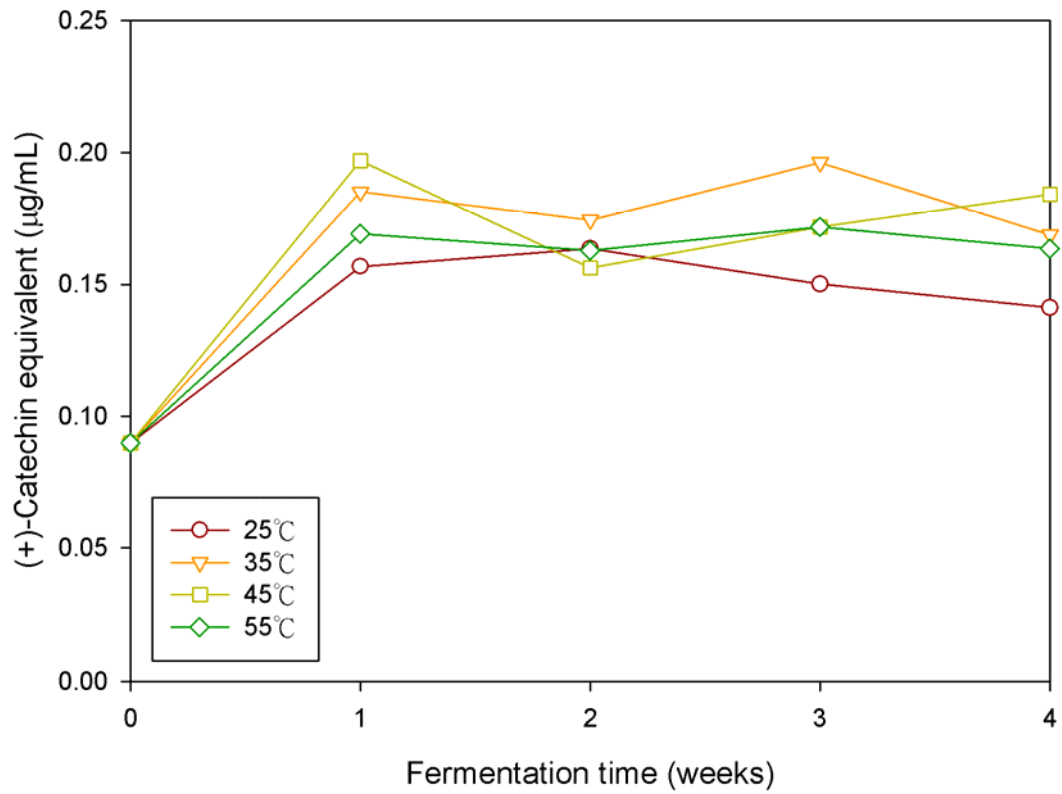
Figure 29. Change of flavonoids content in terms of quercetin equivalent in noni juice during fermentation.

高溫的環境更容易使其劣解。類黃酮減少的情形亦反映諾麗果汁顏色的表現，與前述色澤分析實驗對照，其 b^* 值表現與類黃酮含量具相同趨勢，兩者隨發酵時間逐漸減少，且高溫組更有明顯的降低表現。

(三) 縮合單寧

諾麗果經發酵後，縮合單寧含量與未發酵之控制組相比，各溫度組別均有顯著的增加，但不同溫度與發酵時間對其含量的影響，則呈現較無趨勢的狀態；而在第一週後，縮合單寧表現趨於平穩而無顯著變化，實驗結果如圖三十（附錄二十六）。

縮合單寧的結構複雜而不易被研究，香草醛法是種廣泛應用於定量水果中縮合單寧的方法。本實驗以兒茶素（黃烷-3-醇單體）作為標準品，但若樣品中含有其他酚類物質，可能會因吸光值與香草醛產物重疊而使實驗產生誤差（Broadhurst & Jones, 1978）；香草醛與任何可替代的類黃酮單體均會生成反應產物，因而影響實驗的結果（Hagerman, 1998）。Waterman 和 Mole (1994) 指出每上升 1.4°C ，會使香草醛反應的吸光值上升 11%，而 Sun 等人 (1998) 則建議在 $25\sim 30^{\circ}\text{C}$ 時進行反應，可獲得最大吸光值。本實驗進行的時間適逢初春溫度變化較大的時節，可能略有變化的室溫會影響每週測定的結果。除了上述影響因子外，人為的操作誤差也可能造成縮合單寧含量測試的些微偏差，使其縮合單寧的變化不易觀察。



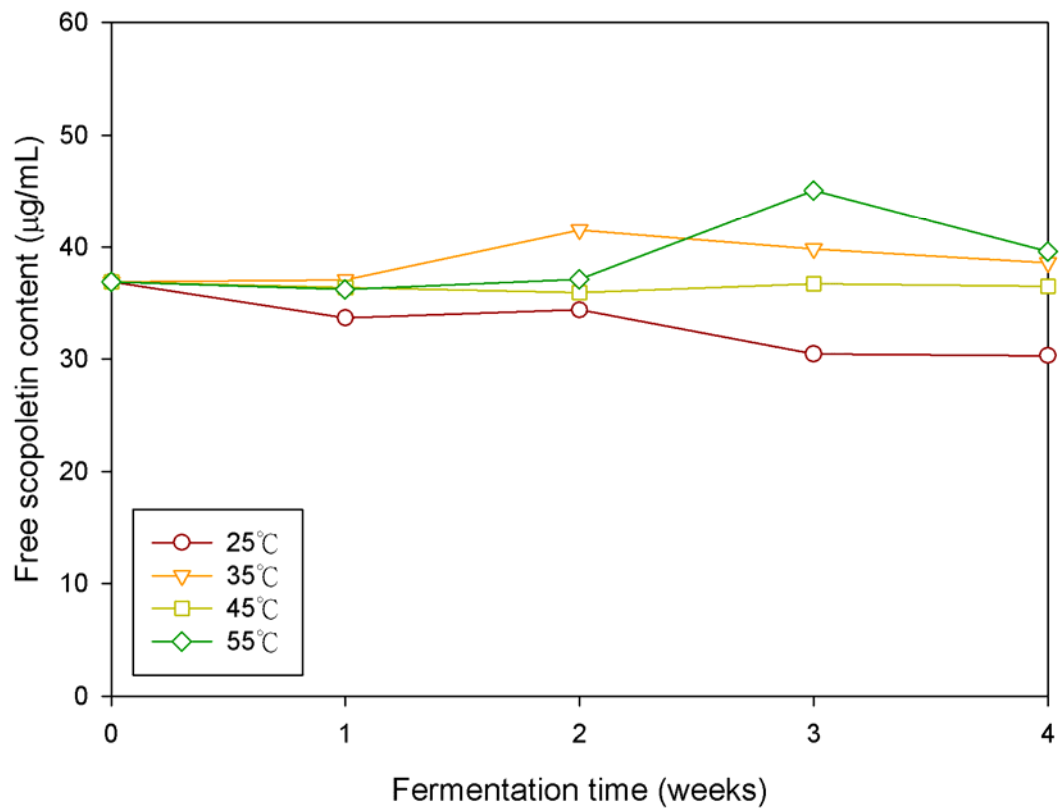
圖三十、諾麗果汁於發酵期間的縮合單寧變化

Figure 30. Change of condensed tannin content in terms of (+)-catechin equivalent in noni juice during fermentation.

(四) 東莨菪素

東莨菪素測定結果如圖三十一 (附錄二十七) 所示。相較於其他組別，東莨菪素在室溫發酵組 (25°C) 有略為下降的情形，整體而言於發酵過程中沒有顯著的變化。Chan-Blanco 等(2007)、羅 (2008)、楊 (2005) 在諾麗果發酵實驗中也發現相同的現象，短期發酵對果汁中東莨菪素含量不會有明顯影響，然而長期發酵則會有略為下降的趨勢。Yang 等人 (2007b) 推測其下降的原因可能是東莨菪素受到酸性環境的作用而逐漸水解；於本次實驗中，室溫發酵組 (25°C) 之 pH 值有較其他組別略低的情形，或許這是影響東莨菪素含量的因素之一。

本實驗未發酵果汁中東莨菪素含量為 36.86 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，於發酵過程中最高增長至 48.51 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，整體維持在 30~40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 左右。和其他文獻相比，約為 Blanco 等人 (2007) 所得結果的 2 倍，但僅有楊 (2005) 所得結果之 1/6，而與羅 (2008) 之結果相似。東莨菪素為一種用以抵禦黴菌感染的植物殺菌素，其產生與植物品種和生長環境有關 (Farine *et al.*, 1996)，上述文獻的含量差異可能與此有關，而本實驗相對較低的東莨菪素含量也可能使其抑菌效果較差，使室溫發酵組果汁測得較多之總生菌數 (張，2010)。



圖三十一、諾麗果汁於發酵期間的東莨菪素變化

Figure 31. Change of scopoletin content in noni juice during fermentation.

(五) 芸香素

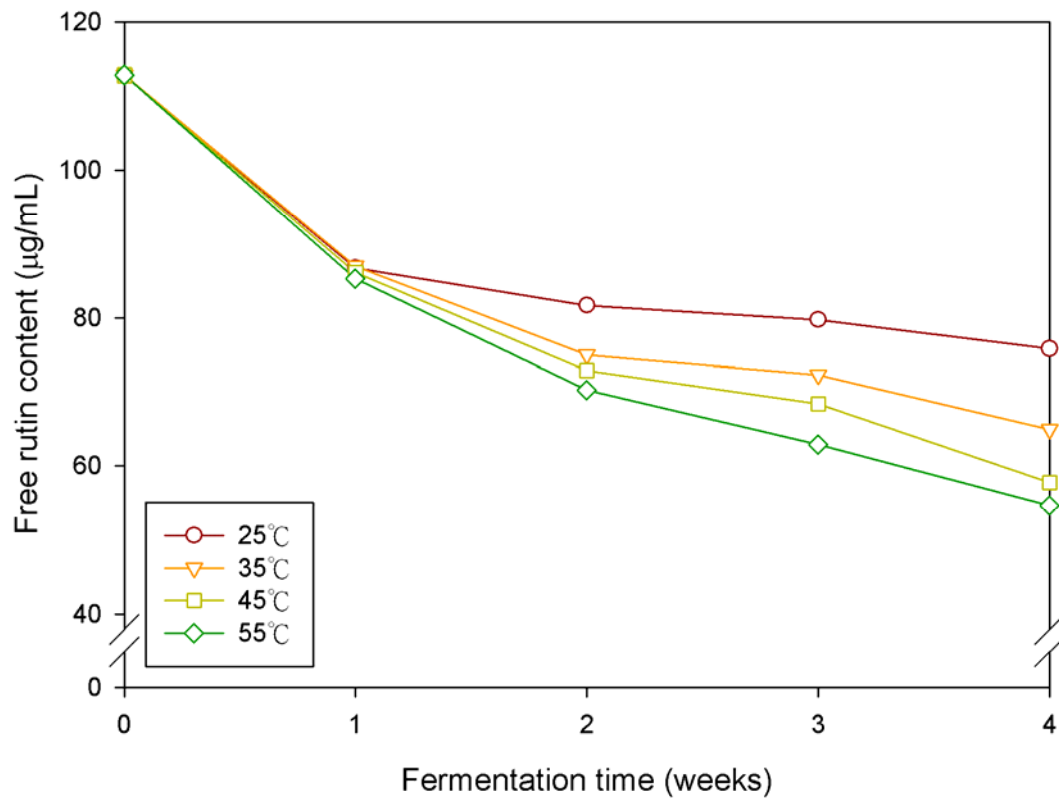
接著芸香素進行測試，其結果如圖三十二 (附錄二十八) 所示。在未發酵前仍具有高含量的芸香素而達 112.84 $\mu\text{g/mL}$ ，隨著發酵的進行而逐漸損失其含量，在發酵第一週時降至約 86 $\mu\text{g/mL}$ 的含量，此時各發酵組別間沒有顯著差異，直至第二週時控溫組 (35、45、55 $^{\circ}\text{C}$) 開始有較為顯著的芸香素減損，越高溫的組別減損越劇。整體來說，室溫組在為期四週的發酵過程中，其芸香素含量沒有大幅度的變化，然而高溫對芸香素的穩定度影響甚鉅，在經過一個月的 55 $^{\circ}\text{C}$ 發酵後，芸香素含量僅剩 54.66 $\mu\text{g/mL}$ ，為發酵前含量的 1/2。

芸香素是由槲皮酮與芸香二糖 (disaccharide rutinose) 所組成的類黃酮配糖體 (Blanco *et al.*, 2007)，在發酵的過程中可能受到光、熱、氧的破壞而水解。另有文獻指出，微生物來源的果膠酵素可以水解芸香素而提高槲皮酮表現量 (Sun *et al.*, 2007)。於本實驗中，略為提高發酵溫度可提升諾麗果中果膠酵素活性，或許會因此增加水解芸香素的能力而降低其含量，然而在槲皮酮的測定中，並沒有相應的增加產生，故此種說法尚待驗證。

三、生理活性測試

(一) 抗氧化能力

1. DPPH 自由基掃除能力



圖三十二、諾麗果汁於發酵期間的芸香素變化

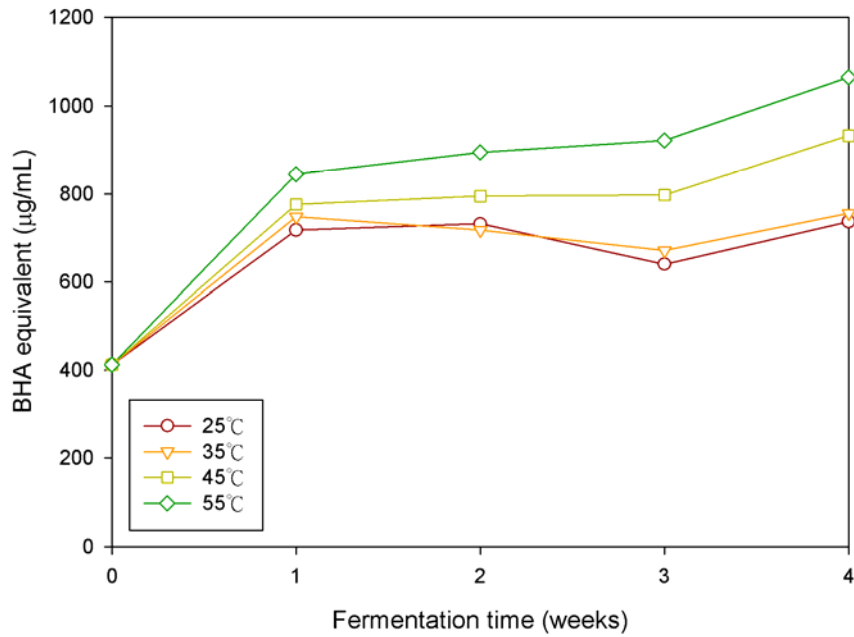
Figure 32. Change of rutin content in noni juice during fermentation.

諾麗果本身即具有良好的抗氧化能力，經發酵後其抗氧化效果更為提高，結果如圖三十三（附錄二十九）所示，抗氧化活性以 $\mu\text{g BHA equivalent/mL}$ 表示之。經過一週發酵後，果膠酵素作用，抗氧化物質自植物組織中被釋放出來，與未發酵的控制組 ($412.1 \mu\text{g BHA equivalent/mL}$) 相比，各組抗氧化效果皆有提高，而越高溫的組別其抗氧化效果越佳。

25 和 35°C 的低溫發酵組別在四週發酵過程中，抗氧化效果沒有明顯變化，甚至有略微降低的情形，整體而言維持在 $735 \mu\text{g BHA equivalent/mL}$ 左右。Yang 等人 (2007b) 在室溫下發酵諾麗果十二週，結果指出諾麗果的 DPPH 自由基掃除能力在整體發酵階段中並沒有顯著差異。諾麗果在室溫發酵時抗氧化物質釋放有限，可能會與罐內空氣反應而喪失其效果。

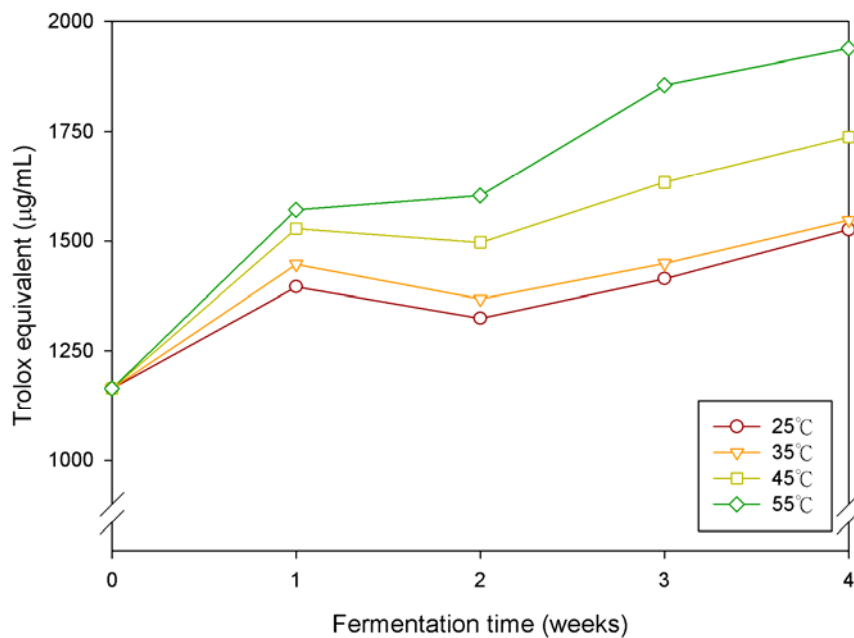
而越高溫的組別其抗氧化效果較佳，45 和 55°C 的組別呈現抗氧化活性提升的情形，且越高溫的組別其活性提升越多。55°C 發酵組在第二週時便具有 $894.59 \mu\text{g BHA equivalent/mL}$ 的抗氧化能力，而與 45°C 發酵組的第四週的抗氧化活性 ($932.73 \mu\text{g BHA equivalent/mL}$) 相當。顯示提高發酵溫度可提升諾麗果汁中抗氧化物質的含量，而縮短發酵所需的時程。

酚類是植物蔬果中主要的抗氧化來源之一，諾麗果的 DPPH 自由



圖三十三、諾麗果汁於發酵期間的DPPH自由基清除能力變化

Figure 33. Change of DPPH scavenging activities in terms of BHA equivalent in noni juice during fermentation.



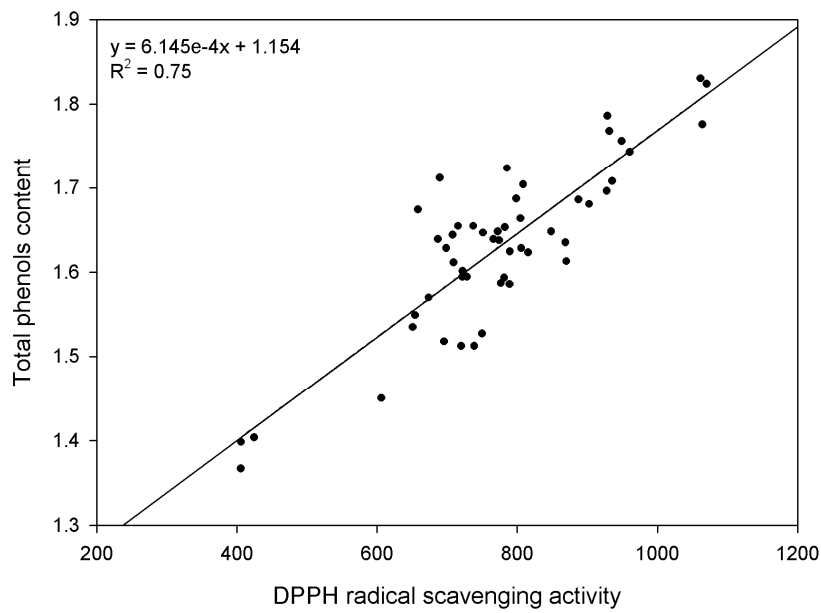
圖三十四、諾麗果汁於發酵期間的ABTS·⁺自由基清除能力變化

Figure 34. Change of ABTS·⁺ scavenging activities in terms of Trolox equivalent in noni juice during fermentation.

