

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

食品科技組

Food Technology Section

碩士論文

Master Thesis

指導教授：盧錫祺 博士

Advisor : Lu, Hsi-Chi, Ph.D.

諾麗果汁及乙醇萃取物之抗氧化及抑癌活性

Anti-oxidative and anti-cancer activities of noni (*Morinda
citrifolia* L.) juice and ethanol extracts

研究生：王彥蘋 撰

Graduate Student : Yen-Ping Wang

中華民國一百零一年七月

July, 2012

謝誌

東海食科所的研究生涯終將告一段落，回首這兩年來的研究生活，感謝恩師郭俊欽教授、蔡正宗教授以及盧錫祺教授，悉心指導與策勵，教導學生於實驗學習與待人處世應有之態度，言教身教的指導者學生立學精神，謝謝老師讓我了解什麼是對於實驗與研究的堅持與執著，以及做事的認真態度和如何解決問題與不輕易放棄的精神，恩師浩蕩，永銘於心，特以卷首，以表謝忱。

文稿初成，承蒙東海大學食品科學系 蔡正宗博士、盧錫祺博士、江文德博士、台中榮總教學研究部 陳春榮博士以及弘光大學食品營養學系 蔡政志博士撥冗審閱及詳加斧正，並於口試過程中給予指正與寶貴意見，使論文內容更趨完善，在此深表誠摯的敬意與謝意，並感謝盧師母細心教導，包容與關懷著我們。

感謝系上所有老師們在課業上的指導與鼓勵，並於實驗期間慷慨借用儀器給與指導和協助，並感謝王姐與系上助教們的幫忙與照顧；學習期間，感謝育玫、曉捷、慧吟、敬義、麗娟、佳宜、美燕、永翰、昱成、柏村、善存、青蓉、庭儒、勝智、冠閔、建廷(歹人)、希奇、佳華(小屁)、芃萱、瑄閔、鈺馨(可樂)、如裕、佳伶等學長姐於實驗與生活上的指導與照顧，尤其感謝希奇與小屁在我瓶頸時給予的鼓勵與支持，謝謝妳們的陪伴與教導使我可以繼續往前走；感謝共同奮鬥的同儕好友欣怡(夜夜)，這段期間的與妳一起分享的喜怒哀樂都會永留我心，謝謝妳的支持與鼓勵，慶幸有妳在陪著我一起撐過那些歡笑淚水；感謝同窗好友鈺萍、鈺欣、哲暉、昱仁、偉翔、豐毓(碰碰)在實驗與生活上的相互打氣與鼓勵，尤其感謝鈺萍在實驗上的耐心指導與幫助，感謝本屆全體朋友們，這兩年來一同創造許多回憶；感謝巧玲、昭伶、建宏、凱琳、偉珊、昭蓁、小歐、敏純、紅莓等學弟妹的協助與陪伴，於實驗室生活中帶給我很多的歡樂；感謝一路陪著我的好友們詩茹、邱衍、文馨、麗文、孟巧、梅雅、芷芸、心滢、宜臻、怡雯、慧軒、士恩、儷蓁、冠怡、宛臻、致吟、百宜、雅婷、穎禎、悟空，謝謝妳們為我加油打氣分擔煩惱。

最要感謝的是我親愛的家人，感謝父親與母親的全力支持、勉勵與無悔的付出，感謝疼愛我的哥哥，感謝您們當我永遠的支柱與靠山，讓我能無後顧之憂地順利完成我的學業，真的辛苦您們了，謝謝您們。

謹以此論文獻給我最摯愛的家人們與所有關心及愛護我的師長與朋友們，感謝你們曾經的付出與關懷，我將永記於心。深深祝福大家幸福健康。

王彥蘋 謹致於
東海大學食品科學研究所
中華民國一百零一年七月

目錄

	頁數
中文摘要.....	1
英文摘要.....	2
壹、前言.....	3
貳、文獻回顧.....	4
2-1 諾麗之簡介.....	4
2-1-1 名稱.....	4
2-1-2 植物外觀.....	4
2-1-3 產地分佈.....	5
2-1-4 品種分類.....	9
2-1-5 後熟現象.....	9
2-2 諾麗的傳統用途及其加工.....	12
2-2-1 傳統用途.....	12
2-2-2 諾麗果汁加工.....	14
2-3 諾麗的基本成分及其化合物.....	19
2-3-1 基本成分性質.....	19
2-3-2 酚類化合物.....	22
2-3-3 其他重要化合物.....	28

2-3-4 諾麗的指標性物質.....	36
2-4 諾麗果之生理功效.....	40
2-4-1 抗微生物(antimicrobial)	40
2-4-2 抗氧化(antioxidant activity)	40
2-4-3 抗發炎和止痛活性.....	45
2-4-4 抗腫瘤及抗癌(anti-tumor and anti-carcinogenic).....	45
2-5 果膠多醣之生理特性.....	46
2-5-1 .具生理活性的果膠多醣.....	46
2-5-2 腸胃道降解作用機制.....	46
2-5-3 果膠多醣在腸胃道的功能特性.....	49
2-5-4 諾麗乙醇萃取果膠多醣體.....	49
2-6 細胞凋亡.....	52
2-6-1 細胞凋亡現象的發現及特徵.....	52
2-6-2 細胞凋亡相關蛋白質.....	54
2-6-3 分析凋亡細胞的方法.....	56
2-6-4 細胞凋亡檢測.....	56
2-6-5 細胞凋亡相關蛋白檢測.....	57
參、材料與方法.....	58
3-1 實驗架構.....	58

3-2 實驗材料.....	60
3-2-1 實驗原料.....	60
3-2-2 分析試藥與試劑.....	60
3-2-3 人類細胞株.....	61
3-2-4 細胞培養基.....	61
3-2-5 細胞培養其他藥品.....	61
3-2-6 細胞凋亡試劑.....	61
3-2-7 蛋白質分析試劑.....	61
3-2-8 設備儀器.....	63
3-3 實驗方法.....	64
3-3-1 發酵諾麗果汁之製備.....	64
3-3-2 多醣體製備.....	64
3-3-3 物理性質.....	65
3-3-4 功能性化合物含量測定.....	65
3-3-5 生理活性分析.....	67
3-3-6 多醣體分析.....	69
3-3-7 細胞試驗.....	71
3-4 統計分析.....	73
肆、結果與討論.....	74

Part. 1：諾麗果汁發酵實驗.....	74
4-1物理性質.....	74
4-2功能性化合物含量.....	77
4-3 生理活性.....	83
Part. 2：乙醇萃取諾麗果汁沉澱物與抑癌實驗.....	87
4-4 多醣體分析.....	87
4-5 諾麗果汁及乙醇萃取物之抑癌實驗.....	92
伍、結論.....	107
陸、總結.....	108
柒、參考文獻.....	109
捌、附錄.....	121

圖目錄

圖次頁數

圖一、諾麗果樹.....	6
圖二、諾麗果：綠色果實和花.....	6
圖三、諾麗果：成熟果(未後熟).....	7
圖四、諾麗果：後熟果.....	7
圖五、不同品種的諾麗果.....	8
圖六、不同熟成階段的諾麗果.....	11
圖七、傳統諾麗果汁製程.....	15
圖八、非傳統諾麗果汁製程.....	17
圖九、諾麗果粉製程.....	18
圖十、酚類之基本結構.....	23
圖十一、類黃酮之基本結構.....	23
圖十二、類黃酮之結構.....	24
圖十三、單寧之結構.....	26
圖十四、芸香素、東莨菪素及東莨菪素衍生物之化學結構.....	27
圖十五、諾麗果實中已知之脂肪酸糖苷、醇糖苷和環烯醚萜類化合物 之化學結構式.....	31
圖十六、諾麗果實中已知之類黃酮、木脂質、香豆素和蔥醌類化合物	

之化學結構式.....	32
圖十七、諾麗果實中已知之其他次級代謝產物之化學結構式.....	33
圖十八、由諾麗果汁中分離出之化學結構式.....	38
圖十九、虹貳之基本結構.....	39
圖二十、由諾麗果汁之乙酸乙酯萃取物分離出的化合物1、2及3之結構.....	44
圖二十一、消化性與非消化性多醣的生物利用率.....	48
圖二十二、不同發酵時間諾麗果汁之色澤變化.....	76
圖二十三、不同發酵時間諾麗果汁之總酚含量.....	78
圖二十四、不同發酵時間諾麗果汁之類黃酮含量.....	79
圖二十五、不同發酵時間諾麗果汁之縮合單寧含量.....	80
圖二十六、不同發酵時間諾麗果汁之芸香素、東莨菪素及其衍生物含量之變化.....	82
圖二十七、不同發酵時間諾麗果汁(50 倍稀釋) (a) ABTS • + 自由基清除能力; (b) Trolox 當量的影響.....	85
圖二十八、不同發酵時間諾麗果汁(50 倍稀釋) (a) DPPH 自由基清除能力; (b) BHA 當量的影響.....	86
圖二十九、不同發酵時間諾麗果汁乙醇萃取沉澱物之總糖含量.....	89
圖三十、不同發酵時間諾麗果汁乙醇萃取沉澱物之還原糖含量.....	90

圖三十一、發酵八週之諾麗果汁乙醇萃取沉澱物分子量膠體通透層析 圖譜.....	91
圖三十二、不同濃度之諾麗果汁、乙醇萃取沉澱物與乙醇萃取之上清 液於對Caco-2細胞存活率分析.....	95
圖三十三、不同濃度與發酵時間之諾麗果汁對Caco-2細胞作用十二小 時之早期與晚期凋亡之影響.....	96
圖三十四、不同濃度與發酵時間之諾麗果汁乙醇萃取上清液對Caco-2 細胞作用十二小時之早期與晚期凋亡之影響.....	97
圖三十五、不同濃度與發酵時間之諾麗果汁乙醇萃取沉澱物對Caco-2 細胞作用十二小時之早期與晚期凋亡之影響.....	98
圖三十六、不同濃度與發酵時間之諾麗果汁對Caco-2細胞作用二十四 小時之早期與晚期凋亡之影響.....	99
圖三十七、不同濃度與發酵時間之諾麗果汁乙醇萃取上清液對Caco-2 細胞作用二十四小時之早期與晚期凋亡之影響.....	100
圖三十八、不同濃度與發酵時間之諾麗果汁乙醇萃取沉澱物對Caco-2 細胞作用二十四小時之早期與晚期凋亡之影響.....	101
圖三十九、不同濃度與發酵時間之諾麗果汁, 諾麗果汁乙醇萃取上清 液及諾麗果汁乙醇萃取沉澱物對Caco-2細胞作用十二小 時之(a)早期與(b)晚期凋亡之比例.....	105

圖四十、不同濃度與發酵時間之諾麗果汁, 諾麗果汁乙醇萃取上清液
及諾麗果汁乙醇萃取沉澱物對Caco-2細胞作用二十四小時
之(a)早期與(b)晚期凋亡之比例.....106

表目錄

表次頁數

表一、諾麗果在果樹不同之成長階段下之可能產量.....	10
表二、在熟成期間水果表面顏色與硬度之演變.....	10
表三、諾麗的傳統用途.....	13
表四、諾麗果汁的物化特性.....	20
表五、不同果汁的鉀含量比較.....	21
表六、基於單糖鍵結資料的多醣組成推論.....	21
表七、諾麗果實中已知化學組成分.....	29
表八、成熟諾麗果實中之揮發性化合物.....	34
表九、諾麗果品質指標性成分含量.....	37
表十、諾麗果萃取物對革蘭氏陽性菌與陰性菌的抗菌活性.....	42
表十一、諾麗萃取物的抗真菌活性.....	43
表十二、具特定生理活性的食品多醣.....	47
表十三、食品多醣的溶解性及分類.....	50
表十四、諾麗果汁乙醇萃取沉澱物之鍵結與組成.....	51
表十五、細胞凋亡與細胞壞死的比較.....	53
表十六、不同發酵時間諾麗果汁之產率.....	74
表十七、不同發酵時間諾麗果汁之pH 值.....	75

表十八、以膠體通透層析不同分子量多醣標準品pullulan(α -D-葡聚糖) 所得之滯留時間.....	92
表十九、不同濃度與發酵時間之諾麗果汁對Caco-2細胞作用十二與二 十四小時之早期與晚期凋亡之影響.....	102
表二十、不同濃度與發酵時間之諾麗果汁乙醇萃取上清液對Caco-2細 胞作用十二與二十四小時之早期與晚期凋亡之影響.....	103
表二十一、不同濃度與發酵時間之諾麗果汁乙醇萃取沉澱物對Caco-2 細胞作用十二與二十四小時早期與晚期凋亡之影響...	104

附目錄

次序頁數

附錄一、沒食子酸之標準曲線圖.....	121
附錄二、槲皮酮之標準曲線圖.....	121
附錄三、兒茶素之標準曲線圖.....	122
附錄四、Scopoletin之標準曲線圖.....	122
附錄五、Rutin之標準曲線圖.....	123
附錄六、Trolox之標準曲線.....	123
附錄七、BHA 之標準曲線圖.....	124
附錄八、總醣之葡萄糖標準曲線圖.....	124
附錄九、還原醣之葡萄糖標準曲線圖.....	125
附錄十、多醣分子量之標準曲線圖.....	125
附錄十一、諾麗果汁於不同發酵時間色澤.....	126
附錄十二、諾麗果汁於不同發酵時間所測得之功能性成份含量.....	127
附錄十三、諾麗果汁於不同發酵時間所測得之抗氧化能力.....	128
附錄十四、諾麗果汁乙醇萃取沉澱物於不同發酵時間所測得之總醣、 還原醣與分子量.....	129
附錄十五、不同發酵時間諾麗果汁之總結論.....	130

中文摘要

諾麗(*Morinda citrifolia* L.)分佈於包括臺灣在內的熱帶環太平洋地域，做為民間保健醫療使用已有兩千年歷史，直至最近才開始系統性科學研究，若干機能性成份分別證實具有不同生理功效，例如諾麗果汁經乙醇處理的多醣體即發現具有抗癌作用。本研究將諾麗果汁進行為期兩個月室溫儲藏，並於每個月取樣後檢測其物化性質(果汁產率、pH值和色澤)、功能性化合物(總酚類化合物、類黃酮、縮合單寧、東莨菪素及其衍生物和芸香素化合物)和生理活性(總抗氧化能力和DPPH自由基清除力)。結果顯示，諾麗果汁經儲藏後，部份成分如總酚類化合物、類黃酮類和芸香素化合物之含量與活性即開始損失，部份成分如縮合單寧和東莨菪素含量則會經儲藏而上升。乙醇萃取物以酚硫酸法、還原糖含量與HPLC分析分子量以測定多醣體，發現多醣體的總糖量會因儲藏時間而減少，還原糖含量以儲藏1個月含量較多，而多醣體主產物的分子量在儲放0與1個月時分別為468.61與448.46 KDa，儲存2個月後分析出兩個主產物分別為2739及103.1 KDa。這些隨時間而產生的變化，可能對於抑癌等活性作用產生影響。其次探討諾麗果汁及其乙醇萃取物對人類結腸直腸癌Caco-2細胞的影響。結果顯示，隨著添加濃度的增加，Caco-2細胞存活率均顯著降低，未發酵諾麗果汁於6000 ppm時能使Caco-2細胞存活率低於50%。以流式細胞儀探討細胞凋亡發現諾麗果汁、諾麗果汁乙醇萃取上清液與諾麗果汁乙醇萃取物皆是濃度6000 ppm時，對於Caco-2細胞較能促進早期與晚期凋亡。未來可藉西方轉漬法定量細胞凋亡相關蛋白質表現以探討諾麗抑癌作用之機制。

Abstract

Noni fruit (*Morinda citrifolia* L.) which has been used for more than 2000 years in Polynesia as traditional folk medicine is consumed as a food or dietary supplement with purported health benefits. The objective of this study was to investigate the optimal fermentation time, anti-oxidative, and cancer preventive effects of noni juice and ethanol extracts. In order to find the best fermentation time, partial fermented noni juices were prepared from noni fruits stored for three different periods of time: 0, 4, and 8 weeks. The characteristics of noni juice from different fermentation period were assayed by measuring functionalities, including physiological and chemical attributes. The characteristics were analyzed as following (1) changes in the physical properties including total yield, color value, and pH value, (2) changes in the content of functional ingredients including total phenolic compounds, flavonoids, condensed tannins, rutins, scopoletin and its derivatives, (3) changes in the physiological activities including trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) and DPPH free radical scavenging. Experimental results indicated that among three different fermentation periods, noni juice began to reduce some of its functional and physiological attributes such as total phenolic compounds, flavonoids, and rutins as time goes by; while condensed tannins, scopoletin and its derivative were increased over time. To investigate the polysaccharides in noni juice, ethanol extracts of noni juice (noni-ppt) were subjected to phenol-sulphuric acid test, DNS residual sugar assay, and molecular mass determination by HPLC analysis. Experimental results indicated that total sugar of noni-ppt was reduced during fermentation, content of reducing sugar of noni-ppt at the 4th week was higher than other periods, and the molecular mass of two major polysaccharide moieties were 468.61 and 448.46 KDa at 0 and 4 weeks respectively. Addition of noni juice or ethanol extracts to Caco-2 colon cancer cell cultures greatly and dose-dependently decreased cell viability as assayed by MTT. 6000 ppm of unfermented noni juice suppressed more than 50% of Caco-2 cell growth. As showed in flow cytometry, early and late apoptosis were most evident when noni was present at the highest concentration (6000 ppm). Western blot analysis of apoptosis-related proteins will help to delineate the underlying mechanism.

壹、前言

根據衛生署2011年最新統計資料顯示，惡性腫瘤在國人癌症死亡率排行仍位居首位，其中結腸直腸癌在十大癌症中發生率第一位、死亡率第三位。如此高的發生率與死亡率歸咎於結腸直腸癌的重要危險因子，飲食。結腸直腸癌主要好發於50歲以上年齡層與食用較多動物脂肪及較少食物纖維的人身上，我國近年來老年人口增加，同時因油脂的攝取量增加、纖維的攝取量減少、飲食習慣逐漸西化，不但心臟血管疾病增加，結腸直腸癌的患者數目也持續的增加。隨著健康觀念的增長，現代人也意識到藉由飲食攝取所需營養較食用藥物來的健康，因為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。植物中多種天然成分具有防治某些疾病之功效，又某些植物特別富含防治某種疾病的天然化合物，此類食用植物宜加以研究並開發為保健食品。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。

Noni (諾麗) (*Morinda Citrifolia* L.) 盛產於南太平洋群島，為一種熱帶常綠灌木植物，是當地居民的食品兼藥物，被視為能治百病的萬靈藥(羅, 2009)。諾麗的果實、根、莖、葉、花及樹皮皆含有多種對人體有益的功能性化合物 (Yang *et al.*, 2007; 羅, 2009; 張, 2009)，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，已有 200 多種化學成分由 noni 中分離出來 (Kinghorn *et al.*, 2011)。研究指出，諾麗含蔥醌、虹甙(Iridoids)、東莨菪素(Scopoletin)、芸香素(Rutin)、類黃酮、多醣及多種酚類物質，具有抗氧化、抗細菌、抗病毒、抗黴菌、抗腫瘤、抗癌症、抗發炎、降血壓及預防心血管疾病等功效 (Wang *et al.*, 2002; Chan-Blanco *et al.*, 2006)。本實驗探討發酵諾麗果汁於儲藏過程中的品質變化和穩定性，接續探究不同時間儲放所得諾麗果汁與乙醇萃取物對於 Caco-2 人類結腸直腸癌細胞是否具有抑制生長效應，進一步瞭解諾麗抑癌作用。

貳、文獻回顧

2-1 諾麗之簡介

2-1-1 名稱

諾麗 (Noni) 隸屬為茜草科 (Rubiaceae)，海巴戟天屬 (Morinda)，noni 俗名為夏威夷及波里尼西亞等地對海巴戟天的俗稱(Morton, 1992)，亦為目前商業上最廣泛使用的名稱 (Nelson and Elevitch, 2006)，Noni廣泛分布於熱帶氣候地區，目前已發現約有80個品種 (Morton, 1992)，其中最常見的就是 *Morinda citrifolia* L. (Samoylenko *et al.*, 2006)。在不同的栽種國家及地區亦具有許多不同的俗名，在印度次大陸有印度桑椹 (India mulberry)、nuna或ach之稱；馬來西亞人稱之為mengkudu；在部分東南亞地區稱為nhau；在加勒比海地區稱之為止痛藥木 (painkiller bush)；在澳大利亞則稱之為乳酪果 (cheese fruit)，另外還有ba ji tian、nono及nonu等俗名(Morton, 1992; Nelson, 2001; Ross, 2001; Wang *et al.*, 2002; Cardon, 2003; Samoylenko *et al.*, 2006; Deng *et al.*, 2010)。在台灣文獻中多稱為檄樹，而其他俗名則包括：水冬瓜、紅珠樹、蘿莉、四季果、精力果及長壽果等 (陳, 2007)。

2-1-2 植物外觀

諾麗是一種生長於海岸線的直立性常綠小喬木或灌木(圖一)，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)，其樹高可達3至10公尺高，樹幹直徑可達15公分以上，葉片為寬橢圓形 (長5-17公分，寬10-40公分)，顏色呈亮綠色且葉脈深，花為管狀小白花聚生在花梗上(圖二)，葉柄似環狀的分布於花梗周圍，其花冠呈白綠色 (Morton, 1992; Elkins, 1998; Dixon *et al.*, 1999; Ross, 2001; Cardon, 2003)。Noni最具特色的為其果實，外觀橢圓 (長約3-10公分，寬約3-6公分)，約馬鈴薯般大，為一種由許多小花聚集轉變而成之聚合果，果實表面有凸起的區塊，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 and Hamburger, 2007)。諾麗果實顏色為亮綠色(圖三)，而採收後的果實在1-3天內會迅速後熟(圖四)，熟成後果實顏色會逐漸軟化變成半透明的灰白色並具有令人不悅的丁酸腐臭味和皂素觸感(Morton, 1992; Dixon *et al.*, 1999; Nelson and Elevitch, 2006)。

2-1-3 產地分佈

諾麗為一熱帶植物原產於東南亞至澳洲一帶，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，台灣中南部的溫溼氣候適合諾麗的生長，故多產於屏東、恆春半島一帶，近幾年來有越來越多的農民引進作大規模的栽種，目前在雲林、嘉義、台南、屏東等地都有諾麗的生產(羅，2009)。諾麗四季皆可開花結果，在台灣地區，約在六、七、八月產量漸豐，而在夏秋兩季達到高峰，大約至十月份產量開始下降，可生產至隔年三、四月左右，但還是要視每年氣候的差異及品種的差異而不同(羅，2009)，且在不同之生長階段其果實產量亦會受到影響，如表一所示(Nelson, 2003)。

不同區域的諾麗果具不同的形態，如圖五，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，俗稱小noni；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，俗稱大noni，為目前商業上泛用的品種。本實驗初步研究小noni與大noni的差異，結果發現小noni具較高的功能性成分含量，故以小noni作為本研究之對象。



圖一、諾麗果樹。

Figure 1. Noni tree.



圖二、諾麗果：綠色果實和花。

Figure 2. Noni fruit: young green fruit with flowers.

(<http://www.imagejuicy.com/images/fruits/n/noni/1/>)



圖三、諾麗果：成熟果（未後熟）。

Figure 3. Noni fruit: mature fruit (unripe).



圖四、諾麗果：後熟果。

Figure 4. Noni fruit: riping fruit.

(<http://www.purenoni.com.tw/?ID=1&ID2=1&idno=1>)



圖五、不同品種的諾麗果 (左：本土品種、右：大溪地品種)

Figure 5. Two different species of noni fruits.

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

(林，2010)

2-1-4 品種分類

諾麗可被分為兩種品種 *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，而葉的形狀從圓形、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應用為傳統的醫療藥物，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 and 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。

2-1-5 後熟現象

由於諾麗果含有豐富的果膠多醣，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二。諾麗果在成熟時經人工選別摘採，在第一階段“黃綠”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)。圖六為諾麗果熟成前後的外觀變化，上圖為未熟成的果實，色澤綠而質地硬；經過幾日的室溫靜置後，轉變為下圖已熟成的果實，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，待所有果實均熟成便可開始進行發酵作業。

表一、諾麗果在果樹不同之成長階段下之可能產量

Table 1. Possible yields of noni at various growth stages

Month	Expected fruit yield*
0-9	Seedling grown in nursery, no fruit production
9	Transplant into field, no fruit production
12-24 (year 1)	2 lbs fruit per plant per month (i.e., 24 lbs per plant per year 1)
24-36 (year 2)	4 lbs fruit per plant per month (i.e., 48 lbs per plant per year 1)
36-48 (year 3)	8 lbs fruit per plant per month (i.e., 96 lbs per plant per year 1)
48-60 (year 4)	15 lbs fruit per plant per month (i.e., 180 lbs per plant per year 1)
60-72 (year 5)	20 lbs fruit per plant per month (i.e., 240 lbs per plant per year 1)

*Realistic estimates based on excellent farm management practices and growing conditions. Actual yields may vary.

(Nelson, 2003)

表二、在熟成期間水果表面顏色與硬度之演變

Table 2. 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)



圖六、不同熟成階段的諾麗果 (上：生果、下：熟果)

Figure 6. Different ripening stages of noni fruit appearance.

Up: unripe noni; down: ripe noni.

(林，2010)

2-2 諾麗的傳統用途及其加工

2-2-1 傳統用途

兩千多年前諾麗就已被波里尼西亞當地居民當作食品兼藥物，整株植物都可被加以利用，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 and 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，用於傳統服飾的染色 (Potterat and Hamburger, 2007)。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三，其中以葉與果實的利用為大宗。近幾年來諾麗在國際上如美國、歐洲、日本等地，備受關注，諾麗果汁甚至被歐盟認定為新興食品 (Chan-Blanco *et al.*, 2006)。在台灣，近年來諾麗果農與廠商加以整合，使得諾麗相關產品的販售日益增加，知名度也越來越高，因而漸漸受到國內消費者的關注。

表三、諾麗的傳統用途

Table 3. 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
Fruit	Vapor of broken leaves	Sties
	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
Stem	Extract	Hypertension
	Wood	Canoe parts, Paddles, axe and adze handles, digging sticks. firewood. red pigment
	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 and Elevitch, 2006)

2-2-2 諾麗果汁加工

諾麗果實剛採收時表面堅硬不好食用，需放置1-3天使其後熟才能做進一步的加工。不光是果實部分，諾麗的根、莖、葉、花及樹皮都具有對人體有益的功能性化合物 (Yang *et al.*, 2007; 羅, 2009; 張, 2009)。目前市面上諾麗產品總類繁多，其中以果汁產品為最大宗。以下就以目前最常見的幾種諾麗產品來做介紹：

2-2-2-1 傳統之諾麗果汁

傳統之諾麗果汁就是經過發酵的諾麗果汁，在發酵過程中多種酵素綜合作用，促使成熟果實進行自消化分解 (autolysis)，進而增強有效成分之生物活性，在民間亦認為發酵產品其生理功效要比新鮮果汁來的佳 (楊, 2005)。傳統製法是將諾麗果放置容器內，並置於室外發酵數月，隨著發酵時間果汁自然滲出，然後將其收集成罐 (Yang *et al.*, 2007)。隨著時代演進，傳統諾麗果汁之製程也有所改善，其製程如圖七所示。將新鮮的諾麗果實採收後直接送到工廠，將其不良果如被動物吃過或微生物感染等去除後，以強力水柱噴洗或利用機械化的傳送帶清洗設備清洗，然後置於架上自然風乾，再將果實放入發酵桶內密封進行發酵。發酵桶需以玻璃、不鏽鋼或食用級的塑膠桶為宜。在發酵過程中，諾麗果汁會漸漸地從果泥中滲出，其色澤從黃褐色變成深褐色 (Nelson and Elevitch, 2006)。在發酵完成後，發酵熟成之諾麗果汁外觀為類似醬油之黑褐色液體，具有澄清葡萄酒的性質以及3.5左右的低pH 值 (王, 2008)。而待果汁完全流出後，再將剩下之果泥內的果汁壓榨出以提高產率，殘餘之果渣可丟棄或乾燥進一步做成其他諾麗相關產品。



1. 成熟諾麗果實



2. 清洗



3. 諾麗果實自然風乾



4. 於收集桶內進行發酵



5. 熟成之發酵諾麗果汁

圖七、傳統諾麗果汁製程

Figure 7. Production procedure for traditional noni juice.

(http://www.ctahr.hawaii.edu/noni/fruit_juices.asp)

2-2-2-2 非傳統之諾麗果汁

非傳統之諾麗果汁即為未發酵的諾麗果汁，不經發酵的諾麗果汁保有較多的水果甜味，而發酵之諾麗果汁其苦味和酸味則相對較重，非傳統諾麗果汁製程如圖八。採收後的成熟諾麗果實經過清洗風乾，然後立即進行榨汁步驟。在榨汁後為了避免發酵，諾麗果汁需進行冷藏、冷凍或巴斯德滅菌 (pasteurization) (羅,2009)。非傳統諾麗果汁因為未經過發酵過程所以其酸度較低、糖度較高，而色澤較傳統發酵諾麗果汁來的亮 (Nelson and Elevitch, 2006)。

2-2-2-3 諾麗果粉

除了諾麗果汁產品外最受重視的就是諾麗果粉，其製程如圖九。將成熟的諾麗果實清洗風乾後，等其後熟軟化或經發酵製汁後，將其種籽去除並置於食品乾燥器 (food dehydrators)或熱風乾燥機中去除水分，最後再將乾燥好的果泥磨成粉末即完成，可進一步製成膠囊等相關產品 (羅, 2009)。另外，也有包含種籽製成的諾麗果粉，市面上大部份的諾麗果粉產品為含種籽全果乾燥磨成粉而成的，但就目前所知諾麗果實中的活性成分主要存在於果汁與果肉中，而不是在種籽中 (Ram, 2002)。此外，近幾年來冷凍乾燥製成的諾麗果粉越來越受到重視，有些學者認為在製作過程不需經過熱處理更可以維持其所含酵素的活性及生理活性，但在經過人體的消化系統後其所含酵素的活性及生理活性是否依然維持，還需進一步的探討 (Ram, 2002; 羅, 2009)。



1. 成熟諾麗果實



2. 清洗



3. 諾麗果實自然風乾



4. 壓榨取汁 (水壓式, hydraulic)



5. 非傳統諾麗果汁

圖八、非傳統諾麗果汁製程。

Figure 8. Production procedure for non-traditional noni juice.

(http://www.ctahr.hawaii.edu/noni/fruit_juices.asp)



1. 諾麗果泥 (含種籽)



2. 將諾麗果泥與種籽分離



3. 將諾麗果泥平鋪於乾燥器上



4. 乾燥完成的諾麗果泥



5. 磨粉後製成的諾麗粉產品

圖九、諾麗果粉製程。

Figure 9. Production procedure for noni powder.

(http://www.ctahr.hawaii.edu/noni/powders_products.asp)

2-2-2-4 其他諾麗相關產品

除了上述三種主要的noni製品外，還有一些相關製品，如諾麗果汁中加入其他果汁如葡萄汁、桑椹汁、草莓汁及百香果汁等，混合調味成諾麗果混合汁，然後加水稀釋和加糖以提升果汁口感與風味；將諾麗果粉加水混合後，再加入其他果汁或添加物製成諾麗果粉飲品；將諾麗果泥去籽後加水稀釋，然後加入其他果汁調製成諾麗果泥飲品；將諾麗果汁濃縮3-5倍，以水或果汁還原成不同比例的諾麗濃縮還原汁；將諾麗葉子或果實切片乾燥後，直接加水沖泡成諾麗茶飲品。此外，還可將諾麗製成香皂、潤手乳及洗髮乳等等，應用層面非常廣泛，這也說明諾麗的經濟價值相當高，值得國人好好開發利用（羅, 2009）。

2-3 諾麗的基本成分及其植物化合物

2-3-1 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，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，基本性質整理於表四。

諾麗果果實中含有約90%的水分，而乾燥物則為可溶性固形物、膳食纖維、蛋白質等；諾麗果為酸性水果，其pH值介於3.4至3.7之間，最主要的為己酸和辛酸 (Dittmar, 1993)。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 (表五)，因此有學者建議腎臟疾病的患者應限制飲用 (West, 2006)。另外，諾麗果中亦富含維生素B、C和E，其中又以維生素C為主 (24 – 158 mg/100 g dry matter) (Morton, 1992; Shovic, 2001)；此外，大量的維生素A先質 (provitamin A) (Dixon, 1999)，可望用於治療維生素A缺乏症狀 (Aalbersberg *et al.*, 1993)。諾麗果中亦含有豐富的碳水化合物，其中包含有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，這些果膠多醣共佔了諾麗果81.6%的碳水化合物組成 (表六) (Bui *et al.*, 2006)，結果顯示諾麗果中含有大量的果膠多醣，在水果熟成與加工過程中扮演重要角色。

表四、諾麗果汁的物化特性

Table 4. 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).

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

表五、不同果汁的鉀含量比較

Table 5. Potassium content comparison for various fruit juices.

