PPO 酶促诱发因素对苹果多酚非酶褐变的影响

易建华，董新玲，朱振宝

（陕西科技大学生命科学与工程学院，陕西西安 710021）

摘要：为探究苹果多酚氧化酶(PPO)酶促诱发因素对苹果多酚参与的非酶褐变的影响，以绿原酸和根皮苷为底物，以磷酸缓冲液为苹果汁模拟体系，通过控制 PPO 酶促诱发条件，进行酶促诱发反应，然后钝化酶，模拟体系于 60 ℃进行非酶聚合反应，每隔 24 h 用色差计测定 L^*值、a^*值、b^*值和 ΔE^*值。结果表明，酶促诱发因素对绿原酸和根皮苷参与的非酶褐变的影响存在较大差异。pH 在 3.5~6.0，含有绿原酸和根皮苷的模拟体系，其褐变程度随酶促诱发 pH 升高而增大；酶促诱发温度 20~60 ℃，诱发体系温度对绿原酸参与的非酶褐变影响不显著，而根皮苷在 40 ℃时褐变程度较大；酶促诱发时间分别为 40 min 和 30 min 时绿原酸和根皮苷参与的非酶褐变程度较大；酶活 14.25~171 U，酶活的增大加速两种多酚参与的非酶褐变。结果同时表明，根皮苷非酶褐变与果汁后浑浊有关，且较高的 pH、温度、PPO 酶活以及较长的酶促诱发时间加速果汁后浑浊形成。

关键词：绿原酸；根皮苷；多酚氧化酶；苹果汁；非酶褐变

文章篇号：1673-9078(2015)2-119-127 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.2.021

Effect of Polyphenol Oxidase (PPO) Enzymatic Inducing Factors on Non-enzymatic Browning of Apple Polyphenols

YI Jian-hua, DONG Xin-ling, ZHU Zhen-bao

(College of Life Science and Engineering, Shaanxi University of Science and Technology, Xi'an 710021, China)

Abstract: In order to study the effects of apple polyphenol oxidase (PPO) enzymatic inducing factors on the non-enzymatic browning of apple polyphenols, chlorogenic acid and phlorizin were used as reaction substrates, and phosphate buffer was used as the model apple juice system to carry out enzymatic induction under controlled enzymatic induction conditions. Subsequently, the enzyme was deactivated, and the non-enzymatic polymerization in the model apple juice system was carried out at 60 ℃; L^*, a^*, b^*, and $\triangle E^*$ values were measured using a colorimeter every 24 h. The results showed that significant differences were found in the impacts of enzymatic inducing factors on the non-enzymatic browning involving chlorogenic acid and phlorizin. In the 3.5~6.0 pH range, the degree of browning in the model juice system containing chlorogenic acid and phlorizin increased with increasing pH values. When the temperature of enzymatic induction was between 20 and 60 ℃, the temperature of the inducing system had no significant effect on the non-enzymatic browning involving chlorogenic acid, while the degree of non-enzymatic browning in the model juice using phlorizin was higher at 40 ℃. A higher degree of non-enzymatic browning was achieved for the model juice using chlorogenic acid and phlorizin when the durations of enzymatic induction were 40 and 30 min, respectively. When the PPO activity was in the range of 14.25~171 U, the increasing enzymatic activity could accelerate the non-enzymatic browning involving chlorogenic acid and phlorizin. Meanwhile, the results indicated that non-enzymatic browning involving phlorizin was related to the haze occurring in apple juice, and the development of the haze in apple juice could be accelerated by increasing the pH, temperature, PPO activities, and duration of enzymatic induction.

Key words: chlorogenic acid; phlorizin; apple polyphenol oxidase; apple juice; non-enzymatic browning

中国是苹果汁生产和出口大国，但褐变至今是困扰中国苹果汁加工业的主要质量问题，也是果蔬加工业普遍存在的四大关键性技术难题之一[1]。果汁褐变严重影响产品的质量，降低了果汁市场竞争力，成为我国苹果汁出口的障碍之一[2]。因此，如何控制褐变，提高苹果汁品质，对提升我国苹果汁市场竞争力，具有极为重要的意义。

苹果汁褐变包括酶促褐变和非酶褐变[3]。酶促褐变是苹果汁加工过程中主要褐变形式，有关其反应机制已得到广泛研究[4]。苹果汁非酶褐变包括多酚氧化聚合反应、美拉德反应、焦糖化反应和抗坏血酸氧化

收稿日期：2014-06-24

基金项目：国家自然科学基金项目（31101326）；咸阳市科技局自然科学项目（2010k12-16）

作者简介：易建华（1971-），女，副教授，研究方向：主要从事现代果汁加工体系研究

分解，其中美拉德反应和多酚氧化聚合是苹果汁非酶褐变的主要因素[5~6]。近年来，美拉德反应对果汁褐变影响的研究已比较深入，而多酚氧化聚合导致果汁非酶褐变的机理目前尚未明晰。

苹果中的多酚物质主要有五类：黄烷-3-醇类（儿茶素或表儿茶素单体、原花青素）、羟基肉桂酸类（绿原酸、对香豆酸）、二氢查尔酮类（根皮苷、木糖根皮苷）、花青素类（矢车菊 3-O-半乳糖苷），类黄酮（槲皮苷、芦丁等）[7~8]。以往的研究指出，多酚物质既参与酶促褐变，又参与非酶褐变[9]。关于多酚物质对果汁褐变的影响，目前的研究主要集中于多酚参与酶促褐变，研究表明，多酚物质的种类，底物浓度，体系温度，pH 以及多酚氧化酶活性等因素与果汁褐变程度密切相关[4, 10~12]；而有关多酚参与的非酶褐变研究却是初步的。长期以来，人们认识到在未受损伤的苹果细胞中，多酚和多酚氧化酶(PPO)被分隔在不同细胞器内，酚类和醌类物质之间氧化与还原作用呈相对平衡状态，榨汁以后，酚与醌类化合物之间的动态平衡被破坏，氧化过程占主导地位，多酚类物质被氧化成邻醌[13~14]。而当具有高度氧化活性的邻醌形成以后，无需 PPO 作用，即可以在一定的外界条件下，通过醌类的氧化还原反应，诱发多酚物质发生非酶聚合，形成褐色聚合物，从而导致果汁褐变，因此，PPO 酶促诱发形成的邻醌是多酚参与非酶褐变的中间物质，而关于酶促诱发多酚聚合引发的果汁非酶褐变，目前尚无研究报道。

我们前期研究发现，PPO 酶促诱发儿茶素对模拟苹果汁非酶褐变有影响，基于此，本研究以绿原酸和根皮苷为多酚底物，研究酶促诱发因素对非酶褐变的影响，为有效控制苹果汁褐变提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