基掃除能力與總酚含量，會受到發酵時間與發酵溫度的影響而有所變化。經迴歸計算，其相關係數為 $R^2 = 0.75$ (圖三十五)。Yang 等人 (2007a) 的實驗結果指出，諾麗果經熱處理後，其總酚含量與 DPPH 掃除能力的相關係數為 $R^2 = 0.41$ 。顯示諾麗果的抗氧化活性與總酚含量具一定的關聯性。

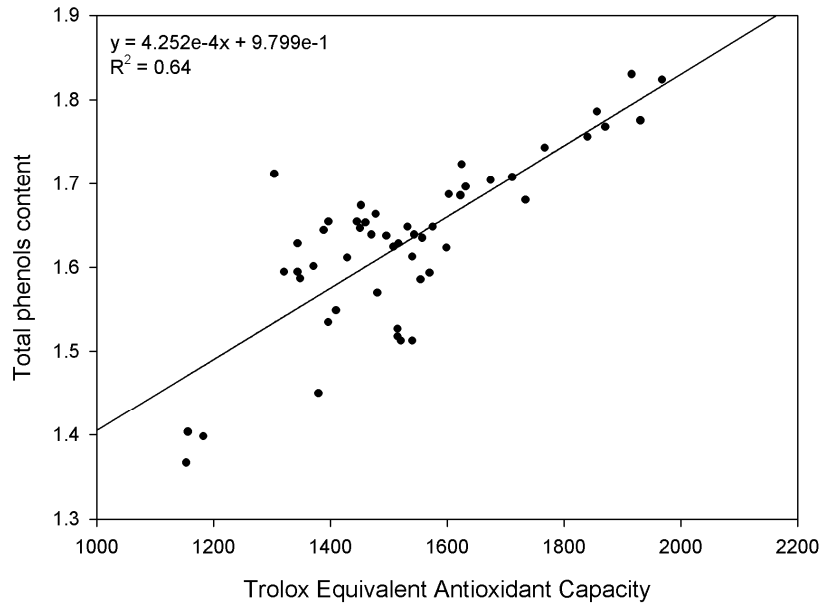
2. TEAC 總抗氧化能力

文獻指出 (Lee *et al.*, 2003)，以 TEAC 法評估食品的總抗氧化能力較 DPPH 法佳，故於本實驗採用之。以 TEAC 法評估諾麗果的抗氧化性，其表現趨勢與 DPPH 法相當，實驗結果如圖三十四 (附錄三十) 所示，抗氧化活性以 $\mu\text{g Trolox equivalent/mL}$ 表示。經過一週的發酵後，各組 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 自由基掃除能力有增加的情形。25 和 35°C 的低溫發酵組，Trolox 當量表現類似的趨勢，於整體發酵過程中呈平穩而略為上揚的趨勢。45 和 55°C 的高溫發酵組，其 Trolox 當量則有大幅增長的情形，且隨著發酵溫度的提升有更好的表現。55°C 的發酵組經四週的發酵後，其抗氧化活性從 1164.11 $\mu\text{g Trolox equivalent/mL}$ 提升至 1938.32 $\mu\text{g Trolox equivalent/mL}$ ，較控制組約提昇了 60.06%。再經迴歸計算，TEAC 總抗氧化能力與總酚含量的相關係數為 $R^2 = 0.64$ (圖三十六)，較 DPPH 法的相關係數 ($R^2 = 0.75$) 為低，顯示 DPPH 法與總酚化合物的關聯性較高。



圖三十五、諾麗果汁中DPPH自由基清除能力與總酚類的關係

Figure 35. Correlation between DPPH scavenging activities with total phenols of noni juice during fermentation.



圖三十六、諾麗果汁中 $ABTS^{\cdot+}$ 自由基清除能力與總酚類的關係

Figure 36. Correlation between TEAC with total phenols of noni juice during juice during fermentation.

一般認為食物中的天然抗氧化物會普遍於加工過程中流失，使食品的生理活性與營養價值降低 (Kusznierewicz *et al.*, 2008)；而造成這種現象，主要是由於維生素 C 等熱敏感營養物質於加工過程中減損所產生的 (Dewanto *et al.*, 2002)。然而近年有多篇研究發現，植物經熱處理加工後，其生理活性有不降反升的情形 (Choi *et al.*, 2006; Dewanto *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2000; Kusznierewicz *et al.*, 2008)，與一般大眾認知相違背，經歸納可能的原因有以下幾點。

在植物食品中，酚類化合物是提供抗氧化活性的主要來源 (Velioglu *et al.*, 1998)。高溫處理可使植物細胞壁瓦解，而更容易釋放出酚類物質，因而提高游離酚含量 (Choi *et al.*, 2006)。高溫處理雖然會破壞維生素 C 等熱敏感抗氧化物，造成部份抗氧化活性降低，但若該食品中主要提供抗氧化活性的物質並非熱敏感的維生素 C，而是對熱穩定的酚類物質，那麼熱加工對抗氧化活性造成的破壞便不是那麼顯著。本實驗發酵諾麗果汁的 DPPH 陰離子掃除能力與總酚含量相關係數為 $R^2 = 0.75$ ，表示酚類物質對發酵諾麗果汁的抗氧化活性具重要貢獻，而維生素 C 對其貢獻可能有限，因此高溫不會削弱諾麗發酵果汁的抗氧化活性。

每種酵素都有其最適的作用溫度，當發酵溫度提高時，會促進果膠酵素的活性，然而亦可能會抑制其他酵素的作用。目前已有相關文

獻的研究，熱處理可使內源性氧化酶失活，防止酵素性氧化造成的抗氧化活性損失 (Dewanto *et al.*, 2002; Nicoli *et al.*, 1999)。蔬果殺菁便是一個典型的例子，藉由短時間的加熱以使植物內的氧化酶失活，進而達到提升品質的效果。雖然控溫發酵的溫度並沒有達到蔬果殺菁的高溫，而無法完全使氧化酶失活，但仍有可能會使氧化酶受到抑制，而減緩其抗氧化活性在發酵過程中的減損。

在發酵過程中，除了果膠酶作用、氧化反應、組織分解外，尚有許多化學變化發生，提高發酵溫度可能會產生非酵素性褐變產物，而促進抗氧化活性。Manzocco 等人 (2001) 指出梅納反應產物具有活性氧掃除的能力，而能提高食品的抗氧化活性。諾麗果高溫發酵的組別在亮度表現上有明顯的變化，顯示高溫發酵的組別其褐變反應劇烈，有可能產生其他抗氧化物質而提高其活性表現。

綜合上述觀點，高溫發酵不會破壞諾麗果中主要的抗氧化物質，反而可減少其損失的機會，甚至產生出新的抗氧化物質，而提升整體抗氧化效果。

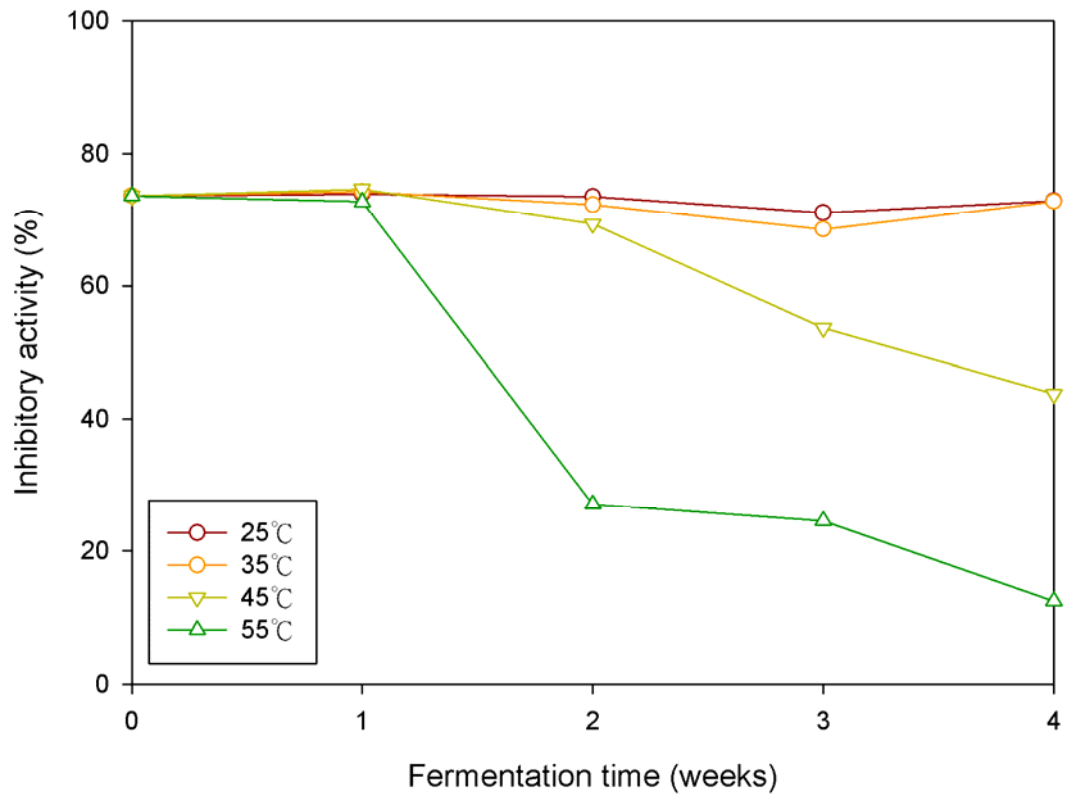
(二) ACE 抑制能力

ACE 藉由生成血管收縮胜肽 (angiotensin II) 和降解血管舒張胜肽 (bradykinin)，來導致血壓上升 (Jamdar *et al.*, 2010)，因此 ACE 抑制劑常被做為對抗高血壓的治療方法。與化學合成的藥物相比，從食

物蛋白質中衍生的水解胜肽為較溫和且安全的 ACE 抑制劑來源 (Hartman & Meisel, 2007)。除水解胜肽外，諾麗果目前亦被證實具有降血壓功能，不僅在動物實驗中展現了降低血壓的效果 (Youngken et al, 1960; Yamaguchi et al, 2002)，在體外實驗中也展現了抑制 ACE 的能力 (楊、2007；王、2008)。

接著觀測諾麗果在發酵過程中 ACE 抑制活性的變化，其結果如圖三十七 (附錄三十一) 所示。低溫發酵的諾麗果 (25、35°C) 於整體發酵過程中沒有顯著變化，楊 (2007) 與王 (2008) 在室溫環境發酵諾麗果，也呈現同樣的情形。然而提升發酵溫度，長期而言可能會對諾麗果汁的 ACE 抑制活性造成破壞。在發酵第一週時，各組稀釋 50 倍的果汁尚有 73% 的 ACE 抑制率；到第二週時，55°C 組的 ACE 抑制率就有明顯的降低，而僅剩 27.12%；到第三週時，45°C 組的 ACE 抑制率緩慢降低至 53.65%；至第四週時，45°C 組的 ACE 抑制率繼續表現降低的趨勢，55°C 組幾乎失去 ACE 抑制活性，而只剩下 12.40% 的抑制活性。長期高溫的環境會對諾麗果汁降血壓效果造成影響，顯示諾麗果的降血壓功能成份是對熱敏感的物質。

一般常見降血壓功能物質為機能胜肽，通常包含 3 至 20 個胺基酸殘基，其生物活性取決於胺基酸組成與序列 (Pihlanto, 2000)。利用其與第一型血管收縮素 (angiotensin I) 的相似性進行競爭性抑制，以



圖三十七、諾麗果汁於發酵期間的ACE抑制活性變化

Figure 37. Change of ACE inhibitory activity in noni juice during fermentation. * The sample diluted for fifty fold.

減少具生理活性的第二型血管收縮素 (angiotensin II) 產生。由於胜肽分子量小且結構簡單，而不易受到溫度影響，多篇研究都認為水解胜肽具高溫穩定性 (Hwang & Meisel, 2010; Wu & Ding, 2002)，以 100 °C 沸煮 2 小時後，其 ACE 抑制能力沒受到絲毫影響。相較之下，諾麗果的 ACE 抑制能力就沒有那麼好的熱穩定性，顯示諾麗果的降血壓機制可能與水解胜肽不同。

Yang 等人 (2007b) 認為諾麗果的降血壓活性與東莨菪素含量呈正相關，然而東莨菪素於本實驗中並沒有明顯的變化情形，長期高溫發酵之組別 ACE 抑制能力有顯著的下降，但東莨菪素仍保持相同含量，顯示東莨菪素於此次實驗可能不是提供諾麗果汁降血壓功能的主要物質。而諾麗果中的類黃酮與縮合單寧化合物，如：牡荊素 (vitexin)、異牡荊素 (isovitexin)、兒茶素 (catechin)、表兒茶素 (epicatechin)、異槲皮酮 (isoquercitrin) 等，也被證實具有很好的降血壓功效 (Yang *et al.*, 2007b)，這些化學成分可能是提供諾麗果降血壓效果的來源。然而類黃酮化合物對熱的耐受性較差，故諾麗果經長期高溫發酵後，可能會因黃酮類物質受損而降低果汁之降血壓功能。

四、官能品評

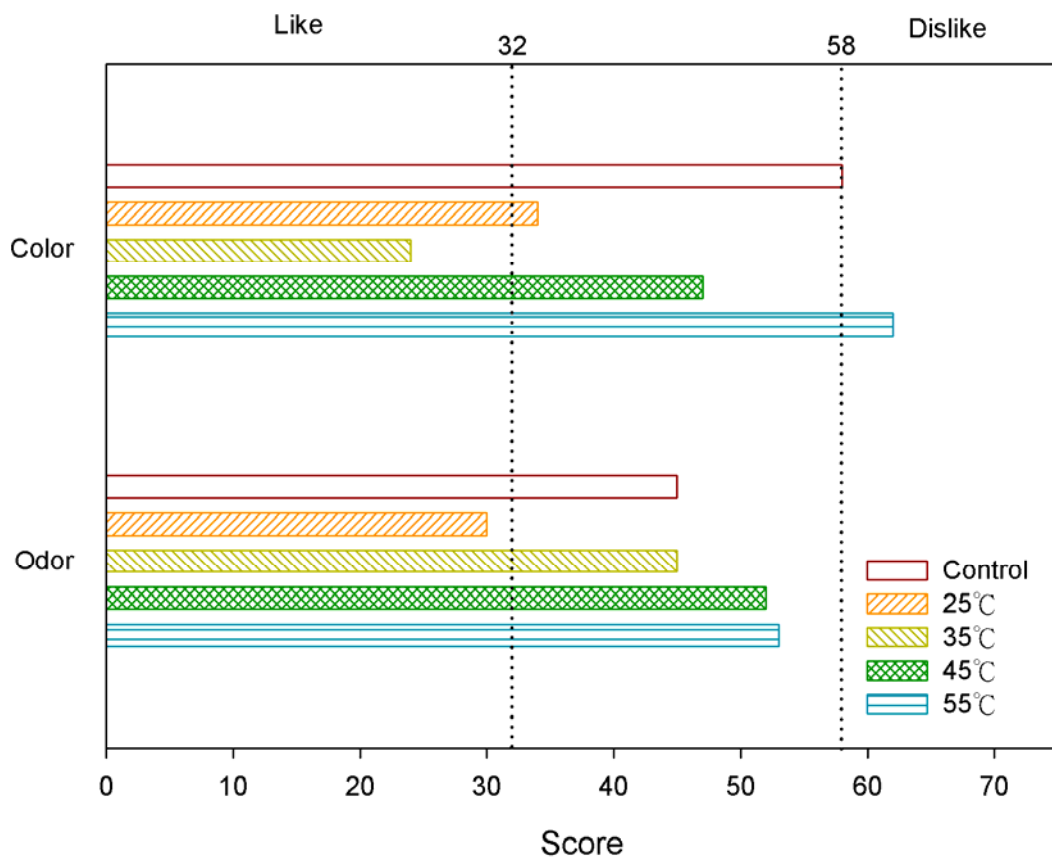
諾麗果經發酵後，不僅功能性成分發生變化，連色澤、風味都產生轉變，尤其是高溫發酵的組別變化更為明顯，且隨著發酵時間的進

行，而有持續性的改變。若發酵完成的產品生理活性極佳但無法被消費者接受，那不能算是一個成功的產品。故在控溫發酵完成後，進行官能品評測試，了解消費者對控溫發酵諾麗汁的喜好與接受程度，以對產品性向進行評估。由於室溫發酵的諾麗果汁含有微生物，而有飲用安全的疑慮，故初步品評只測試視覺與嗅覺兩項。為簡化測試流程，故採用順位法 (Ranking test) 進行喜好排序，要求消費者依個人喜好將特定組合的樣品依可接受的程度加以排列，將樣品所得之積分經統計分析後，可挑出具有顯著差異的組別，而可區別消費者顯著喜愛或顯著厭惡的色澤或氣味。

(一) 初步發酵品質評斷

諾麗果於發酵首週的品評結果如圖三十八 (附錄三十二) 所示。此階段比較樣品數為 5，測試重複數 (品評測試人次) 為 15，經查表後取捨點積分範圍為 32~58，當樣品喜好積分介於此範圍中時表示無顯著差異，但當積分小於 32 時，則表示為受試者可接受的 (喜愛) 的樣品，反之，當積分大於 58 時，則表示為受試者無法接受 (厭惡) 的樣品。

於色澤方面，35°C 發酵果汁的得分較低，以 24 分的積分成為最為受試者喜愛的色澤；55°C 的發酵果汁則以 62 分成為受試者最不喜愛的色澤。令人意外的，未經發酵的控制組以 58 分的成績位於取捨



圖三十八、初步發酵的諾麗果汁之順位法積分

Figure 38. The ranking test score of noni juice in the first week.

