

壳聚糖固定化 S-腺苷甲硫氨酸合成酶

尹春丽¹, 陶贵荣¹, 许乐², 牛卫宁^{*2}

(1. 西安文理学院 生命科学系, 陕西 西安 710065; 2. 西北工业大学 生命学院, 陕西 西安 710072)

摘要: 在大肠杆菌中重组表达了 S-腺苷甲硫氨酸合成酶, 然后以壳聚糖为载体, 戊二醛为交联剂, 对酶进行固定化研究。结果表明, 最佳固定化条件为: 壳聚糖质量浓度为 2.5 g/dL、戊二醛体积分数为 0.8%、固定化酶量为 6 mg/mL、固定化时间为 12 h, 该条件下所得固定化酶活性回收率为 76%, 固定化酶热稳定性较好, 在 55 ℃下保温 5 h 仍保留 53% 的活力, 而游离酶在 50 ℃下保温 5 h 则完全失活。固定化酶在碱性溶液环境的稳定性较高, 在 pH 7.5~9.0 的缓冲液中 4 ℃保温 10 h 酶活性仍保留 80% 以上。将固定化酶用于 S-腺苷甲硫氨酸的合成, 连续反应 5 批次后, 酶活性仍保留 64%。在底物三磷酸腺苷(ATP)浓度为 30 mmol/L 的条件下, 固定化酶催化底物 ATP 的转化率超过 95%。

关键词: S-腺苷甲硫氨酸合成酶; 壳聚糖; 固定化酶; 酶学性质

中图分类号: TQ 426.97 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2013)09—0945—06

Study on Characterizations of Immobilized S-adenosylmethionine Synthetase on Chitosan Microspheres

YIN Chun-li¹, TAO Gui-rong¹, XU Le², NIU Wei-ning^{*2}

(1. Department of Life Science, Xi'an University of Arts and Science, Xi'an 710065, China; 2. School of Life Science, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, China)

Abstract: S-adenosylmethionine (SAM) synthetase was expressed in *E. coli*, and then the purified SAM synthetase was immobilized on chitosan microspheres with glutaraldehyde crosslinking. Properties of the immobilized enzyme were identified. The results showed the optimal conditions for the immobilization of the enzyme were as follows: the mass fraction of chitosan was 2.5%; the volume fraction of glutaraldehyde was 0.8%; the amount of enzyme was 6 mg/mL gel; the immobilization time was 12 hours. Under these conditions, the activity yield of the immobilized enzyme was 76%. The immobilized enzyme showed a good stability compared with the free enzyme. After incubation at 55 ℃ for 5 h the immobilized enzyme maintained 53% of the original activity while the free enzyme lost all activity at 50 ℃ for 5 h. The immobilized enzyme also showed a good stability in alkaline solution. It still kept more than 80% of the original activity when incubated in

收稿日期: 2013-03-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(20802057); 陕西省科技攻关项目(2011K08-12); 西安市科技支撑计划项目(CXY1134W125); 西北工业大学基础研究基金项目(JC201161); 西北工业大学“翱翔之星”计划资助。

作者简介: 尹春丽(1977—), 女, 山西阳泉人, 工学博士, 讲师, 主要从事天然产物化学研究。E-mail: yinchunli1977@126.com

* 通信作者: 牛卫宁(1977—), 男, 山西芮城人, 工学博士, 副教授, 主要从事生物催化研究。E-mail: niuweining@nwpu.edu.cn

the buffer of pH 7.5~9.0 at 4 °C for 10 h. The immobilized enzyme was employed to synthesize the SAM and it remained 64% activity after five times repeated operations. The substrate conversion rate was more than 95% in the presence of 30 mmol/L adenosine triphosphate(ATP)。

Keywords: S-adenosylmethionine synthetase, chitosan, immobilized enzyme, enzymatic properties

