

# 诺丽果、种子和叶提取物抑菌活性 及复合植物抑菌液配方筛选

刘霏莎<sup>1</sup>, 洪启恩<sup>1</sup>, 冯兴江<sup>1</sup>, 毛祥飞<sup>1</sup>, 黄业福<sup>1</sup>, 邵远志<sup>2</sup>, 易美华<sup>2,\*</sup>

(1.海南诺尼生物工程开发有限公司, 海南海口 570100;

2.海南大学食品学院, 海南海口 570100)

**摘要:**研究诺丽果、种子和叶提取物的抑菌活性。通过考察诺丽果发酵汁、种子乙醇提取物、种子水蒸馏提取物、诺丽叶提取物、金银花提取物分别对铜绿假单胞菌、大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、变形链球菌 4 种致病菌的抑菌活性, 筛选出了抑菌活性较强的 3 种提取物(诺丽果发酵汁、种子水蒸馏提取物、金银花提取物)。通过单因素实验、3 因素 3 水平正交实验, 优化了复合植物抑菌液的最佳配方。结果表明:以诺丽果发酵汁 87%、种子水蒸馏提取物 8%、金银花提取物 5% 制成的抑菌液, 抑菌圈直径分别为:铜绿假单胞菌 15 mm, 大肠埃希菌 22 mm, 金黄色葡萄球菌 28 mm, 变形链球菌 17 mm。抑菌效果较好。结论:复合植物抑菌液具有抑菌的作用, 为进一步开发抑菌产品提供理论依据。

**关键词:**诺丽, 提取物, 抑菌, 致病菌, 配方筛选

## Study on antimicrobial properties of Noni fruit, seed and leaf extract and screening of antimicrobial composite formula

LIU Ai-sha<sup>1</sup>, HONG Qi-en<sup>1</sup>, FENG Xing-jiang<sup>1</sup>, MAO Xiang-fei<sup>1</sup>,

HUANG Ye-fu<sup>1</sup>, SHAO Yuan-zhi<sup>2</sup>, YI Mei-hua<sup>2,\*</sup>

(1.Hainan Noni Biological Engineering Development Co., Ltd., Haikou 570100, China;

2.College of Science and Technology, Hainan University, Haikou 570100, China)

**Abstract:** The paper researched the antimicrobial properties of extracts of Noni fruit, seed and leaf extract. By studying the antimicrobial properties of Noni fruit fermented juice, seed ethanol extract, seed steam distillate extract, Noni leaf extract and honeysuckle extract respectively on four kinds of pathogens as the target, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, three kinds of extracts with stronger antimicrobial properties (Noni fruit fermented juice, seed steam distillate extract and honeysuckle extract) were screened out. Through the experimental results from the single factor experiment and three factors three levels orthogonal experiments, the best formula of compound plant bacteriostatic liquid was optimized. The results showed that the antimicrobial effect of liquid mixed from 87% of the Noni fruit fermented juice, 8% of the distilled steam extract and 5% of the honeysuckle extract was the best. The inhibition zone diameters of different bacteria were 15 mm of *Pseudomonas aeruginosa*, 22 mm of *Escherichia coli*, 28 mm of *Staphylococcus aureus*, 17 mm of *Streptococcus mutans*. The compound plant bacteriostatic liquid has antimicrobial effect, and it provides theoretical basis for further developing antimicrobial product.

**Key words:** Noni; extract; antimicrobial; pathogens; prescription screening

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2017)14-0171-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2017.14.034

诺丽(Noni), 学名 *Morinda citrifolia*, 又称海滨木巴戟、海巴戟天、诺尼, 为茜草科巴戟天属灌木至小乔木, 诺丽主要生长在南太平洋群岛, 在我国主要分布在台湾、海南及西沙群岛。

诺丽果在国外已成为一种常见的食品, 特别是波利尼西亚等地区, 当地人使用诺丽果已有两千多

年的历史。研究表明, 诺丽果富含 20 多种氨基酸、维生素 C 等多种营养成分<sup>[1]</sup>, 还含有多糖<sup>[2]</sup>、环烯醚萜<sup>[3]</sup>、萜醌类<sup>[3]</sup>等多种有效成分, 具有体外抗肿瘤、抗氧化、抑菌消炎等<sup>[4]</sup>活性; 诺丽叶含有黄酮、皂甙、多糖等活性成分<sup>[1]</sup>, 种子含有甾醇类、东莨菪亭<sup>[5-6]</sup>等活性成分。目前, 有关诺丽果汁和诺丽叶的提取物显

