

# 还原型谷胱甘肽和几种常见二肽抗氧化性的比较研究

胡晓赟, 曾茂茂, 陈洁\*

(江南大学食品学院, 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122)

**摘要:** 在 DPPH 自由基体系、ABTS<sup>+</sup>· 体系、亚铁离子螯合和亚油酸过氧化体系中, 对还原型谷胱甘肽、L-肌肽、N-乙酰-L-肌肽、甘氨酸-L-酪氨酸、L-丙氨酸-谷氨酰胺、双甘氨酸的抗氧化性进行比较。结果表明: 以上几种小肽均具有一定的抗氧化能力, 尤其在亚油酸体系中。其中含有半胱氨酸的还原型谷胱甘肽、含有酪氨酸的甘氨酸-L-酪氨酸的抗氧化能力与 BHA 和 VE 相当, L-肌肽、双甘氨酸、L-丙氨酸-谷氨酰胺其次, 最弱的是 N-乙酰-L-肌肽。含组氨酸的 L-肌肽有很强的螯合金属离子的能力, 其质量浓度 1mg/mL 时即可达到 92.51% 的螯合亚铁离子的能力, 与 EDTA 的螯合能力相近。

**关键词:** 还原型谷胱甘肽; 二肽; 抗氧化性; 金属螯合能力

## Comparison of Antioxidant Activities of Reduced Glutathione and Several Common Dipeptides

HU Xiao-yun, ZENG Mao-mao, CHEN Jie\*

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** The antioxidant activities of reduced glutathione, L-carnosine, N-acetyl-L-carnosine, Gly-L-Tyr, L-Ala-Gln and Gly-Gly were measured by various chemical assays, including DPPH radical scavenging assay, ABTS radical scavenging assay, ferrous ion chelating assay and ferric thiocyanate method (for determining the inhibitory activity against linoleic acid peroxidation). The results showed that all these peptides had antioxidant activity, especially in linoleic acid system for peroxidation inhibitory activity. The antioxidant activity of reduced glutathione and Gly-L-Tyr were similar to those of BHA and VE and better than those of L-carnosine, L-Ala-Gln and Gly-Gly, and N-acetyl-L-carnosine had the weakest antioxidant activity. L-Carnosine, which contains histidine, was excellent in chelating ferrous ions, and the ability reached 92.51% at the concentration of 1 mg/mL, which was similar to that of EDTA.

**Key words:** reduced glutathione; dipeptide; antioxidant activity; metal ion chelating

中图分类号: TS251.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)07-0006-05

抗氧化肽由于具有生理活性, 且分子质量小、易吸收, 成为近年来的研究热点。迄今为止, 研究人员在蛋白质原料、蛋白酶、水解时间等对蛋白水解物的抗氧化性的影响, 抗氧化肽的构效关系, 以及在食品中的应用等方面都做了大量的研究<sup>[1-4]</sup>。Chen Yu 等<sup>[5]</sup>用木瓜蛋白酶水解土豆蛋白, 并通过反相高效液相色谱(RP-HPLC)的分离和超高效液相色谱(UPLC)的纯化得到结构明确的肽段, 包括 Thr-Tyr、Tyr-Phe-Glu、Tyr-Ser-Thr-Ala 和 Asn-Tyr-Lys-Gln-Met; 酪蛋白水解肽和玉米蛋白

水解肽可在碎牛肉和香肠中起到抑制脂肪氧化的作用<sup>[6-7]</sup>。然而, 研究也发现, 肽的抗氧化机制比较复杂, 它们不仅能清除自由基还可以螯合金属离子<sup>[8-11]</sup>; 尽管各类蛋白质水解物都有一定的抗氧化性, 但抗氧化性与其结构的关系迄今为止尚不明了, 目前可以知道特定的氨基酸残基、氨基酸残基的位置和肽链的长短都可以影响肽的抗氧化活性<sup>[4-5,10]</sup>。但大量研究结果表明, 随着蛋白水解物不断被分离和纯化, 纯肽其抗氧化性与纯化前总体相当, 具有典型淬灭自由基或者螯合金属离子能力的肽在

收稿日期: 2011-04-12

基金项目: 国家“973”计划前期研究专项(2010CB535014); 国家自然科学基金项目(20976071; 30972290)

