

鲤鱼鱼鳞蛋白的酶解制备工艺及其抗氧化活性

李美娜, 黎德佳, 谢景, 李婷婷* (大连民族大学生命科学院, 辽宁大连 116600)

摘要 [目的] 确定鲤鱼鱼鳞蛋白的酶解制备工艺, 并分析所得的鱼鳞抗氧化肽的抗氧化性能。[方法] 以鲤鱼鱼鳞为原料, 选用胰蛋白酶考察其加酶量、反应温度、酶解时间、pH、底物浓度等因素对鱼鳞蛋白水解程度的影响, 用单因素及正交试验的方法优选出鱼鳞蛋白酶解的最佳条件并测定其抗氧化活性。[结果] 试验得到鲤鱼鱼鳞抗氧化肽酶法制备的最佳工艺条件为 pH 8.4、酶解温度 45 ℃、加酶量 4000 U/g、酶解时间 3 h、底物浓度 15%, 此条件下得到的鱼鳞抗氧化肽水解度较佳 (29.97%), 抗氧化能力较好。[结论] 胰蛋白酶有溶解鲤鱼鱼鳞蛋白的能力, 并且酶解产物的抗氧化活性与水解度有关。

关键词 鲤鱼鱼鳞; 酶解; 水解度; 抗氧化活性

中图分类号 S986; TS254 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)19-0086-04

Study on Enzymatic Hydrolysis Preparation and Antioxidant Activity of Protein from Carp Scales

LI Mei-na, LI De-jia, XIE Jing, LI Ting-ting* (College of Life Science, Dalian Nationalities University, Dalian, Liaoning 116600)

Abstract [Objective] To determine enzymatic hydrolysis preparation technique of protein from carp scales and study its antioxidant activity. [Method] With carp scale as material, using trypsin to study effects of enzyme dosage, temperature, time, pH, substrate concentration on hydrolysis degree of scale protein. Single factor and orthogonal test were adopted to select the optimum conditions of enzymatic of protein from carp scales and determine its antioxidant activity. [Result] Under the conditions of pH 8.4, temperature 45 ℃, enzyme dosage 4 000 U/g, time 3 h, substrate concentration 15%, the degree of hydrolysis and antioxidant activity were better. The degree of hydrolysis of trypsin reached 29.97%. [Conclusion] Trypsin had the ability to dissolve carp protein, and the antioxidant activity of hydrolysates was related to the degree of hydrolysis.

Key words Carp scales; Enzymatic hydrolysis; Degree of hydrolysis; Antioxidant activity

近十几年来,我国水产养殖业和水产品加工业蓬勃发展。据统计,2011年我国淡水鱼产量为2 343.66万t,2012年我国淡水鱼产量为2 497.71万t,2013年我国淡水鱼产量为2 635.08万t,其中有鳞鱼1 310万t以上,而我国每年大约可产生鱼鳞高达65万t,但除了少部分被加工成饲料外,大部分的鱼鳞都被抛弃浪费了^[1]。这不仅造成了资源了巨大浪费,同时也污染了环境。鱼鳞中含有丰富的蛋白质和多种矿物质,研究表明,鱼鳞具有延缓衰老、降低血清总胆固醇、促进血液循环和预防心脏病及高血压等功效^[2-3]。美国免疫学家证实,用鱼鳞提取物制成的抗癌药62 硫化鸟嘌呤治疗白血病,有效率达70%以上,其对胃、淋巴瘤也有较好的治疗效果^[4]。鱼鳞中的蛋白质含量高达70%,主要是胶原蛋白和鱼鳞硬蛋白,鱼鳞胶原蛋白中含有丰富的甘氨酸和脯氨酸,其水解产物含有大量的生理活性肽,在保健和美容方面具有很大的应用前景。胶原蛋白中含有大量的疏水性氨基酸,经酶解后,含疏水氨基酸的肽大量释放出来,参与到酶解产物的抗氧化过程中,使得其具有较强的抗氧化作用^[5-6]。

由于利用胰蛋白酶在此方面的研究较少,所以该研究旨在利用胰蛋白酶对鲤鱼鱼鳞进行酶解,以羟自由基清除率和水解度为指标,确定鲤鱼鱼鳞抗氧化肽酶法制备的最佳工艺条件,并对在此条件下制备的鱼鳞抗氧化肽进行分析,为以后鱼鳞的酶解和抗氧化性能的研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原料。鲤鱼鱼鳞购于当地水产市场,胰蛋白酶,酶活力250 000 U。

