

蓝靛果打浆过程中酶促褐变机制及其抑制剂研究

马永强, 李丹, 薛清卓, 修伟业, 李广志, 遇世友

Study on the Mechanism of Enzymatic Browning and Its Inhibitors during *Lonicera caerulea* Fruit Pulp Beating

MA Yongqiang, LI Dan, XUE Qingzhuo, XIU Weiye, LI Guangzhi, and YU Shiyu

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023080033>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

苔干酶促褐变归因分析

Attribution Analysis of *Lactuca sativa* Var. *Angustata* Enzymatic Browning

食品工业科技. 2019, 40(11): 102-107 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.11.018>

红心火龙果果酒生产过程中的褐变机理探究

Study on the browning mechanism in pitaya wine production

食品工业科技. 2018, 39(1): 52-55 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.01.010>

蓝莓果汁贮藏中非酶褐变影响因素评价

Evaluation of Non-enzymatic Browning Factors during Storage of Blueberry Juice

食品工业科技. 2019, 40(14): 94-99 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.14.016>

果蔬汁中多酚介导的非酶褐变研究进展

Research Progress on Non-enzymatic Browning Mediated by Polyphenols in Fruit and Vegetable Juice

食品工业科技. 2021, 42(24): 367-375 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020080207>

植物多肽类胰蛋白酶抑制剂降糖功效研究进展

Recent Progress in Hypoglycemic Effect of Plant Protein Trypsin Inhibitors

食品工业科技. 2021, 42(22): 406-412 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020090170>

豆类胰蛋白酶抑制剂亚基特性研究

Subunit properties of legume trypsin inhibitor

食品工业科技. 2017(09): 133-138 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.09.017>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

马永强, 李丹, 薛清卓, 等. 蓝靛果打浆过程中酶促褐变机制及其抑制剂研究 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(13): 176–185. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023080033

MA Yongqiang, LI Dan, XUE Qingzhuo, et al. Study on the Mechanism of Enzymatic Browning and Its Inhibitors during *Lonicera caerulea* Fruit Pulp Beating[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(13): 176–185. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023080033

· 工艺技术 ·

蓝靛果打浆过程中酶促褐变机制及其抑制剂研究

马永强¹, 李丹¹, 薛清卓¹, 修伟业¹, 李广志^{1,2}, 遇世友^{1,*}

(1. 黑龙江省谷物食品与谷物资源重点实验室, 哈尔滨商业大学食品工程学院, 黑龙江哈尔滨 150028;

2. 哈尔滨商业大学旅游烹饪学院, 黑龙江哈尔滨 150028)

摘要: 为解决蓝靛果打浆工艺单元的酶促褐变现象, 提高蓝靛果的利用价值。实验研究蓝靛果在打浆工艺中主要参与酶促褐变反应的酚类底物及其抑制能力, 并分析酚类底物与表儿茶素对多酚氧化酶 (Polyphenol oxidase, PPO) 反应的相互作用, 进而确定酶促褐变机理。并进一步通过对比抗坏血酸、L-半胱氨酸、氯化钙、EDTA-2Na、柠檬酸添加量对褐变抑制率的影响, 筛选出效果最佳的三种抑制剂。结果表明, 蓝靛果打浆工艺中参与酶促褐变的首要影响因素是表儿茶素, 并且表儿茶素对 PPO 的淬灭机制为静态淬灭。响应面优化试验确定复合抑制剂的最佳组合为: 抗坏血酸添加量 0.11%、L-半胱氨酸添加量 0.11%、EDTA-2Na 添加量 0.08%, 该条件下蓝靛果汁的褐变抑制率为 93.17%。说明选用以上复合抑制剂可抑制蓝靛果打浆工艺中的酶促褐变。

关键词: 蓝靛果, 酶促褐变, 褐变机理, 抑制剂

中图分类号: TS201.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2024)13-0176-10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023080033



本文网刊:

Study on the Mechanism of Enzymatic Browning and Its Inhibitors during *Lonicera caerulea* Fruit Pulp Beating

MA Yongqiang¹, LI Dan¹, XUE Qingzhuo¹, XIU Weiye¹, LI Guangzhi^{1,2}, YU Shiyou^{1,*}

(1. Key Laboratory of Cereal Food and Cereal Resources in Heilongjiang Province, College of Food Engineering,

Harbin University of Commerce, Harbin 150028, China;

2. College of Tourism and Cuisine, Harbin University of Commerce, Harbin 150028, China)

Abstract: In order to solve the enzymatic browning phenomenon in the pulping unit of *Lonicera caerulea* fruits and improve its utilization value. The main phenolic substrates involved in the enzymatic browning reaction in the pulping process of *Lonicera caerulea* fruits and the inhibition ability were investigated, and the interactions between phenolic substrates and epicatechin on the reaction of polyphenol oxidase (PPO) were analyzed and its mechanism of enzymatic browning was also determined. The three most effective inhibitors were further selected by comparing the effects of ascorbic acid, L-cysteine, calcium chloride, EDTA-2Na, and citric acid additions on the browning inhibition rate. The results showed that epicatechin was the primary influencing factor involved in enzymatic browning in the pulping process of *Lonicera caerulea* fruits, and the quenching mechanism of epicatechin on PPO was static quenching. The response surface optimization test determined the optimal combination of composite inhibitors as 0.11% ascorbic acid, 0.11% L-cysteine, and 0.08% EDTA-2Na, and the browning inhibition rate of *Lonicera caerulea* fruits juice under this condition was 93.17%. It indicates that the above composite inhibitors can inhibit the enzymatic browning in the pulping process of *Lonicera caerulea* fruits.

收稿日期: 2023-08-10

基金项目: 黑龙江省应用技术与开发计划 (GA20B301); 2023 年中国烹饪协会全国餐饮职业教育教学指导委员会一般课题 (CYHZW-YB2023021)。

作者简介: 马永强 (1963-), 男, 硕士, 教授, 研究方向: 农产品加工及贮藏, E-mail: qyma126@163.com。

* 通信作者: 遇世友 (1984-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 食品分析与检测, E-mail: davidyuhit@163.com。

Key words: *Lonicera caerulea* fruits; enzymatic browning; mechanism of browning; inhibitor

浆果在打浆过程中,会受到机械损伤,并发生酶促褐变反应,严重影响了果汁的色泽及活性成分。这也是目前影响浆果果汁加工的一种常见的问题。蓝靛果(*Lonicera caerulea* L.),属茜草目,忍冬科忍冬属,常见名称有山茄子果、羊奶子等,是一种新兴的野生浆果^[1-3],具有较高的营养价值^[4-5]。研究表明,蓝靛果中含有丰富的矿物质、V_C、多酚、多糖等活性成分^[6-8]。并且蓝靛果具有清热解毒、抗炎、抗氧化、抗肿瘤和降血糖等功效,对人体健康起到一定的积极促进作用^[9-12]。