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

(Nelson and Elevitch, 2006)

表六、基於單糖鍵結資料的多醣組成推論

Table 6. 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)

2-3-2 酚類化合物

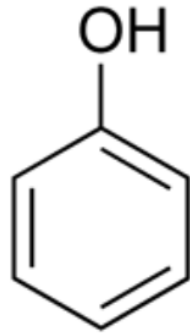
酚類化合物廣泛存在於植物中，為植物中的二次代謝產物，其結構為一個或多個苯環上帶有一個或數個氫氧基團及其衍生物（圖十）。酚類化合物在植物一般生長或遭受逆境下都能生成，其種類多達8000多種，普遍認為具有抗氧化、抗菌、抗病毒、抗黴菌、抗腫瘤、抗突變、抗發炎、保護心血管及促進免疫系統等功能（羅, 2009; 王, 2008）。

2-3-2-1 類黃酮

類黃酮為多酚類化合物之一，具有多樣的結構與特性，多發現於水果、蔬菜、核果、種子、花、樹皮等地方。目前已有4000多種類黃酮被鑑定出，其基本是由三個環狀結構的diphenyl propane (C6-C3-C6) 型式所構成（圖十一），主要的種類為黃酮 (flavones)、黃酮醇 (flavonols)、黃烷酮 (flavanones)、黃烷醇 (flavanols)、異黃酮 (isoflavones)、黃烷酮醇 (flavanonols) 及花青素配質 (anthocyanidins) 等七大類（圖十二）。研究指出類黃酮含有廣泛的生理活性，包括抗氧化、抗細菌、抗病毒、抗發炎、抗過敏、血管舒張、螯合金屬離子、抑制脂質過氧化等功能（Cook and Samman, 1996; Pietta, 2000）。

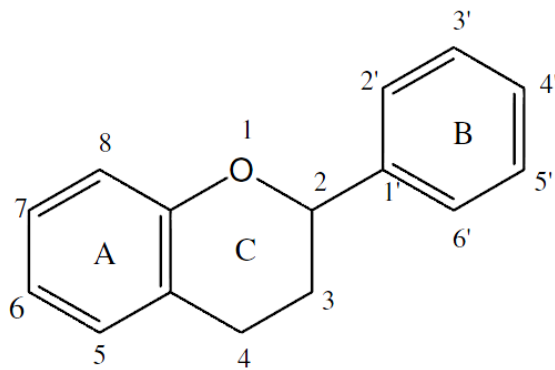
2-3-2-2 單寧

單寧為一種特殊的酚類化合物，用於將獸皮鞣化成皮革，故又稱為鞣質。單寧為單體多酚聚集而成的低聚體或高聚體，且大部分的單寧為類黃酮化合物轉化而成。單寧除具有酚類化合物之特性外，還能使蛋白質、生物鹼、明膠沉澱。單寧廣泛存在於植物中或植物來源的食物內，尤其在橡樹等樹皮中可發現高含量的單寧。根據其結構，單寧可被分為水解型單寧(hydrolysable tannins) 和縮合型單寧 (condensed tannins)（圖十三）。水解型單寧分子量約為500-2800 Da，加水易分解為多元醇和酚酸類物質，而依分解後產生的酚酸不同，可再區分為產生沒食子酸



圖十、酚類之基本結構。

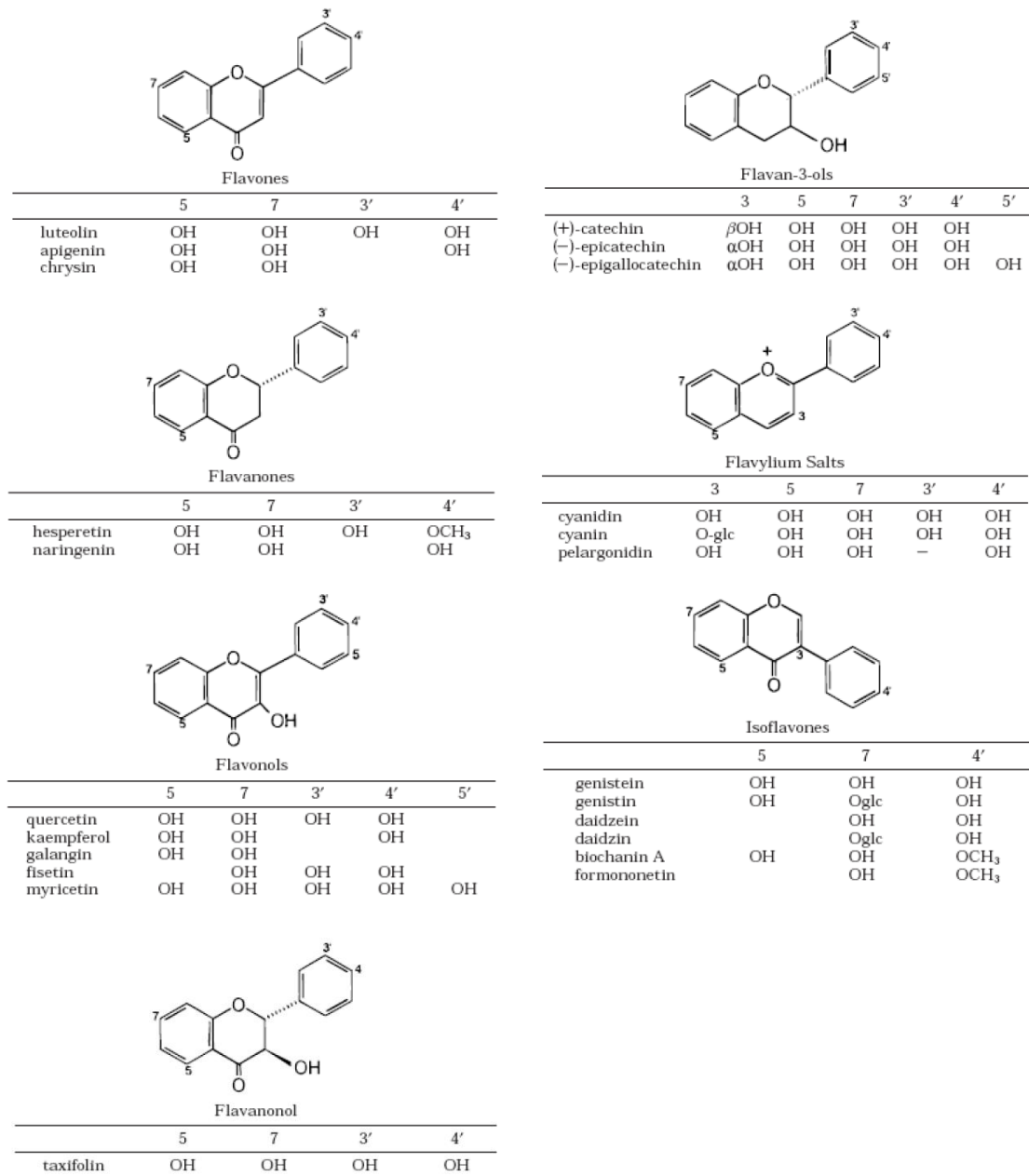
Figure 10. Basic phenol structure.



圖十一、類黃酮之基本結構。

Figure 11. Basic flavonoid structure.

(Pietta, 2000)



圖十二、類黃酮之結構。

Figure 12. Structures of flavonoid

(Pietta, 2000)

(gallic acid)的gallotannin以及產生鞣花酸 (ellagic acid)的ellagitannin。縮合型單寧分子量約為2000-4000 Da，其結構主要以flavan-3-ol為中心，而以碳-碳鍵與flavanol次單位結合，經酸水解會產生花青素配醣基 (anthocyanidin)，故又稱為原花青素配醣基 (proanthocyanidin)。而水解型單寧和大部分的縮合型單寧皆為水溶性，而大分子的縮合型單寧則為非水溶性。研究指出單寧具有良好的抗氧化能力及捕捉自由基，也有抗癌、抗突變、預防低密度脂蛋白氧化等功效，近年來受到廣泛的研究 (Shahidi and Naczk, 2004; 王, 2008; 羅, 2009)。

2-3-2-3 芸香素

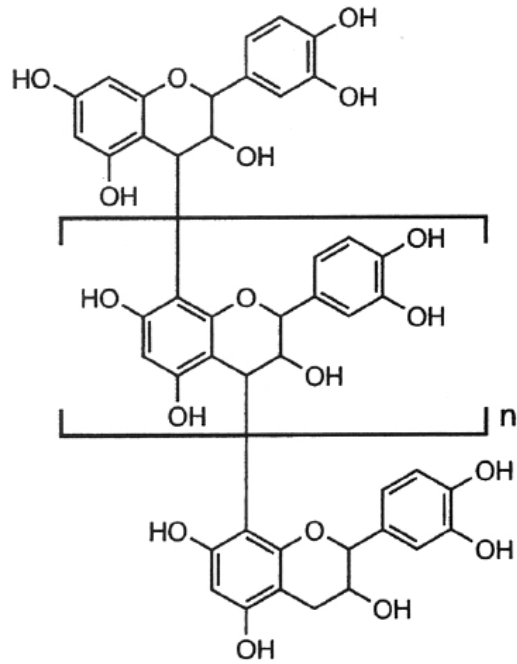
芸香素，又名rutin、rutoside、quercetin-3-rutinoside、sophorin等，最早是從芸香 (*Ruta graveolens*)中分離出，故取名為芸香素，其分子量610.53 Da，屬於類黃酮糖苷化合物 (圖十四)。許多植物中都有芸香素的存在，包括柑橘類 (橘子、葡萄柚、檸檬、萊姆等)的果實及其外皮、莓果(桑葚、小紅莓等)、蕎麥、蘆筍等，其中又以蕎麥的含量最多。芸香素具有很好的抗氧化及抗發炎的能力，且芸香素可以強化血管結構以改善血友病患的症狀及預防靜脈曲張，並對視網膜出血、微血管性中風、冠狀動脈阻塞等疾病有所助益。且有動物實驗證實，芸香素可以降低肝臟中總膽固醇和三酸甘油酯的含量 (羅, 2009)。

2-3-2-4 東莨菪素及其衍生物

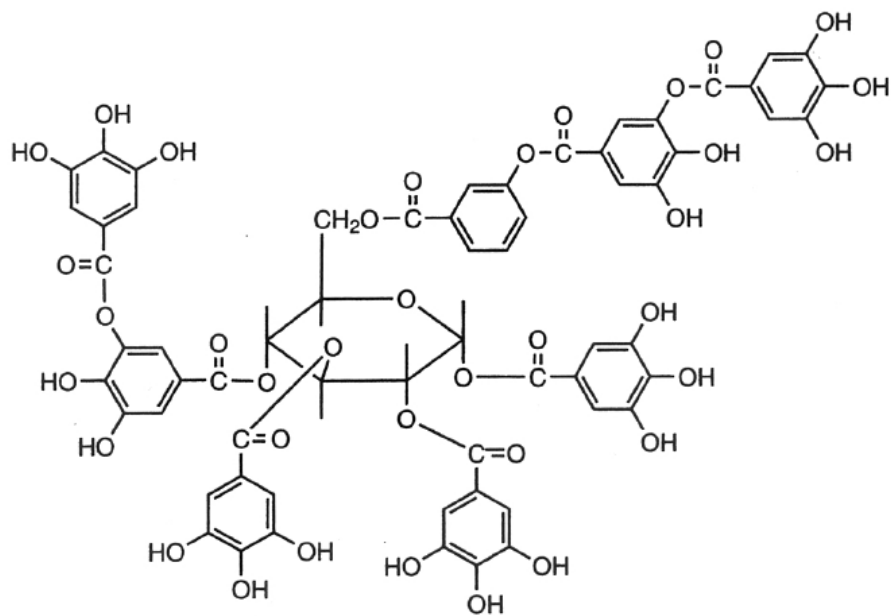
東莨菪素，又名scopoletin、7-hydroxy-6-methoxycoumarin等，其分子量為192.17 Da，純的東莨菪素為黃色或淺黃色結晶粉末，是屬於香豆素化合物 (coumarin) 之一的化合物。東莨菪素是一種重要的酚類化合物，於自然界中並不常見，但在noni果中含量豐富。

東莨菪素具有許多生理活性，包括抗氧化、抗菌、抗發炎、鎮痛、保護肝臟、預防高血壓等 (Chan-Blanco *et al*, 2007; 羅, 2009)。Jang等 (2003) 研究證實東莨菪素具有抑制Hepa 1c1c7小鼠肝癌細胞的增生。

(a)



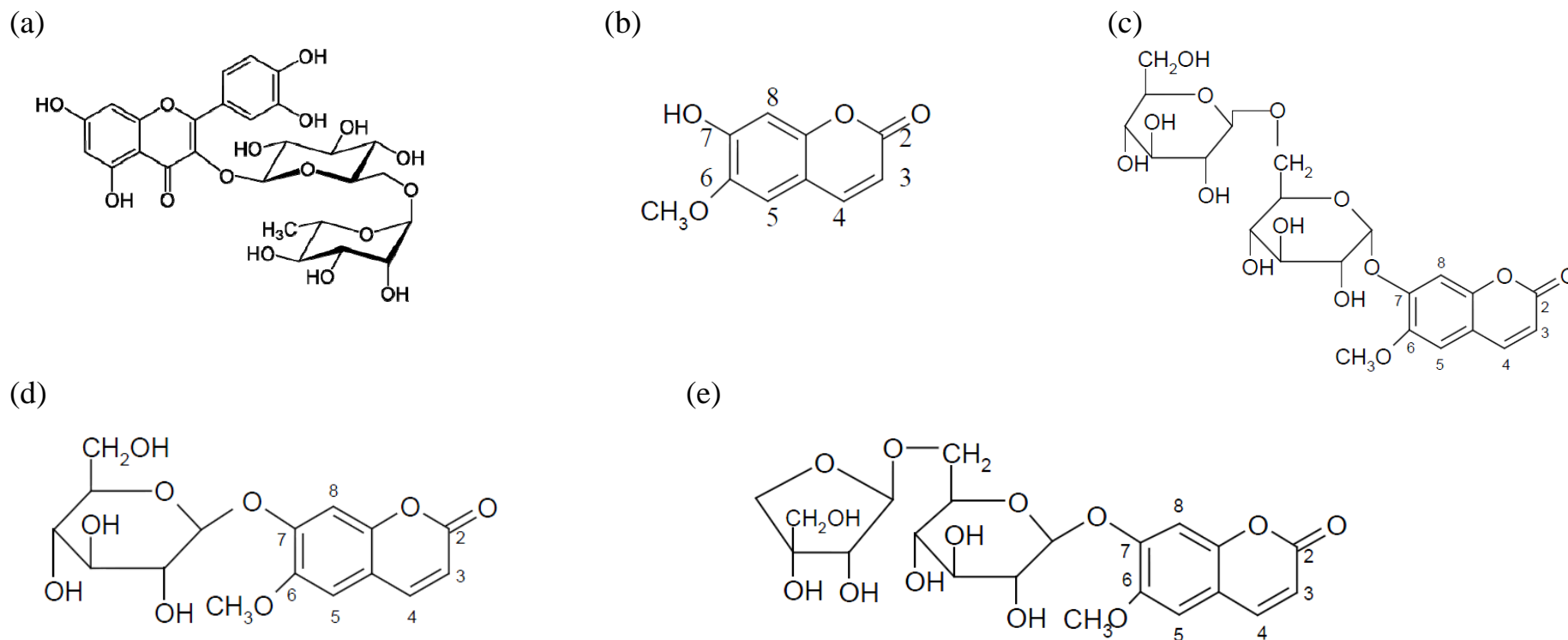
(b)



圖十三、單寧之結構。(a)：縮合型單寧。(b)：水解型單寧。

Figure 13. Structures of tannin. (a): condensed tannin. (b): hydrolysable tannin

(Shahidi and Naczk, 2004)



圖十四、芸香素、東莨菪素及東莨菪素衍生物之化學結構。(a)：芸香素。(b)：東莨菪素。(c)：scopoletin 7-*O*-glucosyl-(6'-1'')-glucoside。(d)：scopoletin-7-*O*- β -glucoside。(e)：scopoletin 7-*O*-glucosyl-(6'-1'')-apioside。

Figure 14. Structures of rutin, scopoletin and scopoletin derivative . (a) : rutin. (b) : scopoletin. (c) : scopoletin 7-*O*-glucosyl-(6'-1'')-glucoside. (d) : scopoletin-7-*O*- β -glucoside. (e) : scopoletin 7-*O*-glucosyl-(6'-1'')-apioside.

(楊, 2005 ; Pawlus and Kinghorn, 2007)

Manuele等 (2006)也認為東莨菪素具有抗腫瘤的能力，有成為癌症用藥的潛力。由文獻得知 (楊，2005)，scopoletin衍生物有三種，分別為scopoletin 7-*O*-glucosyl-(6'-1'')-glucoside、scopoletin-7-*O*- β -glucoside，又可稱為scopolin以及scopoletin 7-*O*-glucosyl-(6'-1'')-apioside，又名xeroboside或hymexelsin，三者之化學結構式如圖十四。

2-3-3 其他重要化合物

目前在noni中已有200種化學物質被鑑定出，其主要的成份為萜類化合物、蒽醌化合物 (anthraquinones)、桑色素酞 (morindone)、檫樹苷 (morindin)、車葉草苷 (asperuloside)、桃葉珊瑚苷 (aucubin)、茜草素 (rubiadin)、東莨菪素 (scopoletin)、damnacanthal、rubiadin-1-methyl ether (Wang *et al.*, 2002)。此外，還有fatty acid glycosides、alcohols glycosides、iridoid glycosides、flavonol glycosides、lignans、coumarins和anthraquinones等(表七)，其結構式如圖十五、十六和十七 (Potterat and Hamburger, 2007)，另外還有生物鹼如xeronine (Heinicke, 1985)。而從諾麗中分離出的揮發性化合物亦多達51種 (表八)，其中以己酸 (hexanoic acid)、辛酸 (octanoic acid)、癸酸 (decanoic acid)、東莨菪素 (scopoletin)和3-methyl-3-buten-1-ol的含量最多，大約佔了總量的85% (Farine *et al.*, 1996)。

表七、諾麗果實中已知化學組成分

Table 7、Chemical composition from noni fruit

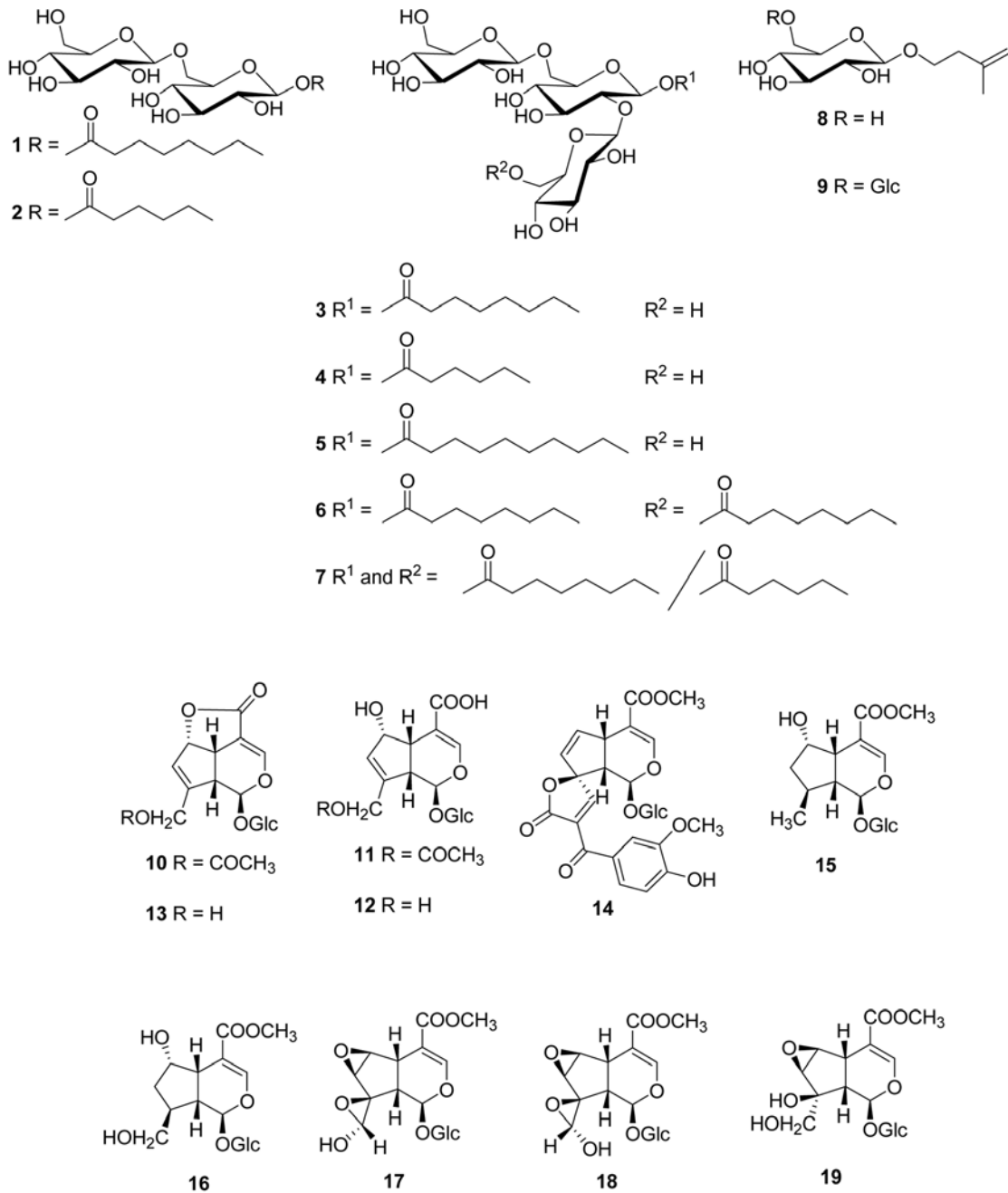
The compound in noni fruit
fatty acid glycoside (1-7)
alcohols glycoside (8-9)
iridoid (main)
asperuloside (10)
asperulosidic acid (11)
deacetylasperulosidic acid (12)
iridoid (minor)
deacetylasperuloside (13)
dehydromethoxygaertneroside (14)
<i>epi</i> -dihydrocornin (15)
6 α -hydroxyadoxoside (16)
citrifolinin B epimers a (17)
citrifolinin B epimers b (18)
6 <i>b</i> ,7 β -epoxy-8- <i>epi</i> -splendoside (19)
flavonol glycosides
rutin (20)
narcissoside (21)
nicotifloroside (22)
lignans
3,3'-bisdemethylpinoresinol (23)
americanol A (24)
americanin A (25)
americanoic acid A (26)
morindolin (27)
isoprincepin (28)
balanophonin (29)

表七、諾麗果實中已知化學組成分 (續)

Table 7、Chemical composition from noni fruit (continued)

The compound in noni fruit
coumarin
scopoletin (30)
2-methoxy-1,3,6-trihydroxyanthraquinone (31)
1,8-dihydroxy-2-hydroxymethyl-5-methoxyanthraquinone (32)
1,3-dihydroxy-2-methoxyanthraquinone (33)
1,6-dihydroxy-5-methoxy-2-methylanthraquinone (34)
2-hydroxy-1-methoxyanthraquinone (35)
5,15-dimethylmorindol (36)
anthragallol-1,3-dimethylether (37)
6-hydroxy-anthragallol-1,3-dimethylether (38)
miscellaneous compounds
β -sitosterol (39)
3- <i>O</i> -glucoside (40)
ursolic acid (41)
19-hydroxyursolic acid (42)
cytidine (43)
borreriagenin (44)
epiborreriagenin (45)
iridoid derivative (46)
succinic acid diesters (47-49)
4-hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde (50)
β -hydroxypropiovanillone (51)
vanillin (52)

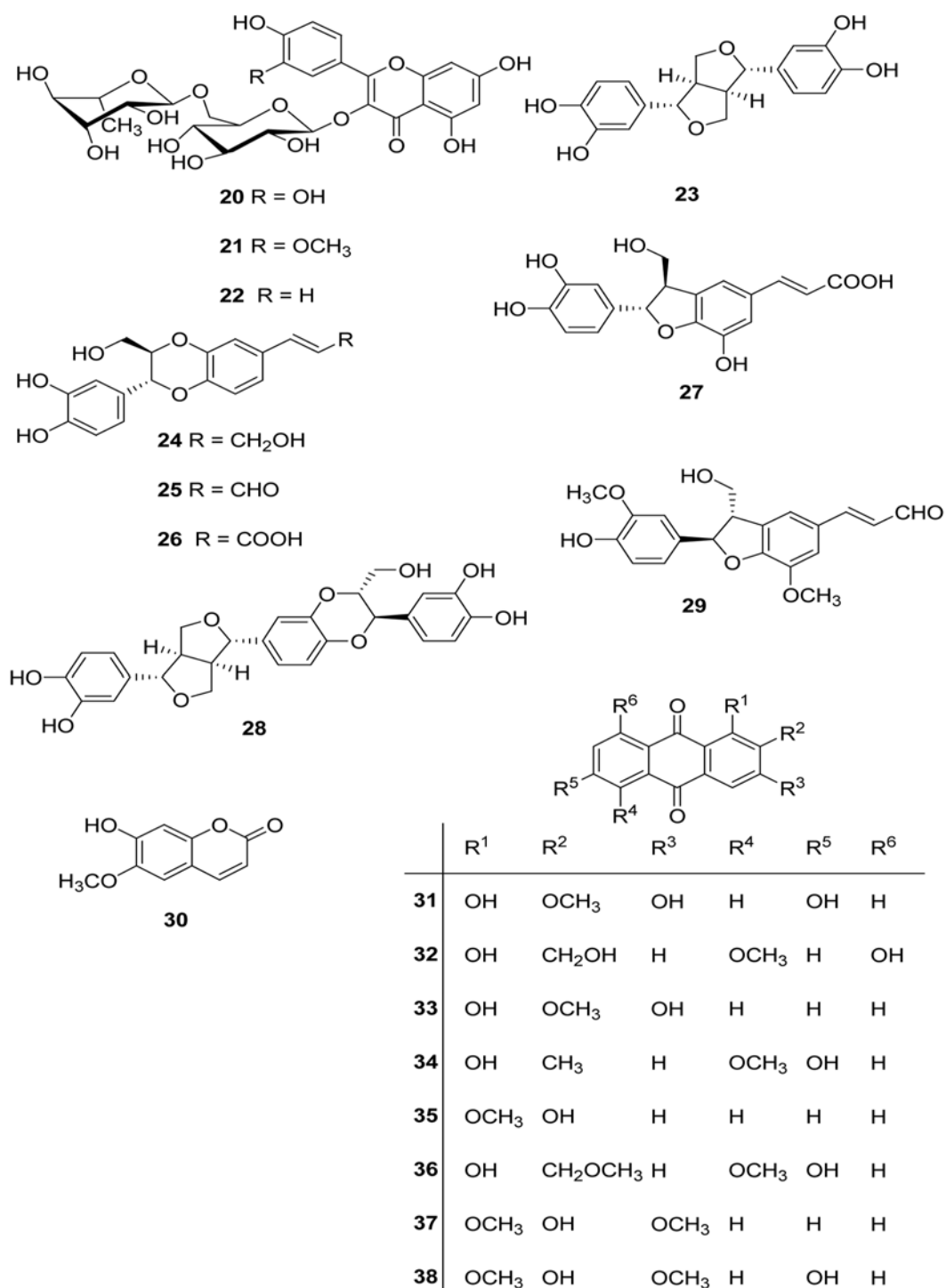
(Potterat and Hamburger, 2007)



圖十五、諾麗果實中已知之脂肪酸糖苷、醇糖苷和環烯醚萜類化合物之化學結構式。

Figure 15. Fatty acid and alcohol glycosides and iridoids reported from noni fruit.

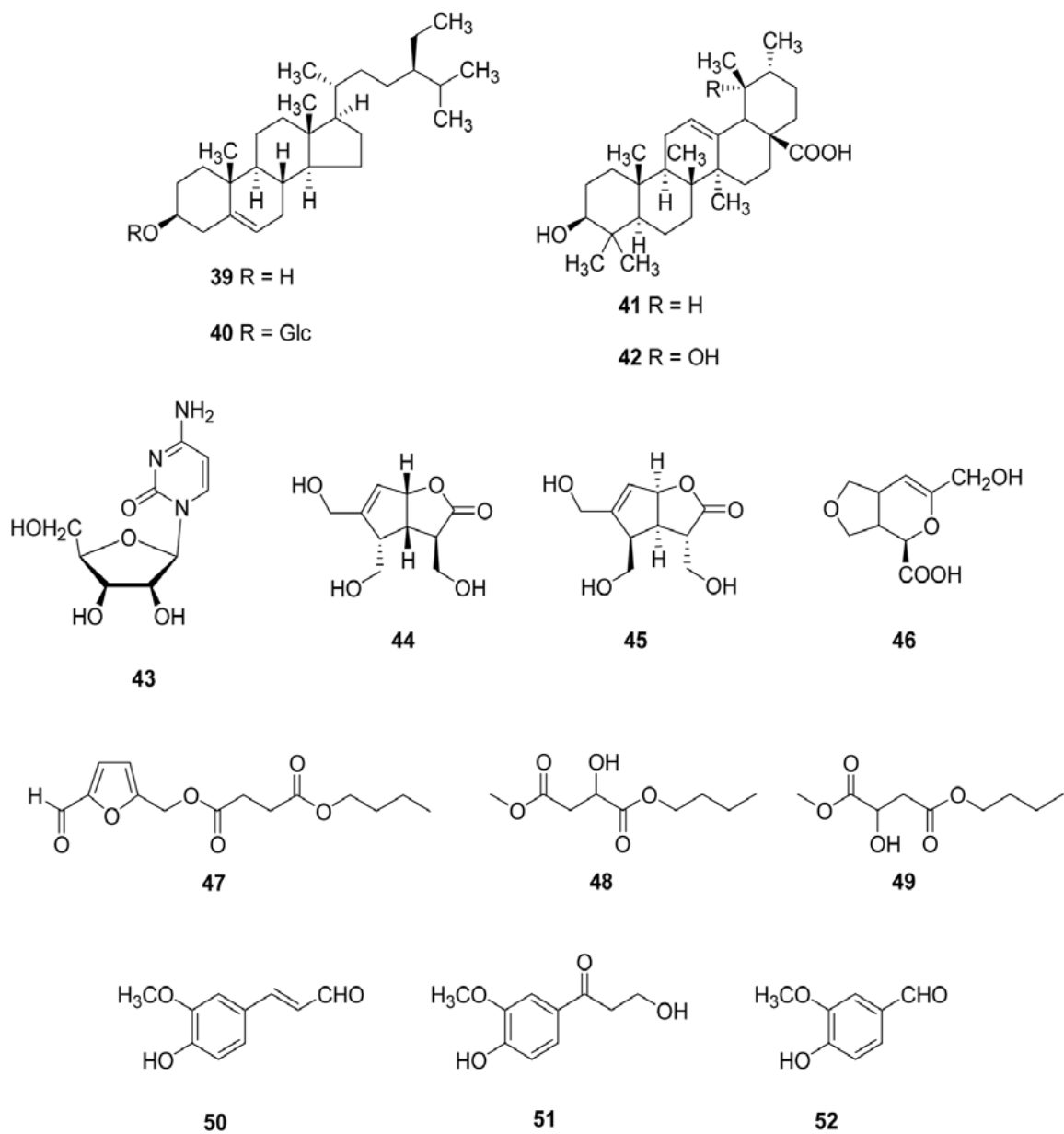
(Potterat and Hamburger, 2007)



圖十六、諾麗果實中已知類黃酮、木脂質、香豆素和蒽醌類化合物之化學結構式。

Figure 16. Flavonoids, lignans, coumarins and anthraquinones in noni fruit.

(Potterat and Hamburger, 2007)



圖十七、諾麗果實中已知之其他次級代謝產物之化學結構式。

Figure 17. Miscellaneous secondary metabolites identified in noni fruit.

(Potterat and Hamburger, 2007)

表八、成熟諾麗果實中之揮發性化合物

Table 8. Identified volatile compounds from ripe fruits of noni

compounds	MW	Identification*	%	ppm
Acids				
Acetic	60	a,b,c	0.04	0.02
2-methyl propanoic	88	a,b	0.11	0.05
Butanoic	88	a,b,c	0.71	0.31
2-methylbutanoic	102	a,b	0.54	0.23
Hexanoic	116	a,b,c	19.42	8.26
3-methylthiopropanoic	120	a,b	0.41	0.18
Benzoic	122	a,b,c	0.19	0.08
Heptanoic	130	a,b,c	0.09	0.04
Octanoic	144	a,b,c	58	24.98
Hexanedioic	146	a,b	0.08	0.03
Nonanoic	158	a,b	0.03	0.01
Decanoic	172	a,b,c	1.54	0.66
Undecanoic	186	a,b,c	0.03	0.02
Lauric	200	a,b,c	0.16	0.07
Myristic	228	a,b,c	0.14	0.06
Palmitic	256	a,b,c	0.49	0.21
Linoleic	280	a,b,c	0.05	0.02
Elaidic	282	a,b,c	0.29	0.12
Oleic	282	a,b,c	0.06	0.03
(Z,Z,Z)-8,11,14-eicosatrienoic	306	a,b	0.68	0.30
total			82.88	35.68
Alcohols				
1-Butanol	72	a,b,c	0.07	0.03
3-Methyl-3-buten-1-ol	86	a,b	4.13	1.78
3-Methyl-2-buten-1-ol	86	a,b	0.03	0.13
1-Hexanol	102	a,b,c	0.11	0.05
Benzyl alcohol	108	a,b,c	0.05	0.02
Eugenol	164	a,b	0.03	0.01
(Z,Z)-2,5-Undecadien-1-ol	168	a,b	0.41	0.18
Total			5.1	2.2
Esters				
Methyl hexanoate	130	a,b,c	0.37	0.16
Methyl 3-methylthio-propanoate	134	a,b	0.03	0.01

表八、成熟諾麗果實中之揮發性化合物 (續)

Table 8. Identified volatile compounds from ripe fruits of noni. (continued)

compounds	MW	Identification*	%	ppm
Ethyl hexanoate	144	a,b,c	0.12	0.05
Methyl octanoate	158	a,b,c	0.85	0.37
Ethyl octanoate	172	a,b,c	0.45	0.19
Methyl decanoate	186	a,b,c	0.57	0.25
Ethyl decanoate	200	a,b,c	0.19	0.08
Methyl palmitate	270	a,b,c	0.04	0.02
Ethyl palmitate	284	a,b,c	0.03	0.02
Methyl elaidate	296	a,b,c	0.05	0.02
Methyl oleate	296	a,b,c	0.03	0.01
Total			2.76	1.18
Ketones				
3-Hydroxy-2-butanone	88	a,b,c	0.06	0.03
2-Heptanone	114	a,b,c	0.35	0.15
Total			0.41	0.18
Lactones				
(E)-6-Dodeceno- γ -lactone	196	a,b	0.09	0.04
(Z)-6-Dodeceno- γ -lactone	196	a,b	0.09	0.04
Total			0.18	0.08
Miscellaneous compounds				
Hexanamide	115	a,b	0.03	0.01
Limonene	136	a,b,c	0.39	0.17
(Ethylthiomethyl) benzene	152	a,b	0.07	0.03
Unknown 1	166	b	1.48	0.64
Unknown 2	168	b	0.56	0.25
Unknown 3	184	b	0.57	0.25
Scopoletin	192	a,b	1.97	0.85
Vomifoliol	206	a,b	0.95	0.4
Unknown 4	212	b	1.65	0.71
Total			7.67	3.31

* Chemical identifications were based on EI mass spectra (a); CI mass spectra (b); and/or comparisons of their Rts with those of synthetic compounds (c).

