

越橘花色苷特征 及其制备技术研究进展

吕春茂^{1,2}, 王新现², 董文轩^{1,*}, 王博², 战孟娇²

(1. 沈阳农业大学园艺学院 辽宁沈阳 110866;

2. 沈阳农业大学食品学院 辽宁沈阳 110866)

摘要:越橘花色苷是一类重要的植物功能性天然色素。系统论述了越橘花色苷的结构、组分、理化性质、生理功能、提取等方面研究成果,阐述了其研究和产业化开发方面存在的问题及越橘花色苷在人体保健应用方面的发展前景。

关键词:越橘 花色苷 理化性质 制备

Properties and preparation technology of anthocyanins from bilberry

LV Chun-mao^{1,2}, WANG Xin-xian², DONG Wen-xuan^{1,*}, WANG Bo², ZHAN Meng-jiao²

(1. College of Gardening, Shenyang Agriculture University, Shenyang 110866, China;

2. College of Food Science and Technology, Shenyang Agriculture University, Shenyang 110866, China)

Abstract: Anthocyanins is one of the important function natural pigments in plants. The structure, physicochemical properties, physiological functions, extraction technology and identification of bilberry anthocyanins were described. The problems and prospects in research and application of this pigment were discussed.

Key words: bilberry; anthocyanins; physicochemical property; preparation

中图分类号: TS255.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2011)05-0428-04

越橘(Bilberry), 又称蓝莓、蓝浆果, 属于杜鹃花科(*Ericaceae*) 越橘属(*Vaccinium*.SPP) 植物。全世界越橘属植物共约有 450 个种, 分布于我国的有 32 种。越橘果实果味甜酸适度, 风味独特, 除此之外, 它的果实内部还含有丰富的营养物质, 特别是对人体有很好的保健功能的多酚类物质—花色苷含量丰富。研究发现, 越橘是花色苷含量最丰富的水果, 其中所含的花色苷具有促进视红素再合成、抗炎症、提高免疫力、延缓衰老、抗癌等多种生理活性功能^[1-3]。国内外对越橘花色苷在诸如清除自由基、抗癌等生理功能已有多方面报道^[4-5]。正是由于它具备的这些功效, 使得近年来越橘的消费市场逐年扩大, 被称为继苹果和柑桔之后的“世界第三代水果”。

1 越橘花色苷的结构和含量

1.1 花色苷的结构

花青素属于类黄酮类化合物, 其基本结构母核是 2-苯基苯并呋喃, 自然条件下游离状态的花青素极少见, 常通过糖苷键形成花色苷(Anthocyanin)。与花青素成苷的糖主要有葡萄糖、半乳糖、阿拉伯

糖、木糖、鼠李糖和由这些单糖构成的均匀或不均匀二糖和三糖, 其成苷的连接位点主要在化合物的 3 位、5 位和 7 位上, 由于 A 环和 B 环各碳位上的取代基不同(羟基或甲氧基), 形成了各种各样的花色苷。目前已知的有 20 多种, 但在食品中重要的仅 6 种, 分别是天竺葵色素(pelargonidin)、矢车菊色素(cyanidin)、飞燕草色素(delphinidin)、芍药色素(peonidin)、牵牛花色素(petunidin)和锦葵色素(malvidin)^[6]。

1.2 越橘花色苷的含量

越橘果实中含有丰富的花色苷等多酚类物质, 野生品种花色苷含量可达 0.33~3.38g/kg, 栽培品种 0.07~0.15g/kg。近些年来国内对越橘花色苷含量的测定已有很多相关研究。杨桂霞等^[7]采用溶剂萃取法和经典柱层析手段相结合对笃斯越橘果实进行了花色苷的分离, 并利用高效液相色谱法测定了十六个栽培品种越橘果实中花色苷的含量, 结果表明, 十六个品种中的花色苷总量平均达到 300mg/100g 鲜果, 但是不同品种间有很大的差别, 在芝妮中总花色苷含量达到 454mg/100g 鲜果, 而在 Bluejay 中只有 191.02mg/100g 鲜果。

