

<https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-2-2430>  
<https://elibrary.ru/SDZLSC>

Оригинальная статья  
<https://fppt.ru>

## Изменение физико-химических и органолептических характеристик яблочного пюре при повышенных температурах хранения



А. И. Сергеев<sup>1,\*</sup>, И. Г. Калинина<sup>1</sup>, Н. Г. Шилкина<sup>1</sup>,  
И. И. Барашкова<sup>1</sup>, М. А. Градова<sup>1</sup>, М. В. Мотякин<sup>1,2</sup>, В. Б. Иванов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральный исследовательский центр  
химической физики им. Н. Н. Семенова Российской академии наук<sup>ROR</sup>, Москва, Россия

<sup>2</sup> Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля Российской академии наук<sup>ROR</sup>, Москва, Россия

Поступила в редакцию: 15.11.2022

Принята после рецензирования: 13.12.2022

Принята к публикации: 10.01.2023

\*А. И. Сергеев: [nismpa@mail.ru](mailto:nismpa@mail.ru),

<https://orcid.org/0000-0002-5982-3162>

И. Г. Калинина: <https://orcid.org/0000-0003-4615-6185>

Н. Г. Шилкина: <https://orcid.org/0000-0002-9825-947X>

И. И. Барашкова: <https://orcid.org/0000-0002-7781-3662>

М. А. Градова: <https://orcid.org/0000-0001-9226-3032>

М. В. Мотякин: <https://orcid.org/0000-0001-8040-7844>

В. Б. Иванов: <https://orcid.org/0000-0002-4647-6296>

© А. И. Сергеев, И. Г. Калинина, Н. Г. Шилкина, И. И. Барашкова,  
М. А. Градова, М. В. Мотякин, В. Б. Иванов, 2023



### Аннотация.

Изменение качества пищевых продуктов в процессе хранения обусловлено не только многофакторным воздействием окружающей среды, но и сложным составом продуктов. Разработка методов контроля этих изменений является важной задачей. Цель работы – изучить изменение физико-химических характеристик яблочного пюре при хранении при повышенных температурах (40–60 °С), определить масштабы этих изменений, выявить наиболее значимые изменяющиеся параметры и сравнить их с изменением органолептических свойств пюре.

Объектом исследования служило гомогенизированное пюре из яблок в упаковке из комбинированного материала. Термическую обработку проводили при 40, 50 и 60 °С. Определение цветиметрических характеристик осуществляли в режиме: 45°/0°, источник света D65. Исследования времени протонной релаксации и измерение коэффициента диффузии воды (метод импульсного градиента) проводили на частоте 20 МГц. Анализ молекулярной динамики выполнен методом электронного парамагнитного резонанса спиновых зондов. При изучении содержания некристаллизирующейся воды методом дифференциальной сканирующей калориметрии охлаждение образцов осуществляли до –70 °С.

Установлено, что изменение цветового различия яблочного пюре при хранении происходит с постоянной скоростью в соответствии с кинетическим уравнением реакции нулевого порядка и энергией активации 92 кДж/моль. Выявлена корреляция изменений цвета, параметров протонной релаксации и органолептических характеристик при выдерживании образцов при 50 и 60 °С. Характер и масштабы изменения времени магнитной релаксации, коэффициента диффузии воды и содержания некристаллизирующейся воды, а также результаты оптической микроскопии свидетельствуют о том, что основные изменения физической структуры пюре при термической обработке обусловлены агрегацией фрагментов клеток яблока.

Длительное выдерживание яблочного пюре при температурах 40–60 °С приводит к изменениям цвета, релаксационных характеристик протонов воды и количества некристаллизуемой при –70 °С воды, а также размеров агрегатов фрагментов клеток яблока. Соответствие значений энергий активации, определяемых методами цветиметрии и протонной релаксации, указывают на общность процессов, ответственных за образование окрашенных структур и изменение состояния воды при термообработке пюре. Полученные результаты свидетельствуют о возможности и целесообразности использования данных физико-химических характеристик для количественной оценки изменения свойств яблочного пюре при термическом воздействии.

**Ключевые слова.** Пищевые продукты, хранение, качество, цветиметрия, протонная релаксация, диффузиометрия, дифференциальная сканирующая калориметрия, электронный парамагнитный резонанс

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках программы фундаментальных научных исследований РФ.

**Для цитирования:** Изменение физико-химических и органолептических характеристик яблочного пюре при повышенных температурах хранения / А. И. Сергеев [и др.] // Техника и технология пищевых производств. 2023. Т. 53. № 2. С. 259–271. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-2-2430>

## Effect of Elevated Storage Temperatures on the Physicochemical and Sensory Properties of Apple Puree



Andrey I. Sergeev<sup>1,\*</sup>, Irina G. Kalinina<sup>1</sup>,  
Natalia G. Shilkina<sup>1</sup>, Irina I. Barashkova<sup>1</sup>,  
Margaret A. Gradova<sup>1</sup>, Mikhail V. Motyakin<sup>1,2</sup>, Victor B. Ivanov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences<sup>ROR</sup>, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Emanuel Institute of Biochemical Physics of Russian Academy of Sciences<sup>ROR</sup>, Moscow, Russia

Received: 15.11.2022  
Revised: 13.12.2022  
Accepted: 10.01.2023

\*Andrey I. Sergeev: [nismpa@mail.ru](mailto:nismpa@mail.ru),  
<https://orcid.org/0000-0002-5982-3162>  
Irina G. Kalinina: <https://orcid.org/0000-0003-4615-6185>  
Natalia G. Shilkina: <https://orcid.org/0000-0002-9825-947X>  
Irina I. Barashkova: <https://orcid.org/0000-0002-7781-3662>  
Margaret A. Gradova: <https://orcid.org/0000-0001-9226-3032>  
Mikhail V. Motyakin: <https://orcid.org/0000-0001-8040-7844>  
Victor B. Ivanov: <https://orcid.org/0000-0002-4647-6296>

© A.I. Sergeev, I.G. Kalinina, N.G. Shilkina,  
I.I. Barashkova, M.A. Gradova, M.V. Motyakin, V.B. Ivanov, 2023



### Abstract.

Food products change their quality during storage not only under the external impact, but also because they are complex in composition. As a result, food scientists look for new methods to control these internal changes. The research objective was to describe the changes in the physicochemical properties of apple puree during storage at elevated temperatures (40–60°C) and link them with the changes in the sensory profile.

The study featured homogenized apple puree packaged in composite material and heated up to 40, 50, and 60°C. The colorimetric studies were conducted at 45°/0°, light source D65. The proton relaxation time and the water diffusion coefficient (impulse gradient method) were studied at a frequency of 20 MHz. The analysis of molecular dynamics involved the method of electron paramagnetic resonance of spin probes. The samples were cooled down to –70°C to measure the content of non-crystallizing water by the method of differential scanning calorimetry.

The color change rate was constant and followed the zero-order kinetic reaction equation with an activation energy of 92 kJ/mol. The changes in color, proton relaxation, and sensory properties correlated when the samples were stored at 50 and 60°C. The analysis of the magnetic relaxation time, the diffusion coefficient of water, and the content of non-crystallizing water indicated that the main changes in the physical structure of the puree during heat treatment occurred as a result of the aggregation of apple cell fragments. These findings were confirmed by the optical microscopy.

A prolonged exposure to 40–60°C affected the color, the relaxation of water protons, and the size of aggregates of apple cell fragments. It also affected the amount of water that did not crystallize at –70°C. The correspondence between the values of the activation energies was determined by the methods of colorimetry and proton relaxation. Therefore, the coloration and the water changes depended on the same processes. These physical and chemical properties can be used for quantitative assessment of apple puree under thermal treatment.

