

# 草莓菠萝复合酵素成分及其体外生物活性研究

段晓宇<sup>1</sup>, 曾 莉<sup>1</sup>, 樊 睿<sup>1</sup>, 赵治巧<sup>1</sup>, 万玉军<sup>2</sup>, 陈 惠<sup>1</sup>, 王 刚<sup>2</sup>, 唐自钟<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>四川农业大学生命科学学院, 雅安 625014; <sup>2</sup>四川省食品发酵工业研究设计院, 成都 611130

**摘要:** 为了实现对产量过剩的草莓和菠萝的有效利用。本研究以草莓菠萝混合果汁为基质, 以果酒酵母和保加利亚乳杆菌为发酵剂对其进行复合发酵。发酵结束后, 以未发酵的混合果汁为对照, 对获得的草莓菠萝酵素的化学成分、功效酶活力、抗氧化活性和抑菌能力进行初步研究。结果表明, 与混合果汁相比, 草莓菠萝酵素的总黄酮含量增加了 63%, 淀粉酶、总超氧化物歧化酶 (T-SOD) 和脂肪酶活力分别从  $0.076 \pm 0.005$ ,  $53.86 \pm 1.52$  和  $1.31 \pm 0.214$  U/mL 增加至  $0.086 \pm 0.006$ ,  $95.57 \pm 4.58$  和  $6.24 \pm 1.781$  U/mL, 但总糖、总酚、蛋白质和蛋白酶含量有所降低。在抗氧化研究中, 与对照相比, 草莓菠萝复合酵素对羟基自由基和超氧阴离子自由基的清除能力增强, 对 DPPH 自由基和 ABTS 自由基的清除能力减弱。在抑菌活性研究中, 与对照相比, 复合酵素对四种病原菌均有较强的抑菌能力, 且抑菌效果为金黄色葡萄球菌 ( $29.60 \pm 1.41$  mm) > 大肠杆菌 ( $29.33 \pm 1.66$  mm) > 绿脓杆菌 ( $27.67 \pm 1.34$  mm) > 枯草芽孢杆菌 ( $14.63 \pm 2.11$  mm)。本研究的开展有助于加深人们对于功能性食品的进一步认识, 对草莓菠萝复合酵素开发利用具有一定的应用价值。

**关键词:** 酵素; 复合发酵; 抗氧化活性; 抑菌能力; 酶活力

中图分类号: TS255.44

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2021)10-1635-09

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.10.002

## Study on constituents of strawberry-pineapple complex Jiaosu and its bioactivity *in vitro*

DUAN Xiao-yu<sup>1</sup>, ZENG Li<sup>1</sup>, FAN Rui<sup>1</sup>, ZHAO Zhi-qiao<sup>1</sup>,  
WAN Yu-jun<sup>2</sup>, CHEN Hui<sup>1</sup>, WANG Gong<sup>2</sup>, TANG Zi-zhong<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Life Science, Sichuan Agricultural University, Yaan 625014, China;

<sup>2</sup>Sichuan Food and Fermentation Industry Research & Design Institute, Chengdu 611130, China

**Abstract:** In order to make full use of the excess production of strawberries and pineapples. In this study, strawberry and pineapple mixed juice was used as a matrix, and wine yeast and *Lactobacillus bulgaricus* were used as combining starters cultures to obtain strawberry-pineapple complex Jiaosu. After the fermentation, the chemical composition, functional enzyme activity, antioxidant activity and antibacterial ability of strawberry-pineapple complex Jiaosu were studied with unfermented mixed fruit juice as a control. The results showed that the total flavonoid content of increased by 63%, and the activities of amylase, total superoxide dismutase (T-SOD) and lipase increased from  $0.076 \pm 0.005$ ,  $53.86 \pm 1.52$  and  $1.31 \pm 0.214$  U/mL to  $0.086 \pm 0.006$ ,  $95.57 \pm 4.58$  and  $6.24 \pm 1.781$  U/mL, respectively. The content of total sugar, total phenol, protein and protease activity was reduced, to a greater or lesser degree, compared with the mixed juice. In the antioxidant experiment, the strawberry-pineapple complex Jiaosu has enhanced scavenging ability of hydroxyl and superoxide anion free radicals, and weakened the scavenging ability of DPPH and ABTS free radicals compared with the control. In the antibacterial activity experiment, the strawberry-pineapple complex Jiaosu exhibited acceptable antibacterial activity against all tested pathogens, and the antibacterial effect is *Staphylococcus aureus* ( $29.60 \pm 1.41$  mm) > *Escherichia coli* ( $29.33 \pm 1.66$  mm) > *Pseudomonas aeruginosa* ( $27.67 \pm 1.34$  mm) > *Bacillus subtilis* ( $14.63 \pm 2.11$  mm) compared with the control. The development of this research is helpful to deepen people's further understanding of functional foods, and has certain application value for the development of

收稿日期: 2021-03-22 接受日期: 2021-08-05

基金项目: 四川省科技厅应用基础(重点)研发项目(2019YJ0549); 苗子工程培育项目(2019058); 四川省科技厅重点研发项目(2019YFG0154)

\* 通信作者 Tel: 86-015008311182; E-mail: 14126@sicau.edu.cn

strawberry-pineapple complex Jiaosu.

