

## 肆、結果與討論

### 一、新鮮諾麗果汁之加工

表三為添加 pectinase G 對諾麗果汁的果汁產量、scopoletin 含量與顏色影響之結果。沒有添加酵素時，諾麗果汁的產率及果汁中 scopoletin 濃度均少於添加酵素的處理組。由於添加 0.6 %與 0.8 %酵素之果汁產率統計上沒有差異，故選擇 0.6 %酵素添加量探討作用不同天數對果汁產率及固形物重之變化。增加果膠酵素含量，scopoletin 含量隨之增加。添加 pectinase G 對諾麗果汁顏色影響。L\*、a\*、b\* 顏色模式為國際照明委員會(Commission internationale de l'Eclairage, CIE)指定的顏色標準之一。L\*表示明亮度，值從 0 到 100 隨值增加明亮度增加。a\*為紅色度，正值為紅色、負值為綠色。b\*是黃色度值，正值是黃色、負值是藍色。提高酵素添加量使 L\*值提高，添加量 0.8 %達 52.09。添加酵素會增加黃色度，添加 0.6 %酵素時達最大值 41.86；對紅色度則沒有影響。

文獻指出果膠酵素能夠增加果汁的產率、改善果汁混濁外觀以及改善果汁的顏色(Alkota et al., 1997; Gao et al., 1997; Liew Abdullah et al., 2007; Versari et al., 1997)。本實驗運用果膠酵素製造新鮮諾麗果汁，能增加果汁產率、澄清果汁以及使果汁呈現金黃色，與生產一般果汁有相似之結果。

商業化果膠酵素除了具有水解果膠能力之外，尚具有  $\beta$ -glycosidase 之能力(Versari et al., 1997)。植物中的 scopoletin 存在之形式常帶有糖基(Chong et al., 2002)，增加果膠酵素添加量生產諾麗果汁，scopoletin 含量會增加，推測為商業果膠酵素中含有水解配糖鍵之能力。

生產不同果汁所需之最適果膠酵素添加量也不盡相同，除了水果果膠含量不同，選用之商業酵素之性質也有所不同。依據廠商之建議用量與科學文獻之研究結果(Liew Abdullah et al., 2007; Versari et al., 1997)，果膠酵素添加量約為千分之一，稍低於本實驗之添加量。

表四為無添加或添加 0.4 % pectinase G 作用不同時間對諾麗果汁產率及果汁固形物重之影響。添加酵素作用不同時間均能提高果汁產率，每 100 g 果泥約能產出 45 mL 果汁。有添加酵素生產的果汁有較高的果汁固形物重，無論添加酵素與否果汁固形物重均隨著熟成時間增加而減少。

添加果膠酵素使果汁果膠含量降低與黏度下降(Alkorta et al., 1998; Liew Abdullah et al., 2007)。諾麗果汁乾重隨時間減少的原因推測為果泥或者添加的酵素作用而產生小分子(小片段果膠或小分子的酚類)，小分子隨時間逐漸聚合並於離心或過濾時被移走。

纖維分解酵素亦為生產果汁用的酵素之一，添加 cellulase AP3 對諾麗果汁產率的影響呈現於表五。對於增加果汁產率並無明顯助益，故不討論其抗氧化性質、scopoletin 含量與顏色。

表三、不同濃度 pectinase G 作用四天，對果汁產率、scopoletin 含量及顏色之影響

Table 3. Effect of pectinase G on the juice production and scopoletin content.

Enzyme content (%)	mL juice/100 g puree	scopoletin ( $\mu\text{g/mL}$ juice)	L*	a*	b*
0	39.97 $\pm$ 1.24 <sup>d</sup>	73.33 $\pm$ 0.84 <sup>e</sup>	21.06 $\pm$ 0.87 <sup>d</sup>	9.94 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	25.41 $\pm$ 0.69 <sup>d</sup>
0.2	41.88 $\pm$ 0.63 <sup>c</sup>	76.06 $\pm$ 0.58 <sup>d</sup>	37.82 $\pm$ 0.16 <sup>c</sup>	9.10 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>	36.39 $\pm$ 0.15 <sup>c</sup>
0.4	43.38 $\pm$ 1.21 <sup>bc</sup>	76.70 $\pm$ 0.33 <sup>c</sup>	37.53 $\pm$ 0.88 <sup>c</sup>	9.99 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	36.08 $\pm$ 0.81 <sup>c</sup>
0.6	45.79 $\pm$ 0.49 <sup>a</sup>	78.27 $\pm$ 0.88 <sup>b</sup>	46.69 $\pm$ 1.08 <sup>b</sup>	9.33 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>	41.86 $\pm$ 0.57 <sup>a</sup>
0.8	44.69 $\pm$ 1.17 <sup>ab</sup>	79.68 $\pm$ 0.90 <sup>a</sup>	52.09 $\pm$ 1.66 <sup>a</sup>	10.04 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	39.08 $\pm$ 0.26 <sup>b</sup>

L\* represents the lightness of the color (0 yields black and 100 indicates white).

a\* represents magenta and green (positive values indicate magenta and negative values indicate green while).

b\* represents yellow and blue (positive values indicate yellow and negative values indicate blue).

Values in each line with different letters are significantly different at  $p < 0.05$  analyzed by Duncan's multiple range test.

表四、無添加或添加 0.6 % pectinase G 作用不同時間對諾麗果汁產率及果汁固形物重之影響

Table 4. Effect of pectinase G on the juice production and its solid content.

Enzyme content	0 %	0.6 %	0 %, S.C. (g/100 mL) <sup>A</sup>	0.6 %, S.C. (g/100 mL)
1 day	40.4±0.9 <sup>c</sup>	43.36±1.6 <sup>ab</sup>	8.14±0.05 <sup>c</sup>	9.34±0.01 <sup>a</sup>
2 days	40.6±0.9 <sup>c</sup>	44.3±1.4 <sup>a</sup>	7.12±0.10 <sup>f</sup>	8.46±0.13 <sup>b</sup>
3 days	40.2±1.8 <sup>c</sup>	45.9±1.9 <sup>a</sup>	6.61±0.07 <sup>g</sup>	7.55±0.06 <sup>d</sup>
4 days	41.1±1.1 <sup>c</sup>	44.0±1.0 <sup>ab</sup>	6.53±0.04 <sup>g</sup>	7.67±0.09 <sup>d</sup>
5 days	41.9±2.1 <sup>bc</sup>	44.2±0.5 <sup>ab</sup>	6.39±0.06 <sup>h</sup>	7.34±0.05 <sup>e</sup>

<sup>A</sup>Means juice solid content (S.C.) presented by grams of dry matter in 100 mL juice. Values in each line with different letters are significantly different at  $p < 0.05$  analyzed by Duncan's multiple range test.

表五、不同濃度 cellulase AP3 作用四天，對於諾麗果汁產率之影響

Table 5. Effect of cellulase AP3 on the juice production.