1.1.1 材料

市售新鲜富士苹果（无破损，成熟度、大小、颜色尽量一致）。

1.1.2 试剂

绿原酸($C_{16}H_{18}O_9$)和根皮苷($C_{12}H_{24}O_{10}\cdot 2H_2O$)，纯度均为 80%，西安楚康责任有限公司；柠檬酸、磷酸氢二钠、邻苯二酚、乙醇，分析纯，天津市科密欧化学试剂有限公司；丙酮，分析纯，西安化学试剂厂；吐温 80，化学纯，天津市天力化学试剂有限公司，牛血清蛋白（BSA Purity≧98~99%）、考马斯亮兰 G250，北京爱普华美生物科技有限公司。

1.1.3 主要仪器和设备

UV759S 型紫外可见分光光度计，上海荆和分析仪器有限公司；501A 型超级恒温器，上海实验仪器厂有限公司；ALPHA1-2/LD-2 型冷冻干燥机，德国 Martin Christ 公司；PB-10 型精密酸度计、BS323S-电子天平，赛多利斯科学仪器，北京有限公司；CM-5 型色差仪，日本 Minolta 公司；电热恒温鼓风干燥箱，上海跃进医疗器械有限公司；漩涡混合器，海门市其林贝儿仪器制造有限公司；84-1 型磁力搅拌器，上海梅颖浦仪器仪表制造有限公司；KQ5200DE 型数控超声波清洗器，昆山市超声仪器有限公司；JYL-C020 型九阳料理机，山东九阳股份有限公司；

1.2 实验方法

1.2.1 PPO 的提取及酶活测定

1.2.1.1 PPO 的提取

参考文献 10 和 15 的方法有所改动，具体方法为，苹果洗净后于 4 ℃预冷，去皮后取果肉 250 g，立即加入冷冻丙酮(-20 ℃) 500 mL，用高速组织捣碎机匀浆 3 min；用布氏漏斗抽滤，滤饼用 200 mL 冷冻丙酮溶解再次提取抽滤，滤饼真空冷冻干燥 24 h，即得 PPO 丙酮粉，4 ℃下保存待用。

称取丙酮粉 1 g，溶于 100 mL 含 1%吐温 80 的 pH 6.8 的预冷(4 ℃)磷酸盐缓冲溶液，用磁力搅拌器搅拌 3 min，12000 r/min 冷冻离心 25 min，上清液过滤，即得苹果 PPO 粗酶液，粗酶液现用现配[4, 10, 15]。

1.2.1.2 PPO 活性测定

比色皿中加入 2.5 mL pH 为 6.8 的磷酸缓冲液，0.1 mL 的粗酶液，以及 1 mL 0.2 M 的邻苯二酚溶液，立即计时测定 A_{420}，连续测定 3 min。以时间为横坐标，吸光值为纵坐标，做曲线的直线段部分的斜率，计算酶活，即 $\Delta OD/\Delta t$。一个酶活力单位是吸光值每分钟增加 0.001 所需要的酶量，测得提取的苹果多酚氧化酶酶活为 28.5 U/mL。

1.2.2 酶蛋白含量的测定

考马斯亮蓝法[16]。蛋白质含量测定标准曲线方程为 $y=0.0088x+0.5247$，$R^2=0.9997$，测得提取的苹果多酚氧化酶的蛋白质含量为 40.25 μg/mL。

1.2.3 PPO 酶促诱发体系 pH 对多酚非酶褐变的影响

室温下（20 ℃），用不同 pH 的磷酸-柠檬酸缓冲液配置 1 mM 绿原酸和根皮苷溶液 100 mL 于失口瓶中，加入 4 mL PPO（酶活 28.5 U/mL，蛋白质含量 40.25 μg/mL）后开始计时，30 min 后于 95 ℃水浴灭酶 5 min，迅速冷却，测得 L_0^*值、a_0^*值、b_0^*值，记为反应 0 d

的色值，然后将反应体系调整至 pH 5.0，拧紧瓶盖以防止溶液蒸发，置于 60 ℃恒温鼓风干燥箱内，每隔 1 d 测定 L_t^*值、a_t^*值、b_t^*值和总色差 ΔE^*值，连续测一周，通过色值的变化，研究 PPO 酶促诱发体系 pH 对多酚参与的非酶褐变的影响。

1.2.4 PPO 酶促诱发体系温度对多酚非酶褐变的影响

室温下，配制含 1 mM 绿原酸和根皮苷的磷酸缓冲液（pH 5.0）各 100 mL，将溶液置于 20、30、40、50、60 ℃超级恒温器后，加入 4 mL PPO（酶活 28.5 U/mL，蛋白质含量 40.25 μg/mL）开始计时，其他方法同 1.2.3，研究酶促诱发体系温度对非酶褐变的影响。

1.2.5 PPO 酶促诱发时间对非酶褐变的影响

室温下，底物溶液配置同 1.2.3，加入 4 mL PPO（酶活 28.5 U/mL，蛋白质含量 40.25 μg/mL）开始计时，分别在室温下反应 5、10、20、30、40 min 后立即灭酶，其他方法同 1.2.3。

1.2.6 PPO 酶活对多酚参与的非酶褐变的影响

反应体系酶活分别为 14.25、28.5、57、114、171 U，控制反应体系 pH 为 5.0，绿原酸和根皮苷浓度为 1 mM，其他方法同 1.2.3。

1.3 测定方法

本实验采用CM-5型分光测色仪测定模拟体系色差的变化，测色仪选用D75光源和10°观察者角度，分别测定模拟体系的色值：L^*值（亮度）、a^*值（红度）、b^*值（黄度）和ΔE^*值（总色差）[3, 17~19]。$\Delta E^*=[(L_t^*-L_0^*)^2+(a_t^*-a_0^*)^2+(b_t^*-b_0^*)^2]^{1/2}$（$L_0^*$、$a_0^*$、$b_0^*$为空白对照所测值，$L_t^*$、$b_t^*$、$a_t^*$为每1 d所测值）。

1.4 数据处理方法

每个处理重复 3 次，每个样品重复测定 3 次，取平均值，数据结果以均值±标准差(x±SD)表示，采用 GraphPad.Prism.v5.0 软件绘图，并运用 SPSS14.0 软件 One-Way ANOVA 对 ΔE*进行显著性检验（$p<0.05$）。

2 结果与讨论

2.1 PPO 酶促诱发体系 pH 对多酚非酶褐变的影响

L^*值、a^*值、b^*值、ΔE^*值分别为果汁的亮度、红度、黄度和总色差；四个参数具有一定的依赖性，一般随着果汁的褐变，其 L^*值（亮度）减低、a^*值（红度）升高、b^*值（黄度）升高、ΔE^*值（总色差）增大；当趋势不一致时，以 ΔE^*值为主要依据。