**Key words:** Jiaosu; compound fermentation; antioxidant activity; bacteriostatic ability; enzyme activity

草莓 (*Fragaria x ananassa* Duch.) 为蔷薇科蔷薇亚科草莓属宿根性多年生常绿草本植物, 其果肉富含维生素和微量元素, 具有很高的营养经济价值, 栽培面积和产量仅次于葡萄。菠萝又称凤梨 (*Ananas comosus* (L.) Merr.), 属于凤梨科凤梨属植物, 其主要生长在南美洲等热带地区, 属于世界第三大热带水果之一。但他们含水量较高, 不宜保存, 从而通过一定技术延长其货架期显得极为重要。

酵素最初起源于日本, 现今日日本酵素一年可达到 1 000 亿日元以上的市场量<sup>[1]</sup>。酵素是以一种或多种新鲜蔬菜、水果、菌菇、中草药等为原材料, 与多种益生菌混合培养, 最终发酵而成一种具有特定药理功能的液体或固体, 因其发酵产物具有较好的抗氧化能力、大分子物质分解能力、抗衰老作用, 而受到众多研究者的关注<sup>[2]</sup>。而水果酵素因其较好的生物活性逐渐成为热点, 在果蔬发酵中微生物的选择尤为重要, 如酵母菌 (yeast) 它能够提高食品营养价值, 而且在生长过程中能够产生一些保健调理的物质, 因此深受食品生产者的喜爱。而乳酸菌在发酵过程中能够产生大量的有机酸和醇类及各种氨基酸等代谢物, 具有抑制杂菌生长、促进消化吸收、防癌等生理功效<sup>[3,4]</sup>。水果果汁的浓度对发酵过程中产生酸性物质也有重要影响, 有研究表明, 当果汁加入量由 30% 增加到 50% 时, 其发酵产酸性物质效率明显增强。酸度过高会对味觉和口腔产生较大刺激, 而酸度过低则会影响酵素给人带来的愉悦感, 酸度作为衡量酵素发酵的一个重要指标, 将酸度控制在一定的范围内, 能有效提高酵素的风味。使用多种益生菌混合发酵可以进一步改善酵素的口感风味, 考虑用乳酸菌与酵母菌共同对进行发酵, 酵母菌发酵可以产生醇, 醇与酸反应会转化为酯, 从而改变饮品的风味, 提高饮品给人带来的舒适感。所以本研究采用保加利亚乳杆菌和果酒酵母复合菌种来发酵草莓菠萝, 以获得对人体具有更高营养价值的水果酵素。

近年来, 酵素制品已成为国际市场的主流, 目前我国酵素制品主要在河南一带发展较好, 但我国的酵素制品主要以单种蔬菜或者水果发酵占据主导。草莓和菠萝单独发酵获得的酵素产品已出现<sup>[5,6]</sup>, 但对其复合酵素笔者尚未见到。并且由于水果具有

含较多柠檬酸和易上火等特点, 所以笔者建议, 比起单一使用某种水果, 将不同种类的水果混合搭配。合理的搭配, 可以更加全面的改善身体状况。所以开发新型独特的菠萝草莓复合酵素制品具有良好的市场前景。因此, 本研究以草莓菠萝混合果汁为原料, 同时添加酵母菌和保加利亚乳杆菌发酵制备酵素, 并对其发酵前后的化学成分含量、功效酶活力、抗氧化活性和抑菌能力进行初步研究, 旨在提高草莓和菠萝的附加值并生产一种具有更高营养价值的复合酵素产品。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

新鲜草莓和菠萝市售; 果酒酵母、保加利亚乳杆菌 (*Lactobacillus bulgaricus*) (四川省食品发酵工业研究设计院); 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌 (*Bacillus coli*) (四川农业大学生命科学院发酵工程实验室)。

### 1.2 试剂与培养基

1,1-二苯基-2-苦基肼 (DPPH) (上海源叶生物有限公司); 水杨酸 (成都科龙化工试剂有限公司); 邻苯三酚 (四川西陇化工有限公司); 酚酶试剂盒和总超氧化物歧化酶试剂盒 (南京建成生物工程研究所)。其他试剂均为国产分析纯。

LB 培养基 (液体): 蛋白胨 1 g, 酵母粉 0.5 g, NaCl 1 g, 水 100 mL, 121 °C 灭菌 30 min; 固体培养基在每 100 mL 液体培养基中加 1.7 g 琼脂粉。

### 1.3 仪器与设备

DK-8D 电热恒温水槽 (上海三发科学仪器有限公司); XZ18K-T 高速冷冻离心机 (长沙湘智离心机仪器有限公司); Multiskan Sky 酶标仪 (上海合商科学仪器有限公司); HZQ-F160 振荡培养箱 (哈尔滨市东联电子技术开发有限公司)。其他均为实验室常规仪器。

### 1.4 方法

#### 1.4.1 酵素制作工艺

挑选新鲜无坏的草莓和菠萝。在无菌条件下取其果肉, 对果肉进行切块处理, 将处理好的果肉装入已灭菌的榨汁机中榨汁, 将榨汁完成的果肉按照 1:1 的比例的装入无菌发酵瓶中, 再往发酵瓶中依次加

入无菌水、白砂糖、酵母菌、保加利亚乳杆菌,密封复合发酵6个月后获得草莓菠萝复合酵素。

#### 1.4.2 草莓菠萝复合酵素化学成分研究

##### 1.4.2.1 草莓菠萝复合酵素总糖研究

参考文献<sup>[7]</sup>,吸取2 mL不同浓度梯度(0~0.7 mg/mL)葡萄糖标准溶液,分别置入8只已标号的25 mL比色管中,加1.5 mL 3,5-二硝基水杨酸(DNS)溶液,混合均匀后于100℃水浴锅中水浴加热5 min,取出,冷却至室温,用水稀释至25 mL,采用酶标仪于520 nm处测定吸光度,0号管为空白。以葡萄糖浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线为 $y = 0.7696x - 0.0078$ ,  $R^2 = 0.9955$ 。

取0.5 mL酵素液,加入2 mL 6 mol/L的盐酸溶液,沸水浴15 min,冷却后加入1.8 mL 6 mol/L氢氧化钠溶液,取2 mL液体于25 mL容量瓶中,后续步骤同标曲测定一样。按照标准曲线线性方程 $y = 0.7696x - 0.0078$ ,  $R^2 = 0.9955$ 计算出总糖含量。