收稿日期: 2016-12-20

作者简介: 刘霏莎(1985-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品微生物, E-mail: liuaisha2@foxmail.com。

\* 通讯作者: 易美华(1945-), 女, 大学本科, 教授, 研究方向: 食品资源开发利用, E-mail: ymh12@163.com。

基金项目: 海南省重点研发计划项目(ZDYF2016175)专项资助。

示良好的抑菌活性<sup>[7-8]</sup>,金银花中的绿原酸类成分有明显的抗菌消炎活性等已有文献报道<sup>[9]</sup>,但诺丽种子的提取物抑菌未见报道。本文分别对诺丽果发酵原液、种子、叶、金银花提取物的抑菌活性进行研究,优化较低浓度的复合植物抑菌液配方,为进一步开发植物复合抑菌液提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

诺丽果、叶子 海南诺尼生物工程开发有限公司;金银花、盐酸左氧氟沙星 购自当地药店;大肠埃希菌 (*Escherichia coli*)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、变形链球菌 (*Streptococcus mutans*) 中国工业微生物菌种保藏管理中心;胰蛋白胨大豆肉汤培养基 (TSB)、脑心浸液培养基 (BHI) 青岛高科技工业园海博生物技术有限公司。

H-1650 高速台式离心机 长沙湘仪离心机仪器有限公司;CH-9230 旋转蒸发仪 瑞士 BUCHI 公司;恒温培养箱 上海迅能电热设备有限公司;发酵罐 温州市亿一机械有限公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 各组分提取物的制备 诺丽果发酵汁:取一定量新鲜成熟的诺丽果于发酵罐中,密封室温自然发酵 40 d,取汁,过滤,取清液待用。

种子乙醇提取物:分离出诺丽种子,晾干,打碎,过 40 目筛,称取 20 g 诺丽种子,按照 1:10 g/mL 的料液比加 95% 乙醇溶液中,浸泡 6 h 后,抽滤清液,6000 r/min 离心、60 °C 浓缩,收集油状物质,待用。

种子水蒸馏提取物:称取 20 g 诺丽种子,置于挥发油提取装置,按 1:8 加水加热至沸腾,回流 3 h,收集油状物质,待用。

诺丽叶提取物:称取 500 g 诺丽叶,烘干粉碎,加 50% 乙醇溶液 40 °C 浸泡提取 24 h,两次提取液合并后 6000 r/min 离心、60 °C 浓缩,待用。

金银花提取物:称取 100 g 金银花按诺丽叶提取物的提取方法得到提取物。

1.2.2 各提取物的单因素抑菌效果研究 以大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌和变形链球菌为供试菌,其中前 3 种是抑菌实验常用致病菌,用胰蛋白胨大豆肉汤培养基 (TSB) 进行培养,而后 1 种是口腔致龋主要病原菌,用脑心浸液培养基 (BHI) 进行培养。将供试菌的新鲜培养物 1 mL 置于培养皿,按照不同的菌种加等量的 TSB 或者 BHI 培养基迅速混匀,凝固后用打孔器在培养基中打孔,挑出培养基留下若干约 10 mm 的圆孔,向孔中加 120  $\mu$ L 各提取物样品。以盐酸左氧氟沙星为阳性对照、无菌水为阴性对照。置于 37 °C 培养 12 h。如样品有抑菌活性,则圆孔外会出现直径大于 10 mm 的透明抑菌圈,量出抑菌圈的直径记录结果。