2 越橘花色苷的理化性质

2.1 光谱特性

越橘花色苷是一种水溶性色素, 其最大吸收波

收稿日期: 2010-05-19 * 通讯联系人

作者简介: 吕春茂(1970-) 男, 副教授, 研究方向: 食品生物技术。

基金项目: 沈阳市青年人才基金计划项目(1081240-1-02)。

长一个在可见光区的 500~540nm 附近,另一个在紫外 275nm 附近。酸碱度对花青素的光谱特性影响很大,在不同的介质中呈现不同的光谱特性,只在酸性条件下 $\lambda = 530\text{nm}$ 左右处出现特征吸收峰。随着 pH 升高,花青素的吸收峰向长波方向移动,当 pH 为 11 时,吸收峰反而向 400nm 方向移动,说明介质 pH 对其吸收峰位有影响,只要 pH 不变,其特征吸收峰也不变^[8]。

2.2 pH 及金属离子的影响

一般来说,花色苷颜色随 pH 的不同而改变,在酸性条件下显色较好,呈红色,在中性、近中性条件下呈无色^[9-10]。金属离子为另一个对其有重要影响的因素,李颖畅、孟宪军等^[11]系统研究了金属离子和食品添加剂对越橘花色苷稳定性的影响。结果表明, Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Al^{3+} 具有增色作用,对花色苷的稳定性无显著影响;高浓度 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 具有增色作用,而且能够增强花色苷的稳定性; Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Pb^{2+} 对花色苷具有破坏作用,使花色苷的稳定性下降,含 Fe^{3+} 、 Pb^{2+} 的花色苷溶液中有沉淀生成;苯甲酸钠对越橘花色苷稳定性良好。

2.3 抗氧化还原性

具有抗氧化性和还原能力是花色苷最重要的性质之一。国外有专家研究发现:越橘是花色苷含量最丰富的水果,其中所含的花色苷具有很强的生物活性,在抗氧化、抗癌及抗肿瘤等方面具备特别功效,在清除 O_2^- 、自由基、DPPH 自由基、抗小鼠微粒体膜脂氧化等方面能力优越^[12]。李颖畅等^[13]采用 4 种体外实验模型对越橘花色苷体外抗氧化性实验表明:越橘花色苷具有抗脂质体过氧化能力,还原能力和清除羟基自由基、超氧阴离子自由基能力。越橘花色苷抗脂质体过氧化能力强于抗坏血酸,还原能力和清除超氧阴离子自由基能力不如抗坏血酸,低浓度时,花色苷清除羟基自由基和抗坏血酸接近,高浓度时强于抗坏血酸。

3 越橘花青素的提取工艺

提取是分离、纯化和利用花色苷的主要环节。花色苷提取方法是近年来花色苷研究领域较为活跃的一个方面,有关的研究报道较多,一些新的提取方法如酶法、超声波法、高压脉冲辅助提取法等都得到了应用。

3.1 溶剂萃取法

冷浸法由于方法简便,设备简单,操作简单快速,提取率较好,适于工业化生产而具有研究优势。目前,通常采用的是水提法和酸化乙醇法提取花色苷。其中酸化乙醇法应用较普遍,而水提法由于存在提取时间较长、提取不完全、提取物杂质较多等缺点而较少应用。徐美玲、赵德卿^[14]以越橘鲜果为原料采用乙醇浸提法提取花色苷,确定的最佳提取条件为 pH3.5、浸提温度 50°C 、浸提 60min,浸提剂乙醇浓度为 50%,提取 1 次,该条件下提取率为 5.8%。张兴茂等^[15]以吉林省长白山野生笃斯越橘果实冻干粉为研究对象,对比分析了料液比、浸提温度、浸提时间、浸提次数等工艺参数对花色苷浸提率影响情

