

果糖-赖氨酸模型体系美拉德产物不同级分对抑制香蕉酶促褐变相关性质的影响

周娅¹, 张海德¹, 李奕星², 李芬芳², 袁德保², 郑晓燕², 谭琳², 陈娇², 马蔚红², 金志强²

(1. 海南大学食品学院, 海南海口 570100)

(2. 中国热带农业科学院海口实验站海南省香蕉遗传改良重点实验室, 海南海口 570102)

摘要: 非硫无毒的抗褐变抑制剂的筛选是目前的研究热点。前期研究显示果糖-赖氨酸模型体系美拉德反应产物对香蕉酶促褐变具有明显的抑制效果。本文研究了分级对该体系产物抑制香蕉酶促褐变相关性质的影响。首先通过超滤、透析等方法将美拉德产物分级为 $M_w < 3500$ u、 $M_w > 5000$ u 及 $3500 \text{ u} < M_w < 5000$ u 的三个级分。然后对其 DPPH·清除能力、还原力、螯合铜离子能力、抑制多酚氧化酶酶活等能力进行了考察。显示: $M_w > 5000$ u 级分的螯合铜离子能力最好, $M_w < 3500$ u 级分次之。 $M_w < 3500$ u 级分的 DPPH·清除能力和抑制香蕉多酚氧化酶能力更佳, 分别达 46.13%、0.089 mg/mL (IC_{50})。三种级分对游离酶和酶-底物络合物的抑制常数分别为: $K_i = 0.297$ mmol/L, $K_{iS} = 1.744$ mmol/L ($M_w > 5000$ u); $K_i = 0.212$ mmol/L, $K_{iS} = 1.656$ mmol/L ($3500 \sim 5000$ u); $K_i = 0.205$ mmol/L, $K_{iS} = 1.536$ mmol/L ($M_w < 3500$ u)。说明 $M_w < 3500$ u 级分与游离酶及酶-底物络合物结合更紧密。综上, $M_w < 3500$ u 的 MRP 具有最优的抑制香蕉酶促褐变的能力。

关键词: 香蕉; 酶促褐变; 抑制; 美拉德产物; 分级

文章编号: 1673-9078(2013)11-2653-2657

Effect of Fractionation of Maillard Reaction Products in Glucose-lysine Model System on Inhibitory Properties of Banana Enzymatic Browning

ZHOU Ya¹, ZHANG Hai-de¹, LI Yi-Xing², LI Fen-fang², YUAN De-bao², ZHENG Xiao-yan², TAN Lin², CHEN Jiao², MA Wei-hong², JIN Zhi-qiang²

(1. Hainan University, College of Food, Haikou 570100, China) (2. Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou Experimental Station, Hainan Key Laboratory of Banana Genetic Improvement, Haikou 570102, China)

Abstract: Screening of non-toxic and non-sulfur anti-browning inhibitors is a hot topic. Maillard reaction products (MRPs) in fructose-lysine model system exhibited strong inhibitory effect on banana enzymatic browning in our previous study. The study mainly discussed the effect of fractionation of the products on the inhibition property. Ultrafiltration and dialysis were applied to divide the MRPs into three grades: $M_w > 5000$ u fraction, $M_w < 3500$ u fraction and $3500 \text{ u} < M_w < 5000$ u fraction. The antioxidant activities (including DPPH· scavenging ability and reducing power), chelating copper activity and the inhibitory effect on banana polyphenol oxidase were evaluated. The fraction with $M_w > 5000$ u showed the best chelating copper ion ability, followed by that with $M_w < 3500$ u. The fraction with $M_w < 3500$ u exhibited the best DPPH· scavenging ability (46.13%) and polyphenol oxidase inhibitory ability (IC_{50} 0.089 mg/mL). Free enzyme inhibition constant (K_i) and enzyme-substrate complex inhibition constant (K_{iS}) of the above-mentioned three parts were $K_i = 0.297$ mmol/L and $K_{iS} = 1.744$ mmol/L ($M_w > 5000$ u), $K_i = 0.212$ mmol/L and $K_{iS} = 1.656$ mmol/L ($5000 \text{ u} > M_w > 3500$ u), $K_i = 0.205$ mmol/L and $K_{iS} = 1.536$ mmol/L ($M_w < 3500$ u). The fraction with $M_w < 3500$ u could combine free enzyme and enzyme-substrate more tightly. In conclusion, the fraction with $M_w < 3500$ u was shown to be the best for inhibiting banana enzymatic browning.