##### 1.4.2.2 草莓菠萝复合酵素总酚研究

参考文献<sup>[7]</sup>,取8支已标号的20 mL比色管,分别加入0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 mL的没食子酸标准液,用蒸馏水稀释至比色管10 mL刻度线,每管加1 mL Folin试剂及2 mL 20%  $\text{NaCO}_3$ ,于100℃水浴锅中水浴加热1 min,冷却并用水稀释至20 mL刻度线,室温放置30 min,采用酶标仪在波长为650 nm时,测定吸光度A为横坐标,浓度为纵坐标,绘制标准曲线为 $y = 15.8991x - 0.2021$ ,  $R^2 = 0.9935$ 。

取0.5 mL酵素液,后续步骤同标曲测定一样。总酚含量以没食子酸计,按标准曲线方程 $y = 15.8991x - 0.2021$ ,  $R^2 = 0.9935$ 计算总酚含量。

##### 1.4.2.3 草莓菠萝复合酵素总黄酮研究

参考文献<sup>[8]</sup>,吸取0.2 mg/mL芦丁标准液0~0.50 mL于6支干净试管中,分别加入2.5 mL 70%乙醇,0.15 mL 5%的 $\text{NaNO}_2$ 溶液,混合均匀在室温下静置6 min;随后加入0.3 mL 10%的 $\text{AlCl}_3$ 溶液摇匀静置5 min;再加入1.00 mL的1 mol/L的NaOH溶液;最后补水至总体积为5.00 mL,振荡均匀;于370 nm测定各管的吸光值。以吸光度(A)作为纵坐标,芦丁浓度作为横坐标,绘制标准曲线 $y = 1.3505x - 0.00441$ ,  $R^2 = 0.9952$ 。

准确吸取0.5 mL酵素液;后续步骤同标曲测定一样。按标准曲线方程 $y = 1.3505x - 0.00441$ ,  $R^2 = 0.9952$ 计算总黄酮含量。

#### 1.4.2.4 蛋白质的测定

参照Chen等方法<sup>[9]</sup>测定草莓菠萝复合酵素发酵液中蛋白质含量。以牛血清蛋白浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制线性方程 $y = 0.0055x + 0.064$ ,  $R^2 = 0.9994$ 。

#### 1.4.3 功效酶活力的测定

##### 1.4.3.1 淀粉酶和T-SOD活力测定

淀粉酶和T-SOD分别严格参照碘-淀粉比色法的试剂盒和总超氧化物歧化酶活力测定试剂盒的操作步骤进行。

##### 1.4.3.2 蛋白酶活力测定

借鉴酪蛋白消化法测定酶活性<sup>[10]</sup>,使用公式(1)计算蛋白酶活力值。

$$\text{蛋白酶活力 (U/mL)} = AK \times 4 / 10 \times N \quad (1)$$

式中:A为实验组酵素液的吸光度;K为吸光度等于1时酪氨酸的量;4为反应溶液的总容积,mL;10为反应时间,min;N酶液稀释总倍数。

##### 1.4.3.3 脂肪酶活力测定

参考Dong等<sup>[11]</sup>的方法测定脂肪酶活力,使用公式(2)计算脂肪酶活力值。

$$X = (B - A) \times C / 0.05 \times 50 \times 1 / 15 \times n = 200 / 3 \times (B - A) \times C \times n \quad (2)$$

式中:X为样品的酶活力,U/mL;B为滴定样品时消耗氢氧化钠标准溶液的体积,mL;A为滴定空白时消耗氢氧化钠标准溶液的体积,mL;C为氢氧化钠标准溶液浓度,mol/L;0.05为氢氧化钠标准溶液浓度换算系数;50为0.05 mol/L氢氧化钠溶液1.00 mL相当于脂肪酸50  $\mu\text{mol}$ ;1/15为反应时间15 min,以1 min计;n为稀释倍数。

#### 1.4.4 草莓菠萝复合酵素抗氧化活性测定

##### 1.4.4.1 对DPPH自由基清除能力的测定

在酶标板上,按样品稀释倍数梯度,分别加入0.2 mmol/L DPPH-乙醇溶液100  $\mu\text{L}$ 和梯度样品溶液100  $\mu\text{L}$ 混匀,室温避光静置30 min后,于 $\lambda = 517$  nm处测OD值,以无水乙醇作调零。每组做三个平行组,使用公式(3)计算DPPH自由基清除率。

$$\text{DPPH自由基清除率} = [(A_1 - A_2) / A_1] \times 100\% \quad (3)$$

式中: $A_1$ 为对照组吸光度; $A_2$ 为样品组吸光度。

##### 1.4.4.2 对OH自由基清除能力的测定

参照Yao等<sup>[12]</sup>的方法测定酵素对OH自由基清除能力,使用公式(4)计算OH自由基清除率。

$$\text{OH自由基清除率} = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100\% \quad (4)$$