况,优化出最佳浸提工艺参数为:浸提溶剂 60% 乙醇,浸提温度 60°C ,料液比 1:50,浸提时间 80min,浸提两次,花色苷得率 9.40%。

3.2 酶法提取

花色苷由于存在于细胞内或吸附在由纤维素组成的细胞壁上,常规方法提取花色苷很难获得较高的提取率。纤维素酶、果胶酶可以对纤维素和果胶进行降解,使细胞壁破坏,花色苷色素可得到充分释放。向道丽^[16]比较了纤维素酶法和传统提取工艺对越橘果渣中的花色苷提取的不同,确定了酶解的最优条件 50°C ,酶解液初始 pH 为 4.5,酶解时间为 3h,酶用量为 5.0mg/g ,固液比为 1:4,并且在一定条件下酶法提取工艺比传统乙醇浸提越橘果渣花色苷色价提高了 30%。李颖畅、孟宪军^[17]用纤维素酶、果胶酶及二者复合对越橘果中花色苷进行了提取,发现纤维素酶提取效果较好,用纤维素酶研究了酶用量、料液比、酶解时间、pH、酶解温度对花色苷提取的影响,确定最佳提取工艺参数为:酶用量 5mg/g ,料液比 1:8, pH5.0,提取时间 60min,酶解温度 45°C ,提取 2 次,越橘果中花色苷含量约为 $350\text{mg}/100\text{g}$ 鲜果。

3.3 超声波法提取

超声波是一种频率范围在 15~60kHz 的高频机械波,超声波法提取主要是应用它的空化作用、热效应、机械作用强化了胞内物质的释放、扩散和溶解,极大地提高了越橘花色苷的提取效率。佟琳琳等^[18]利用超声波辅助提取法提取越橘果实花色苷,初步确立了超声波法提取越橘果实花色苷的条件:酸化乙醇浓度 45%,温度 45°C ,提取时间 30min,提取次数 3 次。王振宇等^[19]研究了大花葵中花色苷的提取工艺,比较了水提法、超声波法、酶提法和超声波-酶法联用提取花色苷的提取效果,发现酶提法与超声波提取法联用的花色苷提取效果最佳,酶解-超声波联用法的提取率要比单独酶解法要高出 60%,比水提法高 72.9%,比超声波法高 65.9%。

3.4 高压脉冲辅助提取

细胞膜的受损程度是影响提取效果的一个重要因素,细胞膜受损程度越大越有利于细胞内的物质向细胞外转移,而使细胞内物质尽快地进入提取介质。高压脉冲辅助提取 (PEF) 可以对细胞膜产生不可逆的损伤,使其可应用于动植物细胞内有效成分的提取。张燕^[20]对 PEF 提取树莓中的花色苷色素做了较为系统的研究,发现高压脉冲辅助提取法与热溶剂、微波和超声波提取方法相比较,提取物的总花色苷和总酚含量显著高于其它三种提取法。

3.5 花色苷提取的发展趋势

传统的水醇提取法尽管应用普遍,但仍有提高潜力,而超声波提取、微波辅助提取、超临界 CO_2 提取、酶法辅助提取等方法目前在生产中应用还不广泛,但相信随着这些技术的成熟,多种提取方法的联合使用将是一种发展趋势^[21]。

4 越橘花色苷的纯化和精制

花色苷 (Anthocyanin) 属黄酮多酚类化合物,由于结构和存在的状态不同,其溶解度存在很大差异。

一般游离苷元难溶于水,易溶于甲醇、乙醇、乙酸乙酯、乙醚等有机溶剂及稀碱液中。因而,使得花色苷的提纯有很大的困难。目前对花色苷类化合物纯化的方法主要有大孔树脂吸附精制法、超滤法及高速逆流色谱法,其中大孔树脂吸附精制法以效率高、质量稳定、成本低且操作简单易行等特点而成为当前分离纯化天然化合物的主要方法^[22],高效逆流色谱、膜分离技术、凝胶层析等技术在花色苷类物质的提纯中也有应用。

4.1 大孔树脂纯化

大孔吸附树脂是一种具有多孔立体结构人工合成的聚合物吸附剂,在实际应用中对一些与其骨架结构相近的分子如芳香族环状化合物尤其具有很强的吸附能力。目前,很多花色苷都采取大孔吸附树脂来进行纯化,一般来说:经过大孔树脂的纯化,花色苷浓度可以提高10~20倍^[23]。