Key words: banana; enzymatic browning; inhibition; maillard reaction products; fractionation

作者简介: 2013-06-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(31101328); 海南省自然科学基金项目(311063)

通讯作者: 袁德保(1982-), 男, 博士, 助理研究员, 研究方向为农产品贮藏与加工

多年来, 食品工业广泛采用亚硫酸盐等硫制剂来抑制褐变, 其具有高效且低廉的特点。但因其潜在的安全性问题, FDA 已经禁止其在鲜切果蔬中使用。因此, 安全高效的褐变抑制剂成为研究热点^[1-2]。

美拉德反应又称羰氨反应, 指氨基化合物(氨基

酸、肽、蛋白质)和羰基化合物(糖类)之间发生的一系列复杂反应。此反应最初是由法国化学家美拉德于1912年在将甘氨酸与葡萄糖混合共热时发现的,故称美拉德反应。近几年国内外一些研究证实,美拉德产物能抑制果蔬(如苹果、香蕉、马铃薯及蘑菇等)的酶促褐变^[3-4],且美拉德反应产物(MRPs)中的蛋白黑素、还原酮以及一些含N、S的杂环化合物具有的抗氧化活性在抑制果蔬酶促褐变的过程中起着重要的作用^[5]。多酚氧化酶是香蕉发生酶促褐变的关键酶,其活性的高低直接影响着香蕉果实的酶促褐变。另外,多酚氧化酶是一种金属酶,多酚氧化酶中Cu²⁺的存在与否直接影响着其活性。

因美拉德反应产物是一系列物质,目前大多数研究都集中在抑制果蔬酶促褐变的美拉德反应底物及条件的筛选,对美拉德产物进行分级并考察不同分级组分抑制果蔬酶促褐变的研究尚很少。果糖-赖氨酸体系的美拉德产物已被证实具有抑制香蕉酶促褐变的作用^[6]。因此,本文采用果糖和赖氨酸作为反应底物,经高温反应并透析、冷冻干燥制得不同分子量大小的美拉德反应产物,全面考察其与抑制香蕉酶促褐变相关的性质,包括抗氧化活性、螯合铜离子能力及抑制香蕉多酚氧化酶能力等。本研究将为美拉德产物开发为香蕉酶促褐变抑制剂提供理论依据和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

香蕉:市售巴西蕉(购买于海口国兴大润发超市),表皮呈鲜黄色,九成熟,无机械损伤;多酚氧化, Worthington公司; 1,1-二苯基苦基苯肼(1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl, DPPH), Sigma公司; 紫脲酸铵(Tetramethylmurexide, TMM), 赖氨酸, 果糖, 六亚甲基四胺, 邻苯二酚, 三氯乙酸, 铁氰化钾, 硫酸铜, Vc, EDTA等, 均为国产分析纯。

1.2 主要仪器设备

4836 controller PARR 5500压力反应釜, 美国Parr公司; Alpha-4冷冻干燥机, 德国Matrin Christ公司; CR-22G 冷冻高速离心机, 日本Hitachi公司; 超滤膜, 美国Vivascience公司; 透析袋, 北京博奥拓达科技有限公司; UV-1800紫外分光光度计, 日本岛津公司; 恒温摇床, 上海智诚分析仪器制造有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 美拉德反应产物的制备

配制浓度均为1 mol/L的果糖与赖氨酸溶液, 两种溶液等体积混合, 用4 mol/L的NaOH溶液调节混合液pH值为2。然后将混合液置于压力反应釜中, 在温度为110 °C条件下反应1 h。反应结束后, 待反应产物冷却后, 将其进行超滤, 透析后, 得到三种分子量分别为>5000 u, 3500 u~5000 u, <3500 u的MRPs, 冷冻干燥以备待用。