S-腺苷甲硫氨酸合成酶 (S-adenosylmethionine synthetase) 在体内催化三磷酸腺苷和 L-甲硫氨酸合成 S-腺苷甲硫氨酸 (S-adenosylmethionine, SAM)^[1], 在欧美国家 SAM 已作为食品营养强化剂、保健品以及药品而得到广泛应用^[2], 但 SAM 售价昂贵。因此, 建立廉价高效的 SAM 生产方法是其大规模推广应用的关键。目前, SAM 的生产方法主要为酵母菌发酵法, 菌种主要包括野生或者诱变的酿酒酵母, 以及经过遗传改造的重组毕赤酵母, 尽管发酵法 SAM 产量可以超过 10 g/L^[3-4], 但存在生产周期长、底物转化率低、纯化工艺复杂、能耗高等不足^[5]。体外酶促转化法克服了发酵法的不足, 同时生产成本较低, 因而是较为有效的工业化生产方法。许多研究者对来源于酿酒酵母以及大肠杆菌的重组 SAM 合成酶的催化特性进行了研究, 但是存在 SAM 合成酶活性低、游离酶稳定性差, 以及无法回收重复利用的问题^[6-8]。作者所在研究组前期构建了高效组成型表达 SAM 合成酶的重组大肠杆菌 *E. coli* JM109(pBR322-SAMS), 重组菌 SAM 合成酶活性比原始菌提高了 157 倍, 并对其酶学性质进行了研究^[9-10]。

与游离酶相比, 固定化酶能大大提高催化反应过程中酶的稳定性。同时, 固定化酶与反应液可以通过离心或过滤等简单方式加以分离, 有利于酶的多次重复使用及反应产物的纯化, 更适于在工业生产中应用。Luo 等^[11]将来源于酿酒酵母的 SAM 合成酶通过亲和层析固定在 Ni 离子螯和柱上, 经过 3 次连续反应, 固定化酶活力回收率仅为 39.5%, 该研究使用的固定化树脂昂贵, 不利于大规模生产, 而且固定化酶的活性回收率以及稳定性并不理想。作者所在研究组通过海藻酸钠包埋法固定化腺苷蛋氨酸合成酶, 但是固定化酶活性回收率仅有 42%, 并且存在固定化酶在反应过程中强度不高以及酶容易流失等问题^[12]。壳聚糖是一种富含氨基的天然高分子化合物, 因其生物相容性、较好的机械性能、稳定的化学性质而成为固定化酶的优良载

体, 通过戊二醛交联形成化学键将酶固定在壳聚糖微球上, 可以防止催化过程中酶的流失。另外, 作者所在研究组通过全细胞催化和固定化酶催化合成 SAM 的技术方法已经获得了专利授权^[13]。

作者以壳聚糖为载体、戊二醛为交联剂, 对 SAM 合成酶进行固定化, 分别对酶固定化条件以及固定化酶的性质进行了研究, 为工业化应用固定化酶高效生产 SAM 奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 菌种和试剂

重组大肠杆菌菌株 *E. coli* JM109 (pBR322-SAMS) 为作者所在实验室构建并保存^[14], Phenyl-Sepharose Fast Flow 预装柱购于 GE 公司, SAM 标准品购于 Sigma 公司, 壳聚糖 (相对分子质量 6×10^5 Da, 脱乙酰度大于 80%) 购于国药集团化学试剂有限公司, 其余试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 方法

1.2.1 重组 SAM 合成酶的表达和粗酶液制备 将重组菌 *E. coli* JM109 (pBR322-SAMS) 接种到 1 L 含有 15 μ g/mL 四环素的 LB 培养基中, 30 °C 220 r/min 培养 12~16 h, 然后离心收获菌体备用。重组 SAM 合成酶的纯化主要参照文献^[12]进行, 纯化过程如下: 离心 1 L 培养液收集细胞, 然后用 40 mL 裂解液 (100 mmol/L Tris-HCl, 2 mmol/L EDTA- Na_2 , pH 8.0) 在冰水浴中超声 (300 W, 超声 3 s, 间隔 5 s) 处理 12 min 破碎细胞, 破碎液加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 固体粉末至终浓度为 0.75 mol/L, 10 000 r/min 离心 20 min, 上清液通过 0.22 μ m 的滤膜过滤备用。将上述酶液加入经 Buffer A (Tris-HCl 50 mmol/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.75 mol/L, pH 8.0) 预平衡的 Phenyl-Sepharose Fast Flow 柱, 然后使用 Buffer B (Tris-HCl 50 mmol/L, pH 8.0) 洗脱, 收集酶液用于固定化酶制备。

