

PEROXIDASA DE PLANTAS TROPICALES

Iván Yu. Sakharov^{1,2*} Gerardo Bautista Ardila¹ Irina V. Sakharova²
Alicia Rojas³ y Olga Yu. Pletjuschkina⁴

Recibido: Agosto 11/98 – Aprobado: Marzo 8/99

Keywords: peroxidase, tropical plants, screening, fruit(s), leaves, root(s).

RESUMEN

Se determinó la actividad de la peroxidasa (EC 1.11.1.7) en 7 frutos, 13 raíces y 31 hojas de plantas tropicales que crecen en Colombia. Se encontró que la actividad de la peroxidasa varía ampliamente de una especie a otra. Para el fruto de balazos (*Monstera deliciosa*) se encontró que la actividad de la peroxidasa depende del grado de madurez. Por el contrario, la actividad de peroxidasa de las hojas de la palma de botella (*Roystonea regia*) se mantiene constante todo el año. Algunas especies presentaron alta actividad de peroxidasa como la raíz de batata (*Ipomoea batatas*), las hojas de pasto guinea (*Panicum maximum*), las de dormidera (*Mimosa pigra*), las de higuera (*Ricinus communis* L.) y las de las siguientes palmas: mararaí (*Aiphanes cariotifolia*), de botella (*Roystonea regia*), dactilera (*Phoenix dactylifera*) y africana (*Elaeis guineensis*). Además, mediante isoelectroenfoque se hallaron peroxidases aniónicas (pI 3.4 – 5.6) tanto en la raíz de batata como en las palmas analizadas.

ABSTRACT

The activity of peroxidase (EC 1.11.1.7) in 7 fruits, 13 roots and 31 leaves of tropical plants grown in Colombia have been determined. It was shown that the values of the peroxidase activity are varied widely specie to specie. It was found that the activity in *Monstera deliciosa* fruits depends upon the degree of their ripening. By contrast, the activity in leaves of real palm (*Roystonea regia*) have not been changed during a whole year. The high content of the peroxidase has been detected in sweet potato (*Ipomoea batatas*) roots and leaves of guinea grass (*Panicum maximum*), mimosa (*Mimosa pigra*), castor bean (*Ricinus communis* L.) and some species of palms, namely, rufflé (*Aiphanes cariotifolia*), real (*Roystonea regia*), date (*Phoenix dactylifera*) and african oil (*Elaeis guineensis*) palms. Using isoelectrofocusing the anionic peroxidase (pI 3.4-5.6) have been revealed in the extracts of the sweet potato and palms studied.

1. Laboratorio de enzimología, Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander. A.A. 678, Bucaramanga, Santander, Colombia. 3. Jardín Botánico, Floridablanca, Santander. 2. Departamento de Química y 4. Instituto Belozersky de Físicoquímica y Biología de la Universidad Estatal de Moscú, Moscú, Rusia.

* A quien se debe dirigir la correspondencia.

INTRODUCCIÓN

La peroxidasa (EC 1.11.1.7; Donador; Peróxido de hidrógeno oxirreductasa, POD) es una de las enzimas que controlan el crecimiento fisiológico de las plantas, su diferenciación y desarrollo. Es bien conocido que esta enzima participa en la construcción y lignificación de la pared celular, la biosíntesis de etileno a partir del ácido 1-aminociclopropanocarboxílico y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), la regulación de niveles de auxina, la protección contra el deterioro de tejidos e infección por microorganismos patógenos, la oxidación de ácido indolacético, etc. (1-3). Por otro lado, hoy día existe un gran interés por la POD debido a sus múltiples aplicaciones prácticas (industria maderera, industria de alimentos, bioquímica clínica, etc.). Actualmente cerca de un 90% de los *Kits* para análisis inmunoenzimático se preparan a partir de peroxidasa (4,5). Además, la POD se ha venido utilizando para preparar electrodos específicos con POD inmovilizada sobre su superficie que tienen aplicación en análisis ambiental (6).

La POD se encuentra ampliamente distribuida en las plantas, sin embargo, en la actualidad, la POD de la raíz de rábano silvestre (*Armoracia lapothifolia*) es la única que tiene aplicación práctica debido a que es la fuente que posee la mayor actividad de esta enzima. La mayoría de las fuentes comparadas con la raíz de rábano silvestre suelen contener niveles de actividad 10 - 100 veces menores (7-9).