蓝靛果在打浆过程中极易发生酶促褐变,在工业生产过程中严重影响蓝靛果汁品质以及经济效益。因此,有必要进一步对蓝靛果打浆工艺酶促褐变机理及其抑制进行研究。研究发现,存在浆果液泡内的多酚与存在于质体和细胞质内的多酚氧化酶(Polyphenol oxidase, PPO)相互接触,可能是引起浆果打浆过程中的酶促褐变的一个重要原因^[13]。Wang等^[14]在研究葡萄加工过程中酶促褐变机理时同样认为PPO是造成其褐变的主要原因。董乐^[15]研究了龙眼果皮的褐变产物,研究发现酶促褐变的产物主要为萘醌类化合物。李琳玲等^[16]在研究板栗酶促褐变产物时也得出了相似的结论,即萘醌类化合物为酶促褐变的主要产物。一些研究发现,通过加入抑制剂,可以在一定程度上抑制果汁的酶促褐变,并提高果汁的货架期及贮藏性。蓝靛果在打浆过程中同样存在相似问题。因此,通过研究蓝靛果打浆过程中酶促褐变机理,可以控制并减少褐变反应,以提高产品的品质。目前,酶促褐变抑制剂主要包括还原剂、酶蛋白抑制剂、螯合剂和酸化剂。常用的还原剂主要包括抗坏血酸、L-半胱氨酸等;酶蛋白抑制剂主要包括氯化物、蛋白酶等;螯合剂主要包括EDTA及其衍生物等;酸化剂主要包括柠檬酸、苹果酸等。熊忠飞等^[17]研究了柠檬酸、抗坏血酸和L-半胱氨酸三种抑制剂对‘黄元帅’苹果汁品质及褐变的影响,研究发现浓度为0.12%的柠檬酸与0.15%的L-半胱氨酸复合可使苹果汁的褐变抑制效果最佳。Özoğlu等^[18]在研究不同抗褐变剂对苹果汁褐变抑制的影响时发现,L-半胱氨酸、抗坏血酸和肉桂酸有较好的抑制效果,当三者组合时抑制效果优于单独的抑制效果,并且发现当L-半胱氨酸的浓度较高时,会产生不良气味和漂白作用。Xu等^[19]同样发现加入适当的抗坏血酸能够更好地缓解苹果汁的酶促褐变,并提高苹果汁的品质。因此,选择合适的抑制剂并控制抑制剂的使用量,可抑制果汁的酶促褐变。

针对蓝靛果在打浆过程中极易出现酶促褐变影响果汁品质的问题,实验采用高效液相色谱法测定了蓝靛果所含的酚类成分,通过研究酚类底物与PPO反应时的酶活,结合通径分析的方法确定主要

参与酶促褐变反应的酚类底物,并采用荧光光谱法分析底物与酶之间的相互作用。同时,通过单因素实验研究对比抑制剂添加量对褐变抑制率的影响,筛选出抑制效果最佳的三种抑制剂进行响应面优化试验确定最优的复合抑制剂组合,以期提高蓝靛果汁的品质,为蓝靛果加工利用提供理论参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与amp;仪器

蓝靛果 ‘蓇葖’品种,产自黑龙江省勃利县,鲜果采摘于6~7月份,冷冻保藏;聚乙烯吡咯烷酮分析纯,国药集团化学试剂有限公司;1,8-二羟基萘醌标准品,上海麦克林生化有限公司;抗坏血酸、L-半胱氨酸、氯化钙、乙二胺四乙酸二钠、柠檬酸 食品级,河南万邦化工科技有限公司;其余试剂均为国产分析纯。

FL1963 榨汁机 温州福菱科技有限公司;UV-5200 紫外可见分光光度计 上海元析仪器有限公司;TD5A 台式高速离心机 湖南凯达科学仪器有限公司;LDZX-50FBS 高压蒸汽灭菌器 上海申安医疗器械厂;Sartorius-PB-10 pH计 广州市深华生物科技有限公司;PHS-2F 精密酸度计 上海雷磁仪器科学仪器有限公司;HL-2B 数显恒流泵 上海沪西分析仪器有限公司;HJ-3 恒温磁力搅拌器 荣华仪器制造有限公司;HWS-26 电热恒温水浴锅 上海一恒科学仪器有限公司;DHP-9082 电热恒温培养箱 上海百典设备有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 蓝靛果打浆基本工艺 蓝靛果贮藏于-18℃中保存,在室温条件下解冻,在蓝靛果添加量60%、打浆时间3 min、打浆强度32000 r/min工艺条件下以榨汁机打浆,打浆后过滤,得到蓝靛果果浆。

1.2.2 蓝靛果中酚类物质的测定 将蓝靛果经过打浆和过滤操作后,经4000 r/min离心20 min,取上清液进行指标的测定。将蓝靛果汁稀释100倍后,取10 mL稀释液溶于甲醇(体积比1:1),在10000 r/min条件下离心10 min,取上清液用0.45 μm微孔滤膜过滤,得待测样液。参照魏敏^[20]的方法,以高效液相色谱(HPLC)法测定蓝靛果汁中酚类物质。

1.2.3 酶促褐变底物鉴定

1.2.3.1 PPO对酚类底物催化酶活性测定 参照陈军等^[21]方法提取待测液PPO得到粗酶液,并测定PPO活性。在试管中加入3 mL磷酸盐缓冲溶液(0.2 mol/L, pH6.8),1 mL不同反应底物(0.5 mol/L),置于28℃水浴中,加热5 min,然后加入1 mL粗酶液,混合均匀,在420 nm波长下测定其在反应4 min内的吸光度值,每隔30 s测1次,以每分钟ΔA值变化0.001为1个酶活力单位。酶活计算见公式(1)^[22]:

$$\text{PPO活性} = \frac{\Delta A \times V}{t \times V_s \times W \times 0.001} \quad \text{式(1)}$$

式中, ΔA 为反应时间内吸光度值的变化; V 为提取酶液总体积, mL; t 为反应时间, min; V_s 为测定时所取酶液体积, mL; W 为取样质量, g。

1.2.3.2 酚类底物含量变化途径分析 分别测定蓝靛果中不同反应底物在 4 °C 贮藏过程中含量的变化和生成物蒽醌含量的变化以及褐变度的变化, 采用相关性分析和途径分析的方法鉴定酶促褐变的底物。

途径分析计算^[23]: 根据相关系数和途径系数, 通过公式(2)和(3)计算决定系数 d , 根据公式(4)计算剩余途径系数 Pe 。决定系数表示各因素对结果的相对决定程度, 剩余途径系数表示未被考虑的一切可能影响 Y 的因素和试验误差。

$$\text{单因素对Y的决定系数: } d_i = P_i^2 \quad \text{式(2)}$$

$$\text{两因素对Y的决定系数: } d_{ij} = 2r_{ij}P_iP_j \quad \text{式(3)}$$

$$\text{剩余途径系数: } Pe = \sqrt{1 - \sum d} \quad \text{式(4)}$$

式中, Y 表示应变量褐变度; i, j 为不同因素(绿原酸、表儿茶素、蒽醌); P_i 为因素 i 的途径系数; P_j 为因素 j 的途径系数; r_{ij} 为因素 i 和 j 的相关系数。

1.2.4 PPO 和表儿茶素相互作用的研究 多种氨基酸残基存在于 PPO 分子中, 其中包括色氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸等。这些氨基酸残基可以发射内源荧光, 因此可通过内源荧光的变化来研究表儿茶素和 PPO 之间的相互作用以及表儿茶素对 PPO 构象的影响。荧光光谱是研究酚类底物与 PPO 相互作用的一种常用方法, 本文采用荧光光谱分析研究表儿茶素与 PPO 体系中的淬灭类型、结合常数和结合位点^[24]。

1.2.4.1 储备液的配制 取不同质量的表儿茶素溶解于磷酸缓冲溶液(pH6.8)中, 配制成浓度分别为 0.34、0.69、1.03、1.38、1.72 mmol/L 的表儿茶素溶液, 备用。

1.2.4.2 淬灭类型的研究 在 25 °C 条件下将不同浓度的表儿茶素与 PPO 混合, 静置反应 2 h 后进行荧光光谱检测。荧光光谱的仪器参数: 激发波长 λ_{ex} 为 280 nm, 激发与发射狭缝宽度均为 10 nm, 电压为 600 V, 发射波长 λ_{em} 为 550~580 nm。PPO 的荧光淬灭过程使用 Stern-Volmer 方程分析^[25], Stern-Volmer 方程见公式(5):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q\tau_0[Q] = 1 + K_{sv}[Q] \quad \text{式(5)}$$