**Keywords.** Food products, storage, quality, colorimetry, proton relaxation, diffusometry, differential scanning calorimetry, electron paramagnetic resonance

**Funding.** The research was part of the program of Fundamental Scientific Research of the Russian Federation.

**For citation:** Sergeev AI, Kalinina IG, Shilkina NG, Barashkova II, Gradova MA, Motyakin MV, et al. Effect of Elevated Storage Temperatures on the Physicochemical and Sensory Properties of Apple Puree. Food Processing: Techniques and Technology. 2023;53(2):259–271. (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-2-2430>

### Введение

Разработка объективных физико-химических методов оценки изменения качества пищевых продуктов в процессе хранения является важной

научно-технической задачей. Сложность этой проблемы обусловлена не только многофакторным воздействием окружающей среды, но и сложным составом продуктов. Кроме того, метод оценки

должен быть простым и точным, а также обеспеченным необходимым оборудованием.

Для яблок и продуктов на их основе, учитывая свойство быстрого потемнения поверхностного слоя яблок в области разреза, одним из очевидных методов является цветометрия. В работе [1] показано, что при хранении нарезанных яблок при 4 °С в темноте в условиях доступа воздуха изменение цвета, оцениваемое по изменению цветового различия  $\Delta E$ , является критической характеристикой. Срок хранения яблок в этих условиях не превышает 3 суток. Однако при хранении нарезанных яблок при –5 °С изменение цвета было незначительно даже через 10 суток [2]. Эти результаты были получены для одного сорта яблок – Fuji. Детальный анализ кинетики изменения цветовых характеристик при хранении продуктов из яблок, выполненный в работах [3, 4], свидетельствует о сложном характере процессов, приводящих к изменению цвета. Это проявляется в отличиях значений энергий активации цветовых изменений (от 52,1 до 80,8 кДж/моль), определяемых для яблочного сока различными авторами при использовании разных методов анализа и кинетических моделей.

Изменение цветовых характеристик яблочного пюре при термообработке при высоких температурах (80–90 °С) имеет сложный характер. Некоторые цветовые характеристики (цветовое различие  $\Delta E$ , координата  $a^*$ , характеризующая интенсивность красной компоненты цвета, и поглощение при 420 нм) изменяются в соответствии с кинетическим уравнением реакции нулевого порядка, в то время как другие (светлота  $L^*$  и координата  $b^*$ , характеризующая интенсивность желтой компоненты цвета) – первого порядка. Энергии активации реакции окисления фенольных соединений, ответственные за появление коричневого пигмента, оцениваемые по изменению разных цветовых характеристик, различаются (от 51,9 до 111,5 кДж/моль) [3, 4]. Аналогичные зависимости обнаружены при исследовании пюре для детского питания, состоящего из смеси пюре из яблок (80 %) и малины (20 %) [5]. Резкое изменение механизма процесса при 90 °С, о котором свидетельствует изменение знака для  $\Delta b^*$  при этой температуре, и незначительное изменение  $\Delta E$  при других температурах ( $\Delta E \leq 2$ ) не позволили с достаточной точностью определить значение энергии активации для этого продукта ( $\sim 47,0 \pm 15,6$  кДж/моль) [5].

Рассмотренные примеры показывают, что кинетические закономерности и особенности изменения цвета зависят от условий подготовки образцов, температуры (диапазона температур) испытания или хранения продукта, а также от его состава. Также значение имеет упаковка.

Изменения цвета, обусловленные образованием и расходом поглощающих в видимой области

спектра веществ, свидетельствуют о протекании в продуктах на основе яблок сложных физико-химических процессов, одной из важнейших характеристик которых является состояние воды в продукте. Для исследования кинетики и масштаба изменения содержания и состояния воды в различных продуктах растительного и животного происхождения используют дифференциальную сканирующую колориметрию (ДСК), оптические и спектрометрические методы [6]. Одним из наиболее информативных является метод ЯМР релаксации, позволяющий изучать подвижность атомов водорода воды, измеряя их времена спин-решеточной ( $T_1$ ) и спин-спиновой ( $T_2$ ) релаксаций [6, 7].

В отличие от более ранних работ недавно было показано возможность исследования суб- и межклеточной диффузии и мембранной проницаемости при анализе спин-спиновой релаксации ( $T_2$ ) при термическом воздействии на микроструктуру яблочных образцов [8]. Выявлено изменение  $T_2$  при температуре 53 °С, при которой резко уменьшалась твердость паренхимы яблока. Эти результаты показывают, что релаксационные параметры, наряду с изменением цвета, могут отражать структурные и биохимические изменения в паренхиме яблока.

Оценивая качество сохранности яблок методами протонной магнитной релаксации, авторы работы [9] пришли к выводу о перспективности использования магнитно-релаксационных параметров при оценке поражения плодов. Эта концепция была реализована при создании ЯМР датчика, определяющего испорченные плоды на конвейере (12 % точности при скорости конвейера 50 мм/с) [10].

Авторы работы [11], изучая времена релаксации протонов воды в клеточной структуре яблока в зависимости от времени  $\tau$  между импульсами в последовательности Карра-Перселла-Мейбума-Гилла (КПМГ), наблюдали две фракции протонов (для  $\tau > 50$  мкс). Наличие двух фракций объяснялось химическим и диффузионным обменом между водосодержащими структурами паренхимы яблочных клеток. Подвергнутые регидрированию (до 85 % и выше) клетки и клеточные мембраны яблок характеризовались одним временем релаксации.

Структурные изменения в биологических системах можно оценить с помощью анализа диффузионных процессов. Коэффициент диффузии ( $D$ ) в таких структурах имеет значение близкое к значению  $D$  в чистой воде при малых временах измерения диффузии, а также уменьшается с увеличением времени измерения до значений, определяемых проницаемостью мембран [12]. Зная время неограниченной диффузии, можно оценить размеры отсеков биологических структур и степень их изменений. Диффузионные и релаксационные параметры, полученные методом импульсного градиента, позволили авторам работы [13] при

изучении паренхимы яблока оценить размеры клеток, внутриклеточную диффузию и диффузионную проницаемость тонопласта.

Другой характеристикой энергии межмолекулярного взаимодействия в биологических системах может служить количество некристаллизующейся при отрицательных температурах воды. Ее изменения могут отражать изменения структуры как клеток в целом, так и их частей. Перспективность такого рода исследований показана в работе [14] при оценке действия импульсного электрического поля на структуру и диффузионную проницаемость воды между клеточными структурами яблока.

Широкий набор методик ЭПР применялся при исследовании биохимических аспектов структуры яблок и продуктов из них: изучение антиокислительной активности с помощью различных спиновых ловушек, использование спиновых меток (т. е. радикалов, химически связанных с объектом исследования) для изучения подвижности полисахаридных цепей в стенках клеток яблок и измерение парамагнитных сигналов при гамма-облучении различных фруктов [15–18]. Спектроскопия спиновых зондов широко используется для исследования сложных гетерогенных систем [19–21]. Магнитно-резонансные параметры ЭПР спектров спиновых зондов предоставляют информацию о молекулярной организации изучаемой системы, ее локальной подвижности и полярности, которая отражает состояние локальных магнитных и электрических полей.

Таким образом, имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о возможности и перспективности применения физико-химических методов для количественной оценки изменений продукта при хранении и оценки состояния воды в них. Цель данной работы – изучить изменение физико-химических характеристик яблочного пюре при хранении при повышенных температурах (40–60 °С), определить масштабы этих изменений, выявить наиболее значимые изменяющиеся параметры и сравнить их с изменением органолептических свойств пюре. Работа направлена на оценку возможности и целесообразности использования получаемых в таких ускоренных испытаниях данных для прогнозирования изменения качества продукта.