作者简介: 胡晓赟(1986—), 女, 硕士研究生, 主要从事食品蛋白质功能研究。E-mail: xyh6027@163.com

\* 通信作者: 陈洁(1969—), 女, 教授, 博士, 主要从事食品蛋白质功能研究。E-mail: chenjie@jiangnan.edu.cn

经过纯化后,并不能显示出更强的抗氧化能力。上述结果表明,抗氧化肽抗氧化机制及其与结构的相关性远未达到明确的水平。为了能够更好地理解并应用抗氧化肽这个天然的新型的潜在抗氧化材料,进一步深入研究抗氧化肽的结构与功能的相关性显得十分重要。

本研究采用结构明确的高纯度的二肽、三肽及他们的衍生物,探讨这些结构明确的肽类清除自由基、螯合金属离子以及抑制亚油酸氧化能力方面的差别,试图通过比较具有明确结构的抗氧化肽之间抗氧化活性的差别,加深对小肽的结构与抗氧化机理相关性的理解,为未来抗氧化肽在食品工业中的应用提供基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与试剂

还原型谷胱甘肽(纯度99%) 日本协和公司; L-肌肽(纯度99%)、双甘氨酸(纯度98.5%) 上海源聚生物科技有限公司; L-丙氨酸-谷氨酰胺(纯度98.5%)、甘氨酸-L-酪氨酸(纯度99%) 济南诚汇双达化工有限公司; N-乙酰-L-肌肽(纯度98%) 宁波科瑞生物工程有限公司。

1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、2,2'-连氮-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)自由基(ABTS<sup>+</sup>·)、Trolox、BHA、菲洛嗪 美国Sigma公司; 亚油酸 东京化成工业株式会社; 过硫酸钾、氯化亚铁、铁氰化钾、三氯乙酸、氯化铁、抗坏血酸、硫氰酸铵 国药集团化学试剂有限公司。

### 1.2 仪器与设备

Cary50 紫外探头型可见光光谱仪 美国Varian公司; AL204 分析天平 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; TDL-5-A 台式离心机 上海安亭科学仪器厂。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 DPPH 自由基清除能力的测定

参照文献[1,12-13]的方法并略作修改,1.5mL适当质量浓度的纯肽溶液与1.5mL 0.1mmol DPPH(溶解于pH5.5的甲醇中)工作液混合,在室温下反应30min后在波长517nm处测定吸光度。测定适当浓度BHA的DPPH自由基清除能力作比较。

配制一系列浓度的Trolox溶液(0~50μmol/L),1.5mL不同浓度的Trolox溶液与1.5mL 0.1mmol DPPH自由基工作液混合,在室温下反应30min后,在517nm波长处测定吸光度。以Trolox溶液浓度为横坐标,清除率为纵坐标,绘制标准曲线。DPPH自由基清除能力用Trolox等价抗氧化能力表示(mmol Trolox/100g),公式如式(1)。

$$\text{DPPH 自由基清除能力} = \frac{C_{\text{TEAC}}}{10 \rho_{\text{样品}}} \quad (1)$$

式中:  $C_{\text{TEAC}}$  为样品在标准曲线中等价的Trolox浓度(μmol/L);  $\rho_{\text{样品}}$  为样品质量浓度/(mg/mL)。

#### 1.3.2 ABTS<sup>+</sup>·清除能力的测定

参照文献[2,14]的方法并略作修改,将7mmol的ABTS<sup>+</sup>·储备液与2.45mmol/L高硫酸钾混合,在室温、避光条件下放置16h,形成ABTS<sup>+</sup>·储备液。使用0.1mol/L磷酸盐缓冲液(pH7.4)将储备液稀释为工作液,使其在734nm波长处的吸光度为0.70 ± 0.02。

自由基清除能力的测定: 0.1mL一定质量浓度的纯肽溶液与3.9mLABTS<sup>+</sup>·工作液混合,在水浴30℃反应6min后在734nm波长处测定吸光度,所选的样品质量浓度使样品的ABTS<sup>+</sup>·清除率在20%~80%范围内。测定适合浓度BHA的ABTS<sup>+</sup>·清除能力作比较。