1.3.2 DPPH·清除率的测定

参照Maillard的方法^[7], 取质量分数为0.01%的MRPs样液0.2 mL, 加入 1×10^{-4} mol/L的DPPH·无水乙醇溶液4 mL, 混匀, 于常温下反应30 min, 测定反应液在517 nm处的吸光值A_i, 空白组(A₀)以等体积蒸馏水代替样品溶液, 对照组(A_j)以等体积无水乙醇代替DPPH·溶液, 以无水乙醇调零。每个样液做3次平行试验。清除率的计算方法如下:

$$\text{清除率} = [A_0 - (A_i - A_j)] / A_0 \times 100\%$$

1.3.3 还原力的测定

参照Kanokwan的方法^[8], 取1 mL质量分数为0.01%的MRPs样液加入0.2 mol/L pH为6.6的磷酸钠缓冲溶液和质量分数为1%的铁氰化钾溶液1 mL, 混合液于50 °C条件下水浴20 min后急速冷却, 再加入10%的三氯乙酸溶液1 mL, 然后于4000 r/min离心5 min, 取其上清液1 mL, 加入蒸馏水2 mL, 0.1%的三氯化铁溶液0.2 mL, 放置10 min后于700 nm测吸光度A₇₀₀, 以质量分数为0.01%的Vc溶液代替MRPs样液作为对照组。吸光度越大还原力越强。

1.3.4 Cu离子螯合能力的测定

参照孙丽平的测定方法^[9], 取质量分数为0.01%的MRPs 0.1 mL于5 mL离心管, 加入1.5 mL六亚甲基四胺-氯化钾缓冲液(Hex缓冲液, 10 mmol/L, pH 5)和0.5 mL溶于Hex缓冲液的硫酸铜溶液(0.1 mmol/L), 混匀, 室温下放置60 min。无铜空白和无样品对照同样处理。三个平行。60 min后加入0.1 mL 1 mmol/L TMM指示剂, 混匀, 静置10 min。Hex缓冲液调零, 测定480 nm和530 nm吸光度, 分别是TMM-铜复合物和游离TMM最大光吸收波长。

标准工作曲线: 配制0~0.1 mmol/L溶于Hex缓冲液的硫酸铜溶液, 取0.5 mL各浓度铜溶液于5 mL离心管, 加入2 mL缓冲液和0.1 mL紫尿酸胺指示剂, 混匀, 静置10 min。Hex缓冲液调零, 测定480 nm和530 nm吸光度。以硫酸铜浓度(mmol/L)为横坐标, 比值A₄₈₀/A₅₃₀为纵坐标建立标准工作曲线。根据标准工作曲线计算MRPs对铜离子的螯合能力, 结果表示为每毫升MRPs所能螯合铜离子的质量(μg), 即μg Cu²⁺/mg MRPs。

1.3.5 抑制PPO酶活力的测定

PPO活力测定参照Galeazzi^[10], 并作适当修改, 分别取浓度为0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06 mg/mL的MRPs样液1 mL, 加入pH 6.6的磷酸缓冲液1.8 mL和0.2 mol/L的邻苯二酚溶液1 mL, 摇匀, 混合液于30 °C水浴5 min, 加入酶液0.2 mL, 摇匀。酶的终浓度为31.25 U/mL。酶液刚加入即开始计时, 每隔5 s测定一次吸光度, 每个样液做三次平行, 由其随时间的增长直线的斜率计算出酶的活力。以每分钟0.001ΔA为一个活力单位(U)。空白组以蒸馏水代替MRPs样液。加入样品后的酶活为V₁, 不加MRPs样液为空白, 酶活为V₀。酶活残存率的计算方法如下:

$$\text{酶活残存率} = V_1/V_0 \times 100\%$$

1.3.6 对PPO的抑制作用类型及抑制常数的测定

于3 mL的测活体系中^[11], 固定酶的浓度, 改变底物邻苯二酚的浓度, 测定不同浓度MRPs对酶活力的影响, 以Lineweaver-Burk双倒数作图, 以底物浓度的倒数1/[S]为X轴, 反应速度的倒数1/V为Y轴, 来判断MRPs对PPO的抑制类型。抑制常数的测定是通过直线的斜率和纵轴截距对效应物含量二次作图, 求出效应物对游离酶抑制常数(K_i)和对酶-底物络合物抑制常数(K_{is})。