基金项目 大连民族大学大学生创新创业训练计划项目(XA201603097)。
作者简介 李美娜(1996—),女,蒙古族,内蒙古赤峰人,本科生,专业:食品科学。*通讯作者,副教授,博士,从事水产品贮藏加工研究。
收稿日期 2017-05-05

1.1.2 主要试剂。去离子水;0.4 mol/L 氢氧化钠溶液;0.2 mol/L 盐酸溶液;甲醛溶液;硫酸铜;硫酸钾;浓硫酸;混合指示剂;0.049 mol/L 的盐酸溶液;20 g/L 硼酸溶液;羟自由基清除能力测试盒,苏州科铭生物技术有限公司。

1.1.3 仪器设备。电子天平;可见分光光度计;离心机;pH计;烘箱;搅碎机;数显水浴锅;磁力搅拌器;电磁炉;凯氏定氮装置;通风橱;酶标仪。

1.2 方法

1.2.1 鲤鱼鱼鳞酶解制备工艺流程。鲤鱼鱼鳞→清洗、烘干→浸酸(0.2 mol/L, M/V = 1:20, 36 h)→清洗至中性→烘干→浸碱(0.4 mol/L, M/V = 1:15, 12 h)→清洗至中性→烘干→打碎→鱼鳞+水→沸水浴加热(100 ℃、15 min)→冷却→调节 pH (NaOH/HCl) →预热 30 min →加酶→恒温水解 4~9 h→灭酶(100 ℃、10 min)→冷却→离心(11 000 r/min, 15 min, 4 ℃)→取得上清液备用。

1.2.2 鱼鳞中总氨基态氮的测定。总氨基态氮含量的测定采用点位滴定法。取鱼鳞水解液 20 mL, 定容至 100 mL。取定容好的样品 20 mL 于 250 mL 烧杯中, 然后再加入 60 mL 水, 放到磁力搅拌器上持续搅拌, 用 0.05 mol/L NaOH 标准液将溶液 pH 滴定至 8.2, 再加入 10 mL 甲醛溶液, 待混匀后, 再用 0.05 mol/L NaOH 溶液继续滴定至 pH 9.2, 滴定所用 NaOH 溶液的量即为 V_1 , 可代入公式(1)计算。在滴定之前要用此法做试剂空白试验, 滴定所用 NaOH 溶液的量即为 V_2 , 可代入公式(1)中计算。

$$X = \frac{(V_1 - V_2) \times C \times \frac{14}{1000}}{5 \times \frac{V_3}{100}} \times 1000 \times 1000 \quad (1)$$

式中, X 为样品中总氨基氮含量(mg/L); V_1 为加入甲醛后样品稀释液消耗氢氧化钠的体积(mL); V_2 为试剂空白试验加

入甲醛后样品稀释液消耗氢氧化钠的体积 (mL); V_3 为样品稀释液的取用量 (mL); C 为氢氧化钠标准溶液的浓度 (mol/L)。

1.2.3 总氮含量的测定。总氮的含量测定采用 GB/T 5009.5—2003 蛋白质测定中的凯氏定氮法。

1.2.4 鱼鳞肽水解度 (DH) 的测定。以水解液中的氨基态氮与原料中的总氮的分数表示:

$$DH = \frac{\text{水解液中氨基态氮含量}}{\text{原料中总氮含量}} \times 100\%$$

水解度能够有效地反映出不同的蛋白酶在不同的条件下对鲤鱼鱼鳞水解程度的差异。

1.2.5 改良的羟自由基清除率的测定^[7]。选用羟自由基清除能力测试盒进行测定。羟自由基清除率的计算见公式(2):

$$D = \frac{(A_2 - A_1)}{(A_3 - A_1)} \times 100\% \quad (2)$$

表 1 胰蛋白酶酶解正交试验因素水平设计

Table 1 Factors and levels of orthogonal test for trypsin hydrolysis

| 水平 Level | 因素 Factor | | | | |
|-------------|-----------|---------------------------------------|------------------------------|-------------------------------|---------------------------------------|
| | pH(A) | 酶解温度(B) Hydrolysis temperature//°C | 加酶量(C) Enzyme dosage//U/g | 酶解时间(D) Hydrolysis time//h | 底物浓度(E) Substrate concentration//% |
| 1 | 8.0 | 40 | 4 000 | 5 | 5 |
| 2 | 8.1 | 45 | 5 000 | 4 | 10 |
| 3 | 8.4 | 50 | 8 000 | 3 | 15 |

