

壳寡糖防止苹果果汁褐变的机理

包子娴¹, 范晓阳¹, 王星华¹, 何家琳¹, 王红梅¹, 孟祥红^{2,*}

(1. 中国海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266003;

2. 中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003)

摘要: 以红富士苹果为材料, 分别测定不同质量浓度壳寡糖(OCS)对果汁中自由基的清除作用, 对超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)4种抗氧化酶酶活性和多酚氧化酶(PPO)酶活性以及抗氧化有关物质(还原型VC和总酚)含量的影响。结果表明: 壳寡糖对果汁中自由基的清除作用比较明显, 尤其在2mg/mL和4mg/mL的质量浓度条件下可以较好的抑制 $O_2^{\cdot-}$ 的产生。壳寡糖可以明显提高抗氧化酶的酶活性, 并且降低PPO的酶活性。壳寡糖对果汁中还原型VC和多酚含量的变化无显著性影响。提示壳寡糖可以提高抗氧化酶的活性, 降低果汁中自由基的含量, 抑制PPO的酶活性, 从而抑制苹果果汁加工中褐变的发生。

关键词: 壳寡糖; 苹果果汁; 抗氧化活性; 防褐变; 机理

Analysis of the Mechanism by Which Oligochitosans Prevent Apple Juice Browning

BAO Zi-xian¹, FAN Xiao-yang¹, WANG Xing-hua¹, HE Jia-lin¹, WANG Hong-mei¹, MENG Xiang-hong^{2,*}

(1. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: The scavenging effect of adding different concentrations of oligochitosans (OCS) on the generation of hydrogen peroxide and superoxide radicals in Red Fuji apple juice was measured. Meanwhile, the effect on the activities of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), peroxidase (POD), catalase (CAT) and polyphenol oxidase (PPO) as well as the contents of antioxidant materials was determined. The results showed that OCS had strong scavenging effect on free radicals. OCS had a strong inhibitory effect on the production of superoxide anion free radicals, especially at concentrations of 2 mg/mL and 4 mg/mL. Moreover, OCS could delay the decrease of antioxidant enzyme activities and inhibit PPO activity. Therefore, OCS can enhance antioxidant enzymes activities, reduce the generation of free radicals, inhibit PPO activity, and consequently prevent the browning of apple juice.

Key words: oligochitosans; apple juice; antioxidant activity; anti-browning; mechanism

中图分类号: Q505

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)19-0102-05

新鲜苹果经过破碎、压榨工序后, 很容易发生褐变现象, 影响产品的感官品质、风味和营养价值。其中多酚氧化酶引起的酶促反应被认为是苹果果汁加工褐变的主要因素之一。尽管超高压处理、加热或低温贮藏等方法在一定程度上可抑制褐变发生, 但抗坏血酸、半胱氨酸、尤其是4-己基间苯二酚等化学物质仍然被认为是有效的抗褐变剂。随着公众对健康意识的增强, 化学添加剂所引起的副作用或食品的安全性已越来越引起关注, 天然抗褐变剂的研发和应用已成为发展趋势。

壳寡糖(oligochitosans, OCS)即 β -1,4-寡聚氨基葡萄糖

糖, 是将壳聚糖经生物或化学方法裂解所制备的水溶性较好、生物活性高的低分子量产品。目前, 壳寡糖不仅有较大的药理学价值^[1-3], 在食品保藏方面应用也较为广泛, 已有研究表明壳寡糖在柑橘、草莓等保藏方面效果较好^[4-6]。壳寡糖及其衍生物的抗氧化性能已有研究报道^[7], 研究者^[8-9]证明壳寡糖具有清除自由基、保护机体免受过氧化损伤等作用, 但有关壳寡糖防止果汁褐变机理尚缺乏明确的认识。壳寡糖防止果汁褐变可能与其直接清除自由基、提高抗氧化酶体系的活性, 维持果汁内天然抗氧化剂(如VC)的含量以及抑制与褐变有关酶的活

收稿日期: 2011-07-21

基金项目: 国家大学生创新性实验计划项目(1011010501)

作者简介: 包子娴(1990—), 女, 学士, 研究方向为食品生物化学。E-mail: baozixian2008@126.com

*通信作者: 孟祥红(1973—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品生物化学。E-mail: mengxh@ouc.edu.cn