(Farine *et al.*, 1996)

2-3-4 諾麗的指標性物質

諾麗果汁含有多種功能性化合物，已被確認能治療多種疾病，也被認可為安全食用。Noni果品質會受到多種因素的影響，例如採收季節、加工及儲藏條件，及其他果汁的添加等，因此noni 果汁之品質控制是非常急迫的需求，故需從果汁中分離純化出可被辨識之化合物來當作果汁品質控制之指標。而文獻報導(Potterat *et al.*, 2007) 多種noni果汁之指標性成分如表九，此七種化合物在其他水果中很少含存，被認為是noni果品質指標性物質，圖十八為其化學結構式。由表九得知Nonioside B (5) 及Nonioside C (6) 含量少，不易偵測，需用質譜儀偵測，但質譜儀價格昂貴，因此Nonioside B (5) 及Nonioside C (6) 不適合作為一般品質指標，另外Alizarin (7) 也是含量少，不適用於一般品質指標，而Rutin (3) 為一強抗氧化劑，易會隨儲藏時間而被破壞，而其中DAA (deacetylasperulosidic acid) (1)、AA (asperulisidic acid) (2) 及Scopoletin (4) 則為較安定的化合物，其安定度大小為DAA (1)、AA (2) > Scopoletin (4) > Rutin (3) ，且DAA與AA的總含量約為2 mg/ml，是七種化合物中較安定且含量較多者。

上述所提之DAA及AA皆屬虹甙類(iridoids)。Iridoids是萜類化合物中的環烯醚萜類，其英文名稱源自於蟻素 (iridomyrmecin)、虹彩內酯 (iridolactone) 及虹彩二醛 (iridodial)，中文名稱又可稱為虹苷，是由虹琉璃螞蟻(*Iridomyces*) 分泌的防禦性分泌物中分離而出(El-Naggar and Beal., 1980)。Iridoids具苦味且通常易溶於水，為陸生及海生植物群和動物群的次級代謝產物，在某些植物體中常以糖苷形式存在(Dinda *et al.*, 2007)。Iridoids在結構上是屬於環戊-(c)-吡喃單萜類，其基本結構如圖十九，生物學及化學分類上是作為萜烯和生物鹼的結構性連結；化學分類上作為植物群中某些屬的標記，像是車前草屬的桃葉珊瑚苷(車前草科)、豬殃殃屬的車葉草苷(茜草科)及玄參屬的哈帕苷(玄參科)。Iridoids常出現於一些民間藥用植物，作為具苦味的補益藥、鎮靜劑、退燒藥、咳嗽藥、創傷用藥、治療皮膚病等功效 (Dinda *et al.*, 2007；Tundis *et al.*, 2008；Deng, 2010)。

表九、諾麗果品質指標性成分含量

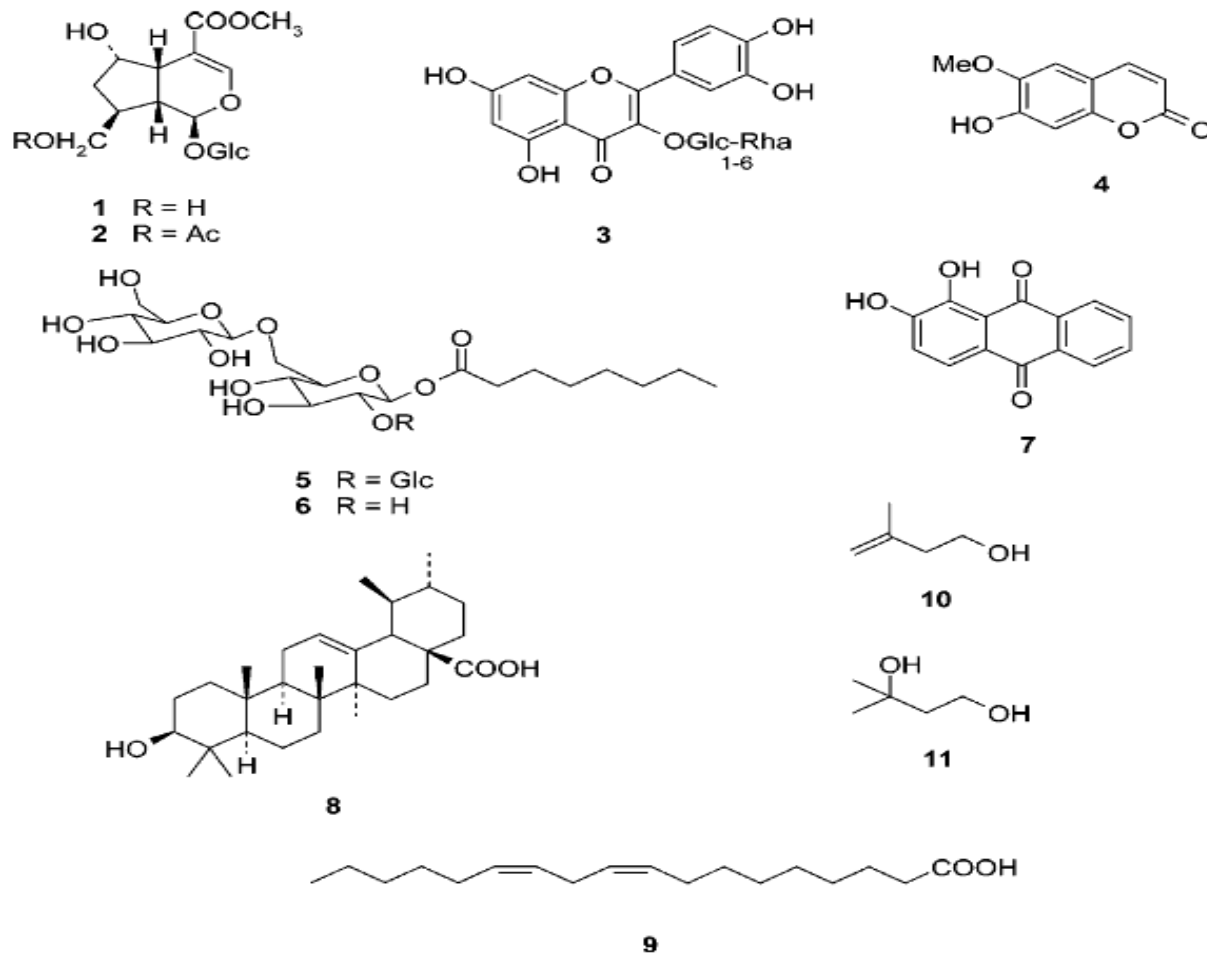
Table 9. Content of quality indicator ingredients in noni fruit

Compound/ juice	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8
DAA (1)	1050.7±24.2	488.8±18.6	1378.2±50.0	2423.5±115.9	1909.7±70.3	360.4±14.2	232.2±15.2	692.7±21.7
AA (2)	220.2±7.1	11.5±1.4	148.2±4.5	122.1±2.0	294.2±5.9	55.9±0.4	5.6±0.3	22.2±1.7
Rutin (3)	0.85±0.05	8.2±0.2	3.5±0.1	1.7±0.1	14.0±0.4	13.3±0.3	2.0±0.1	6.0±0.9
Scopoletin (4)	nd	1.5±0.2	1.6±0.9	23.2±0.2	3.4±0.9	(0.5)	Traces	1.52±0.08
Nonioside B (5)	15.5±0.4	91.7±8.1	3.8±0.2	1.8±0.3	3.0±0.2	94.2±1.6	(0.9)	nd
Nonioside C (6)	3.52±0.04	12.7±0.2	1.8±0.2	2.05±0.02	2.5±0.1	17.1±0.7	(0.3)	nd
Alizarin (7)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

DAA = deacetylasperulosidic acid ; AA = asperulosidic acid. Juice (J) : µg/mL. nd : not detected ; values in parentheses : <QL, tentative determination

J1 : Apo 1 Thai Noni ; J2 : Pacific Noni ; J3 : Tahitian Noni Juice ; J4 : Noni Widfruchtsaft ; J5 : Good Noni Juice ; J6 : Cook Islands Noni Juice ; J7 : Cook Island Noni des Iles Cook ; J8 : Nature's Noni

(Potterat *et al.*, 2007)



Compound 1 : Deacetylasperulosidic acid

Compound 2 : Asperulosidic acid

Compound 3 : Rutin

Compound 4 : Scopoletin

Compound 5 : Noniosides B

Compound 6 : Noniosides C

Compound 7 : Alizarin

Compound 8 : Ursolic acid

Compound 9 : Linoleic acid

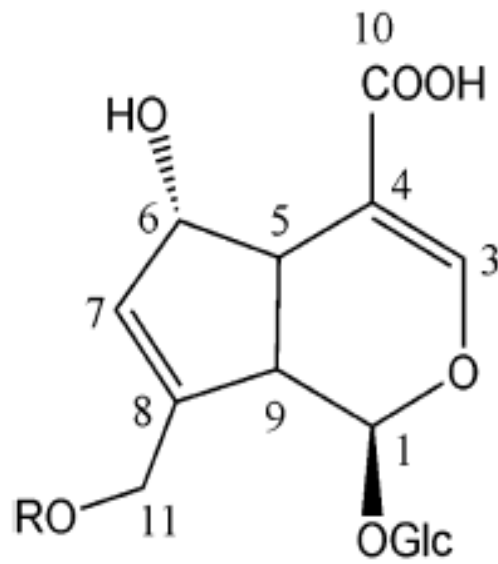
Compound 10 : 3-Methyl-3-buten-1-ol

Compound 11 : 3-Methyl-1,3-butanediol

圖十八、由諾麗果汁中分離出之化學結構式

Figure 18. Structures of compounds isolated from noni juice.

(Potterat *et al.*, 2007)



圖十九、虹貳之基本結構
Figure 19. Basic iridoids structure.

(Deng *et al.*, 2010)

2-4 諾麗的生理功效

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，不管是坊間或網路上都聲稱諾麗具有許多生理功效或對某些疾病具有療效，但許多功效仍需進一步經過科學證明。目前已知諾麗的功能性眾多，而整體上經實驗證實諾麗具有的生理活性整理如下：

2-4-1 抗微生物 (antimicrobial)

Locher等 (1995)的研究顯示出乾燥諾麗果實之乙晴萃取物可抑制 *Pseudomonas aeruginosa*、*Bacillus subtilis*、*Escherichia coli*及*Streptococcus pyrogene*等的生長。Wang等 (2002)研究也指出諾麗果實中的Acubin、L-asperuloside及alizarin和根部的一些蒽醌類化合物 (anthraquinone)具有抑菌效果，可以抑制*Pseudomonas aeruginosa*、*Proteus morgaii*、*Staphylococcus aureus*、*Bacillus subtilis*、*Escherichia coli*、*Salmonella sp*及*Shigella sp*等細菌的活性，此結果與Atkinson (1956)的研究報告相似。因此諾麗有被用來治療皮膚感染、感冒、發燒、割傷及傷口發炎等因為細菌引起的健康問題。且Saludes等 (2002)發現諾麗的乙醇和正己烷的萃取物可抑制結核桿菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)的生長達89-95%。

Jayaraman等 (2008)以不同溶劑萃取諾麗果來觀察其抗菌活性，結果顯示其甲醇萃取物的抗菌活性要高於乙酸乙脂與正己烷萃取物，且對革蘭氏陽性菌與陰性菌都具有抑制效果 (表十)，對真菌也同樣具有抑制效果 (表十一)。

2-4-2 抗氧化性 (antioxidant activity)

Wang等 (2002)比較大溪地諾麗果汁、葡萄籽粉、抗壞血酸 (Vit. C) 及pycnogenol (PYC)的超氧陰離子自由基 (superoxide anion radical) 清除能力。超氧陰離子自由基會促使細胞與脂質氧化以產生對人體有害的影響，所以超氧陰離子清除能力越高代表其抗氧化力也越好。其結果顯示諾麗果

汁的超氧陰離子清除能力為Vit. C的1.4倍、PYC的1.4倍，而與葡萄籽粉有相同的能力。

Mohd等 (2001) 以甲醇和乙酸乙脂萃取諾麗果實，並以硫氰酸鐵法 (ferric thiocyanate method) 和硫巴比妥酸法 (thiobarbituric acid test)測試其抗氧化能力。由結果發現乙酸乙脂萃取物的抑制脂質氧化的能力與等重的 α -生育醇 (α -tocopherol) 及butylated hydroxyl toluene (BHT) 相當。

Zin等 (2006) 利用高效能液相層析儀 (HPLC) 將諾麗之根、果實及葉子的粗萃取物分別區分成數個片段。這些片段都具有高抗氧化活性，但這些片段的抗氧化活性越高，其總酚不一定越高。可能是樣品中含有不同的酚類化合物，因此具有不同的抗氧化能力，所以其抑制氧化的機制也有所不同。

Liu等 (2007)研究發酵諾麗果汁之petroleum ether、ethyl acetate 和 n-butanol 萃取物之抗氧化能力與mannitol 相比較，其中mannitol 為一常見之含氧自由基清除劑，故以此作為實驗之正控制組。結果顯示乙酸乙脂萃取物具有較高之抗氧化能力，乙酸乙脂萃取物 (36.2g/mL) 可清除21.6%之氫氧自由基，而mannitol (36.2 g/mL) 則只能清除12.0% 之氫氧自由基。從發酵諾麗果汁之乙酸乙脂萃取物分離出isoscopoletin、aesculetin 及 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone (quercetin) 三種酚類化合物 (圖二十)，此三種化合物對氫氧自由基和超氧陰離子有良好的清除能力。

Ikeda 等 (2009)定量 8 種諾麗果汁 (Hawaii:1, Samoa:2, Polynesia:3 , Indonesia:4-7, Tahiti:8)中所含的 scopoletin、7-hydroxycoumarin (7-HC)及 4-hydroxycoumarin (4-HC)。8 種樣品中 7-HC 的量為 5.1-231 μ g/ml，scopoletin 的量為 0.04-0.45 μ g/ml，而沒有在任何樣品中發現 4-HC，且 8 種諾麗果汁樣品對 reactive oxygen species (ROS)中的 peroxynitrite (ONOO^-)有較好的抑制能力。

表十、諾麗果萃取物對革蘭氏陽性菌與陰性菌的抗菌活性

Table 11. Antibacterial activity of fruit extracts of *Morinda citrifolia* against gram positive and gram negative bacteria

Microorganism	Methanol extract (in mm)	Ethyl acetate extract (in mm)	Hexane extract (in mm)
<i>Bacillus subtilis</i>	10.0±1.0	6.3±0.6	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	11.3±0.6	6.7±0.6	-
<i>Lactobacillus lactis</i>	10.0±0.0	5.7±0.6	6.3±0.6
<i>Streptococcus thermophilus</i>	11.3±0.6	6.0±1.0	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10.3±0.6	-	-
<i>Salmonella typhi</i>	10.3±0.6	6.0±0.0	-
<i>Escherichia coli</i>	11.0±0.0	6.3±0.6	-
<i>Vibrio harveyi</i>	11.3±0.6	6.3±0.6	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	9.3±0.6	-	-
<i>Shigella flexneri</i>	11.0±0.0	8.0±0.0	-
<i>Salmonella paratyphi A</i>	26.0±1.0	15.7±0.6	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	12.3±0.6	11.3±0.6	-
<i>Vibrio cholerae</i>	7.7±0.6	10.7±0.6	-
<i>Chromobacterium violaceum</i>	12.3±0.6	12.0±1.0	-
<i>Enterobacter faecalis</i>	13.0±1.0	14.7±0.6	-

Note: There was no inhibition found in control.

in mm: The diameter of the inhibition zone.

(Jayaraman *et al.*, 2008)

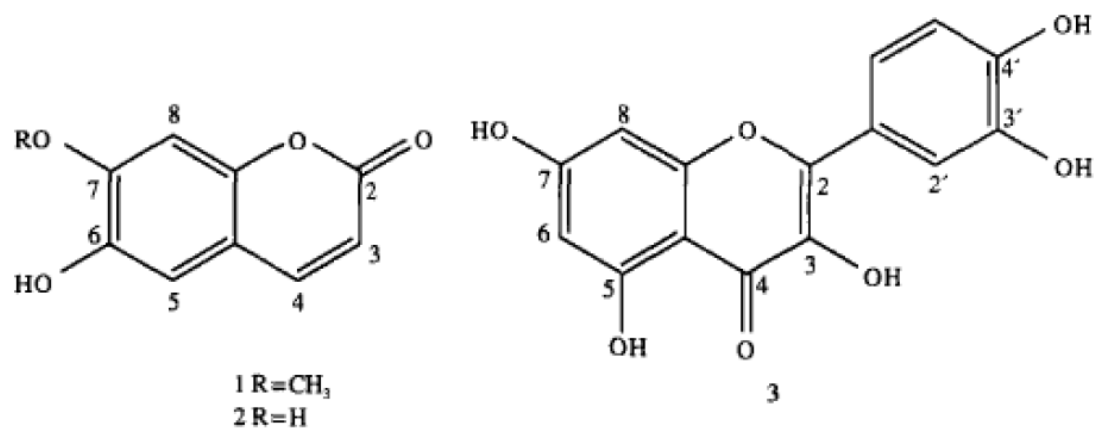
表十一、諾麗萃取物的抗真菌活性

Table 12. Antifungal activity of fruit extracts from *Morinda citrifolia*

Microorganism	Control (in mm)	Methanol extract (in mm)	% inhibition	Ethyl acetate extract (in mm)	% inhibition	Hexane extract (in mm)	% inhibition
<i>Candida albicans</i>	12±0.0	11±0.0	8.3	11±0.0	8.3	12±0.0	0
<i>Aspergillus niger</i>	67±1.0	60±0.0	10.5	63±0.6	5.9	66±0.6	1.4
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	58±0.0	12±0.0	79.3	22±0.6	62.06	41±0.6	29.3
<i>Penicillium</i> sp.	25±0.6	13±0.6	48	18±0.0	28	24±0.0	4
<i>Fusarium</i> sp.	35±1.0	18±0.6	48.5	23±0.6	34.2	33±1.0	5.7
<i>Aspergillus fumigatus</i>	25±0.0	22±0.6	12	22±0.6	12	24±0.6	4
<i>Mucor</i> sp.	90±1.0	50±0.6	44.4	60±0.1	33.33	75±0.6	16.6
<i>Rhizopus</i> sp.	70±0.0	35±1.0	50	37±0.6	47.1	58±1.0	17.1
<i>Aspergillus flavus</i>	28±0.6	25±0.6	10.7	26±0.0	7.14	28±0.0	0

in mm: The diameter of the inhibition zone.

(Jayaraman *et al*, 2008)



圖二十、由諾麗果汁之乙酸乙酯萃取物分離出的化合物 1、2 及 3 之結構。1：
Isoscopoletin； 2：Aesculetin； 3：Quercetin。

Figure 20. Chemical structures of compounds 1, 2 and 3 isolated from ethyl acetate extract of noni fruit juice. 1: Isoscopoletin; 2: Aesculetin; 3: Quercetin.

(Liu *et al.*, 2007)

2-4-3 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，來觀察諾麗果水草物的抗發炎活性，結果顯示口服200 mg的諾麗果水草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) 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) 認為大溪地諾麗果汁除了對COX-2具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。

Yu等 (2008)指出諾麗果汁中主要的抗炎物質scopoletin、quercetin及ursolic acid可有效抑制細胞激素interleukin-1 β (IL-1 β)、interleukin-6 (IL-6)、前列腺素E₂ (prostaglandin E₂; PGE₂) 和骨髓過氧化酶 (myeloperoxidase; MPO)等發炎相關因子的產生。Calabrò等 (2005)亦指出諾麗果汁中的芸香素化合物也具有抗發炎的功效。

2-4-4 抗腫瘤及抗癌 (anti-tumor and anti-carcinogenic)

Hirazumi等 (1994)於諾麗果汁中發現含有不溶於乙醇的豐富多醣體物質，又稱作noni-ppt，其主要成分為葡萄糖醛酸 (glucuronic acid)、半乳糖 (galactose)、阿拉伯糖 (arabinose)及鼠李糖 (rhamnose)。研究指出noni-ppt對路易士肺癌細胞 (Lewis lung carcinoma, LLC)具有細胞毒殺性 (cytotoxicity)，noni-ppt似乎可促使T細胞、胸腺細胞和巨噬細胞釋放一種細胞激素，使腫瘤的細胞週期變慢以及促進免疫細胞反應來對抗腫瘤的生長。實驗結果也顯示讓具有LLC的小鼠每日攝取15mg的諾麗果汁，可有效增加小鼠的存活時間達119%，也使22隻癌症末期的小鼠中的9隻存活超過

50天。攝取noni-ppt並搭配傳統化療來治療小鼠使其存活時間也有明顯的增加 (Hirazumi et al., 1994; Hirazumi et al., 1996; Hirazumi and Furusawa, 1999)。

Dimethyl benz [a] anthracene (DMBA) 為一化學致癌物，當DMBA與細胞中的DNA結合會形成DMBA-DNA加成物 (DMBA-DNA adduct)，是化學致癌之起始關鍵。Wang和Su等 (2001)在實驗鼠的飲用水中加入大溪地諾麗果汁，連續餵食noni果汁一星期後再餵食DMBA，研究結果顯示可顯著減少DMBA-DNA加成物在實驗鼠之心、肝、肺和腎中的生成。

Jayaraman等 (2008)研究諾麗果之甲醇、乙酸乙酯和正己烷萃取物對人類喉癌細胞 (human laryngeal epithiloma cells)的抑制作用。結果顯示甲醇萃取物之抑制效果最好，其次是乙酸乙酯萃取物，而正己烷萃取物則幾乎不具抑制效果。

Thararat等 (2011)研究諾麗果中萃取分離純化的Damnacantha，研究此醌類化合物對於大腸癌細胞(human colorectal cancer cells)的機制探討，結果顯示諾麗果的Damnacantha對於癌細胞具有抑制作用。

2-5 果膠多醣之生理特性

2-5-1 .具生理活性的果膠多醣

多醣膠質與植物半纖維素除了具有膳食纖維的機能，可以促進腸道健康，提高有益菌數、產生短鏈脂肪酸、降低 pH 值、降低病原菌或有害菌、降低二級膽酸量及增加糞便體積 (Wood *et al.*, 2001) 外，亦有研究指出 (表十二)，不同多醣及寡醣具有特定生理活性功能。

2-5-2 腸胃道降解作用機制

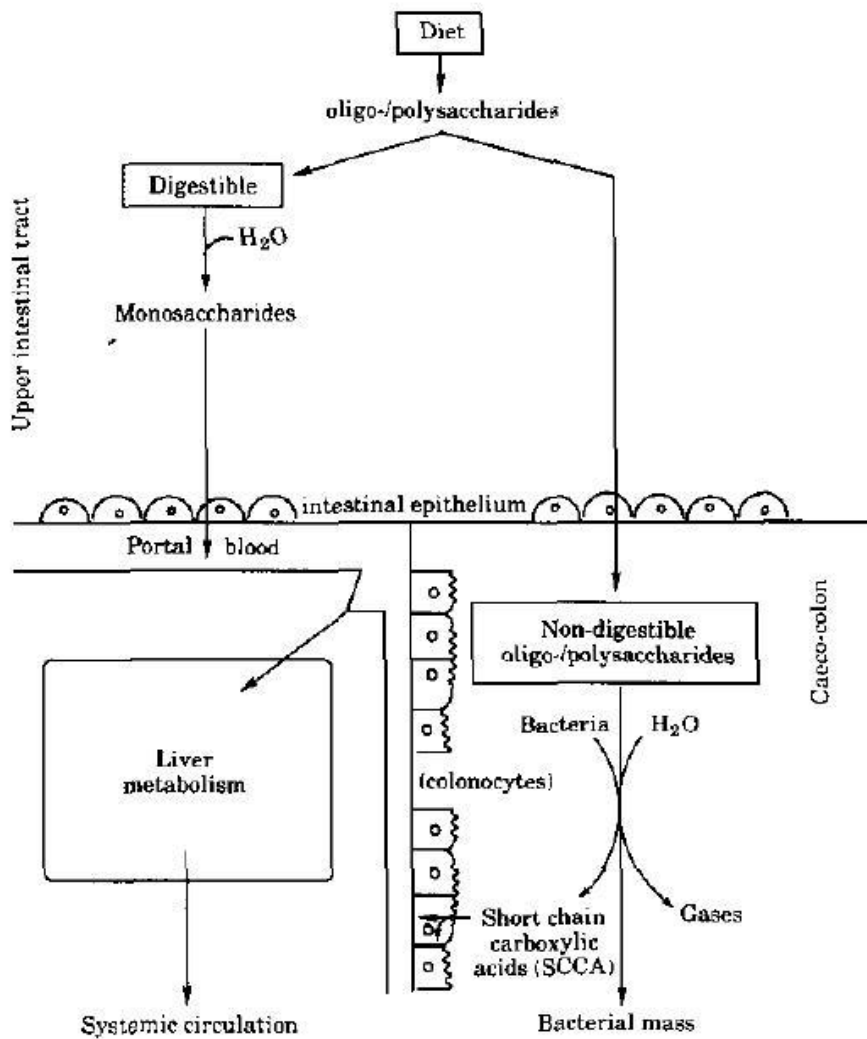
飲食中的寡醣及多醣在腸道上段的處理後，進入腸道上皮細胞進行一連串消化作用，非消化性多醣會經由益生菌代謝之後，產生短鏈脂肪酸與維生素，經結腸上皮細胞吸收後，還能進一步降低結腸癌發生的機率。(Delzenne *et al.*, 1994，黃 2004)(圖二十一)

表十二、具特定生理活性的食品多醣

Table 12. Food polysaccharides with bioactivity

來源	生理活性	具生理活性多醣成分	參考文獻
蒟蒻	降低老鼠血膽固醇、 抑制肝腫瘤生長	β 1→4-D-glucomannan	吳 1994；郭1997
燕麥纖維	降低大鼠血膽固醇， 降低餐後血糖值	β 1→4-branched- β -1→3-glucan	Bell et al. 1999， Kalra et al. 2000
玉米穗軸	增加老鼠免疫活性	arabino- β 1→4-xylan	Ebringerová et al. 2002
當歸	抑制人類子宮頸癌 與肺癌細胞的生長	α -1→6-Glc- α -1→4- arabinoglucan	Cao et al. 2006
菇類	抗腫瘤	β -(1→6)-branched β -(1→3)-D-glucan	Yan et al. 2003 Mizuno et al. 1995
紅藻膠	抑制老鼠肉瘤細胞 的生長、增加體液 免疫的功能	β -D-galactose- β -1→4 and α -1→3-3→6-anhydro-D- galactose	Yuan et al. 2006
中草藥	抗潰瘍、抗腫 瘤、抗發炎	α -1→4polygalacturonan- branched-rhamnogalacturonan	Yamada 1994

(李, 2008)



圖二十一、消化性與非消化性多醣的生物利用率

Figure 21. Schematic representation of the bioavailability of digestion and non-digestion oligo/polysaccharides.

(Delzenne *et al.*, 1994)

2-5-3 果膠多醣在腸胃道的功能特性

膳食纖維雖並非必須營養素之一，許多研究指出對於心血管疾病、大腸直腸癌等文明並具有預防保健功效(Williams *et al.*, 2005)。行政院衛生署國民飲食指標中指出膳食纖維具有促進腸胃蠕動與預防大腸癌之功效。根據Trowell (1976)對膳食纖維的定義，膳食纖維是植物多醣體及木質素(lignin)等不被人體消化酵素所分解的植物成分，也就是植物細胞壁上的纖維素(cellulose)、半纖維素(hemicellulose)、果膠(pectic substances)、木質素以及存在細胞質內之植物膠(gums)，黏液質(mucilage)；海藻多醣體(algal polysaccharides)等。許多研究指出多醣具有膳食纖維的功能，包括保健腸道、調節免疫、調節血糖、調節血脂、抗腫瘤、抗微生物、清除體內自由基等功能(Mizuno *et al.*, 1995; Bohn *et al.*, 1995)。一般依其溶解性可以分為兩大類：(表十三)

1. 水溶性膳食纖維：包括一些半纖維素；黏質液、植物膠(果膠、樹膠等)。目前常用於食品中之水溶性膳食纖維有高分子量的菊糖、蒟蒻(葡甘聚醣)、關華膠、海藻膠、糊精，此外，燕麥富含水溶性的 β -聚葡萄糖(β -glucan)是穀類中水溶性纖維之良好來源。
2. 不可溶性膳食纖維：包括纖維素、木質素以及部分半纖維素。不溶性膳食纖維通常無法經由腸道細菌代謝分解，降低食品多醣在腸道中的消化率。依照種類不同而有所差異，果膠及植物膠一般約為 90~100%、半纖維素約為 50~80%、纖維素約 30~50%。(Wood *et al.*, 2001)

2-5-4 諾麗乙醇萃取果膠多醣體

諾麗果中亦含有豐富的碳水化合物，Hirazumi等 (1994)於諾麗果汁中發現含有不溶於乙醇的豐富多醣體物質，又稱作noni-ppt，其中包含有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，這些果膠多醣共佔了諾麗果81.6%的碳水化合物。文獻指出諾麗果汁中的乙醇沉澱多醣具抗癌效果(Furusawa *et al.*, 2003; Hirazumi *et al.*, 1999)；乙醇萃取沉澱多糖組成已被發表(Anh *et al.*, 2006)(表十四)。

表十三、食品多醣的溶解性及分類

Table 13. Solubility and Classification of food polysaccharides

Classical Nomenclature	Solubility Characteristics	Classes of Polysaccharides
Pectic Substances	Water-soluble	Rhamnoglacturonans Arabinogalactans β -glucan
Hemicelluloses	Insoluble in water Soluble in dilute alkali	Arabinoxylans Galactomannans
α -Cellulose	Insoluble in water	Cellulose
Lignin	Insoluble in 12 M H ₂ SO ₄	
Gums and Mucilages	Water-soluble or dispersible	Galactomannans Arabinogalactans

(Southgate *et al.*, 2001)

表十四、諾麗果汁乙醇萃取沉澱多醣之單醣與組成

Table 14. Monosaccharide linkage and composition of Noni-ppt

Sugar	Deduced glycosidic linkage ^a	Linkage composition (mol%) ^b	Monosaccharide composition (mol%)
<i>Rhap</i>	Terminal	0.6	9.5
	2-	3.3	
	2,4-	2.1	
<i>Fucf</i>	Terminal	0.3	0.3
<i>Araf</i>	Terminal	7.7	13.6
	2-	tr	
	3-	0.1	
	5-	4.8	
	3,5-	2.1	
<i>Xylp</i>	Terminal	0.6	1.2
	2-	0.3	
	4-	0.3	
<i>Manp</i>	4-	0.2	0.7
<i>Glcp</i>	Terminal	0.5	2.2
	4-	1.9	
	4,6-	0.3	
<i>GlcAp</i>	Terminal	0.9	1.1
<i>Galp</i>	Terminal	4.3	17.9
	3-	0.5	
	4-	10.7	
	6-	1.1	
	2,4-	0.2	
	2,6-	tr	
	3,4-	0.6	
	3,6-	1.9	
<i>GalAp</i>	Terminal	2.8 (10)	53.6 (60)
	4-	52.1 (68)	

^a Terminal *Araf* is deduced from 1,4-di-*O*-acetyl-2,3,5-tri-*O*-methylarabinitol, etc.

^b Average of duplicate determination; (), % methyl esterification; tr, trace (<0.2%).

(Anh *et al.*, 2006)

2-6 細胞凋亡

2-6-1 細胞凋亡現象的發現及特徵

細胞凋亡在1914年時已有被發現及描述，當時將此現象以「染色質溶解(Chromatolysis)」來形容 (Majno *et al.*, 1995)。而後澳大利亞學者J. F. R. Kerr 也發現到此現象。1965年Kerr發現老鼠肝臟在非致命的缺血情況下，肝臟細胞會產生有逐漸萎縮的現象，甚至有些細胞還會恢復成正常。這種不同當時所稱的細胞壞死 (Necrosis)的細胞死亡現象，Kerr就根據其形態上的變化，將之稱為「皺縮性的細胞壞死 (Shrinkage necrosis)」(Kerr, 1965)。之後在James Cormack的建議下，以希臘文在1972年正式將「皺縮性的細胞壞死」這詞更改為「細胞凋亡 (Apoptosis)」(Kerr *et al.*, 1972; 楊, 2006)(表十五)

在早期以電子顯微鏡觀察細胞凋亡結構上的變化中，發現可將之區分為兩個主要的時期；第一個時期包括細胞核及細胞質的萎縮、細胞會崩解成一大群被細胞膜包裹好好的碎片，而這些碎片也就是凋亡小體 (apoptotic bodies)；第二個時期：這些凋亡小體會從細胞表面消失，或被其他的細胞分解、消化，而這樣的一連串的分解、消化現象，相似於物質在吞噬體 (phagosomes) 中自溶 (autolysis)現象，因此在此時期，最主要的現象就是凋亡小體被吞噬的情況。凋亡的細胞會和相鄰細胞逐漸脫離，且有細胞濃縮的現象；細胞內的胞器緊湊的聚在一起的情況 (Boobis *et al.*, 1989; Fawthrop *et al.*, 1991)。另外，凋亡細胞內的endonuclease也會因胞內的鈣離子濃度上升而被活化，使細胞的染色質萎縮和斷裂成寡核體長度的片段 (Oligonucleosome length fragments)，其長度約為180~200 bp (Fawthrop *et al.*, 1991; Oberhammer *et al.*, 1993)。而在細胞膜和細胞核則會產生大水泡(blebbing)的現象 (Boobis *et al.*, 1989)。

另外，細胞程式性死亡 (programmed cell death) 亦是細胞凋亡的另一個名稱。經由細胞凋亡所產生的細胞壞死，並不太會引起發炎反應的產生，因為凋亡的細胞通常在組織裡都是極少數的，在進行時，凋亡細胞

表十五、細胞凋亡與細胞壞死的比較

Table 15. Apoptosis V.S Necrosis

比較項目	細胞凋亡	細胞壞死
發生原因	細胞內部自動性	細胞外部被動性
誘導因素	多種無ATP缺乏的生理或病理因素	強烈的刺激因素(毒素等)
細胞形態	膜皺縮，體積變小	體積膨大，變性
細胞質膜	始終保持良好的整合性	破裂
粒線體	內腔閉鎖，體積縮小	內腔擴大，崩解
溶酶體	萎縮，或自吞嚥形成	膜破壞，各種酶類釋出
細胞質	濃縮，均質著染加深	稀或濃，有顆粒或空泡
細胞的DNA	核小體DNA等量斷裂，有規律降解	DNA無規則降解
細胞核的形態	多破裂成相等大小	破裂成大小不等的塊狀
凋亡小體	形成一個或多個	無
分子機制	與凋亡相關基因調控	無基因調控
代謝反應	蛋白酶參與的級聯反應	無有秩序的代謝反應
周圍變化	無發炎性破壞，不留傷痕	有明顯的發炎反應
消除方式	吞嚥消除	溶解消失
結局	壞死	壞死
對個體的影響	個體正常存活的需要	有損傷、破壞作用

(楊, 2006)

會和其周圍的細胞脫離且皺縮，因此，就算有發炎物質的產生，其影響也不大，況且通常這些細胞都很快地被周圍的細胞吞噬掉。因此細胞凋亡是藉由基因來控制，而整個過程是很快速的進行，並和細胞分裂共同扮演起調節細胞存活的角色。

2-6-2 細胞凋亡相關蛋白質

與細胞凋亡相關的蛋白質有很多，主要執行凋亡工作的是caspase 蛋白酶 (Hengartner, 2000)。Caspase 家族亦稱為ICE/CED-3 家族，因為他和Caenorhabditis elegans 的CED-3 基因具有同源性。一般caspase 是以 pro-caspase的形式存在，需經過自身裂解成大小兩個基團、去除pro-domain 及形成二聚體的方式以成為活化狀態。並以上下不同caspase 的一連串活化的連鎖反應傳達凋亡訊息 (Wang & Lenardo, 2000)。目前已知的 caspase family 成員有十餘種，其中caspase-3 是細胞凋亡路徑中的關鍵分子，因為caspase-3 位於細胞凋亡訊號的下游，無論是intrinsic 或 extrinsic 的路徑最終都會以caspase-3 作為一個轉承訊號的位置。Pro-caspase-3 的大小是 32KD， pro-caspase-3 在活化過程中從 Asp28~Ser29 和 Asp175~Ser176 兩處被剪切，形成P17 (29~175)和P10 (182~277)兩個片段，活性形式是由兩個17KD 和兩個12KD 的次單位所組成。 caspase-3 的substrate 是PARP，caspase 把PARP 切成兩個片段，116kD 的PARP 在 Asp216-Gly217之間被caspase-3 剪切成31kD 和85kD 兩個片段而失去作用，結果使受 PARP 負調控影響的 intra-nuclear calcium/magnesium-dependent endonuclease 活性增高，造成DNA 的裂解並引起細胞凋亡。

另一種和細胞凋亡相關的蛋白是Bcl 家族。粒線體在凋亡作用中是一個具整合作用的胞器機構，粒線體膜上有一種 mitochondrial permeability transition pore (PT pore)。打開PT pore 會造成粒線體內膜兩側 H⁺濃度梯度消失、膜電位下降、滲透壓增高，最後造成粒線體漲大，並使cytochrome c 或

AIF 等 caspase-inducing factors 釋出到細胞質中引發下游的細胞凋亡反應。而重要的 Bcl 家族的成員不少就位於粒線體的膜上或附近的細胞質中，以調控粒線體的通透 (Desagher and Martinou, 2000)。Bcl 家族與 *C. elegans* 抗凋亡基因 CED-9 具有同源性，而 Bcl 家族的成員中彼此間也具有兩個同源區 BH1 和 BH2，通過這些同源區各成員可以形成同源及異源多聚體。Bcl 家族一般是以 dimer 形成活化態並以這些 domain 與粒線體形成核孔複合體 (Adams and Cory, 1998)。Bcl 家族本身又分兩種：抑制細胞凋亡的 Bcl-2、Bcl-xL、Bcl-w、Mcl-1 等；以及促進凋亡的 Bax、Bak、Bik、Bid、Bim 等。這些蛋白質的作用，以 Bcl-2、Bcl-xL 或 mcl 為例，這三者蛋白量增多時，常會以 dimer 的形式，抑制 PT pore 的開啟，加強粒線體膜電位，抑制鈣離子的釋放，使核酸內切酶無法活化，進而降低凋亡的情形。