1.2.2 SAM 合成酶固定化方法 称取一定质量的壳聚糖充分溶解于 100 mL φ (乙酸)=2% 的水溶液中, 使用 6 号针头注射器将该溶液逐滴加入到

2 mol/L 的 NaOH 水溶液中,壳聚糖溶液凝聚成直径约为 2 mm 的白色微球,过滤收集并用蒸馏水洗涤至中性,然后在壳聚糖微球中加入不同体积分数的戊二醛水溶液,室温振荡交联 5 h 后用 Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 洗涤交联载体,然后加入适量的 SAM 合成酶液于 4 °C 吸附交联 12 h,洗净抽滤干燥后得到固定化酶,固定化酶密封保存于 4 °C。固定化酶的活力与固定化时所加游离酶总活力的比值即为固定化酶的活力回收率。

1.2.3 酶活性测定方法 固定化酶以及游离酶活性测定参照文献[10]方法进行,使用 SAM 标准品制作色谱峰峰面积和 SAM 质量浓度之间的标准曲线,计算样品中 SAM 的质量浓度。酶活力单位定义为:37 °C,1 h 催化形成 1 μmol SAM 所需要的酶量为 1 个活力单位(1 U)。

1.2.4 固定化酶催化合成 SAM 用天平称取经抽滤干燥的 1 g 固定化酶加到 10 mL SAM 合成反应液 (100 mmol/L Tris、100 mmol/L KCl、70 mmol/L MgSO₄、40 mmol/L L-Met、30 mmol/L ATP、0.8 mol/L 对甲苯磺酸钠,pH 7.0)中,35 °C 振荡反应 8 h,收集上清液进行 HPLC 分析。每次反应后,将固定化酶过滤洗涤后重复使用。

2 结果与讨论

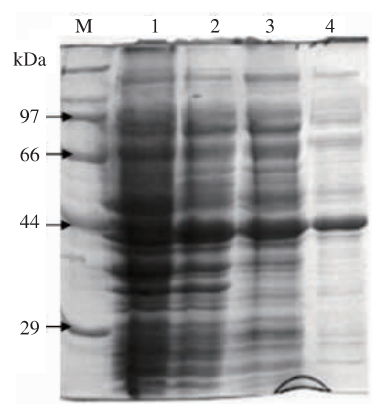
2.1 固定化条件的优化

通过重组大肠杆菌组成型表达 SAM 合成酶,然后经过硫酸铵沉淀和疏水层析纯化得到单位酶活为 22 U/mg 的 SAM 合成酶,结果如图 1 所示,并将其用于后续的固定化酶研究。

2.1.1 壳聚糖微球的制备 壳聚糖溶液浓度能显著影响壳聚糖成球性能。研究中首先考察了质量浓度为 1~5 g/dL 壳聚糖溶液在 2 mol/L 的 NaOH 凝液中的成球情况,结果表明:当壳聚糖质量小于 2 g/dL 的时候,壳聚糖黏度较小,成球容易,但是小球机械强度较差,在合成 SAM 的反应液中易溶胀和破碎;当壳聚糖质量浓度大于 3 g/dL 的时候,壳聚糖溶液成球困难。因此采用质量浓度为 2.5 g/dL 壳聚糖溶液来制备壳聚糖微球。

2.1.2 戊二醛浓度对酶固定化的影响 平行取 0.5 g 壳聚糖微球,然后分别加入不同浓度的戊二醛水溶液 5 mL,于室温振荡交联 5 h,抽滤洗涤。然后加入 2 mL SAM 酶液(2 mg/mL)于 4 °C 交联 12 h,洗净抽

滤后得到固定化酶,测定固定化酶的活力。结果如图 2 所示,当戊二醛体积分数为 0.8 % 时,酶活力达到最大。当戊二醛含量较低时,载体表面偶联的醛基不足,最终固定的酶量较少,导致固定化酶活性较低;当戊二醛含量过高时,可导致蛋白质变性,同时载体结合过多的酶也增加了酶的空间位阻,使固定化酶的活力下降。由此可以确定戊二醛最佳体积分数为 0.8%。