性有关, 本实验将从以上几个方面进行研究, 旨在探讨壳寡糖防止果汁褐变的机理, 以期今后壳寡糖开发为一种天然防褐变剂提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

红富士苹果采自青岛崂山果园; 壳寡糖(分子质量1000u) 大连中科格莱克生物科技有限公司。

硫酸钛、三氯乙酸 国药集团化学试剂有限公司; 2-硫代巴比妥酸(TBA) 上海科丰化学试剂有限公司; 氨水 烟台三和化学试剂有限公司; 盐酸羟胺、 α -萘胺 天津市巴斯夫化工有限公司; 对氨基苯磺酸 天津市博迪化工有限公司; 5,5'-二硫代-双-(2-硝基苯甲酸)(DNTB) 北京索莱宝科技有限公司; 邻苯二酚、2,6-二氯酚、愈创木酚 天津市科密欧化学试剂有限公司; 超氧化物歧化酶试剂盒 南京建成生物工程研究所。

1.2 仪器与设备

UV-2802s型紫外-可见分光光度计 尤尼柯(上海)仪器有限公司; HH-S恒温水浴锅 国胜实验仪器厂; H2050R-1高速冷冻离心机 长沙湘仪离心机有限公司; 微样移液器 德国Eppendorf 公司; FA/JA电子天平 上海民桥精密科学仪器有限公司; CJJ-931四联磁力加热搅拌器、JJ-1电动搅拌机 江苏金坛市金城国胜实验仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 果汁的制备

分别取50mL质量浓度为0、1、2、4mg/mL的壳寡糖, 与50g苹果果肉一起榨汁, 经过4层纱布过滤后8000r/min离心10min, 取上清液。于果汁制备0、24、48h后进行取样测定。实验重复3次, 每组实验平行测定3次。

1.3.2 果汁中自由基的测定

1.3.2.1 $O_2^{\cdot-}$ 的测定

参照李忠光等^[10]的方法, 吸取4mL果汁, 加入0.1mL 10mmol/L盐酸羟胺溶液, 摇匀, 25℃保温20min。取出后加入1mL 58mmol/L对氨基苯磺酸溶液和1mL 7mmol/L α -萘胺溶液, 混匀, 25℃保温20min, 测定530nm波长处吸光度, 用吸光度表示 $O_2^{\cdot-}$ 含量, 吸光度越大则清除率越小。

1.3.2.2 H_2O_2 的测定

参照Patterson等^[11]的方法, 在1mL果汁中, 依次加入0.1mL 5%硫酸钛和0.2mL浓氨水, 混合。反应液经1900r/min、4℃离心5min后, 留沉淀。用3mL丙酮悬浮沉淀后, 再1900r/min、4℃离心5min, 留沉淀。如此反复洗涤3次后, 将沉淀溶于3mL 1mol/L 硫酸中。用分光光度计测定该溶液在415nm波长处的吸光度, 用吸光度表示 H_2O_2 含量, 吸光度越大则清除率越小。

1.3.2.3 膜脂过氧化指标丙二醛(malondialdehyde,

MDA)含量的测定

参照高俊凤^[12]的方法, 吸取2mL果汁(对照加2mL蒸馏水), 加入2mL 0.6% TBA溶液, 混匀, 在试管上加盖塞, 置于沸水浴中煮15min, 迅速冷却, 以8000r/min离心15min, 取上清液测定510、532、560nm波长处的吸光度。

$$\text{MDA含量}/(\text{mmol/g}) = \left(A_{532\text{nm}} - \frac{A_{510\text{nm}} - A_{560\text{nm}}}{2} \right) \times \frac{V_t}{V_s \times m} \quad (1)$$

式中: $A_{532\text{nm}}$ 、 $A_{510\text{nm}}$ 、 $A_{560\text{nm}}$ 分别为532、510、560nm波长处的吸光度; V_t 为果汁总体积/mL; V_s 为测定用果汁体积/mL; m 为果肉鲜质量/g。