将 1.2.1 得到的 5 种提取物作为 5 个因素,每个因素按质量百分比加水稀释,取 5 个浓度进行抑菌实验,筛选出有抑菌活性的提取物。

1.2.3 提取物的复合配方抑菌研究 在 1.2.2 单因素

实验基础上,选择三种提取物设计 3 因素 3 水平正交实验 (见表 1) 研究植物抑菌液的复配配方。

表 1 正交实验的因素水平表

Table 1 Factors and levels table of orthogonal experiment

水平	因素		
	A 诺丽果发酵液 (%)	B 种子水蒸馏提取物 (%)	C 金银花提取物 (%)
1	75	2	5
2	87	5	10
3	100	8	15

1.2.4 绿原酸含量检测 按照 GB/T 22250-2008 的方法检测上述诺丽叶、金银花提取物的绿原酸含量。

### 1.3 数据处理

得到的结果借助正交设计助手 2.0 分析实验数据。

## 2 结果与分析

### 2.1 5 种提取物单因素抑菌研究

将 5 种提取物分别对 4 种供试菌进行抑菌实验,结果如表 2 所示。

由表 2 可知,诺丽果发酵液、诺丽种子水蒸馏提取物、金银花提取物 3 种抑菌效果较好,其中诺丽果发酵液的抑菌效果随浓度降低而降低,选择 100%、87%、75% 进入正交实验。种子水蒸馏提取物的抑菌效果较好,对大肠埃希菌的抑制尤为突出,对铜绿假单胞菌的抑制稍差,但是该提取物得率很低,为了减轻生产成本在有效浓度范围内尽量选择低的浓度,则选择降低浓度 8%、5%、2% 进入正交实验。金银花提取物对铜绿假单胞菌和大肠埃希菌的抑制较明显,但是对变形链球菌的抑制稍差,选择 15%、10%、5% 进入正交实验。其余两种提取物需要较高浓度才有微弱的抑菌效果,故不考虑。

### 2.2 复合配方抑菌研究

根据表 1 的结果,选择诺丽果发酵液、诺丽种子水蒸馏提取物、金银花提取物 3 种,采用 3 因素 3 水平设计正交实验,结果如表 3 所示。

使用正交分析软件,计算结果见表 4,铜绿假单胞菌,各因素主次顺序为 A > C > B,较优配方组合为 A<sub>3</sub>B<sub>1</sub>C<sub>3</sub>,其中 7 号实验正是 A<sub>3</sub>B<sub>1</sub>C<sub>3</sub> 组合,并且可看出是所有实验组中最优配比。大肠埃希菌,各因素主次顺序为 C > B > A,较优配方组合为 A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>1</sub>,按 A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>1</sub> 进行实验,重复 3 次取平均值,得出抑菌圈为 24 mm,同表 3 中的 8 号实验组结果相同,故较优组合为 A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>1</sub> 和 A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>1</sub>。金黄色葡萄球菌,各因素主次顺序为 A > C > B,较优配方组合为 A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>1</sub>,按 A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>1</sub> 进行实验,重复 3 次取平均值,得出抑菌圈为 29 mm,高出表 3 中任何一组实验,故最优组合为 A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>1</sub>。变形链球菌,各因素主次顺序为 B > A > C,较优配方组合为 A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>1</sub> 或 A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>2</sub>,其中 6 号实验正是 A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>1</sub> 组合,同时对 A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>1</sub> 和 A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>2</sub> 进行实验,重复 3 次取平均值,得出 A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>1</sub> 抑菌圈为 18 mm, A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>2</sub> 抑菌圈为 17 mm,故最优组合为 A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>1</sub>。

综合上述分析,结合产品的开发需求,用于对口

表2 5种提取物抑菌结果  
Table 2 The results of five kinds of extracts antimicrobial

样品	浓度 (%)	抑菌圈 (mm)			
		铜绿假单胞菌 <i>P.aeruginosa</i>	大肠埃希菌 <i>E.coli</i>	金黄色葡萄球菌 <i>S.aureus</i>	变形链球菌 <i>S.mutans</i>
诺丽果发酵液	100	15	13	14	-
	93	14	13	15	-
	87	15	14	13	-
	81	13	12	13	-
	75	13	11	12	-
	12	11	12	-	-
诺丽种子乙醇提取物	10	11	-	-	-
	8	-	-	-	-
	6	-	-	-	-
	4	-	-	-	-
	10	14	26	18	17
	8	13	23	16	16
诺丽种子水蒸馏提取物	6	11	20	14	15
	4	11	18	12	13
	2	11	17	12	12
	60	13	15	-	-
诺丽叶提取物	50	-	12	-	-
	40	-	-	-	-
	30	-	-	-	-
	20	-	-	-	-
	20	20	22	19	15
金银花提取物	15	15	23	19	13
	10	14	21	18	13
	5	13	17	16	12
	3	13	12	14	-
	阳性对照	4 mg/mL	33	32	38