式中: $A_1$ 为样品组吸光度; $A_2$ 为本底吸光度; $A_0$

为空白对照吸光度。

#### 1.4.4.3 对 ABTS 自由基清除能力的测定

实验前用无水乙醇稀释 ABTS 储备液至吸光度 A 为  $7 \pm 0.02$ 。取 10 mL EP 管编号,分别加入 1 mL ABTS 溶液和 100  $\mu\text{L}$  梯度样品溶液混匀,静置 6 min,吸取上清液 200  $\mu\text{L}$  在酶标板上进行点样,以无水乙醇作为空白对照,在  $\lambda = 734 \text{ nm}$  处测量各实验组的吸光度。每组做三个平行组,使用公式(5)计算 ABTS 自由基清除率。

$$\text{ABTS 自由基清除率} = [(A_1 - A_2) / A_1] \times 100\% \quad (5)$$

式中: $A_1$  为对照组吸光度; $A_2$  为样品组吸光度。

#### 1.4.4.4 对超氧阴离子自由基清除能力的测定

取 10 mL EP 管编号,分别加入 3 mL 的浓度为 0.05 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(pH 8.2)和不同稀释浓度的酵素样品 1 mL,充分混合均匀在 25  $^{\circ}\text{C}$  的恒温水浴锅中水浴 20 min 后,加入同样预温至 25  $^{\circ}\text{C}$  的 25 mmol/L 的邻苯三酚 0.4 mL,混合均匀后反应 4 min,最后加入 0.5 mL 浓盐酸终止反应,在 325 nm 处测吸光度值  $A_1$ ,以蒸馏水代替样品,同样条件反应测  $A_2$ ,蒸馏水调零。每组作三个平行,使用公式(6)计算超氧阴离子自由基清除率。

$$\text{超氧阴离子自由基清除率} = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100\% \quad (6)$$

式中: $A_1$  为样品组吸光度; $A_2$  为本底吸光度; $A_0$  为空白对照吸光度。

#### 1.4.5 草莓菠萝复合酵素体外抑菌活性研究

本研究以枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和绿脓杆菌四种病原菌为指示菌,根据实验测量得到的抑菌圈直径大小来评估样品对不同病原菌的抑菌能力。取直径 85.00 mm 左右平板,每个平板倒入 15 mL 完成配置的 LB 琼脂备用。取 200  $\mu\text{L}$  病原菌悬液,用无菌曲玻棒使之均匀铺于培养基表面,然后将灭菌牛津杯(内径 6.00 mm,外径 7.80 mm,高 10.00 mm)置于平板内,每板 3 只。用灭菌移液器分别将 200  $\mu\text{L}$  样品液、200  $\mu\text{L}$  10 mg/mL 氨苄青霉素工作液(阳性对照)和 200  $\mu\text{L}$  无菌水(阴性对照)注入牛津杯内,将平碟盖好,置于 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温箱培养 24 h 后用游标卡尺(精度为 0.02 mm)量取抑菌圈大小,观察抑菌效果。平行实验三次,测量实验抑菌圈的直径,取三次平行实验结果的平均值作为最终结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 草莓菠萝复合酵素功能营养成分

酵素品质的好坏与其内所含的化学成分密切相

关。如图 1 所示,发酵 6 个月后获得的草莓菠萝酵素中总糖、总酚和蛋白质的含量分别从起初的  $0.65 \pm 0.044$ 、 $0.06 \pm 0.002$  和  $0.10 \pm 0.005 \text{ mg/mL}$  降低了 75%、50% 和 80%。发酵过程中,微生物一般利用原料中的蔗糖、葡萄糖和果糖等单糖或双糖作为碳源。在发酵初期,微生物会利用水果自身的糖类和外源糖类进行生理活动,在适宜的发酵条件下微生物繁殖较快,并通过一系列代谢反应消耗了大量的可溶性糖,从而使总糖含量下降。从理论上讲,作为抗氧化物质的总酚,其在发酵过程中的含量应该表现为先上升后下降的趋势。因为发酵前期原料中酚类物质溶出,而随着发酵的进行,在有氧情况下被发酵液中酚类会被多酚氧化酶氧化,从而使酵素中总酚含量的降低。Yang 等<sup>[13]</sup>在苹果酵素的研究中发现,总酚含量在发酵第 21 天达到最大值,之后持续下降。总酚含量的减少的可能是因为酚类化合物与发酵液中的蛋白质结合或吸附起来形成沉淀,导致离心后的酵素液中总酚含量变少或者是因为酚类化合物可以和发酵液中的有机酸发生反应,生成其他物质<sup>[14]</sup>。研究也表明,在发酵过程中一定浓度的酚类物质会抑制微生物的生长代谢,而微生物为了维持自身生长会降解酚类,从而使总酚含量降低<sup>[13]</sup>。发酵后期蛋白质对微生物的生理活动极为重要,此时糖类基本已耗尽,蛋白质作为氮源被微生物利用,也有可能是在发酵过程中,微生物通过代谢活动产生蛋白酶,从而导致蛋白质含量的降低。在微生物的生长过程中,时常伴随着活性肽、短链脂肪酸和多糖等物质生成,糖类物质和营养物质减少,酚类

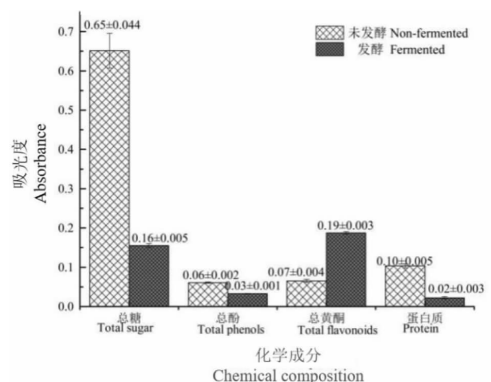


图 1 草莓菠萝复合酵素化学成分

Fig. 1 Chemical constituents of strawberry-pineapple complex Jiaosu

注:未发酵指草莓菠萝混合果汁;发酵指草莓菠萝酵素,下同。

Note: Unfermented means strawberry and pineapple mixed juice; Fermentation refers to strawberry-pineapple Jiaosu. The same below.