1.3.3 抗氧化酶活性的测定

1.3.3.1 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性的测定

采用SOD试剂盒来测定酶活性, 酶活性单位(U)为: 在一定条件下, 3mL反应液中每分钟抑制氧化型细胞色素C还原率达50%的酶量。

1.3.3.2 谷胱甘肽过氧化酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)活性的测定

参考Paul等^[13]的方法, 取3支试管, 1支加入4mL蒸馏水、1mL 0.1mol/L磷酸缓冲液(pH 7.7)和0.5mL 4mmol/L DNTB溶液, 混匀, 以此调零。另2支试管, 分别加入4mL果汁、1mL 0.1mol/L磷酸缓冲液(pH 7.7)后, 向1支试管加入0.5mL 4mmol/L DNTB溶液, 另一支试管中加入0.5mL 0.1mol/L磷酸缓冲液(pH 6.8)。将试管置于25℃保温10min。迅速测定显色液在波长412nm处的吸光度, 分别记作 A_s 和 A_c 。GSH-Px活性为25℃条件下每分钟每毫克蛋白的 $A_{412\text{nm}}$ 变化。

1.3.3.3 过氧化氢酶(catalase, CAT)活性的测定

参考Wang Yousheng等^[14]的方法, 在0.2mL果汁中加入2.8mL 40mmol/L的过氧化氢作为底物, 10s后用紫外分光光度计240nm波长处测定2min内吸光度的变化。CAT活性为25℃条件下每分钟每毫克蛋白的 $A_{240\text{nm}}$ 变化。

1.3.3.4 过氧化物酶(peroxidase, POD)活性的测定

参考张玉荣等^[15]的方法, 采用愈创木酚法测定。取分光光度计比色杯1只(光径10mm), 加入1.6mL反应混合液, 1.5mL果汁, 用分光光度计测定波长470nm处的吸光度, 每隔1min读数一次。以每分钟内 $A_{470\text{nm}}$ 变化0.01为一个POD活性单位(U)。

1.3.4 多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)活性的测定

参考李桂琴等^[16]的方法, 取分光光度计比色杯(光径10mm)加入1.5mL果汁和1.5mL邻苯二酚, 反应120s, 用分光光度计于420nm波长处每10s记录一次吸光度。以每毫升酶液在1min内使 $A_{420\text{nm}}$ 升高0.001为一个PPO活性单位(U)。

1.3.5 抗氧化物质含量的测定

1.3.5.1 还原型VC质量浓度的测定

参考苑乃香等^[17]的方法测定还原型VC的质量浓度。移取VC标准溶液2mL于锥形瓶中, 加入1g/100mL草酸溶液10mL, 3g/100mL的过氧化氢溶液2滴, 摇匀, 立即用

2,6-二氯酚溶液滴定至由无色变为玫瑰红色, 15s内不退色即为终点。用公式(1)计算2,6-二氯酚滴定度。

$$T = \frac{\rho \times V_1}{V_2} \quad (2)$$

式中: T 为2,6-二氯酚滴定度; ρ 为抗坏血酸质量浓度, 取0.5mg/mL; V_1 为抗坏血酸体积/mL; V_2 为2,6-二氯酚消耗体积/mL。

样品测定: 取样品5mL, 置于锥形瓶中, 加入1g/100mL草酸溶液10mL, 3g/100mL的过氧化氢溶液2滴, 摇匀, 立即用上述配制的2,6-二氯酚溶液滴定至由无色变为玫瑰红色, 15s内不退色即为终点。

$$\text{VC用量}/(\text{mg/mL}) = \frac{T \times V}{V_3} \quad (3)$$

式中: V 为2,6-二氯酚体积/mL; V_0 为样品体积/mL。

1.3.5.2 总酚含量的测定

采用福林酚法测定总酚含量^[18-19]。

标准曲线的绘制: 在7支试管中分别加入100 μ g/mL没食子酸0.00、0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30mL和蒸馏水2.00、1.95、1.90、1.85、1.80、1.75、1.70mL, 然后向各个试管中加入1mL福林酚试剂并摇匀3~4min, 再各加10g/100mL Na_2CO_3 1mL。25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴2h, 在765nm波长处测吸光度, 以总酚含量(以没食子酸计, μ g)对 $A_{765\text{nm}}$ 做标准曲线。