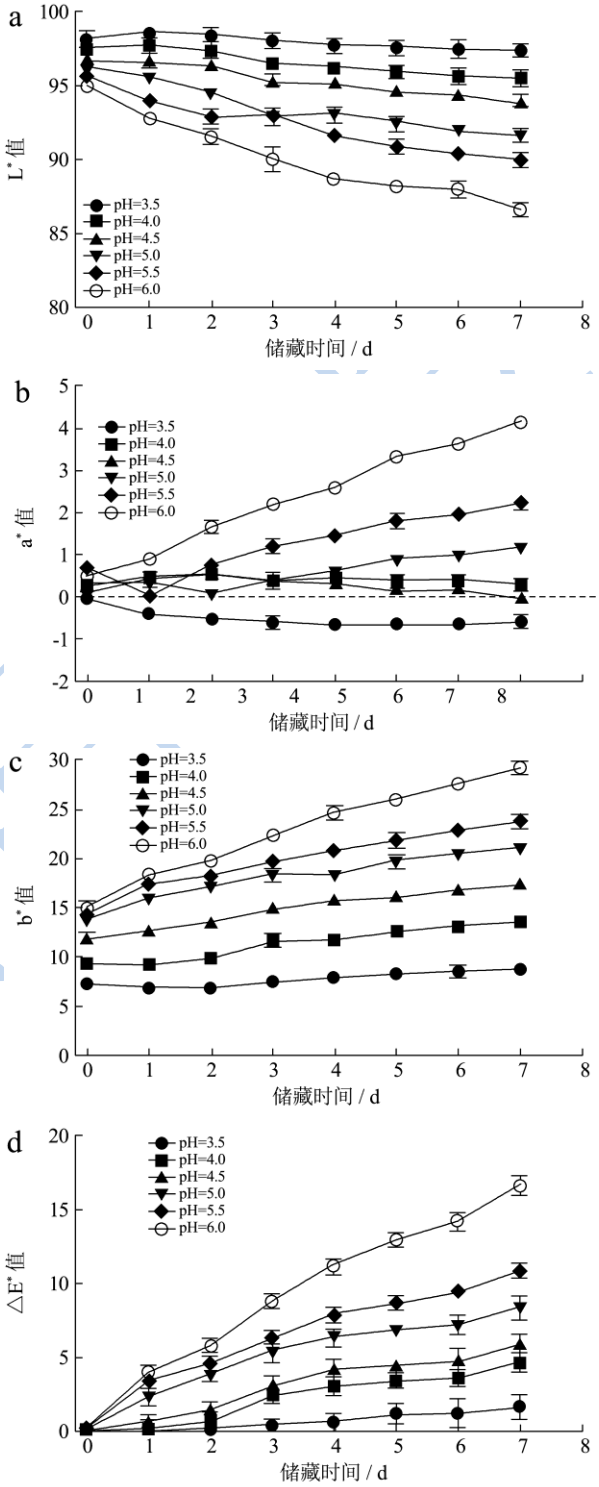


图 1 酶促诱发体系 pH 对绿原酸非酶褐变的影响

Fig.1 Effects of the pH values of the enzymatic inducing system on non-enzymatic browning involving chlorogenic acid

图 1、2 分别为酶促诱发体系 pH 对绿原酸和根皮苷参与的非酶褐变的影响。根据总色差 ΔE^*（图 1d、2d），酶促诱发体系 pH 对上述两种多酚参与的非酶褐变影响较大，其中体系 pH 对根皮苷参与非酶褐变影

响显著大于绿原酸参与的褐变（p<0.05）。

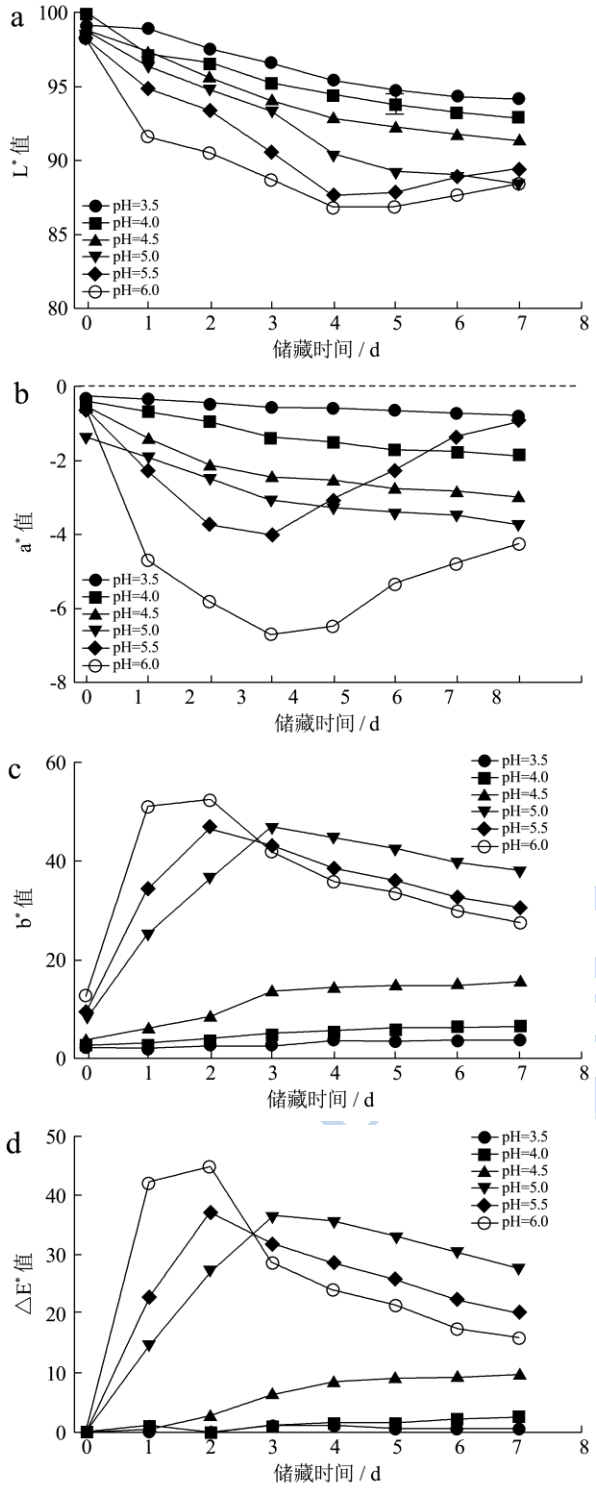


图 2 酶促诱发体系 pH 对根皮苷非酶褐变的影响

Fig.2 Effects of pH values of the enzymatic inducing system on non-enzymatic browning involving phlorizin