La POD de plantas tropicales ha sido muy poco estudiada. Colombia es un país tropical con una enorme variedad de flora, sin embargo, los niveles de actividad

de POD en la mayoría de las plantas que crecen en su territorio no han sido determinados aún. En este trabajo se evaluó el contenido de peroxidasa presente en algunas plantas tropicales provenientes de la región de Santander del Sur (Colombia). La comparación de la actividad de la POD de rábano silvestre con la de algunas fuentes estudiadas como las hojas de varias palmas, de dormidera, de pasto guinea, higuera y la raíz de batata mostraron que dichas plantas tienen alto contenido de POD y, por tanto, son fuentes potenciales para la obtención preparativa de la peroxidasa. Además, mediante isoelectroenfoque se halló que las peroxidases presentes en las plantas estudiadas son de naturaleza aniónica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia prima

Para el estudio se seleccionaron 7 frutos, 13 raíces y 31 hojas de diferentes plantas tropicales (ver tablas 1-3). La mayor parte de las hojas y frutos que se estudiaron se adquirieron en el Jardín Botánico (Floridablanca - Santander) y en las fincas aledañas a la ciudad de Bucaramanga. Por su parte, la totalidad de los tubérculos y un fruto (tomate de árbol) se adquirieron directamente en las plazas de mercado y se desconoce si hubo almacenamiento y bajo que condiciones. Respecto a los tubérculos, solo se analizaron aquellos que parecían frescos y que no presentaban síntomas de maltrato o períodos largos de almacenamiento. Las muestras de hojas y algunos frutos, excepto tomate de árbol fueron analizadas el mismo día que se recolectaron. Previamente al análisis, las muestras fueron lavadas

con agua destilada para remover cualquier suciedad y materiales extraños.

El estudio de la variación de la peroxidasa durante el ciclo vegetal de los frutos se realizó solo con la fruta de balazos. Para definir el estado de madurez se utilizó el color y la masa de los mismos (ver tabla 1). Para las hojas de plantas no es posible utilizar el término grado de madurez. Por eso la actividad de la peroxidasa de las hojas de la palma de botella se determinó mensualmente. Este análisis se realizó con una misma palma, pero de diferentes edades, la cual se estableció con base en su altura.

Reactivos

Los reactivos utilizados en este trabajo fueron adquiridos de diferentes casas comerciales. Así, de Merck: peróxido de hidrógeno (solución al 30% w/v), sulfato de amonio y ácido ascórbico; de J. T. Baker: persulfato de amonio, guayacol; de Aldrich: EDTA; de Sigma: N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) y N,N'-metilene-bis(acrilamida); de Biorad: anfolitos con rango de pH de 3-10; de Pharmacia: una columna PD-10 (volumen - 9 mL); de Serva: patrones de proteínas con valores conocidos de pI (mixture 9): amiloglucosidasa (pI 3.5), ferritina (4.4), albúmina bovina (4.7), β -lactoglobulina (5.34), conalbúmina (5.9), mioglobulina de caballo (7.3), mioglobulina de ballena (8.3), ribonucleasa (9.45), citocromo c (10.65). Todos los otros compuestos utilizados fueron de calidad analítica.

Extracción y precipitación de la enzima

Un gramo de muestra finamente dividida fue homogeneizada (utilizando un homogenizador manual de vidrio) con 10 mL de un buffer de pH 7.0 de composición: 0.1 M de Na_2HPO_4 , 28 mM de ácido ascórbico, 5 mM de EDTA y 5% de NaCl. Para ajustar el pH se utilizó HCl concentrado. La suspensión obtenida fue mantenida a temperatura ambiente y con agitación continua durante una hora. Posteriormente fue centrifugada a 29.000 x g por 15 minutos y 4°C. Después de separar el líquido sobrenadante se desechó el residuo sólido. Para precipitar las proteínas se adicionó gradualmente sulfato de amonio sólido (1.2 gramos de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 2 mL del sobrenadante, 85% de saturación). La solución resultante fue incubada a 4°C. Una hora más tarde, el precipitado formado se separó del sobrenadante por centrifugación (37.000 x g; 20 min.; 4°C). Seguidamente, se disolvió el precipitado en 2 mL de un buffer 10 mM de fosfato de pH 6.0 y se midió la actividad de la POD. La actividad de POD en cada una de las muestras fue determinada el mismo día. Cada determinación se realizó por triplicado para comprobar la reproducibilidad del método y los valores reportados corresponden al promedio de tres determinaciones realizadas de idéntica forma sobre muestras distintas.