#### Объекты и методы исследования

Объектом исследования служило стерильное и гомогенизированное пюре из яблок для питания детей раннего возраста от 4-х месяцев в упаковке дой-пак из комбинированного материала; масса нетто 90 г (ТУ 10.86.10-007-48450600-2016).

Термическую обработку проводили при температуре 40, 50 или 60 °С в условиях принудительной вентиляции в низкотемпературной печи СНОЛ-3.9.3.9.3.6/3.5-2Н (Республика Беларусь). Выбор диапазона температур обусловлен необходимостью

обеспечить высокую скорость изменения характеристик в условиях, максимально приближенных к обычным условиям хранения продукта.

Определение цветометрических характеристик и спектров отражения в области 400–700 нм осуществляли с помощью спектрофотометра ColorFlex (HunterLab, США) в режиме: угол освещения 45°, анализ отражения под углом 0° к поверхности, угол наблюдения 10°, источник света D65. Используемое в качестве основного критерия значение цветового различия  $\Delta E$  в системе CIE Lab-76 определяли по уравнению (1):

$$\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2} \quad (1)$$

где  $\Delta L^* = L_0^* - L_i^*$ ,  $\Delta a^* = a_0^* - a_i^*$ ,  $\Delta b^* = b_0^* - b_i^*$ . Индекс 0 относится к образцу до испытаний, а индекс  $i$  – к образцу после определенного периода испытаний. Значения  $L^*$ ,  $a^*$  и  $b^*$  (в системе CIE Lab-76 величина  $L^*$  определяет яркость, параметр  $a^*$ , в зависимости от знака, – интенсивность красного (+) и зеленого (–) цветов,  $b^*$  – желтого (+) и синего (–) цветов) устанавливали в результате измерений с использованием программного обеспечения спектрофотометра ColorFlex. Измерения цвета при каждой температуре и каждом конкретном времени хранения проводили для 3 индивидуальных образцов. Затем рассчитывали средние значения, которые использовали при анализе кинетики процессов. Органолептические свойства (внешний вид, консистенцию, цвет, вкус и запах) оценивали в соответствии с рекомендациями МУК 4.2.1847-04. Относительную концентрацию ионов водорода в пюре до и после термообработки определяли с помощью рН-метра Kelilong PH-221.

Исследования протонной релаксации проводили на приборе МиниспекРС-120 (Брукер, Германия) на частоте 20 МГц. Время спин-решеточной релаксации ( $T_1$ ) измеряли с помощью импульсной последовательности 180°–90° при следующих условиях: длительность 90° импульса 2,3 мкс, количество точек на кривой 20, задержка между сканами 4–10 с. Время спин-спиновой релаксации ( $T_2$ ) протонов определяли с использованием импульсной последовательности Карра-Парселла-Мейбума-Гилла (КПМГ) при следующих условиях: длительность 90° импульса 2,3 мкс, время между 90° и 180° импульсами 150 мкс, количество точек на кривой спада 1500, накопление 9 сканов, задержка между сканами 4–10 с. Полученные кривые изменения намагниченности анализировали с помощью программы дискретного многоэкспоненциального разложения MULTIT1a и MULTIT2a (Брукер) или программы ORIGIN 9. Каждый образец измерялся 5 раз. Результаты представлены в виде среднего значения и среднеквадратичного отклонения. Относительная ошибка релаксационных измерений не превышала 6 %.

Коэффициент диффузии  $D$  протонов определяли на приборе МиниспекРС-120 (Брукер, Германия) с установкой импульсного градиента с двуимпульсной последовательностью [22]. Значения  $D$  получали из зависимости относительной амплитуды спинового эха от параметров импульсного градиента магнитного поля:

$$\ln(A_n / A_0) = -\gamma^2 g^2 \delta^2 (\Delta - \delta / 3) D \quad (2)$$

где  $A_n$  и  $A_0$  амплитуды эха с и без импульсного градиента;  $\gamma$  – гиромагнитное отношение для протона ( $26,75 \times 10^7$  град. Тл<sup>-1</sup>с<sup>-1</sup>);  $g$  и  $\delta$  (500 мкс) – амплитуда и длительность импульсного градиента;  $\Delta$  – время между импульсными градиентами (время диффузии);  $D$  – коэффициент диффузии. Диапазон изменения  $g$  составил 0,1–2,5 Тл/м<sup>-1</sup>. Изменяющимися величинами являлись  $\Delta$  и  $g$ . Градуировку значений импульсного градиента  $g$  проводили с использованием коэффициента диффузии воды при 25 °С ( $D = 2,3 \times 10^{-9}$  м<sup>2</sup>/с). Различное содержание влаги в образце при диффузионных исследованиях достигалось вакуумированием ( $\sim 10^{-3}$  мм ртутного столба).

Для ДСК измерений использовался калориметр марки DSC204FPhoenix (Германия) с программным обеспечением Proteus. Температурная калибровка производилась по индию (156,6 °С) и ртути (–38,8 °С). В эксперименте охлаждение образцов проводилось со скоростью 10 °С в минуту: от 20 до –70 °С, нагревание со скоростью 5 °С: от –70 до 20 °С. Масса незамерзающей воды определялась из соотношения:

$$W_{\text{unf}} = W_0 - W_{\text{f}} \quad (3)$$

где  $W_0$  – масса воды в образце, определяемая высушиванием в течение суток при 104 °С;  $W_{\text{f}}$  – масса замерзшей воды, определяемая из эндотермического пика плавления льда с учетом удельной теплоты плавления льда  $H_0 = 333,8$  Дж/г.

В качестве спиновых зондов при ЭПР исследованиях в работе использовали стабильные нитроксильные радикалы: 2,2,6,6-тетраметил-пиперидин-1-оксил (ТЕМПО) и 16-доксилстеариновую кислоту (16DSA), химические структуры которых представлены в таблице 1 (Sigma-Aldrich, США). Необходимое количество ТЕМПО помещали в исследуемый образец. 16DSA сначала растворяли в этаноле, а затем отбирали необходимое количество раствора, испаряли растворитель, и в колбу с оставшимся радикалом добавляли яблочное пюре. Образцы перемешивали на магнитной мешалке при комнатной температуре до тех пор, пока в спектрах ЭПР переставал проявляться широкий синглет от нерастворенных радикалов. Время перемешивания составляло около 3 ч для ТЕМПО и примерно 20 ч

для 16DSA. Концентрация радикалов в образцах не превышала  $2 \times 10^{-5}$  М. Спектры ЭПР X-диапазона регистрировали на спектрометре BrukerEMX (Германия). Образец помещался в резонатор спектрометра в стеклянном капилляре диаметром 0,9 мм. Микроволновая мощность была не более 2 мВт, чтобы избежать эффектов насыщения. При записи спектров амплитуда модуляции 100 кГц не превышала значения 0,7 Гс. Для определения магнитно-резонансных параметров ЭПР сигналов использовали программы WINEPR и SIMFONIA (Bruker).

Время корреляции вращения ( $\tau_c$ ) зондов определяли по формуле

$$\tau_c = 6,65 \times 10^{-10} \Delta H^+ \left( \sqrt{I^+ / I^-} - 1 \right) \quad (4)$$

где  $\Delta H^+$  – ширина низкочастотной компоненты спектра;  $I^+ / I^-$  – отношение интенсивностей низкочастотной и высокочастотной компонент соответственно. Изотропные константы СТВ  $a^N$  определяли из спектров ЭПР радикалов.

Оптические микрофотографии в просвечивающем режиме были получены с использованием бинокулярного оптического микроскопа BS-702B, оснащенного цифровой USB-камерой UCMOS08000KPB на базе КМОП-сенсора формата 1/2,5 дюйма с разрешением 3264×2448 пикселей с программным обеспечением AltamiStudio.