以同样方法测定壳寡糖质量浓度为0、1.0、2.0、4.0mg/mL的果汁中总酚含量, 加入1.0mL果汁、1.0mL蒸馏水、1.0mL福林酚、1.0mL 10g/100mL Na_2CO_3 , 在765nm波长处测吸光度, 通过标准曲线算出果汁中总酚含量。

1.4 统计分析

所有数据采用SPSS软件进行统计。实验数据通过ANOVA进行邓肯氏多重差异分析。

2 结果与分析

2.1 壳寡糖对果汁中自由基的清除能力

由图1a可知, 对于不同质量浓度的壳寡糖, 在0、24、48h $\text{O}_2^{\cdot-}$ 水平都是随着时间而呈上升趋势, 但随着壳寡糖质量浓度的升高, $\text{O}_2^{\cdot-}$ 水平有所降低, 尤其在2mg/mL和4mg/mL的果汁中 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 水平比空白对照组中的 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 水平低很多, 说明壳寡糖可以明显清除果汁中 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 。由图1b可知, 在整个贮藏期间对照组果汁中 H_2O_2 的含量略有升高。在4种处理方式下, H_2O_2 均维持在较高水平。在1mg/mL和2mg/mL的果汁中 H_2O_2 的含量有降低, 其中2mg/mL的壳寡糖效果较好, 而在4mg/mL的果汁中 H_2O_2 含量与对照组果汁相近。这说明壳寡糖对 H_2O_2 有清除作用, 但是清除效果不显著, 并且与壳寡糖质量浓度没有正相关性。

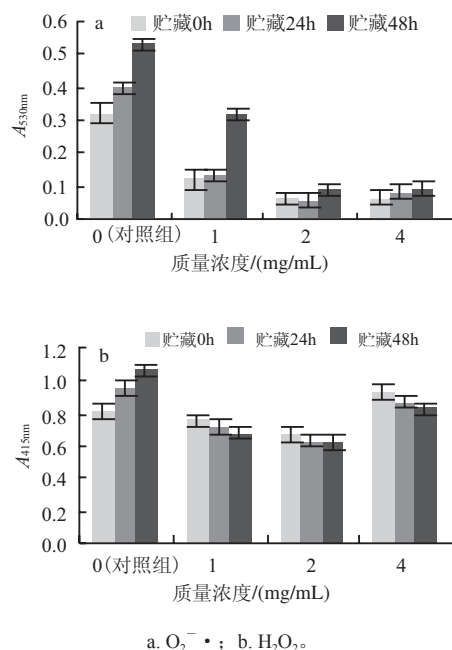


图1 不同壳寡糖质量浓度对果汁中 $\text{O}_2^{\cdot-}$ (a)与 H_2O_2 (b)的清除作用
Fig.1 Scavenging effect of OCS at various concentrations on superoxide anion and hydroxyl free radicals in apple juice

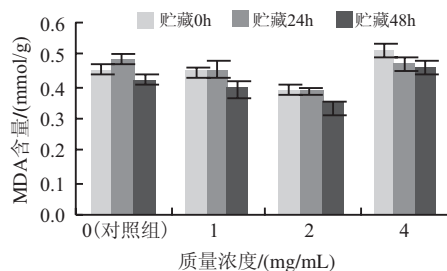


图2 不同壳寡糖质量浓度对果汁中MDA含量的影响
Fig.2 Effect of OCS on MDA content in apple juice

MDA的含量可以反映出果汁中质膜脂质被氧化的程度。由图2可知, 在果汁贮藏期间, 果汁中的MDA含量均维持在较高水平。除了对照组之外, 其余3组随着时间延长MDA的含量略有降低。2mg/mL壳寡糖的处理组果汁中MDA的含量最低, 说明壳寡糖在此质量浓度下对果汁中MDA的产生抑制作用较强, 质膜脂质被氧化的程度较低。因此, 在一定质量浓度范围内壳寡糖可以降低质膜脂质过氧化的程度。