Determinación de la actividad de la peroxidasa

La actividad de la peroxidasa fue determinada espectrofotométricamente siguiendo el procedimiento descrito por Cívello et al. (10). La solución de enzima

(3 – 100 μL) fue adicionada a 3 mL de un buffer 10 mM de fosfato de pH 6.0 que contenía guayacol (20 mM) y H_2O_2 (4.4 mM) como sustratos. Los cambios de absorbancia debidos a la oxidación del guayacol por la POD fueron seguidos a 25 $^\circ\text{C}$ en un espectrofotómetro Lambda Bio 10 a 470 nm. Una unidad de peroxidasa fue definida como la cantidad de enzima que produce 1 μmol de tetraguayacol ($\epsilon_{470} = 5200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) por minuto bajo condiciones estándares. La actividad enzimática fue expresada como unidades de actividad por gramo de muestra.

Isoelectroenfoque

Los puntos isoeléctricos (pI) de las isoenzimas de la peroxidasa de los extractos de plantas se determinaron en una celda horizontal de isoelectroenfoque (Model 111 Mini IEF Cell, BIORAD) con un gel de poliacrilamida (PAAG), de composición: 4.8% (w/v) de acrilamida, 0.15% (w/v) de $\text{N,N}'$ -metileno-bis(acrilamida), 0.04% (w/v) de $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, 5.0% (w/v) de glicerol, 1% de anfolitos (con rango de pH de 3–10), 0.03% (v/v) de $\text{N,N,N}',\text{N}'$ -tetrametilendiamina (TEMED).

Las muestras de enzimas fueron desalinizadas previamente usando una columna PD-10 que fue equilibrada con un buffer de fosfato 10 mM de pH 6.0. Sobre la superficie del gel formado se aplicó una muestra del extracto de enzima (2 μL) y se procedió a realizar la separación de las isoenzimas de la peroxidasa aplicando un voltaje constante de 100 V durante 15 minutos, luego 200 V durante otros 15 minutos y finalmente 450 V durante 45 minutos. Posteriormente, para revelar la actividad de las isoenzimas, el

gel se sumergió en 50 mL de un buffer 0.1 M de fosfato de pH 7.0 que contenía 3, 3'- diaminobencidina (0.1 mg/mL), 0.15 M de NaCl y 0.006% H_2O_2 a temperatura ambiente (10).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La diversidad de plantas tropicales que crecen en Colombia es muy grande. La mayor parte de las especies no ha sido estudiada ni biológica ni bioquímicamente. Para evaluar el contenido de POD en algunas plantas tropicales y para encontrar nuevas fuentes para la producción preparativa de esta enzima, se seleccionaron 7 frutos, 13 raíces y 31 hojas de diferentes plantas. Los datos correspondientes a las actividades de las distintas plantas se muestran en las tablas 1-3. Al comparar los valores de actividad de POD correspondientes a las diferentes partes de las plantas que se analizaron, se encontró que los niveles más bajos correspondieron a las frutas. Los valores de actividad de POD de la mayoría de las frutas variaron entre 1.0 y 16.2 U/g de muestra (ver tabla 1). En consecuencia, la posibilidad de obtención de un preparado comercial de POD a partir de estas fuentes queda por el momento descartada. Valores similares de actividades para frutas de otras especies han sido reportados por varios investigadores (7-9). Solamente para las frutas de balazos (*Monstera deliciosa*) en estado verde y semimaduro, se encontraron valores de actividad relativamente más altos. Por otro lado, la actividad de la POD en las pulpas de las frutas de cacao, tomate de árbol y totumo son comparativamente mucho menor que la exhibida por la semilla de cacao y cortezas de estos mismos frutos (tabla 1).

Tabla 1. Actividad de la peroxidasa de frutas de algunas plantas tropicales.