點，而為受試者第二不喜愛的顏色。作為果汁的產品定位，受試者並不單純以色澤深淺做為產品喜好的依據。顏色為金黃色澤的控制組，反而會帶給受試者稀釋、不純的負面印象，而較為平淡的色澤也與大眾的認知有所出入，受試者普遍認為淡色應為茶飲的色澤。顏色最深的 55°C 發酵果汁同樣也不受受試者喜愛，過於深邃的色澤超乎一般人的認知，而近似於醬汁或藥品的印象，降低受試者飲用的欲望。受試者普遍認為帶有略為紅褐色的 35°C 發酵果汁為可引起消費慾望的產品，因為其色澤近似於一般常見的葡萄汁或紅酒，而易於被大眾接受。由此可知，諾麗果經由發酵後，確實能促進色素生成，增加產品色澤，刺激消費者購買。

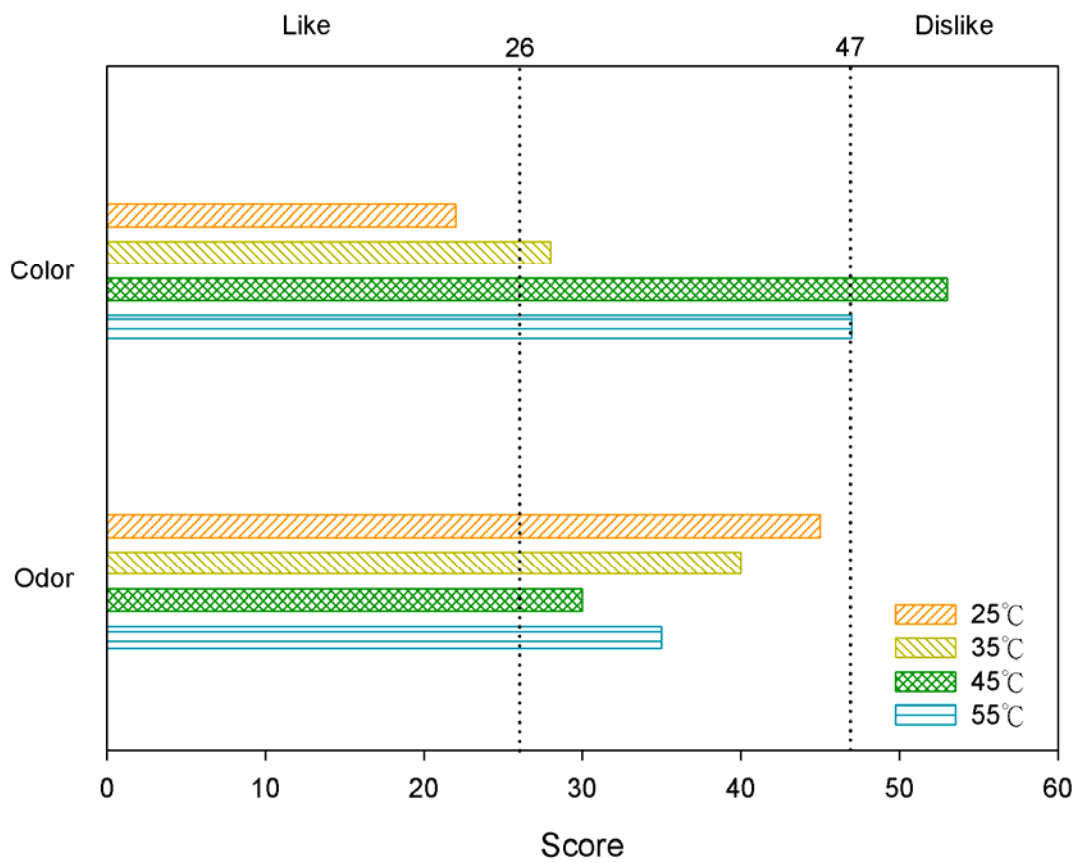
食品中的色香味為吸引我們品嚐的重要性質，若僅具有良好色澤而沒有引人入勝的氣味，亦不能刺激我們產生取用的欲望。發酵諾麗果汁雖不能稱為令人喜悅的氣味，但也要避免產生讓人無法接受的氣味，而降低供人們飲用的興致。在氣味方面，25°C 發酵果汁的積分顯著低於其他組別，以 30 分的成績成為最令受試者喜愛的氣味，其他組別的分數則介於 32 至 58 分，而沒有顯著的喜好差異。受試者普遍認為 25°C 的發酵組別較不具刺激性酸味，甚至具有淡淡的果香，因而較能被接受。而高溫發酵的組別產生了辛辣的味道或些微的焦色，因此不令受試者親睞。結果顯示，諾麗果經發酵後不僅可改善色澤，

連風味都可受到修飾，而成為較能被大眾接受的產品，然而過高的發酵溫度則會導致不良氣味的產生。

(二) 後期發酵品質評斷

經品評測試後，顯示受試者於初步發酵階段，普遍較喜愛低溫發酵的產品。在發酵過程中，諾麗果的成分與性質持續改變，後期發酵的諾麗果汁較初步發酵更具生理活性，然而其色澤與氣味的傾向是否與初步發酵時的表現一致，仍待檢驗。故取用發酵末週的 4 組溫度樣品進行相同的品評測試，其結果如圖三十九 (附錄三十三) 所示。此階段比較樣品數為 4，測試重複數 (品評測試人次) 為 15，經查表後取捨點積分範圍為 26~47，當積分小於 26 時，表示為受試者可接受的範圍，當積分大於 47 時，表示為受試者不可接受的範圍。

在色澤品評中，25°C 發酵果汁因具有相對較淡的顏色而獲得 22 分，普遍可被受試者接受。45°C 的發酵果汁因具有強烈褐變作用而具有深邃色澤，而以 53 分成為消費者最不能接受的組別。55°C 組同樣也具有深邃的褐變色澤，然其褐變產物聚集而在離心過程中被去除，因此色澤略淡於 45°C 組，其得分在 47 分也剛好在取捨點上，同樣不被受試者接受。顯示在發酵末期，由於此時的色澤較發酵初期加深許多，因此沒有果汁顏色過淡的問題，消費者轉變為以顏色深淺作為喜



圖三十九、後期發酵的諾麗果汁之順位法積分

Figure 39. The ranking test score of noni juice in the last week.

愛依據的裁量，在此階段顏色較淡者較能被消費者接受。

接著進行氣味品評，經過四週的發酵後，其氣味轉變的較為一致，在此階段各組得分均在取捨值內，而沒有喜好的顯著差異。不過就得分來說，低溫發酵的組別 (25 和 35°C) 組的得分較高，可能較具有不良氣味的傾向。果膠酯酶在對果膠基質去除甲氧基團時，會自然產生些微甲醇，而醇類在諾麗的高酸性環境中，可能會與酸慢慢形成酯類，而能改善發酵果汁氣味。提高發酵溫度可能會增加不良氣味成分揮發的機會，且高溫提供較低的反應活化能，可能促使化學反應產生，經長時間作用後，於發酵後期產生酯類，而有改善風味的趨勢，此種說法仍待進一步驗證。

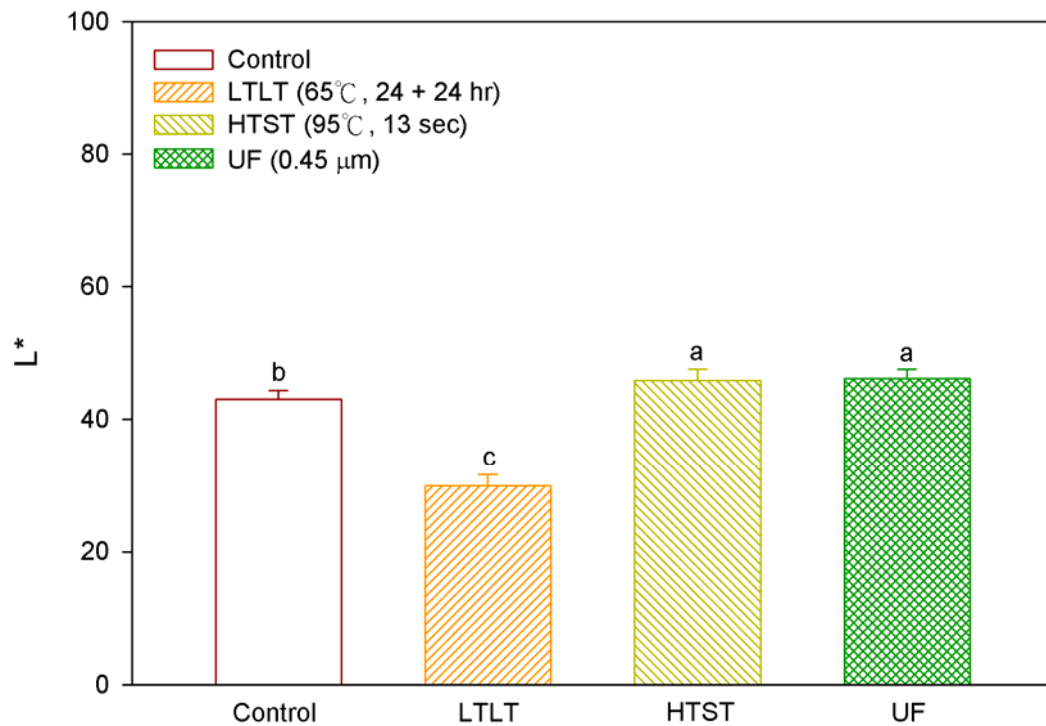
Part 3: 不同殺菌方式之影響

低溫發酵 (25 和 35°C) 的諾麗果汁雖然具有較佳的類黃酮含量和 ACE 抑制活性，但其發酵溫度無法抑止微生物的孳生，因此產品可測得生菌數的存在，而造成消費者飲用的風險。若使用傳統業界的殺菌方式處理其產品，則可能破壞這些熱敏感功能性成分，而使低溫發酵的優勢喪失。故測試不同種類的殺菌方式，對其功能性成分與生理活性的影響，以找出適用於低溫發酵諾麗果汁的殺菌方法。

一、對基本性質的影響

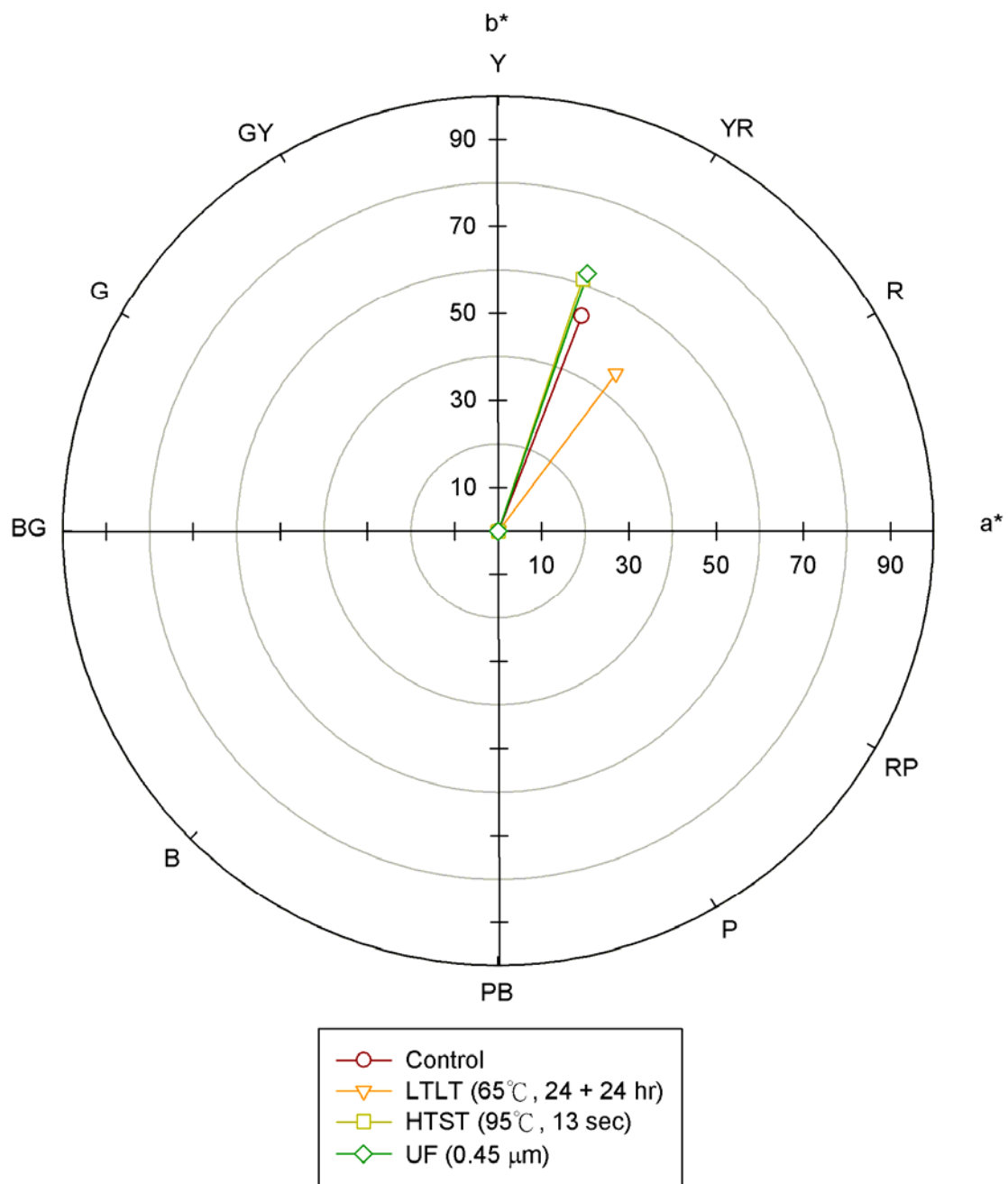
諾麗果經不同殺菌處理後，其 pH 值都維持在 3.84 左右，與前述的控溫發酵實驗相比，pH 值相對提升不少，可能是不同批次原料造成的差異。

再比較其因殺菌所產生的顏色變化，其亮度變化如圖四十 (附錄三十四) 所示。諾麗果經板式熱交換 (HTST) 或膜過濾 (UF) 處理後，其亮度些微上升。以熱水浴低溫短時 (LTLT) 處理的組別，亮度則顯著的降低，表示長時間的昇溫殺菌，會造成褐變產物生成而降低亮度。不同殺菌法造成的色澤差異表示如圖四十一 (附錄三十六)。以膜過濾或板式熱交換處理諾麗果汁，並不會造成產品色澤的改變，其 a*值與 b*值呈現相似的分布而沒有顯著差異，而以熱水浴處理的組別，有 a*值增加、b*值減少的情形，顯示有紅色素的生成與黃色



圖四十、不同殺菌條件的諾麗果汁之亮度 (L*) 變化

Figure 40. Change of L* value in noni juice at different sterilization conditions. ^{a-c} Mean in the same column with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).



圖四十一、不同殺菌條件的諾麗果汁之顏色變化

Figure 41. Change of color in noni juice at different sterilization conditions.

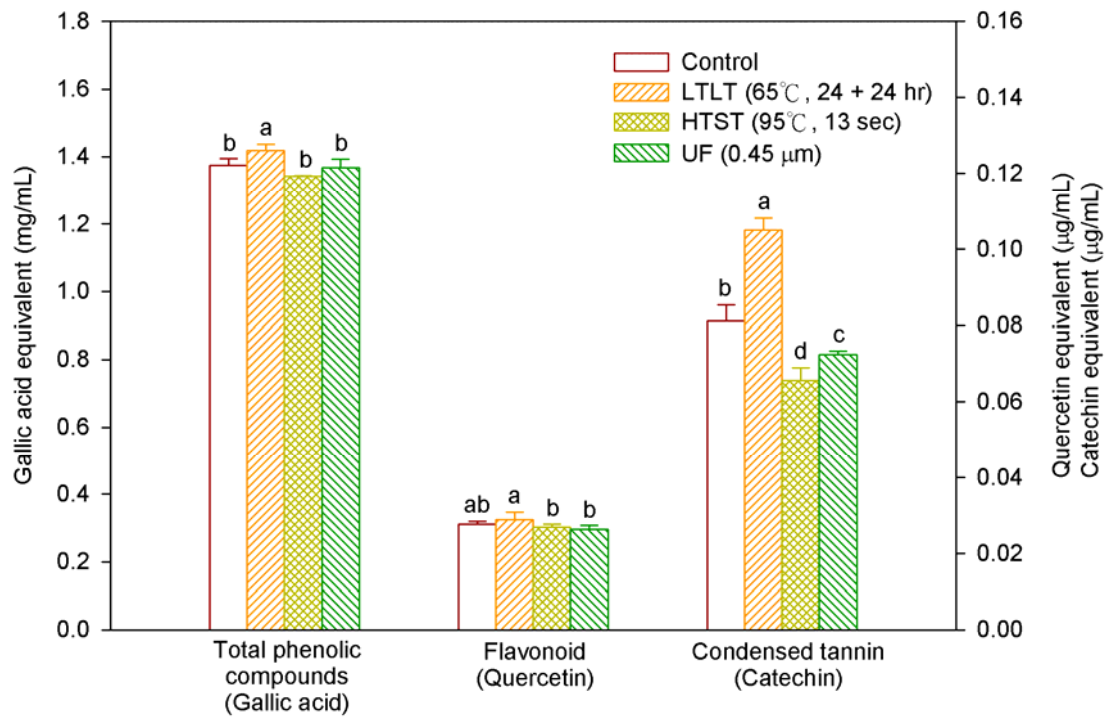
素的的減損。

二、對功能性成分的影響

諾麗果經不同的殺菌處理後，功能性成分變化如圖四十二、四十三 (附錄三十五) 所示。板式熱交換與膜過濾並不會對總酚與類黃酮化合物含量造成影響，然而持續加熱 48 小時的水浴殺菌卻會對其造成影響，使總酚與縮合單寧含量些許提升。至於東莨菪素與芸香素，則未受殺菌方式所影響，整體呈現相似的表現。此處殺菌實驗測得的東莨菪素含量高達 115 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 以上，與控溫發酵時的樣品差異甚大，可能是不同季節或不同批次的樣品差異所致，不同季節的生長環境是否對東莨菪素含量有所影響，尚待進一步探討。

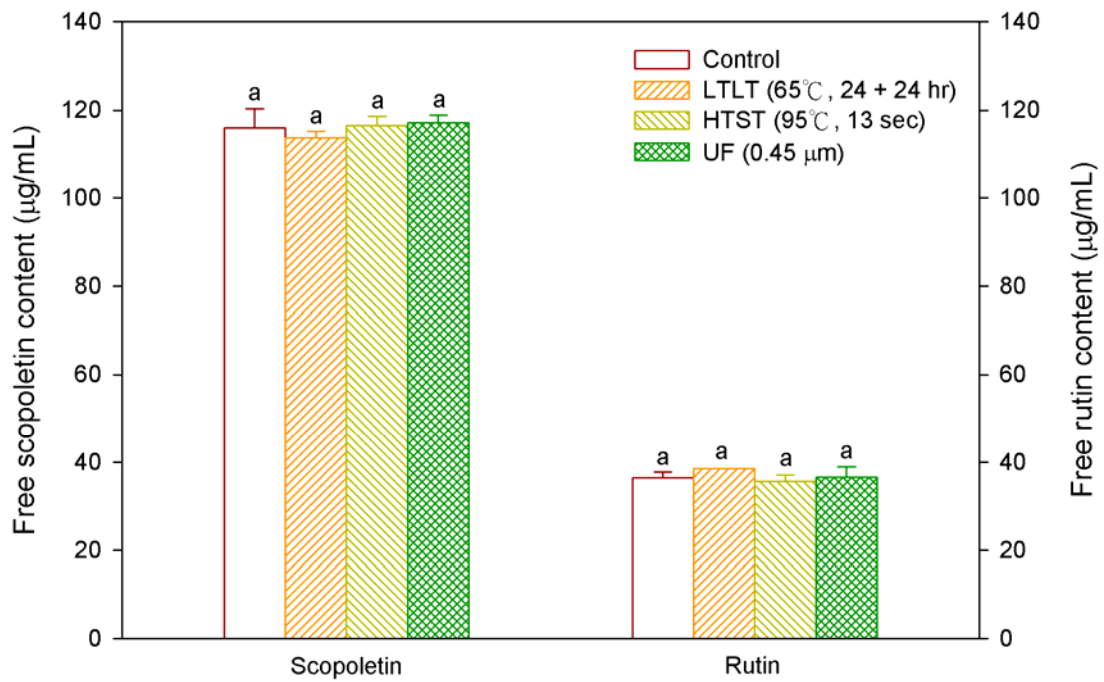
三、對生理活性的影響

不同殺菌處理對諾麗發酵果汁的生理活性影響，結果如圖四十四 (附錄三十六) 所示。板式熱交換與膜過濾處理會略為降低諾麗果汁的 DPPH 自由基掃除能力和 ACE 抑制活性，對 TEAC 總抗氧化能力則沒有影響。而熱水浴殺菌，可能由於其長時間升溫殺菌的緣故，會同時提升 DPPH 自由基掃除能力和 TEAC 總抗氧化能力等抗氧化活性。殺菌實驗所得的生理活性變化趨勢與功能性成分含量多寡，和前述之控溫發酵結果相呼應，長時間的高溫處理會使諾麗果汁產生褐變



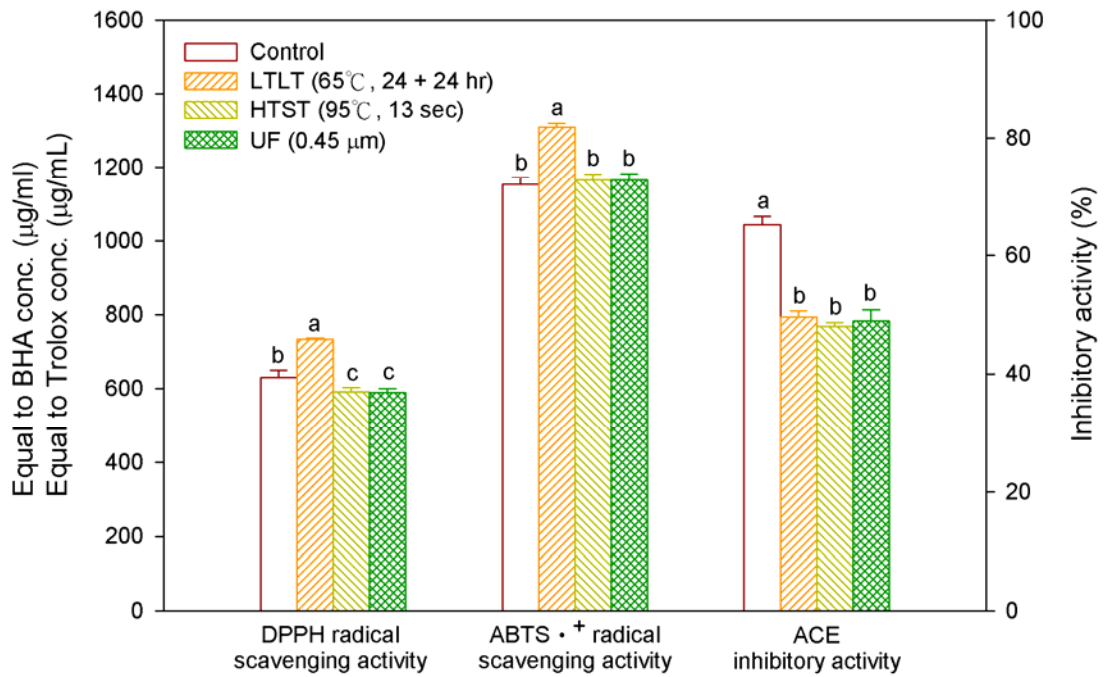
圖四十二、不同殺菌條件的諾麗果汁之功能性化合物變化 (1)

Figure 42. Change of function compound in noni juice at different sterilization conditions. (1) ^{a-d} Mean in the same column with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).