从图 1a 可以看出，随着储藏时间的延长，果汁的 L^*值均出现下降趋势，颜色变暗，这与赵光远[20]等研究的苹果汁 L^*值随储存时间的延长而降低的变化趋势基本一致。图 1a 同时表明，贮藏时间相同，体系 L^*值随着酶促诱发 pH 增大而显著降低（p<0.05），且诱发体系 pH 越大，模拟果汁体系应速率越大，L^*值下降趋势越明显，表明果汁褐变越严重。由图 1b~1d 同时可以看出，随着诱发体系 pH 升高以及贮藏时间的延长，模拟果汁 a^*值、b^*值和 ΔE^*值明显增大，进一步说明褐变加剧。可见，绿原酸参与的非酶褐变与 PPO 酶促诱发体系 pH 有关，表现为 pH 越大，褐变越严重，且褐变程度随非酶褐变时间（即果汁贮藏时间）的延长而增大。

根据图 2d 总色差 ΔE^*变化，诱发体系 pH 对含根皮苷模拟体系褐变的影响有别于绿原酸体系。pH 3.5~4.0，模拟果汁褐变程度随着酶促诱发体系 pH 的增大而增大，但褐变程度不显著（p>0.05）；随着 pH 进一步增大，褐变程度显著增大（p<0.05）。对比图 1、2 同时发现，酶促诱发体系 pH 对根皮苷和绿原酸体系 L^*、a^*、b^*的影响也存在较大差异：诱发体系 pH 较高时（pH≥5.0），在非酶褐变后期（贮藏大约 3~4 d 后），含根皮苷模拟体系的色值（L^*、a^*、b^*）与非酶反应时间（储藏时间）的拟合曲线出现拐点，色值的变化趋势与前期相反，而含绿原酸体系尚无拐点出现。在实验过程中，我们同时观察到诱发体系 pH 5.0~6.0，含根皮苷模拟体系，其反应液底部有褐色沉淀产生，这与仇农学等[21]描述的多酚导致果汁在贮藏过程中产生后浑浊的现象相一致。可见，在根皮苷模拟体系中，随着褐变的进行，褐变产物进一步聚合产生沉淀，从而引起 L^*值升高以及 b^*、ΔE^*值降低。另外，对比图 1b、2b，pH 3.5，绿原酸体系 a^*为负值，体系为绿色，此时，体系反应速率（即曲线斜率）较低，pH 4.0~6.0，a^*为正值，体系为红色，体系反应速率随 pH 升高而增大；诱发 pH 3.5~6.0，含根皮苷体系 a^*一直是负值，表明体系为绿色，且随 pH 增大，体系反应速率增大，表明体系褐变程度增大，体系绿色加深，当 pH≥5.0，非酶褐变产物由于发生沉淀导致 a^*值上升。可以推断，PPO 酶促诱发下绿原酸与根皮苷参与的非酶褐变形成的产物在结构上有较大差别，导致果汁色值存在较大差异。本研究同时表明，通过控制果汁体系 pH，可以在一定程度内达到控制多酚参与非酶酶促褐变的目的，同时可以抑制果汁后浑浊的产生。

2.2 PPO 酶促诱发体系温度对多酚非酶褐变的影响

图 3、4 是酶促诱发体系温度对绿原酸、根皮苷非酶褐变的影响。对比图 3d、4d 总色差 ΔE^*，酶促诱发体系温度对绿原酸参与的非酶褐变无显著性影响，但对根皮苷参与的非酶褐变影响显著（p<0.05）。

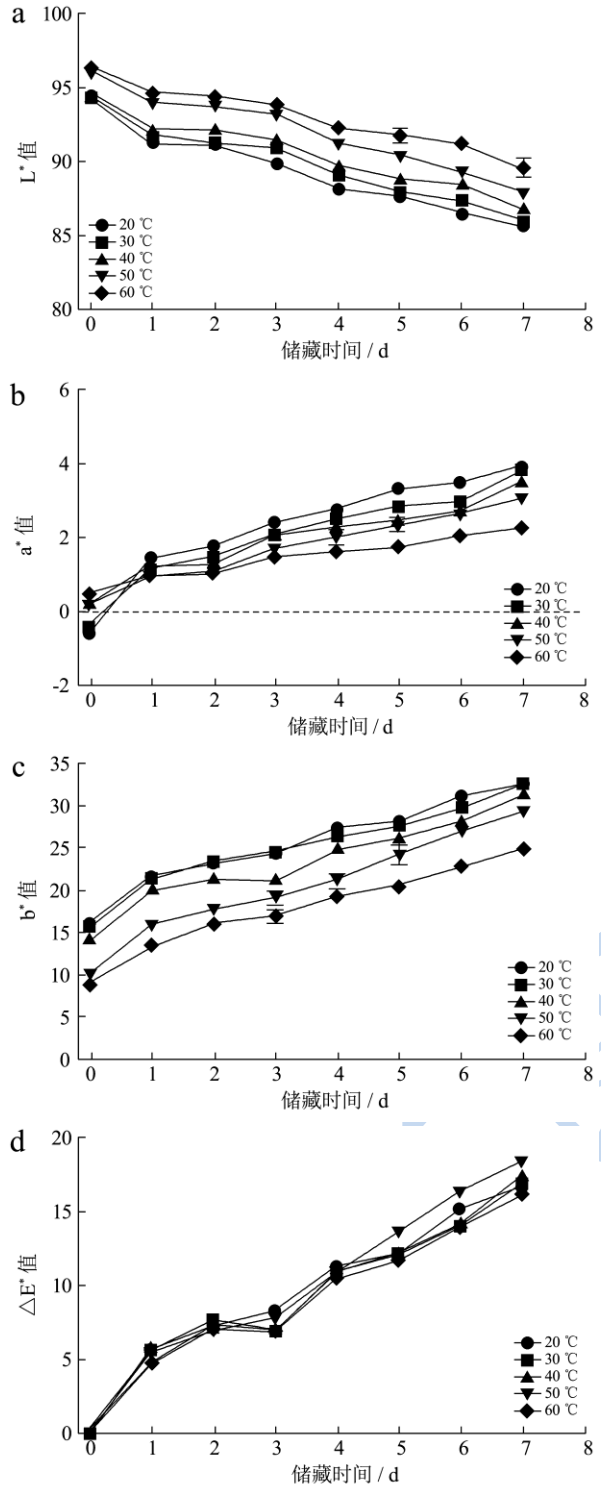


图 3 酶促诱发体系温度对绿原酸非酶褐变的影响

Fig.3 Effects of the temperature of the enzymatic inducing system on non-enzymatic browning involving chlorogenic acid