标准曲线的绘制: 配制一系列浓度的Trolox溶液(0~15μmol/L),0.1mL不同浓度的Trolox溶液与3.9mLABTS<sup>+</sup>·工作液混合,在水浴30℃反应6min后在734nm波长处测定吸光度,以Trolox溶液浓度为横坐标,清除率为纵坐标,绘制标准曲线。ABTS<sup>+</sup>·清除能力用Trolox等价抗氧化能力表示(mmol Trolox/100g),公式如式(2)。

$$\text{ABTS}^+ \cdot \text{清除能力} = \frac{C_{\text{TEAC}}}{10 \rho_{\text{样品}}} \quad (2)$$

式中:  $C_{\text{TEAC}}$  为样品在标准曲线中等价的Trolox浓度(μmol/L);  $\rho_{\text{样品}}$  为样品质量浓度/(mg/mL)。

#### 1.3.3 螯合亚铁离子能力的测定

参照文献[15]的方法,1mL样品溶液与0.05mL 2mmol/L的FeCl<sub>2</sub>溶液,1.85mL二次去离子水混合,加入0.1mL 5mmol/L的菲洛嗪溶液,并混合均匀,室温下放置10min后,在563nm波长处测定吸光度。用二次去离子水代替样品作为空白对照。螯合亚铁离子能力计算公式如式(3)。

$$\text{螯合率}/\% = \frac{A_{\text{空白对照}} - A_{\text{样品}}}{A_{\text{空白对照}}} \times 100 \quad (3)$$

#### 1.3.4 抑制亚油酸过氧化的测定

参照文献[3]的方法,在容量为7mL的棕色玻璃瓶中加入1.0mL样品溶液(溶解于0.1mol/L pH7.0的磷酸盐缓冲溶液中)、0.5mL二次去离子水、1.0mL 50mmol/L的亚油酸溶液(溶解于99.5%的乙醇中)。用带橡胶塞的塑料瓶塞旋紧密封,置于60℃恒温培养箱中保温,每24h测定吸光度。用二次去离子水代替样品作为空白对照。

吸光度及抑制率的测定: 从棕色玻璃瓶中取0.1mL反应混合液,加入4.7mL 75%的乙醇、0.1mL质量分数30%的硫酸氢铵溶液、0.1mL 20mmol/L的氯化亚铁溶液(溶解于体积分数3.5%的盐酸中),混合均匀后,在室

温下反应3min, 在500nm波长处测定吸光度。定义吸光度达到0.3所需的天数为氧化诱导期。自动氧化抑制率计算公式见式(4)。

$$\text{抑制率}/\% = \frac{A_{\text{空白对照}} - A_{\text{样品}}}{A_{\text{空白对照}}} \times 100 \quad (4)$$

## 2 结果与分析

### 2.1 不同小肽清除自由基能力的比较

DPPH 自由基是一种稳定的醇溶自由基, 呈紫色, 并且在517nm波长处有强吸收, 当体系存在自由基清除剂时, 其孤电子配对, 吸光度下降; 而ABTS<sup>+</sup>·是水溶自由基, 呈蓝绿色, 且在734nm波长处有最大吸收峰, 当其自由基被捕获并生成稳定状态时, 反应体系褪色。Trolox 是水溶性VE, 其自由基清除能力可以作为其他抗氧化物质的对照, 所以用Trolox的浓度来表示样品的清除自由基能力。在不同的自由基体系中比较不同小肽的抗氧化作用差异, 结果如表1所示。

表1 谷胱甘肽和二肽清除自由基能力的比较( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Table 1 Comparison of free radical scavenging capacity of glutathione and other dipeptides ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

名称	DPPH 自由基清除能力 / (mmol Trolox/100g)	ABTS <sup>+</sup> ·清除能力 / (mmol Trolox/100g)
还原型谷胱甘肽	242.61 ± 0.19	471.86 ± 0.07
甘氨酸-L-酪氨酸	2.60 ± 0.26	696.79 ± 0.06
L-肌肽	0.49 ± 0.03	5.12 ± 0.02
N-乙酰-L-肌肽	0.03 ± 0.02	0.43 ± 0.05
L-丙氨酸-谷氨酰胺	0.01 ± 0.01	0.20 ± 0.10
双甘氨酸	0.09 ± 0.03	0.08 ± 0.03
BHA	203.73 ± 0.19	574.76 ± 0.60