2 结果与分析

2.1 胰蛋白酶水解鲤鱼鱼鳞各因素对水解度的影响

2.1.1 pH 对胰蛋白酶水解度的影响。已知胰蛋白酶的最适 pH 在 7.8~8.5, 所以便在此范围内对胰蛋白酶进行进一步研究。在酶添加量 5 000 U/g、底物浓度 15%、酶解温度 50 °C、酶解时间 5 h, 不同 pH 下水解度的变化曲线见图 1。由图 1 可得出, 水解度在 pH 为 7.8~8.0 的范围内逐渐增大, pH 在 8.0 后逐渐减小, 而在 pH 8.2 后又处于增加的状态, 在 pH 为 8.4 时出现第 2 个峰。其中 pH 为 8.0、8.1、8.4 的水解度较大, 所以选择这 3 个条件做接下来的正交试验。

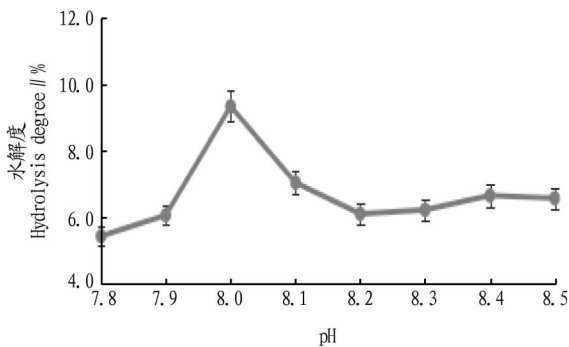


图 1 pH 对胰蛋白酶水解度的影响

Fig. 1 Effect of pH on trypsin hydrolysis degree

2.1.2 酶添加量对胰蛋白酶水解度的影响。在底物浓度 15%、酶解时间 5 h、pH 8.0、酶解温度 50 °C、不同酶添加量下水解度的变化曲线见图 2。由图 2 可得出, 水解度先随加酶量的增多而增大, 酶添加量在 4 000 U/g 后处于逐渐减小的趋势, 而在酶添加量为 8 000 U/g 的时候出现了显著地增大。其中酶添加量为 4 000、5 000、8 000 U/g 的水解效果较好, 所

式中, A_1 为标准管的吸光值; A_2 为测定管的吸光值; A_3 为空白管的吸光值。

1.2.6 胰蛋白酶酶解条件的确定。单因素试验: 每次取 10 g 鱼鳞, 在用胰蛋白酶酶解鱼鳞的过程中分别考察不同影响因素对鱼鳞水解度的影响。影响鱼鳞蛋白水解度的条件主要包括水解的 pH、酶的添加量、水解温度、底物浓度和水解时间。通过变量分析的方法, 从而确定各个因素对鱼鳞蛋白水解程度的影响及其最适范围, 为接下来的正交试验做准备。

正交试验: 在单因素试验的基础上, 选定了 pH(A)、水解温度(B)、酶添加量(C)、酶解时间(D)和底物浓度(E)各因素的 3 个水平(从单因素最适条件中选择), 分别以水解度和羟自由基清除率为指标, 设计了 $L_{18}(3^5)$ 的正交试验并确定各因素的最佳条件。胰蛋白酶的正交试验设计见表 1。