表3 复合配方正交实验结果  
Table 3 Orthogonal experimental results of composite formula

实验号	A	B	C	抑菌圈 (mm)			
				铜绿假单胞菌 <i>P.aeruginosa</i>	大肠埃希菌 <i>E.coli</i>	金黄色葡萄球菌 <i>S.aureus</i>	变形链球菌 <i>S.mutans</i>
1	1	1	1	14	20	24	15
2	1	2	2	13	20	25	14
3	1	3	3	14	21	23	15
4	2	1	2	15	20	25	15
5	2	2	3	17	17	25	15
6	2	3	1	15	22	28	17
7	3	1	3	18	15	28	14
8	3	2	1	16	24	28	13
9	3	3	2	16	23	28	16

腔致龋菌的抑制, 优先考虑抑制变形链球菌效果较好的6号实验配方, 即诺丽发酵液87%、种子水蒸馏提取物8%、金银花提取物5%, 该配方对另外3种致病菌虽然不是最优配方, 但是也有较好的抑制效果。

### 2.3 诺丽叶、金银花的绿原酸含量

诺丽叶的绿原酸含量为24.2 mg/kg, 金银花的绿

原酸含量为363.8 mg/kg。由此可知金银花的绿原酸含量较高, 实验检测结果也与文献<sup>[10]</sup>报道符合, 绿原酸是金银花的主要抗菌、抗病毒有效药理成分, 具有广泛的抗菌作用, 和本实验的结果相符合。诺丽叶的绿原酸含量较低, 这可能是叶子提取物抑菌效果不明显的原因。

(下转第187页)

提液中可溶性蛋白质含量方法的研究[J].苏州大学学报:自然科学版,2006,22(2):82-85.  
 [20]李剑玄.浒苔蛋白质的分离提取及其功能特性的研究[D].武汉:武汉工业学院,2010.  
 [21]范三红,刘艳荣,原超.南瓜籽蛋白质的制备及其功能性研究[J].食品科学,2010,31(16):97-100.  
 [22]杨国燕,陈栋梁,刘莉,等.菜籽分离蛋白及菜籽蛋白肽的功能特性研究[J].食品科学,2007,28(1):76-78.

[23]邓楚津,董强,张良,等.番木瓜籽的营养成分及营养价值[J].食品研究与开发,2012,33(6):185-188.  
 [24]Marfo E K, Oke O L, Afolabi O A. Chemical composition of papaya (*Carica papaya*) seeds [J]. Food Chemistry, 1986, 22(4): 259-266.  
 [25] Marfo E K, Oke O L, Afolabi O A. Some studies on the proteins of *Carica papaya* seeds [J]. Food Chemistry, 1986, 22(4): 267-277.

(上接第 173 页)

表 4 正交实验结果分析

Table 4 Analysis of orthogonal experimen results

		A	B	C
铜绿假单胞菌 <i>P.aeruginosa</i>	K <sub>1</sub>	41	47	45
	K <sub>2</sub>	47	46	44
	K <sub>3</sub>	50	45	49
	R	3.00	0.67	1.67
大肠埃希菌 <i>E.coli</i>	K <sub>1</sub>	61	55	66
	K <sub>2</sub>	59	61	63
	K <sub>3</sub>	62	66	53
	R	1	3.67	4.33
金黄色葡萄球菌 <i>S.aureus</i>	K <sub>1</sub>	72	77	80
	K <sub>2</sub>	78	78	78
	K <sub>3</sub>	84	79	76
	R	4	0.67	1.33
变形链球菌 <i>S.mutans</i>	K <sub>1</sub>	44	44	45
	K <sub>2</sub>	47	42	45
	K <sub>3</sub>	43	48	44
	R	1.33	2	0.33