No.	Fuentes	Actividad de la peroxidasa, U/g fruta
1	Almendra (<i>Terminalia catappa</i>), semimaduro.	< 1.0
2	Balazos (<i>Monstera deliciosa</i>) Tierno (masa 146 g, verde) Verde (masa 343 g, verde) Semi-maduro (masa 551 g, verde) Maduro (masa 653 g, amarillo claro)	32.4 69.4 69.4 15.0
3	Cacao (<i>Theobroma cacao</i>), semimaduro Corteza Pulpa Almendra	11.6 < 1.0 11.6
4	Café (<i>Coffea arabica</i>), maduro Corteza Almendra	9.2 22.9
5	Palma de coco (<i>Cocos nucifera</i>), semimaduro	1.2
6	Tomate de árbol (<i>Cyphomandra betacca</i>), maduro Corteza Pulpa	16.2 4.0
7	Totumo (<i>Crescentia cujete</i>), semimaduro corteza pulpa	5.8 2.3

Aunque durante este estudio se observó una cierta influencia del ciclo de vida de los frutos sobre la POD, la diferencia entre los valores de actividad registrada entre un estado y otro osciló alrededor de 2 y 3 veces. Puesto que esta diferencia no es muy marcada, se optó por realizar la búsqueda de nuevas fuentes potenciales de peroxidasa analizando los frutos en un solo estado de madurez.

Así como las frutas, la mayor parte de las raíces analizadas exhibieron también bajos niveles de actividad de POD (ver tabla 2). Sin embargo, en este grupo, la batata (*Ipomoea batatas*) presentó un

contenido de POD relativamente alto. La actividad de POD de la batata fue 1800 U/g de raíz. No obstante, este valor es un poco menor que el correspondiente a la raíz de rábano silvestre (*Armoracia lapathifolia*) que es la fuente vegetal que posee el mayor contenido de peroxidasa que se conoce actualmente (11) y que fue utilizada en este estudio como control (tabla 2). No obstante, las raíces de batata y rábano silvestre exhibieron una composición de isoenzimas muy variada. Como se muestra en la figura 1, el valor de pI para la POD de batata fue de 3.5, mientras que en rábano silvestre se detectaron

varias isoenzimas con pI 8.3 para mayor isoenzima.

A diferencia de las frutas y las raíces, las hojas de la mayor parte de las plantas presentaron los valores más altos de actividad de POD. Como se muestra en la tabla 3, se encontraron altos niveles de actividad de POD en las hojas de pasto guinea (*Panicum maximum*), dormidera (*Mimosa pigra*), higuerilla (*Ricinus communis L.*) y algunas palmas. Respecto a las palmas, el contenido de POD resultó ser muy variado para las diferentes especies. Así, la actividad enzimática de la POD encontrada en las hojas de las palmas mararai (*Aiphanes carotifolia*), de botella (*Roystonea regia*), dactilera

(*Phoenix dactylifera*) y africana (*Elaeis guineensis*) fue de 1145.0; 694.0; 580.0 y 566.0 U/g de hoja, respectivamente. El alto valor de actividad de POD de las hojas de la palma africana, constituye una fuente potencial muy importante para la obtención de un preparado comercial de esta enzima, sobre todo si se tiene en cuenta las grandes plantaciones de palma africana que existen en Colombia. Sería una buena alternativa para los palmicultores Colombianos, puesto que las hojas pasarían de ser un simple desecho a una valiosa fuente de ingresos.

Al contrario de las palmas mencionadas arriba, la actividad enzimática de las hojas de la palma de coco (*Cocos nucife-*

Tabla 2. Actividad de la peroxidasa en raíces de algunas plantas tropicales.

No.	Fuentes	Actividad de la peroxidasa, U/g raíz
1	Apio (<i>Apium graveolens</i>)	58.0
2	Arracacha (<i>Arracacia xanthorrhiza</i>)	< 1.0
3	Batata (<i>Ipomoea batatas</i>)	1800.0
4	Bore (<i>Colocasia esculenta</i>)	370.0
5	Cilantro (<i>Coriandrum sativum</i>)	35.0
6	Cubios (<i>Tropaeolum tuberosum</i>)	81.0
7	Jengibre (<i>Zingiber officinale</i>)	11.6
8	Ñame (<i>Dioscorea alata</i>)	87.0
9	Olluco (<i>Ullucus tuberosus</i>)	46.0
10	Papa criolla (<i>Solanum rybinii</i>)	24.3
11	Rábano rojo (<i>Rapharus sativus</i>)	121.3
12	Rábano silvestre (<i>Armoracia laphthifolia</i>)	2600.0
13	Yuca (<i>Manihot esculenta</i>)	1.7

ra) y de la palma de areca (*Chrysalidocarpus lutescens*) fue muy baja (Tabla 3). Por lo tanto, se debe resaltar que el contenido de peroxidasa de las distintas palmas depende ampliamente de la especie.