### Результаты и их обсуждение

При выдерживании образцов при повышенных температурах наблюдается изменение цвета, количественно характеризующееся уменьшением коэффициента отражения во всей видимой области спектра, наиболее сильно выраженное в области 550–650 нм. Чем выше температура и больше продолжительность испытаний, тем сильнее выражено это изменение.

Для кинетического анализа в качестве количественной характеристики удобнее использовать цветовое различие  $\Delta E$ , чем цвет образца, определяемое по формуле 1. Величина  $\Delta E$  прямо пропорциональна времени испытания  $t$  (рис. 1). Наклон прямой в координатах  $\Delta E - t$  соответствует скорости изменения цвета, причем величина скорости определяется надежно и точно (коэффициенты корреляции  $R^2$  для прямых при 40, 50 и 60 °С составляют 0,978, 0,980 и 0,985 соответственно). Также наблюдается закономерность: чем выше температура, тем больше значение скорости.

Зависимость скорости увеличения  $\Delta E$  от температуры описывается уравнением Аррениуса (рис. 2), представляемого в полулогарифмических координатах в виде линейной зависимости (5):

$$\ln[d(\Delta E) / dt] = A - E_a / R \quad (5)$$

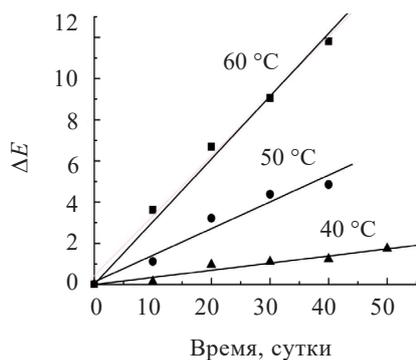


Рисунок 1. Увеличения цветового различия при выдерживании образцов пюре при температуре 40, 50 и 60 °C

Figure 1. Color changes in puree samples at 40, 50, and 60 °C

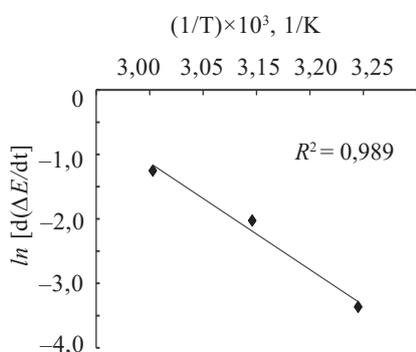


Рисунок 2. Зависимость логарифма скорости увеличения цветового различия от температуры

Figure 2. Effect of temperature on the logarithm of the rate of increase in color difference

где  $E_a$  – энергия активации процесса;  $A$  – коэффициент;  $R$  – универсальная газовая постоянная.

Энергия активации процесса  $E_a$  составляет 92 кДж/моль. Используя это значение, можно рассчитать коэффициент ускорения (или замедления, при переходе к более низким температурам)  $k_a$  при увеличении температуры от 20 до 40 °C по уравнению (6):

$$\ln k_a = E_a [(T_2 - T_1) / (RT_2 T_1)] \quad (6)$$

где  $T_1$  (293 К) – температура хранения (20 °C);  $T_2$  (313 К) – температура испытания (40 °C). В результате коэффициент ускорения составил 11 (минимальная оценка). Следовательно, изменение цвета при 20 °C должно происходить в 11 раз медленнее, чем при 40 °C. Рассчитываемая (прогнозная) величина цветового различия  $\Delta E$  при хранении образцов пюре в течение года при 18–22 °C в этом случае не превышает 1,1. Это значение является минимальным. Его может визуально оценить только квалифици-

рованный специалист и только при одновременном сравнении с контрольным образцом при определенных условиях освещения.

Данные, полученные методом количественной цветометрии, соответствуют качественным изменениям органолептических характеристик, оцениваемых одновременно с изменением цвета через определенные периоды термообработки (табл. 1 и 2).

В таблицах 1 и 2 приведены результаты органолептической оценки качества пюре после тепловой обработки при 50 и 60 °C. Длительность тепловой обработки соответствует временным интервалам. Затем определяли цветометрические характеристики пюре (точки на рисунке 1 для прямых при 50 и 60 °C). Наблюдается соответствие данных рисунка 1 и таблиц 1 и 2: чем выше температура и больше длительность испытаний, тем сильнее выражены изменения. С данными рисунка 1 хорошо коррелируют результаты визуальной оценки цвета, а также появление выраженного горького привкуса пюре. При 40 °C изменение цвета и ухудшение органолептических свойств выражены незначительно, что подтверждает наличие корреляции между этими характеристиками.

Для лучшего понимания процессов, протекающих в пюре при повышенных температурах, проведена оценка содержания кислот после теплового воздействия (рис. 3). Как следует из полученных данных, определяемое с помощью стеклянного электрода значение pH пюре практически не меняется. Наблюдающееся небольшое снижение pH не связано с температурой и не превышает неопределенность измерений, обусловленную варьированием значений pH образцов до проведения испытаний.

Данные рисунка 3 позволяют исключить протекание в пюре микробиологических процессов и окисление компонентов пюре кислородом воздуха. Это свидетельствует о герметичности упаковки, сохраняющейся даже после длительных испытаний при повышенных температурах.

Информация о процессах, протекающих при термическом воздействии на пюре, получена при анализе состояния воды, оцениваемого по времени спин-решеточной ( $T_1$ ) и спин-спиновой ( $T_2$ ) релаксаций. Эти величины зависят от вращательной и трансляционной подвижности молекул воды и служат характеристикой ее мобильности как в свободном, так и в связанном состоянии. Их одновременное увеличение характеризует повышение подвижности молекул воды. Как видно из рисунков 4 и 5, на начальных этапах термообработки  $T_1$  и  $T_2$  растут со временем. Масштаб этого изменения при 60 °C больше, чем при 50 °C. После продолжительного теплового воздействия значения  $T_1$  и  $T_2$ , достигнув определенного уровня, практически перестают изменяться. Однако чем выше температура обработки, тем больше стационарные значения. Оцениваемая

Таблица 1. Изменение органолептических свойств при выдерживании образцов при 50 °С

Table 1. Sensory properties at 50 °C

Органолептическое свойство	Время выдержки при температуре 50 °С, сутки			
	10	20	30	40
Внешний вид	Однородная масса без комков и посторонних включений			
Цвет	Тертого яблока, без изменений	Темнее, 4 балла	Темнее, 3–4 балла	Темнее, 3 балла
Вкус	Яблочный, сладкий	Яблочный, менее сладкий	С неприятным привкусом и горчинкой	С неприятным привкусом, горьковатый и с выраженной кислинкой
Запах	Яблочный	Яблочный	Яблочный	Яблочный, горьковатый
Консистенция	Соответствует первоначальной	Соответствует первоначальной	Более жидкая	Более жидкая

Таблица 2. Изменение органолептических свойств при выдерживании образцов при 60 °С

Table 2. Sensory properties at 60 °C

Органолептическое свойство	Время выдержки при температуре 60 °С, сутки			
	10	20	30	40
Внешний вид	Однородная масса без комков и посторонних включений			
Цвет	Темнее, 4 балла	Темнее, 3–4 балла	Темнее, 3 балла	Темнее, 2–3 балла
Вкус	Яблочный, сладкий	Яблочный, менее сладкий, кисловатый	С неприятным привкусом, горьковатый	С неприятным привкусом, горький и с выраженной кислинкой
Запах	Яблочный	Яблочный	Яблочный	Яблочный, горьковатый
Консистенция	Соответствует первоначальной	Более жидкая	Более жидкая	Более жидкая