Enzyme content (%)	mL juice/100 g puree
0	40.50±0.14 <sup>ab</sup>
0.02	41.51±1.14 <sup>ab</sup>
0.04	42.24±1.80 <sup>a</sup>
0.06	40.67±0.90 <sup>ab</sup>
0.08	39.93±0.50 <sup>b</sup>

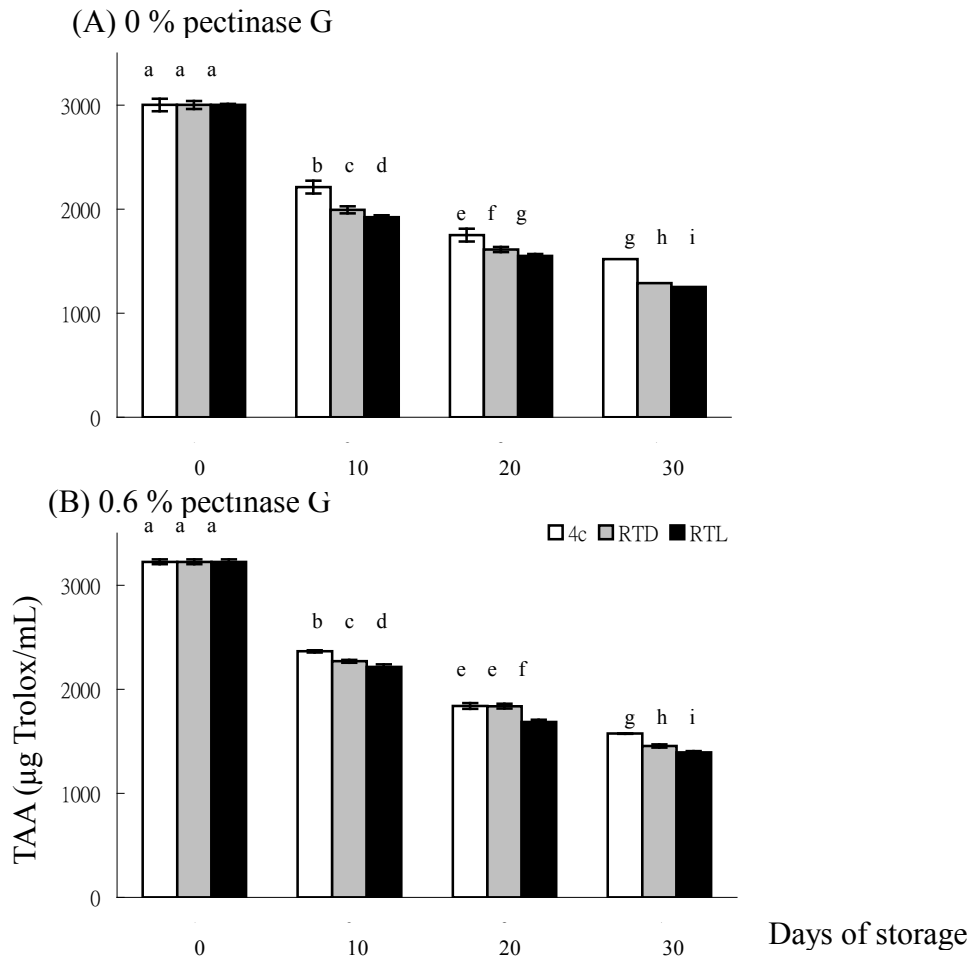
Values in each line with different letters are significantly different at  $p < 0.05$  analyzed by Duncan's multiple range test.

## 二、新鮮諾麗果汁之儲存試驗

圖十是果汁經不同儲藏條件(4 °C、室溫避光與室溫透光)儲存，測量其總抗氧化能力(TEAC)的變化。無論有無添加酵素起初之抗氧化能力差異不大，儲存至第十天各實驗組總抗氧化能力均大幅下降。存放於 4 °C 能保留較高的抗氧化能力，室溫儲存下避光與否對抗氧化力影響不大。即使將果汁冰藏仍無法留存其抗氧化能力，故從保健的角度看來，飲用越新鮮的果汁是較佳的選擇。退而求其次以低溫冷藏及避光儲存，可使其抗氧化能力不會如常溫下快速流失。

圖十一、十二及十三分別為儲存後 scopoletin、總酚與縮合單寧變化。諾麗果汁經儲藏後 scopoletin 含量有上升之趨勢。酚類化合物為提供抗氧化能力物質之一，其含量如同總抗氧化能力隨儲存時間增加而減少。縮合單寧之含量均隨儲存天數增加而增加，約在第二十天與三十天達最大量。

植物中的苯丙醇類化合物(phenylpropanoids)多以帶有糖基為主，因為不帶糖基較容易被氧化。例如煙草細胞中的 scopoletin 常接有一葡萄糖，即為 scopolin(Chong et al., 2002)。經儲藏之諾麗果汁可能是帶有糖基的 scopoletin 分子分解造成 scopoletin 含量上升。又 scopoletin 可能與添加果膠酵素生產的果汁中小分子果膠或是單元酚類化合物結合，使得 scopoletin 含量降低。諾麗果汁富含酚類化合物與單寧類化合物，與紅酒之含量相近(分別約含 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  及 350  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，Cliff et al., 2007)。葡萄酒儲藏時酚類化合物會因為溫度及光線造成分解，單元酚亦會聚合或氧化而減低總酚含量(Recamales et al., 2006)。諾麗果汁中的酚類化合物如同紅酒中減少，單寧類化合物增加。紅酒儲存過程中的單寧類化合物與紅色度值有正相關(Recamales et al., 2006)，故諾麗果汁儲藏期間顏色可能有所改變。

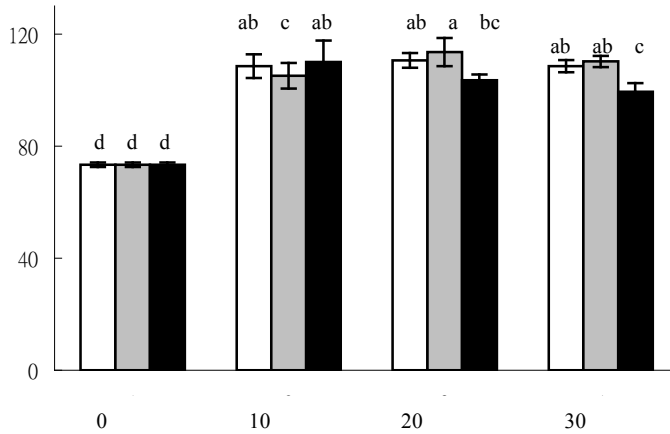


圖十、0、0.6 % pectinase G 生產之諾麗果汁經儲存後 TEAC 之變化。

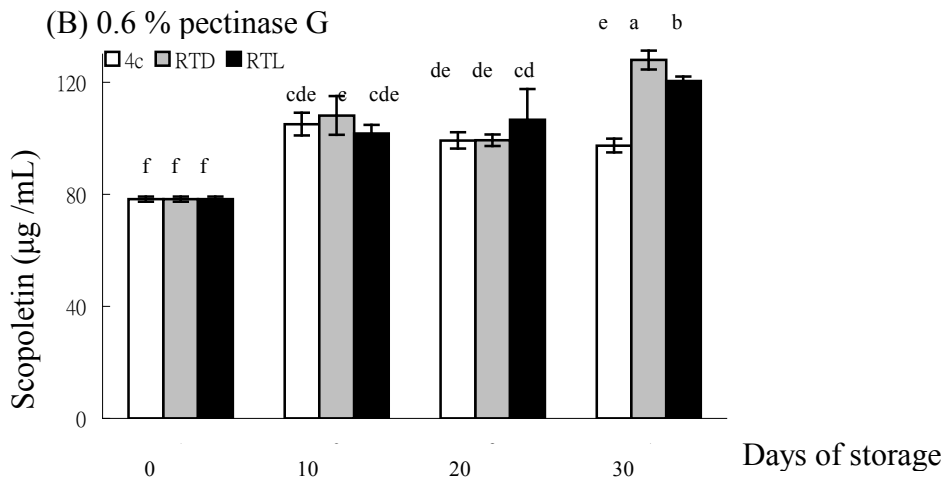
A 為 0 %，B 為 0.6 % 之酵素添加量。4c 為 4 °C 儲存、RTD 為室溫避光儲存、RTL 為室溫透光儲存。

Fig. 10. Total antioxidant activity (Trolox equivalent  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) changes of 0 or 0.6 % pectinase G noni juice storage at various conditions. Store at 4 °C (4c), room temperature dark (RTD) and room temperature light (RTL). Values in each line with different letters are significantly different at  $p < 0.05$  analyzed by Duncan's multiple range test.