Bax 基因長 415kb，含六個外顯子 (Exon)，因剪接方式不同編碼三種蛋白質，含 192 個胺基酸，分子量為 20kDa，分別為 Bax- α 、Bax- β 、Bax- γ 蛋白與 Bcl-2 蛋白形成異二聚體，可使 Bcl-2 蛋白失去活性，而對細胞凋亡有促進作用。Bax 蛋白與 Bcl-2+Bcl-x 蛋白的比值決定細胞受刺激後是凋亡還是存活，Bax 蛋白佔優勢時細胞凋亡，反之，則細胞存活。

Bcl-2 對凋亡的調控目前認為主要是通過對粒線體相關信號的抑制或啟動而扮演作用 (Newmeyer, 1998)，分子量為 28kDa，最初是當作癌基因而被發現，而後發現 Bcl-2 能抑制熱休克 (Heat shock)、放射線、抑癌藥物等多種途徑誘導的細胞凋亡。Bcl-2 分子結構中存在三個分別稱為 BH-1、BH-2、BH-3 的部位。這三個部位可形成通道式的立體結構。缺乏這三個部位的 Bcl-2 失去對細胞凋亡的抑制功能。Bcl-2 的 N 末端存在著被稱為 BH-4 的部位，是與多種蛋白質結合的部位，其中包括 Bad、Raf-1 等。C 末端存在著疏水區域，Bcl-2 借助這一區域與粒線體膜、內質網膜、核膜等細胞器膜結合。缺失 C 末端的 Bcl-2 只存在於細胞質中，而且對細胞凋亡沒有抑制作用，可見 Bcl-2 的作用位點是在細胞器膜上。此外 BH-3 與 BH-4 之間存在所謂的環形區域 (Loop region)，此領域中的絲胺酸 (Serine) 被磷酸化後 Bcl-2 的細胞凋亡抑制

作用減退。

在各種刺激所誘導的細胞凋亡實驗中發現，在細胞凋亡之前粒線體電位低下，引扮演膜的通透性增加，膜中存在的50kDa的蛋白質細胞凋亡誘導因子 (Apoptosis inducing factor) 向細胞質中露出，啟動非活性的Caspase-3使之活性，而將細胞凋亡的資訊傳遞下去。Bcl-2能抑制AIF的漏出，機制可能與Bcl-2通過直接和間接的作用保持粒線體膜的膜電位，調整膜通透性有關。

2-6-3 分析凋亡細胞的方法 - 流式細胞技術(Flow cytometry)：

流式細胞技術 (Flow cytometry) 是一門應用了流體力學、雷射激光、高速電腦、螢光染色、以及細胞生物化學等數門科技，可以自動分析細胞的技術。其工作原理是將懸浮在溶液裡的分散細胞，一個個地依序送往測量區，當每個細胞通過測量區時產生散射光及螢光。這些光線可以被轉換成電子訊號，再進行貯存、分析，並以各種圖形顯示出來，藉此便可測量細胞的一系列重要物理特性及生化特徵。這些特性可以是細胞的大小、活性、核酸含量、酵素活性、表面抗原等。

2-6-4 細胞凋亡檢測 - Annexin V 訊號分析

Annexin V 是一種分子量為35~36KD 的磷脂結合蛋白，能與細胞的磷脂質絲胺酸 (phosphatidylserine, PS) 高親和性的結合。而磷脂質絲胺酸這種磷脂性的蛋白在細胞正常的生理情況下是位於細胞膜的內側，但在細胞凋亡的早期，磷脂質絲胺酸會從細胞膜的內側翻轉到細胞膜的外側表面。因此先將Annexin V 用FITC或biotin 加以標記，便可以此具標記的Annexin V 作為探針加以檢測外翻的磷脂質絲胺酸。一般進行annexin V 染色時還會並用碘化丙啶 (PI) 進行雙染。PI 是一種核酸染料，在細胞膜通透性下降的前提下才能穿透細胞膜而染到細胞核。因為在細胞凋亡晚期

以及因其他因素細胞死亡的情形下細胞膜通透性會下降而磷脂質絲胺酸也會外翻，因此將Annexin V 與PI 雙染使用，就可以將凋亡早晚期的細胞以及死細胞加以區分開來。

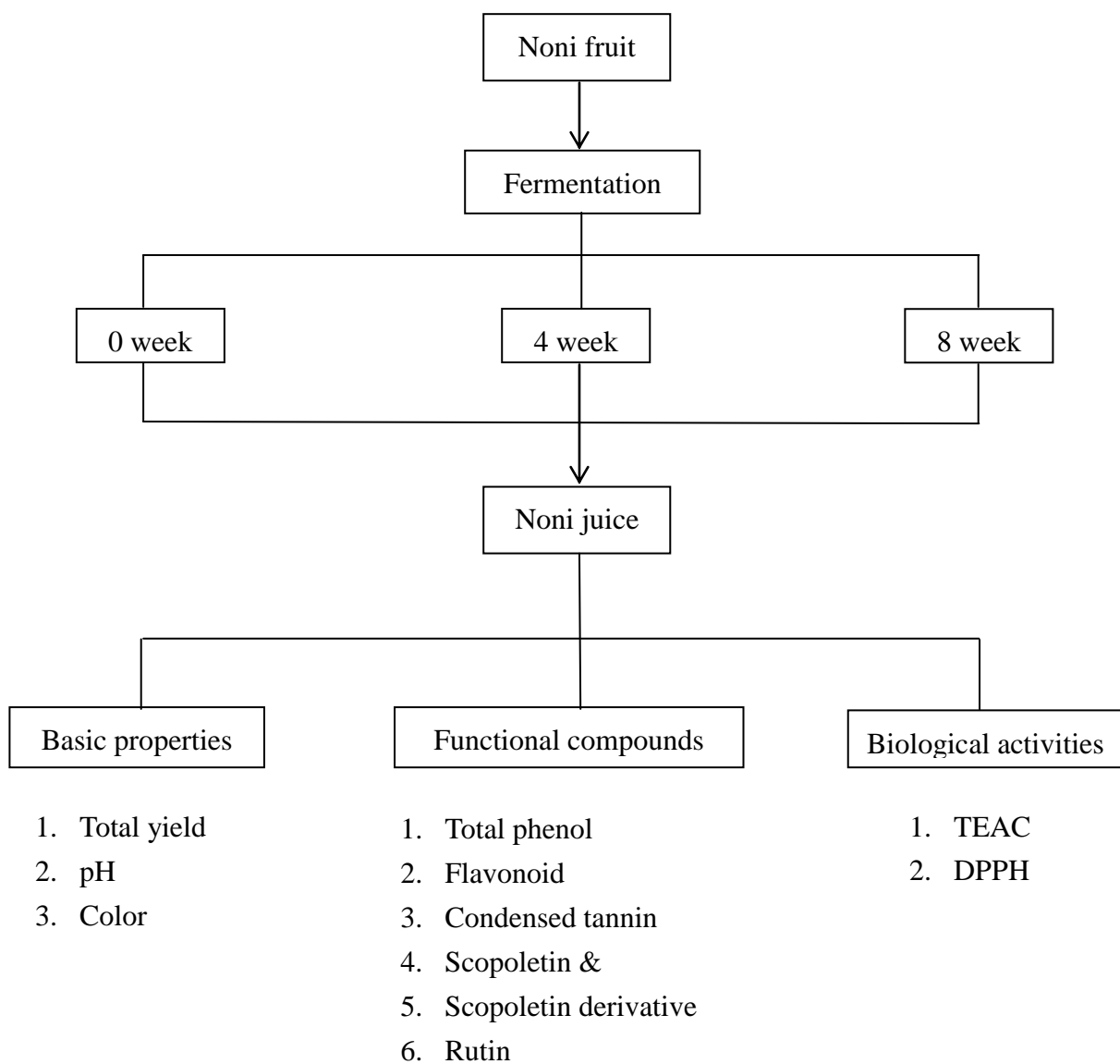
2-6-5 細胞凋亡相關蛋白檢測

牽涉於細胞凋亡機制中的蛋白質有很多，例如caspase 家族, Apaf-1, cytochrome c, PARP。一般凋亡訊號產生後先活化上游的caspase，接著將存在於線粒體內膜和外膜之間的cytochrome c 釋出，凋亡信號便從線粒體釋放至細胞液，結合Apaf-1 後啟動下游caspase 反應，最後活化PARP 等；參與這個途徑的尚有Bcl family、Bax、Caspase 3、PARP 等具有重要角色的蛋白質。這些蛋白質的檢測可利用西方墨點法檢查蛋白質含量；可作為細胞凋亡的證據之一，因此本研究以西方轉漬法探討諾麗抑癌作用之機制。

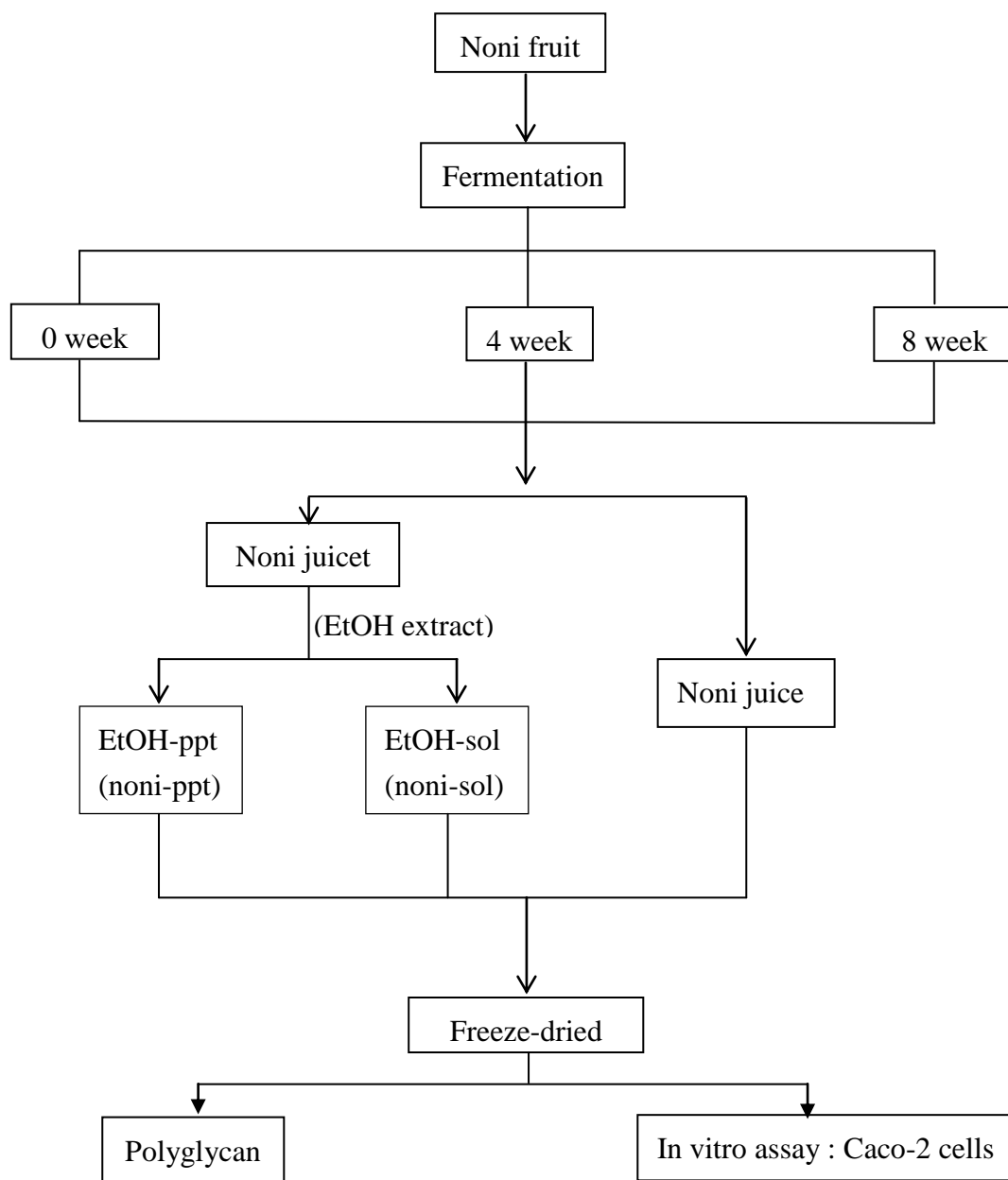
參、材料與方法

3-1 實驗架構：

Part 1. 諾麗果汁發酵實驗



Part 2. 乙醇萃取諾麗果汁多醣體與抑癌實驗



1. Total carbohydrate analysis
2. Reducing sugar
3. Molecular weight of polyglycan

1. Cell viability
 - MTT assay
2. Apoptosis
 - Flow cytometer

3-2 實驗材料：

3-2-1 實驗原料

本土品種小諾麗果，購自雲林縣東豐景觀園藝公司。

3-2-2 分析試藥與試劑

1. 2,2'-azion-bis-(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)、
butylated hydroxyanisole (BHA)、peroxidase (from horseradish)、
2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH)、(+)-catechin、
4-hydroxy-3-emthoxybenzaldehyde (vanillin)、
3,3',4',5,7-phentahydroxyflavone (quercetin)、quercetin-3 β -D-rutinoside
(rutin) 購自 Sigma, U.S.A.。
2. Sodium chloride (NaCl)、trifluoroacetic acid (TFA)、potassium acetate
(CH₃COOK) 購自 Riedel-deHaën, Germany。
3. Aluminium nitrate (Al(NO₃)₃ · 9H₂O)、hydrogen peroxide (H₂O₂) 購自 Merck,
Germany。
4. 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (trolox)、Gallic acid、
Formic acid 購自 Aldrich, U.S.A.。
5. Folin-Ciocalteu's phenol reagent、sodium carbonate (Na₂CO₃) 購自
Sigma-Aldrich, U.S.A.。
6. Methyl alcohol (MeOH, HPLC grade) 購自 Mallinckrodt, U.S.A.。
7. Acetonitrile (CH₃CN, HPLC grade) 購自 HY BIOCARE CHEM, U.S.A.。
8. Scopoletin 購自 ACROS, U.S.A.。
9. Hydrochloric acid (conc. HCl)、sodium hydroxide solution (NaOH)購自聯工化學
試藥, Taiwan。
10. Ethanol absolut (C₂H₆O) 購自 Feral Berlin GmbH, Germany。
11. 商用食品脫氧劑：DR 級，台灣小嵩無氧化學股份有限公司。

3-2-3 人類細胞株

人類大腸腺癌細胞株 C2BBel (Human colon adenocarcinoma, clone of Caco-2) ; ATCC CRL-2102 ; BCRC number : 60182 , 具有正常腸道上皮細胞之黏膜與型態 , 採附著性的生長特性 , 購自食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心 (Bioresource Collection and Research Center, Hsinchu, Taiwan) 。

3-2-4 細胞培養基

取 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 粉末 (GIBCO, USA) , 以 900 mL 二次水溶解後 , 添加碳酸氫鈉 1.4 g/L , 測定 pH 值約 7.2 , 以 0.22 μ m 過濾膜 (Millipore, USA) 過濾 , 再加入 100 mL 胎牛血清 (Charcoal/Dextran treated fetal bovine serum ; FBS, Lot : 315734) 、 10 ml 100X sodium pyruvate (GIBCO, USA) 、 1ml human transferrin (GIBCO, USA) , 混合均勻後儲存於 4°C 備用 。

3-2-5 細胞培養其他藥品

Trypsin-EDTA 及 Trypan blue 均購自 Biological Industries (Kibbutz, Israel) 、 Sodium bicarbonate (OSAKA, Japan) 購自 Sigma (MO, USA) 、 Potassium phosphate 及 Sodium phosphate 購自 Mallinckrodt Baker (NJ, USA) 。 Sodium chloride 購自 Amresco (OH, USA) 、 Acetic acid 購自 TEDIA (OH, USA) 、 MTT reagent 購自 Sigma (St. Louis, USA) 。

3-2-6 細胞凋亡試劑

Annexin-V apoptosis kit 購自 Strong Biotech Corporation (Taiwan)

3-2-7 蛋白質分析試劑

(1) Cell lysis buffer

1. Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane 購自 Bio-Rad (CA, USA) 。
2. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 、 Nonidet P-40 substitute (NP-40) 及

Sodiun deoxycholate 均購自 Sigma (MO, USA)。

3. Sodium dodecyl sulfate (SDS) 購自 Bio-Rad (CA, USA)。

(2) 定量試劑

BCATM Protein Assay Kit 購自 Pierce Biotechnology (IL, USA)。

(3) 西方轉漬試劑

1. N,N,N,N,-Tetramethylethylenediamine (TEMED)、Bromophenol blue、Ponceau S、Skim milk 及 Bovine serum albumin 購自 Sigma (MO, USA)。
2. Glycerol、Glycine、Sodium chloride 及 Tween-20 購自 Panreac Quimca Sa (Barcelona, Spain)。
3. Ammonium persulfate ultrapure (APS)、Dithiothreitol (DTT)及Sodium phosphate monobasic, monohydrate 購自 GERBU (Gaiberg, Germany)。
4. Acryamide-bis solution 40%、Sodium tetraborate-10- hydrate及Sodium phosphate dibasic 購自 Merck (Darmstadt, Germany)。
5. Sodium dodecyl sulfate (SDS) 購自 Bio-Rad (CA, USA)。
6. Methyl alcohol 及 Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris) 購自 Mallinckrodt Baker (NJ, USA)。
7. BlueRAY Prestained Protein Ladder購自 GeneDireX (Bruges, Belgium)。
8. Blotting Papers購自 Whatman plc. (Kent, UK)。
9. PVDF (Polyvinylidene Fluoride) Membranes購自 Millipore (MA, USA)。
10. 水藍底片購自Midwest Scientific (St. Louis, USA)。
11. Oxidizing reagent及Enhanced Luminol reagent購自 Perkin-Elmer Life Sciences (MA, USA)。
12. Developer and replenisher 及 Fixer and replenisher購自 Eastman Kodak (NY, USA)。

3-2-8 設備儀器

1. CO₂恆溫培養箱(型號HEPA CLASS100) (Thermo, USA)

2. 加熱恆溫循環槽(型號WB212-B1) (Kansin , USA)
3. 血球計數器(hemocytometer) (Superior, Bad Marienfeld, Germany)
4. 無菌操作台(Bellco , USA)
5. 倒立螢光顯微鏡(型號IX-71) (Olympus, Japan)
6. 液態氮貯存桶(型號 LS-750) (Taylor-Wharton, Germany)
7. 震盪機Vortex (型號Vortex-2 genie) (Scientific Industries, USA)
8. 流式細胞儀(型號FACScan) (Becton Dickinson, USA)
9. 乾浴槽(型號MC-01S) (Major Science, Taiwan)
10. 蛋白質電泳槽(型號MiNi-Protean) (Bio-Rad, USA)
11. 電源供應器(型號MP- 250N) (Major science, Taiwan)
12. 桌上型離心機(型號UFO-2100) (Pantech, Taiwan)
13. 高速低溫離心機(型號5810R) (Eppendorf, USA)
14. 低溫高速離心機：Himac , CR 22G II , HITACHI , Japan 。
15. pH meter : PHM82 STANDARD pH METER , RADIOMETER
COPENHAGEN , Denmark 。
16. 色差儀：UV-VISIBLE RECORDING SPECTROPHOTOMETER UV-2100 ,
Shimadzu , Japan 。
17. 微量高速離心機：MIKRO 20 , Hettich ZENTRIFUGEN , Germany 。
18. 分光光度計：UV-2100 , Unicon , USA 。
19. 高效能液相層析儀 (High performance liquid chromatography , HPLC) :
Pump : LC-10AT VP Quaternary Pump , SIMADZU , Japan 。
Degasser : 4 channel degasser , GASTORR BG-14 , Japan 。
Integrator : Chromatocorder 21 , SYSTEM INSTRUMENTS CO., LTD
Japan 。
Detector : UV-VIS DETECTOR , S-3702 , Soma , Japan 。
20. 恆溫循環水浴槽：HOTTECH® , 台灣和德科儀企業有限公司 。
21. 凍結乾燥機：FREEZE DRYER FD-5N , EYELA , Japan 。

22. 送風烘箱：1350FD，SHEL-LAB，U.S.A.。
23. 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。
24. 真空減壓旋轉濃縮機：
 低溫循環水槽：YIH DER BL20，Taiwan。
 減壓濃縮裝置：BÜCHI RE111 Rotavapor and BÜCHI 461 Water Bath，Germany。
 真空幫浦水流抽氣機：EYELA ASPIRATOR A-3S，Japan。
25. 恆溫水槽：KANSIN INSTRUMENTS CO., LTD., Model：SB 302，Taiwan。

3-3 實驗方法

3-3-1 發酵諾麗果汁之製備

新鮮小諾麗果表面以軟毛刷刷洗乾淨，風乾後置於室溫下熟成，使得諾麗果由硬實的黃綠色轉變為軟爛的黃白色，每天將已熟成的果實收置於密封罐並在 4°C 下保存，約略 4-5 天可全數熟成。將每顆果實平均切成四等份，每一等份再切成泥狀並混合均勻後即裝入發酵桶中，果泥上要放入適量脫氧包(於秤盤上)以降低有氧發酵，密封後於暗室且室溫下，分別儲藏發酵 0、4、8 週。每 4 週取出一發酵桶，將果泥攪拌均勻後以離心方式，經 13,200 rpm、4°C、20min，共離心兩次分離出果汁即為 Noni juice，放於 -20°C 下保存。

3-3-2 多醣體製備

分別將儲藏發酵 0、4、8 週的 Noni juice，經 noni juice：95% EtOH：1：3 的比例，取 200ml noni juice 加入 600ml 95% EtOH 萃取多醣體，經 13,200 rpm、4°C、20min，共離心兩次，分離出沉澱物為 EtOH-ppt，與上清液為 EtOH-sol，先將 EtOH-sol 經減壓濃縮除去乙醇，再將 Noni juice、EtOH-sol 與 EtOH-ppt 經冷凍乾燥製備為粉末，之後經復水進行實驗 (Hirazumi *et al.*, 1999)。

3-3-3 物理性質

3-3-3-1 產率測定

將發酵完之諾麗果泥進行離心，利用下式計算出之諾麗果汁產率。

$$\text{產率(\%)} = \text{諾麗果汁重} / \text{諾麗果泥重} \times 100\% \quad (1)$$

3-3-3-2 pH 值分析

利用酸鹼度計，依據電位差之原理測定 noni 果汁其酸鹼值之變化。

3-3-3-3 色澤測定

以色差儀 Shimadzu UV-2100 紫外光分光光度計測定 noni 果汁之 L^* 、 a^* 、 b^* 值。 L^* 值表示顏色的亮度，當 L^* 值為 100 時表示全白，為 0 時則表示全黑； a^* 為負值時，表示其顏色偏綠色，而 a^* 為正值時則偏紅色； b^* 為負值時偏藍色，而正值時則偏黃色。

3-3-4 功能性化合物含量測定

3-3-4-1 總酚類化合物之含量測定 (Total phenolic determination)

參考：Julkunen-Titto (1985) 的方法測定之。

原理：Folin-Ciocalteu's phenol reagent 可與酚類化合物之 OH 基反應，並產生顏色之變化 (由黃變藍)，並於波長 735nm 下有吸光。

方法：取 50 μL 之 noni 果汁，加入 1 mL H_2O 和 500 μL Folin-Ciocalteu's phenol reagent，用力搖勻混合，再加入 2.5 mL 20% Na_2CO_3 ，均勻混合，於室溫下靜置 20min，而後以分光光度計測波長 735 nm 之吸光值。以不添加 Folin-Ciocalteu's phenol reagent 之試驗當作空白對照組。

計算：以 gallic acid 為標準品，並製作標準曲線 (附錄一)。Noni 果汁中總酚類化合物之含量由此標準曲線求得相對 gallic acid 之量，以 $\mu\text{g gallic acid equivalent/mL noni juice}$ 表示。

3-3-4-2 類黃酮之含量測定 (Flavonoid determination)

參考：唐等 (1996) 和鍾 (2003) 的方法測定之。

原理：類黃酮化合物於鹼性條件下可與硝酸鋁形成穩定的紅色錯合物，並於波長 415 nm 下有吸光。

方法：取 250 μ L 之 noni 果汁，加入 10 % 硝酸鋁和 1 M 醋酸鉀各 50 μ L，再加入 1.4 mL 去離子水，均勻混合，於室溫下反應 40 min，而後以分光光度計測波長 415 nm 之吸光值。以不添加硝酸鋁之試驗當作空白對照組。

計算：以 quercetin 為標準品，並製作標準曲線 (附錄二)。Noni 果汁中類黃酮之含量由此標準曲線求得相對 quercetin 之量，以 μ g quercetin equivalent/mL noni juice 表示。

3-3-4-3 縮合單寧之含量測定 (Condensed tannin determination)

參考：Julkunen-Titto (1985) 的方法測定之。

原理：縮合單寧與香草醛 (vanillin) 及濃鹽酸作用下，會產生紫色之顏色變化，並於波長 500 nm 下有吸光。

方法：取 100 μ L 之 noni 果汁，加入 1 mL 4 % vanillin (w/v in MeOH)，避光搖勻，再加入 500 μ L conc. HCl，均勻混合，於室溫下靜置 20 min，而後以分光光度計測波長 500 nm 之吸光值。以不添加 vanillin 之試驗當作空白對照組。

計算：以(+)-catechin 為標準品，並製作標準曲線 (附錄三)。Noni 果汁中之縮合單寧含量則由此標準曲線求得相對(+)-catechin 之量，以 mg (+)-catechin equivalent/mL noni juice 表示。

3-3-4-4 芸香素(Rutin)與東莨菪素(Scopoletin)及其衍生物含量測定

參考：王 (2008) 的方法並加以修飾測定之。

使用高效能液相層析儀(HPLC)測定樣品中的 rutin 與 scopoletin 含量。

分析條件如下：

Column : Synergi 4 μ Fusion-RP 80 , 250 \times 4.6 mm , Phenomenex $\text{\textcircled{R}}$

Mobile phase : solvent A : H₂O

solvent B : CH₃CN

Linear gradient : 0-30 min : 100 % solvent A \rightarrow 70 % solvent A

30-40 min : 70 % solvent A \rightarrow 100 % solvent A

40-50 min : 100 % solvent A

Flow rate : 1 mL/min .

Detector : Soma UV-VIS DETECTOR/S-3702 , $\lambda = 345$ nm .

計算 : 以 rutin 與 scopoletin 標準品製作標準曲線(附錄四與五) 。 樣品中的 rutin 、 scopoletin 及 scopoletin 衍生物含量由標準曲線算出 。 單位以 $\mu\text{g/mL}$ noni juice 表示 。

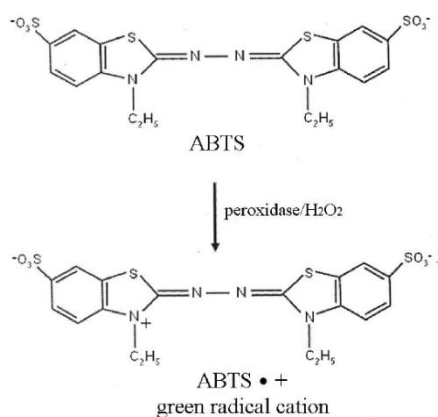
3-3-5 生理活性分析

3-3-5-1 總抗氧化能力 (Trolox equivalent antioxidant capacity , TEAC)

參考 : Miller et al., (1993) 及 Arnao et al., (1996) 的方法測定之 。

原理 : Horseradish peroxidase 會催化 H₂O₂ 及 ABTS , 反應形成 ABTS \cdot^+ , 此為穩定的藍綠色物質 , 於波長 734 nm 下具有吸光 。 當樣品具有抗氧化能力時 , 則能減少 ABTS \cdot^+ 的量 , 吸光值就會下降 。 而吸光值越低 , 則表示樣品之抗氧化能力越強 。 利用相對於控制組之吸光值下降百分比 , 可判斷樣品清除 ABTS \cdot^+ 能力之強弱 , 即可得知樣品之總抗氧化能力的強弱 。

反應式如下 :



方法：將 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS)、peroxidase、與 H₂O₂ 混合均勻，使最後濃度分別為 100 μM、4.4 unit/mL 與 50 μM，於 30 °C 下避光反應 1 h，使其形成藍綠色穩定的 ABTS·+ 陽離子自由基反應試劑。取 2.25 mL 自由基反應試劑，加入 0.25 mL 之 noni 果汁，均勻混合，於室溫下反應 10min，以分光光度計測波長 734 nm 之吸光值。以不添加 ABTS·+ 陽離子自由基反應試劑之試驗作為空白對照組。

計算：以 trolox 為標準品，並製作標準曲線 (附錄六)。Noni 果汁中之抗氧化物含量則由此標準曲線求得相對 trolox 之量，以 μg trolox equivalent/mL noni juice 表示。而 ABTS·+ 陽離子自由基清除力計算方法如下：

$$\text{總抗氧化能力 (\%)} = [(Ac - As) \div Ac] \times 100 \% \quad (2)$$

Ac：控制組之吸光值

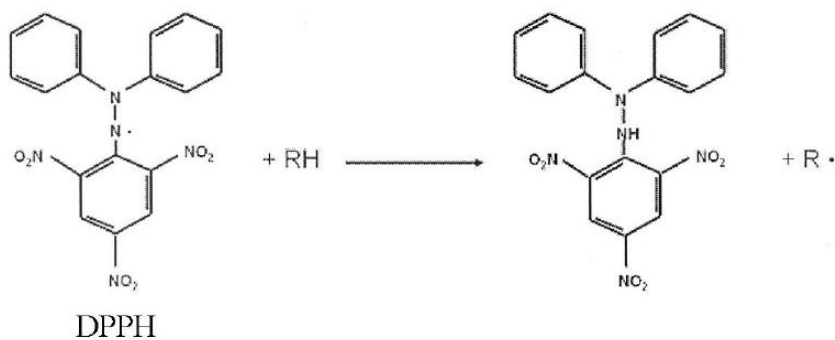
As：試藥組之吸光值

3-3-5-2 DPPH 自由基之清除能力

參考：Shimada et al., (1992) 的方法測定之。

原理：DPPH 自由基之甲醇溶液為深紫色，於波長 517 nm 下有最大之吸光值，常用來評估抗氧化物其提供氫的能力。當樣品具有抗氧化能力時，則能清除 DPPH 自由基，而顏色會由深紫色變為淡黃色，吸光值就會下降。若 DPPH 自由基被消除越多，則吸光值就會下降得越多，表示樣品清除 DPPH 自由基的能力就越強。利用相對於控制組之吸光值下降百分比，可判斷樣品消除 DPPH 自由基能力之強弱。

反應式如下：



方法：取 0.6 mL 之 noni 果汁，加入 0.6 mL 0.008 % DPPH 甲醇溶液（新鮮配製），再加入 0.5 mL 去離子水，均勻混合，於室溫下避光靜置 30 min，而後以分光光度計測波長 517 nm 之吸光值。以不添加 DPPH 之試驗作為空白對照組。

計算：以 BHA 為標準品，並製作標準曲線（附錄七）。Noni 果汁中之抗氧化物含量則由此標準曲線求得相對 BHA 之量，以 $\mu\text{g BHA equivalent/mL noni juice}$ 表示。而 DPPH 自由基清除力計算方法如下：

$$\text{Radical scavenging (\%)} = [(A_0 - A) \div A_0] \times 100 \% \quad (3)$$

A₀：控制組之吸光值

A：試藥組之吸光值

3-3-6 多醣體分析

3-3-6-1 諾麗乙醇萃取沉澱物之總醣含量分析

參考：Keleti and Lederer (1974)的方法測定之

原理：利用醣類(單醣、雙醣、多醣)及其衍生物會與硫酸先作用生成醣醛，再與 Folin-Ciocalteu's phenol reagent 反應生成穩定的橙黃色物質，於波長 490nm 有良好的吸光值。

方法：取 1ml 樣品加入 0.5 ml 5% 酚溶液，震盪混合，再加入 2.5 ml 98% 濃硫酸，震盪混合，靜置 10min，放入 25°C 水浴中 10min，以分光光度計測波長 490 nm 之吸光值

計算：以 D-(+)-Glucose (Sigma, USA)為標準品，並製作標準曲線（附錄八），諾麗多醣體中之總醣含量則由此標準曲線求得相對 D-(+)-glucose 之量，以 $\text{mg (+)-glucose /mL}$ 表示。

3-3-6-2 諾麗乙醇萃取沉澱物之還原糖含量分析

參考：Miller et al., (1959)的方法測定之

原理：DNS (3,5-dinitrosalicylic acid) 可將碳水化合物游離之醛或酮基，在鹼

性溶液下還原，可於波長 575nm 有良好的吸光值。

方法：A 液-將 1(W/V)的 3,5-dinitrosalicylic acid 及 0.2% (W/V)的酚溶液於 1%的氫氧化鉀中；B 液-10% (W/V)亞硫酸鈉；C 液-40% (W/V) 酒石酸鉀鈉；D 液-使用前將 B 液加入 99ml 的 A 液中；取 1ml 樣品與同體積之 D 液，震盪混合，在 100°C 下水浴 15min，再加入 0.5ml C 液，震盪混合，放入 25°C 水浴中 10min，以分光光度計測波長 575 nm 之吸光值

計算：以 D-(+)-Glucose (Sigma, USA)為標準品，並製作標準曲線 (附錄九)，諾麗多醣體中還原糖含量則由此標準曲線求得相對 D-(+)-glucose 之量，以 mg (+)-glucose /mL 表示。

3-3-6-3 諾麗乙醇萃取沉澱物之分子量測定

參考：呂等人 (2001) 的方法測定之

原理：多醣體分子量以膠體滲透層析法(gel permeation chromatography, GPC)，又稱為膠體過濾層析法(gel filtration chromatography)或分子排斥層析法(size exclusion chromatography)進行分析。其固定相為孔徑大小相同的物質，而移動相中大分子物質會因難以進入孔徑內而隨間隙流出，滯留時間短；小分子物質則容易進入孔徑間隙，滯留時間長，以達到分離不同分子量的效果。

分析條件如下：

Column：PolySep-SEC-P 5000 300×7.80mm column，Phenomenex

Temp：40°C

Mobile phase：ddH₂O

Flow rate：0.8 mL / min

Pump：Hitachi model L-6000 pump

Detector：Bischoff model 8110 RI detector

積分儀：Hitachi model D-2500 chromatointegrator

Standard：pullulan(分子量 3.77、4、4.33、4.68、5.05、5.32、5.56 及 5.90 K

Daltons or Da, retention time 分別為 11.22、10.92、10.33、9.68、8.97、8.46、7.87 及 7.34 分鐘), 標準曲線如附錄十。

3-3-7 細胞試驗

3-3-7-1 細胞培養與繼代

將培養基置於 37°C 水浴槽回溫, 再移入無菌操作台內備用。自液態氮桶中取出 Caco-2 大腸癌細胞之冷凍小管, 置於 37°C 水槽中快速解凍, 以 70% ethanol 擦拭諸管外部再移入無菌操作台內。加入已解凍之 Caco-2 細胞懸浮液於 10 cm dish, 再緩慢加入 10 mL 培養基, 混合均勻, 於 37°C 含 5% CO₂ 之培養箱中, 培養 1~2 天後待細胞生長至約 7-8 分滿時, 再進行繼代培養。