式中, F_0 为未加入淬灭剂时的荧光峰值; F 为加入不同浓度淬灭剂时的荧光峰值; τ_0 为不存在淬灭剂时荧光分子的平均寿命; $[Q]$ 为淬灭剂的浓度; K_{sv} 为动态淬灭常数; K_q 为静态淬灭常数。

1.2.4.3 结合常数和结合位点数的研究 对于静态淬灭, 当生物小分子与大分子相结合时, 结合常数

K_a 与结合位点数 n 通过 Lineweaver-Burk 双对数方程进行计算^[26], Lineweaver-Burk 双对数方程见公式(6):

$$\lg \frac{F_0 - F}{F} = \lg K_a + n \lg [Q] \quad \text{式(6)}$$

式中, F_0 为未加入淬灭剂时的荧光峰值; F 为加入不同浓度淬灭剂时的荧光峰值; K_a 为结合常数; n 为结合位点数; $[Q]$ 为淬灭剂的浓度。

1.2.5 酶促褐变抑制剂筛选单因素实验

1.2.5.1 抗坏血酸添加量对抑制效果的影响 在蓝靛果汁中分别添加 0.02%、0.04%、0.06%、0.08%、0.10%、0.12% 的抗坏血酸, 分别测定褐变度, 以褐变抑制率为指标考察抗坏血酸对其的抑制程度。

1.2.5.2 L-半胱氨酸添加量对抑制效果的影响 在蓝靛果汁中分别添加 0.02%、0.04%、0.06%、0.08%、0.10%、0.12% 的 L-半胱氨酸, 分别测定褐变度, 以褐变抑制率为指标考察 L-半胱氨酸对其的抑制程度。

1.2.5.3 氯化钙添加量对抑制效果的影响 在蓝靛果汁中分别添加 0.02%、0.04%、0.06%、0.08%、0.10%、0.12% 的氯化钙, 分别测定褐变度, 以褐变抑制率为指标考察氯化钙对其的抑制程度。

1.2.5.4 EDTA-2Na 添加量对抑制效果的影响 在蓝靛果汁中分别添加 0.02%、0.04%、0.06%、0.08%、0.10%、0.12% 的 EDTA-2Na, 分别测定褐变度, 以褐变抑制率为指标考察 EDTA-2Na 对其的抑制程度。

1.2.5.5 柠檬酸添加量对抑制效果的影响 在蓝靛果汁中分别添加 0.05%、0.15%、0.25%、0.35%、0.45%、0.55% 的柠檬酸, 分别测定褐变度, 以褐变抑制率为指标考察柠檬酸对其的抑制程度。

1.2.6 复合酶促褐变抑制剂筛选响应面优化试验 通过单因素实验筛选出抑制效果最佳的三种抑制剂, 利用 Box-Behnken 设计-响应面分析法, 以褐变抑制率为响应值进行各因素间的交互作用分析, 研究抗坏血酸、L-半胱氨酸、EDTA-2Na 添加量对蓝靛果汁褐变抑制率的影响。设计因素和水平见表 1。

表 1 褐变抑制试验因素水平
Table 1 Factors and levels of browning inhibition test

水平	因素		
	A 抗坏血酸添加量 (%)	B L-半胱氨酸添加量 (%)	C EDTA-2Na (%)
-1	0.08	0.08	0.06
0	0.10	0.10	0.08
1	0.12	0.12	0.10

1.2.7 理化指标的测定

1.2.7.1 蒽醌含量的测定 将不同浓度 1, 8-二羟基蒽醌标准品的甲醇溶液 500 μ L 经挥发后, 加入质量分数为 0.5% 的醋酸镁-甲醇溶液并定容至 10 mL, 充分混合均匀后测定 508 nm 吸光值^[27], 得到标准曲

线($Y=0.0577X+0.0064, R^2=0.9995$), 并根据标准曲线计算蒽醌含量。

1.2.7.2 褐变抑制率的测定 以分光光度计于 420 nm 处测定蓝靛果汁的褐变度, 褐变抑制率计算公式:

$$T(\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \quad \text{式 (7)}$$

式中, T 为褐变抑制率; A_0 为未加抑制剂的蓝靛果汁在 420 nm 处的吸光值; A_1 为加入抑制剂的蓝靛果汁在 420 nm 处的吸光值。

1.3 数据处理

以 SPSS 22.0 对数据进行处理及相关性分析, 并以 Origin 2018 作图, 响应面分析以 Design-Expert 进行, 实验平行进行 3 次并以平均值±标准差表示。

2 结果与分析

2.1 蓝靛果中酚类物质的鉴定

由 HPLC 测定蓝靛果汁中的酚类物质与多种标准溶液进行对比, 根据保留时间确定蓝靛果中的酚类组成, 将蓝靛果中含量较高的三种酚类物质对应的标准溶液和蓝靛果汁进行测定, 结果如图 1 所示。

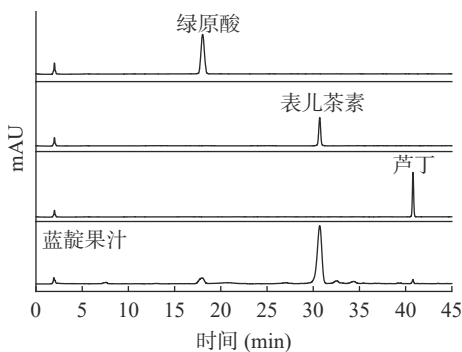


图 1 酚类标准溶液和蓝靛果汁色谱图

Fig.1 Chromatogram of phenol standard solution and *Lonicera edulis* fruit juice

分别配制不同浓度的绿原酸、表儿茶素、芦丁标准品进行标准曲线的绘制, 标准曲线的线性回归方程如表 2 所示。

表 2 酚类物质标准品保留时间及线性回归方程

Table 2 Retention time and linear regression equation of phenolic reference materials

样品名称	保留时间(min)	线性方程	决定系数(R^2)
绿原酸	17.918	$y=12.486x-1.3594$	0.9998
表儿茶素	30.702	$y=8.0243x-27.34$	0.9995
芦丁	40.876	$y=8.3314x+20.648$	0.9996

由图 1 可知, 蓝靛果汁中主要的酚类物质为绿原酸、表儿茶素和芦丁。将图 1 中蓝靛果汁色谱图的纵坐标带入表 2 中的线性回归方程可以得出, 蓝靛果汁中表儿茶素的含量最高, 为 166.71 $\mu\text{g/mL}$, 其次绿原酸的含量为 11.25 $\mu\text{g/mL}$, 芦丁的含量最低, 为 1.07 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2 PPO 催化酚类底物酶活性测定

分别通过测定绿原酸、表儿茶素和芦丁与 PPO 反应过程中在 420 nm 处吸光度值的变化, 计算得到 PPO 对不同酚类底物的催化酶活, 如表 3 所示。

表 3 蓝靛果多酚氧化酶对不同酚类底物催化酶活性
Table 3 Catalytic activity of *Lonicera edulis* fruits PPO on different phenolic substrates

序号	反应底物	酶活(U/g)
1	绿原酸	163.67±5.87
2	表儿茶素	157.00±6.81
3	芦丁	未检出

由表 3 可以看出, 绿原酸和表儿茶素作为反应底物时, PPO 的活性较高, 分别为 163.67 和 157.00 U/g; 芦丁作为反应底物时, 未检测到 PPO 的活性。说明绿原酸和表儿茶素是蓝靛果汁中参与酶促褐变反应的底物, 芦丁未参与蓝靛果汁中酶促褐变的反应。