(A) 0 % pectinase G



(B) 0.6 % pectinase G

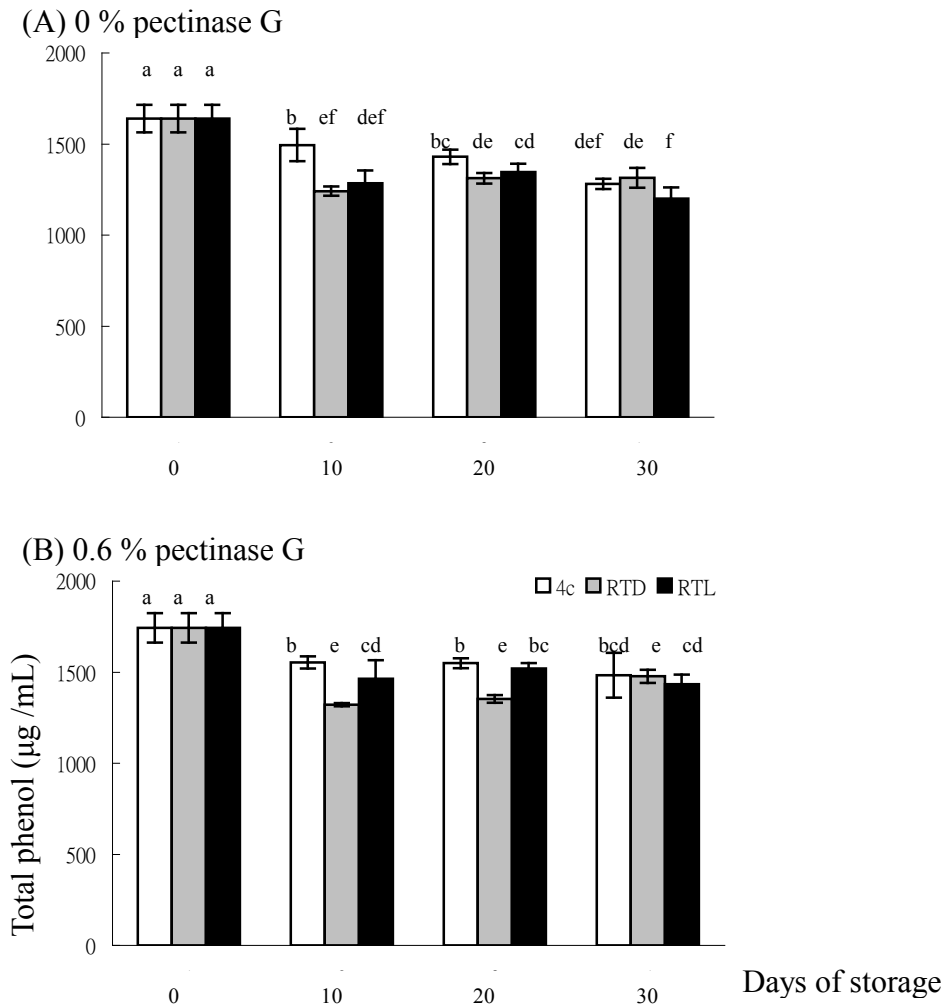


圖十一、0、0.6 % pectinase G 生產之諾麗果汁經儲存後 scopoletin 之變化。A 為 0 %，B 為 0.6 % 之酵素添加量。4c 為 4 °C 冰箱儲存、RTD 為室溫避光儲存、RTL 為室溫透光儲存。

Fig. 11. Scopoletin content of 0 or 0.6 % pectinase G noni juice storage at various conditions. Store at 4 °C (4c), room temperature dark (RTD) and room temperature light (RTL).

Values in each line with different letters are significantly different at  $p < 0.05$  analyzed by Duncan's multiple range test.



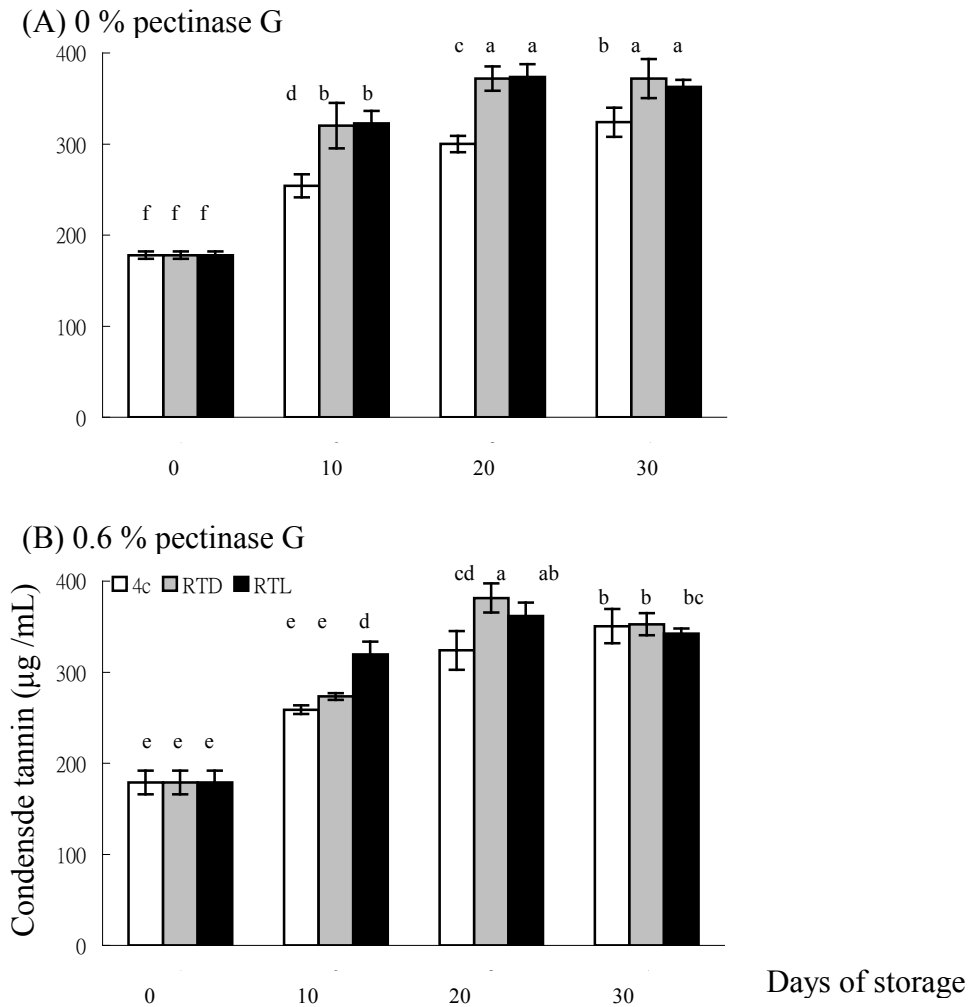


圖十二、0、0.6 % pectinase G 生產之諾麗果汁經儲存後總酚之變化。

A 為 0 %，B 為 0.6 %之酵素添加量。4c 為 4 °C 冰箱儲存、RTD 為室溫避光儲存、RTL 為室溫透光儲存。

Fig. 12. Total phenol content of 0 or 0.6 % pectinase G noni juice storage at various conditions. Store at 4 °C (4c), room temperature dark (RTD) and room temperature light (RTL).

Values in each line with different letters are significantly different at  $p < 0.05$  analyzed by Duncan's multiple range test.



圖十三、0、0.6 % pectinase G 生產之諾麗果汁經儲存後縮合單寧之變化。A 為 0 %，B 為 0.6 %之酵素添加量。4c 為 4 °C 冰箱儲存、RTD 為室溫避光儲存、RTL 為室溫透光儲存。

Fig. 13. Condensed tannin content of 0 or 0.6 % pectinase G noni juice storage at various conditions. Store at 4 °C (4c), room temperature dark (RTD) and room temperature light (RTL).