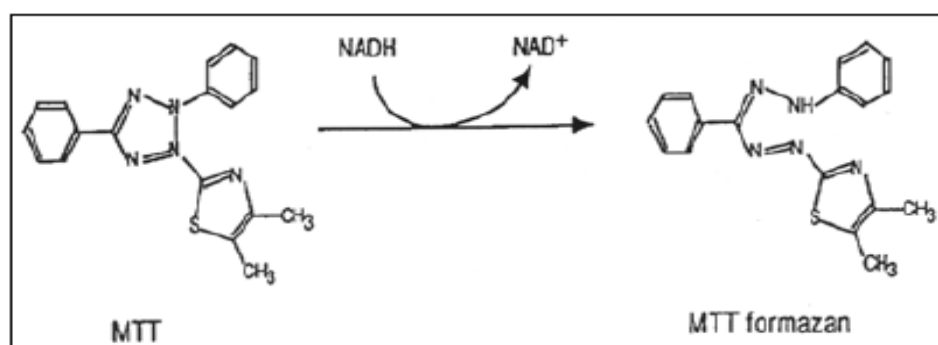
細胞於培養皿中生長至八分滿左右時, 將其培養基吸除, 以 3 mL PBS 清洗 2 次後, 加入 1.5 mL 之 1×Trypsin- EDTA, 置於培養箱約 2 分鐘, 待細胞浮起後, 加入 3 倍體積之培養基終止 Trypsin-EDTA 之作用, 再將該細胞懸浮液平均分配至新的培養皿中, 置於培養箱中培養。

3-3-7-2 細胞存活率分析

參考: Mosmann (1983) 的方法測定之

原理: MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl] 2,5-diphenyltetrazolium bromide) 原本是一種黃色染劑, 若是活的細胞吸收後, 便可利用粒線體中的脫氫酵素 (succinate dehydrogenase) 將其還原形成藍色的 formazan, 加入 DMSO 使其溶解並在 590 nm 的波長偵測其吸光值。

反應式如下:



方法：將細胞培養於 96 孔盤中種適量細胞(10^3 cells/well) 進行培養，添加不同濃度之樣品 24–48 h 後，移去培養基並以 PBS 潤洗一次，加入 100 μ L MTT 試劑(0.5 mg/ml)，混合均勻，於 37 °C 反應 4 h，去掉 MTT 試劑，加入 100 μ l 的 DMSO 以便將藍色結晶析出，靜置 20 min，以 ELISA reader 測量波長 590nm 其吸光值，計算細胞存活率。

3-3-7-3 細胞凋亡分析

參考：Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit 配合流式細胞儀測定

原理：細胞早期凋亡(apoptosis)時細胞膜內膜的 phosphatidylserine 會移至外膜，此時細胞膜仍維持一定穩定度。FITC-labeled Annexin-V 與 phosphatidylserine 專一性結合，由螢光可偵測 FITC 螢光量。當細胞壞死時細胞膜強度減低，溶液中的 PI 會進入細胞；藉兩種不同螢光染劑親合性結合知特性，將細胞區分正常、凋亡或壞死之細胞。

方法：將細胞(10^4 cells/well)鋪於 12 孔盤中，培養至八分滿後，添加不同濃度之樣品 24 h 後，移去培養液並以 PBS 潤洗一次，接者以 Trypsin 作用兩分鐘後使用 medium 終止反應，每 well 收集細胞至 tube 中以離心機於 1000rpm 離心 5 min，去除上清液，每 tube 之沉澱細胞加入 100 μ L binding buffer、2 μ L 之 FITC-Annexin V 與 PI 染劑，在 4°C 暗室中反應 30 min，再加 400 μ L binding buffer，以流式細胞儀分析結果。結果可分四個象限，包括 FITC⁻/PI⁻、FITC⁺/PI⁻、FITC⁻/PI⁺與 FITC⁺/PI⁺ 分別表示正常、早期凋亡、壞死與晚期凋亡之細胞。

3-4 統計分析

實驗所得結果以平均值 \pm 標準偏差(Mean \pm SD)表示，使用 Student's t-test 來評估數據間的差異性。p<0.01 時表示極顯著差異、p<0.05 時表示達顯著差異，p>0.05 則表示為沒有顯著差異。亦有利用 SAS 9.1 套裝軟體進行全隨機設計(completely randomized design)、變異分析(ANOVA)及 Duncan'

s new multiple range test 分析，當機率值小於 0.05 ($p < 0.05$)表示各組於統計上有顯著差異。並使用 Sigmaplot 10.0 (Systat software, USA)軟體進行作圖。

肆、結果與討論

Part 1. 諾麗果汁發酵實驗

4-1 物理性質

4-1-1 諾麗果汁之產率

諾麗果在尚未完全成熟時便摘取下來，此時果實質地堅硬，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，隨著發酵時間進行果膠酵素作用，果膠逐漸被分解而釋出汁液。

諾麗果於成熟過程中逐漸軟化並產生汁液，諾麗果汁之產率隨著發酵時間而增加。諾麗果經 0 至 8 週發酵，果汁產率以發酵8週之產量最高 (表十六)，產率為 $68.34 \pm 1.66\%$ 。有文獻提出諾麗果經一個月與二個月發酵，果汁產率分別為 57.8% 和 63.9% (Newton, 2003)，而實驗結果較文獻中經一個月與兩個月發酵之果汁產率高。

表十六、不同發酵時間諾麗果汁之產率

Table 16. The total yields of noni juice at different fermentation time

Fermentation time (week)	Total yield (%)
0	39.07 ± 1.65^c
4	52.03 ± 1.03^b
8	68.34 ± 1.66^a

Each value is the mean \pm standard deviation (n = 3). Means among different fermentation time with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

4-1-2 諾麗果汁之pH 值

諾麗果經不同之發酵時間 (0至8週)，果汁之pH 值並沒有很大的差異，pH 值大約都在3.7左右 (表十七)，因諾麗果主要有機酸為己酸和辛酸 (Dittmar, 1993) ，隨著發酵時間增加，但有機酸並不會明顯的變化，而低的pH值則有利於果汁之保存。從文獻可知一般諾麗果汁之pH 值大約在3.4-3.9 左右 (European Commission, 2002; Chunhieng, 2003; Newton, 2003) ，而實驗結果與文獻相近。

表十七、不同發酵時間諾麗果汁之pH 值

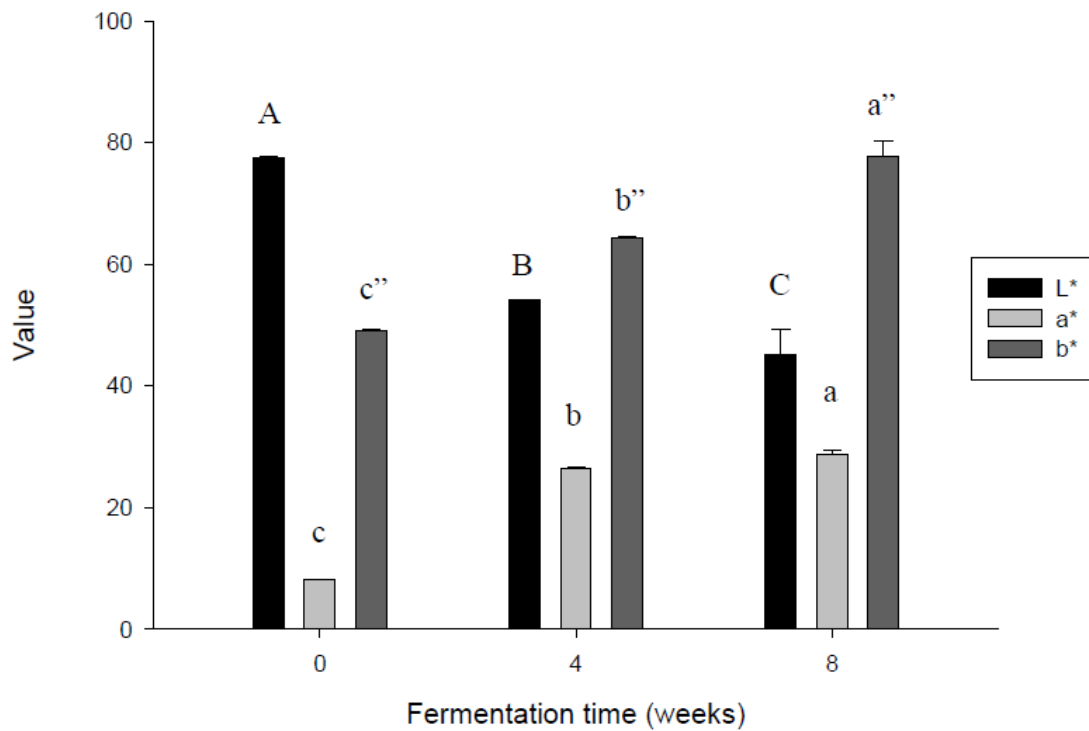
Table 17. The pH values of noni juice at different fermentation time

Fermentation time (week)	pH
0	3.70 ^a
4	3.71 ^a
8	3.71 ^a

Each value is the mean \pm standard deviation (n = 3). Means among different fermentation time with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

4-1-3 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，L*值為亮度表現，值越高表示色澤越淡，隨著發酵的進行色素逐漸生成，褐變反應則使色澤加深，其亮度變化如圖二十二 (附錄十一) 所示。可以得知隨著發酵時間之增長，諾麗果汁之L*值逐漸下降，即諾麗果汁隨著發酵時間之增長而顏色越深；而諾麗果汁之a*值逐漸上升，即諾麗果汁隨著發酵時間之增長而顏色越紅；而諾麗果汁之b*值上升，即諾麗果汁隨著發酵時間之增長而顏色越黃。故發酵時間之長短對諾麗果汁之顏色有很大的影響，發酵時間越長，則諾麗果汁之顏色就越深。文獻指出紅酒之縮合單寧化合物與顏色之紅色度值有正相關 (Recamales *et al.*, 2006)，由此推測諾麗果汁之顏色變化可能與縮合單寧之增加或褐變有密切相關。



圖二十二、不同發酵時間諾麗果汁之色澤變化。

Fig 22. The change of color values of noni juice at different fermentation time. Each value is the mean \pm standard deviation ($n = 3$). Means among different fermentation time for L^* with different letters (A-C) are significantly different ($p < 0.05$). Means among different fermentation time for a^* with different letters (a-c) are significantly different ($p < 0.05$). Means among different fermentation time for b^* with different letters (a''-c'') are significantly different ($p < 0.05$).

4-2 功能性化合物含量

4-2-1 總酚類化合物含量測定

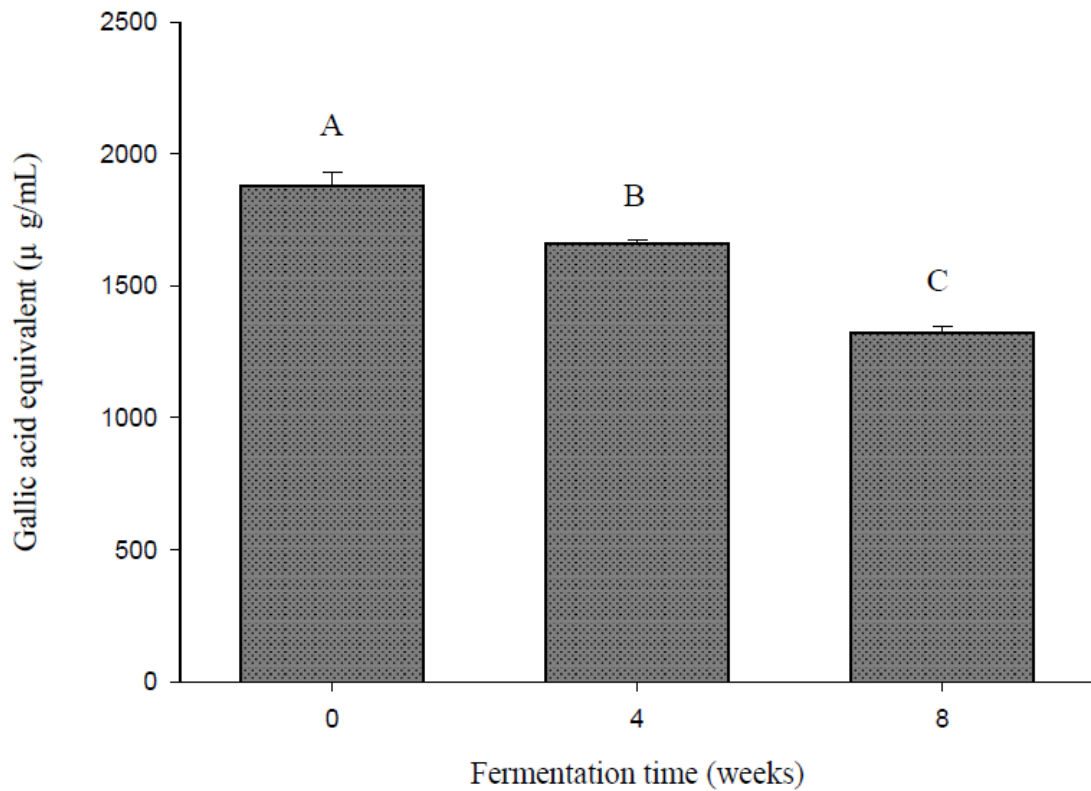
將不同發酵時間之諾麗果汁，進行總酚類化合物含量分析，從實驗結果(圖二十三)顯示經0至8週之發酵，諾麗果汁中總酚類含量隨著發酵時間增加而減少。諾麗果可於發酵期間將部分酚類物質降解或聚集形成其他物質，使總酚含量略為下降。楊(2005)、王(2008)、羅(2008)於室溫發酵諾麗果汁時，也測得類似結果，此結果證明長時間發酵會造成酚類含量下降。

4-2-2 類黃酮含量測定

將不同發酵時間之諾麗果汁，進行類黃酮含量之分析，從實驗結果(圖二十四)可以得知諾麗果汁於0至8週之發酵過程中，隨著發酵時間增加，諾麗果汁中類黃酮含量會有所減少。楊(2005)、王(2008)、羅(2008)於室溫發酵諾麗果汁時，也觀察到類似變化。林(2010)、蘇(2011)發現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，故於發酵過程中，類黃酮會因環境因子影響而部份被水解或聚合而轉化成縮合單寧。

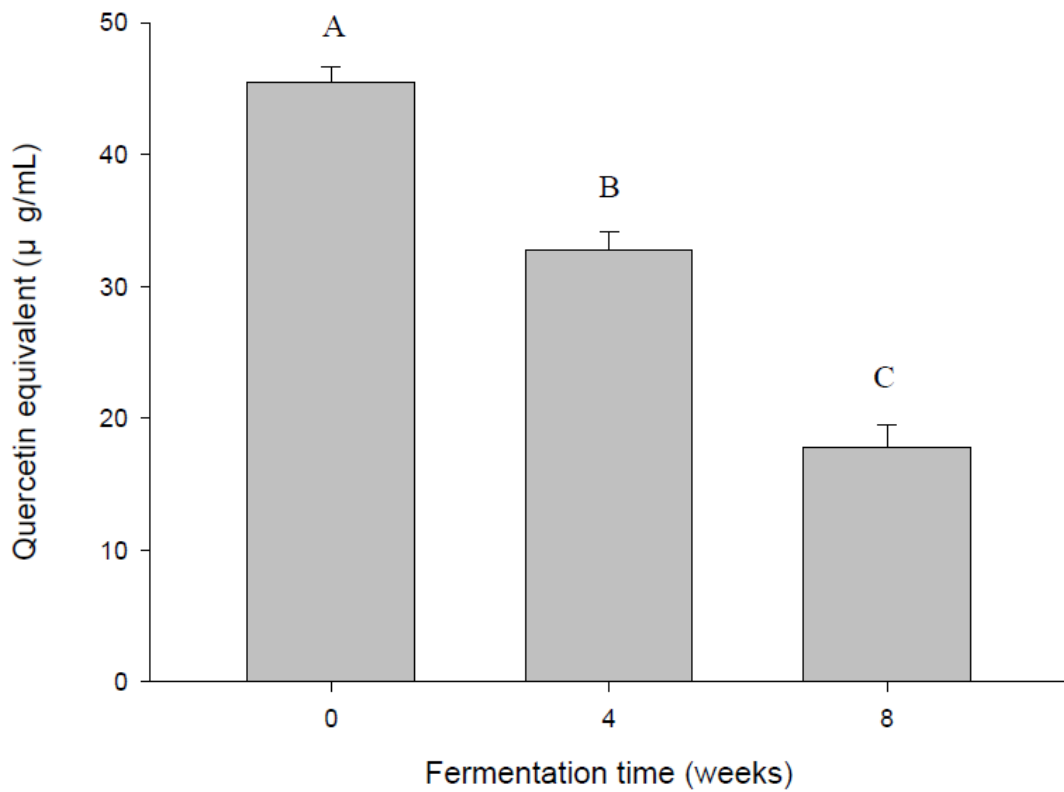
4-2-3 縮合單寧含量測定

將不同發酵時間之諾麗果汁，進行縮合單寧含量之分析，從結果(圖二十五)顯示於0至8週發酵過程中，隨著發酵時間之增加，果汁中之縮合單寧含量逐漸增加。而縮合單寧為類黃酮之聚合物，故縮合單寧含量與類黃酮含量有密切相關。從實驗結果可得知縮合單寧含量之增加與類黃酮含量之減少為互相呼應。而文獻指出紅酒之單寧類化合物與紅色度值具有正相關(Recamales *et al.*, 2006)，故縮合單寧與色澤有密切相關，縮合單寧之增加會使色澤更傾向為暗紅色。而從結果可以得知諾麗果汁隨著發酵時間之增加，其縮合單寧含量增加，而顏色 a^* 值亦增加，此結果亦與文獻結論互相呼應。



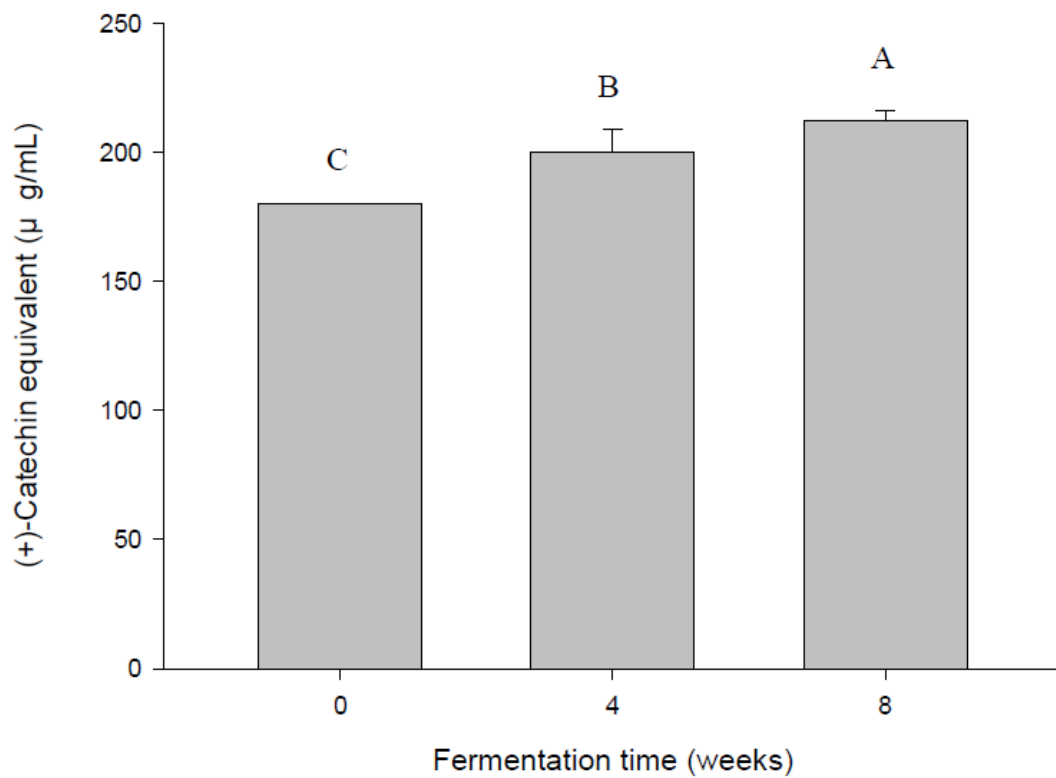
圖二十三、不同發酵時間諾麗果汁之總酚含量。

Fig 23. The contents of total phenolic compounds of noni juice in terms of gallic acid equivalent at different fermentation time. Each value is the mean \pm standard deviation (n = 3). Means among different fermentation time with different letters are significantly different ($p < 0.05$).



圖二十四、不同發酵時間諾麗果汁之類黃酮含量。

Fig 24. The contents of flavonoids of noni juice in terms of quercetin equivalent at different fermentation time. Each value is the mean \pm standard deviation ($n = 3$). Means among different fermentation time with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

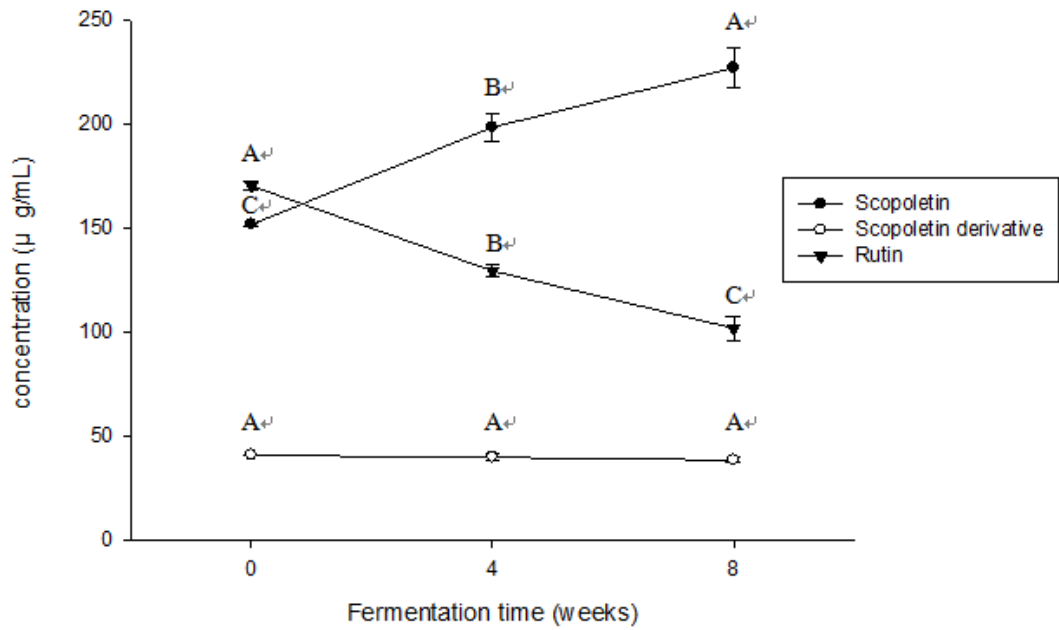


圖二十五、不同發酵時間諾麗果汁之縮合單寧含量。

Fig 25. The contents of condensed tannins of noni juice in terms of (+)-catechin equivalent at different fermentation time. Each value is the mean \pm standard deviation ($n = 3$). Means among different fermentation time with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

4-2-4 Rutin、scopoletin 及其衍生物含量測定

將不同發酵時間之諾麗果汁，進行rutin、scopoletin 及其衍生物含量分析，實驗結果（圖二十六）顯示0至8週之發酵過程中，隨著發酵時間之增加，諾麗果汁中scopoletin 化合物含量增加，scopoletin 衍生物和rutin 化合物含量減少。Rutin 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環境中光、熱、氧的破壞而水解。隨著發酵時間的增加而rutin 化合物含量減少，此結果與(Chan-Blanco *et al.*, 2007)之研究結果互相應証，實驗結果（圖二十四）類黃酮含量隨著發酵時間增加而有所減少，與實驗結果圖(二十六) 屬於類黃酮類的rutin結果相呼應，隨著發酵時間的增加而rutin 化合物含量減少。Scopoletin為多酚類物質的香豆素衍生物（Pawlus and Kinghorn, 2007），從結果可看出scopoletin 化合物隨著時間而增加；scopoletin 衍生物則隨著時間而逐漸減少，可說明scopoletin 衍生物與scopoletin 有相關性。而其相關性如楊（2005）所示，scopoletin衍生物為含有兩個糖基之化合物，此衍生物在經過酵素水解後會形成scopoletin 化合物。



圖二十六、不同發酵時間諾麗果汁之芸香素、東莨菪素及其衍生物含量之變化。
 Fig 26. The contents change of rutin, scopoeltin and scopoletin derivative compounds of noni juice at different fermentation time. Each value is the mean \pm standard deviation ($n = 3$). Means among different fermentation time for the same compound with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

4-3 生理活性

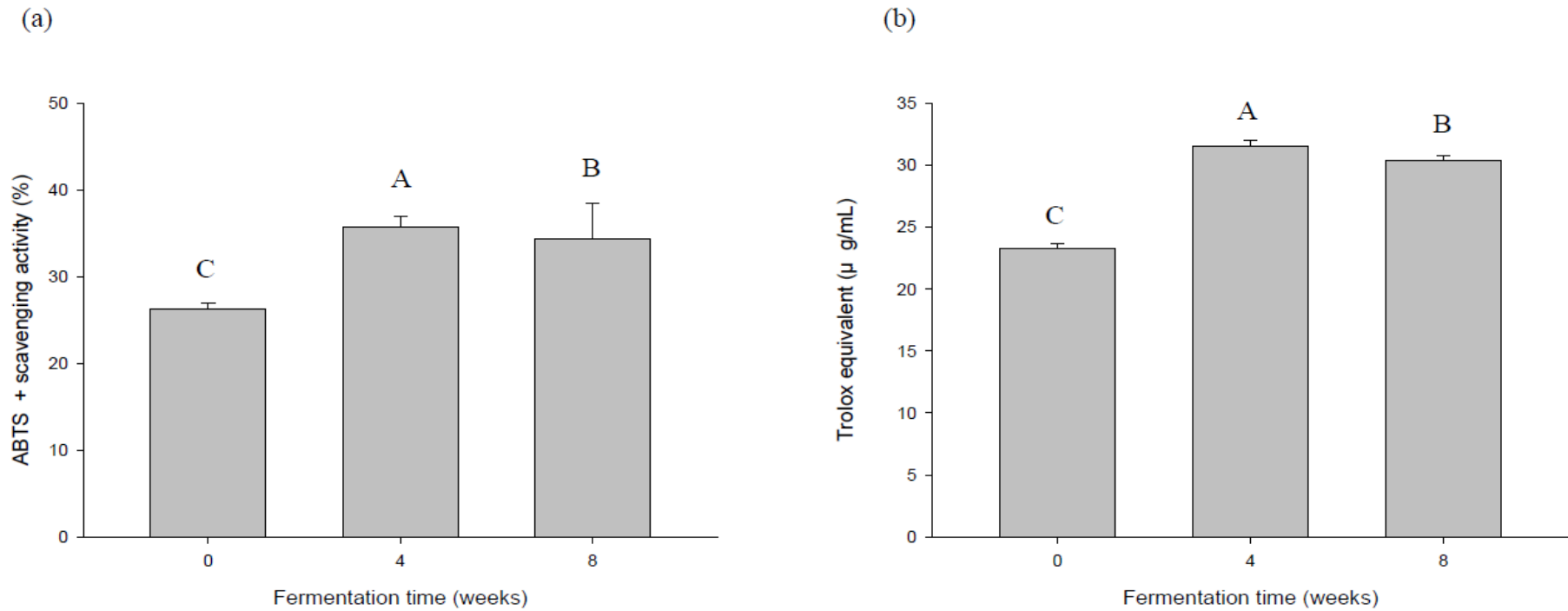
4-3-1 總抗氧化力

將不同發酵時間之諾麗果汁，進行總抗氧化能力之分析，由於 0 至 8 週發酵所得諾麗果汁不經稀釋之清除力大約都在100 %左右，說明了諾麗果汁具有很強的抗氧化能力。因此將諾麗果汁經五十倍稀釋，可發現隨著發酵時間之增加，ABTS•+自由基清除能力有增加的情形，Trolox 當量表現類似的趨勢(圖二十七)，於整體發酵過程中略為上揚的趨勢。從結果也可得知經過發酵之諾麗果汁之總抗氧化能力(34.40~35.72 %) 比未經發酵之新鮮諾麗果汁(26.27 %)來得好。從實驗結果 (圖二十七) 可以得知經發酵之諾麗果汁之五十倍稀釋液，其每毫升大約相當於30.36~31.51 μg 左右的trolox (抗氧化物) 含量。王 (2008)於室溫發酵諾麗果汁時，也觀察到類似變化，此結果顯示諾麗果汁隨著發酵時間之增加其總抗氧化能力有所增加。但第八週後其總抗氧化力有下降的趨勢。食物中的天然抗氧化物一般認為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)，造成此種現象，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(Dewanto *et al.*, 2002)。

4-3-2 DPPH 自由基清除能力

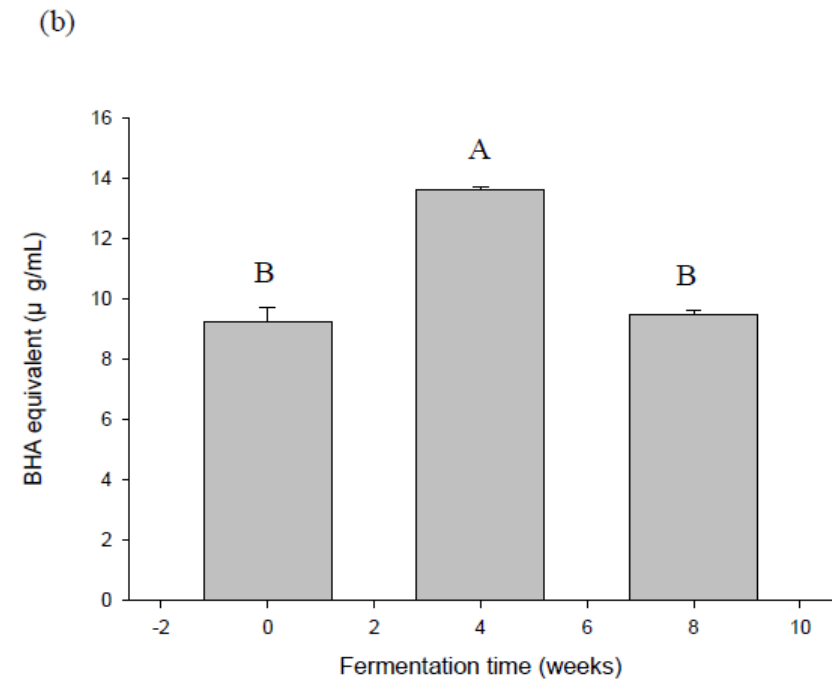
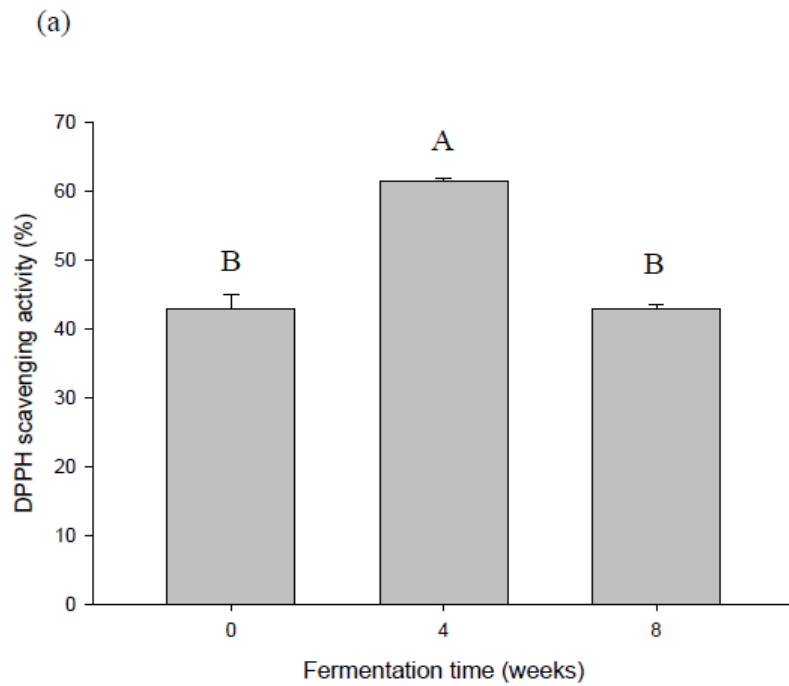
諾麗果本身即具有良好的抗氧化能力，經發酵後其抗氧化效果更為提高，抗氧化活性以 μg BHA equivalent/mL 表示之，經不同發酵時間之諾麗果汁，進行DPPH 自由基清除能力之分析，由於 0至8週之發酵諾麗果汁不經稀釋之 DPPH 自由基清除力大約都在100 %左右，亦說明了諾麗果汁具有很強的DPPH 自由基清除能力。將諾麗果汁經五十倍稀釋，可發現隨著發酵時間之增加，諾麗果汁對DPPH 自由基之清除力會有所增加。從結果亦可得知經發酵之諾麗果汁之 DPPH 自由基清除力 (55.23~61.42 %)比未發酵之新鮮諾麗果汁 (42.85 %) 來得好。從實驗結果 (圖二十八) 可以得知經發酵之諾麗果汁之五十倍稀釋液，其每毫升大約相當於11.17~13.63 μg BHA equivalent/mL 左右。抗氧化能力分析結果顯示，諾麗果汁對DPPH 自由基與ABTS•+皆具極佳之清除能力。從實驗結果 (圖

二十八) 中，經過四週發酵後，抗氧化物質自植物組織中被釋放出來，但自八週發酵後，抗氧化力有下降的趨勢，此結果與 TEAC 總抗氧化力 (圖二十七) 有相互對應。



圖二十七、不同發酵時間諾麗果汁(50 倍稀釋) (a) ABTS • + 自由基清除能力; (b) Trolox 當量。

Fig 27. (a) The ABTS • + radical scavenging activity; (b) Trolox equivalent equivalent of noni juice (50 fold dilution) at different fermentation time. Each value is the mean \pm standard deviation (n = 3). Means among different fermentation time with different letters are significantly different (p < 0.05).



圖二十八、不同發酵時間諾麗果汁(50 倍稀釋) (a) DPPH 自由基清除能力; (b) BHA 當量。

Fig 28. (a) The DPPH radical scavenging activity; (b) BHA equivalent of noni juice (50 fold dilution) at different fermentation time.