由表1可知, 不同小肽对DPPH自由基清除能力的大小顺序为: 还原型谷胱甘肽 > BHA > 甘氨酸-L-酪氨酸 > L-肌肽 > 双甘氨酸 > N-乙酰-L-肌肽 > L-丙氨酸-谷氨酰胺; 不同小肽对ABTS<sup>+</sup>·清除能力的大小顺序为: 甘氨酸-L-酪氨酸 > 还原型谷胱甘肽 > BHA > L-肌肽 > N-乙酰-L-肌肽 > L-丙氨酸-谷氨酰胺 > 双甘氨酸。可以看出含有半胱氨酸的还原型谷胱甘肽对水溶性和醇溶性的两类自由基均具有很强的清除能力; 而含有酪氨酸的甘氨酸-L-酪氨酸的抗氧化能力比较有趣, 其ABTS<sup>+</sup>·清除能力(696.79mmol Trolox/100g)大于BHA的ABTS<sup>+</sup>·清除能力(574.76mmol Trolox/100g), 而DPPH自由基的清除能力却很低。另外, 有趣的是, 肌肽尽管含有组氨酸, 但是对两种自由基的清除能力均很弱。有研究<sup>[5-6, 16]</sup>认为含有芳香族侧链(Tyr、Phe、Trp)、咪唑基侧链(His)以及半胱氨酸侧链的肽类, 具有较强的抗氧化能力。

### 2.2 不同小肽螯合金属离子能力的比较

在食品体系中, 引起脂类氧化的一个重要原因就是金属离子(Cu<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>)的存在, 亚铁离子也是水包油乳状液中最重要促氧化剂之一<sup>[17]</sup>。金属离子可明显缩短链反应引发期的时间, 从而加快脂类化合物氧化的速度。当金属离子螯合剂与活泼金属离子结合成较稳定的络合物时, 体系氧化速率可以得到控制。

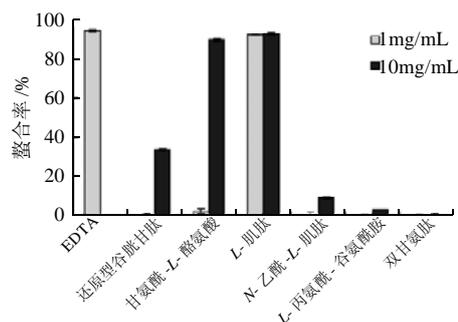


图1 谷胱甘肽和二肽螯合亚铁离子的能力

Fig.1 Ferrous ion chelating activity of glutathione and dipeptides

由图1可知, L-肌肽具有较强的螯合亚铁离子的能力(1mg/mL时螯合率为92.51%), 仅次于常用金属螯合剂EDTA(1mg/mL时螯合率为94.64%), 可能是由于组氨酸侧链中的咪唑环与亚铁离子结合, 形成相对稳定的络合物<sup>[18]</sup>。除此之外, 有报道<sup>[8]</sup>称含有组氨酸的肽还具有淬灭活泼氧和清除·OH的能力。L-肌肽的N端结合乙酰基后转化为N-乙酰-L-肌肽, 其螯合亚铁离子能力明显下降(10mg/mL时螯合率为9.06%), 可能是因为N原子有孤对电子, 可与亚铁离子配位, 而N端结合乙酰基后丧失了配位能力所致。还原型谷胱甘肽和甘氨酸-L-酪氨酸在10mg/mL时具有一定的螯合亚铁离子的能力, 而在1mg/mL时的这种能力几乎为零。L-丙氨酸-谷氨酰胺和双甘氨酸几乎不能螯合亚铁离子。

### 2.3 不同小肽抑制亚油酸氧化的比较

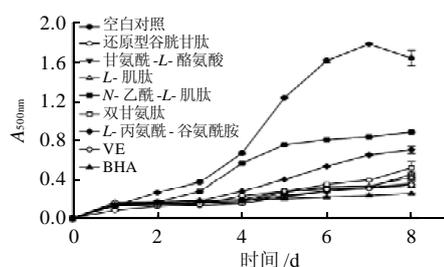


图2 添加还原型谷胱甘肽和其他二肽的亚油酸的氧化曲线

Fig.2 Linoleic acid peroxidation curves in the presence of glutathione and other dipeptides