由图 3a~d 可知，随着非酶褐变时间的延长，模拟果汁 L^*值降低，a^*、b^*和 ΔE^*值增大，表明褐变程度增大，与上述研究结果相一致。而我们前期研究发现，在一定温度范围内（20~60 ℃），PPO 作用绿原酸发生的酶促褐变与温度呈正相关[10]。这说明绿原酸参与的酶促褐变与非酶褐变的特性存在很大差异，其机理尚需进一步研究。

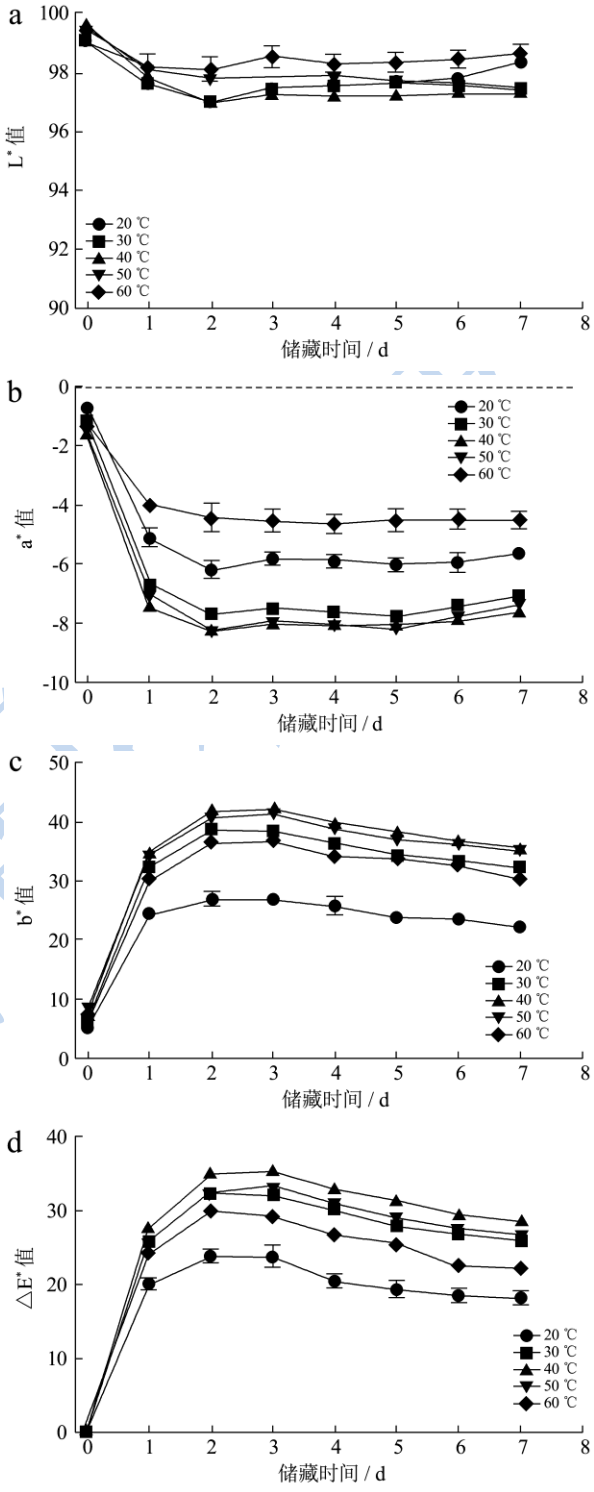


图 4 酶促诱发体系温度对根皮苷非酶褐变的影响

Fig.4 Effects of enzymatic inducing temperature on non-enzymatic browning of phlorizin

图 4 表明，根皮苷参与的非酶褐变，其褐变程度随温度的升高呈现先增大后减小的趋势，当温度为 40 ℃时，褐变程度较大；反应后期，L^*、a^*值略有增大，而 b^*、ΔE^*值略微下降，该研究结果与 2.1 相一致，说明根皮苷参与的非酶褐变产物发生聚合而沉淀。图

3、4 说明，由于酶促诱发温度对苹果多酚参与的非酶褐变影响不同，从而导致对果汁的色值影响存在较大差异。

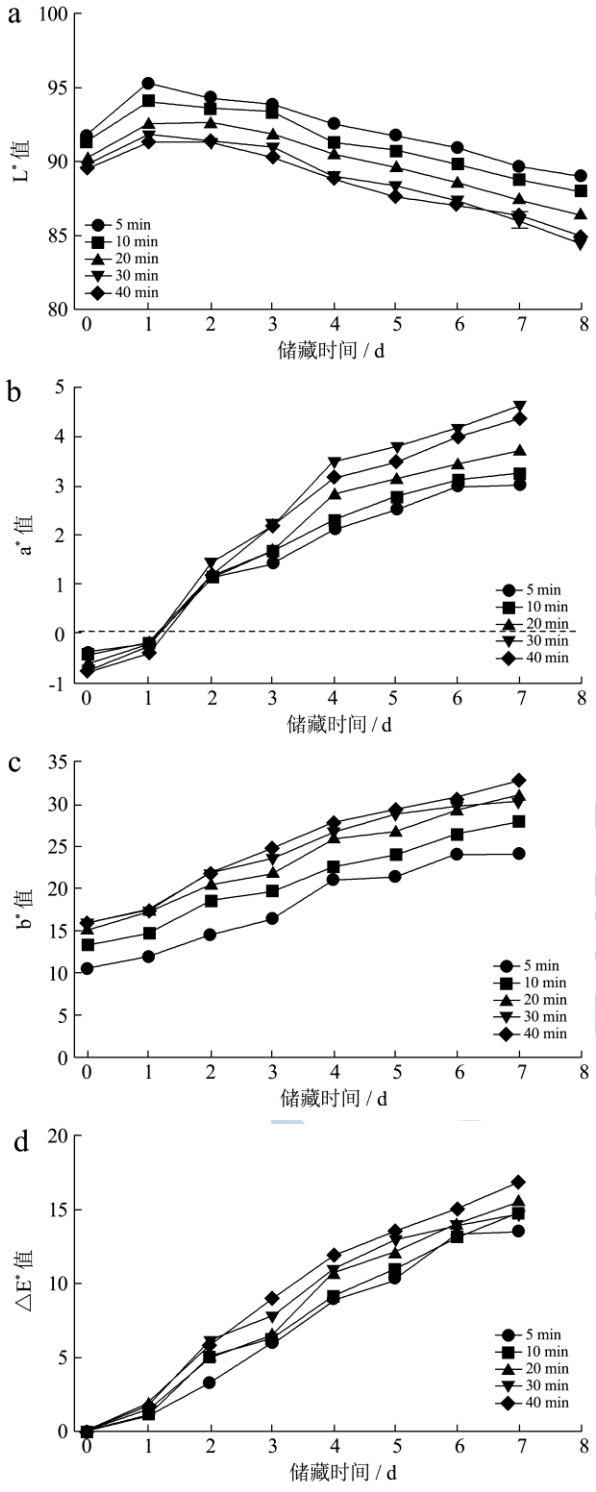


图 5 酶促诱发体系时间对绿原酸非酶褐变的影响

Fig.5 Effects of the duration of enzymatic induction on non-enzymatic browning involving chlorogenic acid