2.3 蓝靛果中酚类物质含量以及褐变度的变化

2.3.1 褐变度与酚类物质含量变化相关性分析 表 4 为蓝靛果汁在贮藏过程中酶促褐变反应物含量(绿原酸和表儿茶素)、生成物含量(蒽醌)以及褐变度的变化, 将表 4 中的 X_1 、 X_2 、 X_3 与 Y_1 进行相关性分析得到表 5。由表 5 可以看出, 绿原酸和表儿茶素含量的变化与褐变度变化的相关系数分别为 -0.964 和 -0.983, 呈极显著负相关($P<0.01$), 并且此时表儿茶素相关性系数(绝对值)要大于绿原酸; 蒽醌含量的变化与褐变度变化的相关性系数为 0.985, 呈极显著正相关($P<0.01$)。说明蓝靛果汁中绿原酸和表儿茶素为主要的致褐因子, 可通过蒽醌含量的变化判断果汁酶促褐变的程度。

表 4 蓝靛果汁在不同贮藏时间褐变度等指标的变化
Table 4 Changes of browning degree of *Lonicera edulis* fruit juice at different storage time

贮藏时间(d)	X_1 : 绿原酸($\mu\text{g/mL}$)	X_2 : 表儿茶素($\mu\text{g/mL}$)	X_3 : 蒽醌($\mu\text{g/mL}$)	Y_1 : 褐变度
0	11.25	166.71	4.83	0.292
2	9.14	150.83	9.42	0.368
4	7.52	137.47	11.74	0.453
6	5.43	131.85	14.26	0.536
8	3.16	125.31	15.11	0.527
10	2.67	121.54	15.75	0.579

表 5 致褐因子与褐变度变化的相关系数

Table 5 Correlation coefficient between browning factor and browning degree change

致褐因子	相关性系数	P值
绿原酸	-0.964**	0.002
表儿茶素	-0.983**	0.000
蒽醌	0.985**	0.000

注: “**”表示差异极显著($P<0.01$)。

2.3.2 褐变度与酚类物质含量变化途径分析 X_1 、

X_2 、 X_3 和 Y_1 之间的相关系数见表 6, 途径系数为各个因子对改变 Y 值的相对重要性的统计数。设 P_1 为各个因子对 Y 的直接途径系数, P_{ij} 为间接途径系数, 计算公式如下:

$$\text{直接途径系数: } \begin{bmatrix} 1 & r_{12} & r_{13} \\ r_{21} & 1 & r_{23} \\ r_{31} & r_{32} & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} P_1 \\ P_2 \\ P_3 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} r_1 \\ r_2 \\ r_3 \end{bmatrix}$$

将表 5 中的数据带入: $\begin{bmatrix} 1 & 0.974 & -0.966 \\ 0.974 & 1 & -0.994 \\ -0.966 & -0.994 & 1 \end{bmatrix}$

$$\begin{bmatrix} P_1 \\ P_2 \\ P_3 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -0.964 \\ -0.983 \\ 0.985 \end{bmatrix}$$

解得: $P_1=-0.150$; $P_2=-0.221$; $P_3=0.620$, 即为绿原酸、表儿茶素、鞣酐对褐变度的直接途径系数。

间接途径系数: $P_{ij} = r_{ij}P_j$

得: $P_{12}=-0.215$; $P_{13}=-0.599$; $P_{21}=-0.146$; $P_{23}=-0.616$; $P_{31}=0.145$; $P_{32}=0.220$ 。

表 6 各因子间相关系数
Table 6 Correlation coefficient of each factor

因子	X_1	X_2	X_3	Y_1
X_1	1			-0.964
X_2	0.974	1		-0.983
X_3	-0.966	-0.994	1	0.985

由直接途径系数和间接途径系数得途径系数见表 7。

表 7 途径系数
Table 7 Path coefficient

因子	X_1	X_2	X_3
X_1	-0.150*	-0.215	-0.599
X_2	-0.146	-0.221*	-0.616
X_3	0.145	0.220	0.620*

注: *为直接途径系数; 其余为间接途径系数。

决定系数是指各因素对结果的相对决定程度, 用 d 表示, 结果为: $d_1=0.023$; $d_2=0.049$; $d_3=0.384$; $d_{12}=0.065$; $d_{13}=0.180$; $d_{23}=0.272$ 。

$$\Sigma d=0.973; Pe=\sqrt{(1-0.973)}=0.164$$

根据致褐因子对褐变度的决定系数可以看出, $d_3>d_{23}>d_{13}>d_{12}>d_2>d_1$, 说明鞣酐是影响褐变度的决定因素; 表儿茶素和鞣酐的交互作用是影响褐变度的第二决定因素; 绿原酸和鞣酐的交互作用是影响褐变度的第三决定因素; 绿原酸和表儿茶素的交互作用是影响褐变度的第四决定因素; 表儿茶素是影响褐变度的第五影响因素; 绿原酸是影响褐变度的第六影响因素。Pe 代表剩余途径系数, 为 0.164, 说明考虑了影响蓝靛果汁酶促褐变的主要因素。

直接途径系数、间接途径系数以及致褐因子对褐变度的决定系数结果表明, 表儿茶素含量的变化对褐变度的影响大于绿原酸, 并且表儿茶素参加酶促反应生成鞣酐的含量大于绿原酸。鞣酐为影响蓝靛果褐变度的决定因素, 而表儿茶素和鞣酐的交互作用为

影响褐变度的第二决定因素, 因此, 综合分析认为蓝靛果汁中主要参加酶促褐变反应的反应物为表儿茶素, 其次为绿原酸, 在本实验中, 主要探究表儿茶素与 PPO 的相互作用。

2.4 PPO 和表儿茶素相互作用的结果

2.4.1 内源荧光光谱和淬灭类型确定 由图 2 可以看出, 随着表儿茶素浓度的增加, 荧光强度逐渐降低, 说明表儿茶素导致 PPO 发生了酶促氧化, 并导致 PPO 发生了荧光淬灭^[28]。将表儿茶素与 PPO 相互作用的内源荧光光谱进行 Stern-Volmer 方程拟合, R^2 为 0.98, 表明 F_0/F 与表儿茶素的浓度呈现良好线性关系。由表 8 可知, 淬灭常数为 4.8×10^3 , 较高的淬灭常数表明表儿茶素与 PPO 之间有较强的相互作用^[29]。生物大分子的荧光存在时间一般为 10^{-8} s, 由此得出淬灭速率常数为 $4.8 \times 10^{11} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 远高于 2×10^{10} ^[28], 因此认为表儿茶素对 PPO 的淬灭机制为静态淬灭。

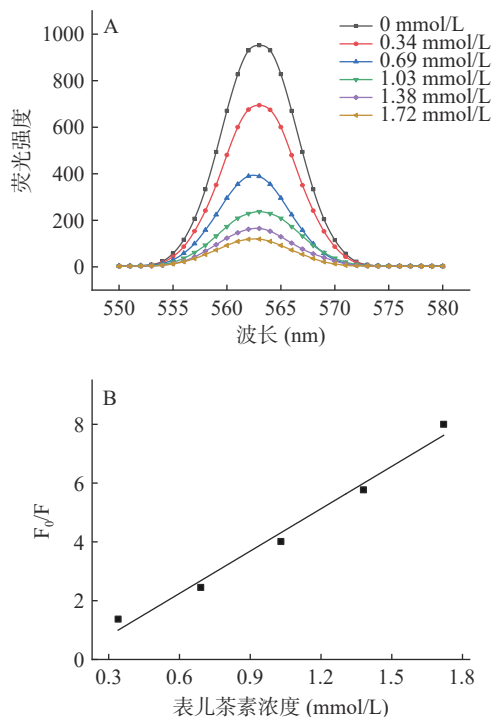


图 2 表儿茶素和 PPO 反应的荧光光谱和 Stern-Volmer 图
Fig.2 Fluorescence spectrum and Stern-Volmer diagram of epicatechin and PPO reaction
注: A 为表儿茶素和 PPO 反应的荧光光谱图; B 为 Stern-Volmer 方程拟合图。