圖四十三、不同殺菌條件的諾麗果汁之功能性化合物變化 (2)

Figure 43. Change of function compound in noni juice at different sterilization conditions. (2) ^a Mean in the same column with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).



圖四十四、不同殺菌條件的諾麗果汁之生理活性變化

Figure 44. Change of biologic activity in noni juice at different sterilization conditions. * The sample of ACE inhibitory activity diluted for fifty fold. ^{a-c} Mean in the same column with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

反應使亮度降低，而該褐變產物可能具有抗氧化活性而能提高產品的抗氧化功能；與控溫發酵時的加熱時間相比，熱水浴殺菌法相對較短的加熱時間並不會對熱敏感的類黃酮化合物造成影響，因此對 ACE 抑制活性亦影響不大。

伍、結論

於第一部份之果膠酵素純化實驗結果得知，經由 35~75%硫酸銨沉澱、DEAE 陰離子交換管柱分離，可初步純化出二種諾麗果膠酯解同功酶 PME-A 和 PME-B，其比活性分別提升 1.65 和 14.57 倍。再分別對酵素特性作測試，結果酵素活性隨溫度提高而有所提升，PME-A 最佳作用活性約為 60°C，PME-B 在 70°C 時活性仍有繼續上升的趨勢；溫度耐受性方面，PME-B 有較好的溫度耐受性，在 70°C 下加熱 5 min 尚殘存 43.63% 的活性，PME-A 則僅存 16.64%，兩者均於 80°C 加熱 5 min 後完全失活。上述溫度因子可應用於諾麗果控溫發酵，以改善其製程與產品品質。相對於其他酵素純化之文獻，本研究的酵素比活性提升效果略低，表示可能在純化過程中喪失過多酵素活性，或是純化步驟可能非此樣品的最佳化方法。總覽酵素純化過程，似乎還有改善的空間，若能對萃取液的氯化鈉濃度與 pH 值做最佳化測試，應可再提高萃取率；而致力於縮短純化時間流程，也可減少活性的損失，以避免在純化後期酵素活性表現低落而難以測得。初步純化時使用了離子交換管柱，後續或可許應用膠體過濾或親和性管柱再加以進一步純化，唯純化流程須加速而試驗規模應放大，以降低活性減損所造成的影響。另外酵素活性測定的方法也有改善的空間，現行測試法略高的樣品消耗量，亦使純化步驟於後期窒礙難行，有很多樣品

均於純化中期就被消耗殆盡，導致必須生產更多的樣品因應測試，無形之中便拖長了純化所需的時間。以上缺失若能加以修正，應可得到更令人滿意的酵素純化結果。

接著進行第二部份的諾麗不同控溫發酵實驗。諾麗果實富含果膠，若能控制果膠酵素作用，加速果膠分解，可望促進色素改變與功能成份釋放，縮短果汁發酵時間，促進經濟效益。綜合以上結果，諾麗果中的果膠酵素在不同溫度發酵初期（一至二週）較有影響，在發酵首週時，各組色素有顯著的生成，且隨著發酵溫度的增加，而有較佳的功能性成分釋放表現；而在發酵中後期釋放減緩，甚至有部份有效成分開始減損。整體而言，可將實驗結果分為兩組趨勢，低溫發酵組（25 和 35°C）和高溫發酵組（45 和 55°C）：

在接近室溫的低溫發酵組中，適當的提高發酵溫度，可提升果膠酵素活性，促進初期產率提升與色素生成，縮短發酵時間。較高溫組少的褐變反應雖使抗氧化表現較差，但產品呈色較佳。而易受溫度影響的類黃酮類與降血壓功能性成分受破壞的程度較低，為低溫發酵組的優勢。

而相對高溫的發酵組，雖然會顯著的增加總酚含量，並促進抗氧化活性提升，但卻會大幅的減少熱敏感的類黃酮和 ACE 抑制活性，且長期高溫環境會對諾麗果產生類似熬煮的效果，使其色澤和風味發

生較大的改變。高溫組產率較差且色深，可能較不適用於飲品用途，但可作為其他型態的產品，如以熱風乾燥製成粉末或膠囊錠劑。因產品的熱敏感成分已於發酵過程中損失，而在乾燥時便不需考量到這些成分而可採取較低成本的模式，最終可製成具良好抗氧化活性的營養補給品。

最後對諾麗果汁進行殺菌測驗，尋找較適用於熱敏感的室溫發酵組果汁之殺菌方法。廠商使用的熱水浴低溫長時殺菌法，為確保能確實清除產孢菌，而採取長時間隔夜加熱二次的作法，然而長期升溫處理，會對諾麗果汁的品質產生影響。雖會小幅提升總酚含量與抗氧化活性，但褐變使亮度降低。相較於熱水浴法，以板式熱交換高溫短時加熱或膜過濾處理，較不會對諾麗果汁產生影響，無論是色澤、功能性成分或生理活性都沒有明顯改變。此二種殺菌法為對產品品質影響較小的處理方式。由於膜過濾法的處理效率較差，流量小且膜易堵塞，濾膜更換的耗材支出也很可觀，故建議使用產量大且效率高的板式熱交換殺菌法應用於工業生產上。

不同的加工方式皆有其優劣，若考量到產品特性，而以其優勢作為應用，則能更加發揮產品價值，減少產製成本，創造價格低廉又具健康效果的諾麗果產品。

陸、參考文獻

- 王美燕 (2008)。部份發酵諾麗果汁之製備及其儲藏性探討。東海大學 食品科學系 碩士論文。
- 林滄棋 (1990)。綠豆芽不同分子型態果膠酯酶之純化與其特性之研究。台灣大學 食品科技研究所 碩士論文。
- 施瑋筑 (2008)。檫樹果實自然發酵過程中菌相與果汁成分變化之研究。台灣大學 園藝所研究所 碩士論文。
- 陳雅惠 (2002a)。龍鬚菜果膠酯酶所催化轉醯基反應之探討。屏東科技大學 食品科學系 碩士論文。
- 陳震學 (2002b)。果膠酵素與硬心香蕉形成之探討。屏東科技大學 食品科學系 碩士論文。
- 陳師瑩、陳靜慧、陳姿秀、葉東柏和林翠品 (2007a)。儲藏條件對海巴戟天葉萃取物之抗氧化活性與總酚類含量的影響。嘉南學報，33期，頁 40-53。
- 陳富民 (2007b)。諾麗 (Noni) 果汁最佳發酵條件之探討。屏東科技大學 機械工程系 碩士論文。
- 莊榮輝 (2005)。酵素化學實驗。國立台灣大學 生化科技學系 微生物與生化所 生物化學研究室。台灣。

- 郭偉翔 (2006)。探討諾麗果汁之製造、儲存變化與生理活性。東海大學 食品科學系 碩士論文。
- 郭孫憲 (2007)。番石榴採收後生理活性變化及其果膠甲基酯酶分離純化之探討。屏東科技大學 食品科學系 碩士論文。
- 張惠香、陳錦樹、林金源 (2007)。諾麗果發酵產物對 BALB/c 小鼠脾臟細胞 Th1/Th2 細胞激素分泌之影響。台灣營養學會雜誌，32 卷 1 期，頁 30-36。
- 張展維 (2010)。脈衝電場對食品中毒病原菌殺菌之致死效率及其在諾麗果汁殺菌應用。東海大學 食品科學系 碩士論文。
- 黃淑貞 (1984)。食品官感檢查手冊。經濟部商品檢驗局。台灣。
- 楊秀美 (1990)。大豆芽果膠酯酶之性質研究。台灣大學 食品科技研究所 碩士論文。
- 楊淑娟 (2005)。Noni 果汁抗氧化性、ACE 抑制活性和其純化物質 Scopoletin 及衍生物之化學結構鑑定。東海大學 食品科學系 碩士論文。
- 賴滋漢、賴業超 (1994)。食品科技辭典。富林出版社。台灣。
- 羅宇展 (2008)。檄樹 (諾麗) 果實自然發酵過程中果汁與乾燥果肉所含酚類化合物之變化。台灣大學 園藝學研究所 碩士論文。
- Aalbersberg, W. G. L., Hussein, S., Sotheeswaran, S., & Parkinson, S. (1993). Carotenoids in the leaves of *Morinda citrifolia*. *J. Herbs Spices*

Med. Plants, 2, 51-54.

Ali, Z. M., Chin, L. H., & Lazan, H. (2004). A comparative study on wall degrading enzymes, pectin modifications and softening during ripening of selected tropical fruits. *Plant Sci.*, 167(2), 317-327.

Alkorta, I., Garbisu, C., Llama, M. J., & Serra, J. L. (1998). Industrial applications of pectic enzymes: A review. *Proc. Biochem.*, 33(1), 21-28.

Alonso, J., Canet, W., Howell, N., & Alique, R. (2003). Purification and characterisation of carrot (*Daucus carota* L.) pectin esterase. *J. Sci. Food Agric.*, 83, 1600-1606.

Ames, B. N., Shigenaga, M. K., & Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 7915-7922.

Amin, A. & Buratovich, M. (2007). The Anti-cancer charm of flavonoids: A cup-of-tea will do! *Recent Patents Anticancer Drug Discov.*, 2, 109-117.

Amor Y, Haigler C. H., Johnson S., Wainscott M., & Delmer D. (1995). A membrane-associated form of sucrose synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 9353-9357.

Assis, S. A., Lima, D. C., & De Faria Oliveira, O. M. M. (2000). Acerola's pectin methylesterase: Studies of heat inactivation. *Food Chem.*, 71, 465-467.

Assis, S. A. D., Martins, A. B. G., Guaglianoni, D. G., & Oliveira O. M. M. D. F. (2002). Partial Purification and Characterization of Pectin Methylesterase from Acerola (*Malpighia glabra* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 50, 4103-4107.

- Atkinson, N. (1956). Antibacterial substances from flowering plants. 3. Antibacterial activity of dried Australian plants by rapid direct plate test. *Aust. J. Exp. Biol.*, 34, 17-26.
- Azza, A. S., Labib, F. A. El-Ashwah, Omran, H. T., & Askar, A. (1995). Heat inactivation of mango pectinesterase and polygalacturonase. *Food Chem.*, 53, 137-142.
- Bagchi, D., Bagchi, M., Stohs, S. J., Das, D. K., Ray, S. D., Kuszynski, C. A., Joshi, S. S., & Pruess, H. G. (2000). Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology*, 148, 187-197.
- Barön, A., Rombouts, F., & Drilleau, J. F. (1980). Purification et propriétés de la pectinestérase produite par *Aspergillus niger*. *Lebensm-Wiss. u.-Technol.*, 13, 330-333.
- Bate-Smith, E. C. (1962). The phenolic constituents of plants and their taxonomic significance: Dicotyledons. *Bot. J. Linn. Soc.*, 58(371), 95-173.
- BeMiller, J. N. (1986). *An introduction to pectins: Structure and properties*. In: *Chemistry and Function of Pectins*, M. L. Fishman and J. J. Jen, eds., ACS Sym. Ser. 310, American Chemical Society, Washington, D. C.
- Benen, J. A. E., Kester, H. C. M., & Visser, J. (1999). Kinetic characterization of *Aspergillus niger* N400 endopolygalacturonases I, II and C. *Eur. J. Biochem.*, 259, 577-585.
- Berg, J. T. & Furusawa, E. (2007). Failure of juice or juice extract from the noni plant (*Morinda citrifolia*) to protect rats against oxygen toxicity. *Hawaii Med. J.*, 66, 41-44.

- Blanco, Y. C., Vaillant, F., Pérez, A.M., & Belleville, M.P. (2007). The ripening and aging of noni fruits (*Morinda citrifolia* L.): microbiological flora and antioxidant compounds. *J. Sci. Food Agric.*, 87, 1710-1716.
- Brady, C. J. (1976). The pectinesterase of the pulp of the banana fruit. *Aust. J. Plant Physiol.*, 3, 163-172.
- Broadhurst, R. B., & Jones, W. T. (1978). Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. *J. Sci. Food Agric.*, 29, 788-794.
- Bui, A. K. T., Bacic, A., & Pettolino, F. (2006). Polysaccharide composition of the fruit juice of *Morinda citrifolia* (noni). *Phytochemistry*, 67, 1271-1275.
- Bushnell, O. A., Fukuda, M., & Makinodan, T. (1950). The antibacterial properties of some plants found in Hawaii. *Pacific Sci.* 4: 167-183.
- Cafall, K. H. & Mohnen, D., (2009). The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydr. Res.*, 344, 1879-1900.
- Carpita N. & Gibeaut D. M. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.*, 3, 1-3.
- Castaldo, D., Quagliuolo, L., Servillo, L., Balestrieri, C., & Giovane, A. (1989). Isolation and characterization of pectin methylesterase from apple fruit. *J. Food Sci.*, 54, 653-655.
- Chan-Blanco, Y., Vaillant, F., Perez, A. M., Reynes, M., Brillouet, J. M., & Brat, P. (2006). The noni fruit (*Morinda citrifolia* L.): A review of agricultural research, nutritional and therapeutic properties. *J. Food Compost. Anal.*, 19, 645-654.
- Chan-Blanco, Y. C., Vaillant F., Pérez A., Belleville, M. P., Zúûiga, C., &

- Brat, P. (2007). The ripening and aging of noni fruits (*Morinda citrifolia* L.) microbiological flora and antioxidant compounds. *J. Sci. Food Agric.*, 87, 1710-1716.
- Chang, L. W. S., Norita, L. L. & Yamamoto, H. Y. (1965). Papaya pectinesterase inhibition by sucrose. *J. Food Sci.*, 30, 218-222.
- Chavez, J. H., Leal, P. C., Tunes, R. A., Nunes, R. J., Barardi, C. R., Pinto, A. R., Simoes, C. M., & Zanetti, C. R. (2006). Evaluation of antiviral activity of phenolic compounds and derivatives against rabies virus. *Vet. Microbiol.*, 116, 53-59.
- Chearskul, S., Kooptiwut, S., Chatchawalvanit, S., Onreabroi, S., Churintrapun, M., Saralamp, P., & Soonthornchareonnon, N. (2004). *Morinda citrifolia* has very weak estrogenic activity in vivo. *Thai J. Physiol. Sci.*, 17, 22-29.
- Choi, Y., Lee, S. M., Chun, J., Lee, H. B., & Lee, J. (2006). Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of Shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. *Food Chem.*, 99, 381-387.
- Chopra M, Fitzsimons PE, Strain JJ, Thurnham DI, & Howard AN. (2000). Nonalcoholic red wine extract and quercetin inhibit LDL oxidation without affecting plasma antioxidant vitamin and carotenoid concentrations. *Clin. Chem.*, 46, 1162-1170.
- Chunhieng, M. T. (2003). *Développement de nouveaux aliments santé tropicale: application à la noix du Brésil Bertholettia excelsa et au fruit de Cambodge Morinda citrifolia*. Ph.D. thesis, INPL, France.
- Cliff, M. A., King, M. C., & Schlosser, J. (2007). Anthocyanin, phenolic composition, colour measurement and sensory analysis of BC commercial red wines. *Food Res. Int.*, 40, 92-100.

- Collmer, A., & Keen, N. T., (1986). The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 24, 383-409.
- Cosgrove D.J. (1997). Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 13, 171-201.
- Cushnie T. P. T. & Lamb A.J. (2005). Review. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 26, 343-356.
- Delinc'ee, H. & Radola, B.J. (1970). Some size and charge properties of tomato pectin methylesterase. *Biophys. Acta.*, 214(1), 178-189.
- Delinc'ee, H. (1976). Thin-layer isoelectric focusing of multiple forms of tomato pectinesterase. *Phytochemistry*, 15, 903-908.
- Denes, J. M., Baron, A., & Drilleau, J. F. (2000). Purification, properties and heat inactivation of pectin methylesterase from apple (cv *Golden Delicious*). *J. Sci. Food Agric.*, 80, 1503-1509.
- Deng, S., West, B. J., Jensen, C. J., Basar, S., & Westendorf, J. (2009). Development and validation of an RP-HPLC method for the analysis of anthraquinones in noni fruits and leaves. *Food Chem.*, 116, 505-508.
- Dewanto, V., Wu, X., Adom, K. K., & Liu, R. H. (2002). Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 3010-3014.
- Dittmar A. (1993). *Morinda citrifolia* L. – use in indigenous Samoan medicine. *J. Herbs Spices Med. Plants* 1, 77-92.
- Dixon A.R., McMillan H, & Etkin N.L. (1999). Ferment this: the transformation of Noni, a traditional Polynesian medicine (*Morinda citrifolia*, *Rubiaceae*). *Econ. Bot.*, 53, 51-68.
- Draye, M. & Cutsem, P. V. (2008). Pectin methylesterases induce an abrupt increase of acidic pectin during strawberry fruit ripening. *J. Plant*

Physiol., 165(11), 1152-1160.

Earle, J.E. (2001). *Plantas Medicinales en el Trópico Húmedo*. Editorial Guayacán, San José.

Erlund, I. (2004). Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutr. Res.*, 24, 851-874.

Espachs-Barroso A., Loey, A. V., Hendrickx, M., & Marín-Belloso, O. (2006). Inactivation of plant pectin methylesterase by thermal or high intensity pulsed electric field treatments. *Innov. Food Sci. Emerg. Tech.*, 7(1-2), 40-48.

European Food Safety Authority. (2006, February 15-16). *Minutes of the 13th Plenary Meeting of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies*. Available at http://www.efsa.eu.int/science/ndaopinions/catindex_en.html. Accessed in 2006.

Farine, J. R., Legal, L., Moreteau, B., & Le Quere, J. L. (1996). Volatile components of ripe fruits of *Morinda citrifolia* and their effects on *Drosophila*. *Phytochem.*, 41(2), 433-438.

Fayyaz, A., Asbi, B. A., Ghazali, H. M., & Che Man, Y. B. (1995). Kinetics of papaya pectinesterase. *Food Chem.*, 53, 129-135.

Fennema, O. R. (1985). *Food chemistry*. 2nd ed. Morcel Dekker, USA, 440.

Ferry D. R., Smith A., Malkhandi J., Fyfe D. W., de Takats P. G., & Anderson D. (1996). Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for in vivo tyrosine kinase inhibition. *Clin. Cancer Res.*, 2, 659-668.