2.2 壳寡糖对果汁中抗氧化酶活性的影响

由图3a可知, 果汁在贮藏过程中SOD活性总体呈下降趋势, 但经过壳寡糖处理的果汁中SOD活性下降得很慢, 与对照组相比, 壳寡糖处理可延缓果汁中SOD活性的降低程度, 保持较高的SOD活性, 壳寡糖质量浓度间无显著差异。而且壳寡糖对SOD活性的保护具有时效性, 在榨汁过程中加壳寡糖立即就会对SOD起到保护作用。榨汁后0h时测得壳寡糖处理即可使果汁中SOD的活

性与对照组相比提高50%左右。结果表明壳寡糖可以有效地提高SOD活性。

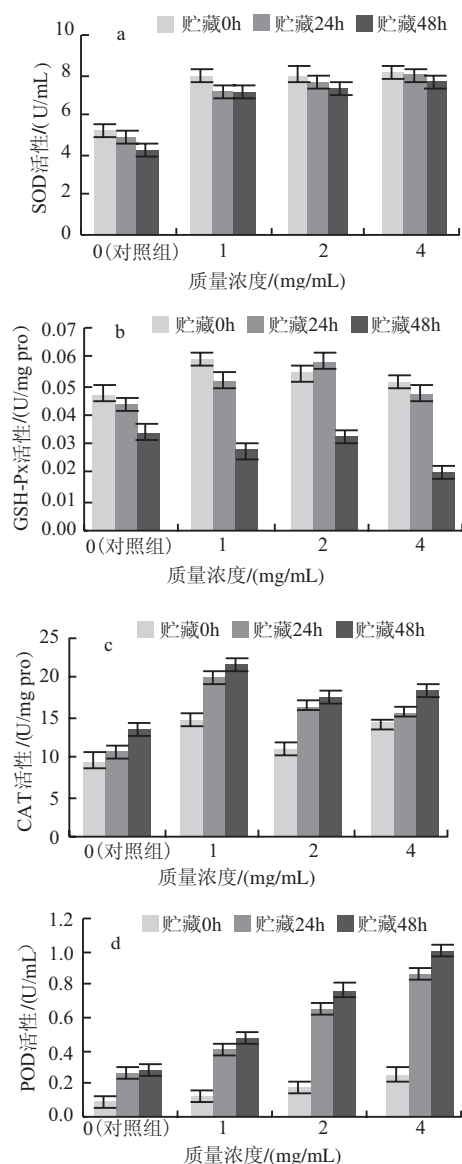


图3 不同壳寡糖质量浓度对果汁中SOD(a)、GSH-Px(b)、CAT(c)、POD(d)活性的影响

Fig.3 Effect of OCS on the activities of SOD, GPx, CAT and POD in apple juice

由图3b可知,在果汁保存期间GSH-Px活性在24h之前均较高,并且加入壳寡糖的果汁中酶活性比对照组果汁要强,但是在加入壳寡糖的果汁中48h时酶活性均较低。说明壳寡糖可以增强GSH-Px活性,但是持久性不强。

CAT催化过氧化氢分解成氧和水,减少果汁中的羟基,从而延缓果汁褐变的速率。由图3c可知,在果汁保存期间CAT活性总体呈上升趋势。在加入壳寡糖的果汁中,CAT活性均有不同程度的提高,其中1mg/mL的壳寡糖效果最显著。实验结果说明壳寡糖可以提高CAT活性。

POD能有效地消除过氧化所产生的活性物质,

防御植物细胞膜过氧化,以降低植物受伤害的程度。由图3d可知,整个贮藏期间果汁中POD活性基本呈上升趋势,不同的处理可以不同程度的提高果汁中POD的活性,且随着壳寡糖质量浓度的提高,果汁中POD活性不断升高,两者之间存在很好的正相关性。

2.3 壳寡糖对果汁中氧化酶活性的影响

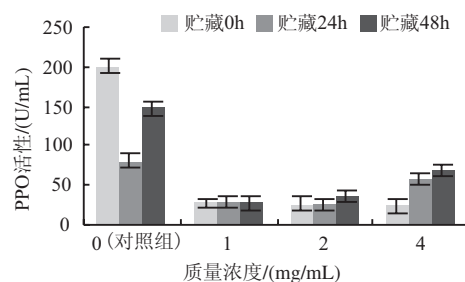


图4 不同壳寡糖质量浓度对果汁中PPO催化反应速率的影响

Fig.4 Effect of OCS on reaction rate catalyzed by PPO in apple juice

由图4可知,0、24、48h时,加壳寡糖后果汁催化PPO的反应速率明显下降。由于在榨汁时苹果中酶和底物的区域化分布遭到破坏,氧气大量侵入,PPO迅速与多酚类底物发生相互作用,而加入壳寡糖处理的果汁在榨汁时就能显著抑制PPO活性。24h和48h时,壳寡糖处理对果汁中PPO活性的抑制作用虽然没有0h时明显,但与对照组相比,PPO活性仍有很程度的降低。说明壳寡糖对PPO活性有明显抑制作用。