表 8 表儿茶素和 PPO 相互作用的 Stern-Volmer 常数
Table 8 Stern-Volmer constants of the interaction between epicatechin and PPO

温度(°C)	淬灭常数 K_{sv}	淬灭速率常数 $K_q(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	R^2
25	4.8×10^3	4.8×10^{11}	0.98

2.4.2 结合常数和结合位点数 将图 2(A)中的数据代入公式(6)计算出结合常数和结合位点数, 结果如表 9 所示。

由表 9 可以看出, 表儿茶素与 PPO 的结合常数

为 7.32×10^5 , 远大于 10^4 数量级, 说明表儿茶素与 PPO 之间具有较强的相互作用^[30]。结合位点数为 1.81, 说明表儿茶素与 PPO 大约有 1~2 个结合位点数。由于主要参加蓝靛果酶促褐变的反应物为表儿茶素, 其与 PPO 结合引起酶促褐变, 为进一步解决蓝靛果加工过程中酶促褐变的问题, 实验通过筛选与表儿茶素或 PPO 结合的抑制剂, 使表儿茶素和 PPO 二者之间的结合减少, 进而达到减少酶促褐变的目的。

表 9 表儿茶素和 PPO 相互作用的结合常数与结合位点数
Table 9 Binding constants and number of binding sites of the interaction between epicatechin and PPO

温度(°C)	结合常数 K_a	结合位点数n
25	7.32×10^5	1.81

2.5 酶促褐变抑制剂的筛选

2.5.1 抑制剂筛选单因素实验结果 如图 3 所示, 随着抗坏血酸添加量的增加, 褐变抑制率逐渐增加, 说明褐变抑制率与抗坏血酸的添加量呈一定的剂量效应关系。抗坏血酸添加量较少时, 其被醌类物质氧化消耗后会继续发生酶促褐变反应; 抗坏血酸添加量增多后, 既能将中间产物邻二醌还原成邻二酸, 阻止黑色素的产生, 还能与 PPO 的辅基铜离子发生螯合, 降低 PPO 的活性^[31]。当添加量为 0.10% 和 0.12% 时的褐变抑制率分别为 73.93% 和 78.21%, 具有明显的抑制效果。但当抗坏血酸添加量超过 0.10% 时, 邻二醌的转化和螯合反应基本完全, 并且过量的抗坏血酸降解, 生成醛类物质, 自身发生褐变^[32]。所以, 选择最佳的抗坏血酸添加量为 0.10%。

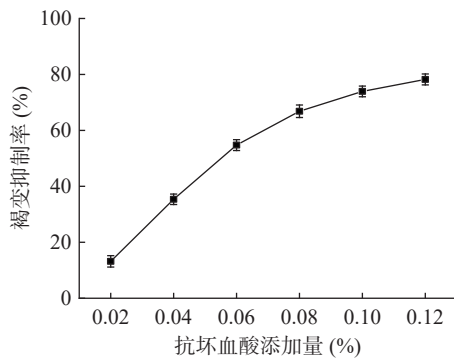


图 3 抗坏血酸添加量对酶促褐变抑制率的影响
Fig.3 Effect of ascorbic acid on inhibition rate of enzymatic browning

如图 4 所示, 随着 L-半胱氨酸添加量的增加, 褐变抑制率逐渐增加, 当添加量超过 0.10% 时, 褐变抑制率变化趋于平稳。当添加量为 0.10% 和 0.12% 时, 褐变抑制率分别为 81.32% 和 83.81%, 具有明显的抑制效果。主要是因为 L-半胱氨酸中含有-SH 的氨基酸, 可与表儿茶素等酚类底物反应生成醌类物质结合形成无色的硫氢化合物, 从而抑制酶促褐变反应的发生^[33]。但当添加量超过 0.10% 时, 体系内底物发生反应接近饱和, 褐变抑制率增加平缓, 并且, 过量

的 L-半胱氨酸溶解后自身带有的微臭味会引起蓝靛果汁产生不良气味。因此, 选择最适的 L-半胱氨酸添加量为 0.10%。

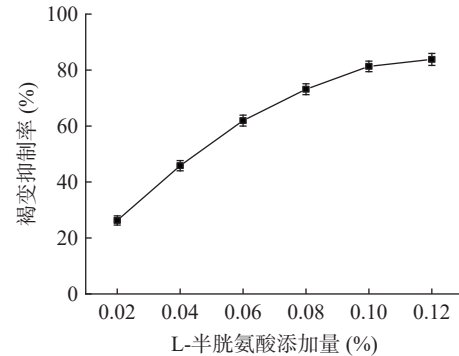


图 4 L-半胱氨酸添加量对酶促褐变抑制率的影响
Fig.4 Effect of L-cysteine addition on the inhibition rate of enzymatic browning

如图 5 所示, 随着氯化钙添加量的增加, 褐变抑制率逐渐增加, 说明褐变抑制率与氯化钙添加量呈一定的剂量效应关系。氯化钙主要通过钙离子与 PPO 中的羧基化合物结合, 降低 PPO 的活性, 减少表儿茶素等酚类物质与 PPO 的反应来减少酶促褐变反应的发生^[34]。随着钙离子与 PPO 结合基本完全, 后续褐变抑制率逐渐平缓。当氯化钙添加量为 0.12% 时, 褐变抑制率为 66.93%。

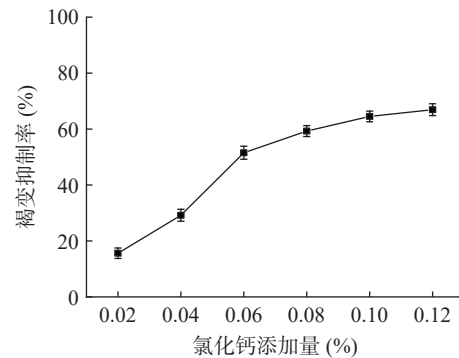


图 5 氯化钙添加量对酶促褐变抑制率的影响
Fig.5 Effect of calcium chloride on inhibition rate of enzymatic browning

如图 6 所示, 随着 EDTA-2Na 添加量的增加, 褐

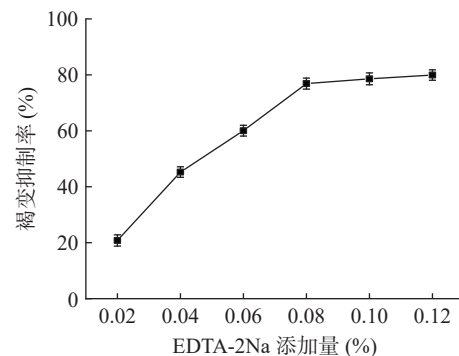


图 6 EDTA-2Na 添加量对酶促褐变抑制率的影响
Fig.6 Effect of EDTA-2Na addition on the inhibition rate of enzymatic browning