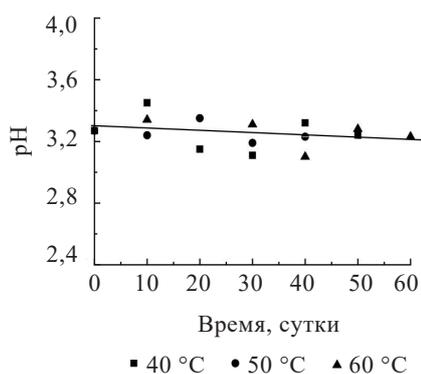


Рисунок 3. Относительное содержание кислот в образцах пюре, выдержанных различное время при температуре 40, 50 и 60 °С

Figure 3. Relative acid content at 40, 50, and 60 °C

по изменению  $T_1$  энергия активации процесса составляет  $\sim 82$  кДж/моль, а по изменению  $T_2$  на начальных стадиях  $\sim 94$  кДж/моль. Учитывая относительно большую неопределенность этих оценок, обусловленную большой дисперсией значений  $T_1$

и  $T_2$ , рассчитываемые таким образом величины энергии активации можно рассматривать лишь как качественные характеристики, а не количественные. Учитывая близость этих оценок к величине энергии активации, определяемой методом количественной цветометрии, можно полагать, что изменение цвета и возрастание  $T_1$  и  $T_2$  обусловлены одними и теми же процессами, протекающими при выдерживании образцов пюре при повышенных температурах.

Содержание воды в яблочном пюре составило  $85,0 \pm 0,7$  масс.% (среднее значение из 21 измерений). В отличие от работы [12] по протонной релаксации в яблоках в исследуемых образцах пюре было обнаружено, что  $T_1$  и  $T_2$  имеют не многокомпонентный, а однокомпонентный характер. Это говорит о быстром обмене между областью свободной воды и воды, связанной с неводными фракциями. Взаимодействие между этими фракциями объясняет пониженные значения времен релаксации в сравнении с их значением для свободной воды ( $T_1, T_2 \sim 2-3$  с). Изменение этого взаимодействия может быть обусловлено разрушением клеточных структур яблока при приготовлении пюре и его стерилизации. Как

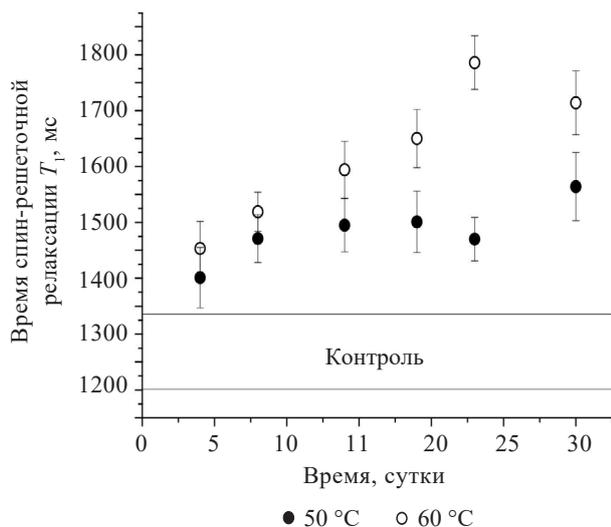


Рисунок 4. Изменение времени спин-решеточной релаксации ( $T_1$ ) при термообработке пюре при 50 и 60 °C

Figure 4. Spin-lattice relaxation time ( $T_1$ ) at 50 and 60 °C

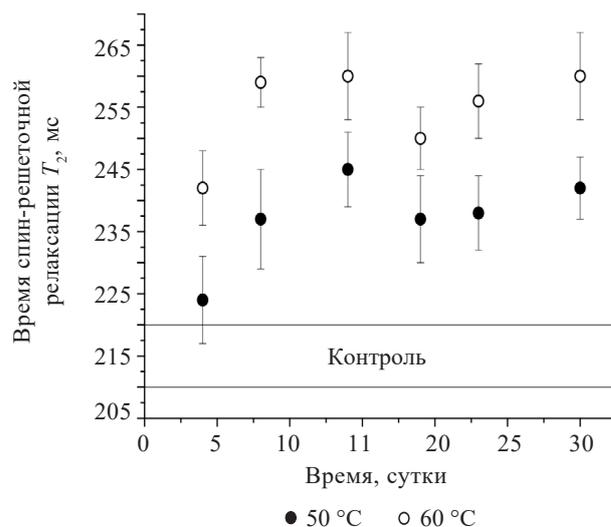
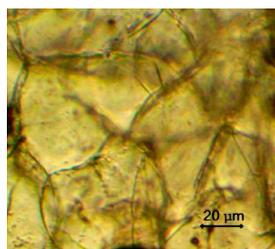
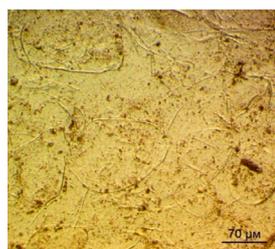


Рисунок 5. Изменение времени спин-спиновой релаксации ( $T_2$ ) при термообработке пюре при 50 и 60 °C

Figure 5. Spin-spin relaxation time ( $T_2$ ) at 50 and 60 °C



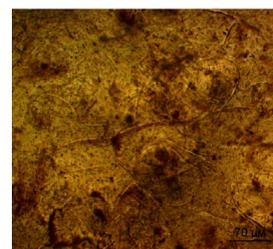
а – Яблоко цельное



б – Пюре контроль



с – Пюре, 30 сутки, 50 °C



д – Пюре, 30 сутки, 60 °C

Рисунок 6. Микроскопия образцов яблока и яблочного пюре при термообработке

Figure 6. Microscopy of apple and apple puree samples during heat treatment

следует из анализа образцов пюре методом оптической микроскопии (рис. 6), в них отсутствует четкая клеточная структура, характерная для яблок (рис. 6а), но имеются лишь фрагменты клеток и их агрегаты (рис. 6б). Термообработка при 50 °C приводит к дополнительному разрушению фрагментов клеток и клеточных оболочек, а также к образованию агрегатов (рис. 6с).

Это явление еще более выражено при 60 °C. В последнем случае наблюдается образование более крупных агрегатов, окрашенных в коричневый цвет (рис. 6д). С этим процессом связано изменение цвета пюре при термообработке.

Разрушение фрагментов клеток и клеточных оболочек и образование агрегатов должно приводить к уменьшению макроскопической вязкости, отмеченному в таблицах 1 и 2.

Эти процессы должны также приводить к снижению микроскопической вязкости, что должно

проявляться в увеличении коэффициента диффузии воды. Подтверждение этого предположения получено при измерении коэффициента диффузии воды методом градиента магнитного поля (рис. 7).

Как видно из рисунка 7, коэффициент диффузии при термообработке возрастает, и чем выше температура, тем больше наблюдаемый эффект. Как показали измерения  $D$  от времени диффузии  $\Delta$ , коэффициент диффузии остается приблизительно постоянным при варьировании  $\Delta$  в широких пределах. Поэтому можно говорить о неограниченном характере диффузии в образцах пюре после термообработки. Величина измеряемого коэффициента становится близка к коэффициенту диффузии в свободной воде ( $2,3 \times 10^{-9} \text{ м}^2/\text{с}$ ).