由于不饱和脂肪酸亚甲基上的H异常活泼,亚油酸在高温下通过自由基链式反应迅速发生氧化,而抗氧化剂可以中断自由基链式反应抑制氧化。图2为亚油酸体系中分别添加1mg/mL还原型谷胱甘肽和二肽的氧化曲线,可以看出,对于空白对照的亚油酸模拟体系,各种肽对亚油酸氧化都有一定的抑制能力。而由图3可知,甘氨酸-L-酪氨酸的抗氧化活性最强,几乎与VE相当,L-肌肽和还原型谷胱甘肽的抗氧化活性其次,双甘氨酸的抗氧化活性再次,而L-丙氨酸-谷氨酰胺和N-乙酰-L-肌肽抗氧化活性最弱。

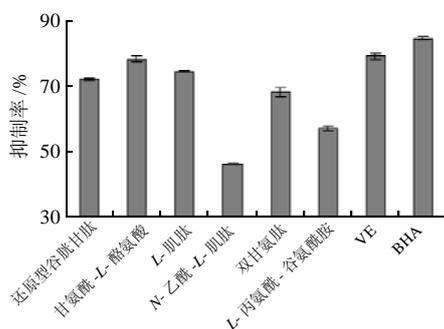


图3 添加还原型谷胱甘肽和其他二肽的亚油酸体系8d后的过氧化抑制率

Fig.3 Inhibitory rates against linoleic acid peroxidation after 8 days of incubation in the presence of glutathione and other dipeptides

上述肽抑制亚油酸氧化的能力顺序与前面测定的自由基清除能力和金属离子螯合能力的顺序都不同。但是,具有很强的ABTS<sup>+</sup>·清除能力的甘氨酸-L-酪氨酸具有最强的抑制亚油酸氧化的效应,而分别具有强DPPH自由基清除能力和强金属离子螯合能力的还原型谷胱甘肽和L-肌肽的抑制亚油酸氧化能力相当,说明在实际体系中,肽的抗氧化机制比较复杂。甘氨酸-L-酪氨酸的DPPH自由基和ABTS<sup>+</sup>·清除能力,螯合金属离子能力以及在亚油酸过氧化体系中的抗氧化能力均较好。甘氨酸-L-酪氨酸在水溶性ABTS<sup>+</sup>·体系和醇溶性DPPH自由基体系的自由基清除能力最强,其次是还原型谷胱甘肽。甘氨酸-L-酪氨酸和L-肌肽的亚铁离子螯合能力最强。在亚油酸过氧化体系中甘氨酸-L-酪氨酸的抗氧化能力最强,其次是L-肌肽和还原型谷胱甘肽。除还原型谷胱甘肽以外,其余都是二肽,其中甘氨酸-L-酪氨酸与双甘氨酸结构类似,均含有甘氨酸,仅N端的氨基酸不一样;L-肌肽与L-丙氨酸-谷氨酰胺均含有丙氨酸,仅N端的氨基酸不同;N-乙酰-L-肌肽则是L-肌肽N端乙酰化的产物。将甘氨酸-L-酪氨酸与双甘氨酸进行比较,可以看出当C端为甘氨酸时,N端的氨基酸类型对清除DPPH自由基和ABTS<sup>+</sup>·能力、亚铁离

子螯合能力和亚油酸过氧化体系的抗氧化能力均有很大的影响,芳香族氨基酸如酪氨酸可以极大地提高其在这4种体系中的抗氧化能力。将L-肌肽与L-丙氨酸-谷氨酰胺进行比较,可以看出当C端为丙氨酸时,位于N端含有咪唑基的组氨酸可以大幅提高其亚铁离子螯合能力和在亚油酸过氧化体系中的抗氧化能力。L-肌肽与N-乙酰-L-肌肽的比较则说明,N端的乙酰化使得亚铁离子螯合能力和在亚油酸过氧化体系中的抗氧化能力显著降低。

上述结果也提示,在表征肽的抗氧化能力时,单纯采用DPPH自由基清除能力或者ABTS<sup>+</sup>·清除能力或者金属离子螯合能力都是不恰当的,多指标联合表征可能更合理。