变抑制率逐渐增加,当添加量超过 0.08% 时,褐变抑制率变化趋于平稳。EDTA-2Na 作为金属离子螯合剂,主要通过与底物竞争和 PPO 结合,降低 PPO 和酚类底物的结合浓度,抑制果汁的酶促褐变^[35]。添加量为 0.08% 时,褐变抑制率为 76.87%,有较好的抑制效果。当添加量超过 0.08% 时,PPO 和 EDTA-2Na 的结合反应基本完全,并且蓝靛果果汁中的果胶和蛋白类物质可能与过量的 EDTA-2Na 发生结合,产生少量的絮状物,影响产品的质量。所以 EDTA-2Na 的最适添加量为 0.08%。

如图 7 所示,随着柠檬酸添加量的增加,褐变抑制率逐渐增加,当添加量超过 0.35% 时,褐变抑制率逐渐趋于平稳。添加量为 0.55% 时,褐变抑制率为 72.34%。柠檬酸抑制酶促褐变反应一方面是加入柠檬酸后,果汁的 pH 降低,使 PPO 中的辅基铜离子解离出来,降低了 PPO 的活性;另一方面是当果汁 pH 过低时,导致蛋白质变性,降低了 PPO 的活性^[36]。当柠檬酸添加量较少时,褐变抑制程度不明显;当柠檬酸添加量较多时,虽然褐变抑制率有所提升,但会导致蓝靛果汁过酸,影响产品的风味。

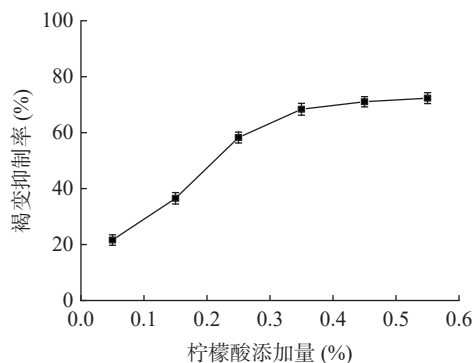


图 7 柠檬酸添加量对酶促褐变抑制率的影响
Fig.7 Effect of citric acid addition on inhibition rate of enzymatic browning

2.5.2 响应面优化试验结果 为进一步优化工艺,选择单因素实验已考察的抑制褐变率效果最佳的三种抑制剂(抗坏血酸、L-半胱氨酸、EDTA-2Na)的添加量对蓝靛果汁褐变抑制率的影响,进一步确定复合抑制剂最优组合条件,试验设计及结果见表 10。

2.5.3 回归模型的建立与分析 对表 10 中的数据回归拟合后得到蓝靛果汁褐变抑制率的二次多项回归方程为: $Y=92.88+1.61A+2.09B+0.3675C+0.43AB-0.3AC+0.145BC-3.09A^2-3.51B^2-2.84C^2$ 。根据表 11 可以得出,模型中 $P<0.0001$ (极显著),失拟项 $P=0.4189>0.05$ (不显著),方程拟合度和相关性很好,误差较小,模型合理。总决定系数 $R^2=0.9979$,校正系数 $R^2_{Adj}=0.9952$,说明预测值与实际值高度一致^[37],模型可用来预测抗坏血酸添加量、L-半胱氨酸添加量、EDTA-2Na 添加量对果汁褐变抑制率的影响。因此,采用该模型分析和预测蓝靛果汁的褐变抑制率,可有效反映真实值。

表 10 响应面设计模型及结果

Table 10 Response surface design model and results

试验号	A	B	C	Y: 褐变抑制率(%)
1	0	0	0	92.56
2	0	0	0	93.04
3	-1	0	-1	84.73
4	-1	1	0	86.47
5	0	0	0	92.74
6	1	0	1	88.58
7	-1	0	1	85.97
8	0	-1	1	84.86
9	0	0	0	92.92
10	0	1	1	89.03
11	-1	-1	0	82.85
12	1	0	-1	88.54
13	1	1	0	90.57
14	1	-1	0	85.23
15	0	1	-1	87.91
16	0	-1	-1	84.32
17	0	0	0	93.15

表 11 回归模型方差分析结果

Table 11 Regression model analysis of variance results

方差来源	平方和	自由度	平均方差	F值	P值	显著性
模型	198.74	9	22.08	367.53	<0.0001	**
A	20.80	1	20.80	346.21	<0.0001	**
B	34.94	1	34.94	581.61	<0.0001	**
C	1.08	1	1.08	17.98	0.0038	**
AB	0.7396	1	0.7396	12.31	0.0099	**
AC	0.3600	1	0.3600	5.99	0.0442	*
BC	0.0841	1	0.0841	1.40	0.2754	-
A ²	40.16	1	40.16	668.47	<0.0001	**
B ²	51.98	1	51.98	865.10	<0.0001	**
C ²	33.92	1	33.92	564.63	<0.0001	**
残差	0.4206	7	0.0601			
失拟项	0.1985	3	0.0662	1.19	0.4198	-
纯误差	0.2221	4	0.0555			
总离差	199.16	16				

注:“**”表示差异极显著($P<0.01$);“*”表示差异显著($P<0.05$);“-”表示差异不显著($P>0.05$)。

进一步对回归模型进行方差分析和交互作用分析,确定影响蓝靛果汁褐变抑制率的因素依次为:EDTA-2Na 添加量<抗坏血酸添加量<L-半胱氨酸添加量。通过 P 值判断回归系数的显著性:一次项 A、B、C、交互项 AB、二次项 A²、B² 和 C² 均极显著 ($P<0.01$),交互项 AC 为显著水平 ($P<0.05$),交互项 BC 不显著 ($P>0.05$)。由图 8 所示,交互项 AB 等高线图呈现椭圆形,3D 图曲面陡峭,这说明抗坏血酸和 L-半胱氨酸添加量在交互作用下极显著影响蓝靛果汁的褐变抑制率。因此,实验结果同样揭示了复合抑制剂更能够降低蓝靛果打浆过程中的褐变率。

2.5.4 最佳工艺验证 根据软件对数据进行响应面结果分析,预测蓝靛果汁酶促褐变最佳抑制剂条件为:抗坏血酸添加量为 0.1056%、L-半胱氨酸添加量为 0.1063%、EDTA-2Na 添加量为 0.0811%,在此条件下预测果汁褐变抑制率可以达到 93.45%。但在实际操作中这一条件很难控制,因此考虑到实际的可操