物质被分解利用,最终转化为具有附加生物价值的物质如黄酮等具有良好生物活性的物质<sup>[15]</sup>,所以复合酵素中用来表征酵素抗氧化活性的一个重要指标黄酮类化合物从最初的  $0.07 \pm 0.004 \text{ mg/mL}$  提高了 63%。黄酮类化合物因结构的不同而具有不同的生理功能,当作为抗氧化剂时,可以提高机体清除自由基能力,减少组织细胞的氧化损伤并且可以调节 DNA、蛋白质等物质的合成,免受衰老因子的损伤;当作为信号因子时,可以调节基因表达,改善衰老机体代谢情况<sup>[15]</sup>。因此,在草莓菠萝复合酵素中黄酮类化合物含量的上升的情况下,我们可以初步推测其具有清除体内自由基、延缓衰老的潜能。

## 2.2 草莓菠萝复合酵素的功效酶

蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶可以将大分子的蛋白质、脂肪和淀粉分解为小分子物质,从而更有利于肠胃消化吸收;而具有抗氧化作用的一种金属酶 SOD 可以清除机体产生的超氧阴离子,使后者发生歧化反应产生对机体无害的氧气和过氧化氢。由图 2 可知,发酵 6 个月后,草莓菠萝复合酵素中的淀粉酶、T-SOD 和脂肪酶分别由起初的  $0.076 \pm 0.005$ 、 $53.86 \pm 1.52$  和  $1.31 \pm 0.214 \text{ U/mL}$  增加至  $0.086 \pm 0.006$ 、 $95.57 \pm 4.58$  和  $6.24 \pm 1.781 \text{ U/mL}$ 。与 Wang<sup>[16]</sup>、Zhang<sup>[17]</sup> 等对青梅酵素和市售酵素的 SOD 活性测定分别为  $75.64 \text{ U/mL}$  和  $41.7 \text{ U/mL}$  相比,草莓菠萝复合酵素的 SOD 酶活力更高。并且在发酵后,T-SOD 活力接近增加了一倍,因此本研究所得的复合酵素在体内具有很好的清除自由基的能力,具有很好的保健和美容功效;与 Dong 等<sup>[11]</sup> 对火龙果酵素的脂肪酶活力测  $1.8 \pm 0.3 \text{ U/mL}$  相比,草莓菠萝复合酵素的脂肪酶活力较高,这说明草莓菠萝复合酵素对脂肪的消化能力更强。所以草莓菠萝复合酵素在医药、美容行业具有很大的推广应用价值。但其蛋白酶活力由起初的  $57.14 \pm 4.45 \text{ U/mL}$  降低到  $2.67 \pm 0.57 \text{ U/mL}$ ,这便与前面蛋白质含量变化所一致,即蛋白酶活力的下降减少了对样品中蛋白质的分解能力,从而使其含量增加。分析原因可能是发酵过程中加入的酵母菌与乳酸菌大规模生长导致酵素 pH 值急剧下降,最终导致蛋白酶活力大幅度降低。

## 2.3 草莓菠萝复合酵素的体外生物学活性研究

### 2.3.1 草莓菠萝复合酵素对 DPPH 自由基的清除能力

本研究将发酵前后的样品用溶剂稀释成一定的

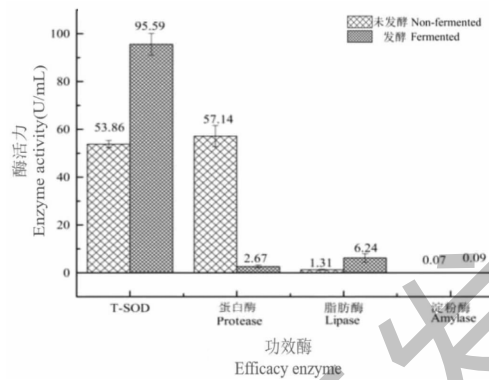


图 2 草莓菠萝复合酵素功效酶活力

Fig. 2 Efficacy enzyme activity of strawberry-pineapple complex Jiaosu

体积浓度梯度(0.8% ~ 10.4%),由图 3 可知,各样品随着其体积浓度的增加对 DPPH 自由基(DPPH·)的清除能力也有所增加。发酵前样品对 DPPH 自由基的清除能力从  $6.44\% \pm 0.88\%$  增加至  $96.24\% \pm 0.305\%$ ,发酵后的草莓菠萝酵素对 DPPH 自由基的清除能力从  $61.18\% \pm 0.23\%$  降低至  $14.14\% \pm 3.08\%$ 。因此我们发现在微生物的生长过程中,样品中对 DPPH 自由基具有清除能力的物质被分解或消耗。Chen 等<sup>[5]</sup>研究草莓酵素的抗氧化性变化发现酵素液对 DPPH 自由基清除率与发酵液中总酚含量具有相似的变化趋势,说明酵素对 DPPH 自由基的清除能力与酚酸类化合物之间有一定的相关性。所以发酵降低了样品对 DPPH 自由基的清除能力可能与发酵过程中酵素液中总酚含量下降有关。

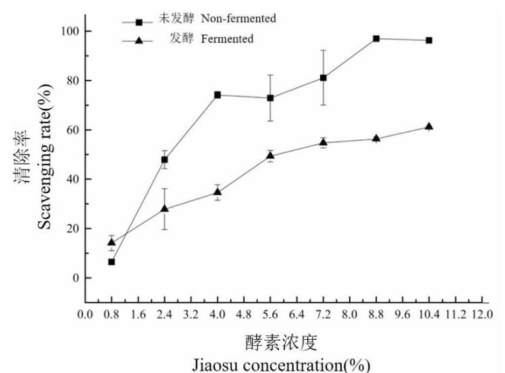


图 3 草莓菠萝复合酵素对 DPPH 自由基的清除能力

Fig. 3 Scavenging activity of strawberry-pineapple complex Jiaosu on DPPH·

### 2.3.2 草莓菠萝复合酵素对 OH 自由基的清除作用

OH 自由基( $\cdot\text{OH}$ )是活性氧中化学性质最活泼的自由基,它能够与活细胞中大多数具有还原性

的生物大分子发生剧烈反应,是对机体危害最大的自由基。由图4可知,在实验浓度范围内(2%~14%),样品对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率呈浓度依赖性。发酵前样品对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力从 $34.10\% \pm 0.46\%$ 增加至 $59.99\% \pm 2.16\%$ ,发酵后的草莓菠萝酵素对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力 $26.74\% \pm 3.04\%$ 增加至 $85.91\% \pm 2.69\%$ 。Ng等<sup>[18]</sup>研究表明,黄酮类化合物对 $\cdot\text{OH}$ 有较好的清除能力,其清除能力的强弱取决于芳香环上羟基的数目和位置。由图1可知草莓菠萝酵素发酵后总黄酮含量提升为发酵前的三倍,在发酵过程中可能由于微生物的生长使发酵液中的酚类物质转化为黄酮类物质,同时导致了黄酮类化合物芳香环上羟基的数目和位置发生相应改变,最终使发酵后酵素对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率变高。