Values in each line with different letters are significantly different at  $p < 0.05$  analyzed by Duncan's multiple range test.

表六、表七及表八是添加 0 % 與 0.6 % pectinase 酵素生產果汁，經 4 °C 冰箱、室溫避光或室溫透光儲存後其顏色之變化。添加 pectinase G 果汁的起始明亮度較無添加高，表示 pectinase G 具有澄清諾麗果汁的效果且使外觀較明亮。儲存後無添加組可能是小分子果膠聚集，明亮度逐漸上升與添加組相似。酵素添加組可能因為沒有加熱處理，造成褐變反應使存放 30 天後明亮度下降與無添加組相似。無添加酵素組室溫避光及室溫透光儲藏之  $a^*$  值，與果汁中單寧含量增加有正相關 ( $r = 0.99, n = 4; r = 0.99, n = 4$ )。添加酵素組 4 °C、室溫避光與室溫透光儲藏之  $a^*$  值，與果汁中單寧含量增加有正相關 ( $r = 0.95, n = 4; r = 0.76, n = 4; r = 0.88, n = 4$ )。最初添加酵素組之黃色度較無添加組高，經低溫儲存後無添加組  $b^*$  值漸漸增加，最後接近添加組之值。故綜合肉眼觀察與  $L^*$ 、 $a^*$  及  $b^*$  值，最初添加酵素之果汁為金黃色的澄清液體，無添加酵素之果汁為混濁偏洋紅的外觀。經存放三十天後兩者皆澄清，添加酵素組較無添加組有更深的酒紅色，外觀近似一般市售諾麗果汁。

紅酒儲存過程中的單寧類化合物與紅色度值有正相關(Recamales et al., 2006)，新鮮諾麗果汁經儲藏後縮合單寧含量與紅色度值之相關係數為 0.79 到 0.99，此結果顯示諾麗果汁與紅酒之儲存變化相似。

無添加 pectinase G 可生產諾麗果汁 40 mL / 100 g 果泥，成本為

0.3125 元新台幣／毫升果汁。添加 0.6 % pectinase G 作用三天為 45 mL  
 ／100 g 果泥，又 Pectinase G 價格為 1,300 元新台幣／kg。故添加 0.6  
 % 酵素生產之果汁成本增為 0.321 元新台幣／毫升果汁，較無添加酵  
 素之成本高。

表六、0、0.6 % pectinase G 生產之諾麗果汁經 4 °C 儲存顏色變化

Table 6. Color changing of 0 or 0.6 % pectinase G noni juice storage at 4 °C refrigerator.

Days of storage	L*		a*		b*	
	0 %	0.6 %	0 %	0.6 %	0 %	0.6 %
0	21.06±0.87 <sup>f</sup>	46.69±1.08 <sup>c</sup>	9.94±0.13 <sup>e</sup>	9.33±0.15 <sup>f</sup>	25.41±0.69 <sup>h</sup>	41.86±0.57 <sup>e</sup>
10	30.60±0.70 <sup>e</sup>	61.38±1.31 <sup>a</sup>	10.09±0.04 <sup>de</sup>	11.19±0.18 <sup>c</sup>	33.22±0.55 <sup>g</sup>	50.41±0.47 <sup>b</sup>
20	31.48±0.72 <sup>e</sup>	55.12±0.46 <sup>b</sup>	10.68±0.50 <sup>cd</sup>	15.37±0.21 <sup>b</sup>	35.83±0.22 <sup>f</sup>	51.63±0.20 <sup>a</sup>
30	43.53±1.03 <sup>d</sup>	43.81±0.71 <sup>d</sup>	8.01±0.82 <sup>g</sup>	18.75±0.28 <sup>a</sup>	44.12±0.15 <sup>d</sup>	47.27±0.41 <sup>c</sup>

The data are mean values of three determinants.

Values in each line with different letters are significantly different at p<0.05 analyzed by Duncan's multiple range test.

表七、0、0.6 % pectinase G 生產之諾麗果汁經室溫避光(RTD)儲存顏色變化

Table 7. Color changing of 0 or 0.6 % pectinase G noni juice storage at room temperature dark (RTD).

Days of storage	L*		a*		b*	
	0 %	0.6 %	0 %	0.6 %	0 %	0.6 %
0	21.06±0.87 <sup>e</sup>	46.69±1.08 <sup>b</sup>	9.94±0.13 <sup>d</sup>	9.33±0.15 <sup>e</sup>	25.41±0.69 <sup>e</sup>	41.86±0.57 <sup>d</sup>
10	53.43±0.22 <sup>a</sup>	14.73±0.53 <sup>f</sup>	21.95±0.05 <sup>b</sup>	21.84±0.46 <sup>b</sup>	69.36±0.13 <sup>a</sup>	19.72±0.90 <sup>f</sup>
20	37.93±0.91 <sup>c</sup>	14.72±0.29 <sup>f</sup>	29.26±0.15 <sup>a</sup>	22.29±0.44 <sup>b</sup>	56.72±0.84 <sup>b</sup>	19.69±0.40 <sup>f</sup>
30	32.28±1.14 <sup>d</sup>	10.26±0.61 <sup>g</sup>	28.86±0.34 <sup>a</sup>	17.26±0.49 <sup>c</sup>	48.12±1.66 <sup>c</sup>	11.90±0.13 <sup>g</sup>

The data are mean values of three determinants.

Values in each line with different letters are significantly different at  $p < 0.05$  analyzed by Duncan's multiple range test.

表八、0、0.6 % pectinase G 生產之諾麗果汁經室溫透光(RTL)儲存顏色變化

Table 8. Color changing of 0 or 0.6 % pectinase G noni juice storage at room temperature light (RTL).

Days of storage	L*		a*		b*	
	0 %	0.6 %	0 %	0.6 %	0 %	0.6 %
0	21.06±0.87 <sup>e</sup>	46.69±1.08 <sup>b</sup>	9.94±0.13 <sup>g</sup>	9.33±0.15 <sup>h</sup>	25.41±0.69 <sup>e</sup>	41.86±0.57 <sup>d</sup>
10	50.95±0.79 <sup>a</sup>	13.02±0.31 <sup>f</sup>	22.15±0.09 <sup>c</sup>	20.04±0.46 <sup>d</sup>	67.53±0.66 <sup>a</sup>	16.85±0.51 <sup>g</sup>
20	34.10±0.85 <sup>d</sup>	13.75±0.51 <sup>f</sup>	25.98±0.37 <sup>b</sup>	20.91±0.72 <sup>e</sup>	50.80±0.97 <sup>c</sup>	18.18±0.36 <sup>f</sup>
30	36.69±0.35 <sup>c</sup>	8.59±0.29 <sup>g</sup>	27.29±0.40 <sup>a</sup>	15.84±0.51 <sup>f</sup>	54.39±0.49 <sup>b</sup>	9.00±0.39 <sup>h</sup>

The data are mean values of three determinants.

Values in each line with different letters are significantly different at  $p < 0.05$  analyzed by Duncan's multiple range test.