Para la palma de botella se encontró que su contenido de peroxidasa no varía

con la edad de la misma, pues, se encontraron valores similares tanto en el estado adulto (palmas con 18 metros de altura) como en palmas en estado joven (entre 0.5 y 2.0 metros de altura). Contrariamente a lo encontrado en el fruto de balazos, donde la actividad varía con el grado de madurez, la actividad de las hojas de la

Tabla 3. Actividad de la peroxidasa de hojas de algunas plantas tropicales.

No.	Fuentes	Actividad de la peroxidasa, U/g hoja
1	Adelfo (<i>Nerium oleander</i>)	98.3
2	Balazos (<i>Monstera delisiosa</i>)	179.0
3	Banano (<i>Musa sapientum</i>)	49.7
4	Bambú (<i>Bambusa guadua</i>)	< 1.0
5	Barba de viejo (<i>Tillandsia recurvata</i>)	5.2
6	Cactus Cirio (<i>Cereus hexagonus</i>)	19.0
7	Caléndula (<i>Calendula oficinales</i>)	231.2
8	Calistemo (<i>Callistemon lanceolatu</i>)	< 1.0
9	Caña de azúcar (<i>Saccharum officinarum</i>)	104.0
10	Dormidera (<i>Mimosa pigra.</i>)	460.0
11	Eucalipto (<i>Eucalyptus citriodora</i>)	< 1.0
12	Fique (<i>Agave fourcroides</i>)	19.6
13	Helecho (<i>Adiantum obliquum</i>)	< 1.0
14	Higuerilla (<i>Ricinus communis L.</i>)	440.0
15	Limonaria (<i>Cymbopogon citratus</i>)	390.0
16	Palma abanico (<i>Copernica pectori</i>)	220.0
17	Palma africana (<i>Elaeis guineensis</i>)	566.0
18	Palma areca (<i>Chrysalidocarpus lutescens</i>)	< 1.0
19	Palma dactilera (<i>Phoenix dactylifera</i>)	580.0
20	Palma de botella (<i>Roystonea regia</i>)	694.0

Continuación **Tabla 3**

21	Palma de coco (<i>Cocos nucifera</i>)	48.6
22	Palma de corozo (<i>Acrocomia aculeata</i>)	570.0
23	Palma de vino (<i>Scheelea butyracea</i>)	173.4
24	Palma estera (<i>Astrocarium sp.</i>)	220.0
25	Palma lata (<i>Bactris sp.</i>)	196.0
26	Palma mararai (<i>Aiphanes carotifolia</i>)	1145.0
27	Pasto guinea (<i>Panicum maximum</i>)	980.0
28	Perejil (<i>Petroselinum sativum</i>)	35.0
29	Totumo (<i>Crescentia cujete</i>)	<1.0
30	Ylang-Ylang (<i>Cananga odorata</i>)	<1.0
31	Yuca (<i>Yucca aloifolia</i>)	231.2

pI

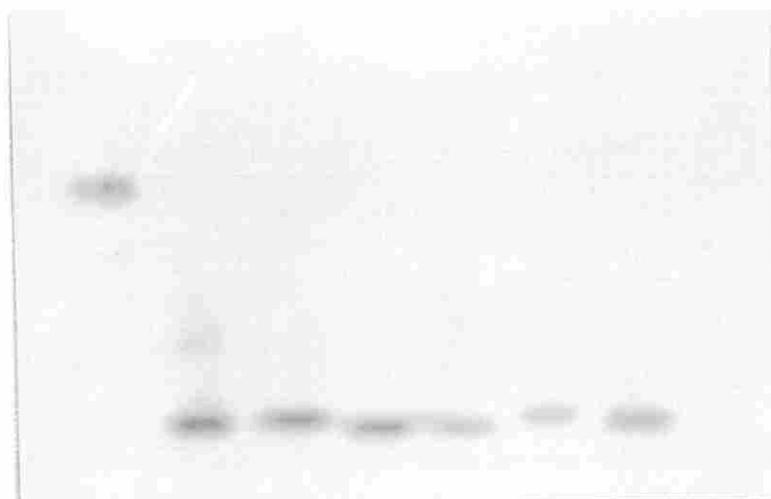
10.65 -

8.30 -

5.90 -

4.70 -

3.50 -



a b c d e f g

Figura 1. Isoelectroenfoco de isoenzimas de la peroxidasa de varias fuentes vegetales. a) rábano silvestre, b) palma mararai, c) palma africana, d) palma de corozo, e) palma de botella (estado joven), f) palma de botella (estado adulto), g) batata.

palma se mantiene constante todo el tiempo, durante un año, haciendo muestreos mensualmente no se observó ninguna variación (datos no mostrados).