Gee, J. M., DuPont, S. M., Day, A. J., Plumb, G. W., Williamson, G., &

- Johnson, I. T. (2000). Intestinal transport of quercetin glycosides in rats involves both the deglycosylation and interaction with hexose transport pathway. *J. Nutr.*, *130*, 2765-2771.
- Giovane, A., Quagliuolo, L., Castaldo, D., Servillo, L. & Balestrieri, C. (1990). Pectin methylesterase from *Actinidia chinensis* fruits. *Phytochemistry*, *29*, 2821-2826.
- Goldberg, R. (1984). Changes in the properties of cell wall pectin methylesterase along the *Vigna radiata* hypocotyls. *Physiol. Plant*, *61*, 58-63.
- Goldberg, R., Pierron, M., Durand, L. & Mutaftschiev, S. (1992). In vitro and in situ properties of cell wall pectin methylesterase from mung bean hypocotyl. *J. Exp. Bot.*, *43*, 41-46.
- Guardia T., Rotelli A., Juarez A. & Pelzer L. (2001). Antiinflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Il. Farmaco.*, *56*, 683-687.
- Guiavarc'h ,Y., Segovia, O., Hendrickx, M., & Loey, A. V. (2005). Purification, characterization, thermal and high-pressure inactivation of a pectin methylesterase from white grapefruit (*Citrus paradisi*). *Innov. Food Sci. Emerg. Tech.*, *6(4)*, 363-371.
- Hagerman, A.E. (1998). *Tannin chemistry*. Retrieved May 5, 2010, from the World Wide Web: <http://www.users.muohio.edu/hagermae>
- Harborne J. B. & Williams C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, *55*, 481-504.
- Hartman, R., & Meisel, H. (2007). Food derived peptides with biological activity: From research to food applications. *Curr. Opin. Biotechnol.*, *18*, 163-169.

- Heinicke, R. M. (1985). The pharmacologically active ingredient of noni. *Pac. Trop. Bot. Gard. Bull.*, *15*, 10-14.
- Hertog, M. G. L., Feskens, E. J. M., Hollman, P. C. H., Katan, M. B., & Kromhout, D. (1993). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease:the Zutphen Elderly Study. *Lancet.*, *342*, 1007-1011.
- Hirazumi, A., Furusawa, E., Chou, S. C., & Hokama, Y. (1994). Anticancer activity of *Morinda citrifolia* (noni) on intraperitoneally implanted lewis lung carcinoma in syngeneic mice. *Proc. West. Pharmacol. Soc.*, *37*, 145-146.
- Hornick, C. A., Myers, A., Sadowska-Krowicka, H., T. A. C., & Woltering, E. A. (2003). Inhibition of angiogenic initiation and disruption of newly established human vascular networks by juice from *Morinda citrifolia* (noni). *Angiogenesis*, *6*, 143-149.
- Huang, L., Liu, J. F., Liu, L. X., Li, D. F., Zhang, Y., Nui, H. Z., Song, H. Y., & Zhang, C. Y. (1993). Antipyretic and anti-inflammatory effects of *Artemisia annua* L.. *China J. Chin. Mate. Med.*, *18*, 44-48; 63-64.
- Hultin, H. O., Sun, B., & Bulger, J. (1966). Pectin methyl esterases of the banana. Purification and properties. *J. Food Sci.*, *31*, 320-327.
- Ishii, S., Kiho., Sugiyama, S. & Sugimoto, H. (1979). Low-methoxyl pectin prepared by pectinesterase from *Aspergillus japonicus*. *J. Food Sci.*, *44*, 611-614.
- Jacari, H. & Wicker, L. (1991). Partial purification and characterization of peach pectinesterase. *J. Food Biochem.*, *15*, 241-252.
- Jamdar, S. N., Rajalakshmi, V., Pednekar, M. D., Juan, F., Yardi, V., & Sharma, A. (2010). Influence of degree of hydrolysis on functional

- properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. *Food Chem.*, 121, 178-184.
- Kamiya, K., Tanaka, Y., Endang, H., Umar, M., & Satake, T. (2004). Chemical constituents of *Morinda citrifolia* fruits inhibit copperinduced low-density lipoprotein oxidation. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 5843-5848.
- Kashyap, D. R., Vohra, P. K., Chopra, S. & Tewari, R. (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technol.*, 77, 215-227.
- Kertesz, Z. I., (1951). *The Pectic Substances*. Interscience Publishing, New York.
- Kim, W. Y., Kim, J. M., Han, S. B., Lee, S. K., Kim, N. D., & Park, M. K., (2000). Steaming of ginseng at high temperature enhances biological activity. *J. Nat. Prod.*, 63, 1702-1704.
- Kim, H. J., Jang, S. I., Kim, Y. J., Chung, H. T., Yun, Y. G., Kang, T. H., Jeong, O. S., & Kim, Y. C. (2004). Scopoletin suppresses pro-inflammatory cytokines and PGE2 from LPS-stimulated cell line, RAW 264.7 cells. *Fitoterapia.*, 75, 261-266.
- Kim, S. W., Jo, B. K., Jeong, J. H., Choi, S. U., & Hwang, Y. I. (2005). Induction of extracellular matrix synthesis in normal human fibroblasts by anthraquinone isolated from *Morinda citrifolia* (noni) fruit. *J. Med. Food*, 8, 552-555.
- King, K. (1991). Characteristics of pectinesterase isolated from bramley apple waste. *J. Sci. Food Agric.*, 57, 43-48.
- Kohn, R., Markovic, O., & Machova, E. (1983). Deesterification mode of pectin by pectinesterase of *Aspergillus foetidus* ,tomatoes and alfalfa. *Coll. Czech. Chem. Commun.*, 48, 790-798.

- Kohorn, B. D. (2000). Plasma membrane-cell wall contact. *Plant Physiol.*, *124*, 31-38.
- Komae, K., Sone, Y., Kakutu, M. & Misaki, A. (1990). Purification and characterization of pectinesterase from *Ficus awkeotsang*. *Biol. Chem.*, *54(6)*, 1469-1476.
- Korkina L. G. & Afanas'ev I. B. (1997). Antioxidant and chelating properties of flavonoids. *Adv. Pharmacol.*, *38*, 151-63.
- Korner, B., Zimmermann, G., & Berk, Z. (1980). Orange pectinesterase: purification properties and effect on cloud stability. *J. Food Sci.*, *45*, 1203-1206.
- Kulp, K. (1975). *Carbohydrate*. In "Enzymes in Food Processing". ed. By Reed, G. Academic Press. New York, 107-122.
- Kupeli, E., Sahin, F. P., Yesilada, E., Cali, I., & Ezer, N. (2007). In vivo anti-inflammatory and antinociceptive activity evaluation of phenolic compounds from *Sideritis stricta*. *Z.. Naturforsch.*, *62*, 519-525.
- Kusznierewicz B., Smiechowska A., Bartoszek A., Wolska L., & NamieSnik J. (2008). The effect of heating and fermenting on antioxidant properties of white cabbage. *Food Chem.*, *108*, 853-861.
- Ladaniya, M. S. (2008). *Citrus Fruit Biology, Technology and Evaluation*. (1st ed.) Elsevier, USA.
- Lam, R. Y., Woo, A. Y., Leung, P. S., & Cheng, C. H. (2007). Antioxidant actions of phenolic compounds found in dietary plants on low-density lipoprotein and erythrocytes in vitro. *J. Am. Coll. Nutr.*, *26*, 233-242.
- Leach A. J., Leach D.N., & Leach G. J. (1988). Antibacterial activity of some medical plants of Papua New Guinea. *Sci. New Guinea*, *14*, 1-7.
- Lee, M. & MacMillan, J. D. (1968). Mode of action of pectin enzymes. I.

- Purification and certain properties of tomato pectinesterase *Biochemistry*, 7, 4025-4030.
- Lee, M. & MacMillan, J. D. (1970a). Mode of action of pectic enzyme. III. Site of initial action of tomato pectinesterase on highly esterified pectin. *Biochemistry*, 9(9), 1930-1934.
- Lee, Y. S. & Wiley, R. C. (1970b). Measurement and partial characterization of pectinesterase in apple fruits. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 95, 465-468.
- Lee, C. Y., Bourne, M. C., & Van Buren, J. P. (1979a). Effect of blanching treatments on the firmness carrots. *J. Food Sci.*, 44, 615-620.
- Lee, C. Y., Smith, N. L., & Nelson, R. R. (1979b). Relationship between pectin methylesterase activity and the formation of methanol in concord grape juice and wine. *Food Chem.*, 4, 143-149.
- Lee, H. G., Lee, K. S., Lee, S. H., Choe, E. O., & Park, K. H. (2001). Characterization of pectinolytic enzyme and blanching condition of raw carrots. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 30, 228-233.
- Lee, K. W., Kim, Y. J., Lee, H. J., & Lee, C. Y. (2003). Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 7292-7295.
- Leite, K. M. D. S. C., Tadiotti, A. C., Baldochi, D., & Oliveira, O. M. M. F. (2006). Partial purification, heat stability and kinetic characterization of the pectinmethylesterase from Brazilian guava, *Paluma* cultivars. *Food Chem.*, 94, 565-572.
- Levand, O. & Larson, H. O. (1979). Some chemical constituents of *Morinda citrifolia*. *Planta. Med.*, 36, 186-187.
- Li, R. W., Myers, S. P., Leach, D. N., Lin, G. D., & Leach, G. (2003). A

- cross-cultural study: Anti-inflammatory activity of Australian and Chinese plants. *J. Ethnopharmacol.*, 85, 25-32.
- Lim, Y. M & Chung, M. C. M. (1989). Pectin methylesterase from papaya: Isolation and characterisation. In Proceedings of the 7th World Congress of Food Science and Technology, October 1987, Singapore. *Singapore Institute of Food Sci. Tech.*, 75-77.
- Lin, T., Lin, C., Chen, S. & Wang, W. (1989). Purification and characterization of pectin methylesterase from *Ficus awkeotsang makino achenes*. *Plant Physiol.*, 91, 1445-1453.
- Lin, C. C., Hung, P. F., & Ho, S. C. (2008). Heat treatment enhances the NO-suppressing and peroxynitrite-intercepting activities of kumquat (*Fortunella margarita Swingle*) peel. *Food Chem.*, 109, 95-103.
- Liners, F., Letesson, J. J., Didembourg, C., & Van Cutsem, P. (1989). *Plant Physiol.*, 91, 1419-1424.
- Lineweaver, H. & Ballou, G. A. (1945). The effect of cations on the activity of alfalfa pectinesterase (pectase). *Arch. Biochem.*, 6, 373.
- Locher, C. P., Burch, M. T., Mower, H. F., Berestecky, J., Davis, H., Van Poel, B., Lasure, A., Vanden Berghe, D. A., & Vlietinck, A. J. (1995). Anti-microbial activity and anti-complement activity of extracts obtained from selected Hawaiian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.*, 49, 23-32.
- Locher, C. P., Witvrouw, M., De Béthune, M.-P., Burch, M. T., Mower, H. F., Davis, H., Lasure, A., Pauwels, R., De Clercq, E., & Vlietinck, A. J. (1996). Antiviral activity of Hawaiian medicinal plants against human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1). *Phytomedicine*, 2, 259-264.
- Lourenco, E. J. & Catutani, A. T. (1984). Purification and properties of

- pectinesterase from papaya. *J. Sci. Food Agric.*, *35*, 1120-1127.
- Ly-Nguyen, B., Van Loey, A. M., Fachin, D., Verlent, I., Indrawati & Hendrickx, M. E. (2002a). Partial purification, characterisation and thermal and high-pressure inactivation of pectin methylesterase from carrots (*Daucus carota* L.). *J. Agric. Food Chem.*, *50*, 5437-5444.
- Ly-Nguyen, B., Van Loey, A. M., Fachin, D., Verlent, I., & Hendrickx, I. M. (2002b). Purification, characterization, thermal, and high-pressure inactivation of pectin methylesterase from bananas (cv *Cavendish*). *Biotechnol. Bioeng.*, *78*(6), 683-691.
- MacDonald, H. M., Evans, R., & Spencer, W. J. (1993). Purification and properties of the major pectinesterase in lemon fruits (*Citrus limon*). *J. Sci. Food Agric. Sacher*, *68*.
- MacDonnell, L. R., Jansen, E. F., & Lineweaver, H. (1945). The properties of orange pectinesterase. *Arch. Biochem.*, *6*, 389-401.
- Manzocco, L., Calligaris, S., Mastrocola, D., Nicoli, M. C., & Lerici, C. R. (2001). Review of non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. *Trends Food Sci. Technol.*, *11*, 340-346.
- Markovic, O. & Slezarik, A. (1969). Isolation and partial characterization of pectinesterase from tomatoes. *Coll. Czech. Chem. Commun.* *34*, 3820.
- Markovic, O. & Patocka, J. (1977). Action of iodine on the tomato pectinesterase. *Experientia*, *33*(6), 711-713.
- Markovic, O. (1978). Pectinesterase from carrot (*Daucus carota* L.). *Cell. Mol. Life Sci.*, *34*(5), 561-562.
- Markovic, O. & Jornvall, H. (1986). Pectinesterase. The primary structure of the tomato enzyme. *Eur. J. Biochem.*, *158*(3), 455-462.
- McClatchey, W. (2002). From Polynesian healers to health food stores:

- changing perspectives of *Morinda citrifolia* (Rubiaceae). *Integral Cancer Therapy, 1*, 110-120.
- McKoy, M. L. G., Thomas, E. A., & Simon, O. R., (2002). Preliminary investigation of the anti-inflammatory properties of an aqueous extract from *Morinda citrifolia* (Noni). *Pharmacol. Soc.*, *45*, 76-78.
- Millonig C., Stadlmann S., & Vogel W. (2005). Herbal hepatotoxicity: acute hepatitis caused by a noni preparation (*Morinda citrifolia*). *Eur. J. Gastroenterol Hepatol*, *17*, 445-447.
- Mohd, Z., Abdul-Hamid, A., & Osman, A. (2001). Antioxidative activity extracts from Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) root, fruit and leaf. *Food Chem.*, *78*, 227-231.
- Morton, J. F. (1992). The ocean-going Noni, or Indian mulberry (*Morinda citrifolia*, Rubiaceae) and some of its "colorful" relatives. *Econ. Bot.*, *46*, 241-256.
- Naczki M. & Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, *41*, 1523-1542.
- Nakagawa, H., Yanagawa, Y., & Takenhana, H. (1970). Studies on the pectolytic enzyme. Part V. Some properties of the purified tomatoes pectinesterase. *Agric. Biol. Chem.*, *34*, 998-1003.
- Nari, J., Noat, G., & Ricard, J. (1991). Pectin methylesterase, metal ions and plant cell- wall extension. *Biochem. J.*, *279*, 343-350.
- Nayak, B. S., Isitor, G. N., Maxwell, A., Bhogadi, V., & Ramdath, D. D (2007). Wound-healing activity of *Morinda citrifolia* fruit juice o diabetes-induced rats. *J. Wound. Care.*, *16*, 83-86.
- Nelson, S. C. (2003). *Noni Cultivation and Production in Hawaii*. In

- Proceedings of the 2002 Hawaii Noni Conference*. University of Hawaii at Nanao. College of Tropical Agriculture and Human Resources. Hawaii.
- Nelson, S. C. & Elevitch, C. R. (2006). *Noni: the complete guide for consumer and grower*. Holualoa: Permanent Agriculture Resources (PAR). USA.
- Newton, K. (2003). *Production of Noni Juice and Powder in Samoa*. From: *Proceedings of the 2002 Hawaii Noni Conference*. University of Hawaii at Manoa, College of Tropical Agriculture and Human Resources.
- Nicoli, M. C., Anese, M., Parpinel, M. T., & Franceschi, S. (1999). Influence of processing on the antioxidant properties of fruits and vegetables. *Trends Food Sci. Technol.*, 10, 94-100.
- Nijveldt R. J., van Nood E., van Hoorn D. E., Boelens P. G., van Norren K., & van Leeuwen P. A. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.*, 74, 418-425.
- Nunes, C. S., Castro, S. M., Saraiva, J. A., Coimbra, M. A., Hendrickx, M. E., & Van Loey, A. M. (2006). Thermal and high-pressure stability of purified pectin methylesterase from plums (*Prunus domestica*). *J. Food Biochem.*, 30, 138-154.
- ONEILL, M. A., & YORK, W. S. (2003). The composition and structure of plant primary cell walls. *Plant Rev.*, 8, 1-35.
- Opinion on a request from the Commission related to the safety of Noni juice (juice of the fruits of *Morinda citrifolia*). (2006). *EFSAJ*, 376, 1-12.

- Palu, A. K., Kim, A. H., West, B. J., Deng, S., Jensen, J., & White, L. (2008). The effects of *Morinda citrifolia* L. (noni) on the immune system: its molecular mechanisms of action. *J. Ethnopharmacol.*, *115*, 502-506.
- Pawlus A. D. & Kinghorn D. (2007). Review of the ethnobotany, chemistry, biological activity and safety of the botanical dietary supplement *Morinda citrifolia* (noni). *J. Pharm. Pharmacol.*, *59*, 1587-1609.
- Pear J. R., Kawagoe Y, Schreckengost W. E., Delmer D. P., & Stalker D.M. (1996). Higher plants contain homologs of the bacterial celA genes encoding the catalytic subunit of cellulose synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *93*, 12637-12642
- Pereira M. A., Grubbs C. J., Barnes L. H., Li H., Olson G. R., & Eto I. (1996). Effects of the phytochemicals, curcumin and quercetin, upon azoxymethane-induced colon cancer and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary cancer in rats. *Carcinogenesis*, *17*, 1305-1311.
- Perez-Vizcaino F., Ibarra M., Cogolludo A. L., Duarte J., Zaragoza-Arnez F., & Moreno L. (2002). Endotheliumindependent vasodilator effects of the flavonoid quercetin and its methylated metabolites in rat conductance resistance arteries. *J. Pharmacol Exp. Ther.*, *302*, 66-72.
- Pihlanto, L. (2000). Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: Opioid and ace-inhibitory. *Trends Food Sci. Technol.*, *11*, 347-356.
- Pignatelli P., Pulcinelli F. M., Celestini A., Lenti L., Ghiselli A., &

- Gazzaniga P. P. (2000). The flavonoids quercetin and catechin synergistically inhibit platelet function by antagonizing the intracellular production of hydrogen peroxide. *Am. J. Clin. Nutr.*, 72, 1150-1155.
- Piskula, M. K. & Terao, J. (1998). Accumulation of (-)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues. *J. Nutr.*, 128, 1172-1178.
- Popper, Z. A. & Fry, S. (2007). Xyloglucan-pectin linkages are formed intra-protoplasmically, contribute to wall-assembly, and remain stable in the cell wall. *Planta.*, 227, 781-794.
- Potterat, O. & Hamburger, M. (2007). *Morinda citrifolia* (noni) fruit —phytochemistry, pharmacology, safety. *Planta. Med.*, 73, 191-199.
- Pressey, R. & Avanes, J. K. (1972). Multiple forms of pectinesterase in tomatoes. *Phytochemistry*, 11, 3139-3142.
- Puri, A., Solomos, T., & Kramer, A. (1982). Partial purification and characterization of potato pectinesterase. *Food Chem.*, 8, 203-213.
- Raffo A., La Malfa G., Fogliano G. & Quaglia G. (2006). Seasonal variation in antioxidant components of cherry tomatoes (*Lycopersicon esculentum* cv. Naomi F1). *J. Food Compost. Anal.*, 19, 11-19.
- Recamales, A.F., Sayago, González-Miret, M. L., & Hernanz, D. (2006). The effect of time and storage conditions on the phenolic composition and colour of white wine. *Food Res. Int.*, 39, 220-229.
- Reiter W.D. (1994). *Structure, synthesis, and function of the plant cell wall*. In EM Meyerowitz, CR Somerville, eds, *Arabidopsis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 955-988.
- Ren, M. Q., Kuhn, G., Wegner, J. & Chen J. (2001). Isoflavones,