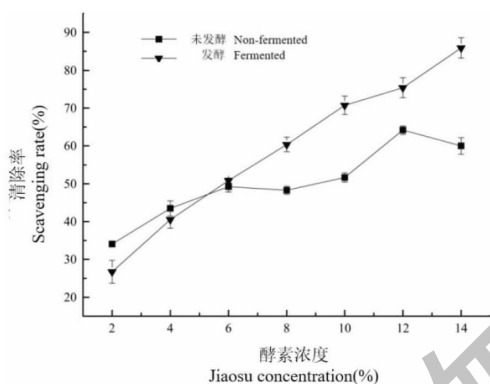


图4 草莓菠萝复合酵素对 $\text{OH}$ 自由基的清除能力

Fig. 4 Scavenging activity of strawberry-pineapple complex Jiaosu on  $\cdot\text{OH}$

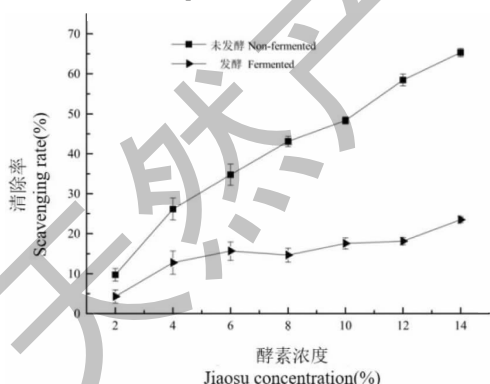


图5 草莓菠萝复合酵素对 $\text{ABTS}$ 自由基的清除能力

Fig. 5 Scavenging activity of strawberry-pineapple complex Jiaosu on  $\text{ABTS}^{+\cdot}$

### 2.3.3 草莓菠萝复合酵素对 $\text{ABTS}$ 自由基的清除作用

$\text{ABTS}$  自由基( $\text{ABTS}^{+\cdot}$ )清除法被广泛用于生

物样品的总抗氧化能力测定。在反应体系中, $\text{ABTS}$ 经氧化后生成相对稳定的蓝绿色的 $\text{ABTS}$ 水溶性自由基,当其遇到自由基清除剂时, $\text{ABTS}$ 的颜色变浅,特征吸光度降低,吸光度越低。因此,通过测定吸光度的变化来体现对 $\text{ABTS}$ 自由基的清除效果,结果见图5。

由图5可知,在 $\text{ABTS}$ 测试体系中未发酵的样品和发酵后的草莓菠萝复合酵素清除 $\text{ABTS}$ 自由基能力的差异显著。当体积浓度为2%时,未发酵的样品对 $\text{ABTS}$ 自由基清除率为 $9.74\% \pm 1.60\%$ ,而发酵后的草莓菠萝复合酵素对 $\text{ABTS}$ 自由基的清除率为 $4.28\% \pm 1.63\%$ ;且当体积浓度为14%时,未发酵样品的清除率 $65.32\% \pm 1.06\%$ 仍强于草莓菠萝酵素的清除能力 $23.52\% \pm 0.75\%$ 。Jiang等<sup>[19]</sup>对葡萄糖素天然发酵过程中体外抗氧化活性研究发现,总酚含量与 $\text{ABTS}$ 自由基清除能力具有显著的相关性。发酵过程中 $\text{ABTS}$ 自由基清除能力的变化可能与总酚含量的变化有关。由图1可知,未发酵样品中总酚含量为发酵后样品的两倍,且未发酵样品对 $\text{ABTS}$ 自由基的清除能力约为发酵后样品的两倍,所以发酵后酵素对 $\text{ABTS}$ 自由基清除能力下降可能是由于微生物的生长使发酵液中的酚类物质被分解,导致酚类物质的产量小于消耗量,最终体现为发酵后样品对 $\text{ABTS}$ 自由基清除能力下降。

### 2.3.4 草莓菠萝复合酵素对超氧阴离子自由基的清除作用

超氧阴离子自由基( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )作为生物体代谢过程中产生的一种自由基,可攻击生物大分子,且与机体的衰老和疾病有关,与 $\cdot\text{OH}$ 反应后的产物可能会导致细胞DNA出现损坏并且破坏人类机体中的酶或活性物质,现阶段科学家们十分注重清除超氧阴离子自由基的研究。

由图6知,发酵后草莓菠萝复合酵素对超氧阴离子清除能力远远强于未发酵的样品。当体积浓度为10%时,未发酵样品对超氧阴离子的清除率为 $26.75\% \pm 1.54\%$ ,而此时草莓菠萝复合酵素的清除率已达到 $79.72\% \pm 1.17\%$ 。随着体积浓度的增加(20%~70%),未发酵样品对自由基的清除率与体积浓度呈正相关,而复合酵素对超氧阴离子的清除能力趋于平稳状态。当体积浓度达到最大(70%)时,两者的清除率分别为 $45.58\% \pm 1.77\%$ 和 $98.34\% \pm 0.57\%$ 。Zhang等<sup>[20]</sup>研究表明,随着苯环上羟基数目的增加,黄酮类化合物抑制超氧阴离子