### 3 结论

3.1 含有酪氨酸的甘氨酸-L-酪氨酸对ABTS<sup>+</sup>·的清除能力较强,含有半胱氨酸的还原型谷胱甘肽对DPPH自由基的清除能力较强,而L-肌肽有很强的亚铁离子的螯合能力,说明不能仅从特殊氨基酸侧链来推测肽的抗氧化活性高低,不同的氨基酸侧链作用机理不同,影响抗氧化活性的大小也不同。

3.2 除氨基酸侧链对抗氧化活性的影响外,通过比较N-乙酰-L-肌肽和L-肌肽的抗氧化活性,可以看出N端基团或者N端衍生物都会对肽的抗氧化活性产生影响,在本研究中其影响是消极的。

3.3 在亚油酸氧化体系中,抗氧化结果并不与以上任何一个指标有完全对照关系,表明不能从体外某单个抗氧化指标衡量肽的抗氧化活性,多个指标联合表征更加科学。

### 参考文献:

- [1] ZHU Lijuan, CHEN Jie, TANG Xueyan, et al. Reducing, radical scavenging, and chelation properties of *in vitro* digests of alcalase-treated zein hydrolysate[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(8): 2714-2721.
- [2] 朱丽娟, 熊幼翎, 唐学燕, 等. 玉米醇溶蛋白抗氧化肽耐消化性研究[J]. 食品工业科技, 2008, 29(12): 61-64.
- [3] CHEN Huaming, MURAMOTO K, YAMAUCHI F. Structural analysis of antioxidative peptides from soybean  $\beta$ -conglycinin[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995, 43(3): 574-578.
- [4] GUO Hang, KOUZUMA Y, YONEKURA M. Structures and properties of antioxidative peptides derived from royal jelly protein[J]. Food Chemistry, 2009, 113(1): 238-245.
- [5] CHENG Yu, CHEN Jie, XIONG Youling L. Chromatographic separation and tandem MS identification of active peptides in potato protein hydrolysate that inhibit autoxidation of soybean oil-in-water emulsions[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(15): 8825-8832.
- [6] DIAZ M, DECKER E A. Antioxidant mechanisms of caseinophosphopeptides and casein hydrolysates and their application in

- ground beef[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(26): 8208-8213.
- [7] 石丽梅, 唐学燕, 何志勇, 等. 玉米抗氧化肽对于中式香肠的氧化稳定性的影响[J]. 食品科技, 2008(10): 135-139.
- [8] CHEN Huaming, MURAMOTO K, YAMAUCHI F, et al. Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46(1): 49-53.
- [9] MURASE H, NAGAO A, TERAU J. Antioxidant and emulsifying activity of *N*-(long-chain-acyl)histidine and *N*-(long-chain-acyl)carnosine [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1993, 41(10): 1601-1604.
- [10] KAWASHIMA K, ITOH H, MIYOSHI M, et al. Antioxidant properties of branched-chain amino acid derivatives[C]//5th International Congress of Food Science and Technology. Kyoto, 1979: 1912-1916.
- [11] DECKER E A, CRUM A D, CALVERT J T. Differences in the antioxidant mechanism of carnosine in the presence of copper and iron[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1992, 40(5): 756-759.
- [12] WU Huichun, CHEN Huaming, SHIAU C Y. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*) [J]. Food Research International, 2003, 36(9/10): 949-957.
- [13] SHARMA O P, BHAT T K. DPPH antioxidant assay revisited[J]. Food Chemistry, 2009, 113(4): 1202-1205.
- [14] CAI Yizhong, LUO Qiong, SUN Mei, et al. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer[J]. Life Sciences, 2004, 74(17): 2157-2184.
- [15] DECKER E A, WELCH B. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1990, 38(3): 674-677.
- [16] FARAJI H, McCLEMENTS D J, DECKER E A. Role of continuous phase protein on the oxidative stability of fish oil-in-water emulsions[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(14): 4558-4564.
- [17] WARAHO T, MCCLEMENTS D J, DECKER E A. Mechanisms of lipid oxidation in food dispersions[J]. Trends in Food Science & Technology, 2011, 22(1): 3-13.
- [18] DECKER E A, CRUM A D, CALVERT J T. Differences in the antioxidant mechanism of carnosine in the presence of copper and iron[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1992, 40(5): 756-759.