### 三、熟成諾麗果汁抑制癌細胞相關試驗

經處理後之 noni-juice 之固形物重為 63 mg/mL，酒精萃取後之 EtOH-ppt 固形物重為 9.72 mg/mL、EtOH-sol 固形物重為 53.1 mg/mL。為進行 XTT 試驗所需，將 noni-juice、EtOH-ppt 與 EtOH-sol 於每個小孔中之濃度為原濃度(63, 9.72, 53.1 mg/mL)、稀釋五倍(12.6, 1.944, 10.62 mg/mL)與稀釋十倍(6.3, 0.972, 5.31 mg/mL)。

添加諾麗果汁及酒精萃取物七十二小時，以 XTT 測驗結果如圖十三示。Noni-juice 與 EtOH-sol 於稀釋五倍之濃度下仍能使兩種癌細胞存活率低於 50%，無稀釋的情況下幾乎沒有存活，稀釋十倍時細胞存活率均增加。Noni-juice 十倍稀釋濃度，CE 81T 存活率 83.77%、HTB-37 為 74.43%。EtOH-sol 十倍稀釋，CE 81T 及 HTB-37 存活率分別為 88.1、76.65%；HTB-37 對於 noni-juice 和 EtOH-sol 耐受性較 CE 81T 差。五倍和十倍稀釋之 EtOH-ppt 無法抑制細胞增生，未稀釋濃度的處理使 HTB-37 存活率為(19.9%)遠較 CE 81T(60.97%)低，整體而言酒精沉澱物對於 HTB-37 有較大的抗增生能力。Hirazumi (1999) 研究諾麗果汁酒精沉澱(6.25 mg/mL)對 Lewis lung cancer cell (LLC) 作用 72 小時之 XTT 為 77.6%，與本實驗中的 EtOH-ppt (9.72 mg/mL) 對 CE 81T 之作用相似。

為瞭解上述細胞如何死亡，諾麗果汁及酒精萃取物均以最高濃度

試驗作用十六或二十四小時，再雙染 Annexin-V 與 PI 進行流式細胞儀分析。

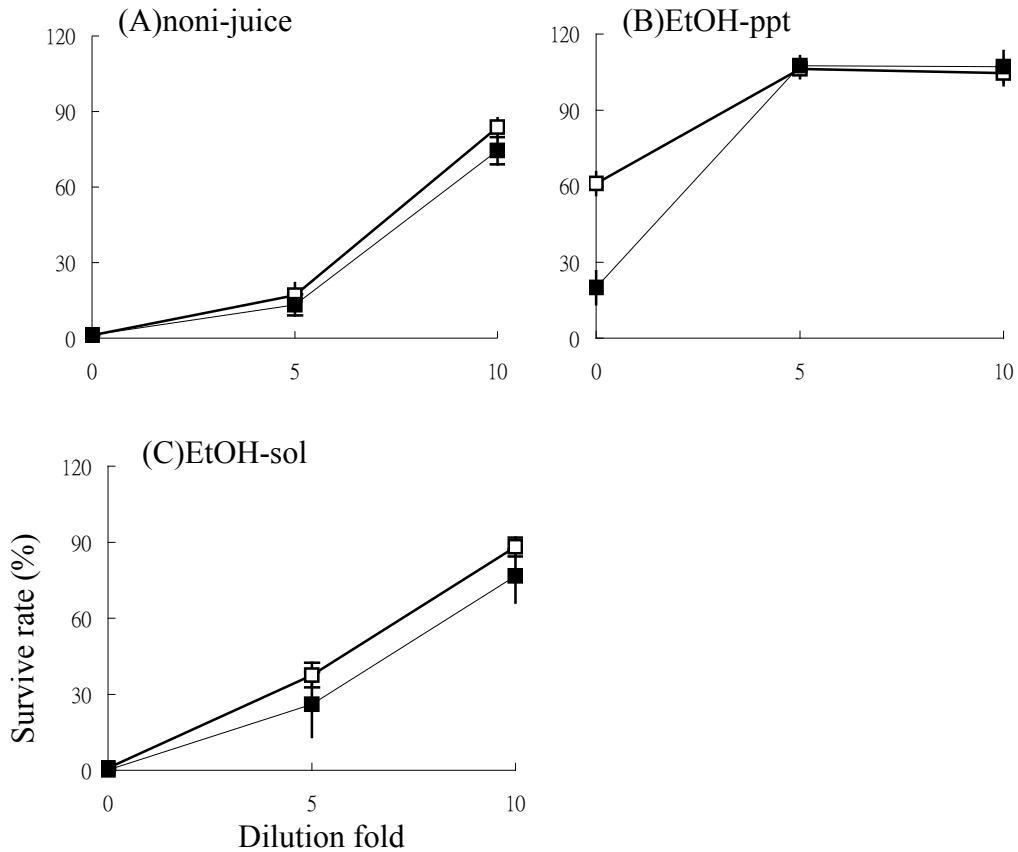
Noni-juice 作用於 CE 81T 如圖十四所示，十六小時到二十四小時的階段，活細胞與凋亡細胞逐漸減少(分別為從 13.15 到 3.91 %與從 5.8 到 1.42 %)，十六小時壞死細胞(21.54 %)於二十四小時大幅成為晚期壞死/凋亡(從 59.51 增至 88.00 %)。EtOH-ppt 作用十六及二十四小時，活細胞、凋亡細胞與壞死細胞均些微減少(分別為從 78.54 到 73.66 %、7.33 到 2.45 %、1.98 到 1.38 %)。晚期壞死/凋亡之比率上升(12.51 到 22.51 %)多為凋亡細胞轉換所致。EtOH-sol 作用時間從十六小時增加到二十四小時，活細胞與凋亡細胞逐漸減少(分別為從 54.30 到 32.09 %與從 19.32 到 8.81 %)，壞死細胞則大幅成長(8.69 % 到 29.06 %)，晚期壞死/凋亡亦是增加(從 17.69 增至 30.04 %)。由結果推測 noni-juice 對於 CE 81T 之作用較為快速(晚期凋亡/壞死比率最高，活細胞、凋亡細胞與壞死細胞比率降低)且已至後期，EtOH-sol 次之(晚期凋亡/壞死比率居中，活細胞與凋亡細胞比率降低，壞死細胞比率仍增加)而 EtOH-ppt 作用較緩慢且多為細胞凋亡。

HTB-37 受諾麗果汁與酒精萃取物之作用不似 CE 81T，其結果如圖十五所示。細胞受 noni-juice 作用十六小時到二十四小時，活細胞比率大幅減少(78.82 到 1.76 %)並成為凋亡細胞(2.29 到 70.31 %)，壞

死細胞比率下降(11.94 到 0.27 %)，部份凋亡及壞死細胞轉為晚期凋亡／壞死細胞(6.95 到 27.66 %)。EtOH-ppt 作用十六及二十四小時，活細胞大幅減少(93.74 到 36.22 %)，於二十四小時之細胞狀態多呈現凋亡(0.89 增至 21.43 %)與壞死(2.49 增至 25.98)，晚期凋亡／壞死亦增加(2.88 到 16.37 %)。EtOH-sol 作用十六及二十四小時，於十六小時之活細胞與凋亡細胞比率相近(40.56 與 48.91 %)，當時間延長至二十四小時，活細胞(36.50 %)與凋亡細胞比率(45.01 %)均下降。壞死細胞比率些微增加(0.22 到 3.29 %)，晚期凋亡／壞死比率也增加(10.31 到 15.20 %)。