2.3 PPO 酶促诱发时间对多酚非酶褐变的影响

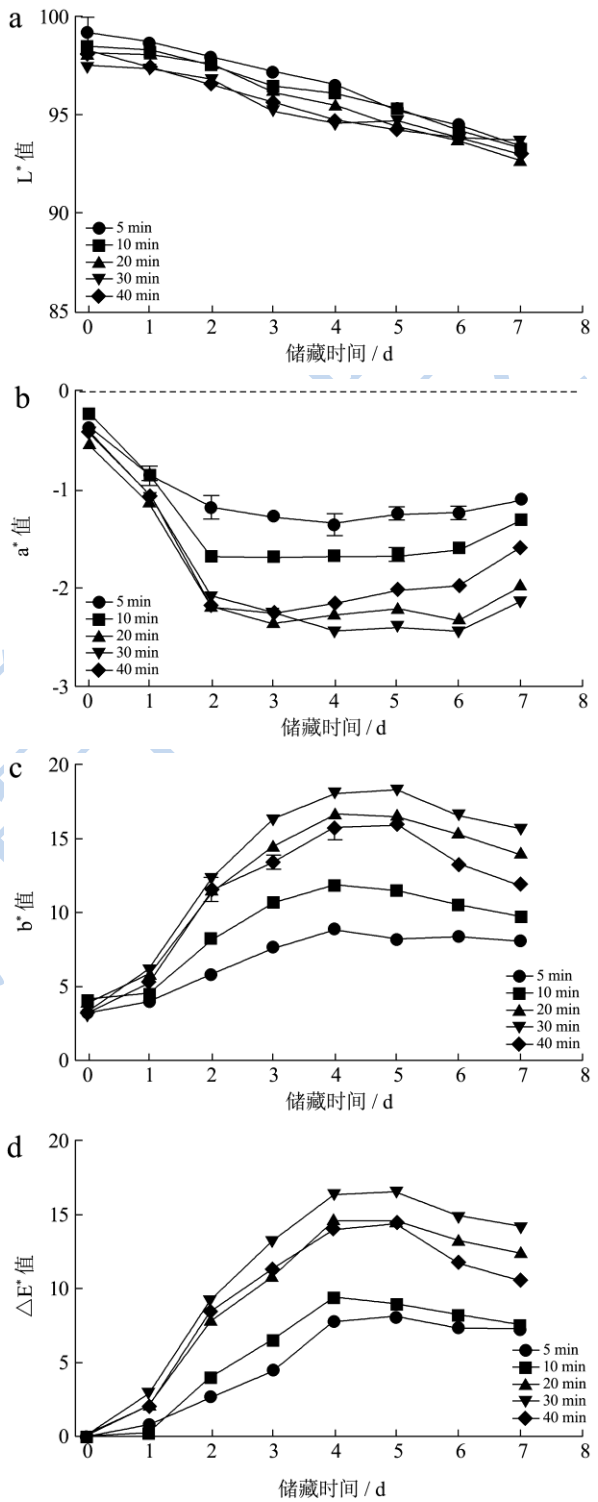


图 6 酶促诱发体系时间对根皮苷非酶褐变的影响

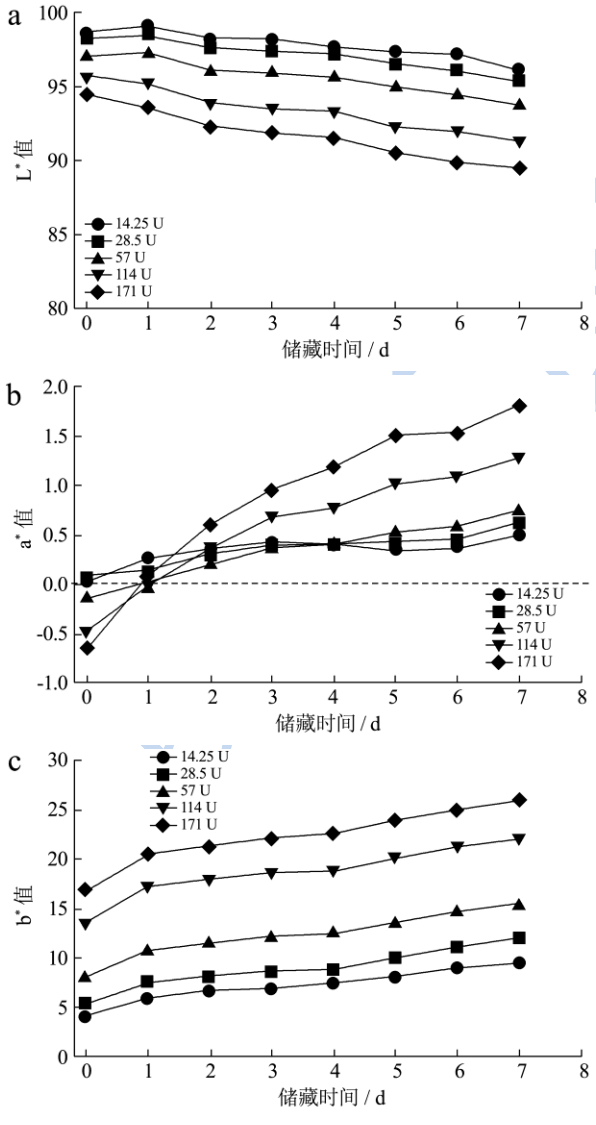
Fig.6 Effects of the duration of enzymatic induction on non-enzymatic browning involving phlorizin

酶促诱发时间对模拟体系非酶褐变的影响如图 5、6 所示。根据总色差 ΔE^*，诱发时间对含绿原酸体系的非酶褐变影响较小，而对根皮苷体系褐变影响显

著（$p<0.05$）。由图 5 可知，含绿原酸模拟体系，褐变随酶促诱发时间的延长而增大（L^*减小，a^*、b^*和 ΔE^*增大）；且诱发时间 40 min，褐变程度较大；由图 6 可知，酶促诱发时间的延长同样影响含根皮苷模拟果汁的褐变，表现为 L^*值降低以及 b^*和 ΔE^*值增大；诱发时间≥30 min，L^*值反而增大，对应的 b^*和 ΔE^*值降低，这可能是由于聚合产物产生沉淀所致。此结果进一步说明，在 PPO 作用下，诱发多酚产生高度氧化活性的邻醌物质，邻醌一旦形成，后续反应无需 PPO 作用，即可以在一定的外界条件下，诱发多酚物质发生非酶聚合，形成褐色聚合物，导致果汁褐变。