以选用这 3 个条件做接下来的正交试验。

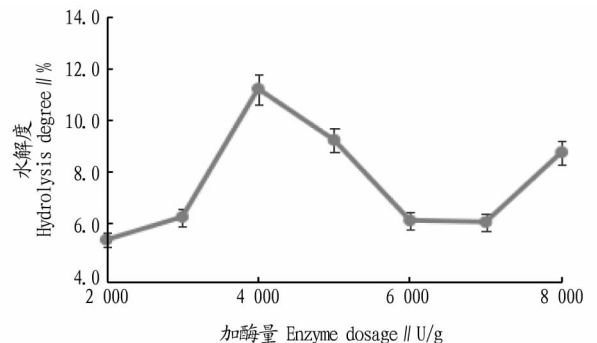


图 2 酶添加量对胰蛋白酶水解度的影响

Fig. 2 Effect of enzyme dosage on trypsin hydrolysis degree

2.1.3 酶解温度对胰蛋白酶水解度的影响。在底物浓度 15%、酶解时间 5 h、pH 8.0、酶添加量 4 000 U/g、不同酶解温度下水解度的变化曲线见图 3。由图 3 可得出, 水解度在酶解温度为 35~40 °C 时增加幅度较大, 而酶解温度在 40 °C 时, 随温度的升高水解度逐渐较低。其中酶解温度为 40、45、50 °C 时的水解效果较好, 所以选用这 3 个条件做接下来的正交试验。

2.1.4 底物浓度对胰蛋白酶水解度的影响。在酶解温度 40 °C、酶解时间 5 h、pH 8.0、加酶量 4 000 U/g、不同底物浓度下的水解度变化曲线见图 4。由图 4 可得出, 不同底物浓度的水解度从大到小依次为 15%、10%、5%、20%、25%, 并且水解度先随底物浓度的增大而增大, 在底物浓度为 15% 以后逐渐减小。其中底物浓度为 15%、10%、5% 的水解度较大, 所以选择这 3 个条件做接下来的正交试验。

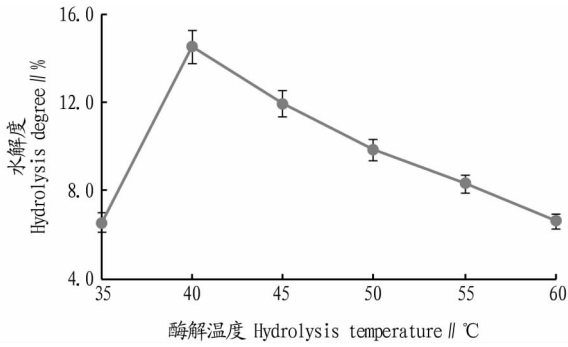


图3 酶解温度对胰蛋白酶水解度的影响

Fig.3 Effect of temperature on trypsin hydrolysis degree

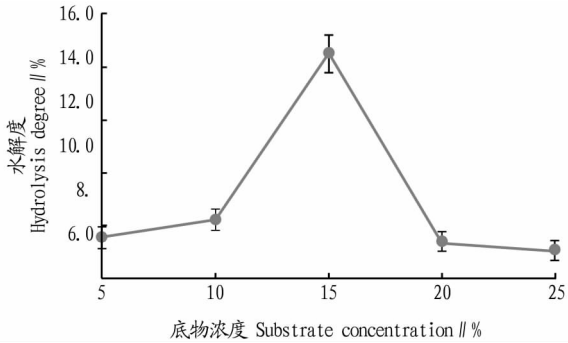


图4 底物浓度对胰蛋白酶水解度的影响

Fig.4 Effect of substrate concentration on hydrolysis degree of trypsin

2.1.5 酶解时间对胰蛋白酶水解度的影响。在酶解温度 40 °C、底物浓度 15%、pH 8.0、加酶量 4 000 U/g、不同酶解时间下水解度的变化曲线见图 5。由图 5 可得出,水解度在酶解时间为 5 h 时出现最高峰值,而其他几个时间段的水解度曲线较为平缓,变化较小。但其中酶解时间为 3、4、5 h 的水解较好,所以在接下来的正交试验中选用这 3 个条件。

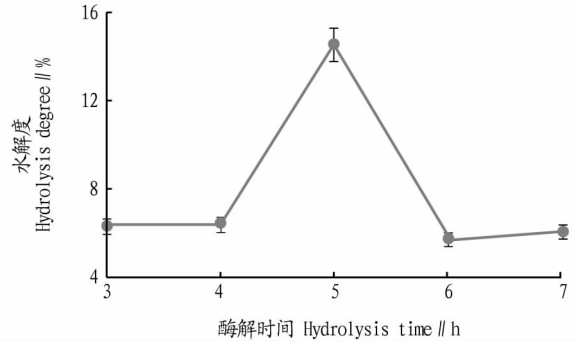


图5 酶解时间对胰蛋白酶水解度的影响

Fig.5 Effect of hydrolysis time on hydrolysis degree of trypsin

2.2 酶解条件的优化 在初步获得的单因素试验结果的基础上,从较优的水解条件中筛选出最好的水解条件,因此选择 pH、水解温度、加酶量、水解时间和底物浓度 5 个因素,设计 3 个水平的正交试验,胰蛋白酶的正交试验结果见表 2。