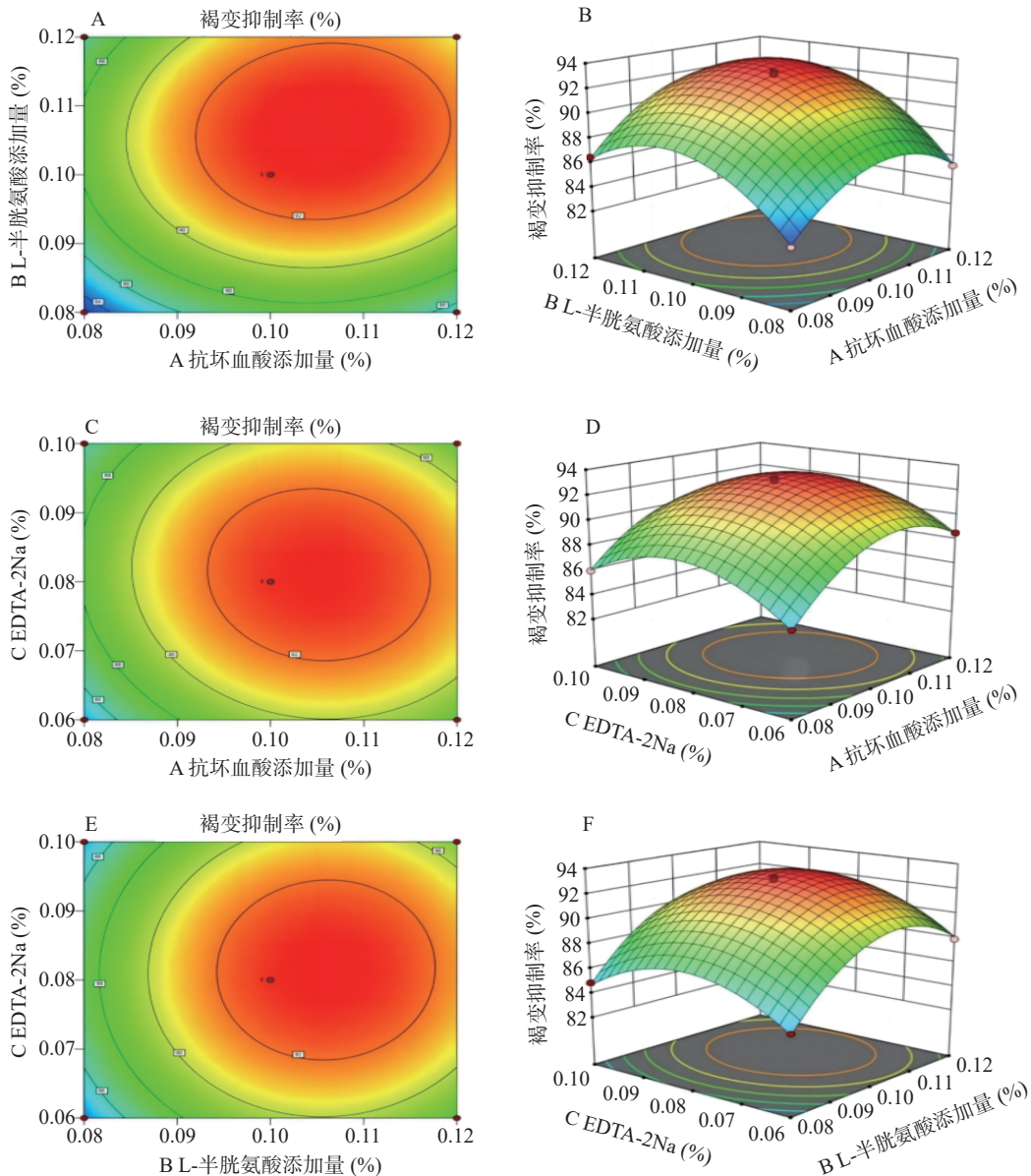


图 8 各因素交互作用的等高线及响应面图

Fig.8 Contour plots and response surface plots of the interaction of each factor

作性且能准确地验证预测的合理性, 实际操作验证选取抗坏血酸添加量为 0.11%、L-半胱氨酸添加量为 0.11%、EDTA-2Na 添加量为 0.08%, 该条件下经过 3 次实验取平均值, 得到蓝莓果汁的褐变抑制率为 93.17%, 与理论预测值基本一致。说明所建模型有效可行, 可以对蓝莓果汁酶促褐变抑制剂进行优化、分析和预测。

3 结论

实验研究了蓝莓果在加工过程中酶促褐变机理, 以及不同褐变抑制剂对褐变抑制率的影响, 采用通径分析的方法得出蓝莓果中主要参与酶促褐变反应的酚类底物为表儿茶素, 其次为绿原酸。通过荧光光谱分析 PPO 与酚类底物的相互作用, 得出淬灭常数为 4.8×10^3 , 淬灭速率常数为 $4.8 \times 10^{11} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 说明表儿茶素对 PPO 的淬灭机制为静态淬灭。结合常数为 7.32×10^5 , 说明表儿茶素与 PPO 之间具有较强的相互作用, 且约有 1~2 个结合位点数。明确褐

变机理后为进一步解决打浆工艺后酶促褐变的问题, 通过单因素实验研究抗坏血酸、L-半胱氨酸、氯化钙、EDTA-2Na、柠檬酸添加量对褐变抑制率的影响, 并通过响应面优化试验得到最优的复合抑制剂组合为抗坏血酸添加量 0.11%、L-半胱氨酸添加量 0.11%、EDTA-2Na 添加量 0.08%, 在此条件下褐变抑制率达到 93.17%。实验可为蓝莓果加工工艺提供理论参考。

© The Author(s) 2024. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

[1] MACLEAN A, SILVA Y, JIAO G, et al. Ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from Haskap berries (*Lonicera caerulea* L.) using a deep eutectic solvent (DES) [J]. *Food Technol Biotech*, 2021, 59(1): 56-62.