M:蛋白质相对分子质量标准;1:菌体总蛋白;2:重组菌破碎后上清液;3:0.75 mol/L 硫酸铵沉淀后上清液;4:疏水层析纯化后 SAM 合成酶

图 1 SAM 合成酶纯化结果的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of SAM synthetase purification

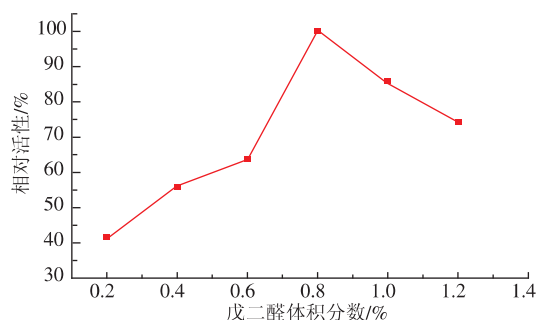


图 2 戊二醛体积分数对固定化酶的影响

Fig. 2 Effect of the concentration of glutaraldehyde on the immobilized enzyme

2.1.3 酶与载体配比对固定化的影响 平行取 0.5 g 壳聚糖微球与 φ (戊二醛)=0.8% 的水溶液交联制备的载体,各加入不同量的酶液进行固定化,测定固定化酶活力,结果如图 3 所示。随着给酶量的增加,固定化酶活力逐渐增加。当酶量增加到 6 mg/mL 时,固定化酶活力达到最大值。继续增加酶量,固定化酶活力不再增加,并且有略微下降的趋势,这是

由于载体的结合位点已经达到饱和。因此确定 1 mL 凝胶添加 6 mg SAM 合成酶为最佳。

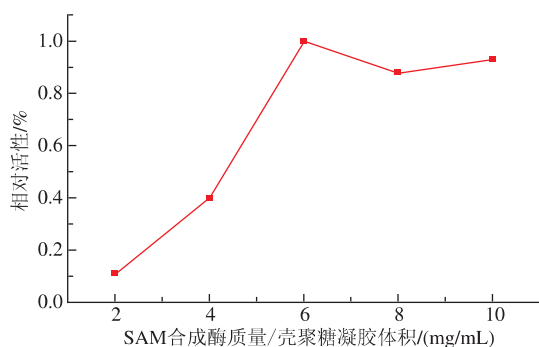


图3 酶与凝胶比对固定化酶的影响

Fig. 3 Effect of enzyme/chitosan gel ratio on the immobilized enzyme

2.1.4 交联时间对酶固定化的影响 为了减少酶交联过程中活性的损失,载体和酶的交联反应在 4 °C 下进行。交联时间对固定化酶活力的影响如图 4 所示。固定化酶活力随着酶交联时间增加而增大,12 h 达到最高后则略微下降,酶交联时间越长越有利于酶分子固定在载体上,但当载体偶联的酶过多时,可能使载体孔径相应变小,导致底物和产物的传质性降低,从而使酶活力下降。

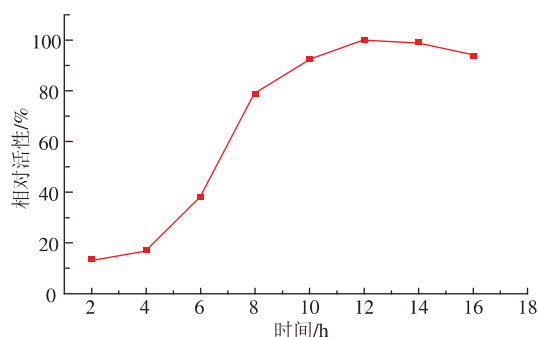


图4 酶交联时间对固定化酶活力的影响

Fig. 4 Effect of cross-linking time on the immobilized enzyme

在以上优化条件下,所得固定化酶活性回收率为 76%。

2.2 固定化 SAM 合成酶的性质

2.2.1 固定化酶的热稳定性 将固定化酶和游离酶分别在不同温度下保温 5 h 后测定残留酶活力,分别以未经过热处理的固定化酶和游离酶的酶活力为 100%,结果如图 5 所示。固定化酶的热稳定性比游离酶明显提高,固定化酶在 55 °C 下保温 5 h 后仍保持了 53% 的活力,而游离酶在 50 °C 下保温 5 h,