Each value is the mean \pm standard deviation ($n = 3$). Means among different fermentation time with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

Part 2. 乙醇萃取諾麗果汁沉澱物與抑癌實驗

4-4 多醣體分析

4-4-1 總醣含量分析

將不同發酵時間之諾麗果汁經乙醇萃取沉澱物，進行酚硫酸法之總醣含量分析，從實驗結果（圖二十九）可以得知0至8週之發酵過程中，每公升未發酵諾麗果汁乙醇萃取沉澱物之總醣含量為 2.52 ± 0.04 g葡萄糖含量，隨著發酵時間之增加，諾麗果汁乙醇萃取沉澱物之總醣含量有減少的趨勢，從結果可得知經過發酵之諾麗果汁乙醇萃取沉澱物之總醣含量比未經發酵之新鮮諾麗果汁乙醇萃取沉澱物減少了8%左右，可能因隨著儲藏時間增加而水解使總醣量逐漸減少。從實驗結果（圖二十九）可以得知經發酵之諾麗果汁乙醇萃取沉澱物，其每公升大約相當於2.34~2.31g左右的葡萄糖含量。文獻於諾麗果汁乙醇萃取沉澱物 (Hirazumi *et al.*, 1999) 觀察為 1.39 ± 0.05 mg葡聚糖硫酸鈉 (dextran sulphate)含量，此分子量為36000~50000 Da，葡萄糖的分子量為180.16 Da，換算單位顯示此結果較文獻之總醣含量多，可能因產地不同而有所差異。

4-4-2 還原醣含量分析

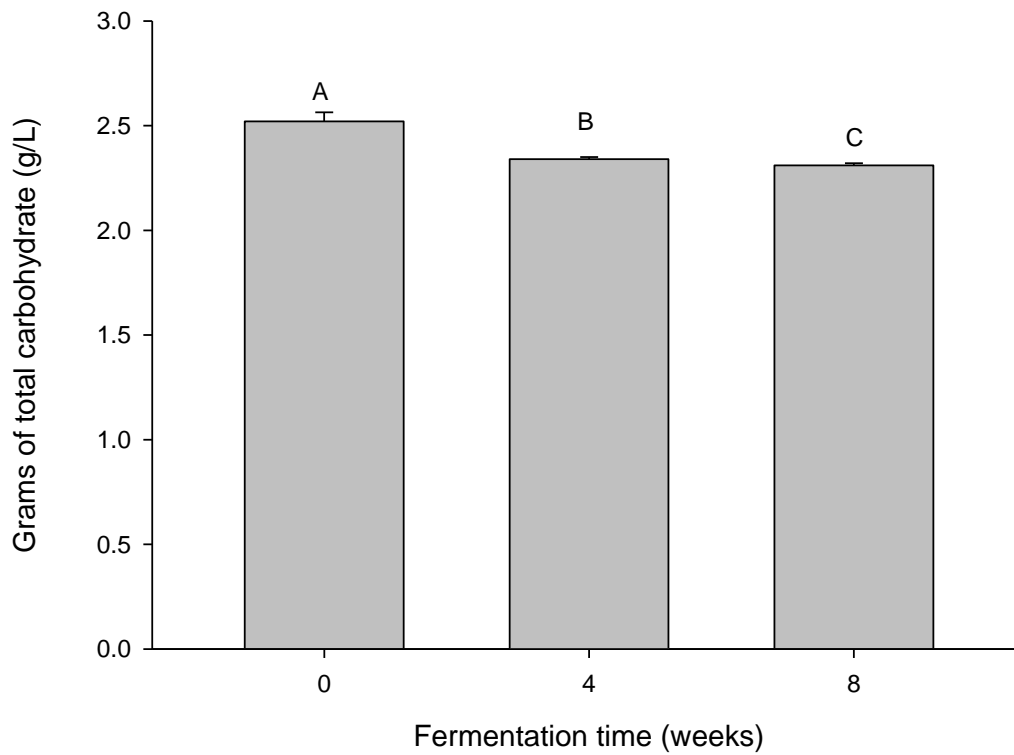
將不同發酵時間之諾麗果汁經乙醇萃取沉澱物，進行DNS法之還原醣含量分析，從實驗結果（圖三十）可以得知0至8週之發酵過程中，每公升未發酵諾麗果汁乙醇萃取沉澱物之總醣含量為 0.37 ± 0.03 g葡萄糖含量，隨著發酵時間之增加，諾麗果汁乙醇萃取沉澱物之還原醣以發酵四週較多，每公升發酵四週之諾麗果汁乙醇萃取沉澱物為 0.55 ± 0.06 g葡萄糖含量，接著隨著發酵時間增加有減少的趨勢，可能因在一段時間內有初步的分解，但因儲藏時間增加又更進一步的分解使還原醣量逐漸減少。也可能因實驗結果（圖二十六）所示，可看出scopoletin 化合物隨著發現時間之增加，而scopoletin 衍生物隨著發現時間而逐漸減少，scopoletin為多酚類物質的香豆素衍生物 (Pawlus and Kinghorn, 2007)，scopoletin 衍生物為含有兩個糖基之化合物，此衍生物在經過酵素水解後會形成scopoletin 化合物，可能因scopoletin衍生物切掉糖基化合物造成還原糖增加。文獻指出scopoletin衍生物需切下糖基化合物形成scopoletin後，抗氧化力會較有效果

(Chan-Blanco *et al.*, 2007)，此實驗結果(圖三十)顯示發酵四週之還原糖含量較多，與結果(圖二十七、二十八)所示發酵四週之抗氧化力較好之相呼對應。

4-4-3 多醣分子量含量分析

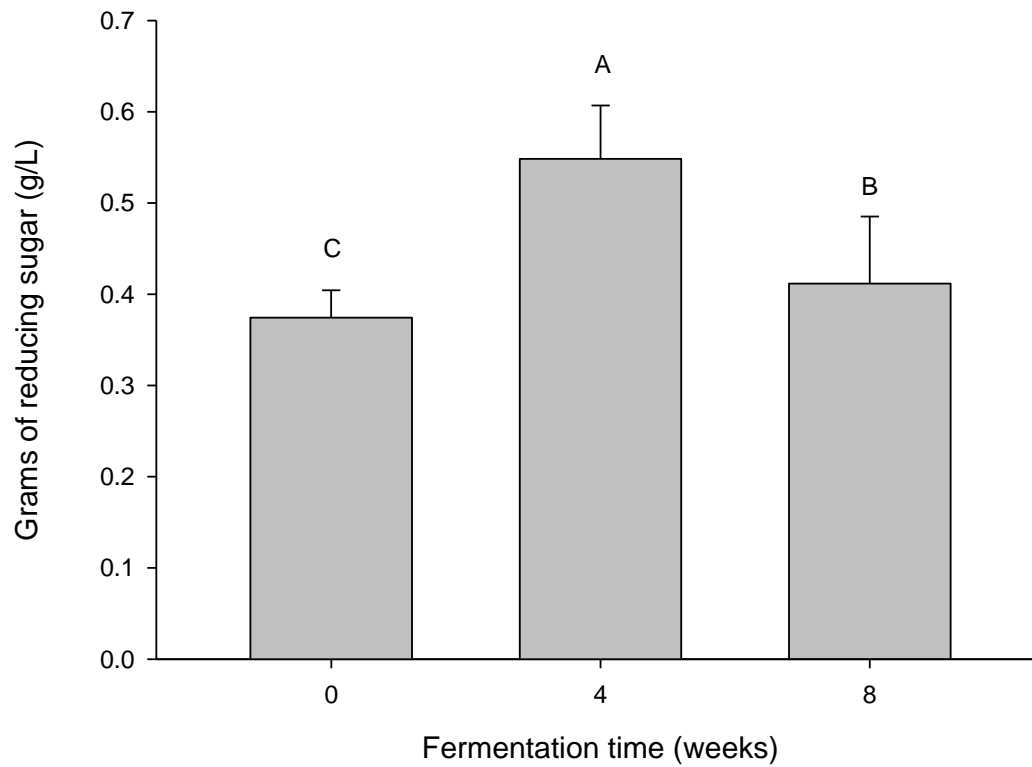
將不同發酵時間之諾麗果汁經乙醇萃取沉澱物，進行膠體滲透層析法(gel permeation chromatography, GPC)法之多醣分子量分析，從實驗結果(圖三十一)可以得知0至8週之發酵過程中，未發酵與發酵四週之滯留時間分別為7.75及7.79分鐘，比對多醣分子量標準曲線(附錄十)後得知分子約468.61及448.47 KDa，發酵八週之滯留時間為6.32及9.01分鐘，皆有波峰產生，比對多醣分子量標準曲線(附錄十)後得知分子約為2739.30及103.11 KDa。從實驗結果(圖三十一)推論，可能因縮合單寧隨著儲藏聚合成大分子沉澱，此結果與圖二十五顯示於0至8週發酵過程中，隨著發酵時間之增加，果汁中之縮合單寧含量逐漸增加相呼應。單寧為單體多酚聚集而成的低聚體或高聚體，且大部分的單寧為類黃酮化合物轉化而成。單寧除具有酚類化合物之特性外，還能使蛋白質、生物鹼、明膠沉澱。單寧可被分為水解型單寧(hydrolysable tannins)和縮合型單寧(condensed tannins)(圖十三)。水解型單寧分子量約為500-2800 Da，縮合型單寧分子量約為2000-4000 Da (Shahidi and Naczka, 2004)。

果膠多醣體會受到分支度、主鏈鍵結方式與側鏈基團影響而改變其分子排列結構，影響分子量之大小，因而具有不同之生理活性(杜等人，2002)，有文獻表示多醣體分子量在3~5 KDa之間具降血糖功能，在10~1000 KDa之間者具抗發炎作用，在30 KDa以上具抗發炎及抗腫瘤作用(黃，1998)。由此推測諾麗果汁乙醇萃取物之果膠多醣體可能有抗腫瘤功效。



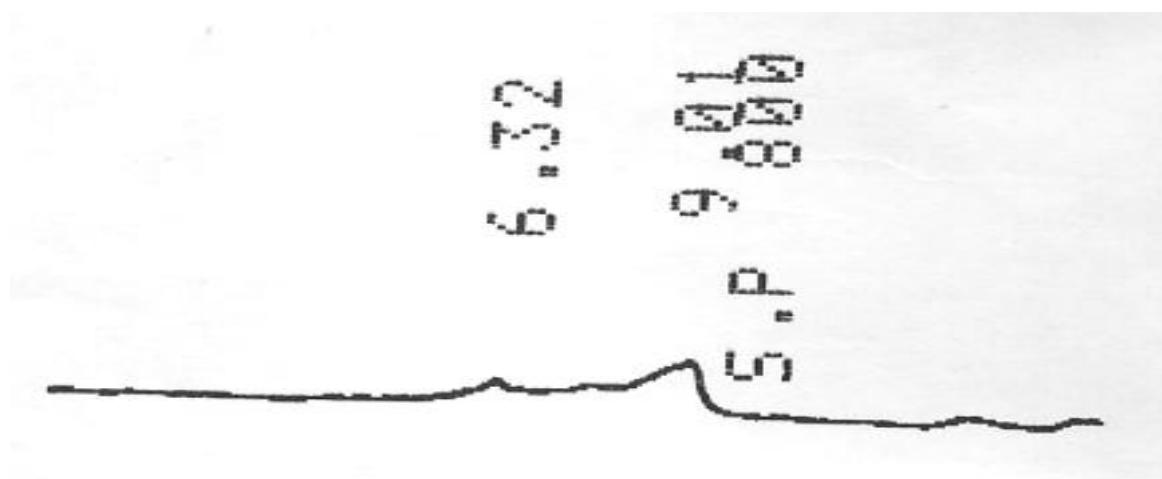
圖二十九、不同發酵時間諾麗果汁乙醇萃取沉澱物之總糖含量。

Fig 29. The contents of total carbohydrate of noni juice ethanol extracts at different fermentation time. Each value is the mean \pm standard deviation (n = 3). Means among different fermentation time with different letters are significantly different (p < 0.05).



圖三十、不同發酵時間諾麗果汁乙醇萃取沉澱物之還原糖含量。

Fig 30. The contents of reducing sugar of noni juice ethanol extracts at different fermentation time. Each value is the mean \pm standard deviation ($n = 3$). Means among different fermentation time with different letters are significantly different ($p < 0.05$).



圖三十一、發酵八週之諾麗果汁乙醇萃取沉澱物分子量膠體通透層析圖譜。

Fig 31. Molecular weight chromatograms of noni ppt at 8 week by gel permeation chromatography.

Peak	Retention time (min)	Molecular weight (KDa)
1	6.32	2739.30
2	9.01	103.11

表十八、以膠體通透層析不同分子量多醣標準品pullulan(α -D-葡聚糖)所得之滯留時間

Table 18. Retention time of pullulan standards with different molecular weights by gel permeation chromatography

Molecular weight (KDa)	Retention time (min)	Log M.W.*
6	11.22	3.77
10	10.92	4
21.7	10.33	4.33
48.8	9.68	4.68
113	8.97	5.05
210	8.46	5.32
366	7.87	5.56
805	7.34	5.90

* Log molecular weight

4-5 諾麗果汁及乙醇萃取物之抑癌實驗

4-5-1 細胞存活率分析

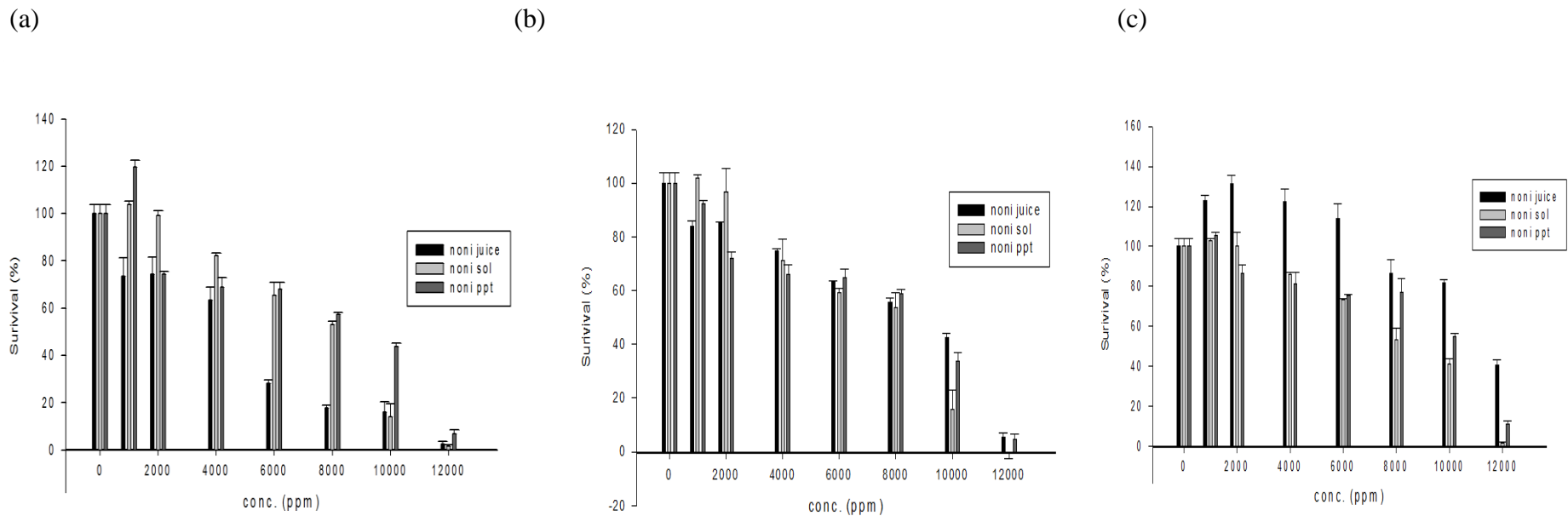
將人類結腸直腸癌Caco-2細胞添加不同濃度之不同發酵時間的諾麗果汁 (noni-juice)、乙醇萃取沉澱物 (noni-ppt)與乙醇萃取之上清液 (noni-sol)，分別以 1000、2000、4000、6000、8000、10000及120000 ppm，作用二十四小時後，以 MTT分析細胞存活率，從實驗結果 (圖三十二 a) 可以得知諾麗果汁 (noni-juice) 0至8週之發酵過程中，隨著添加濃度的增加，Caco-2 癌細胞存活率顯著降低。未發酵諾麗果汁於濃度 6000ppm 時能使 Caco-2 細胞存活率低於50%；諾麗果汁乙醇萃取沉澱物從實驗結果 (圖三十二 b) 可以得知0至8週之發酵過程中，隨著添加濃度的增加，Caco-2癌細胞存活率顯著降低。發酵四週諾麗果汁於濃度 10000ppm時能使Caco-2細胞存活率低於50%；諾麗果汁乙醇萃取之上清液從實驗結果 (圖三十二 c) 可以得知0至8週之發酵過程中，隨著添加濃度的增加，Caco-2

癌細胞存活率顯著降低。未發酵諾麗果汁於濃度8000ppm時能使Caco-2細胞存活率低於50%，其文獻 (Hirazumi *et al.*, 1999) 所示，noni-ppt於6.25 mg/ml濃度時能使小鼠肺癌LLC1細胞存活率低於50%。故本研究以2000、4000及6000ppm為測試濃度，以探討諾麗果汁、乙醇萃取沉澱物與乙醇萃取之上清液是否具有抑癌功效。

4-5-1 細胞凋亡分析

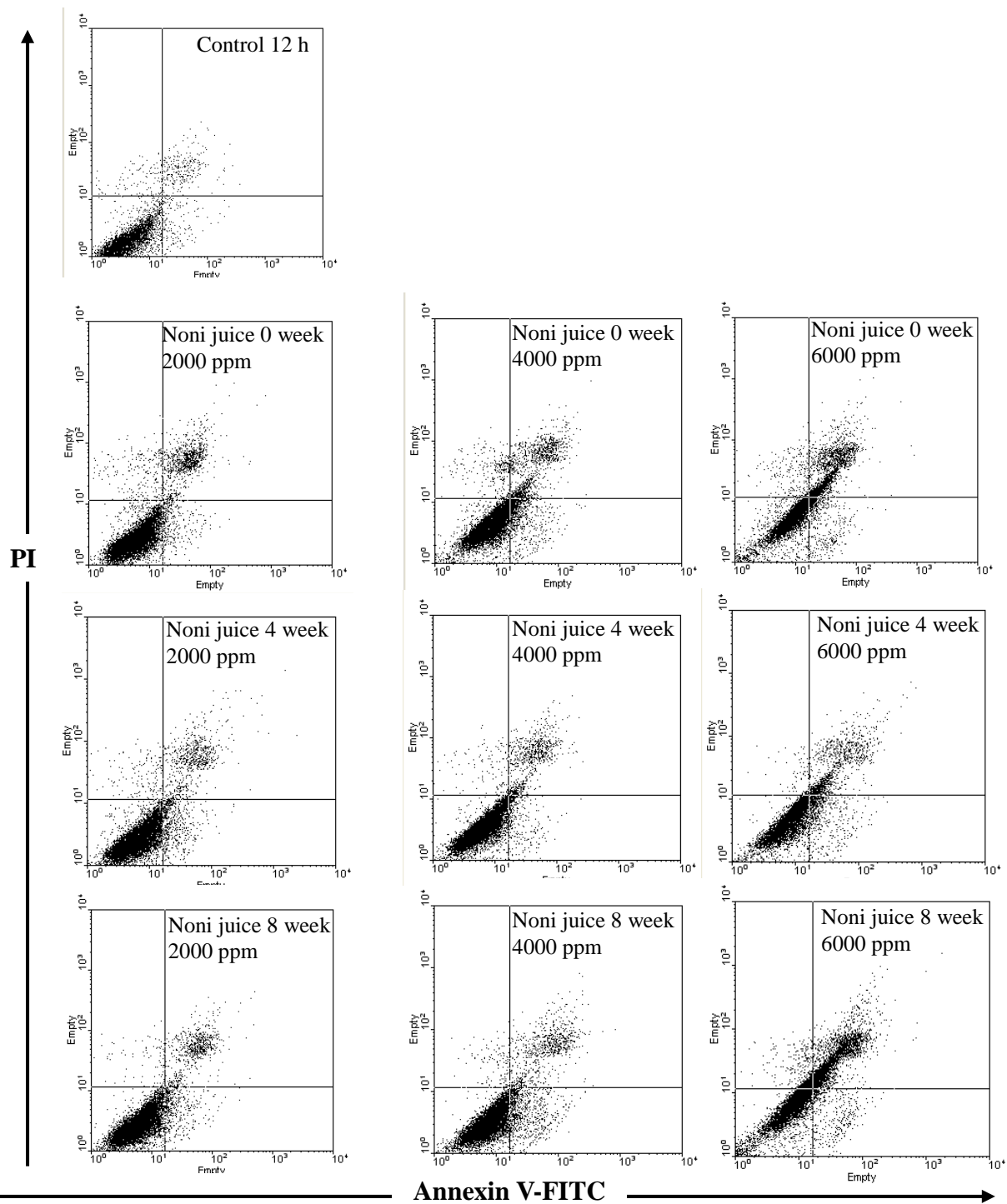
結果(圖三十三至三十八)為將人類結腸直腸癌Caco-2細胞添加不同濃度之不同發酵時間的諾麗果汁、乙醇萃取沉澱物與乙醇萃取之上清液，分別以2000、4000及6000ppm，分別作用12與24小時後，以FITC-Annexin V/PI 雙染進行細胞早期凋亡與晚期凋亡試驗，將結果分為四個象限，包括FITC⁻/PI⁻、FITC⁺/PI⁻、FITC⁻/PI⁺、FITC⁺/PI⁺，分別代表正常、早期凋亡、壞死與晚期凋亡的細胞。結果顯示(表十九)，隨著不同發酵時間之諾麗果汁的濃度增加，細胞分佈漸漸朝右上方位移，代表早、晚期凋亡的細胞比率隨之增高，其中未發酵諾麗果汁在2000ppm下與Caco-2細胞培養二十四小時後，早期凋亡與晚期凋亡的細胞比例為5.59%與11.53%，但濃度增加為4000ppm時，早期凋亡與晚期凋亡的比例分別為5.33%與13.14%，顯示未發酵諾麗果汁在4000ppm對Caco-2細胞會促進晚期凋亡。未發酵、發酵四週及發酵八週之諾麗果汁於濃度2000、4000及6000ppm分別作用十二與二十四小時後，晚期凋亡的比例皆逐漸增加，郭 (2007)於細胞實驗中也觀察到類似變化。結果顯示(表二十)，隨著不同發酵時間之諾麗果汁乙醇萃取上清液的濃度增加，細胞分佈漸漸朝右上方位移，代表早、晚期凋亡的細胞比率隨之增高，其中未發酵諾麗果汁乙醇萃取上清液在2000ppm下與Caco-2細胞培養十二小時後，早期凋亡與晚期凋亡的細胞比例為8.82%與8.26%，但濃度增加為4000ppm時，早期凋亡與晚期凋亡的比例分別為8.05%與9.36%，顯示未發酵諾麗果汁乙醇萃取上清液在4000ppm對Caco-2細胞會促進晚期凋亡。結果顯示(表二十一)，隨著不同發酵時間之諾麗果汁乙醇萃取物的濃度增加，細胞分佈漸漸朝右上方位移，代表早、晚期凋亡的細胞比率隨之增高，其中未發酵諾麗果汁乙醇萃取物在2000ppm下與Caco-2細胞培養二十四小時後，早期凋亡與晚

期凋亡的細胞比例為 4.57%與 8.35%，但濃度增加為 4000ppm時，早期凋亡與晚期凋亡的比例分別為 4.36%與 8.94%，顯示未發酵諾麗果汁乙醇萃取物在 4000ppm對Caco-2細胞會促進晚期凋亡。結果顯示(圖三十九至四十)，諾麗果汁、諾麗果汁乙醇萃取上清液與諾麗果汁乙醇萃取物皆是濃度 6000ppm時，對於Caco-2細胞較能促進早期凋亡與晚期凋亡。結果顯示(表十八至二十)諾麗果汁以發酵四週在6000ppm時，作用十二與二十四小時都對於Caco-2細胞較能促進早期凋亡，諾麗果汁於發酵八週在6000ppm時，較能促進晚期凋亡。諾麗果汁乙醇萃取上清液以發酵八週於6000ppm作用十二小時，對於Caco-2細胞較能促進早期凋亡，作用Caco-2細胞二十四小時以未發酵之諾麗果汁乙醇萃取上清液於6000ppm較能促進早期凋亡。晚期凋亡部分，作用十二小時與二十四小時分別以發酵四週與發酵八週之諾麗果汁乙醇萃取上清液6000ppm較為顯著。諾麗果汁乙醇萃取物以發酵八週於6000ppm作用十二小時，對於Caco-2細胞較能促進早期凋亡，晚期凋亡以發酵四週於6000ppm作用十二小時較為顯著，作用二十四小時部分，早期凋亡與晚期凋亡皆是以發酵八週之諾麗果汁乙醇萃取物於6000ppm作用較為顯著。諾麗果汁乙醇萃取物與結果(圖三十一)相呼應，因諾麗果汁乙醇萃取物以發酵八週之多醣體分子量較大，這些多醣體可能因縮合單寧隨著儲藏聚合成大分子沉澱，研究指出單寧具有抗癌、抗突變、預防低密度脂蛋白氧化等功效 (Shahidi and Naczk, 2004)。也有文獻表示多醣體分子量30 KDa以上具抗發炎及抗腫瘤作用 (黃, 1998)。由此推測諾麗果汁乙醇萃取物之果膠多醣體可能有抗腫瘤功效。



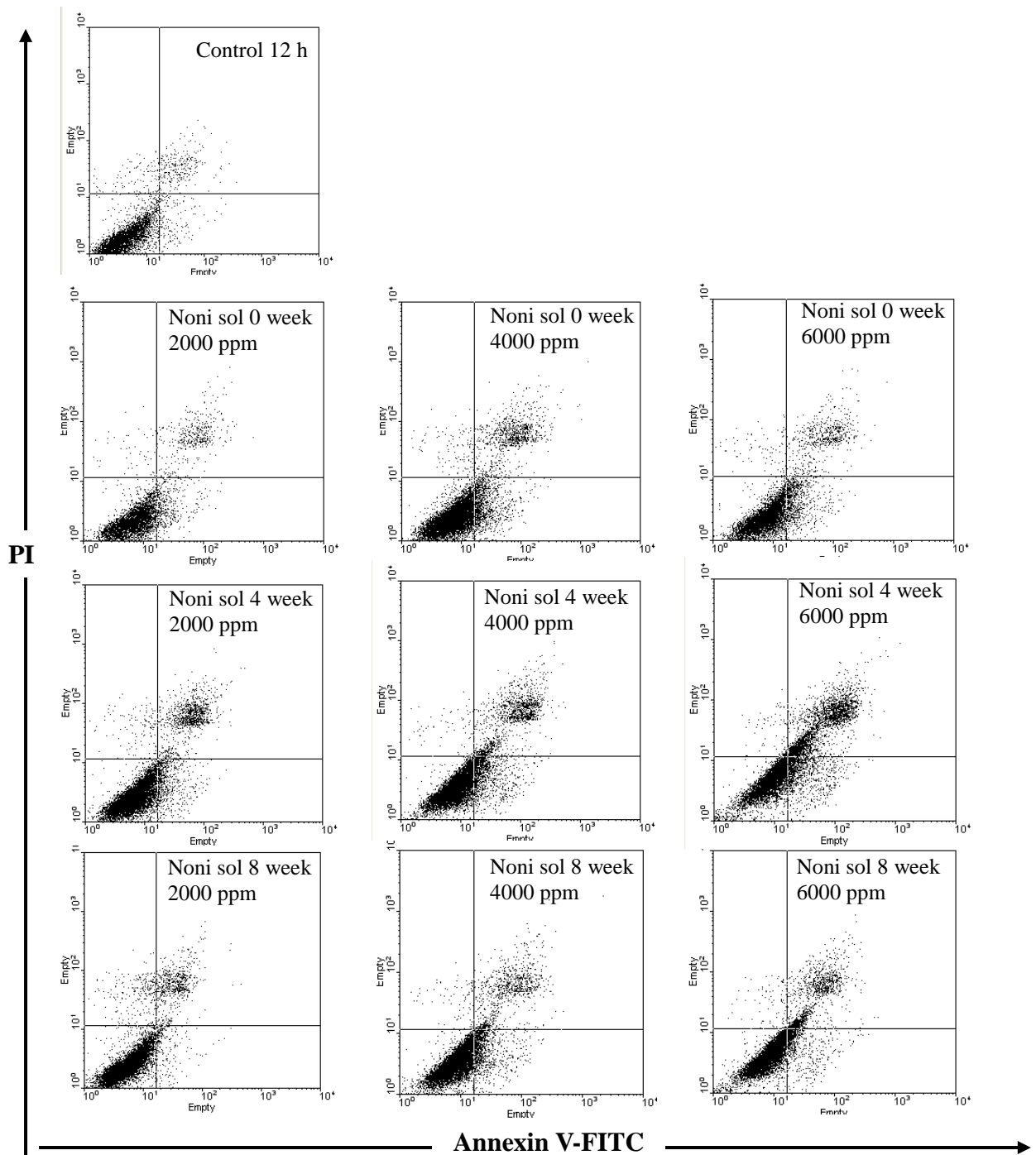
圖三十二、不同濃度之諾麗果汁、乙醇萃取沉澱物與乙醇萃取之上清液於(a) 未發酵、(b) 發酵四週與 (c) 發酵八週對Caco-2細胞存活率分析。

Fig 32. Caco-2 cell viability after treating for 24 h by MTT assay with noni juice, sol, and ppt at (a) 0 week (b) 4 week (c) 8 week. Each value is the mean \pm standard deviation (n = 3) at different fermentation time.



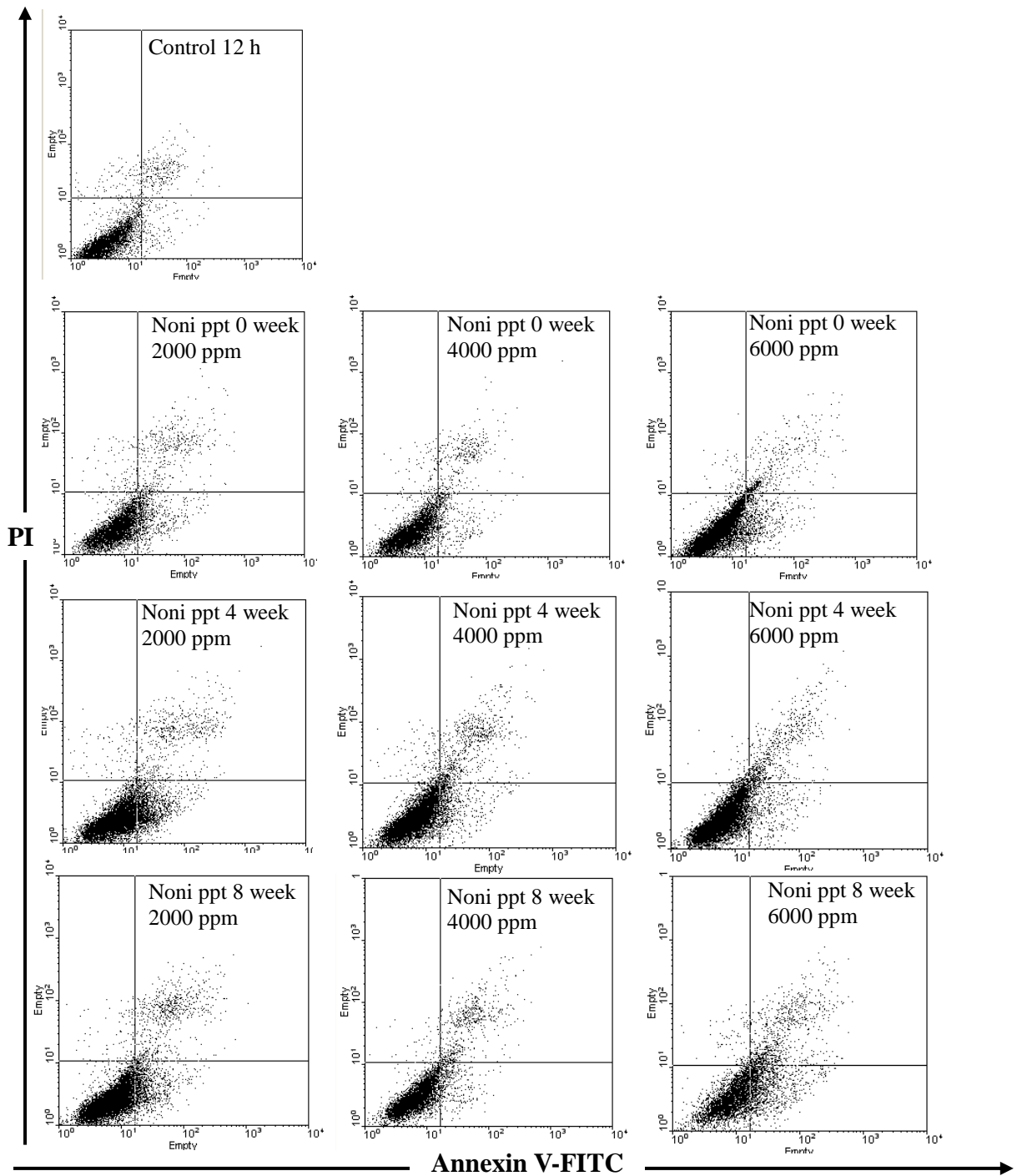
圖三十三、不同濃度與不同發酵時間之諾麗果汁對人類結腸直腸癌Caco-2細胞作用十二小時之早期凋亡與晚期凋亡之影響。

Fig 33. Effects of noni juice at different fermentation time on early and late apoptosis in Caco-2 cells. Cells were treated with 2000,4000, and 6000 ppm of noni juice for 12 h and stained with Annexin V-FITC/PI.



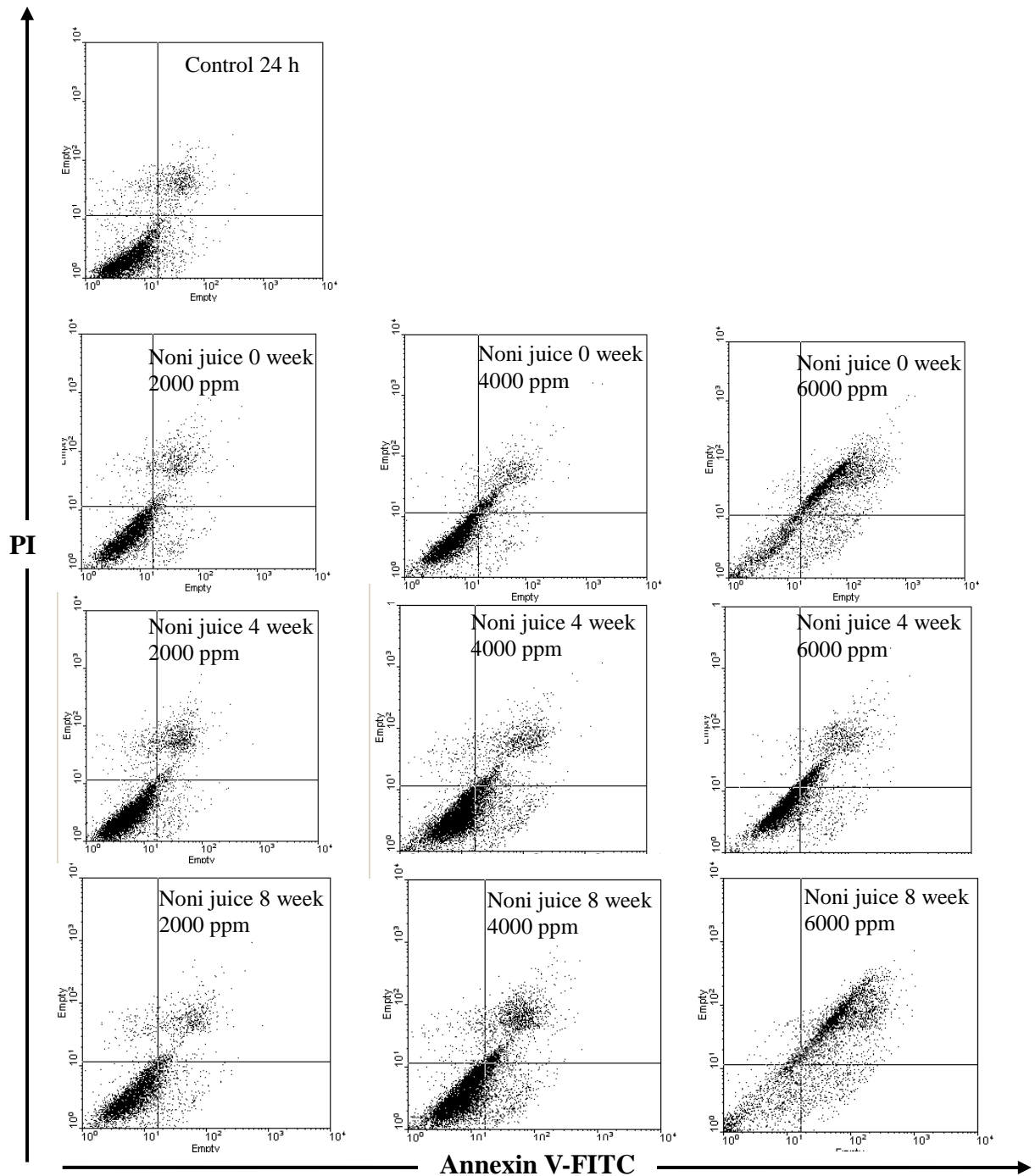
圖三十四、不同濃度與不同發酵時間之諾麗果汁乙醇萃取上清液對人類結腸直腸癌 Caco-2 細胞作用十二小時之早期凋亡與晚期凋亡之影響。

Fig 34. Effects of noni sol at different fermentation time on early and late apoptosis in Caco-2 cells. Cells were treated with 2000,4000, and 6000 ppm of noni juice for 12 h and stained with Annexin V-FITC/PI.