的能力增强,并且 SOD 对清除超氧阴离子自由基也有着重要作用。由图 2 可知发酵后草莓菠萝复合酵素中 T-SOD 活力增加了近一倍,所以样品发酵后对超氧阴离子自由基的清除能力大幅提升可能与发酵过程中微生物产生大量 SOD 和多羟基取代或 3 羟基取代的黄酮类化合物的大量合成有关。

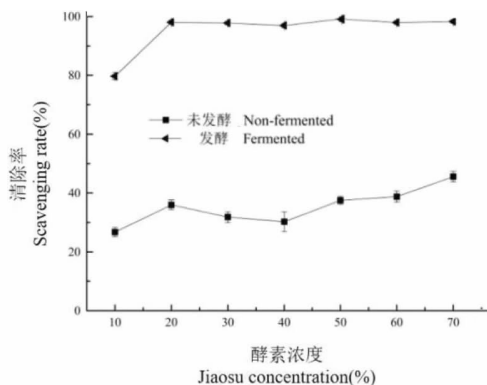


图 6 草莓菠萝复合酵素对超氧阴离子自由基的清除能力

Fig. 6 Scavenging activity of strawberry-pineapple complex Jiaosu on O<sub>2</sub><sup>·-</sup>

本研究采用常见的四种自由基体系对发酵前后的草莓菠萝复合酵素体外抗氧化能力进行较为全面的研究。结果发现,与对照相比,草莓菠萝酵素对羟自由基和超氧阴离子自由基的清除能力增强,对

DPPH 和 ABTS 自由基的清除能力减弱。复合酵素对不同自由基清除效果表现出差异,这是因为抗氧化剂化合物可以通过不同的机制,在反应基质中每个有其特定的目标。因此,在各种化学测试不同的化学反应活性可能导致不同程度的抗氧化能力<sup>[21]</sup>。

### 2.4 草莓菠萝复合酵素的抑菌活性

如图 7 所示,发酵前的样品对四种病原菌均无抑菌能力而发酵后的草莓菠萝复合酵素对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌和枯草芽孢杆菌均有一定的抑制效果,且抑菌效果为金黄色葡萄球菌 (29.60 ± 1.41 mm) > 大肠杆菌 (29.33 ± 1.66 mm) > 绿脓杆菌 (27.67 ± 1.34 mm) > 枯草芽孢杆菌 (14.63 ± 2.11 mm)。发酵后样品抑菌能力增加可能与发酵过程中醋酸、皂苷和硫化物等物质的产生有关<sup>[22,23]</sup>,而且也可能与乳酸菌合成具有抗菌性能的代谢产物如乳酸和乙酸、脂肪酸、过氧化氢或双乙酰以及抗菌蛋白如细菌素肽聚糖水解酶等发挥抗菌作用有关<sup>[24]</sup>;而对革兰氏阴性菌(大肠杆菌)和革兰氏阳性菌(金黄色葡萄球菌)的抗菌活性较强,主要是由于有机酸中存在乙酸所致<sup>[25]</sup>。枯草芽孢杆菌细胞壁表面附有荚膜且能产生孢子,由此推测,具有抑菌特性的生物活性物质很难穿过荚膜作用于细菌内部,所以草莓菠萝复合酵素对枯草芽孢杆菌的抑制效果最弱。

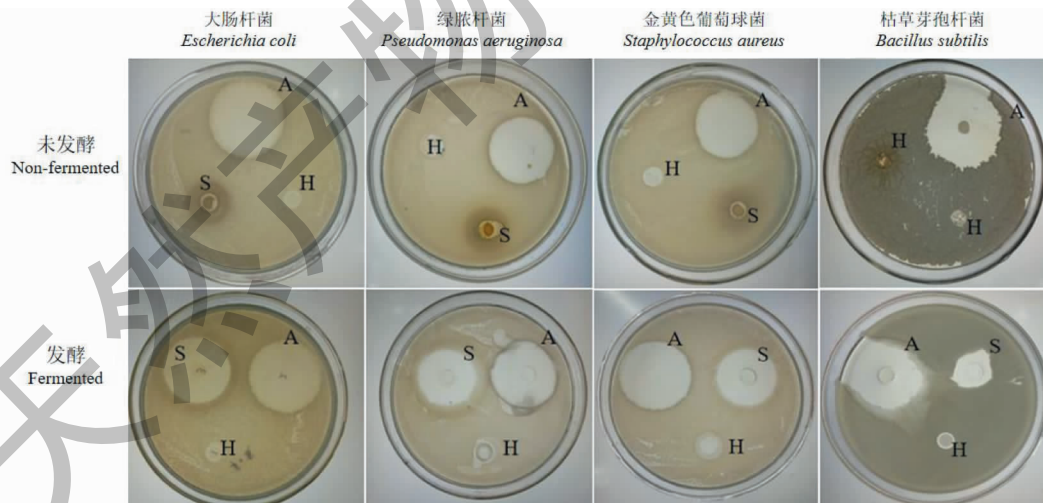


图 7 发酵前后草莓菠萝复合酵素的抑菌实验

Fig. 7 Inhibition experiment of strawberry-pineapple complex Jiaosu on bacteria

注:A:10 mg/mL 氨苄青霉素;S:样品液;H:无菌水。Note:A:10 mg/mL ampicillin;S:Sample solution;H:Sterile water.