- substances with multibiological and clinical properties. *Eur. J. Nutr.*, *40*, 135-146.
- Ribéreau-Gayon P. (1968). *Les Composes Phénoliques des Végétaux*. Dunod, Paris, 96-118.
- Ridley, B. L., O'Neill, M. A., & Mohnen, D. (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and oligosaccharide-related signalling. *Phytochemistry*, *57*, 929-967.
- Rillo, L., Castaldo, D. Giovand, A., Servillo, L., Balestrieri, C., & Quagliuolo, L. (1992). Purification and properties of pectin methylesterase from Mandarin orange fruit. *J. Agric. Food Chem.*, *40*, 591-593.
- Rouse, A. H. (1953). Distribution of pectinesterase and total pectin in component parts of citrus fruits. *Fd. Technol.*, *7*, 360-362.
- Rouse, A. H., Atkins, C. D., and Moore, E. L. (1965). Seasonal changes occurring in pectin esterase activity and pectic constituents of component parts of citrus fruit. *Fd. Technol.*, *19*, 673-676.
- Rutin - Wikipedia, the free encyclopedia*. (2010, June 22). Retrieved June 29, 2010, from the World Wide Web: <http://en.wikipedia.org/wiki/Rutin>
- Sang, S., Cheng, X., Zhu, N., Stark, R. E., Badmaev, V., Ghai, G., Rosen, R. T., & Ho, C. T. (2001). Flavonol glycosides and novel iridoid glycoside from the leaves of *Morinda citrifolia*. *J. Agric. Food Chem.*, *49*, 4478-4481.
- Santos-Buelga, C. & Scalbert, A. (2000). Proanthocyanidins and tannin-like compounds-nature, occurrence dietary intake and effects on nutrition and health. *J. Sci. Food Agri.*, *80*, 1094-1117.
- Schofield, D. M., Mbugua, D. M., & Pell, A. N. (2001). Analysis of

- condensed tannins: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.*, *91*, 21-40.
- Scopoletin* - *Wikipedia, the free encyclopedia*. (2010, June 11). Retrieved June 29, 2010, from the World Wide Web: <http://en.wikipedia.org/wiki/Scopoletin>
- Selloum L., Bouriche H., Tigrine C. & Boudoukha C. (2003). Antiinflammatory effect of rutin on rat paw oedema, and on neutrophils chemotaxis and degranulation. *Exp. Toxicol. Pathol.*, *54*, 313-318.
- Seymour, T. A., Preston, J. F., Wicker, L., Lindsay, J. A., & Marshall, M. R. (1991). Purification and properties of pectinesterase of marsh white grapefruit pulp. *J. Agric. Food Chem.*, *39*, 1080-1085.
- Sfakianos, J., Coward, L., Kirk, M., & Barnes, S., (1997). Intestinal uptake and biliary excretion of the isoflavone genistein in rats. *J. Nutr.*, *128*, 1172-1178.
- Shahidi, F. (2000). Antioxidants in food and food antioxidants. *Nahrung*, *44*, 158-163.
- Shahidi, F. (2002). *Antioxidants in plants and oleaginous seeds, in Free Radicals in Food: Chemistry, Nutrition, and Health Effect*. Morello, M. J., Shahidi, F., and Ho. C-T., Eds., ACS Symposium Series 807.
- Shahidi, F. & Naczk, M. (2004). *Phenolics in Food and Nutraceuticals: Sources, Applications and Health Effects*. CRC Press, Boca Raton, FL. American Chemical Society. Washington, D. C., 162-175.
- Shovic, A. C. & Whistler, W. A. (2001). Food sources of provitamin A and vitamin C in the American Pacific. *Trop. Scie.*, *41*, 199-202.
- Sila, D. N., Smout, C., Satara, Y., Truong, V., Loey, A. V., & Hendrickx, M. (2007). Combined thermal and high pressure effect on carrot pectin methylesterase stability and catalytic activity. *J. Food Eng.*, *78*, 755-764.

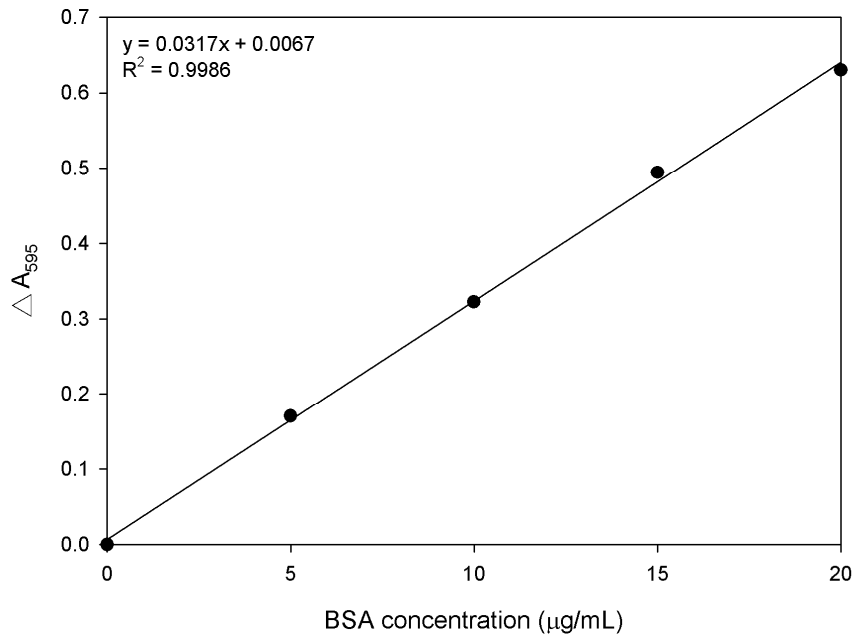
- Solomon, N. (1999). *The noni phenomenon*. Direct source publishing, Utah, 62-70.
- Spencer, J. P., Chowrimootoo, G., Choudhury, R., Debnam, E. S., Srail, S. K., & Rice-Evans, C. (1999). The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. *FEBS Lett.*, *458*, 224-230.
- Stadlbauer V., Fickert P., Lackner C., Schmerlaib J., Krisper P., & Trauner M. (2005). Hepatotoxicity of noni juice: report of two cases. *World J. Gastroenterol*, *11*, 4758-4760.
- Sun, B., Ricardo-da-Silva, J.M., & Spranger, I. (1998). Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *J. Agric Food Chem.*, *46*, 4267-4274.
- Sun, T., Powers, J. R., & Tang, T. (2007). Loss of rutin and antioxidant activity of asparagus juice caused by a pectolytic enzyme preparation from *Aspergillus niger*. *Food Chem.*, *105*, 173-178.
- Sung, S. H., Park, J. H., & Kim, Y. C. (1998). Hepatoprotective activity of scopoletin, a constituent of *Solaumly artum*. *Arch. Pharmacol. Res.*, *21*, 718-722.
- Taylor, A. J., Brown, J. M., & Downie, L. M. (1981). The effect of processing on the texture of canned mung bean (*Phaseolus aureus*) shoots. *J. Sci. Food Agric.*, *32*, 134-138.
- Theron, T., De Villiers, O. T., & Schmidt, A. A. (1977). Isolation and purification of pectin methylesterase from marvel tomatoes. *Agrochemophysica*, *9(4)*, 93-96.
- Tripoli, E., Guardia, M. L., Giammanco, S., Majo, D. D., & Giammanco, M. (2007). Citrus Flavonoids: Molecular Structure, Biological Activity and Nutritional Properties: A Review. *Food Chem.*, *104*, 466-479.

- Tucker, G. A., Robertson, N. G., & Grierson, D. (1982). Purification and changes in activities of tomato pectinesterase isozymes. *J. Sci. Food Agric.*, 33, 396-400.
- Ünal, M. Ü. & Bellur, E. (2009). Extraction and characterisation of pectin methylesterase from black carrot (*Daucus carota* L.). *Food Chem.*, 116, 836-840.
- van Sumere, C. F. (1989). *Phenols and phenolic acids, in Methods in Plant Biochemistry, Volume 1, Plant Phenolics*. Harborne, J. B., Ed., Academic Press, London, 29-74.
- Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L., & Oomah, B. P. (1998). Antioxidant activity and total polyphenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 4113-4117.
- Versari, A., Boulton, R. B., Parpinello, & G. P. (2008). A comparison of analytical methods for measuring the color components of red wines. *Food Chem.*, 106, 397-402.
- Versteeg, C., Romboouts, F. M., & Pilnik, W. (1978). Purification and some characteristics of two pectinesterase isozymes from orange. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 11, 267-274.
- Vivar-Vera, M. A., Salazar-Montoya, J. A., Calva-Calva, G., & Ramos-Ramírez, E. G. (2007). Extraction, thermal stability and kinetic behavior of pectinmethylesterase from hawthorn (*Crataegus pubescens*) fruit. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 40, 278-284.
- Walle, U. K., Galijatovic, A. & Walle, T. (1999). Transport of flavonoid chrysin and its conjugated metabolites by the human intestinal cell line Caco-2. *Biochem. Pharmacol.*, 58, 431-438.
- Wang, M. Y. & Su, C. (2001). Cancer preventive effect of *Morinda*

- citrifolia* (noni). *Ann. NY Acad. Sci.*, 952, 161-168.
- Wang M. Y., West B. J., Jensen C. J., Nowicki D., Su C., Palu A. K., & Anderson, G. (2002). *Morinda citrifolia* (noni): a literature review and recent advances in noni research. *Acta. Pharmacol. Sin.*, 23(12), 1127-1141.
- Waterman, P.G. & Mole, S. (1994). *Analysis of plant phenolic metabolites*. Blackwell, Oxford, U.K.
- West, B. J. (2006). Hepatotoxicity from interferon-beta, not noni juice. *Digestion*, 74, 47-48.
- Wicker, L., Braddock, R. J., & Vassallo, M. R. (1987). Effect of assay temperature on activity of citrus pectinesterase in fresh orange juice. *J. Food Sci.*, 52, 378-380.
- Wong, D. W. S., (1995). *Food Enzymes: Structure and Mechanism*. Chapman & Hall, New York, 212-236.
- Wu, J., & Ding, X. (2002). Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. *Food Res. Int.*, 35, 367-375.
- Wu, M. C., Jiang, C. M., Huang, P. H., Wu, M. Y. & Wang, Y. T. (2007). Separation and utilization of pectin lyase from commercial pectic enzyme via highly methoxylated cross-linked alcohol insoluble solid chromatography for wine methanol reduction. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 1557-1562.
- Yamaguchi, S., Ohnishi, J., Sogawa, M., Maru, I., Ohta, Y., & Tsukada, Y. (2002). Inhibition of angiotensin I converting enzyme by noni (*Morinda citrifolia*) juice. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 49, 624-627.
- Yang, J., Gadi R., Paulino R., & Thomson T. (2010). Total phenolics,

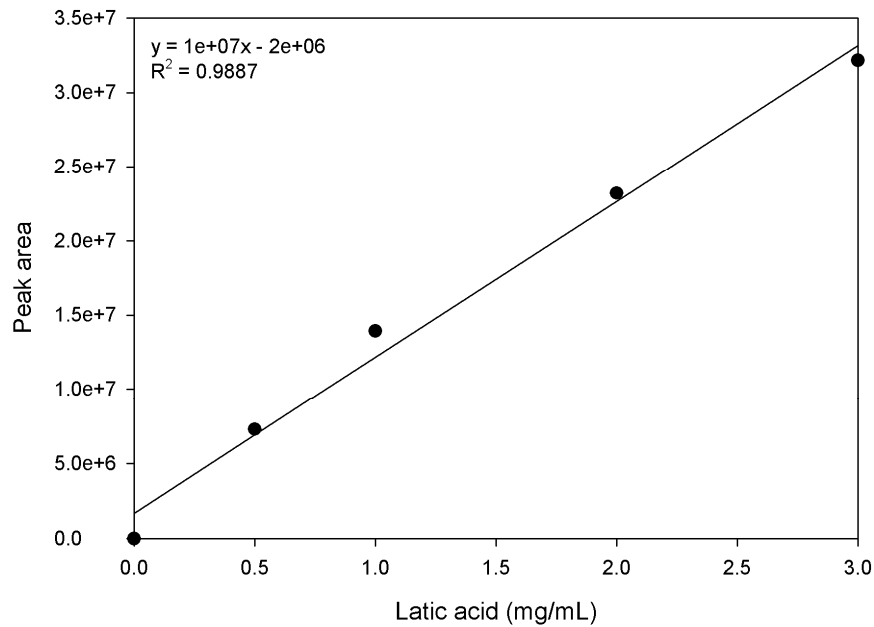
- ascorbic acid, and antioxidant capacity of noni (*Morinda citrifolia* L.) juice and powder as affected by illumination during storage. *Food Chem.*, 122(3), 627-632.
- Yang, J., Paulino, R., Janke-Stedronsky, S., & Abawi, F. (2007a). Free-radical scavenging activity and total phenols of noni (*Morinda citrifolia* L.) juice and powder in processing and storage. *Food Chem.*, 102, 302-308.
- Yang, S. C., Chen, T. I., Li, K. Y., & Tsai, T. C. (2007b). Change in phenolic compound content, reductive capacity and ACE inhibitory activity in noni juice during traditional fermentation. *J. Food Drug Anal.*, 15, 290-298.
- Yen, G. C. & Chen, H. Y. (1995). Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 27-32.
- Youngken, H. W. S., Jenkins, H. J., & Butler, C. (1960). Studies on *Morinda citrifolia* L. II. *J. Am. Pharm. Assoc.*, 49, 271-273.
- Zablackis, E., Huang, J., Muller, B., Darvill, A. G., & Albersheim, P. (1995). Characterization of the Cell-Wall Polysaccharides of *Arabidopsis thaliana* Leaves. *Plant Physiol.*, 107, 1129-1138.
- Zeringue, H. J. (1992). Effects of C6-C10 alkenals and alkanals on eliciting a defence response in the developing cotton boll. *Phytochem.*, 31, 2305-2308.
- Zobel, A. M., Wang, J., March, R. E. & Brown, S. A. (1991). Identification of eight coumarins occurring with psoralen, xanthotoxin, and bergapten on leaf surfaces. *J. Chem. Ecol.*, 17, 1859-1870.

柒、附錄



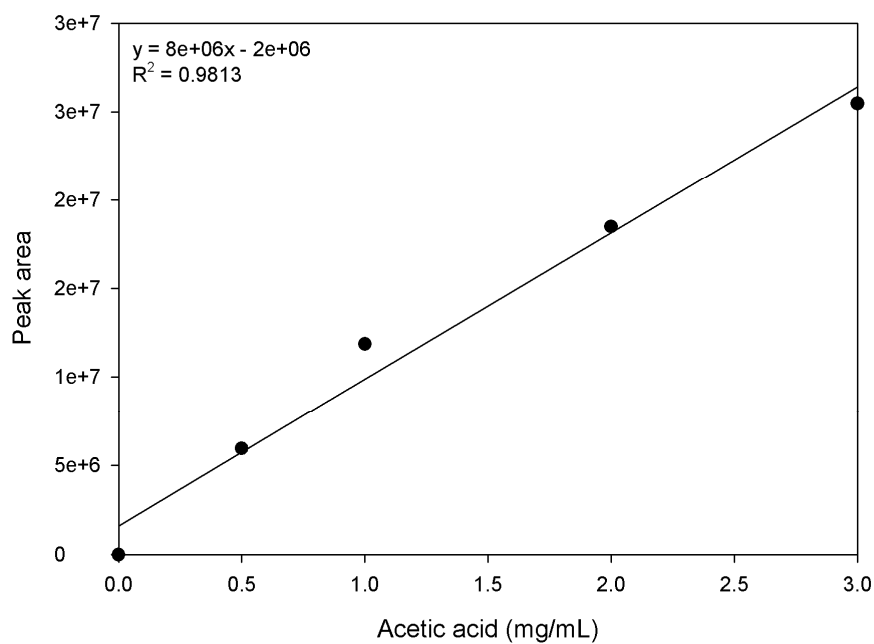
附錄一、牛血清蛋白之標準曲線

Appendix 1. Standard curve of BSA for protein assay.



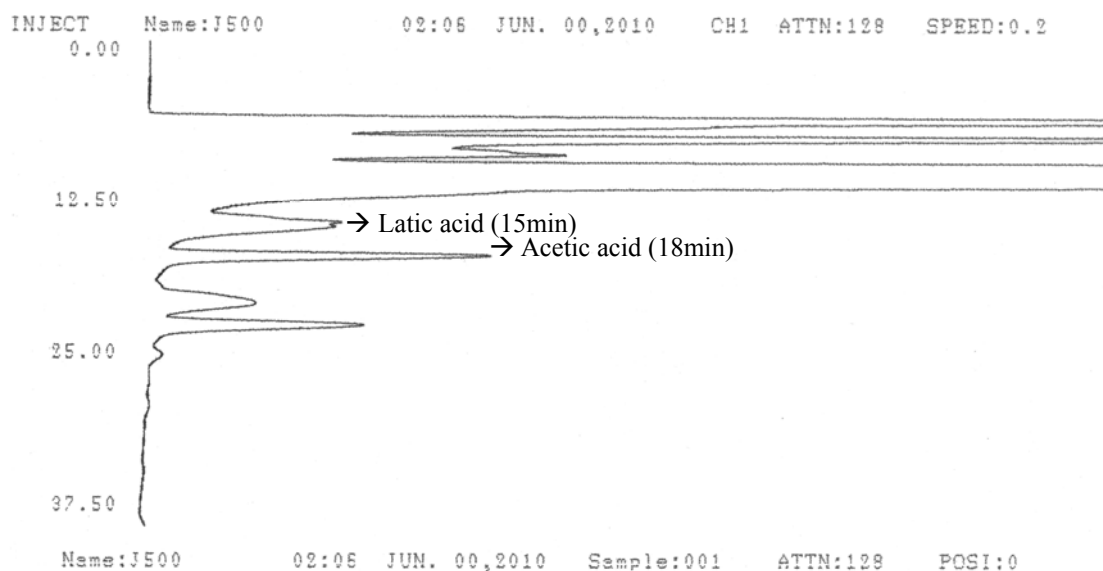
附錄二、乳酸之標準曲線

Appendix 2. Standard curve of lactic acid for organic acid assay.



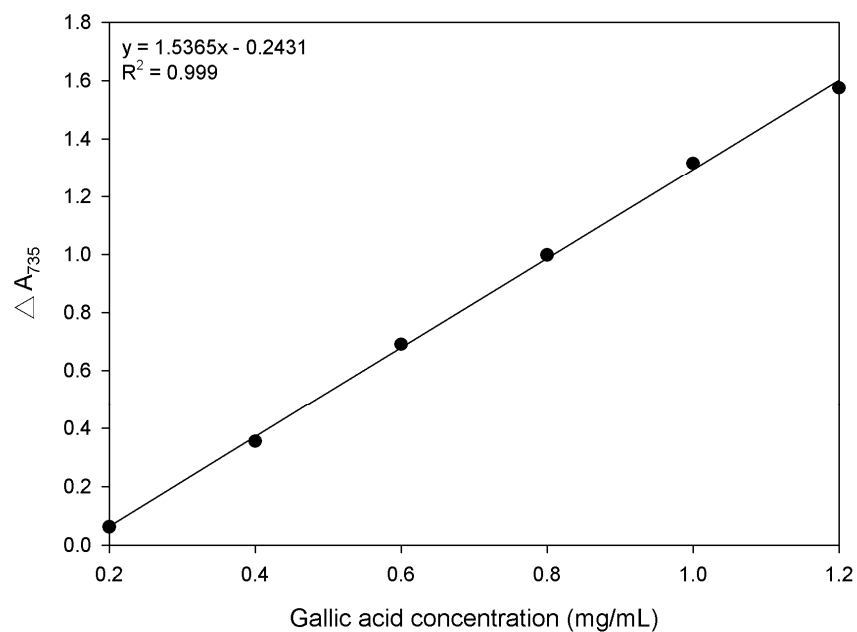
附錄三、醋酸之標準曲線

Appendix 3. Standard curve of acetic acid for organic acid assay.