李明瑾等^[24]以长白山笃斯越橘花色苷粗提液为实验材料,以吸附和解吸效果为衡量指标,对比分析了五种不同型号树脂(NKA-2、D3502、NKA9、HPD-500、AB-8)分离纯化笃斯越橘花色苷,筛选出AB-8树脂最适合应用于笃斯越橘花色苷的分离纯化。并通过实验研究确定最优吸附和洗脱条件为:环境温度30℃、pH6、乙醇浓度为60%。李颖畅、郑凤娥、孟宪军^[25]比较了10种大孔树脂(AB-8、X-5、S-8、HPD-100、HPD-300、HPD-450、HPD-600、HPD-700、DA-201、DM-301)对越橘花色苷的吸附和解吸效果,研究了AB-8型大孔树脂对越橘花色苷的吸附与解吸条件。结果表明:AB-8型大孔树脂是纯化越橘花色苷效果较好的树脂;越橘花色苷在AB-8型树脂上的吸附平衡时间为4h,解吸平衡时间为2h,吸附的最适质量浓度为750mg/L;30℃,pH3.0时吸附能力比较强,解吸时宜选用体积分数60%乙醇溶液。该工艺生产的花色苷产品为紫黑色粉末,色价为54.10,回收率为88.20%。相关的研究还有董怡等^[26]通过对笃斯越橘花色苷进行RP-HPLC分析,首先得到花色苷提取率随盐酸浓度变化的规律,并得出盐酸-乙醇法提取花青素的最佳盐酸浓度为1.5mol/L。接下来分别采用AB-8大孔树脂、聚酰胺树脂及AB-8大孔树脂与聚酰胺树脂联用对提取液进行了初步纯化,得到了4种纯化花色苷样品,经过RP-HPLC法检测分析获得了4种纯化样品的花色苷的纯度分别为13.36397%、36.95687%、13.21466%、8.559135%,可知采用聚酰胺树脂对笃斯越橘花色苷的纯化效果明显优于AB-8树脂,纯度可提高23.5%。

大孔吸附树脂目前广泛应用于制药及天然植物中活性成分的精制纯化工作,已经在花色苷色素的纯化中得到了一定的应用,生产出的产品纯度完全符合欧洲标准。随着纯化技术的不断完善,工业化生产应用于花色苷的纯化将更加广泛。

4.2 越橘花色苷组分分析及其鉴定

关于花色苷素的分析方法目前用得较多的是紫外分光光度计法和HPLC法,其中紫外分光光度计法

多用于含量的测定,而HPLC法多用于单一成分结构的鉴定。孙视等^[27]从兔眼蓝浆果中检测到17种花色苷;吴信子等^[28]利用UV-VIS、IR、H-NMR和HPLC等现代手段,对从蓝靛果中分离出的纯花色苷色素(矢车菊色素)的结构进行了鉴定。刘翠等^[29]采用反相高效液相色谱法和电喷雾质谱法对中国野生笃斯越橘中花色苷组分进行分析和鉴定,得到花色苷的单体、二聚体、三聚体和四聚体,通过分析比较发现我国野生笃斯越橘中含有丰富的花色苷色素,低聚体是其中的主要成分。

5 问题与展望

花色苷类色素作为一种天然水溶性食用色素,因其色泽鲜艳自然、安全、无毒,且具有一定营养和保健功效,在食品、化妆品、医药方面已显示出巨大应用潜力。目前欧美日等国越橘产业发展方兴未艾,栽培面积达到12万hm²,在花色苷提取分离及应用方面有了很大的发展,他们规定了只有花色苷色素含量≥24%的提取物才可用在食品、药品及化妆品中,而实际的含量达到了36%。现在美日把越橘提取物做成锭剂、胶囊和颗粒等保健食品,北欧一些国家把野生越橘制成药品,用于眼科和改善血液循环,且很多药品都已商品化;我国越橘产业近几年迅猛发展,全国各省均有分布,至2004年,东三省及山东发展300hm²,年产300t,产品80%出口日本,现已有果酱、果汁、果酒和果茶等初加工产品,获得了一定的经济和社会效益,但由于起步晚,规模小,我国越橘资源远未得到有效利用,尤其大兴安岭及长白山地区的野生越橘资源,高附加值产品少。越橘花色苷等多酚类物质提取分离也停留在基础研究阶段及分离纯化阶段,因此从开发利用越橘多酚等物质资源的角度出发,很有必要对其提取工艺、生理活性、产品形态和功能机制等进一步研究。合理开发花色苷的功能性食品,加强原料的综合利用,以满足我国不同人群对功能性食品的要求是一项具有广阔发展前景和深远意义的工作。随着花色苷色素类添加剂在食品、医药等领域的应用日益广泛,以及提取和纯化技术的发展成熟,我国的花色苷色素提取和纯化均将会有很好的发展和应用^[30]。