Изучение коэффициента диффузии  $D$  в образцах яблока показало его зависимость от таких факторов, как pH, количество растворимых и нерастворимых в воде веществ и температура [23, 24]. Как

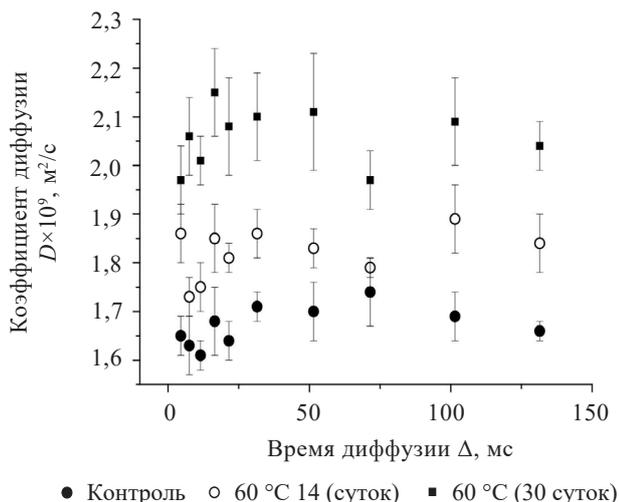


Рисунок 7. Коэффициенты диффузии воды в пюре до термической обработки и после прогрева при 60 °C в течение 14 и 30 суток

Figure 7. Water diffusion coefficients before and after heat treatment at 60°C for 14 and 30 days

видно из рисунка 3, значение pH постоянно. Влияние этого фактора на диффузионные процессы можно исключить.

Измерение  $D$ , в зависимости от содержания воды в образце, может отражать степень взаимодействия молекул воды с растворенными сахарами, полисахаридами клеточных мембран и другими неводными фракциями. Изучение изменения коэффициента диффузии воды в яблочном пюре, в зависимости от влагосодержания, для образцов, подвергнутых тепловому воздействию в 60 °C, представлено на рисунке 8. Температурное воздействие вызывает статистически достоверное различие в значениях  $D$  до содержания воды в образце 1 г  $H_2O$ /г сухого веса. Как показали исследования протонной магнитной релаксации и изотермы сорбции различных полисахаридов, количество воды в монослое на поверхности взаимодействия вода – полисахарид лежит в пределах 0,1–0,3 г  $H_2O$ /г сухого веса [25, 26]. Взаимодействие воды в яблочном пюре происходит с растворенными сахарами и полисахаридами неводных фракций. Сделав предположение о сходности таких взаимодействий, можно полагать, что при влажности 1 г  $H_2O$ /г сухого веса образец яблочного пюре имеет от трех до десяти монослоев воды.

Исследуя значения коэффициента диффузии воды в поверхностных слоях силикагеля, авторы работы [27] показали, что величина  $D$  имеет пониженное на порядок значение около поверхности взаимодействия и восстанавливается до значений  $D$  в свободной воде на расстоянии, превышающем 15 монослоев от поверхности. Можно предположить, что в образцах яблочного пюре с влагосодержанием

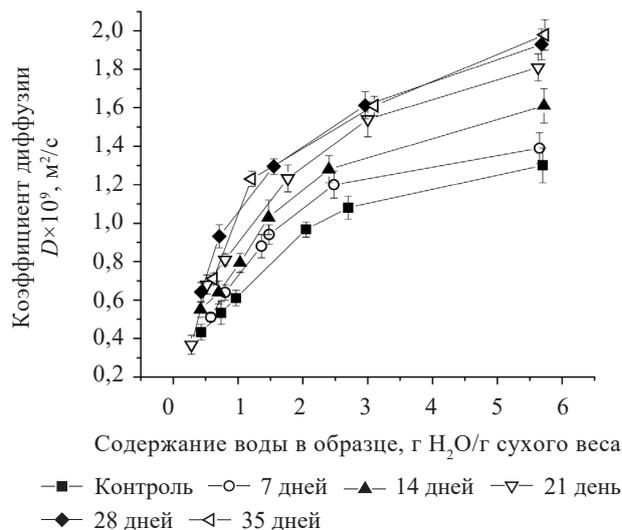


Рисунок 8. Изменение коэффициента диффузии воды в яблочном пюре, в зависимости от влагосодержания, для образцов, подвергнутых тепловому воздействию в 60 °C. Линии имеют ориентировочный характер

Figure 8. Water diffusion coefficient vs. moisture content at 60°C

1 г  $H_2O$ /г сухого веса вся вода находится под влиянием взаимодействия с полисахаридами, и увеличение  $D$  с повышением времени теплового воздействия отражает ослабление энергии взаимодействия вода – полисахарид. Это говорит о комплексном воздействии теплового эффекта на яблочное пюре, выражающемся в агломерации фрагментов и уменьшении энергии взаимодействия воды с растворами сахаров и полисахаридами клеточных структур.

В отличие от нативных яблок, где четко определены структурные понятия (вакуоли, цитоплазм, клеточные мембраны), в яблочном пюре тканевая структура разрушена. Для характеристики биофизических изменений следует применять обобщенные параметры, не привязанные к какой-либо структуре. Одним из таких параметров может быть количество некристаллизующейся при определенной отрицательной температуре воды. Количество некристаллизующейся воды может характеризовать взаимодействие в системе вода – неводная структура клетки и изменение количества центров этого взаимодействия. В яблочном пюре такого рода систему могут создать растворы сахаров, полисахариды, остатки клеточных мембран и аминокислоты. Такого рода взаимодействие может характеризовать многие свойства продуктов, влияющие на их сохранность [28]. Результаты изменения количества некристаллизующейся при –70 °C воды в яблочном пюре, подвергнутом термической обработке при 60 °C в течение 35 суток, представлены на рисунке 9. Следует отметить, что значения некристаллизующейся

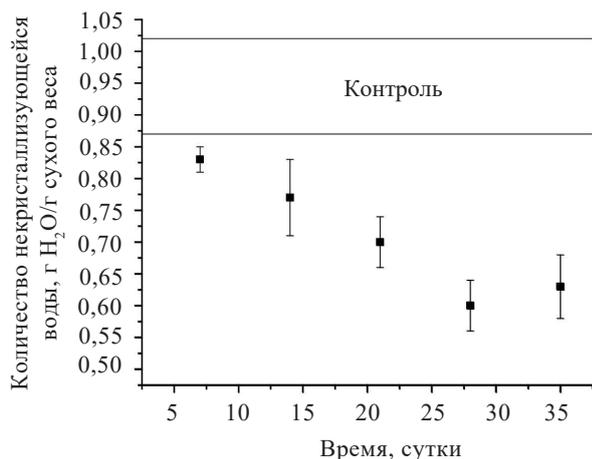


Рисунок 9. Количество некристаллизующейся воды при  $-70^{\circ}\text{C}$  воды в образцах яблочного пюре при тепловом воздействии в  $60^{\circ}\text{C}$

Figure 9. Non-crystallizing water ( $-70^{\circ}\text{C}$ ) at  $60^{\circ}\text{C}$

воды для яблочного пюре больше, чем для образцов крахмала и крахмального геля ( $0,2\text{--}0,4\text{ г H}_2\text{O/г}$  сухого веса) [29, 30]. Это может быть следствием высокой дисперсности пюре.

Наблюдаемые изменения значений некристаллизующейся воды можно объяснить как уменьшением энергии взаимодействия вода – неводные фракции, так и уменьшением поверхности этого взаимодействия, которое может произойти в результате агломерации неводных структур. Подобного рода агломерации можно видеть на рисунке 6с и д.

Интерпретация релаксационных и диффузионных исследований яблочного пюре предполагает определенный механизм этих явлений. Его связывают с наличием нескольких областей (вакуоль, цитоплазма, клеточная мембрана) с различными релаксационными свойствами [12, 31]. Релаксация в каждой области определяется объемной и поверхностной релаксацией, зависящей от скорости химического обмена, химическим сдвигом  $\Delta\omega$  и коэффициентом диффузии. Для яблочного пюре наличие химического обмена может оказывать влияние на релаксацию, т. к. примерно 85 % состава представляют собой растворы сахаров и других веществ. При наличии диффузионного обмена между областями релаксационные свойства зависят от размеров областей и проницаемости стенок (мембран), ограничивающих данную область [32]. Также на релаксацию оказывает влияние наличие областей с различной магнитной восприимчивостью, особенно для образцов нативных яблок, где воздух занимает приблизительно 20–25 % объема. В случае яблочного пюре этот фактор отсутствует.