由表 2 数据可知,胰蛋白酶酶解鲤鱼鱼鳞的水解度最高可达 25.97%,证明胰蛋白酶对鲤鱼鱼鳞蛋白有着较好的水

表 2 胰蛋白酶酶解正交试验结果

Table 2 Orthogonal test of trypsin hydrolysis

| 试验号 Test No. | 因素 Factor | | | | | 水解度 Hydrolysis degree / % | 羟自由基清除率 Hydroxyl radical scavenging rate / % |
|-----------------|-----------|-------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|--|------------------------------|---|
| | pH (A) | 酶解温度 Hydrolysis temperature / °C | 加酶量 Enzyme dosage (C) // U/g | 酶解时间 (D) Hydrolysis time // h | 底物浓度 (E) Substrate concentration // % | | |
| 1 | 8.0 | 40 | 4 000 | 5 | 15 | 14.50 | 67.81 |
| 2 | 8.0 | 45 | 5 000 | 4 | 5 | 10.47 | 62.51 |
| 3 | 8.0 | 50 | 8 000 | 3 | 10 | 16.22 | 71.43 |
| 4 | 8.1 | 40 | 4 000 | 4 | 5 | 12.67 | 75.39 |
| 5 | 8.1 | 45 | 5 000 | 3 | 10 | 8.36 | 48.69 |
| 6 | 8.1 | 50 | 8 000 | 5 | 15 | 14.46 | 68.20 |
| 7 | 8.4 | 45 | 4 000 | 3 | 15 | 25.97 | 83.72 |
| 8 | 8.4 | 50 | 5 000 | 5 | 5 | 8.09 | 47.53 |
| 9 | 8.4 | 40 | 8 000 | 4 | 10 | 11.30 | 62.78 |
| 10 | 8.0 | 50 | 4 000 | 4 | 10 | 9.65 | 56.46 |
| 11 | 8.0 | 40 | 5 000 | 3 | 15 | 16.43 | 71.85 |
| 12 | 8.0 | 45 | 8 000 | 5 | 5 | 8.26 | 67.94 |
| 13 | 8.1 | 45 | 4 000 | 5 | 10 | 9.03 | 48.09 |
| 14 | 8.1 | 50 | 5 000 | 4 | 15 | 14.04 | 67.12 |
| 15 | 8.1 | 40 | 8 000 | 3 | 5 | 10.68 | 63.76 |
| 16 | 8.4 | 50 | 4 000 | 3 | 5 | 10.09 | 62.52 |
| 17 | 8.4 | 40 | 5 000 | 5 | 10 | 10.03 | 61.65 |
| 18 | 8.4 | 45 | 8 000 | 4 | 15 | 20.94 | 80.91 |
| K_{j1} | 0.129 | 0.129 | 0.145 | 0.111 | 0.186 | | |
| K_{j2} | 0.115 | 0.143 | 0.112 | 0.132 | 0.100 | | |
| K_{j3} | 0.149 | 0.121 | 0.136 | 0.151 | 0.108 | | |
| R_1 | 0.034 | 0.022 | 0.033 | 0.040 | 0.086 | | |
| K_{i1} | 0.672 | 0.664 | 0.668 | 0.614 | 0.774 | | |
| K_{i2} | 0.605 | 0.690 | 0.599 | 0.628 | 0.616 | | |
| K_{i3} | 0.699 | 0.622 | 0.708 | 0.687 | 0.585 | | |
| R_2 | 0.094 | 0.068 | 0.109 | 0.073 | 0.189 | | |

注:表中 K_j 、 R_1 分别为水解度的平均值和极差; K_i 、 R_2 分别为羟自由基清除率平均值和极差

Note: K_j 、 R_1 in the table are mean and range of hydrolysis degree; K_i 、 R_2 are mean and range of hydroxyl radical scavenging rate