1.4 数据分析

每个实验平行3次。采用Origin 8软件进行数据处理和分析。

2 结果与讨论

2.1 MRP_s对DPPH·的清除

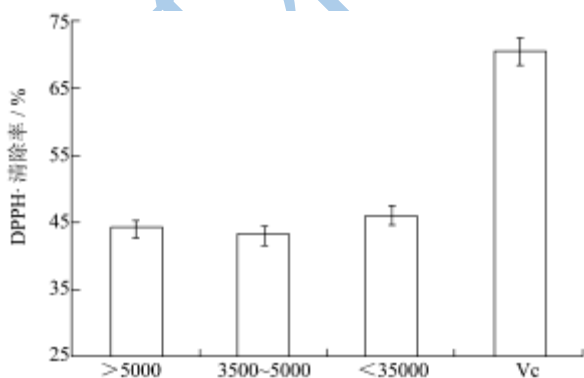


图1 不同分子量的MRPs 清除DPPH·自由基能力

Fig.1 Scavenging effects against DPPH· of different molecular weight MRPs

图1说明MRPs具有DPPH·自由基清除能力, 三种不同分子量大小的MRPs其清除DPPH·能力几近相

同。M_w < 3500 u的MRPs对DPPH·清除率相对较高, 约为46.13%, 但远小于质量分数0.01%的Vc对DPPH·的清除率(约为70.62%)。徐献兵^[12]研究了超滤对葡萄糖-醋酸铵模式美拉德反应产物的影响, 发现随着截留分子量增加, 截留产物DPPH·清除率呈上升趋势。可见, 不同反应模式及反应条件的得到的美拉德产物, 截留的MRPs的DPPH·清除率并不一致。

2.2 MRP_s还原能力

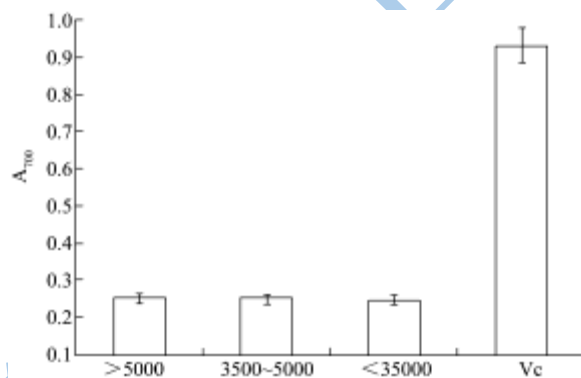


图2 不同分子量的MRPs的还原力

Fig.2 Reducing powers of different molecular weight MRPs

如图2, 三种不同分子量的MRPs还原能力几近相同, 且皆远小于质量分数0.01%的Vc, M_w > 5000 u的MRPs吸光度最高为0.252。结合图1和图2看, 三种不同分子量的MRPs都具有一定的DPPH·自由基清除能力和还原力, 但是两者随着分子量变化不一致。原因在于, MRPs的自由基清除能力来源于一些杂环化合物, 如蛋白黑素、咪喃等, 而还原力的大小则取决于MRPs中还原酮类物质的含量。

2.3 MRP_s螯合铜离子能力

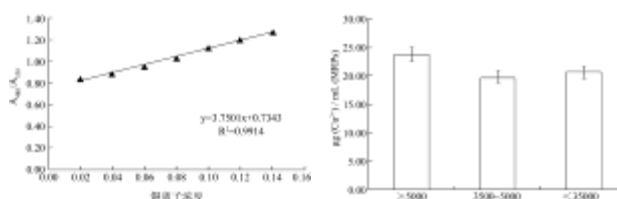


图3 不同分子量的MRPs对螯合铜离子的影响

Fig.3 Effect of different molecular weight MRPs on copper-chelating ability

MRPs能够有效的螯合铜、铁等金属离子, 从而阻断金属催化的自由基链式反应, 或使一些以铜离子为活性位点的氧化酶失去催化氧化能力, 延缓脂质氧化或抑制一些酶促褐变, 表现较好的抗氧化活性^[13]。因此, 铜离子螯合能力是考察MRPs对多酚氧化酶促褐变抑制能力的重要指标。如图3所示, MRPs螯合铜离子能力的顺序为: M_w > 5000 u的MRPs最高,