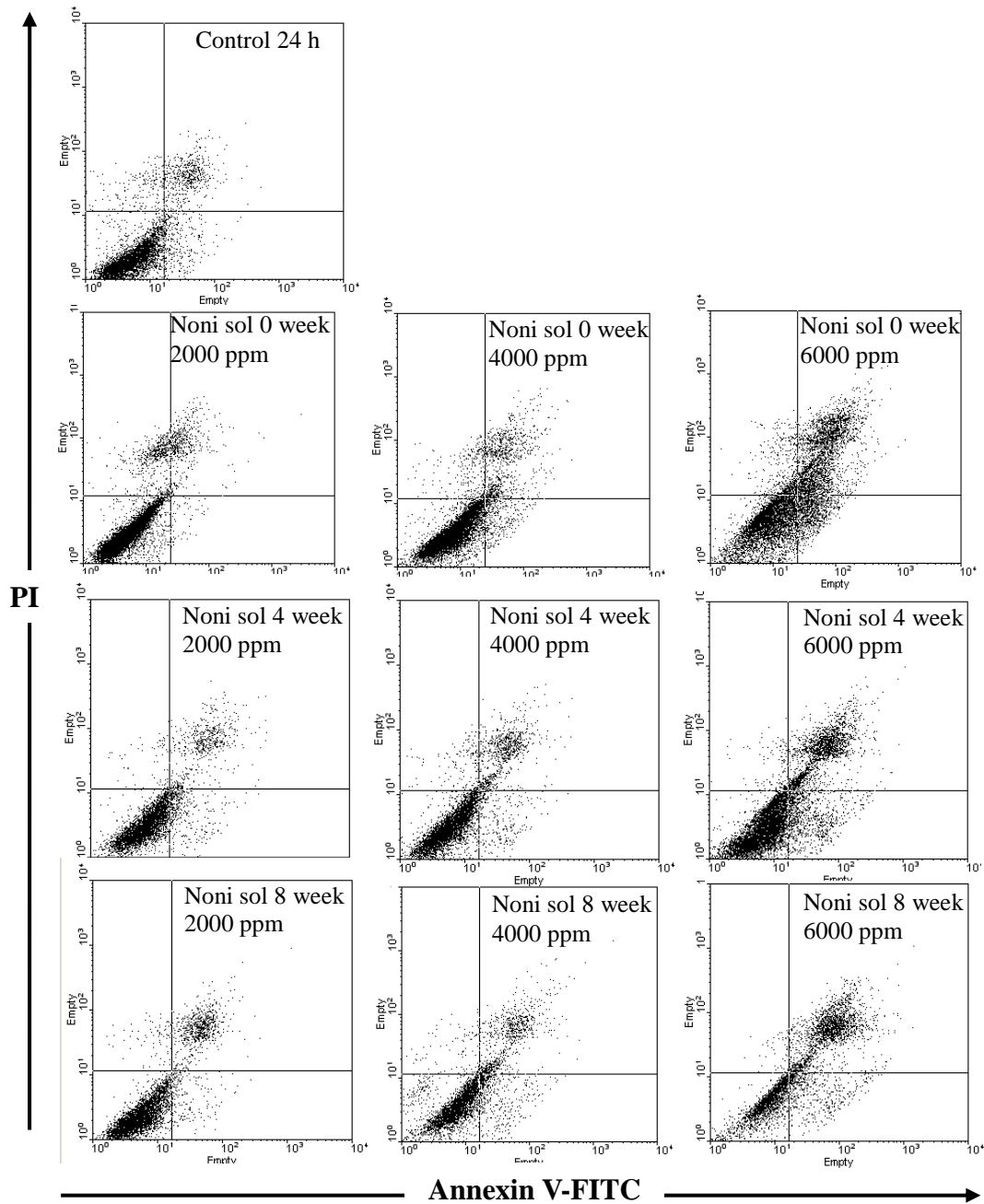
圖三十五、不同濃度與不同發酵時間之諾麗果汁乙醇萃取沉澱物對人類結腸直腸癌 Caco-2細胞作用十二小時之早期凋亡與晚期凋亡之影響。

Fig 35. Effects of noni ppt at different fermentation time on early and late apoptosis in Caco-2 cells. Cells were treated with 2000,4000, and 6000 ppm of noni juice for 12 h and stained with Annexin V-FITC/PI.



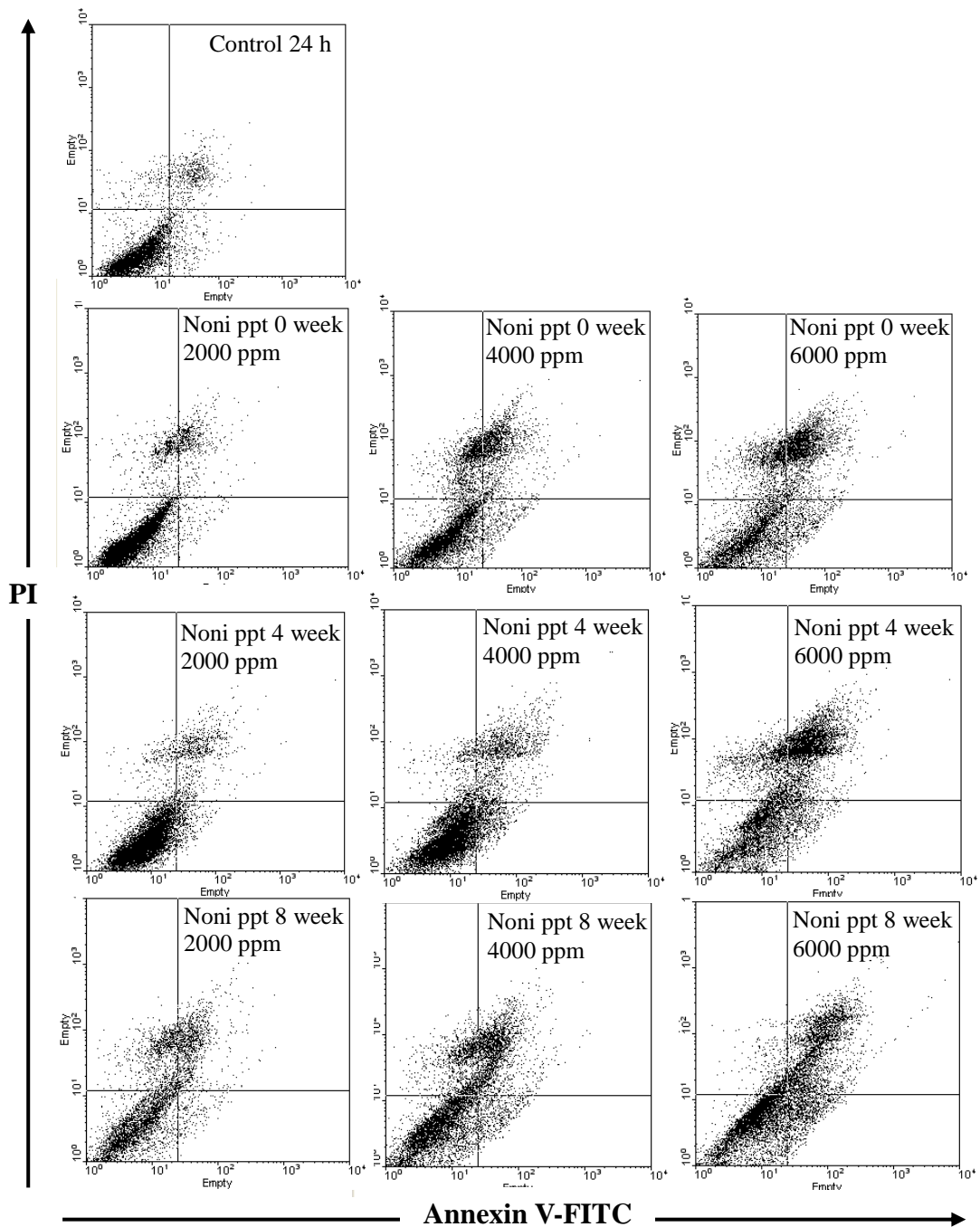
圖三十六、不同濃度與不同發酵時間之諾麗果汁對人類結腸直腸癌Caco-2細胞作用二十四小時之早期凋亡與晚期凋亡之影響。

Fig 36. Effects of noni juice at different fermentation time on early and late apoptosis in Caco-2 cells. Cells were treated with 2000,4000, and 6000 ppm of noni juice for 24 h and stained with Annexin V-FITC/PI.



圖三十七、不同濃度與不同發酵時間之諾麗果汁乙醇萃取上清液對人類結腸直腸癌 Caco-2細胞作用二十四小時之早期凋亡與晚期凋亡之影響。

Fig 37. Effects of noni sol at different fermentation time on early and late apoptosis in Caco-2 cells. Cells were treated with 2000,4000, and 6000 ppm of noni juice for 24 h and stained with Annexin V-FITC/PI.



圖三十八、不同濃度與不同發酵時間之諾麗果汁乙醇萃取沉澱物對人類結腸直腸癌 Caco-2細胞作用二十四小時之早期凋亡與晚期凋亡之影響。

Fig 38. Effects of noni ppt at different fermentation time on early and late apoptosis in Caco-2 cells. Cells were treated with 2000,4000, and 6000 ppm of noni juice for 24 h and stained with Annexin V-FITC/PI.

表十九、不同濃度與發酵時間之諾麗果汁對Caco-2細胞作用十二與二十四小時之早期與晚期凋亡之影響

Table 19. Effects of noni juice at different fermentation time on early and late apoptosis in Caco-2 cells. Cells were treated with 2000,4000, and 6000 ppm of noni juice for 12 & 24 h and stained with Annexin V-FITC/PI

Fermentation time (week)	Concentration (ppm)	Percentages of cells (%) ²				
		12 h		24 h		
		Early apoptosis	Late apoptosis	Early apoptosis	Late apoptosis	
Noni juice	0	2000	4.74±1.31 ^d	9.89±0.60 ^{DE}	5.59±0.21 ^{bc}	11.53±1.08 ^E
		4000	8.08±0.97 ^{bc}	12.04±0.73 ^D	5.33±1.56 ^{bc}	13.14±0.53 ^E
		6000	8.44±0.63 ^b	25.21±2.81 ^C	7.12±0.84 ^b	51.57±1.22 ^B
	4	2000	5.17±1.10 ^d	8.20±1.86 ^E	5.22±0.62 ^{bc}	8.56±0.97 ^E
		4000	4.85±0.70 ^d	7.12±0.49 ^E	10.62±0.53 ^a	12.34±1.52 ^E
		6000	10.26±1.64 ^b	12.95±3.25 ^D	10.84±1.99 ^a	23.80±1.87 ^D
Noni juice	8	2000	4.19±0.41 ^d	8.28±1.36 ^E	6.37±0.23 ^b	11.43±0.97 ^E
		4000	5.41±0.40 ^d	7.45±0.19 ^E	6.32±2.06 ^b	13.31±1.56 ^E
		6000	5.87±2.12 ^{cd}	30.90±1.47 ^B	6.86±0.62 ^b	40.70±7.98 ^C
¹ Control	(-)		4.24±1.31	6.43±0.24	3.10±0.41	6.17±1.39
	(+)		16.61±2.56 ^a	64.05±3.33 ^A	3.99±1.11 ^c	77.21±2.51 ^A

¹Control(-): cells were treated with no FBS medium. Control(+): cells were treated with MeOH.

²Each value is the mean ± standard deviation (n = 3). Means among different fermentation time with different superscripts are significantly different (p < 0.05) as compared with control (+).

表二十、不同濃度與發酵時間之諾麗果汁乙醇萃取上清液對Caco-2細胞作用十二與二十四小時之早期與晚期凋亡之影響

Table 20. Effects of noni sol at different fermentation time on early and late apoptosis in Caco-2 cells. Cells were treated with 2000,4000, and 6000 ppm of noni juice for 12 & 24 h and stained with Annexin V-FITC/PI

Fermentation time (week)	Concentration (ppm)	Percentages of cells (%) ²				
		12 h		24 h		
		Early apoptosis	Late apoptosis	Early apoptosis	Late apoptosis	
Noni sol	0	2000	8.82±0.10 ^d	8.26±1.05 ^{GF}	9.77±0.39 ^{cde}	10.60±0.77 ^E
		4000	8.05±2.65 ^{de}	9.36±0.41 ^{EGF}	12.84±1.70 ^b	11.44±1.92 ^E
		6000	12.69±0.38 ^{bc}	10.23±1.39 ^{EDF}	18.24±3.85 ^a	12.64±0.07 ^E
	4	2000	6.51±0.60 ^e	11.34±0.52 ^{ED}	5.01±0.90 ^{fg}	11.01±0.94 ^E
		4000	9.13±0.05 ^d	12.67±0.95 ^D	7.64±0.60 ^{ef}	12.63±0.69 ^E
		6000	12.10±0.25 ^c	34.58±1.39 ^B	10.84±1.01 ^{bcd}	21.12±0.51 ^C
Noni sol	8	2000	3.35±0.64 ^f	7.22±0.81 ^G	4.00±0.89 ^{bcd}	12.75±0.51 ^E
		4000	11.87±0.50 ^c	8.25±0.56 ^{GF}	8.09±1.75 ^g	16.05±0.58 ^D
		6000	14.31±0.45 ^b	20.10±0.57 ^C	11.04±0.14 ^{de}	39.45±0.79 ^B
¹ Control	(-)		4.24±1.31	6.43±0.24	3.10±0.41	6.17±1.39
	(+)		16.61±2.56 ^a	64.05±3.33 ^A	3.99±1.11 ^g	77.21±2.51 ^A

¹Control(-): cells were treated with no FBS medium. Control(+): cells were treated with MeOH.

²Each value is the mean ± standard deviation (n = 3). Means among different fermentation time with different superscripts are significantly different (p < 0.05) as compared with control (+).

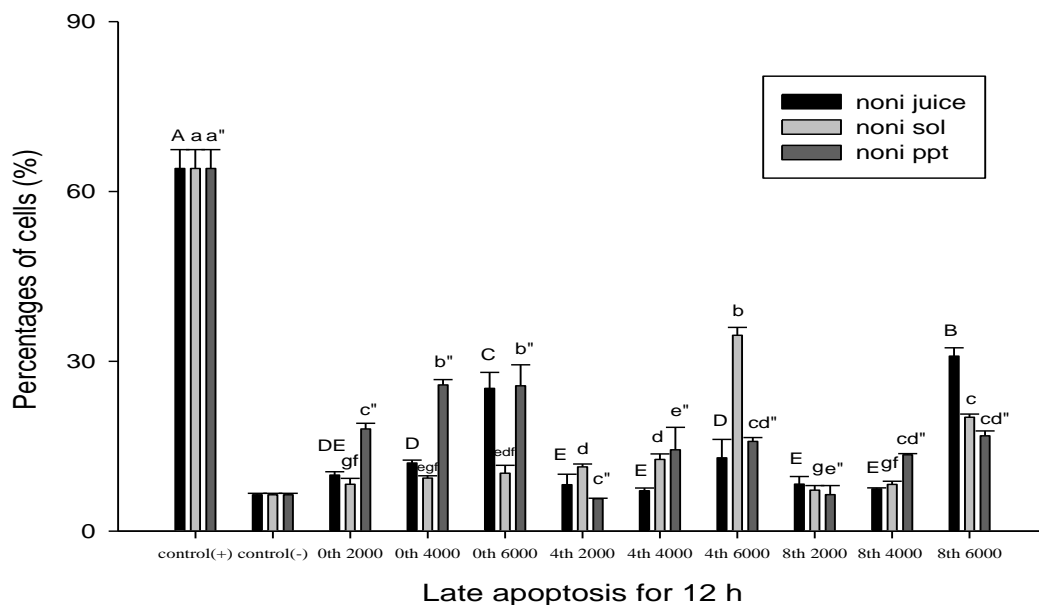
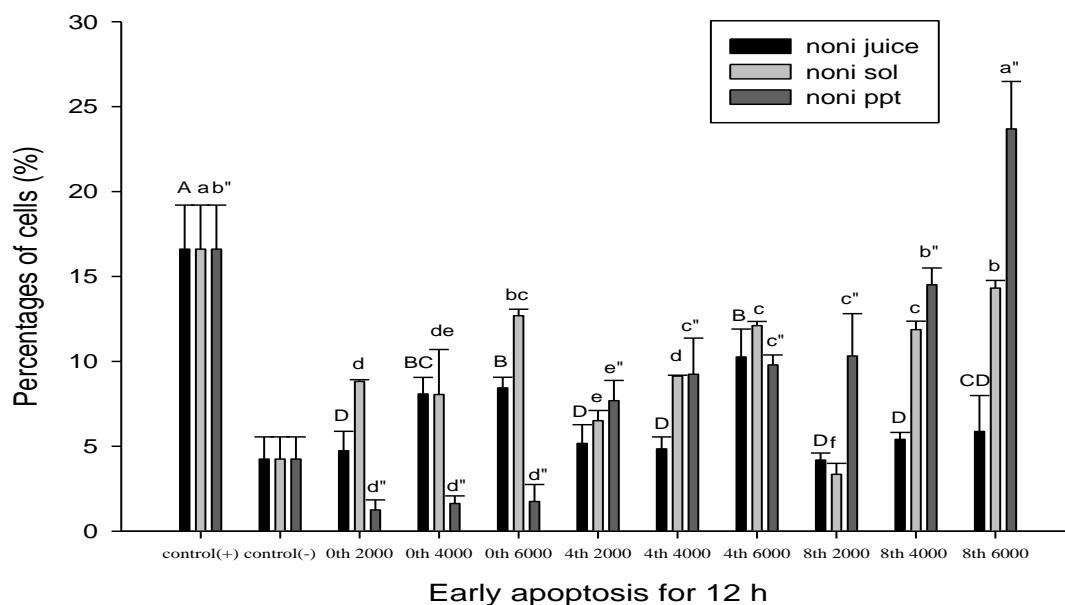
表二十一、不同濃度與發酵時間之諾麗果汁乙醇萃取沉澱物對Caco-2細胞作用十二與二十四小時之早期與晚期凋亡之影響

Table 21. Effects of noni ppt at different fermentation time on early and late apoptosis in Caco-2 cells. Cells were treated with 2000,4000, and 6000 ppm of noni juice for 12 & 24 h and stained with Annexin V-FITC/PI

Fermentation time (week)	Concentration (ppm)	Percentages of cells (%)				
		12 h		24 h		
		Early apoptosis	Late apoptosis	Early apoptosis	Late apoptosis	
Noni ppt	0	2000	1.25±0.59 ^d	18.04±1.01 ^B	4.57±0.03 ^c	8.35±5.27 ^G
		4000	1.63±0.45 ^d	25.82±0.95 ^B	4.36±1.52 ^c	8.94±3.83 ^G
		6000	1.75±1.00 ^d	25.68±3.71 ^C	2.60±1.04 ^c	23.13±3.66 ^C
	4	2000	7.68±1.20 ^c	5.74±0.06 ^E	5.58±1.16 ^b	17.37±4.40 ^E
		4000	9.24±2.13 ^c	14.36±3.98 ^{CD}	5.94±1.06 ^b	20.42±1.18 ^D
		6000	9.79±0.59 ^c	15.85±0.67 ^{CD}	3.74±0.14 ^b	23.68±3.41 ^C
	8	2000	10.32±2.49 ^c	6.43±1.61 ^E	3.51±0.61 ^b	15.82±0.81 ^F
		4000	14.51±0.99 ^b	13.47±0.21 ^{CD}	7.21±1.27 ^b	21.06±0.88 ^{CD}
		6000	23.69±2.79 ^a	16.84±0.84 ^{CD}	9.23±1.04 ^a	27.55±2.17 ^B
Control	(-)		4.24±1.31	6.43±0.24	3.10±0.41	6.17±1.39
	(+)		16.61±2.56 ^b	64.05±3.33 ^A	3.99±1.11 ^b	77.21±2.51 ^A

¹Control(-): cells were treated with no FBS medium. Control(+): cells were treated with MeOH.

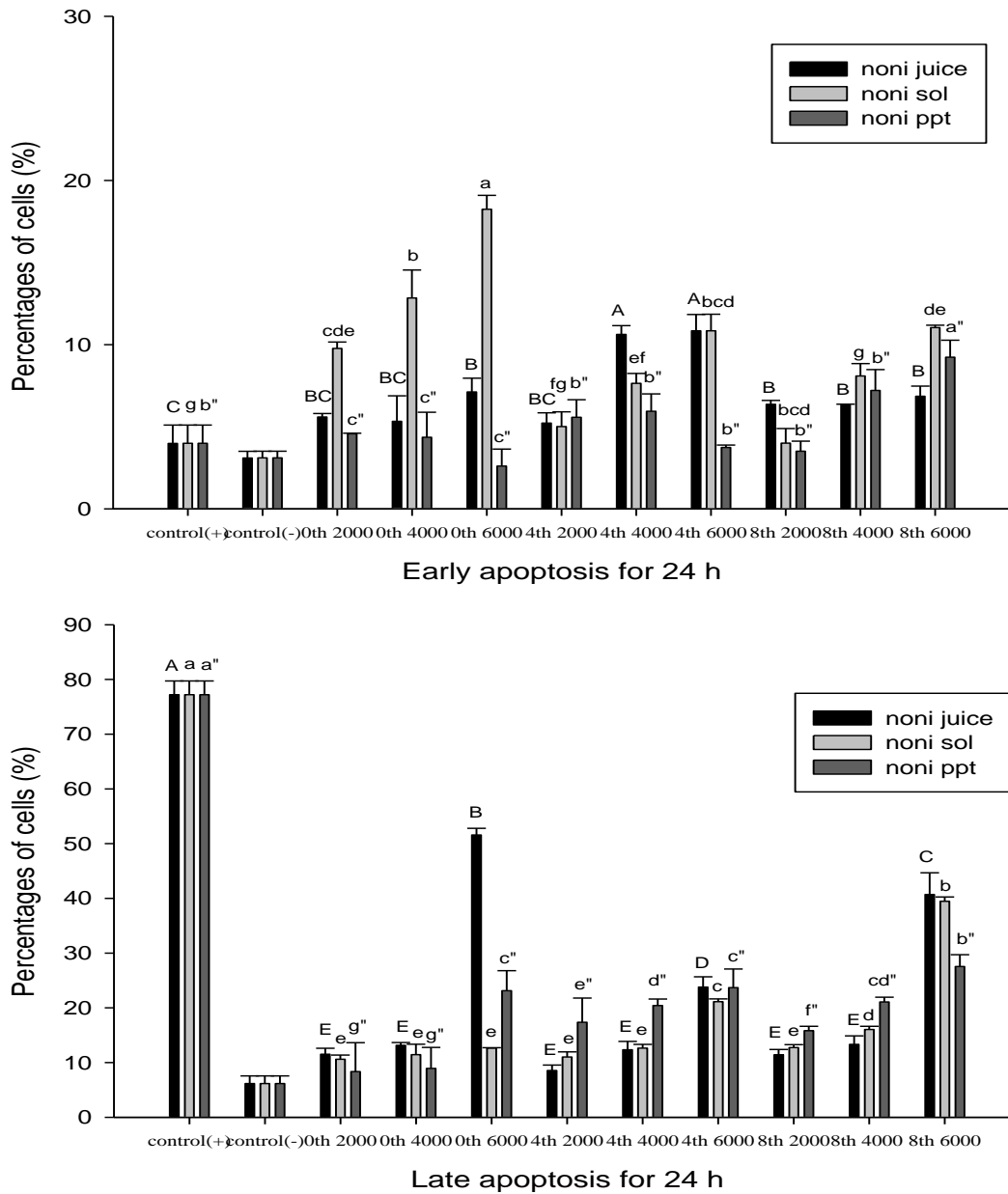
²Each value is the mean ± standard deviation (n = 3). Means among different fermentation time with different superscripts are significantly different (p < 0.05) as compared with control (+).



圖三十九、不同濃度與發酵時間之諾麗果汁, 諾麗果汁乙醇萃取上清液及諾麗果汁乙醇萃取沉澱物對Caco-2細胞作用十二小時之(a)早期與(b)晚期凋亡之比例。

Fig 39. The percentage (%) of noni juice at different fermentation time on (a) early and (b) late apoptosis in Caco-2 cells. Cells were treated with 2000,4000, and 6000 ppm of noni juice for 12 h and stained with Annexin V-FITC/PI.

Statistical differences were calculated by Duncan's new multiple range test. Values in the same column (a,b,c) with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$). Data were shown as mean \pm SD for triplicates.



圖四十、不同濃度與發酵時間之諾麗果汁，諾麗果汁乙醇萃取上清液及諾麗果汁乙醇萃取沉澱物對 Caco-2 細胞作用二十四小時之(a)早期與(b)晚期凋亡之比例。 Fig 40. The percentage (%) of noni juice at different fermentation time on (a) early and (b) late apoptosis in Caco-2 cells. Cells were treated with 2000,4000, and 6000 ppm of noni juice for 24 h and stained with Annexin V-FITC/PI. Statistical differences were calculated by Duncan's new multiple range test. Values in the same column (a,b,c) with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$). Data were shown as mean \pm SD for triplicates.

伍、結論

本實驗探討發酵諾麗果汁於儲藏過程中的品質變化和穩定性，接續探究不同時間儲放所得諾麗果汁與乙醇萃取物對於 Caco-2 人類結腸直腸癌細胞是否具有抑制生長效應，進一步瞭解諾麗抑癌作用。

第一部份諾麗果汁部份發酵實驗中，由結果可知，未發酵及發酵諾麗果汁的 pH 值幾乎維持在 3.7；在色澤方面，諾麗果汁則會由金黃色轉變為紅褐色，且隨發酵時間之增加顏色會越深，與縮合單寧之增加有正相關；另外，產率方面會隨著發酵時間增加，其中以第八週為最佳；總酚、類黃酮及 Scopoletin 衍生物和 rutin 是隨發酵時間下降，而縮合單寧與 Scopoletin 是隨之增加，總抗氧化能力與 DPPH 自由基清除能力亦是隨發酵時間而下降，以第四週含量抗氧化力較好，綜合實驗結果可知，雖未發酵之 noni 果汁亦具有良好的功能性成分，但若再考慮到產率則是以發酵過的諾麗果汁較佳。

第二部分乙醇萃取諾麗果汁多醣體與抑癌實驗中，多醣體分析部分，由結果可知未發酵諾麗果汁乙醇萃取物之總醣含量較高，還原醣含量以發酵四週較好，而多醣體主產物的分子量在儲放 0 與 1 個月時分別為 468.61 與 448.46 KDa，儲存 2 個月後分析出兩個主產物分別為 2739 及 103.1 KDa，可能因果膠多醣體會受到分支度、主鏈鍵結方式與側鏈基團影響而改變其分子排列結構，影響分子量之大小。抑癌實驗中，為評估諾麗果汁及乙醇萃取物對於 Caco-2 細胞凋亡之能力，由 MTT 試驗可以得知 0 至 8 週之發酵過程中，隨著添加濃度的增加，Caco-2 癌細胞存活率顯著降低。接者以流式細胞儀做細胞凋亡之分析，隨著不同發酵時間之諾麗果汁乙醇萃取物的濃度增加，細胞分佈漸漸朝右上方位移，代表早、晚期凋亡的細胞比率隨之增高，結果顯示，諾麗果汁、諾麗果汁乙醇萃取上清液與諾麗果汁乙醇萃取物皆是濃度 6000ppm 時，對於 Caco-2 細胞較能誘發細胞走向凋亡。

陸、總結

諾麗果汁部份發酵與多醣體分析實驗結果，未發酵諾麗果汁以總酚類化合物含量、類黃酮含量、芸香素含量、東莨菪素衍生物及總糖含量較多。發酵四週諾麗果汁以總抗氧化力、DPPH自由基清除能力與還原糖含量較多。發酵八週諾麗果汁以總產率、縮合單寧含量、東莨菪素與多醣體分子量較大。

人類結腸直腸癌Caco-2細胞抑癌實驗結果顯示，細胞存活率分析部分，Caco-2細胞隨者添加濃度的增加，存活率顯著降低。流式細胞儀分析細胞凋亡部分，對於Caco-2細胞於早期凋亡中最為顯著的為諾麗果汁乙醇萃取物發酵八週於6000ppm作用十二小時，從多醣體分析實驗中得知發酵八週之諾麗果汁乙醇萃取物以多醣體分子量較大，諾麗果汁乙醇萃取物與結果(圖三十一)相呼應，因諾麗果汁乙醇萃取物以發酵八週之多醣體分子量較大，這些多醣體可能因縮合單寧隨著儲藏聚合成大分子沉澱，研究指出單寧具有抗癌功效 (Shahidi and Naczki, 2004)。許多研究指出多醣具有膳食纖維的功能，包括保健腸道、調節免疫、調節血糖、調節血脂、抗腫瘤、抗微生物、清除體內自由基等功能(Mizuno *et al.*, 1995; Bohn *et al.*, 1995)。推測諾麗果汁乙醇萃取物之果膠多醣體可能有抗腫瘤功效；促進Caco-2細胞晚期凋亡以諾麗果汁未發酵於6000ppm作用二十四小時最為顯著，從部分發酵實驗中得知未發酵之諾麗果汁以總酚、類黃酮、東莨菪素衍生物、芸香素及總糖含量較多，文獻指出酚類物質、類黃酮類皆具有抗氧化、抗腫瘤功效(Cook and Samman, 1996; Pietta, 2000)。Manuele等 (2006)也認為東莨菪素具有抗腫瘤的能力，總酚類、類黃酮類、東莨菪素與芸香素等含量與抗氧化也有正相關，文獻指出酚類化合物對於消化道的抗氧化與抗癌作用有助益 (Halliwell, 2007)，可得知對抗癌細胞增生效果。由此推測諾麗果汁有抗癌功效。

柒、參考文獻

- 水野和川合正允 (1992) 菇類的化學生化學。台北 國立編譯館。
- 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。
- 李宗哲 (2008) 以廢棄雞爪開發具抗氧化與降高血壓效果酵素水解物之研究。國立中興大學 動物科學系 碩士論文。
- 李冠青 (2008) 食品多醣、甲基化衍生物及降解物之抗氧化活性及對腸腺癌細胞之抑制性。靜宜大學 食品營養學系 碩士論文。
- 林昱成 (2010) 部分純化諾麗果膠酵素與諾麗果汁控溫發酵之研究。東海大學 食品科學系 碩士論文。
- 林溢多 (2003) Cyprohepatadine 誘發人類大腸癌細胞凋亡及細胞週期停滯分子機制之研究，台北醫學大學 醫學研究所 碩士論文。
- 唐孟成、賈之慎、朱祥瑞和呂順霖 (1996) 春秋桑葉中黃酮類化合物總量及提取方法比較。浙江農業大學學報 22(4): 394-398。
- 張惠敏 (2009) 諾麗 今日預防醫學之星。台灣 正義出版社。
- 郭偉翔 (2007) 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。
- 陳富民 (2007) 諾麗 (Noni) 果汁最佳發酵條件之探討。屏東科技大學 機械系 碩士論文。
- 黃仁彰 (1998)。食藥用菇類保健食品之研發。食藥用菇類的培養與應用。食品工業發展研究所專題報告 新竹 台灣。
- 黃永翰 (2010) 鈣螯合諾麗果汁及果汁粉之製備、定性與儲藏研究。東海大學 食品科學系 碩士論文。
- 黃崇真 (2004) 腸道微生物與益生菌，食品工業 36(3): 4-15。
- 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。
- 楊繼江 (2006) 細胞死亡之細胞凋亡。中山醫學大學 醫技系。

- 蔡宗堯 (2004) 酵素水解分離大豆蛋白以製備高血壓抑制胜肽。東海大學食品科學系 碩士論文。
- 鍾玉玲 (2003) 海巴戟天葉、莖及果實粗萃取物的抗氧化活性之比較。嘉南藥理科技大學 生物科技研究所 碩士論文。
- 羅宇展 (2009) 檫樹 (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 生物資源暨農學院園藝學研究所 碩士論文。
- Aalbersberg, W. G. L., Hussein, S., Sotheeswaran, S., and Parkinson, S. (1993) Carotenoids in the leaves of *Morinda citrifolia*. *J. Herbs Spices Med. Plants*, 2, 51-54.
- Adams, J. M., and Cory, S. (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*, 281: 1322-1326.
- Anh K. T., Bui a., Antony B., and Filomena P., (2006) Polysaccharide composition of the fruit juice of *Morinda citrifolia* (Noni). *PHYTOCHEMISTRY*, 67: 1271-1275
- Arnao, M. B., Cano. A., Hernandez-Ruiz, J., Garcia-Canovas, F. and Acosta, M. (1996) Inhibition by L-ascorbic acid and other antioxidants of the 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) oxidation catalyzed by peroxidase: a new approach for determining total antioxidant status of foods. *Analy. Biochem.* 236: 255-261.
- Asahina, A. Y., Ebesu, J. S. M., Ichinotsubo, D., Tongson, J. and Hokama, Y. (1994) Effect of okadaic acid (OA) and Noni fruit extraction in the synthesis of tumor necrosis factor- α (TNF- α) by peripheral blood mononuclear (PBN) cells *in vitro*. The Proceedings of the International Symposium of Ciguatera and Marine Natural Products: 197-205.
- 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.
- Bohn, J. A. and BeMiller, J.N. (1995) (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans biological response modifiers:a review of structure-functional activity relationships.*Carbohydrate*

polymers.28:3-14.

Boobis, A. R., Fawthrop, D. J., and Davies, D. S. (1989) Mechanisms of cell death.

Trends Pharmacol Sci, 10: 275-280.

Bouderbala, S., Prost, J., Lacaille-Dubois, M. A. and Bouchenak, M. (2010) Iridoid extracts from *Ajugaiva* increase the antioxidant enzyme activities in red blood cells of rats fed a cholesterol-rich diet. *Nutrition Research* 30 (5): 358-365.

Bui, A. K. T., Bacic, A., and Pettolino, F. (2006) Polysaccharide composition of the fruit juice of *Morinda citrifolia* (noni). *Phytochemistry*, 67, 1271-1275.

Calabrò, M. L., Tommasini, S., Donato, P., Stancanelli, R., Raneri, D., Catania, S., Costa, C., Villari, V., Ficarra, P. and Ficarra, R. (2005) The rutin/ β -cyclodextrin interactions in fully aqueous solution: spectroscopic studies and biological assays. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36: 1019-1027.

Cardon, D. (2003) *Le Monde des Teintures Naturelles*. Belin. Paris.

Chan-Blanco, Y., Vaillant F., Pérez A. M., Belleville, M.-P., Zúñiga, 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.

Chan-Blanco, Y., Vaillant, F., Perez, A. M., Reynes, M., Brillouet, J.-M. and Brat, P. (2006) The noni fruit (*Morinda citrifolia* L.): A review of agricultural research, nutritional and therapeutic properties. *J. Food Compos. Anal.*, 19: 645-654.

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. and Schlosser, J. (2007) Anthocyanin, phenolic composition, colour measurement and sensory analysis of BC commercial red wines. *Food Res. Int.*, 40, 92-100.