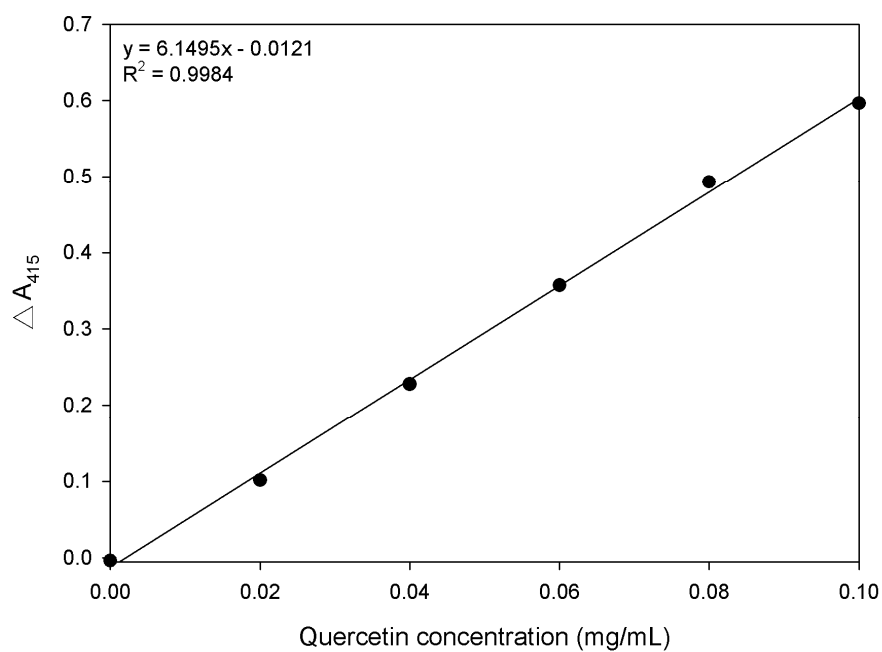
附錄四、典型的有機酸分析之樣品層析圖譜

Appendix 4. Typical chromatogram for organic acid assay.



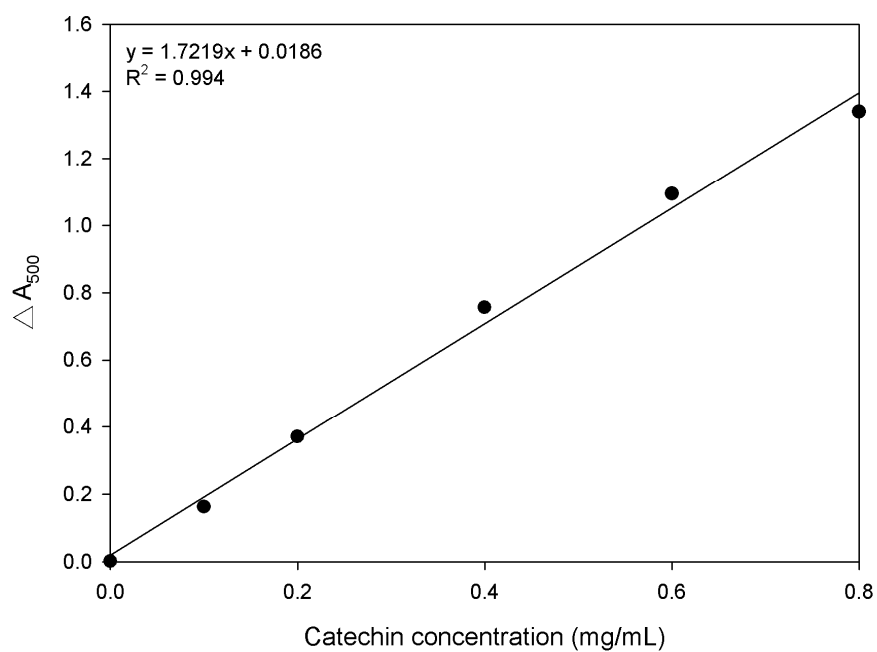
附錄五、沒食子酸之標準曲線

Appendix 5. Standard curve of gallic acid for total phenolic compounds.



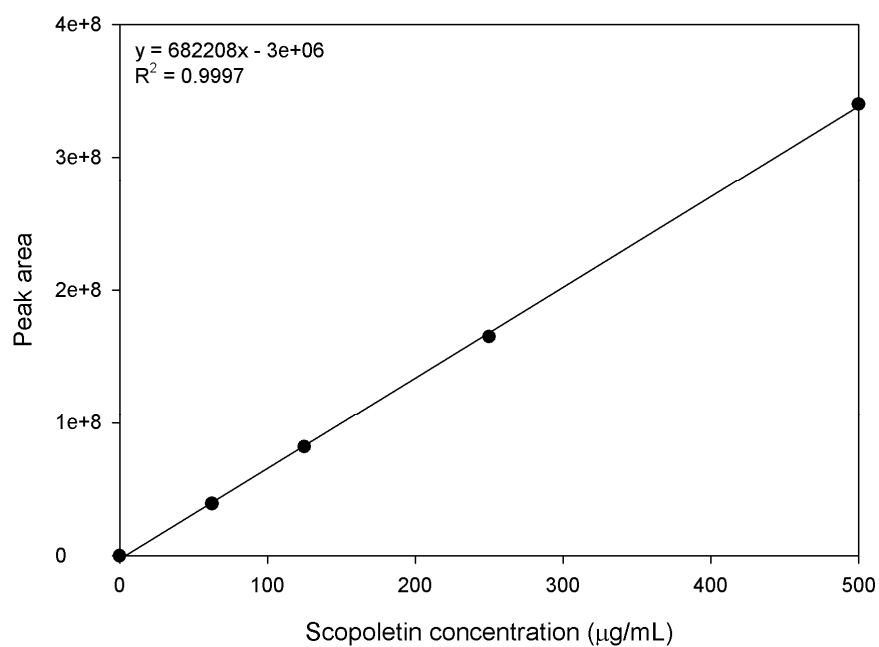
附錄六、槲皮酮之標準曲線

Appendix 6. Standard curve of quercetin for flavonoid.



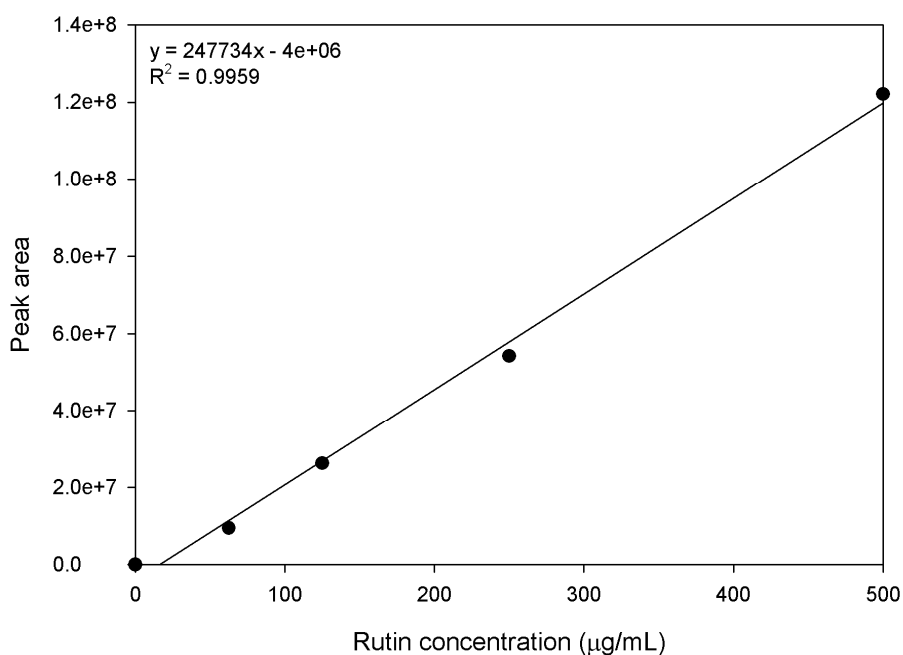
附錄七、兒茶素之標準曲線

Appendix 7. Standard curve of (+)-catechin for condensed tannin.



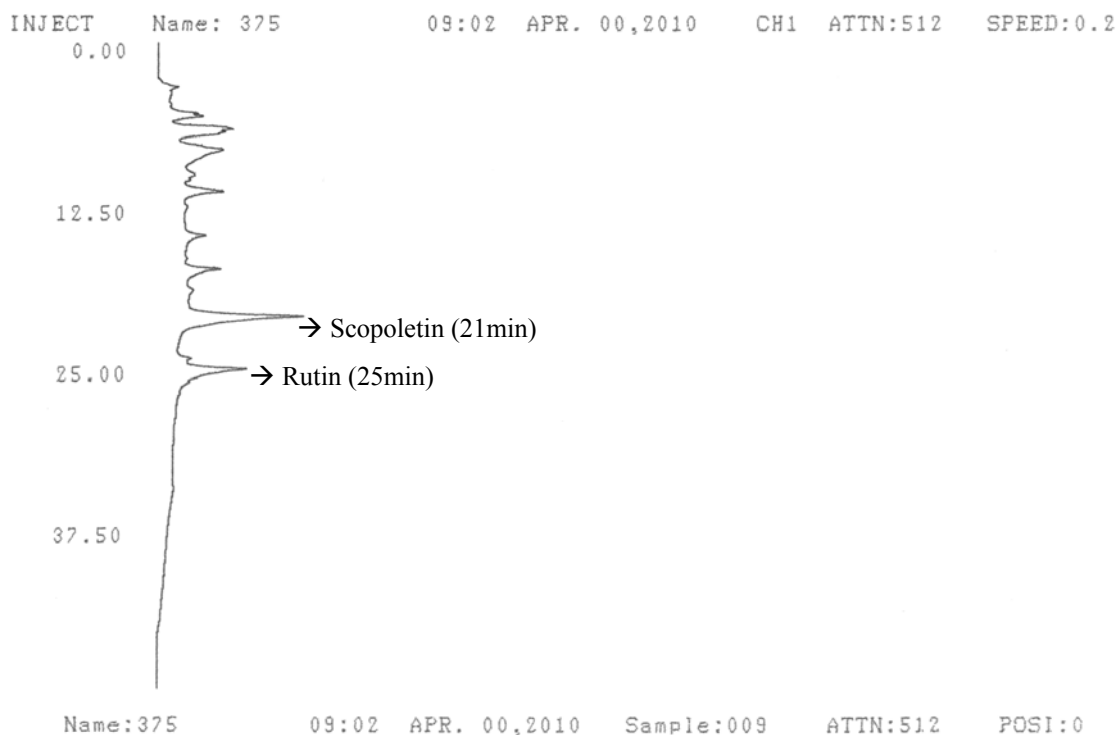
附錄八、東莨菪素之標準曲線

Appendix 8. Standard curve of scopoletin for RP-HPLC.



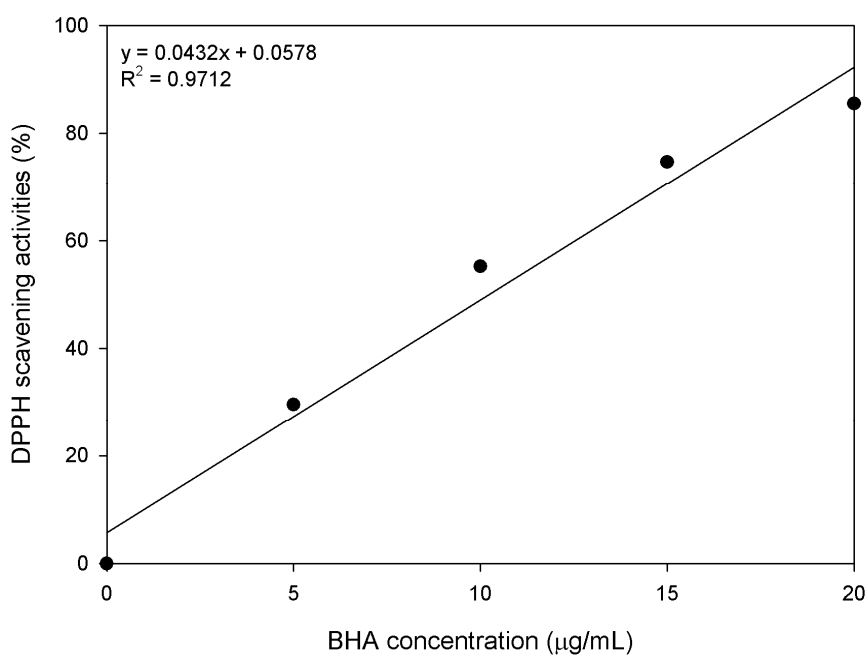
附錄九、芸香素之標準曲線

Appendix 9. Standard curve of rutin for RP-HPLC.



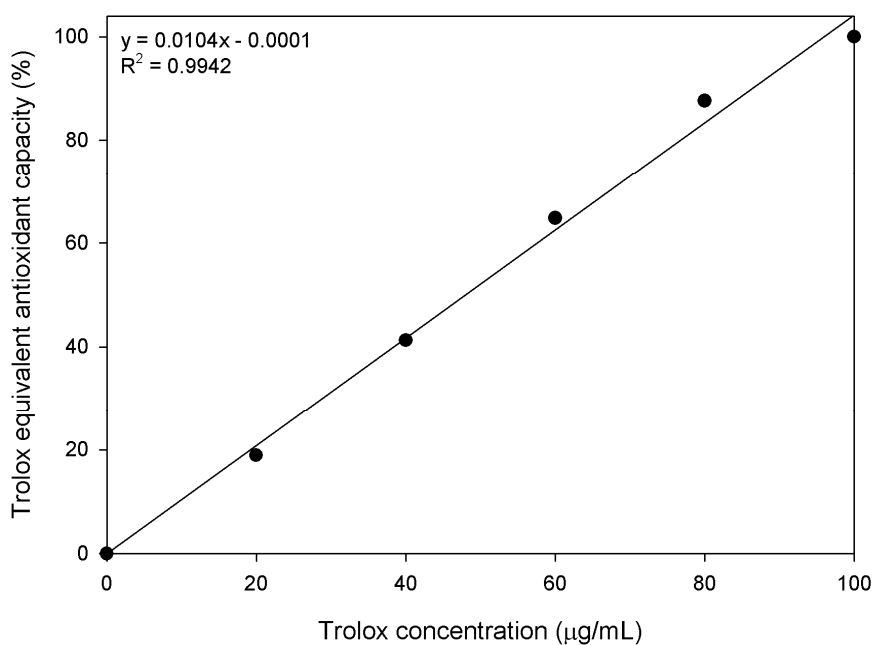
附錄十、典型的東莨菪素與雲香素測定之樣品層析圖譜

Appendix 10. Typical chromatogram for scopoletin and rutin assay.



附錄十一、BHA 之標準曲線

Appendix 11. Standard curve of BHA for DPPH scavenging activities.



附錄十二、Trolox 之標準曲線

Appendix 12. Standard curve of Trolox for Trolox equivalent antioxidant capacity.

附錄十四、反應溫度對諾麗果 PME 活性的影響

Appendix 14. Effect of temperature on activity of PME from noni.

Isozymes	Temp (°C)					Temp (°C)				
	Activity (Unit/mL)					Relative activity (%)				
	30	40	50	60	70	30	40	50	60	70
PME-A	2.63	3.82	5.81	7.48	5.79	100.00	145.34	221.06	284.25	220.11
PME-B	0.43	0.66	1.09	1.75	2.73	100.00	151.50	253.01	405.06	631.69

附錄十五、諾麗果 PME 之溫度耐受性

Appendix 15. Thermal stability of PME from noni.

Isozymes	Temp (°C)							Temp (°C)						
	Activity (Unit/mL)							Relative activity (%)						
	30	40	50	60	70	80	90	30	40	50	60	70	80	90
PME-A	2.56	2.57	2.50	2.38	0.43	-0.02	-0.01	100.00	100.19	97.50	92.63	16.64	-0.60	-0.20
PME-B	0.41	0.40	0.39	0.39	0.18	-0.03	-0.06	100.00	96.04	94.76	94.20	43.63	-8.03	-14.71

附錄十六、不同發酵時間的諾麗果汁之產率 (%)

Appendix 16. The total yield (%) of noni juice at different fermentation time

Fermentation time (weeks)	Temp (°C)			
	25	35	45	55
0	33.17 ± 5.38 ^f			
1	39.84 ± 1.74 ^{cde}	42.38 ± 0.87 ^{abc}	39.27 ± 0.27 ^{de}	37.45 ± 1.21 ^e
2	43.58 ± 0.02 ^{ab}	43.75 ± 0.58 ^{ab}	39.87 ± 0.30 ^{cde}	37.86 ± 0.37 ^e
3	44.29 ± 1.94 ^a	45.26 ± 0.83 ^a	42.50 ± 0.58 ^{abc}	40.01 ± 1.19 ^{cde}
4	45.25 ± 1.05 ^a	44.61 ± 0.94 ^a	41.05 ± 0.32 ^{bcd}	37.77 ± 0.86 ^e

Each value is the mean ± standard deviation ($n = 3$).

^{a-c} Mean in the same column with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

附錄十七、不同發酵時間的諾麗果汁之 pH 值

Appendix 17. The pH value of noni juice at different fermentation time

Fermentation time (weeks)	Temp (°C)			
	25	35	45	55
0	3.64 ± 0.00 ^{abc}			
1	3.58 ± 0.02 ^{gf}	3.59 ± 0.00 ^{ef}	3.64 ± 0.01 ^{ab}	3.65 ± 0.01 ^a
2	3.55 ± 0.06 ^g	3.59 ± 0.01 ^{ef}	3.63 ± 0.01 ^{abcde}	3.64 ± 0.00 ^{abc}
3	3.62 ± 0.06 ^{abcdef}	3.60 ± 0.01 ^{cdef}	3.64 ± 0.01 ^{abcd}	3.65 ± 0.00 ^a
4	3.61 ± 0.03 ^{bcdef}	3.60 ± 0.01 ^{def}	3.64 ± 0.01 ^{abcd}	3.65 ± 0.01 ^a

Each value is the mean ± standard deviation ($n = 3$).

^{a-f} Mean in the same column with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

附錄十八、不同發酵時間的諾麗果汁之可溶性固形物 (以糖度表示)

Appendix 18. The soluble solid ($^{\circ}$ Brix) of noni juice at different fermentation time

Fermentation time (weeks)	Temp ($^{\circ}$ C)			
	25	35	45	55
0	10.20 \pm 0.10 ^e			
1	10.03 \pm 0.61 ^{ef}	11.27 \pm 0.12 ^{abc}	11.33 \pm 0.06 ^{abc}	11.10 \pm 0.00 ^{ef}
2	9.93 \pm 0.32 ^{ef}	11.50 \pm 0.10 ^{ab}	11.53 \pm 0.06 ^a	10.97 \pm 0.06 ^{cd}
3	9.27 \pm 0.49 ^g	11.37 \pm 0.06 ^{abc}	11.27 \pm 0.06 ^{bc}	10.83 \pm 0.06 ^d
4	9.70 \pm 0.00 ^f	11.40 \pm 0.00 ^{ab}	11.40 \pm 0.00 ^{ab}	10.83 \pm 0.15 ^d

Each value is the mean \pm standard deviation ($n = 3$).

^{a-g} Mean in the same column with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

附錄十九、不同發酵時間的諾麗果汁之乳酸含量

Appendix 19. The latic acid content of noni juice at different fermentation time

Fermentation time (weeks)	Temp ($^{\circ}$ C)			
	25	35	45	55
0	1.21 \pm 0.44 ^{abc}			
1	1.44 \pm 0.51 ^{ab}	0.95 \pm 0.14 ^{abcd}	0.46 \pm 0.05 ^{def}	0.87 \pm 0.34 ^{bcde}
2	0.97 \pm 0.32 ^{abcd}	0.75 \pm 0.38 ^{bcdef}	0.45 \pm 0.19 ^{def}	0.13 \pm 0.06 ^f
3	1.08 \pm 0.41 ^{abcd}	0.61 \pm 0.67 ^{cdef}	0.38 \pm 0.16 ^{def}	0.16 \pm 0.04 ^{ef}
4	1.61 \pm 0.85 ^a	0.39 \pm 0.21 ^{def}	0.20 \pm 0.07 ^{ef}	0.67 \pm 0.11 ^{cdef}

The latic acid content was expressed as mg/mL.

