(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102014649 B
(45)授权公告日 2014.06.25

(21)申请号 200980115505.X
(22)申请日 2009.03.12
(30)优先权数据
08155449.5 2008.04.30 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2010.10.29
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2009/052932 2009.03.12
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2009/132887 EN 2009.11.05
(73)专利权人 雀巢产品技术援助有限公司
地址 瑞士沃韦
(72)发明人 R·贝尔-赖利德 K·克雷亨比尔 C·卡万 T·W·拉布 N·佩奇
(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所 11247
代理人 黄革生 林柏楠
(51)Int.Cl.
A23F 5/02(2006.01)
A23F 5/16(2006.01)
A23F 5/40(2006.01)
A23L 1/30(2006.01)
A23L 1/305(2006.01)
A23C 11/00(2006.01)

(56)对比文件
CN 100999271 A,2007.07.18, 说明书第2页第11-14行.
GB 394621 ,1933.06.29, 全文.
CN 101147517 A,2008.03.26, 说明书第2页第13行至第4页第14行.
JP 特开2001-321116 A,2001.11.20, 全文.
US 2006/0257384 A1,2006.11.16, 全文.
WO 2008/028300 A1,2008.03.13, 全文.
EP 1726213 A1,2006.11.29, 全文.
EP 1872665 A1,2008.01.02, 全文.
M. Asther et al..Purification and characterization of a chlorogenic acid hydrolase from Aspergillus niger catalysing the hydrolysis of chlorogenic acid.《Journal of Biotechnology》.2005, 第115卷47-56.
D. COUTEAU ET AL..Isolation and characterization of human colonic bacteria able to hydrolyse chlorogenic acid.《Journal of Applied Microbiology》.2001, 第90卷873-881.
尉芹 等. 绿原酸及其提取分离方法评述.《中成药》.2001, 第23卷(第2期),135-138.

审查员 毕晓华

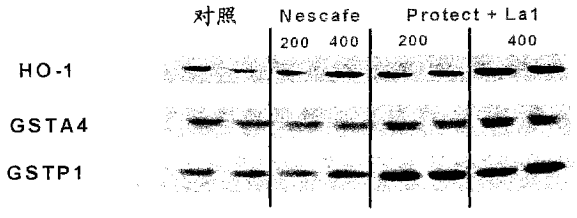
权利要求书1页 说明书14页 附图1页

(54)发明名称

用于制备包含水解绿原酸的咖啡饮料的组合物

(57)摘要

本发明涉及用于制备饮料的组合物,所述组合物包含能够将咖啡提取物的绿原酸水解成酚酸的微生物和/或酶。当消费用本发明的组合物制备的饮料时,与相似的常规饮料相比,存在于咖啡提取物中的绿原酸被水解从而改善了抗氧化和/或抗炎的性质。



CN 102014649 B

1. 一种饮料粉末，其包含：

a) 干燥的咖啡提取物；和

b) 能够水解咖啡酰奎尼酸和二酯而产生咖啡酸的微生物和 / 或酶，

所述饮料粉末被配制为使微生物和 / 或酶在储存期间不发酵咖啡提取物和 / 或其他成分，或不与咖啡提取物和 / 或其他成分反应。

2. 根据权利要求 1 所述的饮料粉末，其包含伴侣。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的饮料粉末，其包含甜味剂。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述的饮料粉末，其包含奶蛋白质和 / 或奶脂肪。