Cook, N. C. and Samman, S. (1996) Flavonoids – Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *The Journal of Nutritional Biochemistry*

7 (2), 66-76

Cushman, D. W. and Cheung, H. S. (1971) Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharmacol.* 20: 1637-1648.

Delzenne, N.M. and Roberfroid, M.R. (1994) Physiological Effects of Non-Digestible Oligosaccharides. *Food Technology.* 27: 1-6

Deng, S., West, B. J. and Jensen, C. J. (2010) A quantitative comparison of phytochemical components in global noni fruits and their commercial products. *Food Chem.* 122 : 267–270.

Desagher, S. and Martinou, J. C. (2000) Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.* 10: 369-377.

Dittmar, A. (1993) *Morinda citrifolia* L. – use in indigenous Samoan medicine. *J. Herbs Spices Med. Plants* 1: 77-92.

Dixon, A. R., McMillen, H. and Etkin, N. L. (1999) Ferment this: the transformation of Noni, a traditional Polynesian medicine (*Morinda citrifolia*, Rubiaceae). *Ecological Botany* 53: 51-68.

Elkins, R. (1998) Hawaiian Noni (*Morinda citrifolia*) Prize Herb of Hawaii and the South Pacific. Woodland Publishing. Utah.

European Commission. Scientific Committee of Food. (2002) Opinion of the Scientific Committee on Food of Tahitian Noni Juice. SCF/CS/DOS/ 18 ADD 2. Belgium.

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

Fawthrop, D. J., Boobis, A. R., and Davies, D. S. (1991) Mechanisms of cell death. *ArchToxicol.* 65: 437-444.

Furusawa, E., Hirazumi, A., Story, S. and Jensen, J. (2003) Antitumour potential of a

polysaccharide-rich substance from the fruit juice of *Morinda citrifolia* (Noni) on sarcoma 180 ascites tumor in mice. *Phytother. Res.* 17: 1158-1164.

Heinicke, R. M. (1985) The pharmacologically active ingredient of noni. *Pac. Trop. Bot. Gard. Bull.* 15: 10-14.

Hengartner, M. O. (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 407: 770-776.

Hirazumi, A. and Furusawa, E. (1999) An immunomodulatory polysaccharide-rich substance from the fruit juice of *Morinda citrifolia* (Noni) with antitumor activity. *Phytother Res.* 13: 380-387.

Hirazumi, A., Furusawa, E., Chou, S.C. and Hokama, Y. (1994) Anticancer activity of *Morinda citrifolia* on intraperitoneally implanted Lewis lung carcinoma in syngenic mice. *Proc West Pharmacol Soc.* 37: 145-146.

Hirazumi, A., Furusawa, E., Chou, S.C. and Hokama, Y. (1996) Immunomodulation contributes to the anticancer activity of *Morinda citrifolia* (Noni) fruit juice. *Proc West Pharmacol Soc.* 39: 7-9.

Ikedo, R., Wada M., Nishigaki T. and Nakashima K. (2009) Quantification of coumarin derivatives in Noni (*Morinda citrifolia*) and their contribution of quenching effect on reactive oxygen species. *Food Chem.* 113: 1169-1172.

Jang, D. S., Park, E. J., Kang, Y. H., Su, B. N., Hawthorne, M. E., Vigo, J. S., Graham, J.G., Cabieses, F., Fong, H. H., Metha, R. G. and Pezzuto, J. M. (2003) Compounds obtained from *Sida acuta* with the potential to induce quinone reductase and to inhibit 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced preneoplastic lesions in a mouse mammary organ culture model. *Arch. Pharm. Res.* 26: 585-590.

Jayaraman, S. K., Manoharan, M. S. and Illanchezian, S. (2008) Antibacterial, Antifungal and Tumor cell suppression potential of *Morinda citrifolia* fruit extracts. *Int. J. Integr. Biol.* 3 (1): 44-49.

Julkunen-Titto, R. (1985) Phenolic constituents in the leaves of Northern willows: Methods for the analysis of certain phenolics. *J. Agric. Food Chem.* 33: 213-217.

- Kamiya, K., Tanaka, Y., Endang, H., Umar, M. and Satake, T. (2004) Chemical constituents of *Morinda citrifolia* fruits inhibit copper-induced low-density lipoprotein oxidation. *J. Agric. Food Chem.* 52: 5843-5848.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. (1972) Apoptosis : a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26: 239-257.
- Kim, D.-H., Lee, H.-J., Oh, Y.-J., Kim, M.-J., Kim, S.-H., Jeong, T.-S. and Baek, N.-I. (2005) Iridoid Glycosides Isolated from *Oldenlandia diffusa* Inhibit LDL-Oxidation. *Arch Pharm Res* 2 (10) : 1156-1160.
- Kinghorn, A. D., Chai, Hee-byung., Sung, C. K., & Keller, W. J. (2011) The classical drug discovery approach to defining bioactive constituents of botanicals. *Fitoterapia.*, 82, 71-79.
- Lacaille-Dubois, M. A., Franck, U. and Wagner, H. (2001) Search for potential Angiotensin Converting Enzyme (ACE)-inhibitors from plants. *Phytomedicine* 8 (1): 47-52.
- Li, B., Zhang, D.-M., Luo, Y. M. and Chen, X.G. (2006) Three New and Antitumor Anthraquinone Glycosides from *Lasianthus acuminatissimus* MERR. *Chem. Pharm. Bull.* 54(3) : 297-300.
- Li, R. W., Myers, S. P., Leach, D. N., Lin, G. D. and Leach, G. (2003) A cross-cultural study: anti-inflammatory activity of Australian and Chinese plants. *J. Ethnopharmacol.* 85: 25-32.
- Lin, L.-C., Wang, Y.-H., Hou, Y.-C., Chang, S., Liou, K.-T., Chou, Y.-C., Wang, W.-Y. and Shen, Y.-C. (2006) The inhibitory effect of phenylpropanoid glycosides and iridoid glucosides on free radical production and $\beta 2$ integrin expression in human leucocytes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 58 (1): 129-135.
- Liu, C. H., Xue, Y. R., Ye, Y. H., Yuan, F. F., Liu, J. Y., and Shuang, J. L. (2007) Extraction and characterization of antioxidant compositions from fermented fruit juice

- of *Morinda citrifolia* (Noni). *Agricultural Sciences in China* 6 (12): 1494-1501.
- Locher, C. P., Burch, M. T., Mower, H. F., Berestecky, J., Davis, H., Van Poel, B., Lasure, A., Vanden Berghe, D. A. and Vlietinck, A. J. (1995) Anti-microbial activity and anti-complement activity of extracts obtained from selected Hawaiian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 49: 23-32.
- Majno, G. and Joris, I. (1995) Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol.* 146: 3-15.
- Manuele, M. G., Ferraro, G., Arcos, M. L. B., López, P., Cremaschi, G. and Anesini, C. (2006) Comparative immunomodulatory effect of scopoletin on tumoral and normal lymphocytes. *Life Sci.* 79: 2043-2048.
- 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. and Simon, O. R. (2002) Preliminary investigation of the anti-inflammatory properties of an aqueous extract from *Morinda citrifolia* (Noni). *Pharmacol Soc.* 45: 76-78.
- Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V. and Milner, A. (1993) A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.* 84: 407-412.
- Mizuno, T., Kinoshita, T., Zhuang, C., Ito, H. and Mayuzumi, Y. (1995) Antitumor-active Heteroglycans from Niohshimeji Mushroom, *Tricholoma giganteum*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry.* 59 (4),568-571
- 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.
- Moorthy, N. K. and Reddy, G. S. (1970) Preliminary phytochemical and pharmacological study of *Morinda citrifolia* Linn. *Antiseptic.* 67: 167-171.
- Morton, J. F. (1992) The ocean-going Noni, or Indian mulberry (*Morinda citrifolia*, Rubiaceae) and some of its "colourful" relatives. *Ecological Botony* 46: 241-256.

- Nakamura, T., Nakazawa, Y., Onizuka, S., Satoh, S., Chiba, A., Sekihashi, K., Miura, A., Yasugahira, N. and Sasaki, Y. (1997) Antimutagenicity of Tochu tea (an aqueous extract of *Eucommia ulmoides* leaves): 1. The clastogen-suppressing effects of Tochu tea in CHO cells and mice. *Mutation Research, Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 388 (1): 7-20.
- Nelson, S. C. (2001) Noni cultivation in Hawaii. *Fruit and Nuts* 4: 1-4.
- 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. and Elevitch C.R. (2006) *Noni: The complete guide for consumers and growers*. 1st ed. Permanent Agriculture Resources, Holualoa, Hawaii.
- Newmeyer DD, Green DR. (1998) Surviving the cytochrome seas. 21: 653-655.
- 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.
- Oberhammer, F., Wilson, J. W., Dive, C., Morris, I. D., Hickman, J. A., Wakeling, A. E., Walker, P. R., and Sikorska. (1993)M. Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO J.* 12: 3679-3684,
- Ojewole, J. A. O. and Adesina, S. K. (1983) Mechanism of the hypotensive effect of scopoletin isolated from the fruit of *Tetrapleura tetraptera*. *Planta Med.* 49 (1): 46-50.
- Pacifico, S., D'Abrosca, B., Pascarella, M. T., Letizia, M., Uzzo, P., Piscopo, V., Fiorentino, A. (2009) Antioxidant efficacy of iridoid and phenylethanoid glycosides from the medicinal plant *Teucrium chamaedris* in cell-free systems. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17 (17): 6173-6179.
- 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. and Kinghorn, D. A. (2007) Review of the ethnobotany, chemistry, biological activity and safety of the botanical dietary supplement *Morinda citrifolia* (noni). *J. Pharm. Pharmacol.* 59: 1587-1609.
- Pietta, P.-G. (2000) Flavonoids as Antioxidants. *J. Nat. Prod.* 63: 1035-1042.
- Potterat, O. and Hamburger, M. (2007) *Morinda citrifolia* (Noni) Fruit-Phytochemistry, Pharmacology, Safety. *Planta Med.* 73: 191-199.
- Potterat, O., Felten, R.V., Dalsgaard, P. W. and Hamburger, T. (2007) Identification of TLC Markers and Quantification by HPLC-MS of Various Constituents in Noni Fruit Powder and Commercial Noni-Derived Products. *J. Agric. Food Chem.* 55, 7489-7494.
- Ram J. (2002) Noni processing and quality control: protecting the image of Hawaiian. Proc.2002 Hawaii noni conf. p. 25-28.
- Rastrelli, L., Caceres, A., Morales, C., Simone, F. D. and Aquino, R. (1998) Iridoids from *Lippia graveolens*. *Phytochemistry* 49(6), 1829-1832.
- Recamales, A. F., Sayago, A. Gonzalez-Miret, M. L. and 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.
- Ross, I. A. (2001) Medical Plants of the World. Chemical Constituents, Traditional and Modern Medical Uses. Humana Press. New Jersey.
- Saludes, J. P., Garson, M. J., Franzblau, S. G. and Aguinaldo, A. M. (2002) Antitubercular constituents from the hexane fraction of *Morinda citrifolia* L. (Rubiaceae). *Phytotherapeutic Research* 16: 683–685.
- Samoylenko, V., Zhao, J., Dunbar, D. C., Khan, I. A., Rushing, J. W. and Muhammad, I. (2006) New constituents from noni (*Morinda citrifolia*) fruit juice. *J. Agric. Food Chem.* 54: 6398-6402.

- Shahidi, F. and Naczki, 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.
- Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K. and Nakamura, T. (1992) Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *J. Agric. Food Chem.* 40: 945-948.
- Shovic, A. C. and Whistler, W. A. (2001). Food sources of provitamin A and vitamin C in the American Pacific. *Trop. Sci.* 41, 199-202.
- Southgate, P-A. M., & Woortman A-J. J. (2001). Substitution patterns in methylated starch as studied by enzymic degradation. *Carbohydrate Research* 258:207-221.
- Thararat, N., Pleumchitt R., Wandee G., Seong, H. L., Darunee L. and Seung J. B., (2011) Damnacanthol, a noni component, exhibits antitumorigenic activity in human colorectal cancer cells. *Journal of Nutritional Biochemistry* 10: 120-128.
- Trowell, H., Southgate, DA., Wolever, TM., Leeds, AR., Gassull, MA and Jenkins, DJ. (1976). Letter :Dietary fiber redefined.
- Tundis, R., Loizzo, M. R., Menichini, F., Statti, G. A. and Menichini, F. (2008) Biological and Pharmacological Activities of Iridoids: Recent Developments. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 8: 399-420.
- Versari, A., Boulton, R. B. and Parpinello, G. P. (2008). A comparison of analytical methods for measuring the color components of red wines. *Food Chem.* 106: 397-402.
- Wang, J. and Lenardo, M. J. (2000) Roles of caspases in apoptosis, development, and cytokine maturation revealed by homozygous gene deficiencies. *J Cell Sci.* 113 (Pt 5): 753-757.
- Wang, M. Y. and Su, C. (2001) Cancer preventive effect of *Morinda citrifolia* (Noni). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 952: 161-168.
- Wang, M. Y., Peng, L., Lutfiyya, M. N., Henley, E., Eidenbacher-Hoper, V., and Anderson G. (2009) *Morinda citrifolia* (noni) reduces cancer risk in current smokers

by decreasing aromatic DNA adducts. *Nutrition and Cancer* 61: 634-639.

Wang, M. Y., West, B. J., Jensen, C. J., Nowicki, D., Chen, S., Palu, A.K. and Anderson, G. (2002) *Morinda citrifolia* (Noni): a literature review and recent advances in Noni research. *Acta. Pharmacol. Sin.* 23 (12): 1127-1141.

West, B. J. (2006). Hepatotoxicity from interferon-beta, not noni juice. *Digestion*, 74: 47-48.

West, B. J., Deng S. and Jensen, C. J. (2006) Nutrient and phytochemical analyses of processed noni puree. *Food Research International* 44(7): 2295-2301.

Williams, M. T. and Hord, N. G. (2005) The role of dietary factor in cancer prevention: beyond fruits and vegetable. *Nutrition in clinical practice. official publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition* 20: 451-459.

Wood and Gorbach. (2001) In "CRC Handbook of Dietary Fiber in Human Nutrition", *Spiller* 32: 257

Xing, J., Xu, W.-R., Liu, P., Liu, B.-N., Fu, H.-X., Liu, W., Wang, Y.-L. and Tang, L.-D. (2009) Virtual evaluation on anti-inflammatory activities of iridoids from cape jasmine fruit and adhesive rehmannia root. *Zhongcaoyao* 40 (6): 930-935.

Yamabe, N., Noh, J. S., Park, C. H., Kang, K. S., Shibahara, N., Tanaka, T., Yokozawa, T. (2010) Evaluation of loganin, iridoid glycoside from Corni Fructus, on hepatic and renal glucolipototoxicity and inflammation in type 2 diabetic db/db mice. *European Journal of Pharmacology* 648 (1-3) : 179-187.

Yamaguchi, S., Ohnishi, J., Sogawa, M., Maru, I., Ohta, Y. and Tsukada, Y. (2002) Inhibition of Angiotensin I converting enzyme by noni (*Morinda citrifolia*) juice. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* 49 (9): 624-627.

Yang, J., Paulino, R., Janke-Stedronsky, S. and Abawi, F. (2007) Free-radical-scavenging activity and total phenols of noni (*Morinda citrifolia* L.) juice and powder in processing and storage. *Food Chem.* 102: 302-308.

Youngken, H. W. (1958) A study of the root of *Morinda citrifolia* Linn I. J. Am.

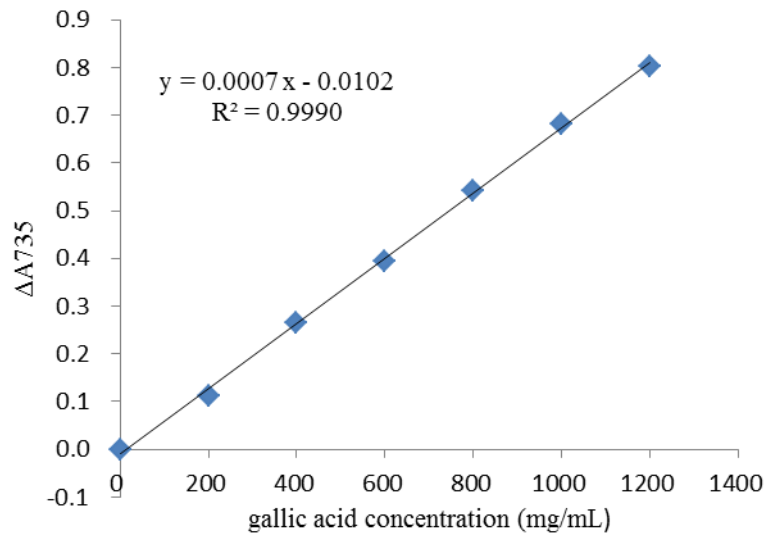
Pharm. Assoc. 47: 162-165.

Younos, C., Rolland, A., Fleurentin, J., Lanhers, M.C., Misslin, R. and Mortier, F. (1990) Analgesic and behavioral effects of *Morinda citrifolia*. *Planta Medicine* 56: 430-434.

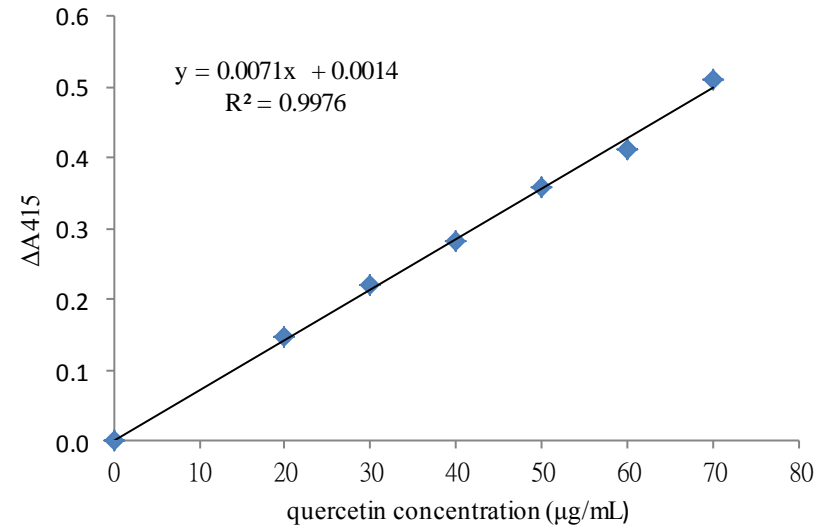
Yu, H., Li, S., Huang, M. T. and Ho, C. T. (2008) Anti-inflammatory constituents in Noni (*Morinda citrifolia*) fruits. *Dietary Supplements* 12 : 179-190.

Zin, Z. M., Abdul-Hamid, A., Osman, A. and Saari N. (2006) Antioxidative activity of chromatographic fractions obtained from root, fruit and leaf of Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) *Food Chem.* 94: 169-178.

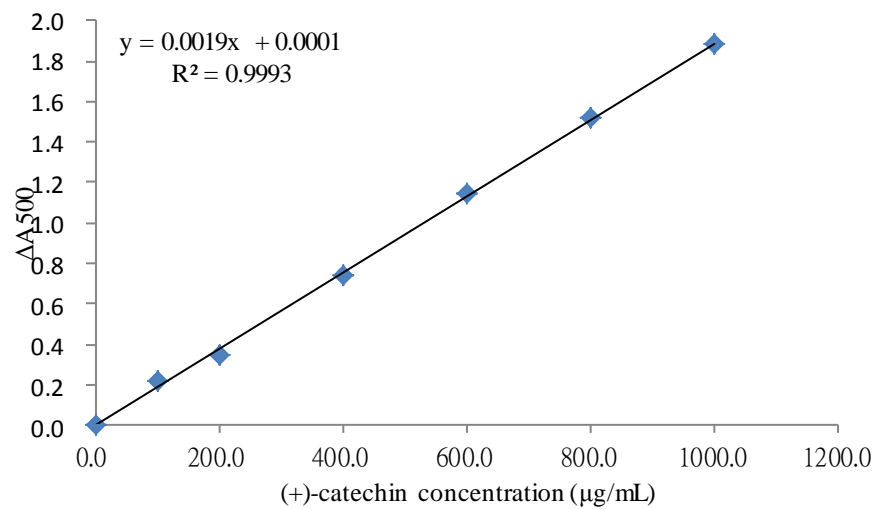
捌、附錄



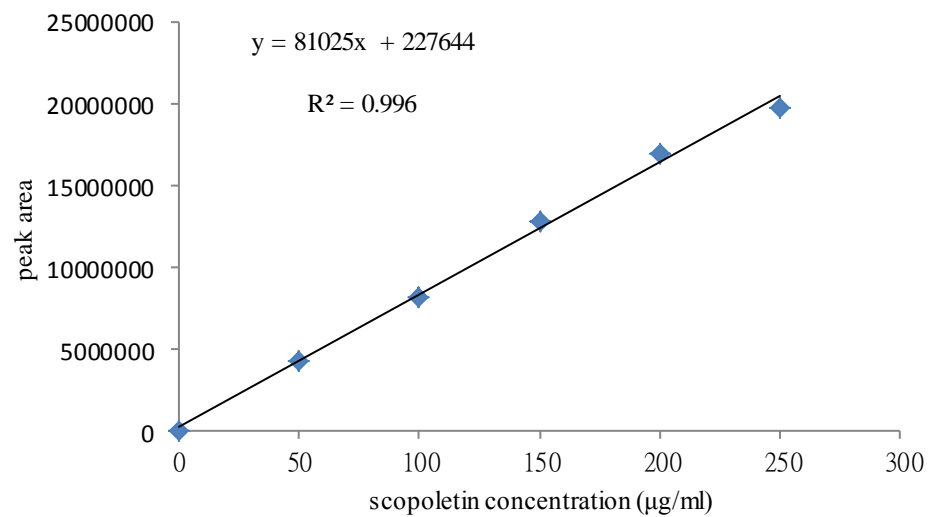
附錄一、沒食子酸之標準曲線圖。
Appendix 1. Standard curve of gallic acid.



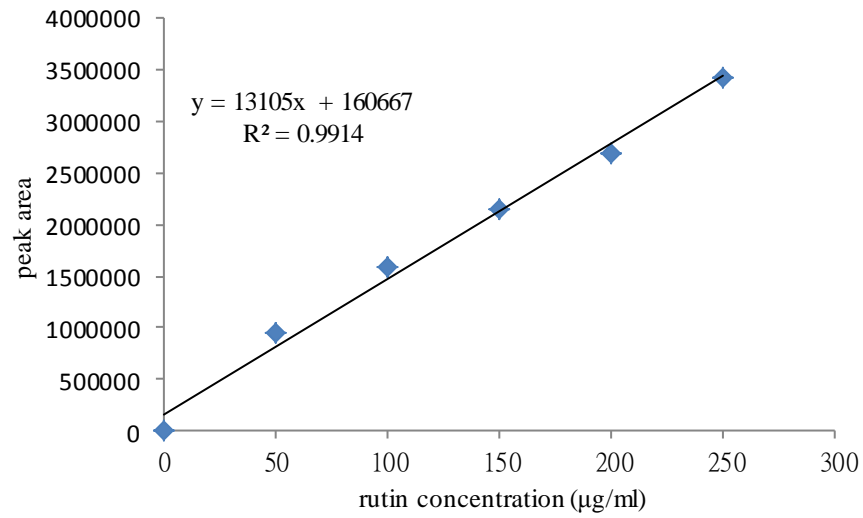
附錄二、槲皮酮之標準曲線圖。
Appendix 2. Standard curve of quercetin.



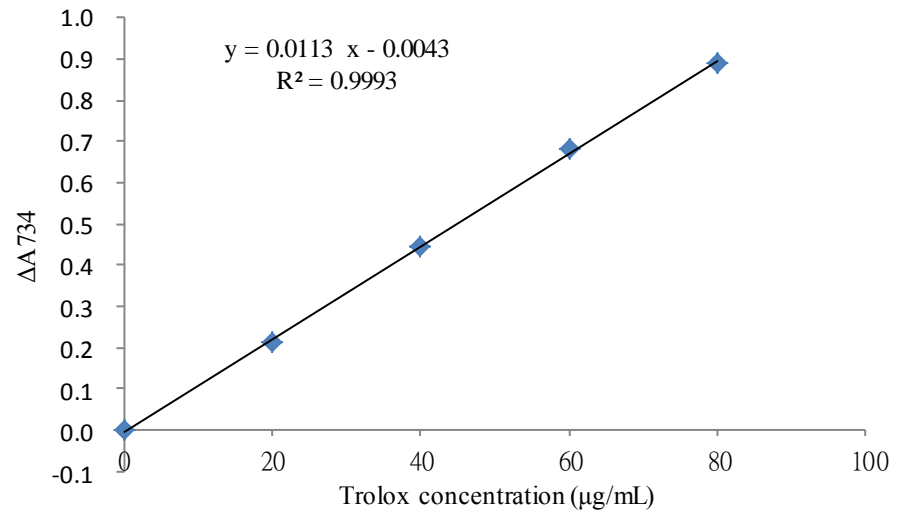
附錄三、兒茶素之標準曲線圖。
Appendix 9. Standard curve of (+)-catechin.



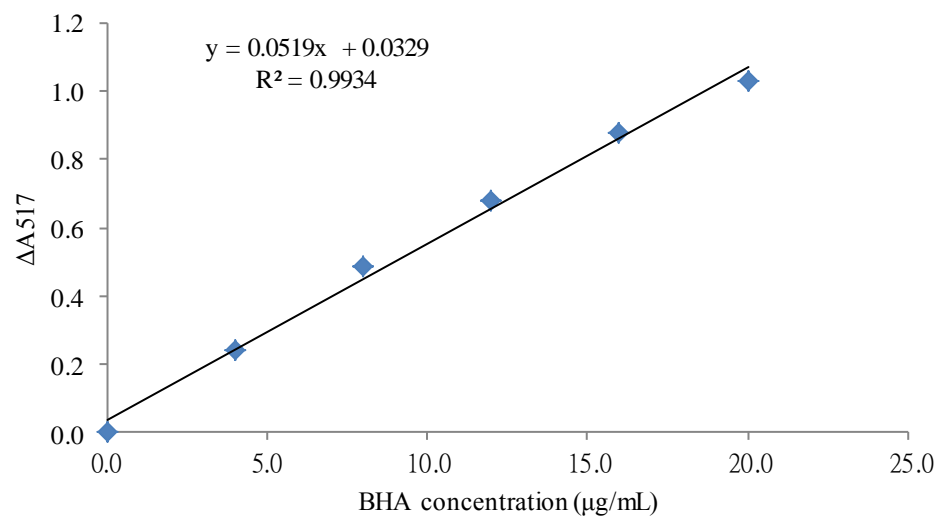
附錄四、Scopoletin之標準曲線圖。
Appendix 4. Standard curve of scopoletin.



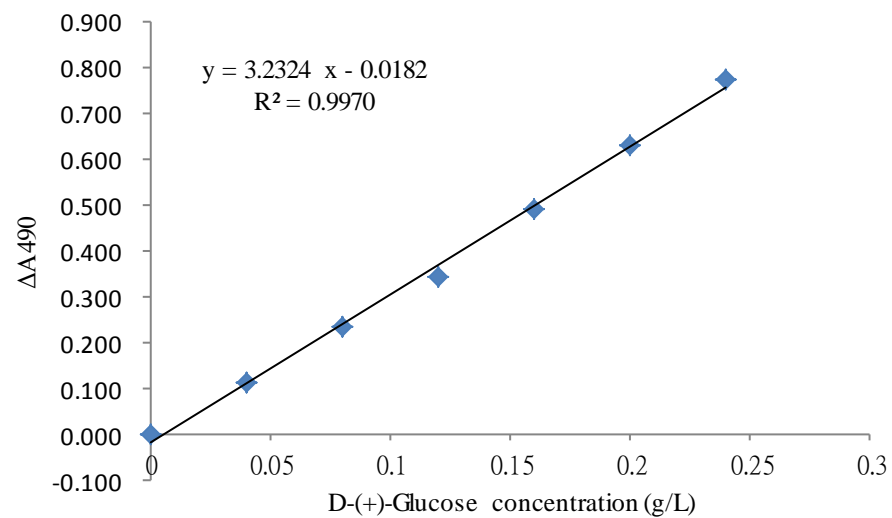
附錄五、Rutin之標準曲線圖。
Appendix 5. Standard curve of rutin.



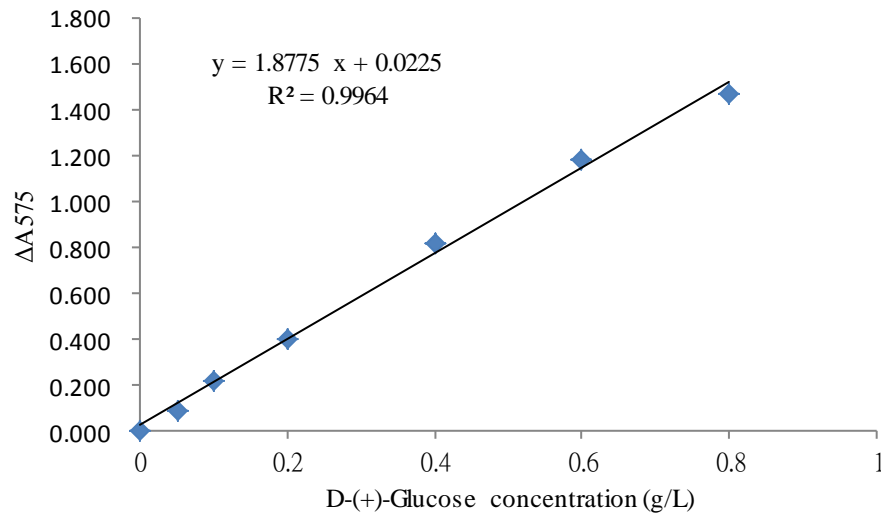
附錄六、Trolox之標準曲線圖。
Appendix 6. Standard curve of trolox.



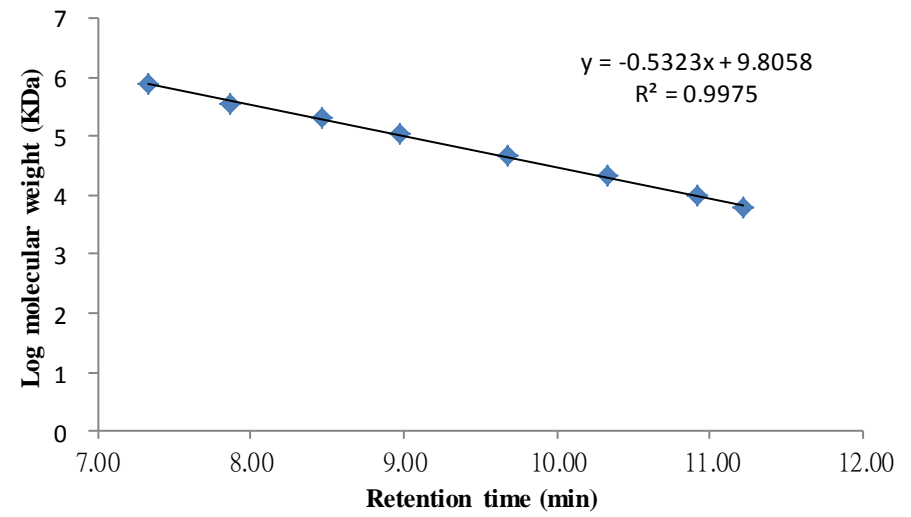
附錄七、BHA之標準曲線圖。
Appendix 7. Standard curve of BHA.



附錄八、總糖之葡萄糖標準曲線圖。
Appendix 8. Standard curve of D-(+)-Glucose



附錄九、還原醣之葡萄糖標準曲線圖。
Appendix 9. Standard curve of D-(+)-Glucose.



附錄十、多醣分子量之標準曲線圖。
Appendix 9. Standard curve of pullulan.

附錄十一、諾麗果汁於不同發酵時間色澤

Appendix 11. The color values of noni juice at different fermentation time

Fermentation time (weeks)	L*	a*	b*
0	77.41 ± 0.34 ^a	8.09 ± 0.04 ^c	49.19 ± 0.13 ^c
4	54.75 ± 0.13 ^b	26.48 ± 0.16 ^b	64.36 ± 0.32 ^b
8	45.17 ± 4.06 ^c	28.76 ± 0.62 ^a	77.86 ± 2.50 ^a

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).

附錄十二、諾麗果汁於不同發酵時間所測得之功能性成份含量

Appendix 12. The functional compounds contents of noni juice at different fermentation time

Fermentation time (weeks)	Total phenolic (mg/mL)	Flavonoid ($\mu\text{g/mL}$)	Condensed tannins ($\mu\text{g/mL}$)	Scopoletin ($\mu\text{g/mL}$)	Scopoletin derivate ($\mu\text{g/mL}$)	Rutin ($\mu\text{g/mL}$)
0	1847.56 \pm 50.75 ^a	45.47 \pm 0.05 ^a	179.83 \pm 0.35 ^c	151.84 \pm 0.92 ^c	40.96 \pm 0.26 ^a	170.24 \pm 2.01 ^a
4	1626.60 \pm 12.06 ^b	32.71 \pm 0.12 ^b	200.00 \pm 29.14 ^b	198.41 \pm 6.79 ^b	39.96 \pm 1.73 ^a	129.43 \pm 2.93 ^b
8	1289.78 \pm 24.20 ^c	17.80 \pm 0.25 ^c	212.33 \pm 3.67 ^a	226.86 \pm 9.78 ^a	38.69 \pm 1.03 ^a	101.92 \pm 5.67 ^c

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

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

附錄十三、諾麗果汁於不同發酵時間所測得之抗氧化能力

Appendix 13. The antioxidant capacity of noni juice at different fermentation time

Fermentation time (weeks)	ABTS • ⁺ scavenging activity	Equal to Trolox conc.	DPPH scavenging activity	Equal to BHA conc.
	(%)	(µg/mL)	(%)	(µg/mL)
	1/50*	1/50*	1/50*	1/50*
0	26.28 ± 1.14 ^c	23.27 ± 0.62 ^c	42.85 ± 2.02 ^b	9.24 ± 0.47 ^b
4	36.57 ± 0.71 ^a	31.51 ± 0.12 ^a	61.42 ± 0.48 ^a	13.63 ± 0.10 ^a
8	34.05 ± 1.02 ^b	30.36 ± 0.49 ^b	42.91 ± 0.62 ^b	9.49 ± 0.13 ^b

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

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

1/50*: The sample diluted for fifty fold.

附錄十四、諾麗果汁乙醇萃取沉澱物於不同發酵時間所測得之總糖、還原糖與分子量

Appendix 14. The total carbohydrate, reducing sugar, and molucular weight of noni juice ethanol extracts at different fermentation time

Fermentation time (weeks)	Total carbohydrate (g/L)	Reducing sugar (g/L)	Molucular weight (KDa)
0	2.52 ± 0.04 ^a	0.37 ± 0.03 ^c	468.61 ± 0.04 ^b
4	2.34 ± 0.01 ^b	0.55 ± 0.06 ^a	448.47 ± 0.01 ^b
8	2.31 ± 0.01 ^c	0.41 ± 0.07 ^b	103.11 ± 0.01 ^c 2739.30 ± 0.03 ^a

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).

附錄十五、不同發酵時間諾麗果汁之總結論

Appendix 15. The summary of the noni juice at different fermentation time

week	0	4	8
Yield			*
Total phenolic compounds	*		
Flavonoids compounds	*		
Condensed tannin compounds			*
Scopoletin derivative	*		
Scopoletin			*
Rutin	*		
Trolox equivalent antioxidant activity		*	
DPPH scavenging activity		*	
Total carbohydrate	*		
Reducing sugar		*	

* Mean the best in the same row