2.4 PPO 酶活对多酚非酶褐变的影响

PPO 酶活对含绿原酸以及根皮苷模拟体系非酶褐变的影响分别如图 7、8 所示。根据总色差 ΔE^*，酶活同时影响着两种苹果多酚参与的非酶褐变，且酶活对含根皮苷模拟体系褐变影响显著大于含绿原酸模拟体系（$p<0.05$）。



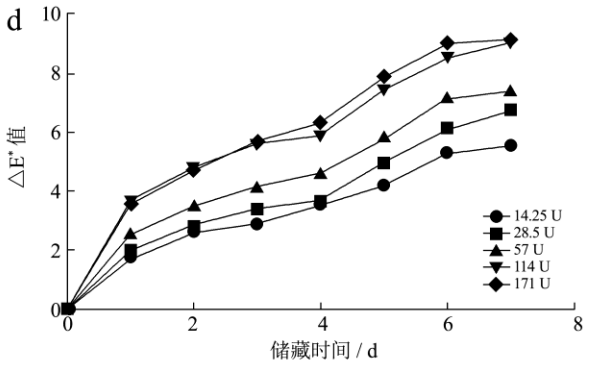


图 7 酶促诱发体系酶活对绿原酸非酶褐变的影响

Fig.7 Effects of the PPO activity of the enzymatic inducing system on non-enzymatic browning involving chlorogenic acid

对于含绿原酸模拟体系，褐变程度随着酶活的增加而增大，表现为 L^*值降低，a^*、b^*和 ΔE^*值增大。对于根皮苷的模拟体系，酶活为 14.25~57 U，褐变程度随着酶活的增加而增大；酶活 114~171 U，储藏前期 L^*值下降，b^*和 ΔE^*值上升；后期（2~3 d 后），色值变化出现拐点，表现为 L^*、a^*值升高，对应的 b^*和 ΔE^*值降低，如前论述，这可能是由于根皮苷非酶聚合，其聚合自身或与体系蛋白质（如 PPO）相互作用，产生沉淀，导致体系色值的变化。该研究结果进一步说明根皮苷与果汁贮藏过程中发生的后浑浊有关，此结论与孙海峰[22]、刘金豹[12]等研究的酚类物质与果汁中的蛋白质结合，形成大分子的聚合物，从而使苹果汁产生沉淀的结论相一致。

3 结论

3.1 PPO 酶促诱发因素（pH、温度、时间、加酶量）对绿原酸参与的非酶褐变有不同程度的影响，其中，pH3.5，模拟果汁褐变缓慢，随着酶促诱发体系 pH 增大，褐变加快；酶促诱发温度 20~60 ℃，诱发体系温度对绿原酸参与的非酶褐变无显著性影响；酶促诱发时间 40 min，褐变程度较大；绿原酸参与的非酶褐变与酶促诱发体系酶活呈正相关，随着酶活的增大，褐变反应加快。

3.2 PPO 酶促诱发因素同样对根皮苷参与的非酶褐变产生影响，但与含有绿原酸模拟果汁体系存在较大差异。pH3.5~4.0，模拟果汁褐变缓慢，随着酶促诱发体系 pH 增大，褐变显著加快，pH5.0~6.0，在反应后期，体系出现有色沉淀物；酶促诱发温度 40 ℃，褐变程度较大；酶促诱发时间由 5 min 增至 30 min，褐变加快，酶促诱发时间进一步延长导致反应后期模拟体系出现有色沉淀物；根皮苷参与的非酶褐变与酶促诱发体系酶活也呈正相关，且酶活≥114 U，模拟果汁在贮藏后期出现沉淀物。

3.3 苹果汁后浑浊与根皮苷参与的非酶褐变相关，且较高的 pH、温度、PPO 含量以及较长的酶促诱发时间加速果汁后浑浊形成。

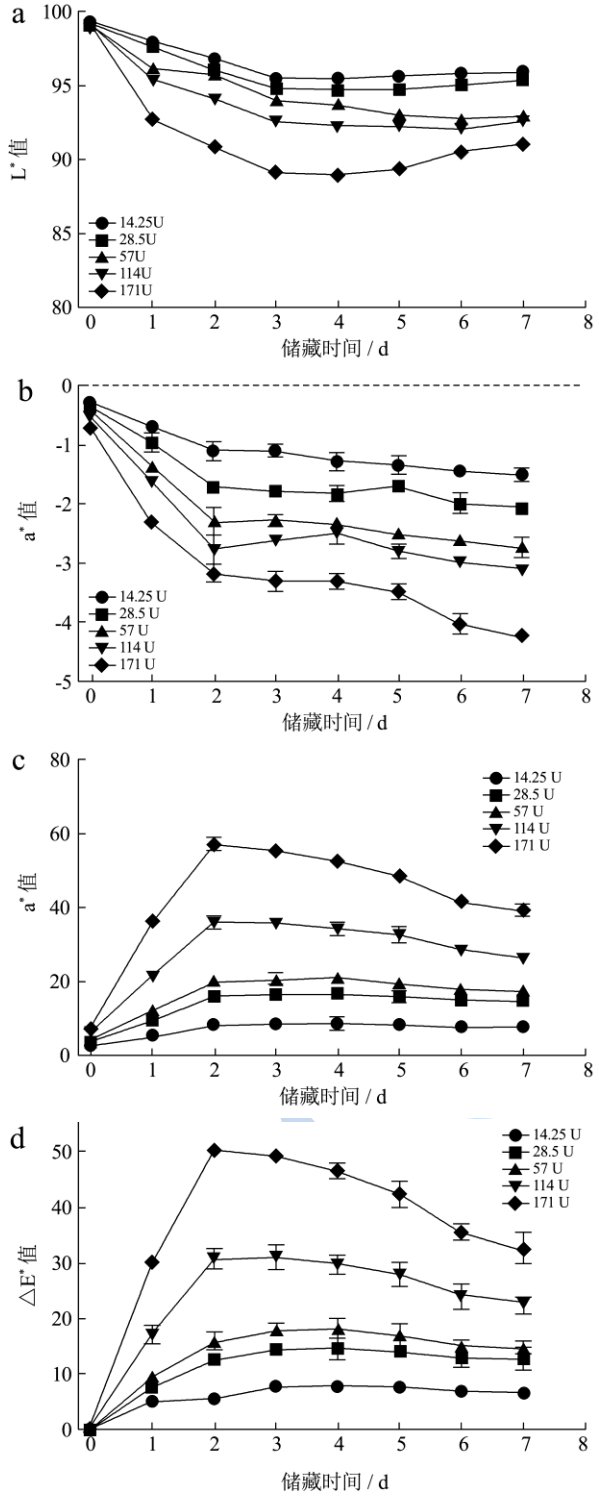


图 8 酶促诱发体系酶活对根皮苷非酶褐变的影响

Fig.8 Effects of the PPO activity of the enzymatic inducing system on non-enzymatic browning involving phlorizin