解作用。原因可能在于,胰蛋白酶是一种消化酶,也是肽链内切酶,它能把多肽链中赖氨酸和精氨酸残基中的羧基侧切断。它不仅起消化酶的作用,而且还能限制分解糜蛋白酶原、羧肽酶原、磷脂酶原等其他酶的前体,起活化作用^[8]。胰蛋白酶还是特异性最强的蛋白酶,在决定蛋白质的氨基酸排列中,它也是不可缺少的工具。

表 2 中胰蛋白酶正交试验的水解度极差表明,影响胰蛋白酶酶解鲤鱼鱼鳞的因素大小顺序为底物浓度、时间、pH、加酶量、温度。正交试验较优组合为 $A_3B_2C_1D_3E_1$; 直观分析得出水解能力较优条件是 7 号试验组 ($A_3B_2C_1D_3E_3$), 即 pH 8.4、酶解温度 45 °C、加酶量 4 000 U/g、酶解时间 3 h、底物浓度 15% 的条件下胰蛋白酶酶解鲤鱼鱼鳞的酶解能力较好。

表 2 中胰蛋白酶正交试验的羟自由基清除率极差表明,影响胰蛋白酶酶解鲤鱼鱼鳞的因素大小顺序为底物浓度、加酶量、pH、时间 > 温度。正交试验得到的较优组合 $A_3B_2C_1D_3E_1$; 直观分析得出清除能力较优条件是 7 号试验组 ($A_3B_2C_1D_3E_3$), 即 pH 8.4、酶解温度 45 °C、加酶量 4 000 U/g、酶解时间 3 h、底物浓度 15% 的条件下胰蛋白酶酶解鲤鱼鱼鳞抗氧化能力较好。

综合考虑,最优组合为正交试验中的 7 号试验组。

3 结论

通过参照水解度和羟自由基清除率在鲤鱼鱼鳞酶解过程中的变化,最后得出了较佳的鲤鱼鱼鳞酶解工艺条件条件即 pH 8.4、酶解温度 45 °C、加酶量 4 000 U/g、酶解时间 3 h、底物浓度 15% 的条件下得到的鱼鳞肽抗氧化能力较好。通过试验数据表明,胰蛋白酶在酶解鲤鱼鱼鳞的过程中,其水解度与羟自由基清除率是呈正相关的关系。

该试验以胰蛋白酶为例,对鱼鳞的水解度进行研究。试

(上接第 85 页)

不挥发性组分转化为挥发性组分,如脂肪酸和类脂分解成脂肪烃,N-甲基烟酸内盐转化为含氮化合物,高萜分解为单萜等^[3],这赋予了焙炒咖啡特别的风味。

花生焙炒后产生的香味含有羰基化合物,特殊的香气成分有五吡嗪化合物和 N-甲基吡咯,其中 a-伴花生球蛋白为炒花生提供特殊的香味^[4]。花生含花生油 47%, 属不干性油,最难聚合,不影响风味咖啡的水色。

生豆含蛋白质 13% 左右,花生含蛋白质 27% 左右,因高热作用蛋白质结构发生变化,如肽键的水解、氨基键的变性和新共价异肽键的形成等,水解释放硫酸甲酯和甲基硫醇,香味较好^[5]。另外,蛋白质则产生焦糖化产物,在生豆表面形成一种芳香的咖啡油^[6]。同时,水分和碳水化合物则被蒸发掉。热解反应使生豆的有机化合物发生裂解,产生焦糖、挥发性酸、挥发性羰基和硫酸盐等化合物,在烘焙过程中形成了咖啡特有的芳香风味。

(2) 咖啡豆经过烘焙,热量使生豆发生化学变化,将生豆中的淀粉转变成糖和酸性物质。咖啡豆因烘焙程度不同,会

过程中,鱼鳞酶解液有较大的腥味,并且酶解液成品为黄色透明的液体。研究表明,胰蛋白酶酶解鲤鱼鱼鳞后得到的短肽有一定的抗氧化活性。由于胰蛋白酶在酶解鲤鱼鱼鳞的过程中水解度不是很高,所以可能导致其对鱼鳞蛋白的回收率较低,从而影响了胰蛋白酶应用的可行性,所以在此方面仍需进一步研究。