$M_w < 3500$ u 的 MRP 其次, $3500 < M_w < 5000$ u 的 MRP 最小。三者分别为 $23.75 \mu\text{g Cu}^{2+}/\text{mL MRP}$ (螯合率为 37.11%)、 $20.66 \mu\text{g Cu}^{2+}/\text{mL MRP}$ (螯合率为 32.28%)、 $19.82 \mu\text{g Cu}^{2+}/\text{mL MRP}$ (螯合率为 30.96%)。EDTA 作为食品添加剂, 在食品体系中的最高添加量约为 0.025% (质量分数)^[4], 而该质量分数的 EDTA 螯合铜离子的螯合率为 40%, 经换算约为 $25.837 \mu\text{g Cu}^{2+}/\text{mL EDTA}$ ^[15]。

2.4 MRP 抑制 PPO 活力

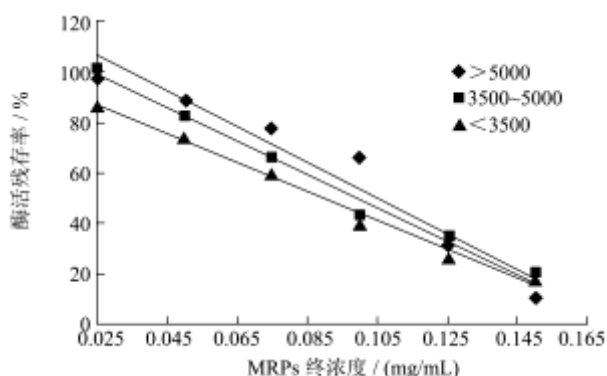


图4 不同分子量的MRPs对抑制香蕉PPO酶活的影响

Fig.4 Effect of different molecular weight MRPs on the inhibition of banana PPO

多酚氧化酶(PPO)是引起香蕉褐变的一个重要因素, 因此 MRP 对 PPO 活性的抑制是衡量其抑制香蕉褐变能力的一个重要因素。如图 4 所示, 随着不同分子量 MRP 的浓度增大, 酶活残存率呈下降趋势, 说明 PPO 活性受到不同抑制。按照分子量由大到小, 导致酶活力下降一半所需的抑制剂浓度(IC₅₀)分别为 0.105、0.099、0.089 mg/mL, 说明 $M_w < 3500$ u 的 MRP 抑制 PPO 能力最强。

2.5 MRP 对 PPO 的抑制动力学分析

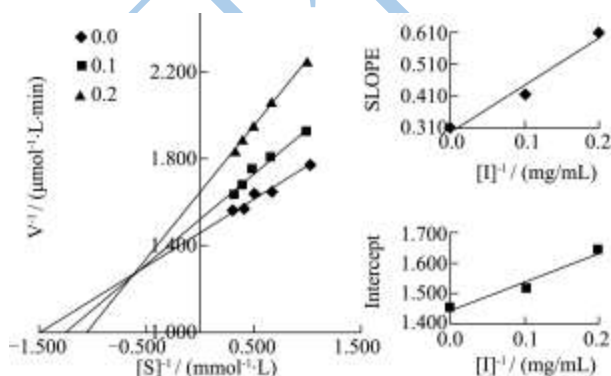


图5 $M_w < 3500$ u的MRPs对PPO的抑制类型和抑制常数的测定

Fig.5 The inhibitory type and inhibition constant of MRPs of $M_w < 3500$ u on banana PPO