Если времена протонной магнитной релаксации дают информацию о подвижности самой молекулы

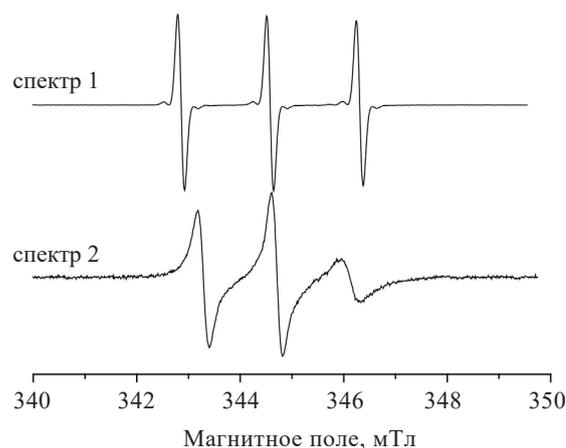


Рисунок 10. Спектры ЭПР зондов ТЕМПО (спектр 1) и 16DSA (спектр 2) в образцах яблочного пюре. Измерение при температуре  $20^{\circ}\text{C}$

Figure 10. RCS spectra of TEMPO (spectrum 1) and 16DSA (spectrum 2) probes at  $20^{\circ}\text{C}$

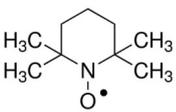
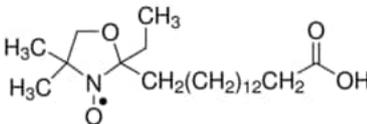
воды, то подвижность спиновых зондов, изучаемая методом ЭПР, дает такую информацию опосредованно в зависимости от локализации зонда. В гетерогенных системах радикал ТЕМПО локализуется в областях, имеющих меньшую плотность и большой свободный объем для вращения зонда. Данные области могут быть как гидрофобными, так и гидрофильными [32, 33]. На рисунке 10 представлен спектр ЭПР радикала ТЕМПО (спектр 1) в образце после 21 суток термической обработки яблочного пюре при  $60^{\circ}\text{C}$ . Спектры ЭПР зонда ТЕМПО во всех образцах яблочного пюре, независимо от времени термообработки, идентичны. Значения времени корреляции и изотропной константы СТВ,  $a^N$ , зонда ТЕМПО, представленные в таблице 3, указывают на локализацию радикала в гидрофильной области исследуемой системы в водной фазе. На рисунке 10 (спектр 2) представлен спектр ЭПР радикала 16DSA в яблочном пюре. Данный радикал плохо растворим в воде, поэтому он локализован в гидрофобных областях гетерогенных систем, что видно с учетом его молекулярно-динамических характеристик (табл. 3) [21].

В нашем случае локализация возможна внутри доменов с высокой долей пектина или клетчатки. Как и в случае с зондом ТЕМПО, спектры ЭПР зонда 16DSA во всех образцах яблочного пюре идентичны и не изменяются при термообработке в течение 30 суток.

Неизменность параметров ЭПР зондов при термообработке указывает на то, что все изменения физической структуры яблочного пюре происходят на макромолекулярном уровне и не затрагивают микроуровень, в котором работает техника ЭПР (времена корреляции спиновых зондов  $\tau_c \sim 10^9\text{--}10^{11}\text{ Гц}$ ).

Таблица 3. Структура, времена корреляции и изотропные константы СТВ нитроксильных радикалов в образцах яблочного пюре. Измерение при температуре 20 °С

Table 3. Structure, correlation times, and isotropic constants of nitroxide radicals at 20°C

Спиновый зонд	Время корреляции, с	Константа СТВ, мТл
2,2,6,6-Тетраметилпиперидин-1-оксил (ТЕМПО) 	$3,0 \times 10^{-11}$	1,725
16-Доксилстеариновая кислота (16DSA) 	$1,2 \times 10^{-9}$	1,410

Агрегация, при которой возможны изменения в характере перестройки полисахаридных цепей как целого, может быть такого рода уровнем. Изменения в структуре и динамике взаимодействия воды и неводных фракций, наблюдаемые в нашем опыте, могут быть выявлены другими методиками ЭПР, такими как методика переноса насыщения, работающая в частотном диапазоне спиновых зондов ( $10^5$  с и ниже) [34]. К сожалению, технические возможности не позволили нам провести такого рода исследования, мы надеемся осуществить это в дальнейшем.

### Выводы

При длительном выдерживании яблочного пюре в упаковке из комбинированного материала при 40–60 °С меняется цвет, количество кристаллизующейся при –70 °С воды и релаксационные характеристики протонов воды, а также размеры частиц клеток яблока.

Изменение цвета более четко, по сравнению с другими характеристиками, отражает влияние температуры и времени воздействия на процессы, приводящие к изменению свойств пюре, и коррелирует с изменением органолептических характеристик продукта при тех же температурах. При длительном выдерживании яблочного пюре в упаковке из комбинированного материала при 40–60 °С изменение цвета, основной причиной которого является превращение полифенолов в хиноны, соответствует кинетическому уравнению реакции нулевого порядка, а энергия активации этого процесса составляет 92 кДж/моль. Поэтому можно надеяться, что в дальнейшем при получении дополнительных данных для аналогичных продуктов с использованием этой характеристики можно будет разработать ускоренный метод объективной инструментальной оценки срока хранения яблочного пюре.

Времена спин-решеточной ( $T_1$ ) и спин-спиновой ( $T_2$ ) релаксаций исследованного продукта имеют

однокомпонентный характер. Это свидетельствует о разрушении клеточных структур в процессе приготовления пюре. Чем выше температура термообработки, тем больше начальные скорости увеличения  $T_1$  и  $T_2$  и их квазистационарные значения. Энергия активации процесса, оцениваемая по изменению  $T_1$ , составляет ~ 82 кДж/моль, а по изменению  $T_2$  на начальных стадиях ~ 94 кДж/моль. Качественное соответствие значений энергий активации, определяемых методами цветометрии и протонной релаксации, свидетельствует об общности процессов, ответственных за образование окрашенных структур и изменение состояния воды при термообработке пюре в исследованном диапазоне температур.

Данные, полученные методами оптической микроскопии, ЯМР релаксации, ДСК и ЭПР, свидетельствуют о том, что основным физическим процессом при хранении пюре при повышенных температурах является агрегация фрагментов клеток яблока и уменьшение количества связанной с этими фрагментами воды.

### Критерии авторства

А. И. Сергеев проводил исследование, измерение характеристик продукта и анализ данных, писал статью. И. Г. Калинина проводила исследование и измерение характеристик продукта. Н. Г. Шилкина отрабатывала методику эксперимента и проводила исследование. И. И. Барашкова проводила эксперимент и анализ полученных результатов. М. А. Градова проводила эксперимент и анализ полученных результатов. М. В. Мотякин проводил эксперимент и анализ полученных результатов, редактировал статью. В. Б. Иванов проводил анализ данных, готовил и редактировал статью.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Contribution

A.I. Sergeev performed the research, analyzed the data, and wrote the paper. I.G. Kalinina performed the research and measurements. N.G. Shilkina performed the research and measurements. I.I. Barashkova was responsible for the research and data analysis. M.A. Gradova performed the research and data analysis. M.V. Motyakin performed the research, analyzed

the data, and proofread the manuscript. V.B. Ivanov analyzed the data, drafted the manuscript, and proofread the final version.

### Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

### References/Список литературы

1. Rocha AMCN, Morais AMMB. Self live of minimally processed apple (cv. Jonagored) determined by colour change. *Food Control*. 2003;14(1):13–20. [https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(02\)00046-4](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(02)00046-4)
2. Osluga R, Sakurai M, Orikasa T, Uemura M. Quality and microbial evaluation of fresh-cut apples during 10 days of supercooled storage. *Food Control*. 2021;126. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108014>
3. Vaikousi H, Koutsoumanis K, Biliaderis CG. Kinetic modeling of non-enzymatic browning of apple juice concentrates differing in water activity under isothermal and dynamic heating conditions. *Food Chemistry*. 2008;107(2):785–796. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.078>
4. Quintero Ruts NA, Demarchi SM, Massolo JF, Rodoni LM, Giner SA. Evaluation of quality during storage of apple leather. *LWT*. 2012;47(2):485–492. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.02.012>
5. Prchalová J, Čížková H, Sevcik R, Hanušová K, Rajchl A. Evaluation of shelf-life of fruit baby food. *Agronomy Research*. 2016;14(2):556–558.
6. Joardder MUH, Mourshed M, Masud MH. State of bound water: Measurement and significance in food processing. Cham: Springer; 2019. 142 p. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-99888-6>
7. Sergeev A, Mettu S, Zaborova V. The influence of extruded flour on water content and retrogradation process in muffins during storage: NMR relaxation study. *Journal of Food Science and Technology*. 2021;58(5):2028–2033. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04921-5>
8. Leca A, Clerjon S, Bonny J-M, Renard CMGC, Traore A. Multiscale NMR analysis of the degradation of apple structure due to thermal treatment. *Journal of Food Engineering*. 2021;294. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110413>
9. Marigheto N, Venturi L, Hills B. Tow-dimensional NMR relaxation studies of apple quality. *Postharvest Biology and Technology*. 2008;48(3):331–340. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.11.002>
10. Chayaprasert W, Stroshine R. Rapid sensing of internal browning in whole apples using a low-cost, low field proton magnetic resonance sensor. *Postharvest Biology and Technology*. 2005;36(3):291–301. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2005.02.006>
11. Hills BP, Duce SL. The influence of chemical and diffusive exchange on water proton transverse relaxation in plant tissues. *Magnetic Resonance Imaging*. 1990;8(3):321–331. [https://doi.org/10.1016/0730-725X\(90\)90106-C](https://doi.org/10.1016/0730-725X(90)90106-C)
12. Snaar JEM, Van As H. Probing water compartments and membrane permeability in plant cells by <sup>1</sup>H NMR relaxation measurements. *Biophysical Journal*. 1992;63(6):1654–1658. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(92\)81741-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(92)81741-1)
13. Sibgatullin TA, de Jager PA, Vergeldt FJ, Gerkema E, Anisimov AV, Van As H. Combined analysis of diffusion and relaxation behavior of water in apple parenchyma cells. *Biophysics*. 2007;52(2):196–203. <https://doi.org/10.1134/S0006350907020091>
14. Tylewicz U, Aganovic K, Vannini M, Toepfl S, Bortolotti V, Dalla Rosa M, et al. Effect of pulsed electric field treatment on water distribution of freeze-dried apple tissue evaluated with DSC and TD-NMR techniques. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2016;37:352–358. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.06.012>
15. Ding M, Lu Y, Bowman L, Huang C, Leonard S, Wang L, et al. Inhibition of AP-1 and neoplastic transformation by fresh apple peel extract\*. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(11):10670–10676. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311465200>
16. Oszmianski J, Wolniak M, Wojdyło A, Wawer I. Influence of apple pure'e preparation and storage on polyphenol contents and antioxidant activity. *Food Chemistry*. 2008;107(4):1473–1484. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.10.003>
17. Irwin PL, Sevilla MD, Chamulitrat W, Hoffman AE, Klein J. Localized, internal, and supramolecular polyuronide motions in cell wall matrices: A comparison of solid-state NMR and EPR relaxation behavior. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1992;40(11):2045–2051. <https://doi.org/10.1021/jf00023a003>
18. Raffi JJ, Agnel J-PL. Electron spin resonance identification of irradiated fruits. *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part C. Radiation Physics and Chemistry*. 1989;34(6):891–894.
19. Berliner LJ. Spin labeling. Theory and applications. New York: Academic Press; 1976.

20. Wasserman AM, Yasina LL, Motyakin MV, Aliev II, Churochkina NA, Rogovina LZ, *et al.* EPR spin probe study of polymer associative systems. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2008;69(5):1344–1353. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2007.09.028>
21. Wasserman AM. Spin probes in micelles. *Russian Chemical Reviews*. 1994;63(5):373–382. <https://doi.org/10.1070/RC1994v063n05ABEH000091>
22. Stejskal EO, Tanner JE. Spin diffusion measurements: Spin echoes in the presence of a time-dependent field gradient. *The Journal of Chemical Physics*. 1965;42(1):288–292. <https://doi.org/10.1063/1.1695690>
23. Keener KM, Stroshine RL, Nyenhuis JA. Proton magnetic resonance measurements of self-diffusion coefficient of water in sucrose solutions, citric acid solutions, fruit juices, and apple tissue. *Transactions of the ASAE*. 1997;40(6):1633–1641. <https://doi.org/10.13031/2013.21402>
24. Keener KM, Stroshine RL, Nyenhuis JA. Evaluation of low field (5.40-MHz) Proton magnetic resonance measurements of  $D_w$  and  $T_2$  as methods of nondestructive quality evaluation of apples. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 1999;124(3):289–295. <https://doi.org/10.21273/JASHS.124.3.289>
25. Le Boltan D, Rugraff Y, Martin C, Colonna P. Quantitative determination of bound water in wheat starch by time domain NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research*. 1998;308(1–2):29–36. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(98\)00068-8](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(98)00068-8)
26. Bizot H, Le Bail P, Leroux B, Davy J, Roger P, Buleon A. Calorimetric evaluation of the glass transition in hydrated, linear and branched poly(1,6)-D-glucopyranoside compounds. *Carbohydrate Polymers*. 1997;32(1):33–50. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(96\)00146-4](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(96)00146-4)
27. Morariu VV, Mills R. Self-diffusion of water adsorbed on silica. *Zeitschrift für Physikalische Chemie*. 1972;79:1–9. [https://doi.org/10.1524/zpch.1972.79.1\\_2.001](https://doi.org/10.1524/zpch.1972.79.1_2.001)
28. Roos YH. *Phase transition in foods*. San Diego: Academic Press; 1995. 360 p.
29. Suzuki S, Kitama S. Unfrozen water in amylose molecules is dependent on the molecular structures – A differential scanning calorimetric study. *Food Hydrocolloids*. 2008;22(5):862–867. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.04.011>
30. Tananuwong K, Reid DS. DSC and NMR relaxation studies of starch-water interactions during gelatinization. *Carbohydrate Polymers*. 2004;58(3):345–358. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.08.003>
31. Brownstein KR, Tarr CE. Importance of classical diffusion in NMR studies of water in biological cells. *Physical Review A*. 1979;19(6):2446–2453. <https://doi.org/10.1103/PhysRevA.19.2446>
32. Buchachenko AL, Vasserman AM. Stable radical. Moscow: Khimiya; 1973. 408 p. (In Russ.). [Бучаченко А. Л., Вассерман А. М. Стабильные радикалы. М.: Химия, 1973. 408 с.]
33. Timofeev VP, Misharin AY, Tkachev YaV. Simulation of EPR spectra of the radical TEMPO in water-lipid systems in different microwave ranges. *Biophysics*. 2011;56(3):407–417. <https://doi.org/10.1134/S0006350911030274>
34. van den Dries IJ, van Dusschoten D, Hemminga MA, van der Linden E. Effects of water content and molecular weight on spin probe and water mobility in malto-oligomer glasses. *Journal of Physical Chemistry B*. 2000;104(44):10126–10132. <https://doi.org/10.1021/jp0001541>