5. 根据权利要求 3 所述的饮料粉末，其包含奶蛋白质和 / 或奶脂肪。

6. 根据权利要求 1 或 2 所述的饮料粉末，其中能够水解咖啡酰奎尼酸和二酯而产生咖啡酸的微生物是乳酸菌。

7. 根据权利要求 3 所述的饮料粉末，其中能够水解咖啡酰奎尼酸和二酯而产生咖啡酸的微生物是乳酸菌。

8. 根据权利要求 4 所述的饮料粉末，其中能够水解咖啡酰奎尼酸和二酯而产生咖啡酸的微生物是乳酸菌。

9. 根据权利要求 5 所述的饮料粉末，其中能够水解咖啡酰奎尼酸和二酯而产生咖啡酸的微生物是乳酸菌。

10. 一种制备饮料的试剂盒，其包含至少两个部分：

a) 含有咖啡提取物的第一部分；和

b) 含有能够水解绿原酸而产生酚酸的微生物和 / 或酶的第二部分；

其中所述试剂盒被配制为使微生物和 / 或酶在储存期间不发酵咖啡提取物和 / 或其他成分，或不与咖啡提取物和 / 或其他成分反应。

11. 根据权利要求 10 所述的试剂盒，其中第一部分包含纯的可溶咖啡。

12. 根据权利要求 10 或 11 所述的试剂盒，其中第二部分包含奶蛋白质和 / 或植物蛋白质。

13. 根据权利要求 10 或 11 所述的试剂盒，其中第二部分包含伴侣和 / 或甜味剂。

14. 根据权利要求 12 所述的试剂盒，其中第二部分包含伴侣和 / 或甜味剂。

15. 根据权利要求 10 或 11 所述的试剂盒，其中能够水解绿原酸而产生酚酸的微生物是乳酸菌。

16. 根据权利要求 12 所述的试剂盒，其中能够水解绿原酸而产生酚酸的微生物是乳酸菌。

17. 根据权利要求 13 所述的试剂盒，其中能够水解绿原酸而产生酚酸的微生物是乳酸菌。

18. 根据权利要求 14 所述的试剂盒，其中能够水解绿原酸而产生酚酸的微生物是乳酸菌。

19. 根据权利要求 1-9 任一项所述的饮料粉末或根据权利要求 10-18 任一项所述的试剂盒用于增强消耗了由此制备的饮料的人或动物体内抗氧化能力的非治疗或预防用途。

用于制备包含水解绿原酸的咖啡饮料的组合物

发明领域

[0001] 本发明涉及制备饮料的组合物。所述组合物含有能够将咖啡提取物的绿原酸水解成酚酸的微生物和/或酶。用本发明的组合物制备的饮料具有改善的抗氧化和/或抗炎的性质。

[0002] 发明背景

[0003] 已经显示咖啡和咖啡活性化合物如咖啡因和二萜类(例如咖啡醇、咖啡白脂)诱导啮齿类动物的解毒酶(例如谷胱甘肽-S-转移酶GST)(CavinC. 等人1998. The coffee-specific diterpenes cafestol and kahweolprotect against aflatoxin B1-induced genotoxicity trough a dualmechanism.Carcinogenesis 19,1369-1375;Cavin,C. 等人,2003.Coffee diterpenes prevent benzo[a]pyrene genotoxicity in rat andhuman culture systems.Biochemical Biophysical ResearchCommunication 306,488-495;Huber,W. 等人.2002a.Enhancement of thechemoprotective enzymes glucuronyl transferase and glutathionetransferase in specific organs of the rat by the coffee componentskahweol and cafestol.Archive of Toxicology 76,209-217)。通过咖啡增加GST活性已经在消耗800ml的咖啡5天后的人中得到了证明(Steinkellner,H. 等人.2005.Coffee consumption induces GSTP inplasma and protects lymphocytes against(+/-)-anti-benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide inducedDNA-damage:results of controlled human intervention trials.Mut.Res.591264-275)。

[0004] 已知这类抗氧化活性通过减少破坏性自由基防御“氧化压力”,所述自由基可以涉及例如癌症、心脏病、退行性脑功能障碍和衰老。

[0005] 为了增加食品和饮料产品的健康益处,需要产生具有增加的抗氧化活性以及其它有益生物活性的产品。

[0006] 发明概述

[0007] 本发明人惊讶地发现用能够将绿原酸水解产生酚酸的微生物或酶处理咖啡提取物引起咖啡提取物抗氧化和/或抗炎性质的改善。另外发现当人或动物摄入与能够水解绿原酸产生酚酸的酶或微生物组合的咖啡提取物时,所述处理可以在体内发生。