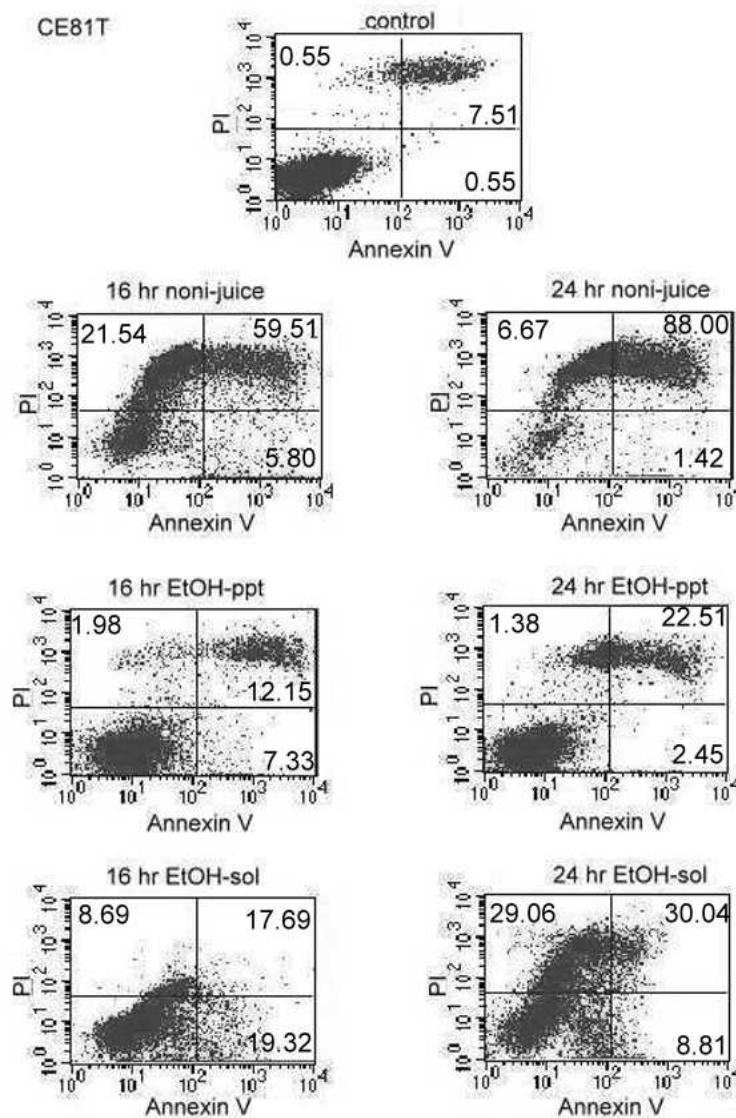
從流式細胞儀結果，推測 noni-juice 與 EtOH-sol 之作用對於此兩種癌細胞活細胞比率較 EtOH-ppt 之作用少，EtOH-ppt 對於 HTB-37 抗增生效果較 CE 81T 佳。諾麗果汁造成 CE 81T 多呈現壞死狀態，此可能濃度太高所致。適量的有效成份對細胞有引發凋亡的作用，然而當濃度再增加會造成細胞壞死。從流式細胞儀分析細胞凋亡或壞死，推測 CE 81T 對諾麗果汁耐受性較 HTB-37 差。諾麗果汁及酒精萃取物對於此兩種癌細胞影想之模式皆不同，為進一步瞭解細胞 DNA 之情況故繼續以彗星試驗分析。





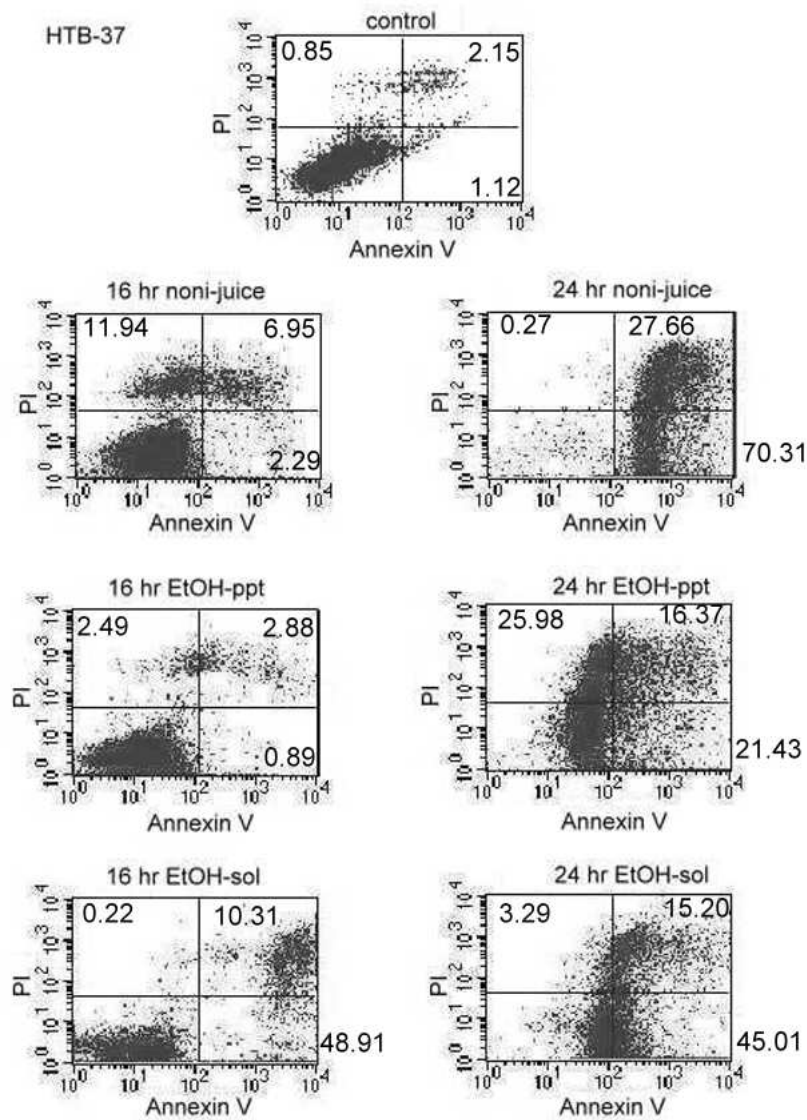
圖十四、諾麗果汁其酒精萃取物對於食道癌細胞(CE 81T, -□-)與結腸癌細胞(HTB-37, -■-)抗增生作用。(A)為諾麗果汁、(B)為酒精萃取沉澱物，(C)為酒精萃取上清液。

Fig. 14. Antiproliferative effect of Palawan noni (*Morinda citrifolia*) juice (A) and its 2 fractions: EtOH-ppt (B) and EtOH-sol (C) on human carcinoma of esophagus (CE 81T, -□-) and human colon cancer (HTB-37, -■-). Cells were treated with different concentrations of noni-juice, EtOH-ppt and EtOH-sol for 72 hr, then the cell viability was determined by the XTT assay. The growth rate was calculated as % of growth compared with the control. The original concentration of noni-juice, EtOH-ppt and EtOH-sol were 63, 9.72 and 53.1 mg/mL.



圖十五、諾麗果汁及其酒精萃取物與食道癌細胞(CE 81T)作用十六與二十四小時，經 Annexin-V 與 PI 染色後之流式細胞儀分析圖。

Fig. 15. Cytograms of CE 81T stained with Annexin-V and PI after treated with noni and its alcohol extracts. The horizontal axis shows FITC-Annexin-V green fluorescence intensity and the vertical axis shows red fluorescence intensity of PI. Quadrants present as follows. LL (Annexin V<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>): viable cells; LR (Annexin V<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>): cells in early apoptosis; UR (Annexin V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>): cells in late apoptosis; UL (Annexin V<sup>-</sup>/PI<sup>+</sup>): cells in necrosis.

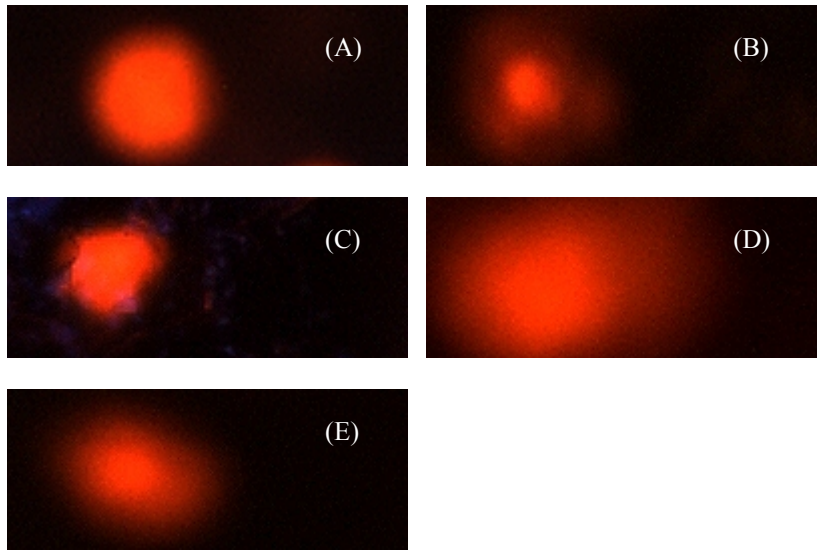


圖十六、諾麗果汁及其酒精萃取物與結腸癌細胞(HTB-37)作用十六與二十四小時，經 Annexin-V 與 PI 染色後之流式細胞儀分析圖。

Fig. 16. Cytograms of HTB-37 stained with Annexin-V and PI after treated with noni and its alcohol extracts.