### 3 结论

本实验采用正交实验设计,结合实际开发需求,主要抑制口腔致龋菌,初步选择效果较好的组分比例为 6 号配方,即诺尼发酵液 87%、种子水蒸馏提取物 8%、金银花提取物 5%,抑菌圈直径分别为:铜绿假单胞菌 15 mm,大肠埃希菌 22 mm,金黄色葡萄球菌 28 mm,变形链球菌 17 mm。

诺丽种子水蒸馏提取物即挥发油,主要是酯类物质,根据吴慧娟<sup>[11]</sup>等,抑菌作用位点可能位于细菌细胞膜上,破坏细胞膜磷脂双分子层的完整性,引起细胞裂解,达到抑菌效果。

诺丽叶的绿原酸含量较低,目前的提取方法不能得到含量较高的提取物,抑菌效果不理想,今后需要进一步改进提取工艺。

诺丽作抑菌实验已有报道,李金霞<sup>[7]</sup>等利用诺丽十倍浓缩液能有效抑制食源性致病菌;龚敏<sup>[12]</sup>等报道诺丽果汁的乙酸乙酯和正丁醇萃取段具有明显的抑菌作用;诺丽提取物凝胶能抑制粪肠球菌生长<sup>[13]</sup>; Zhang<sup>[8]</sup>等报道诺丽叶的正丁醇等有机溶剂提取物也有很好的抑菌效果。本实验利用诺丽发酵原液而非浓缩液,配合种子和金银花的水提取物组成复合植

物配方液,成分安全,抑菌效果较好,相比市面上应用广泛的氯己定类口腔护理产品在牙齿上会留痕迹、不美观,诺丽传统的抗菌消炎作用,为日后开发口腔护理产品打下基础。

### 参考文献

[1] Yanine Chan-Blanco, Fabrice Vaillant, Ana Mercedes Perez, et al. The noni fruit (*Morinda citrifolia* L.): A review of agricultural research, nutritional and therapeutic properties [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2006, 19(6-7): 645-654.  
 [2] 李戈,张丽霞,牛迎凤,等.不同来源地诺丽果质量分析[J].中华中医药杂志,2016(9):3766-3769.  
 [3] 许国平,张春妮.诺丽作用机制的研究进展[J].医学研究生学报,2007,20(9):974-977.  
 [4] 于纯森,李煦照,于栋华,等.海巴戟果实诺丽(NONI)生理功能研究进展[J].食品工业科技,2011,32(12):573-576.  
 [5] YANG Xiao Long, JIANG Meng Yuan, Hsieh Kun Lung, et al. Chemical constituents from the seeds of *Morinda citrifolia* [J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2009, 7(2): 119-122.  
 [6] 何其伟,吴培云,梁益敏,等.诺丽果肉化学成分研究[J].中成药,2012,43(9):1729-1733.  
 [7] 李金霞,陈建国,李雪,等.西沙诺尼果汁抑菌特性与抑菌物质研究[J].中国食品学报,2015,15(2):143-149.  
 [8] Zhang Wei - Min, Wang Wei, Zhang Jing - Jing, et al. Antibacterial Constituents of Hainan *Morinda citrifolia* (Noni) Leaves [J]. J Food Sci, 2016, 81(5): 1192-1196.  
 [9] 王亚丹,杨建波,戴忠,等.中药金银花的研究进展[J].药物分析杂志,2014,16(11):1928-1935.  
 [10] 向增旭,郭巧生.不同产地金银花的绿原酸含量比较[J].中药材,2007,30(12):1497-1498.  
 [11] 吴慧娟,黄杨名,陈科廷,等.神农香菊全草精油的化学成分及抑菌机理研究[J].食品科学,2012,33(17):35-39.  
 [12] 龚敏,苏奎,邓世明.诺丽鲜果与诺丽发酵汁的抗氧化及抑菌活性的对比研究[J].食品科技,2010,35(10):92-94.  
 [13] A Bhardwaj, S Ballal, N Velmurugan. Comparative evaluation of the antimicrobial activity of natural extracts of *Morinda citrifolia*, papain and aloe vera (all in gel formulation), 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide, against *Enterococcus faecalis*-An *in vitro* study [J]. Journal of Conservative Dentistry, 2012, 15(3): 293-297.