[0008] 因此本发明涉及一种饮料粉末,其包含:a)干燥的咖啡提取物;b)能够将咖啡酰奎尼酸和二酯水解产生咖啡酸的微生物和/或酶。在另一个方面,本发明涉及一种制备饮料的试剂盒,其包括至少两个部分:a)包含咖啡提取物的第一部分;和b)包含能够水解绿原酸产生酚酸的微生物和/或酶的第二部分。在另一个方面,本发明涉及本发明的产品的用途。

[0009] 附图的简要说明

[0010] 图1:Western印迹凝胶显示用200和400ug/ml NESCAFE RED CUP®(烘烤咖啡豆的提取物)(未经处理水解绿原酸处理的),用200和400ug/mlNESCAFE PROTECT®(用约氏乳杆菌(Lactobacillus johnsonii)处理)处理的大鼠原代肝细胞,以及未经咖啡提取

物处理的对照样品中的 GST 亚基 (GSTA4、GSTP1) 和血红素加氧酶 1(HO-1) 的蛋白质表达。详见实施例 1。

[0011] 图 2 :Western 印迹显示雄性大鼠肝脏中解毒酶表达 (GSTP1 ;NQO1) 的诱导,所述大鼠用饮食中具有 5%的 NESCAFE RED CUP® (烘烤咖啡豆的提取物,未经处理水解绿原酸)(RN), NESCAFE PROTECT® (生的和烘烤的咖啡豆的共同提取物,未经处理水解绿原酸)(P) ;和 NESCAFE PROTECT® (用约氏乳杆菌处理)(La1-P) 喂食 2 周。详见实施例 1。

[0012] 发明详述

[0013] 需要与咖啡提取物混合而制备咖啡饮料的组合物在本领域中是熟知的,例如奶、奶油、咖啡增白剂 (whitener) 和咖啡伴侣 (creamer)。消费者使用这样的组合物从而改变例如咖啡的芳香、外观和质地。所述组合物可以是液体或干燥的形式,例如粉末,其可以溶于和 / 或悬浮于一杯咖啡中,例如一杯新煮的咖啡或一杯通过将纯的可溶咖啡溶解在水中制备的咖啡。

[0014] 在本发明的一个具体实施方案中,需要与咖啡提取物混合的组合物是咖啡伴侣或咖啡增白剂。伴侣可以例如基于奶蛋白质和 / 或奶脂肪,或其可以是基于植物蛋白质和 / 或植物脂肪的非乳制的伴侣。组合物可以是干燥的形式,例如粉末,其中水含量在例如 5% 以下。组合物还可以是液体的形式。

[0015] 需要与根据本发明的咖啡提取物混合的组合物包含能够水解绿原酸产生酚酸的微生物和 / 或酶。绿原酸是反式肉桂酸和奎尼酸形成的酯类家族。绿原酸主要作为奎尼酸和连接至不同位置的酚基团 (例如咖啡的、阿魏酸的、香豆的、甲氧基肉桂的) 的单酯和二酯天然存在于咖啡中。在本发明的一个具体实施方案中,微生物和 / 或酶能够水解咖啡酰奎尼酸和二酯 (例如 3-、4-、或 5- 咖啡酰奎尼酸和二酯) 和 / 或阿魏酰奎尼酸和二酯 (例如 3-、4-、或 5- 阿魏酰奎尼酸和二酯) 从而分别产生咖啡酸和阿魏酸。

[0016] 应该制备本发明的组合物以使微生物和 / 或酶在储存过程中不发酵组合物或不与组合物反应。这可以通过下列方式实现 :例如制备干燥粉末形式的组合物和 / 或包封微生物和 / 或酶,以使微生物和 / 或酶只在组合物与咖啡提取物混合时或在消化过程中被释放。