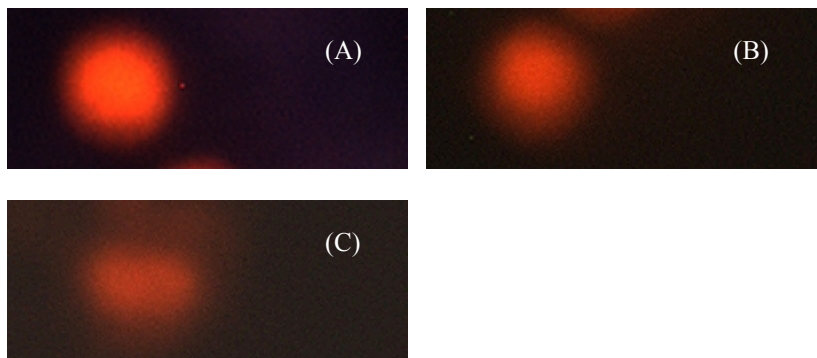
經流式細胞儀分析後，處理後之細胞有凋亡／壞死之現象。為推測是否 DNA 損害所致，以彗星試驗分析 DNA 損傷(圖十六與圖十七)。使用影像分析軟體 CometScore™ 分析尾部 DNA 百分比 (percentage of DNA in the tail, % Tail DNA)，其結果如表九所示。CE 81T 經 noni-juice、EtOH-ppt 及 EtOH-sol 作用八小時，DNA 損傷達 12.36、11.17 與 16.88 %。當時間延長至二十小時，EtOH-ppt 使 DNA 損傷增加至 19.50 %，推測除了損傷 DNA 引發壞死之外亦可能細胞內之 DNA 分解酵素業已開始作用。Noni-juice 與 EtOH-ppt 因為此時細胞膜強度太低，與融溶態 low melting agarose 混合時胞膜破裂而無法偵測。故 noni-juice 與 EtOH-sol 可能是使 DNA 大幅度斷裂，接著引發壞死。EtOH-ppt 作用 HTB-37 八小時使 DNA 損傷 13.46 %，隨時間增加至二十小時損傷隨之增加為 22.99 %。EtOH-ppt 應先造成 HTB-37 細胞 DNA 損傷，再引起凋亡／壞死。Noni-juice 與 EtOH-sol 作用於 HTB-37，不論八或二十小時均無法偵測 DNA 損害程度(理由同上)，故無法得知其作用機制。

從 XTT、flow cytometry 與 comet assay 之結果可推論出諾麗果汁及其酒精萃取物對細胞之作用可能途徑：小幅度傷害細胞 DNA→引發凋亡／壞死→死亡。



圖十七、食道癌細胞(CE 81T)DNA 損傷圖

Fig. 17. Changes in the levels of DNA damage in CE 81T cells. (A), (B), (C), (D) and (E) was control, 8 hr noni-juice, 8 hr EtOH-ppt, 20 hr EtOH-ppt and 8 hr EtOH-sol, respectively.



圖十八、結腸癌細胞(HTB-37)DNA 損傷圖

Fig. 18. Changes in the levels of DNA damage in HTB-37 cells. (A), (B) and (C) was control, 8 hr EtOH-ppt and 20 hr EtOH-ppt, respectively.

表九、彗星試驗分析諾麗果汁及其酒精萃取沉澱物與上清液作用後 DNA 損傷程度。

Table 9. DNA damage<sup>A</sup> analysis of DNA in CE 81T and HTB-37 cells after treating with noni-juice, EtOH-ppt or EtOH-sol by comet assay.

	CE 81T		HTB-37	
	8 hr	20 hr	8 hr	20 hr
control	1.48±1.88 <sup>b</sup>	1.48±1.42 <sup>b</sup>	1.56±1.83 <sup>b</sup>	3.02±2.52 <sup>b</sup>
noni-juice	12.36±5.03 <sup>a</sup>	N.A. <sup>B</sup>	N.A.	N.A.
EtOH-ppt	11.17±2.49 <sup>a</sup>	19.50±6.60 <sup>a</sup>	13.46±3.88 <sup>a</sup>	22.99±8.80 <sup>a</sup>
EtOH-sol	16.88±8.04 <sup>a</sup>	N.A.	N.A.	N.A.

<sup>A</sup> DNA damage is counted 60 cells and presented as percentage of DNA in the tail (% Tail DNA). % Tail DNA = (total intensity - head intensity)/ total intensity, and the value was automatically calculated by software.

<sup>B</sup> N.A. means not available.

Values in each line with different letters are significantly different at p<0.05 analyzed by Duncan's multiple range test.

#### 四、熟成諾麗果汁抗氧化性質分析

清除 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、DPPH 自由基的結果如表十所示，對照組為商業用抗氧化劑 BHA。Noni-juice、EtOH-ppt 與 EtOH-sol 均有清除 90 % 以上 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 自由基能力，其中又以 EtOH-ppt 及 EtOH-sol 的效果最好。

Noni-juice 與 EtOH-ppt 清除 DPPH 能力(約 64 %)，顯著較 EtOH-sol(48 %) 為佳。BHA 之清除 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 與 DPPH 自由基能力分別為 99 % 及 62 %。

還原力與總抗氧化力測定結果如表十一所示。相對於抗壞血酸

(ascorbic acid)之數據 noni-juice 的還原力達 110  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，EtOH-sol 約 79  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ascorbic acid；EtOH-ppt 則無法測得。Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC)為一快速、準確評估水相樣品之總抗氧化能力(total antioxidant activity, TAA) 的測定方式。Trolox 是穩定的抗氧化劑，以之建立標準檢量曲線，可得知樣品中等同之 Trolox 含量。EtOH-sol 之 TAA 是 676  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Trolox 為三者最高，Noni-juice 次之 EtOH-ppt 最低。EtOH-sol 在 TEAC 中有最高抗氧化力、DPPH 中具最差清除力，推測是 TEAC 是較極性的反應；DPPH 則為較非極性之反應。

表十二為亞鐵離子螯合能力結果，EtOH-ppt 有 80 %亞鐵離子螯合能力，Noni-juice 有 54 %螯合能力均較 EDTA (0.1  $\text{mg}/\text{mL}$ )高；EtOH-sol 是其中亞鐵離子螯合能力最差者。

表十三為三樣品之 scopoletin、總酚與縮合單寧含量，經 HPLC 分析後 Noni-juice 與 EtOH-sol 之 scopoletin 含量各為 66 與 51  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。由於 scopoletin 為醇溶性物質，故 EtOH-ppt 偵測不到 scopoletin。Noni-juice、EtOH-sol 總酚含量分別為 1240 與 1078  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，EtOH-ppt 總酚最少只有 166  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。縮合單寧為酚類化合物的一種，是具抑制癌細胞生長的物質(Russo et al., 2005)。Noni-juice、EtOH-sol 縮合單寧含量分別為 138 與 113  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，EtOH-ppt 總酚最少只有 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

表十、諾麗果汁及其酒精萃取物之活性氧自由基清除能力  
Table 10. Scavenging activity of reactive oxygen radical species in noni-juice, EtOH-ppt and EtOH-sol.