参考文献

[1] 葛毅强,蔡同一,胡小松.果汁中酚类物质的研究新思路[J].饮料工业,2003,6(4):1-4,10

GE Yi-qiang, CAI Tong-yi, HU Xiao-song. New studying thought of phenolic compounds in fruit juices [J]. Beverage Industry, 2003, 6(4): 1-4, 10

[2] 张建新,张更,余清谋,等.浓缩苹果清汁生产中的色值控制措施研究[J].农业工程学报,2008,24(7):255-259

ZHANG Jian-xin, ZHANG Geng, YU Qing-mou, et a1. Control measures of color value in apple juice concentrate [J]. Transactions of the CSAE, 2008, 24(7): 255-259

[3] Víctor F, Pagán J, Ibarz A. Effect of UV irradiation on enzymatic activities and physicochemical properties of apple juices from different varieties [J]. LWT-Food Science and Technology, 2011, 44(1): 115-119

[4] Queiroz C, Lopes M L M, Fialho E, et al. Polyphenol oxidase: characteristics and mechanisms of browning control [J]. Food Reviews International, 2008, 24: 361-375

[5] 易建华,仇农学,朱振宝.树脂法生产无色浓缩苹果汁的初步研究[J].饮料工业,2001,4(4):6-8

YI Jian-hua, QIU Nong-xue, ZHU Zhen-bao. Preliminary study on colourless apple juice concentrate by resin method [J]. Beverage Industry, 2001, 4(4): 6-8

[6] 滕建文,李欣,夏宁,等.贮藏过程中菠萝浓缩汁非酶褐变原因解析[J].食品科学,2008,29(12):701-704

TENG Jian-wen, LI Xin, XIA Ning, et al. Analysis of mechanism of nonenzymatic browning of pineapple juice concentrate during storage [J]. Food Science, 2008, 29(12): 701-704

[7] Quevedo R, Jaramillo M, Díaz O, et al. Quantification of enzymatic browning in apple slices applying the fractal texture fourier image [J]. Journal of Food Engineering, 2009, 95(2): 285-290

[8] Emilie Devic, Guyot S, Daudin J-D, et al. Effect of temperature and cultivar on polyphenol retention and mass transfer during osmotic dehydration of apples [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(1): 606-614

[9] Kondo S, Tsuda K, Muto N, et al. Antioxidative activity of apple skin or flesh extracts associated with fruit development on selected apple cultivars [J]. Scientia Horticulturae, 2002, 96(1-4): 177-185

[10] 易建华,李美丽,朱振宝.苹果多酚对多酚氧化酶氧化特性的影响[J].现代食品科技,2013,29(11):2601-2606

YI Jian-hua, LI Mei-li, ZHU Zhen-bao. Influence of apple polyphenols on the properties of polyphenol oxidase [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(11): 2601-2606

[11] 米热班古·木太力甫,马泽鑫,敬思群.苹果汁褐变影响因素的研究[J].安徽农业科学,2011,39(14):8604-8606, 8630
Mutallip Mihriban, Ma Ze-xin, Jing Si-qun. Study on the influencing factors of browning in apple juice [J]. Journal of Anhui Agri Sci，2011, 39(14): 8604-8606, 8630

[12] 刘金豹,翟衡,张静.果汁褐变及其影响因素研究进展[J].饮料工业,2004,7(3):1-5
LIU Jin-bao, ZHAI Heng, ZHANG Jing. Progress in research on juice browning and factors influencing it [J]. Beverage Industry, 2004, 7(3): 1-5

[13] Poupard P, Guyot S, Bernillon S, et al. Renard characterisation by liquid chromatography coupled to electrospray ionisation ion trap mass spectrometry of phloroglucinol and 4-methylcatechol oxidation products to study the reactivity of epicatechin in an apple juice model system [J]. Journal of Chromatography A, 2008, 1179(2): 168-181

[14] Oszmianski J, Lee C Y. Enzymatic oxidative reaction of catechin and chlorogenic acid in a model system [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1990, 38(5): 1202-1204

[15] 刘文山,肖凯军,郭祀远.苹果多酚氧化酶的提取及其抑制作用的研究[J].现代食品科技,2006,22(4):82-85
LIU Wen-shan, XIAO Kai-jun, GUO Si-yuan. The extraction and inhibition of apple polyphenol oxidase [J]. Modern Food Science and Technology, 2006, 22(4): 82-85

[16] Marion M B. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Biochemisity, 1976, 72(1): 248-254

[17] Lòpez-Nicolás J M, Núñez-Delicado E, Sánchez-Ferrer Á, et al. Kinetic model of apple juice enzymatic browning in the presence of cyclodextrins: the use of maltosyl-β-cyclodextrin as secondary antioxidant [J]. Food Chemistry, 2007, 101: 1164-1171

[18] Du yun-jian, Dou si-qi, Wu sheng-jun. Efficacy of phytic acid as an inhibitor of enzymatic and non-anzymatic browning in apple juice [J]. Food Chemistry, 2012, 135: 580-582

[19] 易建华,朱丹,朱振宝.乳清分离蛋白对苹果汁澄清效果的研究[J].食品与机械,2013,29(5):41-44,50
YI Jian-hua, ZHU Dan, ZHU Zhen-bao. Effect of whey protein isolates on clarification of apple juice [J]. Food and Machinery, 2013, 29(5): 41-44, 50

[20] 赵光远,纵伟,姚二民.混浊苹果汁储藏过程中色泽稳定性的研究[J].食品科学,2006,27(8):93-97
ZHAO Guang-yuan, ZONG Wei, YAO Er-min. Studies on color stability during storage of cloudy apple juice [J]. Food Science, 2006, 27(8): 93-97

[21] 仇农学,郭善广.LSA-800B 吸附树脂对苹果汁吸附脱色的动力学研究[J].农业工程学报,2004,20(6):15-19
QIU Nong-xue, GUO Shan-guang. Kinetic studies on the adsorption of dark colored compounds from apple juice using LSA-800B adsorbent resin [J]. Transactions of the CSAE, 2004, 20(6): 15-19

[22] 孙海峰,吕海涛,周莎莎,等.HPLC 法测定苹果浓缩汁中的多酚类物质[J].食品科学,2008,29(4):314-317
SUN Hai-feng, LV Hai-tao, ZHOU Sha-sha, et al. Simultaneous determination of phenolic compounds in apple Juice concentrate by high performance liquid chromatography [J]. Food Science, 2008, 29(4): 314-317