Each value is the mean \pm standard deviation ($n = 3$).

^{a-f} Mean in the same column with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

附錄二十、不同發酵時間的諾麗果汁之醋酸含量

Appendix 20. The acetic acid content of noni juice at different fermentation time

Fermentation time (weeks)	Temp (°C)			
	25	35	45	55
0	0.00 ± 0.00 ^c			
1	0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00 ^c	Trace
2	0.95 ± 0.73 ^b	0.02 ± 0.03 ^c	Trace	Trace
3	0.65 ± 0.40 ^{bc}	Trace	Trace	0.07 ± 0.06 ^c
4	1.80 ± 1.46 ^a	Trace	0.03 ± 0.04 ^c	0.17 ± 0.00 ^c

The acetic acid content was expressed as mg/mL.

Each value is the mean ± standard deviation ($n = 3$).

^{a-c} Mean in the same column with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

附錄二十一、不同發酵時間的諾麗果汁之 L* 值

Appendix 21. The L* value of noni juice at different fermentation time

Fermentation time (weeks)	Temp (°C)			
	25	35	45	55
0	75.98 ± 1.98 ^a			
1	52.68 ± 4.21 ^b	49.17 ± 1.63 ^c	38.17 ± 0.62 ^{de}	35.53 ± 1.07 ^{ef}
2	47.40 ± 4.81 ^c	39.22 ± 1.36 ^d	26.39 ± 0.69 ^g	27.44 ± 0.27 ^g
3	48.08 ± 1.15 ^c	32.43 ± 0.32 ^f	19.88 ± 1.09 ^{hi}	20.71 ± 1.35 ^h
4	39.65 ± 1.82 ^d	27.71 ± 1.35 ^g	16.69 ± 0.89 ⁱ	21.58 ± 1.33 ^h

Each value is the mean ± standard deviation ($n = 3$).

^{a-i} Mean in the same column with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

附錄二十二、不同發酵時間的諾麗果汁之 a* 值

Appendix 22. The a* of noni juice at different fermentation time

Fermentation time (weeks)	Temp (°C)			
	25	35	45	55
0	-0.16 ± 0.17 ^h			
1	21.32 ± 0.65 ^g	28.33 ± 0.11 ^{ef}	31.67 ± 3.50 ^{cd}	34.70 ± 1.14 ^{ab}
2	27.22 ± 2.21 ^f	34.13 ± 0.44 ^{abc}	33.91 ± 0.52 ^{abc}	35.49 ± 0.16 ^a
3	28.04 ± 0.42 ^f	32.88 ± 1.06 ^{bc}	32.11 ± 0.45 ^{cd}	33.98 ± 0.72 ^{abc}
4	31.99 ± 0.69 ^{cd}	33.28 ± 1.53 ^{abc}	30.29 ± 2.11 ^{de}	35.46 ± 0.84 ^a

Each value is the mean ± standard deviation ($n = 3$).

^{a-h} Mean in the same column with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

附錄二十三、不同發酵時間的諾麗果汁之 b* 值

Appendix 23. The b* of noni juice at different fermentation time

Fermentation time (weeks)	Temp (°C)			
	25	35	45	55
0	41.11 ± 0.70 ^d			
1	67.84 ± 4.78 ^a	71.96 ± 2.22 ^a	51.34 ± 11.59 ^c	54.05 ± 1.93 ^{bc}
2	68.31 ± 5.58 ^a	59.58 ± 1.89 ^b	39.09 ± 1.11 ^{de}	40.98 ± 0.46 ^d
3	68.34 ± 3.88 ^a	48.67 ± 0.50 ^c	28.16 ± 1.93 ^{fg}	29.67 ± 2.34 ^{ef}
4	59.25 ± 2.64 ^b	41.24 ± 2.37 ^d	22.30 ± 2.36 ^g	31.22 ± 2.31 ^f

Each value is the mean ± standard deviation ($n = 3$).

^{a-g} Mean in the same column with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

附錄二十四、不同發酵時間的諾麗果汁之總酚含量

Appendix 24. The total phenolic compound content of noni juice at different fermentation time

Fermentation time (weeks)	Temp (°C)			
	25	35	45	55
0	1.39 ± 0.02 ^j			
1	1.65 ± 0.02 ^{cdef}	1.64 ± 0.02 ^{defgh}	1.64 ± 0.01 ^{cdefg}	1.63 ± 0.02 ^{defgh}
2	1.63 ± 0.07 ^{defgh}	1.61 ± 0.03 ^{efgh}	1.64 ± 0.02 ^{cdefg}	1.67 ± 0.03 ^{cde}
3	1.56 ± 0.11 ^{hi}	1.58 ± 0.05 ^{fghi}	1.70 ± 0.02 ^{bcd}	1.77 ± 0.02 ^{ab}
4	1.52 ± 0.01 ⁱ	1.57 ± 0.04 ^{ghi}	1.71 ± 0.03 ^{bc}	1.81 ± 0.03 ^a

The total phenolic compound content was expressed as mg of gallic acid equi./mL.

Each value is the mean ± standard deviation ($n = 3$).

^{a-h} Mean in the same column with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

附錄二十五、不同發酵時間的諾麗果汁之類黃酮含量

Appendix 25. The flavonoid content of noni juice at different fermentation time

Fermentation time (weeks)	Temp (°C)			
	25	35	45	55
0	75.27 ± 2.09 ^a			
1	60.09 ± 2.12 ^{bc}	55.21 ± 5.26 ^{cde}	53.26 ± 1.14 ^{def}	52.07 ± 1.72 ^{efg}
2	59.22 ± 1.81 ^{bcd}	49.90 ± 2.09 ^{efgh}	53.15 ± 5.04 ^{def}	51.85 ± 2.12 ^{efg}
3	61.72 ± 0.19 ^b	48.27 ± 0.68 ^{fghi}	46.54 ± 4.59 ^{ghi}	47.95 ± 2.28 ^{fghi}
4	53.59 ± 7.53 ^{def}	42.31 ± 1.72 ^{ij}	40.36 ± 4.23 ^j	43.72 ± 3.58 ^{hij}

The flavonoid content was expressed as µg of quercetin equi./mL.

Each value is the mean ± standard deviation ($n = 3$).

^{a-j} Mean in the same column with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

附錄二十六、不同發酵時間的諾麗果汁之縮合單寧含量

Appendix 26. The condensed tannin content of noni juice at different fermentation time

Fermentation time (weeks)	Temp (°C)			
	25	35	45	55
0	0.09 ± 0.02 ^g			
1	0.16 ± 0.02 ^{cdef}	0.19 ± 0.01 ^{abc}	0.20 ± 0.01 ^a	0.17 ± 0.01 ^{abcde}
2	0.16 ± 0.01 ^{cdef}	0.17 ± 0.02 ^{abcde}	0.16 ± 0.01 ^{def}	0.16 ± 0.00 ^{cdef}
3	0.15 ± 0.02 ^{ef}	0.20 ± 0.01 ^{ab}	0.17 ± 0.02 ^{abcde}	0.17 ± 0.01 ^{abcde}
4	0.14 ± 0.01 ^f	0.17 ± 0.02 ^{bcdef}	0.18 ± 0.00 ^{abcd}	0.16 ± 0.02 ^{cdef}

The condensed tannin content was expressed as mg of (+)-catechin equi./mL.

Each value is the mean ± standard deviation ($n = 3$).

^{a-f} Mean in the same column with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

附錄二十七、不同發酵時間的諾麗果汁之東莨菪素含量

Appendix 27. The scopoletin content of noni juice at different fermentation time

Fermentation time (weeks)	Temp (°C)			
	25	35	45	55
0	36.86 ± 0.77 ^{bcd}			
1	33.64 ± 1.93 ^{cd}	37.06 ± 0.14 ^{bcd}	36.38 ± 1.59 ^{bcd}	36.20 ± 1.11 ^{bcd}
2	34.36 ± 5.84 ^{bcd}	41.54 ± 3.67 ^{ab}	35.93 ± 4.65 ^{bcd}	37.12 ± 5.52 ^{bcd}
3	30.44 ± 3.93 ^d	39.82 ± 2.28 ^{abc}	36.71 ± 4.62 ^{bcd}	45.05 ± 3.18 ^a
4	30.29 ± 2.10 ^d	38.59 ± 1.03 ^{abc}	36.46 ± 3.69 ^{bcd}	39.58 ± 7.54 ^{abc}

The scopoletin content was expressed as mg of µg/mL.

Each value is the mean ± standard deviation ($n = 3$).

^{a-d} Mean in the same column with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

附錄二十八、不同發酵時間的諾麗果汁之芸香素含量

Appendix 28. The rutin content of noni juice at different fermentation time

Fermentation time (weeks)	Temp (°C)			
	25	35	45	55
0	112.84 ± 2.16 ^a			
1	86.77 ± 7.60 ^b	87.02 ± 5.09 ^b	86.19 ± 1.65 ^b	85.36 ± 2.91 ^b
2	81.73 ± 2.72 ^{bc}	75.00 ± 1.87 ^{cde}	72.87 ± 4.44 ^{cdef}	70.30 ± 6.20 ^{efg}
3	79.77 ± 7.27 ^{bcd}	72.32 ± 6.86 ^{def}	68.45 ± 2.80 ^{efg}	62.94 ± 0.62 ^{ghi}
4	75.85 ± 7.95 ^{cde}	64.98 ± 6.72 ^{fgh}	57.76 ± 1.91 ^{hi}	54.66 ± 5.17 ⁱ

The rutin content was expressed as mg of µg/mL.

Each value is the mean ± standard deviation ($n = 3$).

^{a-i} Mean in the same column with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

附錄二十九、不同發酵時間的諾麗果汁之 DPPH 自由基掃除能力

Appendix 29. The DPPH scavenging activity of noni juice at different fermentation time

Fermentation time (weeks)	Temp (°C)				Temp (°C)			
	DPPH scavenging activity (%)				Equal to BHA conc. (µg/mL)			
	25	35	45	55	25	35	45	55
0	28.03 ± 0.59				412.10 ± 10.99 ^h			
1	44.51 ± 1.04	45.28 ± 2.35	40.32 ± 1.56	45.54 ± 0.81	717.17 ± 19.30 ^f	747.49 ± 36.57 ^{ef}	775.85 ± 12.14 ^{de}	844.72 ± 27.42 ^c
2	46.14 ± 1.97	44.51 ± 0.44	41.99 ± 0.98	46.57 ± 2.80	731.55 ± 43.59 ^{ef}	717.22 ± 8.07 ^f	794.90 ± 17.96 ^d	894.59 ± 30.14 ^b
3	47.68 ± 0.66	48.70 ± 0.97	48.84 ± 0.63	56.15 ± 1.56	639.61 ± 28.98 ^g	670.47 ± 18.11 ^g	797.49 ± 11.59 ^d	921.47 ± 14.95 ^b
4	51.39 ± 1.48	54.09 ± 1.63	56.35 ± 0.60	63.30 ± 0.24	736.25 ± 15.00 ^{ef}	755.41 ± 51.82 ^{def}	932.73 ± 28.94 ^b	1065.15 ± 4.44 ^a

The capability of DPPH scavenging activity was expressed as µg of BHA equi./mL.

Each value is the mean ± standard deviation ($n = 3$).

^{a-h} Mean in the same column with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

附錄三十、不同發酵時間的諾麗果汁之總抗氧化能力

Appendix 30. The Trolox equivalent antioxidant capacity of noni juice at different fermentation time

Fermentation time (weeks)	Temp (°C)				Temp (°C)			
	ABTS ^{·+} scavenging activity (%)				Equal to Trolox conc. (µg/mL)			
	25	35	45	55	25	35	45	55
0	30.26 ± 0.42				1164.11 ± 06.01 ^m			
1	36.27 ± 1.32	34.43 ± 0.58	36.75 ± 0.95	39.65 ± 0.34	1395.44 ± 50.89 ^k	1446.74 ± 16.06 ^{ij}	1527.91 ± 18.13 ^{fg}	1571.33 ± 29.48 ^{ef}
2	37.61 ± 0.42	35.56 ± 0.59	37.67 ± 1.20	40.20 ± 0.74	1324.48 ± 22.36 ^l	1367.89 ± 22.53 ^{kl}	1496.80 ± 19.35 ^{gh}	1603.87 ± 40.63 ^{de}
3	39.72 ± 0.47	38.91 ± 0.50	42.48 ± 0.96	45.16 ± 0.73	1413.93 ± 36.43 ^{jk}	1449.09 ± 46.21 ^{hi}	1634.21 ± 36.78 ^d	1855.91 ± 15.09 ^b
4	40.84 ± 0.77	41.69 ± 1.06	48.24 ± 0.39	50.39 ± 0.70	1525.46 ± 13.21 ^{fg}	1546.56 ± 28.35 ^f	1737.50 ± 27.90 ^c	1938.32 ± 26.77 ^a

The capability of ABTS^{·+} scavenging activity was expressed as µg of Trolox equi./mL.

Each value is the mean ± standard deviation (*n* = 3).

^{a-m} Mean in the same column with different superscripts are significantly different (*p* < 0.05).

附錄三十一、不同發酵時間的諾麗果汁之 ACE 抑制活性 (%)

Appendix 31. The ACE inhibitory activity (%) of noni juice at different fermentation time

Fermentation time (weeks)	Temp (°C)			
	25	35	45	55
0	73.65 ± 0.94 ^a			
1	73.92 ± 2.53 ^a	74.25 ± 2.75 ^a	74.66 ± 1.58 ^a	72.72 ± 0.53 ^a
2	73.52 ± 1.04 ^a	72.30 ± 0.98 ^a	69.37 ± 1.71 ^a	27.12 ± 9.24 ^d
3	71.06 ± 2.64 ^a	68.54 ± 2.39 ^a	53.65 ± 12.49 ^b	24.60 ± 4.23 ^d
4	72.88 ± 2.59 ^a	72.79 ± 0.49 ^a	43.76 ± 7.24 ^c	12.40 ± 0.86 ^e

The sample of ACE inhibitory activity diluted for fifty fold

Each value is the mean ± standard deviation ($n = 3$).

^{a-c} Mean in the same column with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

附錄三十二、初步發酵的諾麗果汁之順位檢定表

Appendix 32. The ranking test table of noni juice in the first week.

Number of consumer	Color					Odor				
	Week 0	Week 1				Week 0	Week 1			
		25°C	35°C	45°C	55°C		25°C	35°C	45°C	55°C
1	5	2	1	3	4	4	3	2	1	5
2	5	2	1	4	3	3	1	4	5	2
3	5	2	1	3	4	2	3	1	4	5
4	4	2	1	3	5	4	1	3	5	2
5	4	1	2	3	5	3	4	1	5	2
6	1	2	3	4	5	1	2	4	3	5
7	1	2	3	4	5	5	3	1	2	4
8	5	4	1	2	3	5	1	4	3	2
9	5	4	3	1	2	2	1	3	5	4
10	5	1	2	3	4	1	5	3	2	4
11	3	2	1	5	4	4	1	5	3	2
12	4	3	1	2	5	2	1	5	3	4
13	5	2	1	3	4	5	1	3	4	2
14	5	2	1	3	4	3	1	2	4	5
15	1	3	2	4	5	1	2	4	3	5
Sum of rank	58	34	24	47	62	45	30	45	52	53

Critical Value ($p > 0.05$) = 32~58

Scores below 32, significantly favor by public

Score higher than 60, significantly disfavor by public.

附錄三十三、後期發酵的諾麗果汁之順位檢定表

Appendix 33. The ranking test table of noni juice in the last week.

Number of consumer	Color				Odor			
	Week 4				Week 4			
	25°C	35°C	45°C	55°C	25°C	35°C	45°C	55°C
1	1	2	4	3	3	2	1	4
2	1	2	4	3	4	1	2	3
3	4	1	3	2	3	4	2	1
4	1	2	4	3	4	3	2	1
5	1	4	3	2	1	2	3	4
6	1	2	4	3	2	4	1	3
7	1	2	4	3	1	4	2	3
8	1	2	3	4	4	3	1	2
9	2	1	3	4	3	2	4	1
10	3	1	4	2	1	4	3	2
11	1	2	3	4	4	1	2	3
12	1	2	3	4	4	2	1	3
13	1	2	3	4	4	3	1	2
14	2	1	4	3	4	1	3	2
15	1	2	4	3	3	4	2	1
Sum of rank	22	28	53	47	45	40	30	35

Critical Value ($p > 0.05$) = 26~47

Scores below 26, significantly favor by public.

Score higher than 47, significantly disfavor by public.

附錄三十四、不同殺菌條件的諾麗果汁之 pH 與色澤

Appendix 34. The pH and color values of noni juice at different sterilization conditions.

Condition	pH	L*	a*	b*
Control	3.84	43.05 ± 1.30 ^b	19.17 ± 1.94 ^b	49.25 ± 9.10 ^{ab}
LTLT (65°C, 24 + 24 hr)	3.86	29.93 ± 1.69 ^c	26.96 ± 4.83 ^a	36.04 ± 10.78 ^b
HTST (95°C, ≐13 sec)	3.84	45.87 ± 1.70 ^a	19.47 ± 0.89 ^b	57.89 ± 4.20 ^a
UF (0.45 μm)	3.83	46.15 ± 1.41 ^a	20.58 ± 1.63 ^b	59.17 ± 4.60 ^a

Each value is the mean ± standard deviation ($n = 3$).

^{a-b} Mean in the same column with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

附錄三十五、不同殺菌條件的諾麗果汁之功能性成分含量

Appendix 35. The functional compounds contents of noni juice at different sterilization conditions.

Condition	Total phenol (mg/mL)	Flavonoid (μg/mL)	Condensed tannin (mg/mL)	Rutin (μg/mL)	Scopoletin (μg/mL)
Control	1.37 ± 0.02 ^b	27.71 ± 0.07 ^{ab}	0.08 ± 0.00 ^b	36.54 ± 1.31 ^a	116.04 ± 4.36 ^a
LTLT (65°C, 24 + 24 hr)	1.42 ± 0.02 ^a	28.91 ± 0.18 ^a	0.10 ± 0.00 ^a	38.61 ± 0.07 ^a	113.72 ± 1.38 ^a
HTST (95°C, ≐13sec)	1.34 ± 0.00 ^b	27.85 ± 0.09 ^b	0.07 ± 0.00 ^d	35.72 ± 1.40 ^a	116.51 ± 2.16 ^a
UF (0.45 μm)	1.37 ± 0.03 ^b	26.25 ± 0.11 ^b	0.07 ± 0.00 ^c	36.61 ± 2.39 ^a	117.21 ± 1.61 ^a

Each value is the mean ± standard deviation ($n = 3$).

^{a-d} Mean in the same column with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

附錄三十六、不同殺菌條件的諾麗果汁之生理活性

Appendix 36. The biologic activity of noni juice at different sterilization conditions.

Condition	Anti-oxidant capability		ACE inhibitory activity ³
	DPPH scavenging activity (%) ¹ Equal to BHA conc. (µg/mL)	Trolox equivalent antioxidant capacity (%) ² Equal to Trolox conc. (µg/mL)	
Control	39.85% ± 1.01 631.01 ± 18.72 ^b	30.00% ± 0.46 1154.10 ± 17.81 ^b	65.24 ± 1.40 ^a
LTLT (65°C, 24 + 24hr)	45.41% ± 0.15 733.82 ± 2.78 ^a	34.07% ± 0.26 1310.63 ± 10.03 ^a	49.66 ± 1.06 ^b
HTST (95°C, ≐ 13 sec)	37.74% ± 0.63 591.84 ± 11.70 ^c	30.29% ± 0.40 1165.47 ± 15.36 ^b	48.03 ± 0.74 ^b
UF (0.45 µm)	37.61% ± 0.61 589.40 ± 11.35 ^c	30.29% ± 0.42 1165.47 ± 16.21 ^b	49.00 ± 1.92 ^b

¹ The sample diluted for eighty fold.

² The sample diluted for forty fold.

³ The sample diluted for fifty fold.

Each value is the mean ± standard deviation ($n = 3$).

^{a-c} Mean in the same column with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).