依据抑制剂与酶的作用方式的不同, 酶的可逆抑制有竞争型、非竞争型、反竞争型和混合型几种类型。抑制作用类型可通过 Lineweaver-Burk 双倒数方程作图, 比较酶催化反应的动力学参数。图 5 显示, Lineweaver-Burk 双倒数作图为相交于第二象限中一点的一组直线, 横轴截距和纵轴截距都因 MRP 浓度的变化而改变。即米氏常数(K_m)和最大反应速度(V_m)都随着 MRP 浓度增大而改变, K_m 增大而 V_m 减小, 其抑制机理表现为混合型 I。Lee^[16]对葡萄糖-甘氨酸模型体系美拉德产物抑制土豆多酚氧化酶的作用机理进行了研究, 结果表明, 该产物对土豆多酚氧化酶的抑制机理属于非竞争性抑制。分别求出 MRP 对游离酶抑制常数(K_i)和对酶-底物络合物抑制常数 (K_{iS}): $M_w > 5000$ u: $K_i=0.297 \text{ mmol/L}$, $K_{iS}=1.744 \text{ mmol/L}$ (图略); $3500 \text{ u} \sim 5000 \text{ u}$: $K_i=0.212 \text{ mmol/L}$, $K_{iS}=1.656 \text{ mmol/L}$ (图略); $M_w < 3500$ u 的 MRP: $K_i=0.205 \text{ mmol/L}$, $K_{iS}=1.536 \text{ mmol/L}$ 。混合 I 型抑制剂的抑制常数 K_i 值小于 K_{iS} 值, 说明 MRP 与游离酶 (E) 的结合比与酶底物络合物 (ES) 的结合更牢固。MRP 中可能含有的醛基等能与重要的亲核基团如巯基、氨基或羟基反应, 与酶重要的氨基基团形成席夫碱结构, 从而使 MRP 与酶结合, 达到抑制活性的作用。席夫碱结构越牢固, MRP 对酶的抑制作用越强^[17]。 $M_w < 3500$ u 的 MRP 的 K_{iS} 值和 K_i 值均小于另外两种 MRP 抑制常数。说明 $M_w < 3500$ u 的 MRP 与多酚氧化酶的结合力比另外两种 MRP 更牢固, 并且 $M_w < 3500$ u 的 MRP 作用于游离酶的能力比另外两种 MRP 更强。综上, 分级组分的抑制常数与其抑制 PPO 活性的结果相一致。

3 结论

Billaud^[18]指出美拉德早期阶段的 Amadori 重排产物是一类具有螯合、还原和清除氧气特性的物质, 该类物质在美拉德产物抑制酶促褐变中可能发挥着一定的作用。本文表明, 果糖-赖氨酸模式美拉德反应产物经超滤透析后得到的分级组分, 抑制香蕉酶促褐变能力相关的性质, 如自由基清除能力、还原力、螯合铜离子能力和抑制多酚氧化酶活性等呈现一定差别。但是, 抑制酶活的能力与各组分清除 DPPH、还原力及螯合铜离子等方面的能力不存在绝对的依赖性。 $M_w < 3500$ u 的 MRP 呈现较优的抑制香蕉 PPO 酶活的能力。因此, 我们推断对香蕉酶促褐变起抑制作用的是美拉德产物中低分子量物质。上述研究结果将为香蕉加工中的酶促褐变的控制起到指导作用。此外, MRP