[0017] 本发明的组合物还可以包含任何适于包括在需要与咖啡提取物混合而制备饮料的组合物中的成分。通常的成分可以是例如糖、人工甜味剂、乳化剂、稳定剂、增稠剂、流动剂 (flowing agent)、色素、香料、香气等。合适的人工甜味剂包括糖精、环己氨基磺酸类 (cyclamate)、安赛蜜 (acetosulfame)、基于 L- 天冬氨酰的甜味剂如阿斯巴甜,和这些的混合物。合适的乳化剂包括单甘油酯、双甘油酯、卵磷脂、单 - 双甘油酯的二乙酰酒石酸酯、乳化淀粉和其混合物。合适的稳定剂包括磷酸氢二钾和柠檬酸钠。合适的流动剂是硅铝酸钠 (sodium silica aluminate)。在一个具体实施方案中,组合物包含奶蛋白质和 / 或植物蛋白质。在另一个具体实施方案中,组合物包含奶脂肪和 / 或植物脂肪。

[0018] 咖啡提取物

[0019] 根据本发明的咖啡提取物是通过水或蒸汽提取的生咖啡豆和 / 或烘烤咖啡豆的提取物。许多用于生产咖啡提取物的方法在本领域中是已知的,例如来自 EP 0916267。咖啡提取物可以是例如纯的可溶咖啡。纯的可溶咖啡产品是现成的,并且许多用于生产纯的可溶咖啡产品的方法在本领域中是已知的,例如来自 EP 106930。

[0020] 微生物

[0021] 能够水解绿原酸的微生物可以例如如本申请的实施例中公开的被鉴定。合适的微生物可以选自酵母、真菌或细菌。合适的微生物可以是例如曲霉;如例如米曲霉(Aspergillus oryzae)、乳杆菌(Lactobacillus),如例如约氏乳杆菌(CNCM I-1225)、双歧杆菌(Bifidobacterium),如例如乳双歧杆菌(CNCM I-3446)或酵母如例如酿酒酵母(Saccharomycescerevisiae)。

[0022] 酶

[0023] 合适的酶是例如酯酶例如源自日本曲霉(Aspergillus japonicus)的绿原酸酯酶(可以从Kikkoman,Japan商售获得)、源自米曲霉的鞣酸酶(EC 3.1.1.20)(可以从Kikkoman,Japan商售获得);和奶酪香精脂肪酶(Palatase 20000L)(EC 3.1.1.3,可以从Novozymes A/S,Denmark商售获得)。所述的酶可以以纯化的酶形式存在或例如以微生物的细胞裂解物的形式存在。合适的细胞可以是例如上述微生物的细胞。合适的用于生产细胞裂解物的方法在本领域中是已知的。

[0024] 微生物和/或酶应该以在消化过程中足以将大量的存在于咖啡提取物中的绿原酸水解成酚酸的量存在。所需微生物和/或酶的量可以通过例如测定在消化实验中水解的绿原酸的量在本文实施例3中所述的TIM消化模型中测定。优选至少20%,如至少30%,至少50%或至少75%的存在于咖啡提取物中的咖啡酰奎尼酸(CQA)和/或阿魏酰奎尼酸(FQA)被水解。

[0025] 各部分的试剂盒

[0026] 在一个具体实施方案中,本发明涉及用于制备饮料的试剂盒,其包括至少两个部分:a)包含咖啡提取物的第一部分;和b)包含能够水解绿原酸产生酚酸的微生物和/或酶的第二部分。所述两个部分被一起销售用于制备饮料,但是在产品的包装中是彼此分离的。需要消费的最终饮料是通过在消费前不久将两个部分混合而制备的。如果一个部分或两个部分是液体的形式,可以直接将其混合,可选地可以加入另外的液体例如水或奶。还可以通过将两个部分溶解或悬浮于液体中,例如水或奶中将其混合。当使用液体时,其可以是热的或冷的,取决于需要的是热的或是冷的饮料。如果使用热液体,可能优选具有不是很高不至于在摄入饮料前令微生物和/或酶失活的温度。

[0027] 试剂盒的第一部分包含咖啡提取物。在优选的具体实施方案中,第一部分是干燥的形式,例如粉末的形式。咖啡提取物可以是例如常规的纯可溶咖啡粉末,例如喷雾干燥的或冷冻干燥的咖啡提取物。纯的可溶咖啡粉末是现成的并且在本领域中有广泛的描述。第一部分还可以是液体的形式。液体咖啡提取物是现成的,例如现成可饮的咖啡饮料。第一部分可以另外包含任何其他合适的成分,例如菊苣提取物、香气添加剂、稳定剂、盐和/或甜味剂。第一部分可以以任何合适的方式包装,例如在封闭小袋中、瓶中或罐中。