活力完全丧失。另外,作者所在研究组前期通过海藻酸钠包埋法制备了固定化 SAM 合成酶,在 55 °C 下保温 5 h 后保持了 32% 的活力^[12],因此通过壳聚糖交联法制备的固定化酶热稳定性高于海藻酸钠包埋法制备的固定化酶。这可能是由于 SAM 合成酶被戊二醛交联固定化后增加了酶分子的稳定性,使分子整体运动受限,酶的热稳定性也随之增加。

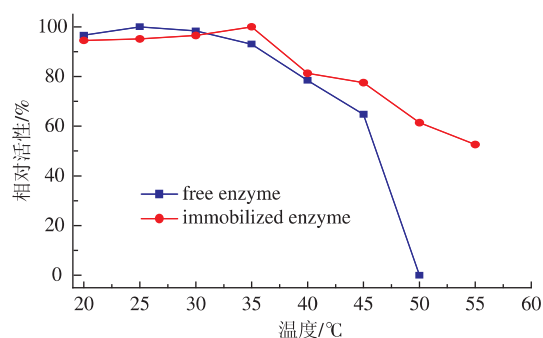


图5 固定化和游离 SAM 合成酶的热稳定性

Fig. 5 Thermal stability of immobilized and free SAM synthetase

2.2.2 pH 对固定化酶活力的影响 将固定化酶和游离酶置于 pH 6~9.5 的缓冲液中 4 °C 放置 10 h 测定酶活性,结果如图 6 所示,在更广泛的 pH 范围内固定化酶比游离酶的稳定性增强,特别是在 pH>7.5 的碱性条件下固定化酶的稳定性得到大幅度提高。在 pH 7.5~9.0 的缓冲液中 4 °C 保温 10 h 酶活性仍保留 80% 以上,可能是酶经过交联后被固定在凝胶结构中,使外界因素对酶的影响减弱。但是固定化酶和游离酶在酸性条件下的稳定性较差,因此在溶液状态下保存 SAM 合成酶需要选择碱性缓冲液系统。

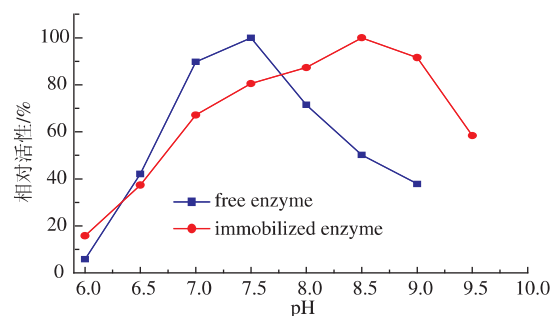


图6 pH 对固定化和游离 SAM 合成酶稳定性的影响

Fig. 6 Effects of pH on the immobilized and free SAM synthetase

2.2.3 固定化酶的操作稳定性 将1 g固定化酶与10 mL反应液在35℃下连续反应5批次,每次反应时间为8 h,每次反应后分别测定残余酶活力,以第1批次反应交联固定化酶的总活力为100%,计算相对酶活力,结果如图7所示。在第1批次反应后固定化酶活力有一定程度的下降,残余酶活为91%,连续反应5批次后酶活力仍然保持64%,固定化酶活力的降低可能是载体表面部分酶分子的脱落以及部分固定化酶变性失活所致。同时经过5批次反应后,固定化酶的形态没有明显变化。在底物三磷酸腺苷(ATP)浓度为30 mmol/L的条件下,固定化酶催化底物ATP的转化率仍超过95%,说明固定化SAM合成酶具有较好的操作稳定性以及催化活性。