Treatment (mg/mL)	% Scavenging ability	
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	DPPH
Noni-juice (63)	93.69±5.96 <sup>b</sup>	64.54±1.50 <sup>a</sup>
EtOH-ppt (9.72)	98.86±0.84 <sup>a</sup>	63.48±2.26 <sup>ab</sup>
EtOH-sol (53.1)	99.38±0.42 <sup>a</sup>	48.10±2.36 <sup>c</sup>
BHA (0.05)	99.38±0.36 <sup>a</sup>	62.19±2.13 <sup>b</sup>

Scavenging ability are mean values of four determinants.

Values in each line with different letters are significantly different at p<0.05 analyzed by Duncan's multiple range test.

表十一、諾麗果汁及其酒精萃取物之還原力與總抗氧化能力  
Table 11. Reducing power assay and Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) of effect of noni-juice, EtOH-ppt and EtOH-sol.

Treatment (mg/mL)	Reducing power <sup>A</sup> (µg/mL)	TAA <sup>B</sup> (µg/mL)
Noni-juice (63)	110.60±0.10 <sup>a</sup>	614.36±9.52 <sup>b</sup>
EtOH-ppt (9.72)	N.D. <sup>C</sup>	312.77±3.81 <sup>c</sup>
EtOH-sol (53.1)	78.79±0.15 <sup>b</sup>	676.18±1.89 <sup>a</sup>

<sup>A</sup> Reducing power represents equal concentration of ascorbic acid. The data are mean values of four determinants.

<sup>B</sup> TAA (total antioxidant activity) represents equal concentration of trolox. The data are mean values of four determinants.

<sup>C</sup> Means not detectable.

Values in each line with different letters are significantly different at p<0.05 analyzed by Duncan's multiple range test.



表十二、諾麗果汁及其酒精萃取物之亞鐵離子螯合能力

Table 12. Fe<sup>2+</sup> binding activity of noni-juice, EtOH-ppt and EtOH-sol.

Treatment (mg/mL)	Binding activity <sup>A</sup> (%)
Noni-juice (63)	54.04±2.74 <sup>b</sup>
EtOH-ppt (9.72)	80.00±6.17 <sup>a</sup>
EtOH-sol (53.1)	17.62±8.88 <sup>d</sup>
EDTA (0.1)	41.43±3.69 <sup>c</sup>

<sup>A</sup> Binding activity represents the percentage of Fe<sup>2+</sup> compared to control. The data are mean values of four determinants.

Values in each line with different letters are significantly different at p<0.05 analyzed by Duncan's multiple range test.

表十三、諾麗果汁及其酒精萃取物之 scopoletin、總酚化合物與縮合單寧之含量

Table 13. Scopoletin, total phenolic compounds and condensed tannin contents of noni-juice, EtOH-ppt and EtOH-sol.

(mg/mL)	Scopoletin (µg/mL)	Total phenol <sup>A</sup> (µg/mL)	Condensed <sup>B</sup> tannin (µg/mL)
Noni-juice (63)	66.22±8.22 <sup>a</sup>	1240.38±3.10 <sup>a</sup>	138±14 <sup>a</sup>
EtOH-ppt (9.72)	N.D. <sup>C</sup>	166.50±7.50 <sup>c</sup>	5±1 <sup>c</sup>
EtOH-sol (53.1)	51.03±4.34 <sup>b</sup>	1078.08±3.99 <sup>b</sup>	113±4 <sup>b</sup>

<sup>A</sup> Total phenol represents equal concentration of gallic acid.

The data are mean values of four determinants.

<sup>B</sup> Condensed tannin represents equal concentration of (+)-catechin.

The data are mean values of four determinants.

<sup>C</sup> Means not detectable.

Values in each line with different letters are significantly different at p<0.05 analyzed by Duncan's multiple range test.

不同抗氧化實驗得知 Noni-juice、EtOH-ppt 與 EtOH-sol 有不同之抗氧化能力，從 DPPH 與總抗氧化能力試驗來看 EtOH-ppt 與 EtOH-sol，兩者的抗氧化能力為拮抗反應(antagonistic)並非協同(synergistic)或加成(additive)效果。總酚含量與總抗氧化能力有正相關，且較有抗癌細胞增生效果。有許多報導指出(Halliwell, 2007; Lotito et al., 2006; Issa et al., 2006)，酚類化合物對於消化道的抗氧化與抗癌作用較有助益。生物體中之自由基，除了在傳統上被認為是造成某些疾病之因素，現有研究指出尚有傳遞訊息之功能(Seifried et al., 2007; Volko et al., 2007)。體外試驗具抗氧化能力之物質，於細胞試驗或是動物體內試驗不一定直接呈現抗氧化作用，可能於高劑量呈現促氧化(Labieniec et al., 2006; Long et al., 2000; Loo, 2003)。由於細胞實驗選擇高劑量之諾麗果汁與酒精萃取物，癌細胞 DNA 受損後呈現凋亡或壞死，且體外抗氧化實驗具良好抗氧化能力。因此推測為促氧化造成氧化壓力(oxidative stress)，使癌細胞 DNA 損傷後引發凋亡或壞死。

## 伍、結論

### (一) 添加 pectinase G 生產諾麗果汁與儲存期之活性變化

添加 pectinase G 能夠增加新鮮諾麗果汁產率約 12.5 %，果汁外觀較清澈且較明亮。生產完成之諾麗果汁即使於 4 °C 冷藏亦會使其抗氧化能力下降，顏色逐漸改變。然而添加酵素能使果汁外觀較為明亮且清澈，使其異於深褐色的傳統熟成諾麗果汁。

運用 response surface methodology 分析生產新鮮果汁(Liew Abdullah et al., 2007)，探討酵素添加量、作用時間與處理溫度對於果汁物理及化學品質之影響。未來生產新鮮諾麗果汁，尚需建立最適化之生產條件。

國產諾麗果汁價格 1.2 元新台幣／毫升(學甲鎮農會)或 2.67 元新台幣／毫升(珍果生技)，國外諾麗果汁價格約 0.73 元新台幣／毫升(www.nextag.com)；產地、加工方式及銷售方式差異頗大，故售價沒有定論。此外新鮮的果汁具有高度的抗氧化能力，果汁販賣若改變為低溫流通、保存期限較短之鮮食果汁，也許是另一個優質新飲料。市售諾麗果汁均為常溫販售，如從保留高抗氧化力之保健觀點重新定位諾麗果汁的市場定位，台灣國產諾麗果汁會擁有一嶄新的市場。

## (二) 酒精萃取諾麗果汁對細胞與抗氧化能力

從兩種癌細胞模式可得知諾麗果汁(noni-juice)、酒精萃取沉澱物(EtOH-ppt)與酒精萃取上清液(EtOH-sol)是先傷害癌細胞 DNA，接著導致細胞凋亡／壞死、最後死亡。EtOH-sol 中含酚類化合物較 EtOH-ppt 多，EtOH-ppt 中推測多為多醣類(Hirazumi, et al., 1999 and Bui, et al., 2006)；於各式抗氧化測驗中各有優勢，可能是其抗氧化能力造成癌細胞之氧化壓力(oxidative stress)使 DNA 受損進而啟動凋亡(Loo, 2003)。

為進一步釐清細胞凋亡機制，未來可探究其訊息傳遞，例如分析幾種 cysteine aspartic acid specific proteases (caspase)與轉錄因子 nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)之活性，或者其他可造成細胞凋亡的途徑。Scopoletin 可能是一具生理活性的分子，然帶有糖基的 scopolin 在植物模式中亦參與抗病毒之反應(Chong et al., 2002)。可進一步研究是否帶糖基的 scopoletin 對於細胞之影響，以及於動物體中之代謝途徑。

本實驗建構一套分析天然物對細胞影響之檢驗平台，日後除了可繼續深入探討諾麗果汁對細胞之作用機制，亦能藉此架構分析其他化合物之細胞效應。