2.4 壳寡糖对果汁内某些与抗氧化有关物质含量的影响

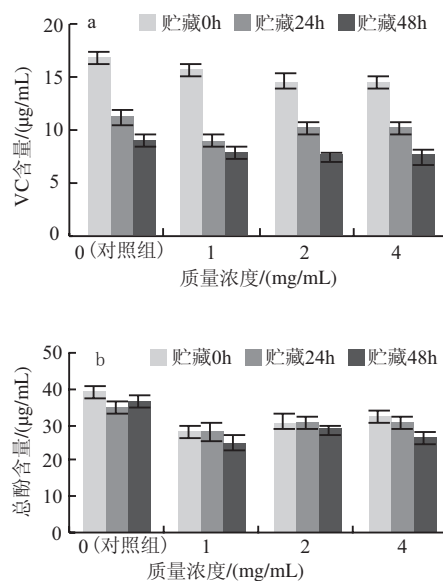


图5 不同壳寡糖质量浓度对果汁中还原型VC含量(a)及总酚含量(b)的影响

Fig.5 Effect of OCS on the contents of vitamin C in the reduced form and total phenols in apple juice

VC是一种强抗氧化剂,通过氧化自身使氧化型谷胱甘肽还原为还原型谷胱甘肽,发挥抗氧化性。由图 5a可知,在果汁贮藏期间,还原型VC含量会随着贮藏时间的延长而不断下降,且0~24h降低的程度高于24~48h。壳寡糖的加入对还原型VC含量的变化影响不显著。

果汁混浊的原因与酚类物质有关,混浊果汁中总酚含量高于正常果汁^[20]。由图 5b可知,对照果汁中总酚含量先减少后增加。加入壳寡糖的果汁中总酚含量比对照果汁中低,但是在3种经过壳寡糖处理的果汁中总酚含量相差不大。

3 讨论

PPO在有氧或氧化剂存在的情况下催化多酚类物质成为O-醌,进而聚合成不溶性的黑色素沉淀被认为是引起果蔬褐变现象的主要原因^[21]。正常果肉组织中由于细胞的区隔化,PPO的酶促反应不易发生,但在果汁加工过程中由于机械破碎导致果肉组织细胞结构的破坏和氧自由基的快速增加,PPO反应急剧发生,导致果汁褐变和混浊^[21-22]。因此,在果汁加工过程中降低氧或氧化剂的含量和抑制PPO活性是控制酶促褐变现象的有效手段。壳聚糖控制鲜切苹果果肉和橙汁酶促褐变的现象已有研究报道^[23-24]。本实验发现壳寡糖一方面显著提高了苹果果汁中抗氧化相关酶SOD、GSH-Px、POD、CAT活性,显著降低果汁体系中 $O_2^{\cdot-}$ 含量,另一方面显著抑制果汁中PPO活性,上述双重效应可能是其控制苹果果汁褐变的原因。针对其抑制PPO活性的现象,未来将从酶促反应动力学的角度开展深入的研究,以期壳寡糖作为一种新型防褐变剂的应用提供理论基础。

参考文献:

- [1] SEYFARTH F, SCHLIEMANN S, ELSNER P, et al. Antifungal effect of high- and low-molecular-weight chitosan hydrochloride, carboxymethyl chitosan, chitosan oligosaccharide and N-acetyl-D-glucosamine against *Candida albicans*, *Candida krusei* and *Candida glabrata*[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2008, 353(1/2): 139-148.
- [2] SINGLA A K, CHAWLA M. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects: an update[J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2001, 53(8): 1047-1067.
- [3] 郭丽民, 张汝学, 贾正平. 寡糖的药理作用和机制研究进展[J]. 中成药, 2006, 28(9): 1353-1356.
- [4] 邓丽莉, 黄艳, 周玉翔, 等. 壳寡糖处理对柑桔果实贮藏品质的影响[J]. 食品工业科技, 2009, 30(7): 287-290.
- [5] 聂青玉, 刘丹, 王燕飞, 等. 壳寡糖处理对草莓贮藏品质的影响[J]. 农产品加工, 2010(7): 31-33.
- [6] 聂青玉, 侯大军. 壳寡糖处理对红橘果实贮藏品质和生理的影响[J]. 西南大学学报, 2010, 32(10): 37-41.
- [7] 赵盼, 王丽, 孟祥红. 壳聚糖及其衍生物的抗氧化性能及应用研究进展[J]. 食品科学, 2010, 31(15): 299-303.
- [8] FENG Tao, DU Yumin, LI Jin, et al. Antioxidant activity of half N-acetylated water-soluble chitosan *in vitro*[J]. European Food Research and Technology, 2007, 225(1): 133-138.
- [9] KYUNG W K, THOMAS R L. Anti-oxidative activity of chitosans with varying molecular weights[J]. Food Chemistry, 2007, 101(1): 308-313.
- [10] 李忠光, 龚明. 植物中超氧阴离子自由基测定方法的改进[J]. 云南植物研究, 2005, 27(2): 211-216.
- [11] PATTERSON B D, MACHAE E A, FERGUSON I B. Estimation of hydrogen peroxide in plant extracts using titanium (IV)[J]. Analytical Biochemistry, 1984, 139(2): 487-492.
- [12] 高俊凤. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006: 211-214.
- [13] PAUL A, MILLAT B, HOLTHAUSEN U, et al. Diagnosis and treatment of common bile duct stones (CBDS). Results of a consensus development conference. Scientific Committee of the European Association for Endoscopic Surgery (E. A. E. S.)[J]. Surgical Endoscopy, 1998, 12(6): 856-864.
- [14] WANG Yousheng, TIAN Shiping, XU Yong, et al. Changes in the activities of pro- and anti-oxidant enzymes in peach fruit inoculated with *Cryptococcus laurentii* or *Penicillium expansum* at 0 or 20 °C[J]. Postharvest Biology and Technology, 2004, 34(1): 21-28.
- [15] 张玉荣, 刘通, 周显青. 影响愈创木酚法测定玉米过氧化氢酶活力的因素[J]. 粮油加工, 2008(3): 4-7.
- [16] 李桂琴, 刘坤, 高志华, 等. 鸭梨果肉多酚氧化酶的活性研究与纯化[J]. 河北农业大学学报, 2010, 33(5): 45-49.
- [17] 苑乃香, 宣亚文, 谢东坡, 等. 2,6-二氯酚钠测定蔬菜中抗坏血酸的含量[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(25): 11853-11864.
- [18] 郭娟, 艾志录, 崔建涛, 等. 苹果渣中多酚物质的福林法测定[J]. 食品工业科技, 2006(2): 178-180.
- [19] 王林枫, 杨改青, 张世君, 等. 不同处理方式对苹果渣中苹果多酚含量的影响[J]. 饲料工业, 2008, 29(21): 48-52.
- [20] 黄峰华, 于泽源, 李兴国. 苹果浓缩汁常见质量问题概述[J]. 中国果菜, 2005(5): 41-42.
- [21] FRANK C, LAMMERTYN J, TRIHO Q, et al. Browning disorders in peach fruit[J]. Postharvest Biology and Technology, 2007, 43(1): 1-13.
- [22] QUEIROZ C, SILVA J R D, LOPES M L M, et al. Polyphenol oxidase activity, phenolic acid composition and browning in cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) after processing[J]. Food Chemistry, 2011, 125(1): 128-132.
- [23] MARTÍN-DIANA A B, RICO D, BARAT J M, et al. Orange juices enriched with chitosan: optimisation for extending the shelf-life[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2009, 10(4): 590-600.
- [24] QI Haiping, HU Wenzhong, JIANG Aili, et al. Extending shelf-life of fresh-cut 'Fuji' apples with chitosan-coatings[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2011, 12(1): 62-66.