抑制 PPO 酶活的机制还有待研究。

参考文献

- [1] Mogol B A, Yildırım A, Gökmen V. Inhibition of enzymatic browning in actual food systems by the Maillard reaction products [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2010, 90: 2556-2562
- [2] Wu J J, Cheng K W, Li E T S, et al. Antibrowning activity of MRPs in enzyme and fresh-cut apple slice models [J]. *Food Chemistry*, 2008, 109(2): 379-385
- [3] Billaud C, Maraschin C, Chow Y N, et al. Maillard reaction products as "natural antibrowning" agents in fruit and vegetable technology [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2005, 49: 656-662
- [4] Lee M K. Inhibitory effect of banana polyphenol oxidase during ripening of banana by onion extract and Maillard reaction products [J]. *Food Chemistry*, 2007, 102: 146-149
- [5] Cheriot S, Billaud C, Pöhtrage S, et al. Comparison study between antioxidant and mutagenic properties of cysteine glucose-derived Maillard reaction products and neoformed products from heated cysteine and hydroxymethylfurfural [J]. *Food Chemistry*, 2009, 114: 132-138
- [6] 郑杰琼,李芬芳,袁德保,等.初始pH值对果糖-赖氨酸模型美拉德产物抑制香蕉酶促褐变相关性质的影响[J]. *食品科学*, 2012, 33(21): 24-27
Zheng Jie-qiong, Li Fen-fang, Yuan De-bao, et al. Effect of initial pH in a fructose-lysine model system on the properties of Maillard reaction products related to the inhibitory effect on banana enzymatic browning [J]. *Food Science*, 2012, 33(21): 24-27
- [7] Maillard M N, Billaud C, Chow Y N, et al. Free radical scavenging, inhibition of polyphenoloxidase activity and copper chelating properties of model Maillard systems [J]. *LWT-food science and technology*, 2007, 40: 1434-1444
- [8] Kanokwan M, Soottawat B, Munehiko T. Effect of reactant concentrations on the Maillard reaction in a fructose-glycine model system and the inhibition of black tiger shrimp polyphenoloxidase [J]. *Food Chemistry*, 2006, 98: 1-8
- [9] 孙丽平.美拉德反应体系的光谱特性、抗氧化活性及评价方法[D].青岛:中国海洋大学,2009
Sun Li-ping. The spectroscopic characteristics, antioxidant properties and estimated methods of Mallard reaction systems [D]. Qingdao: Chinese Marine University, 2009
- [10] Galeazzi M A M, Sgarbieri V, Costantinides S M. Isolation, purification and physicochemical characterization of polyphenoloxidase from dwarf variety of banana (*Musa carentishii*) [J]. *Journal of Food Science*, 1981, 46: 150-155
- [11] 乔薇,巫晓琴,黎峰,等.苯甲醛及其类似物对酪氨酸酶抑制作用的研究[J]. *中山大学学报(自然科学版)*, 2007, 46(5): 41-44
Qiao Wei, WU Xiao-qin, Li Feng, et al. Tyrosinase inhibition by benaldehyde and its analogs [J]. *Journal of Zhongshan University (Natural Science Edition)*, 2007, 46(5): 41-44
- [12] 徐献兵,于淑娟.超滤分离美拉德反应产物的特性研究[J]. *现代食品科技*, 2010, 26(12): 1338-1340
Xu Xian-bing, Yu Shu-jian. Characterization of the Maillard reaction products separated by ultrafiltration [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2010, 26(12): 1338-1340
- [13] Duh P D. Antioxidant activity of budrock arctium lappa Linn: its scavenging effect on free radical and active oxenry [J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1998, 75: 455-461
- [14] GB 2760-2007, 食品添加剂使用卫生标准[S]
GB 2760-2007, Hygienic Standards for Uses of Food Additives [S]
- [15] Sophie Brun-Me'rimée. Effect of glutathione and Maillard reaction products prepared from glucose or fructose with glutathione on polyphenol oxidase from apple-II. Kinetic study and mechanism of inhibition [J]. *Food Chemistry*, 2004, 84: 235-241
- [16] Lee M K, Park I. Inhibition of potato polyphenol oxidase by Maillard reaction products [J]. *Food Chemistry*, 2005, 91: 57-61
- [17] 龚盛昭,杨卓如,程江.香草醛对酪氨酸酶活性的抑制[J]. *华南理工大学学报(自然科学版)*, 2006, 34(5): 53-57
Gong Sheng-zhao, Yang Zhuo-ru, Cheng Jiang. Inhibition of tyrosinase activity by vanillin [J]. *Journal of South China University of Technology (Natural Science Edition)*, 2006, 34(5): 53-57
- [18] Billaud C, Roux E, Brun-Mérimée S, et al. Inhibitory effect of unheated and heated D-glucose, D-fructose and L-cysteine solutions and Maillard reaction product model systems on polyphenoloxidase from apple. I. Enzymatic browning and enzyme activity inhibition using spectrophotometric and polarographic methods [J]. *Food Chemistry*, 2003, 81: 35-50