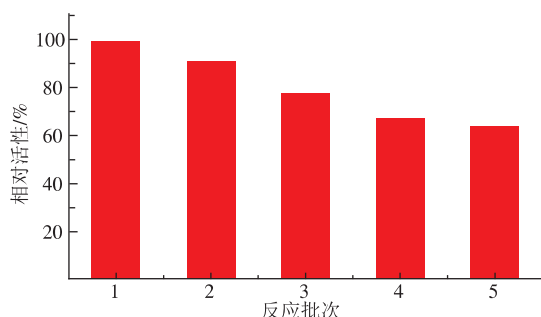


图7 固定化酶的重复使用性

Fig. 7 Repeated usability of the immobilized enzyme

2.2.4 固定化酶的贮存稳定性 分别将抽滤的固定化酶和游离酶(pH 7.5)置于4℃冰箱中,贮存15 d后测残余酶活,游离酶活性仅残余17%,而固定化酶保存了78%的酶活性,说明固定化酶有较好的贮存稳定性。用于固定化的SAM合成酶是经过一步纯化的粗酶,所以游离酶溶液中含有各种蛋白酶,在溶液长期贮存过程中容易降解,而通过戊二醛交联的固定化酶蛋白空间构象受到限制,所以稳定性较高。

3 结 语

壳聚糖是最常用的天然高分子固定化酶载体,通过戊二醛交联将酶固定在壳聚糖微球上,大大提高了SAM合成酶的稳定性。研究结果表明,最佳固定化条件为:壳聚糖质量浓度为2.5 g/dL、戊二醛体积分数为0.8%、固定化酶量为6 mg/mL、固定化时间为12 h。固定化酶热稳定性得到大幅度提高,同时固定化酶具有较好的强度和操作稳定性,将固定化酶用于SAM的催化合成,连续反应5批次后,酶活性仍保留64%,固定化酶催化底物ATP的转化率超过95%。研究成果为固定化酶法生产SAM奠定了基础。

参考文献:

- [1] Grillo M A, Colombatto S. S-adenosylmethionine and its products[J]. *Amino Acids*, 2008, 34: 187-193.
- [2] Bottiglieri T. S-adenosyl-L-methionine (S-AdoMet): from the bench to the bedside—molecular basis of a pleiotropic molecule[J]. *Am J Clin Nutr*, 2002, 76(5): 1151-1157.
- [3] HE Jun-yun, DENG Juan-juan, ZHENG Ying-hua, et al. A synergistic effect on the production of S-adenosyl-L-methionine in *Pichia pastoris* by knocking in of S-adenosyl-L-methionine synthase and knocking out of cystathionine- β -synthase[J]. *J Biotechnol*, 2006, 126: 519-527.
- [4] ZHANG Jian-guo, WANG Xue-dong, ZHENG Yu, et al. Enhancing yield of S-adenosylmethionine in *Pichia pastoris* by controlling NH_4^+ concentration[J]. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2008, 31: 63-67.
- [5] 牛卫宁, 左晓佳, 王莉衡, 等. S-腺苷甲硫氨酸制备方法的研究进展[J]. 化学与生物工程, 2009, 26(3): 1-5.
NIU Wei-ning, ZUO Xiao-jia, WANG Li-heng, et al. Development for the preparation of S-adenosylmethionine[J]. *Chemistry & Bioengineering*, 2009, 26(3): 1-5. (in Chinese)
- [6] 关晶华, 许晓, 陈新玲, 等. 重组腺苷蛋氨酸合成酶酶促反应条件的研究[J]. 中国医药导报, 2009, 16(6): 28-30.
GUAN Jing-hua, XU Xiao, CHEN Xin-ling, et al. Study on enzyme catalysis conditions of recombinant S-adenosylmethionine synthetase[J]. *China Medical Herald*, 2009, 16(6): 28-30. (in Chinese)
- [7] 罗赞星, 袁中一, 罗贵民, 等. S-腺苷甲硫氨酸合成酶反应条件的优化[J]. 工业微生物, 2008, 32(2): 6-10.
LUO Yun-xing, YUAN Zhong-yi, LUO Gui-ming, et al. Optimization on catalysis conditions for S-adenosylmethionine synthetase [J]. *Industrial Microbiology*, 2008, 32(2): 6-10. (in Chinese)
- [8] Park J, TAI Jun-zhe, Roessner C A, et al. Enzymatic synthesis of S-adenosyl-L-methionine on the preparative scale [J]. *Bioorg Med Chem*, 1996, 4(12): 2179-2185.