参考文献

- [1] 卢艳花, 邹彦平, 秦会玲, 等. 欧洲越桔和笃斯越桔体外抗氧化活性比较[J]. 中草药, 2004, 35(6): 674-679.
- [2] 凌关庭. 可供开发食品添加剂(IX): 蓝莓提取物及其抗氧化作用[J]. 粮食与油脂, 2003(6): 45-48.
- [3] 孙志健, 张燕, 陈芳, 等. 对蓝莓产业化发展的思考[J]. 食品工业科技, 2005, 26(12): 183-184.
- [4] Mazza G, Kay D, Tony Cotterll, et al. Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects [J]. J Agric Food Chem, 2002, 50(10): 7731-7737.
- [5] Weiguang Y, Casimir C Akoh, Joan Fischer, et al. Effects of phenolic compounds in blueberries and muscadine grapes on HepG2 cell viability and apoptosis [J]. Food Research

International 2006 39(5): 628-638.

- [6] 赵云荣, 王世富. 植物花青素研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36(8): 3095-3097.
- [7] 杨桂霞, 吴毅男. 笃斯越橘花色素的分离鉴定及栽培种花色素的定量分析 [D]. 吉林农业大学, 2004.
- [8] 陆国权, 唐忠厚. 花青素特征及其制备技术研究进展 [C]. 成都: 全国甘薯育种与产业化学术研讨会, 2005: 267-271.
- [9] Markakis. Anthocyanins as Food colors [M]. New York, 1982a: 1-40.
- [10] 任玉林, 李华, 郝贵德, 等. 天然食用色素花色苷 [J]. 食品科学, 1995, 16(7): 22-27.
- [11] 李颖畅, 孟宪军, 周艳, 等. 金属离子和食品添加剂对蓝莓花色苷稳定性的影响 [J]. 食品科学, 2009, 30(9): 80-84.
- [12] 陶欣艺, 卢艳花, 周文瑜, 等. 欧洲越桔和笃斯越桔对神经细胞氧化损伤的保护作用 [J]. 中国临床康复, 2005, 33: 50-52.
- [13] 李颖畅, 孟宪军. 蓝莓花色苷抗氧化活性的研究 [J]. 研究报告, 2007, 33(9): 61-64.
- [14] 徐美玲, 赵德卿. 蓝莓花青素的提取及理化性质的研究 [J]. 添加剂, 2008, 29(9): 187-189.
- [15] 张兴茂, 林松毅, 刘静波, 等. 长白山笃斯越橘果实原花青素浸提工艺的研究 [J]. 食品科学, 2007, 28(11): 186-189.
- [16] 向道丽. 酶法提取越橘果渣花色苷酶解条件的研究 [J]. 中国林副特产, 2005, 12(6): 1-3.
- [17] 李颖畅, 孟宪军. 酶法提取蓝莓果中花色苷的研究 [J]. 食品工业科技, 2008, 29(4): 215-218.
- [18] 佟琳琳, 李亚东. 越橘果实花色苷的动态分析和提取工艺研究 [D]. 硕士学位论文, 吉林农业大学, 2006.
- [19] 王振宇, 杨谦. 酶法制备花色苷的研究 [J]. 中国甜菜糖

业, 2004, 12(4): 26-29.