Mediante isoelectroenfoque se encontró en las hojas de las palmas analizadas una sola peroxidasa aniónica con pI alrededor de 3.4 - 3.8 (figura 1). Solo en las hojas de la palma mararai se detectaron 4 isoenzimas de POD, encontrándose la mayor banda a un pI de 3.5. Anteriormente para otras plantas como tomate, patata, rábano rojo, tabaco, etc. se ha reportado también la presencia de isoenzimas aniónicas de POD (11-13).

Por lo anterior, durante este estudio se llevó a cabo la determinación de la actividad de la peroxidasa en hojas, raíces, y frutos de algunas plantas tropicales, encontrándose un alto contenido de esta enzima en algunas especies. El estudio demuestra que predomina la peroxidasa de carácter ácido en las fuentes estudiadas. La purificación y caracterización de la peroxidasa de las plantas que presentaron alta actividad enzimática serán el objeto de futuros estudios.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento a la Dirección de Investigaciones de la Facultad (DIF de Ciencias, Proyecto 7168) de la Universidad Industrial de Santander y al CORPES CENTRO ORIENTE (proyecto 7421) por el apoyo financiero para la realización de este trabajo.

REFERENCIAS

1. Krylov, S.N.; Dunford, H. B. Reaction of horseradish peroxidase with indole-3-acetic acid. *Plant Peroxidases, Biochemistry and Physiology*, Univ. Agriculture, Vienna & Univ. Geneva: Geneva - Vienna, **1996**, 59.
2. Farrell, R. L.; Murtagh, K. E.; Tien, M.; Mozuch, M. D.; Kirk, T. K. Physical and enzymatic properties of lignin-peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme Microb. Technol.* **1989**, 11, 322.
3. Wakamatsu, K.; Takahama, U. Changes in peroxidase activity and in peroxidase isoenzymes in carrot callus. *Physiol. Plants.* **1993**, 88, 167.
4. Hammer, F. E. Oxidoreductases. *Enzymes in Food Processing*, Academic Press: New York, 1993, 221.
5. Tijssen, P. *Practice and Theory of Enzyme Immunoassay*, Elsevier: Amsterdam, **1985**.
6. Munteanu, F. D.; Lindgren, A.; Emnéus, J.; Gorton, L.; Ruzgas, T.; Csoregi, E.; Ciucu, A.; van Huystee, R. B.; Gazaryan, I. G.; Lagrimini, L. M. Bioelectrochemical monitoring of phenols and aromatic amines in flow injection using novel plant peroxidases. *Anal.Chem.* **1998**, 70, 2596.
7. Khader, S. E. S. A.; Sigh, B. P.; Khan, S.A. Effect of GA3 as a post-harvest treatment of mango fruit on ripening, amylase and peroxidase activity and quality during storage. *Sci. Hort.* **1988**, 36, 261.

8. Moulding, P. H.; Grant, H. F.; McLellan, K. M.; Robinson, D. S. Heat stability of soluble and ionically bound peroxidase extracted from apples. *Int. J. Food Sci. Technol.* **1987**, 22, 391.
9. Robinson, D. S.; Bretherick, M. R.; Donnelly, J. K. The heat stability and isoenzymes composition of peroxidase in Ohane grapes. *Int. J. Food Sci. Technol.* **1989**, 24, 613.
10. Civello, P. M., Martínez, G. A., Chaves, A. R.; Añón, M. C. Peroxidase from strawberry fruit (*Fragaria ananassa* Duch.): partial purification and determination of some properties. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, 43, 2596.
11. Gazaryan, I.G. Plant peroxidases. *Biotechnology of peroxidases of plants and fungi*, VINITI: Moscow. **1992**, 4.
12. Lagrimini, L.M. The role of the tobacco anionic peroxidase in growth and development. *Plant Peroxidases. Biochemistry and Physiology*, Univ. Agriculture, Vienna & Univ. Geneva: Geneva - Vienna, **1996**, 235.
13. Marangoni, A. G.; Brown, E. D.; Stanley, D. W.; Yada, R. Y. Tomato peroxidase: rapid isolation and partial characterization. *J. Food Sci.* **1989**, 54, 1269.