- [2] SENICA M, STAMPAR F, MIKULIC-PETKOVSEK M. Blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L. subs. *edulis*) berry; A rich source of some nutrients and their differences among four different cultivars[J]. *Scientia Horticulturae*, 2018, 238: 215–221.
- [3] WANG X, LUO Y, MA R, et al. Effect of *Lonicera edulis* polysaccharide on reducing oral dyeing of *Lonicera edulis* juice[J]. *Applied Biological Chemistry*, 2022, 65(1): 1–13.
- [4] KUCHARSKA A Z, ANNA S T, JAN O, et al. Iridoids, phenolic compounds and antioxidant activity of edible honeysuckle berries (*Lonicera caerulea* var. *Kamtschatica* Sevest)[J]. *Molecules*, 2017, 22(3): 405.
- [5] LIU X, LV Y, ZHENG M, et al. Polyphenols from blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* var. *edulis*) berry inhibit lipid accumulation in adipocytes by suppressing lipogenesis[J]. *Journal of Ethnopharmacol*, 2021, 279: 114403.
- [6] LEE H J, LEE D Y, CHUN Y, et al. Effects of blue honeysuckle containing anthocyanin on anti-diabetic hypoglycemia and hyperlipidemia in ob/ob mice[J]. *Journal of Functional Foods*, 2022, 89: 104959.
- [7] CAPRIOLI G, IANNARELLI R, INNOCENTI M, et al. Blue honeysuckle fruit (*Lonicera caerulea* L.) from Eastern Russia: Phenolic composition, nutritional value and biological activities of its polar extracts[J]. *Food & Function*, 2016, 7(4): 1892–1903.
- [8] WANG Y, ZHU J, MENG X, et al. Comparison of polyphenol, anthocyanin and antioxidant capacity in four varieties of *Lonicera caerulea* berry extracts[J]. *Food Chemistry*, 2016, 197: 522–529.
- [9] DE S, RUPASINGHE H. Polyphenols composition and anti-diabetic properties *in vitro* of Haskap (*Lonicera caerulea* L.) berries in relation to cultivar and harvesting date[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2020, 88: 103402.
- [10] ZDARILOVA A, SVOBODOVA A, CHYTILOVÁ K, et al. Polyphenolic fraction of *Lonicera caerulea* L. fruits reduces oxidative stress and inflammatory markers induced by lip polysaccharide in gingival fibroblasts[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2017, 48(6): 1555–1561.
- [11] AN M, EO H, SON H, et al. Antiinflammatory effects of leaf and branch extracts of honeyberry (*Lonicera caerulea*) on lipopolysaccharide stimulated RAW264.7 cells through ATF3 and Nrf2/HO1 activation[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2020, 22(6): 5219–5230.
- [12] GHARIBZAHEDI S, JAFARI S. The importance of minerals in human nutrition: Bioavailability, food fortification, processing effects and nanoencapsulation[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2017, 62: 119–132.
- [13] 张亚伟, 陈义伦. 不同品种梨汁酶促褐变因子及其相关性[J]. *中国农业科学*, 2011, 44(9): 1880–1887. [ZHANG. Y W, CHEN Y L, Enzymatic browning factors of pear juice in different varieties and its correlation with enzymatic browning[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2011, 44(9): 1880–1887.]
- [14] WANG Z L, YUAN J L, YANG J H, et al. Effects of Guankou grape polyphenol oxidase on enzymatic browning[J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2021, 46(1): 458–465.
- [15] 董乐. 龙眼果皮酶促褐变产物的提取、稳定性及抗氧化活性研究[J]. *中国农学通报*, 2012, 28(28): 174–181. [DONG L. Study on the extraction, stability and antioxidational effects of the enzymatic browning product in *Dimocarpus longan* pericarp[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2012, 28(28): 174–181.]
- [16] 李琳玲, 郑永良, 张雪花, 等. 罗田板栗褐变产物的分离及稳定性研究[J]. *湖北农业科学*, 2018, 57(1): 93–96. [LI L L, ZHENG Y L, ZHANG X H, et al. Isolation and stability analysis of the browning product in Luotian chestnut[J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2018, 57(1): 93–96.]
- [17] 熊忠飞, 李惠, 付岩吉, 等. 响应面法优化“黄元帅”苹果浓缩汁防褐变工艺研究[J]. *中国食品添加剂*, 2019, 30(12): 143–151. [XIONG Z F, LI H, FU Y J, et al. Study on optimization of anti-browning process of apple concentrate by response surface analysis[J]. *China Food Additives*, 2019, 30(12): 143–151.]
- [18] ÖZOĞLU H, BAYNDRL A. Inhibition of enzymic browning in cloudy apple juice with selected antibrowning agents[J]. *Food Control*, 2002, 13(4): 213–221.
- [19] XU J, ZHOU L, MIAO J Y, et al. Effect of cinnamon essential oil nanoemulsion combined with ascorbic acid on enzymatic browning of cloudy apple juice[J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2020, 13(4): 1–11.
- [20] 魏敏. 鲜切苹果酶促褐变底物研究[J]. *现代园艺*, 2015(15): 56, 31. [WEI M. Study on the enzymatic browning substrate of fresh-cut apples [J]. *Xiandai Horticulture*, 2015(15): 56, 31.]
- [21] 陈军, 鲁豪. 鲜切苹果不同部位酶促褐变机理研究[J]. *宿州学院学报*, 2020, 35(11): 72–75. [CHEN J, LU H. Study on the mechanism of enzymatic browning on different parts of fresh-cut apples[J]. *Journal of Suzhou University*, 2020, 35(11): 72–75.]
- [22] ZHOU L, LIU W, TEREFE N S. The inactivation kinetics of soluble and membrane-bound polyphenol oxidase in pear during thermal and high-pressure processing[J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2018, 11(5): 1039–1049.
- [23] 朱丹, 颜飞翔, 朱立斌, 等. 沙棘酒贮藏期间非酶褐变研究[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(8): 336–341. [ZHU D, YAN F X, ZHU L B, et al. Research on non-enzymatic browning of sea buckthorn wine during storage[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(8): 336–341.]
- [24] JIANG H W, ZHOU L, SUN Y F, et al. Polyphenol oxidase inhibited by 4-hydroxycinnamic acid and naringenin: Multi-spectroscopic analyses and molecular docking simulation at different pH[J]. *Food Chemistry*, 2022, 396: 133662..
- [25] 李春翼, 田勇, 杨雅轩, 等. 植物多酚与蛋白质相互作用机制表征方法研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(13): 262–268. [LI C Y, TIAN Y, YANG Y X, et al. Characterization methods for investigating interaction mechanisms between plant polyphenols and proteins: A review[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2019, 45(13): 262–268.]
- [26] 何文妮, 陈开意, 邵波. 对氨基苯甲酸与牛血清白蛋白相互作用的荧光分析[J]. *河南化工*, 2020, 37(9): 23–28. [HE W N, CHEN K Y, SHAO B. Fluorescence analysis on the interaction between p-aminobenzoic acid and bovine serum albumin[J]. *Henan Chemical Industry*, 2020, 37(9): 23–28.]
- [27] 马永强, 戴传荣, 王鑫, 等. 抑制剂对蓝莓果汁加工过程的酶促褐变研究[J]. *中国食品添加剂*, 2017(2): 124–129. [MA Y Q, DAI C R, WANG X, et al. Study of inhibitors usage on preventing enzymatic browning of blueberry juice[J]. *China Food Additives*, 2017(2): 124–129.]
- [28] 候增超, 原江锋, 赖钰婷, 等. 微波对没食子酸和 PPO 相互作用特性的影响[J]. *河南科技大学学报(自然科学版)*, 2021, 42(6): 68–75, 83, 8–9. [HOU Z C, YUAN J F, LAI Y T, et al. Effect of microwave on interaction properties between gallic acid and polyphenol oxidase[J]. *Journal of Henan University of Science and Technology: Natural Science*, 2021, 42(6): 68–75, 83, 8–9.]
- [29] OUYANG J, SUN F, FENG W, et al. Antimicrobial activity of galangin and its effects on murein hydrolases of vancomycin-in-

- intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) strain Mu50[J]. *Chemotherapy*, 2018, 63(1): 20–28.
- [30] ZHU L, ZHU L, MURTAZA A, et al. Ultrasonic processing induced activity and structural changes of polyphenol oxidase in orange (*Citrus sinensis* Osbeck) [J]. *Molecules*, 2019, 24(10): 1922.
- [31] GAO M, FENG L, JIANG T. Browning inhibition and quality preservation of button mushroom (*Agaricus bisporus*) by essential oils fumigation treatment [J]. *Food Chemistry*, 2014, 149(8): 107–113.
- [32] 甘笑静, 陈志周, 李绍振, 等. 超声-抗坏血酸复合处理对新梨 7 号梨汁的褐变及营养品质的影响 [J]. *食品科技*, 2022, 47(11): 51–58, 65. [GAN X J, CHEN Z Z, LI S Z, et al. Effect of ultrasound-ascorbic acid combination treatment on browning and nutritional quality of Xinli No. 7 pear juice [J]. *Food Science and Technology*, 2022, 47(11): 51–58, 65.]
- [33] WU X, GUO X, ZHU K. Inhibition of L-cysteine on the browning of fresh wet noodles [J]. *Foods (Basel, Switzerland)*, 2021, 10(6): 1156–1156.
- [34] 谷会, 朱世江, 侯晓婉, 等. 氯化钙处理对菠萝采后黑心病及贮藏品质的影响 [J]. *食品科学*, 2020, 41(9): 161–167. [GU H, ZHU S J, HOU X W, et al. Effect of calcium chloride treatment on internal browning and storage quality of pineapple after harvest [J]. *Food Science*, 2020, 41(9): 161–167.]
- [35] TASHOOQ A, ABDUL H, SYED Z, et al. Efficacy of ascorbic acid, citric acid, ethylenediaminetetraacetic acid, and 4-hexylresorcinol as inhibitors of enzymatic browning in osmo-dehydrated fresh cut kiwis [J]. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2021, 15(5): 1–17.
- [36] SOMMANO S, CHANASUT U, KUMPOUN W. Enzymatic browning and its amelioration in fresh-cut tropical fruit [J]. *Fresh-Cut Fruits and Vegetables*, 2020: 51–76.
- [37] XUE H, LI J, LIU Y, et al. Optimization of the ultrafiltration-assisted extraction of Chinese yam polysaccharide using response surface methodology and its biological activity [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 121: 1186–1193.