- [20] 张燕. 高压脉冲电场技术辅助提取树莓花青素研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2007.
- [21] 吴克伟, 马越, 赵晓燕, 等. 花青素类色素提取纯化研究现状及发展趋势 [J]. 中国食品添加剂, 2008, (z1): 147-150.
- [22] 钱竹, 徐鹏, 章克昌, 等. 大孔树脂分离提取发酵液中灵芝三萜类物质 [J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(6): 111-114, 126.
- [23] 吴克伟, 马越, 赵晓燕, 等. 花青素类色素提取纯化研究现状及发展趋势 [C]. 上海: 第十二届中国国际食品添加剂和配料展览会暨第十八届全国食品添加剂生产应用技术展示会 (FIC2008) 学术报告会, 2008: 147-150.
- [24] 李明瑾, 林松毅, 王二雷, 等. 笃斯越橘花青素的分离纯化研究 [J]. 食品科学, 2007, 28(11): 139-141.
- [25] 李颖畅, 郑凤娥, 孟宪军. 大孔树脂纯化蓝莓果中花色苷的研究 [J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(4): 496-500.
- [26] 董怡, 林松毅, 刘艳丰, 等. RP-HPLC 法优化笃斯越橘花青素提取、纯化技术研究 [J]. 食品科学, 2008, 29(10): 349-352.
- [27] 孙视, 於虹, 赵友谊, 等. 兔眼蓝浆果花青素 HPLC 分析 [J]. 植物资源与环境学报, 2001, 10(4): 59-60.
- [28] 吴信子, 朴京一, 张小勇, 等. 蓝靛果花青素的分离与鉴定 [J]. 延边大学学报, 2001, 27(3): 191-194.
- [29] 刘翠. 中国野生笃斯越橘花青素的提取分离、组分分析及抗氧化活性的研究 [D]. 中国海洋大学, 2009.
- [30] 刘岱琳, 於洪建, 刘丹, 等. 花色苷在健康食品中的应用 [C]. 营养强化剂和功能性食品配料国际研讨会暨协会营养强化剂及特种营养食品专业委员会年年会论文集, 2006: 15-20.

(上接第 427 页)

- 压肽的研究 [J]. 食品科学, 2003, 24(10): 210-211.
- [23] 张国胜. 大豆蛋白抗高压活性肽的研究 [J]. 乳品工业, 2004, 32(8): 12-14.
- [24] M Kohmuru, N Nio, K Kubo, et al. Inhibition of angiotensin converting enzyme by synthetic peptides of human β -Casein [J]. Agric Biol Chem, 2002, 53(8): 2107-2114.
- [25] E Seki, K Osajima, H Matsufuji, et al. Angiotensin converting enzyme inhibitory activity of the short chain peptides derived from various food proteins [J]. Nippon Shokuhin Kagaku Haishi (In Japanese), 2006, 43(7): 839-840.
- [26] Y Kawamura. Food protein and antihypertensive peptides [J]. Farming Japan, 1997, 31(1): 14-19.
- [27] S Mihoshi, H Tanaka. Angiotensin I-converting enzyme inhibitor from Ficus Carica [J]. Agril Biol Chem, 1999, 53(10): 2763-2767.
- [28] Cheung HS, Wang FL, Ondetti MA, et al. Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin converting enzyme [J]. J Biol Chem, 2000, 275: 401-407.
- [29] Fujita H, Yokoyama K, Yoshikawa M. Classification and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides of derived from food protein [J]. J Dairy Sci, 2004, 77: 917-922.
- [30] Cushman DW, Cheung HS. Spectrophotometric assay and

- properties of the Angiotensin converting enzyme of rabbit lung [J]. Biochem Pharmacology, 1971, 20: 1637-1648.
- [31] Naoyuki Yamamoto, Atsuko Akino, et al. Antihypertensive effects of different kinds of fermented milk in spontaneously hypertensive rats [J]. Biosci Biotech Biochem, 1994, 58(4): 776-778.
- [32] Saito Y, Wanezaki K, Kawato A, et al. Structure and activity of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from sake and sake lees [J]. Biosci Biochem, 1994, 58: 1767-71.
- [33] CHEN Jiun-rong, TAKASHI, OKADA, et al. Identification of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from the peptic digest of soybean protein [J]. Journal of Food Biochemistry, 2008(2): 543-554.
- [34] Hee-Guk Byun, et al. Purification and characterization of angiotensin I converting [J]. Process Biochemistry, 2007, 36: 1115-1162.
- [35] Seki E, Osajima K, Matsuiji H, et al. Angiotensin converting enzyme inhibitory of the short chain peptides derived from various food proteins [J]. Nippon Shokuhin Kagaku Haishi, 2006, 43(7): 839-840.
- [36] M Kohmura, N Nio, K Kubo, et al. Inhibition of angiotensin converting enzyme by synthetic peptides of human β -Casein [J]. Agric Biol Chem, 2005, 53(8): 2107-2114.