参考文献

- [1] 农业部渔业局. 中国渔业年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2007.
- [2] 许益民, 陈建伟, 郭成. 海马和海龙中磷脂成分与脂肪酸的分析研究[J]. 中国海洋药物, 1994(1): 14-18.
- [3] 刘庆慧, 王彩理, 刘从力. 鱼鳞提取物延缓衰老作用研究[J]. 海洋水产研究, 1999, 20(1): 75-79.
- [4] 杜海燕, 李春燕, 王慧, 等. 鱼鳞中羟基磷灰石的提取及其显微结构的研究[J]. 电子显微学报, 2001, 20(4): 457-458.
- [5] 蒋挺大, 张春萍. 胶原蛋白[M]. 北京: 化学工业出版社, 2001.
- [6] 涂宗财, 郑明, 陈钢, 等. 酶解鱼鳞蛋白制备抗氧化肽的研究[J]. 食品工业科技, 2009(7): 202-203.
- [7] 刘立明, 刘丽虹, 宋功武, 等. 分光光度法测定 Fenton 反应产生的羟自由基[J]. 湖北大学学报(自然科学版), 2002, 24(4): 326-328.
- [8] 陈日春. 鲑鱼鱼鳞胶原蛋白肽的制备及其抗氧化活性的研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2013.
- [9] 刘庆慧, 王采理, 张培新, 等. 鱼鳞酶解工艺的研究[J]. 海洋水产研究, 1998, 19(2): 202-206.
- [10] BERJAKUL S, MORRISSEY M T. Protein hydrolysates from pacific whitening solid wastes [J]. Agric Food Chem, 1997, 45(9): 342-3430.
- [11] 安然, 罗永康, 尤娟, 等. 草鱼鱼鳞蛋白酶解产物功能特性及其抗氧化活性[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(8): 76-80.
- [12] 廖伟, 夏光华, 李川, 等. 尖吻鲈鱼鳞和鱼皮胶原蛋白的提取及其理化分析[J/OL]. (2017-01-10)[2017-02-21]. <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20170111.1430.040.html>.
- [13] 宋芹, 颜军, 郭晓强, 等. 酶法制取罗非鱼鱼鳞胶原蛋白寡肽的工艺[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(4): 39-43.
- [14] 李振华, 龚吉军, 赵延华, 等. 抗氧化肽的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(6): 157-161.
- [15] 杜云建, 赵玉巧, 李念念. 酶解法制草鱼鱼鳞多肽及其清除羟自由基的研究[J]. 食品科学, 2010, 31(7): 168-172.

造成味道及香味上微妙的变化。不同深度的烘焙产生不同的酸苦, 烘焙程度越深, 咖啡的香味越浓。浅烘焙的咖啡豆, 呈浅茶色有很浓的气味, 很脆。中烘焙的咖啡豆有很浓的醇度, 同时还保留大部分的酸度。

4 结论

不同的配方在焙炒时略有不同, 其目的是使其风味更好, 但横向可比性会降低, 统一用一个评分表, 具有可比性。该研究表明, 配方 5 最佳, 咖啡香味浓郁, 口感平衡好, 酸味中等, 大众易接受, 口感香气和滋味较为丰富, 醇厚度较高。

参考文献

- [1] 鲍晓华. 风味咖啡的研制[J]. 农牧产品开发, 2001(5): 18-19.
- [2] UMESH K P, SARAF S, DIXI V K. Hypolipidemic activity of seeds *Cassia tora* Linn [J]. Journal of ethnopharmacology, 2004, 90(2/3): 249-252.
- [3] AU T S, YANG D J, ZHANG Y O, et al. Differential expression of lipid metabolism related genes in HepG2 cells treated with neoralactone [J]. Acta pharmaceutica sinica, 2003, 38(1): 62-66.
- [4] 周斌, 任洪涛, 夏凯国, 等. 云南小粒咖啡的香气成分分析[J]. 现代食品科技, 2013, 29(1): 186-188.
- [5] 张承志. 咖啡的香味[J]. 咖啡语茶, 2009(4): 111-116.
- [6] 蔡瑞玲, 韩英素, 赵晋府, 等. 焙炒条件对咖啡风味影响的研究[J]. 饮料工业, 2003, 6(6): 32-37.