### 3 结论

本实验通过乳酸菌和酵母菌复合发酵让发酵过程中产生的酸类物质和醇类物质尽量中和,使复合

酵素口味和风味都得到了改善。复合发酵后草莓菠萝复合酵素中总黄酮含量提升 1.5 倍,对羟自由基和超氧阴离子自由基的清除能力均有较大提升,

10.4%的草莓菠萝复合酵素对 DPPH 自由基的清除率达到 58%,与 Chen<sup>[5]</sup>报道的发酵 30 天后的草莓酵素对 DPPH 自由基的清除率相当,14%的草莓菠萝复合酵素对 ·OH 的清除率高达 88%,而 Zhao<sup>[6]</sup>报道的 56%菠萝酵素对 ·OH 的清除率仅有 60%左右,与 Chen<sup>[5]</sup>对草莓酵素发酵后的羟自由基清除作用测定为除率达到最高值 76.44%相比,草莓菠萝复合酵素的羟自由基清除率更高,20%的草莓菠萝酵素对超氧阴离子自由基的清除率已达 100%,而 Zhao<sup>[6]</sup>报道的 70%的菠萝酵素对超氧阴离子自由基的清除率不到 90%,并且在发酵后其 T-SOD 活力接近增加了一倍,脂肪酶活力大幅度提升。以上说明草莓菠萝复合酵素与草莓酵素和菠萝酵素相比具有更好的清除自由基的能力,能够在保健和美容方面发挥较好功效。草莓菠萝复合酵素融合了草莓和菠萝这两种水果各自的特性,取长补短,可以更全面地调理使用者身体。因此这种新型功能性酵素饮料不仅对人体清除自由基、分解大分子物质上具有一定的效果,而且在医药研发和化妆品等领域具有一定的推广应用价值,除此之外其还有助于加深人们对于天然功能性食品的进一步认识。

#### 参考文献

- 1 Wei SJ, Liu T, Ge YZ, et al. Study on changes in the biochemical indicators and antioxidant activity of broccoli enzyme during fermentation[J]. Mod Food Sci Technol(现代食品科技), 2017, 33(8):123-129.
- 2 Qi H, Zhao JM, Gao XQ, et al. Development status of functional fermented enzymes[J]. Sci Technol Food Ind(食品工业科技), 2019, 40(1):337-345.
- 3 Rodríguez H, Curiel JA, Landete JM, et al. Food phenolics and lactic acid bacteria[J]. Int J Food Microbiol, 2009, 132(2,3):79-90.
- 4 Marsh AJ, Hill C, Ross RP, et al. Fermented beverages with health-promoting potential: past and future perspectives[J]. Trends Food Sci Technol, 2014, 38(2):113-124.
- 5 Chen XW, Cheng YJ, Jiang LX, et al. Studies on the changes of metabolites and antioxidant activity during the fermentation process of strawberry Jiaosu[J]. J Chin Inst Food Sci Technol(中国食品学报), 2020, 20(5):157-165.
- 6 Zhao ZQ, Zeng L, Wan YJ, et al. Study on the bioactivity of pineapple Jiaosu fermented by yeast and *Lactobacillus plantarum*[J]. Food Ferment Ind(食品与发酵工业), 2020, 46(7):110-115.
- 7 Song J. The study on fermentation process optimization of fer-

- ment[D]. Taiyuan: Shanxi University(山西大学), 2017.
- 8 Wei SJ. The research on fermentation process of mulberry Jiaosu and biotransformation of anthocyanins[D]. Guangzhou: South China University of Technology(华南理工大学), 2018.
- 9 Cheng YJ, Chen XW, Jiang LX, et al. Evaluation of changes in amino acids in fermented Jiaosu of *Cudrania tricuspidata* green fruits with different fermentation periods[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2018, 30:1402-1409.
- 10 Benefo EO, Ofosu IW. Bromelain activity of waste parts of two pineapple varieties[J]. Sustain Food Pro, 2018, 2:21-28.
- 11 Dong YL, He CF, Wang L, et al. Study on the bioactivity of pitaya enzyme[J]. Food Sci Technol(食品科技), 2009, 34(3):192-196.
- 12 Yao D, Xu L, Li JH. Correlation research on antioxidant activity and microbial diversity of three Jiaosu[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2020, 32:928-936.
- 13 Yang XX, Zhou JC, Chen QM, et al. Changes in metabolites during natural fermentation of apple into enzyme drink[J]. Food Sci(食品科学), 2017, 38(24):15-19.
- 14 Yan S. Isolation and identification of dominant Strains of Fruit enzymes after natural fermentation and study on efficacy characteristics of their metabolites[D]. Changsha: Central South University of Forestry and Technology(中南林业科技大学), 2019.
- 15 Malaterre SA, Remize F, Poucheret P. Fruits and vegetables, as a source of nutritional compounds and phytochemicals: Changes in bioactive compounds during lactic fermentation[J]. Food Res Int, 2018, 104:86-99.
- 16 Wang H, Ma XM, Zhang Y. Bioactivity and inhibition effects of greengage ferment[J]. Sci Technol Food Ind(食品工业科技), 2018, 12:39-43.
- 17 Zhang MM, Liu F, Hu KD, et al. Analysis on microorganism index, main enzymes and organic acids of leaven food[J]. Food Ferment Ind(食品与发酵工业), 2017, 9:195-200.
- 18 Ng CC, Wang CY, Wang YP, et al. Lactic acid bacterial fermentation on the production of functional antioxidant herbal *Anoectochilus formosanus* Hayata[J]. J Biosci Bioeng, 2011, 111:289-293.
- 19 Jiang ZL, Liu XQ, Wang ZZ, et al. Analysis of organic acids and *in vitro* antioxidant activity of grape-ferment[J]. J Chin Inst Food Sci Technol(中国食品学报), 2017, 17(5):255-262.
- 20 Zhang L, Lu WM. Study on the relationship of antioxidant activity with structure on flavonoids as scavengers of superoxide anion[J]. J Zhejiang Univ: Sci(浙江大学学报:理学版), 2006, 33:187.