- [9] 牛卫宁,左晓佳,尚晓娅,等. 固定化 E.Coli JM109 (pBR322-MAT)细胞催化合成 S-腺苷蛋氨酸[J]. 现代化工,2009,29(3): 38-41.
- NIU Wei-ning,ZUO Xiao-jia,SHANG Xiao-ya,et al. Biosynthesis of S-adenosylmethionine by immobilized whole cell of E. Coli JM109(pBR322-MAT)[J]. **Modern Chemical Industry**,2009,29(3):38-41. (in Chinese)
- [10] 田林奇,牛卫宁,左晓佳,等. S-腺苷甲硫氨酸合成酶的组成型表达、产物纯化及鉴定[J]. 中国生物工程杂志,2010,20(3): 61-66.
- TIAN Lin -qi,NIU Wei -ning,ZUO Xiao -jia,et al. Constitutive expression,purification and identification of S - Adenosylmethionine synthetase[J]. **China Biotechnology**,2010,20(3):61-66. (in Chinese)
- [11] LUO Yun-xing,YUAN Zhong-yi,LUO Gui-min,et al. Expression of secreted His-tagged S-adenosylmethionine synthetase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and its characterization,one-step purification,and immobilization[J]. **Biotech Prog**, 2008,24:214-220.
- [12] 尹春丽,曹珊珊,牛卫宁. 海藻酸钠固定化 S-腺苷甲硫氨酸合成酶的制备及其性质研究[J]. 化学与生物工程,2012,29 (10):21-24.
- YIN Chun -li,CAO Shan -shan,NIU Wei -ning. Preparation and properties of sodium Alginate -Immobilized S - Adenosylmethionine synthetase[J]. **Chemistry & Bioengineering**,2012,29(10):21-24. (in Chinese)
- [13] 牛卫宁. 一种制备固定化腺苷甲硫氨酸合成酶和腺苷甲硫氨酸的方法;中国,ZL 201010545201.1[P]. 2012-07-04.
- [14] 牛卫宁,左晓佳,丁焰,等. 重组大肠杆菌全细胞催化合成 S-腺苷甲硫氨酸[J]. 精细化工,2009,26(3):288-292.
- NIU Wei-ning,ZUO Xiao-jia,DING Yan,et al. Biosynthesis of S-adenosylmethionine by whole cell of recombinant *E. coli*. [J]. **Fine Chemicals**,2009,26(3):288-292. (in Chinese)

科 技 信 息

新加坡修订食品条例 食品出口企业需予重视

新加坡农业食品兽医局(AVA)于8月1日在其官方公报上刊登了2013年食品条例(修正案),并宣布于发布之日起正式实行。

该条例为新加坡食品销售法案的第56部分,此次修订主要包括以下几个方面:一是定义了幼儿的概念,特指1-3岁的儿童;二是新增加了9种食品添加剂,并规定了其在69类食品中的限量要求;三是规定了婴儿配方奶粉中聚葡萄糖的最大含量不得超过0.2克/100毫升,以及二甲基二碳酸盐使用量的清晰释义;四是规定了真菌毒素黄曲霉毒素B1、黄曲霉毒素M1、棒曲霉素在婴幼儿食品中的最大限量,以及三聚氰胺在婴儿配方食品及其他食品中的最大限量;五是修改了营养信息面板中营养素含量的单位等。

[信息来源] WTO 检验检疫信息网. 新加坡修订食品条例 食品出口企业需予重视
[EB/OL]. (2013-8-19). <http://www.wtociq.gov.cn/wto1/show.jsp?cid=261&aid=42158>.

日本修正营养标签标准

近日,日本向WTO秘书处发出了修正营养标签标准的通报(G/TBT/N/JPN/436)。

新增加了下列关于营养声明的规则:1. 如果生产商以合理的方式估计出食品中营养含量的值,生产商可以在营养声明中使用该值,而不管当前指定的容差。在依照本新规则作出营养声明时,生产商应当显示声明值的准确度,例如,“这些值基于某种估算”,以及保存作为估算该值的证据的解释性文件;2. 在食品中营养水平低,但也符合新规定的放松容限限制条件的情况下,食品容限可以放宽。

该通报法规的拟批准日期和拟生效日期均待定。

[信息来源] 食品伙伴网. 日本修正营养标签标准 [EB/OL]. (2013-8-23). <http://news.foodmate.net/2013/08/241380.html>.