[0028] 第二部分包含能够水解绿原酸产生酚酸的微生物和/或酶。所述部分优选可以是需要与本文所述的咖啡提取物混合的组合物的形式,优选是咖啡增白剂或咖啡伴侣的形式。其可以包含任何其他合适的成分,例如通常在咖啡伴侣或咖啡增白剂中发现的成分,如作为需要与咖啡提取物混合的组合物成分的本文提及的成分。其可以是干燥的形式,例如粉末,或液体的形式,并可以以任何合适的方式例如在封闭小袋中、瓶中或罐中包装。应该将其配制成:在储存的过程中微生物和/或酶不发酵其他成分或不与其他成分反应。这可

以通过以下方式实现：例如将组合物制成干燥粉末，和/或包封微生物和/或酶以使微生物和/或酶只在组合物与咖啡提取物混合物时或在消化过程中被释放。

[0029] 所述至少两个部分可以以任何合适的方式包装。可以例如将其包装在组合的容器中，其中在储存过程中所述部分保持彼此分离，当容器被打开时所述部分混合，或可以将其包装在分开的容器中，所述容器一起被销售用于制备饮料。

[0030] 饮料粉末

[0031] 在一个具体实施方案中，本发明涉及饮料粉末，其包含：a) 干燥的咖啡提取物；和 b) 能够水解绿原酸产生酚酸的微生物和/或酶。

[0032] 根据本发明的饮料粉末是需要用于通过将粉末溶于或悬浮于液体例如水或奶中制备饮料的粉末。需要从粉末制备的饮料可以是例如黑咖啡、拿铁咖啡、玛琪雅朵咖啡、卡布奇诺咖啡或任何其他基于咖啡的饮料。

[0033] 干燥的咖啡提取物可以是例如常规的纯可溶咖啡粉末，例如喷雾干燥的或冷冻干燥的咖啡提取物。纯的可溶咖啡粉末是现成的并在本领域中有广泛的描述。

[0034] 微生物和/或酶以干燥粉末的形式例如冷冻干燥的粉末形式存在。可以将微生物和/或酶包封。

[0035] 应该将饮料粉末制成：在存储过程中，微生物和/或酶不发酵咖啡提取物和/或其他成分，或不与咖啡提取物和/或其他成分反应。

[0036] 在本发明优选的具体实施方案中，饮料粉末包含需要与本文所述的干燥形式的咖啡提取物混合的组合物。在本发明更优选的具体实施方案中，饮料粉末包含伴侣。

[0037] 饮料粉末可以包含任何其他适于制备所需饮料的成分。合适的成分在本领域中是熟知的，并可以是例如糖、人工甜味剂、乳化剂、稳定剂、增稠剂、流动剂、色素、香料、香气等。合适的人工甜味剂包括糖精、环己氨基磺酸盐、基于 L-天冬氨酰的甜味剂如阿斯巴甜，及其混合物。合适的乳化剂包括单甘油酯、双甘油酯、卵磷脂、单-双甘油酯的二乙酰酒石酸酯 (da ta 酯)、乳化淀粉和其混合物。合适的稳定剂包括磷酸氢二钾和柠檬酸钠。合适的流动剂是硅铝酸钠。在一个具体实施方案中，饮料粉末包含奶蛋白质和/或植物蛋白质。在另一个具体实施方案中，饮料粉末包含奶脂肪或植物脂肪。在另一个具体实施方案中，饮料粉末包含甜味剂。

[0038] 本发明的产品的用途

[0039] 本发明的产品可以用于通过例如诱导解毒酶如谷胱甘肽-S-转移酶 (GST) 和通过增加 Nrf2 介导的基因表达途径，增强消费了由本发明产品制备的饮料的人或动物体内的抗氧化能力。已经报道与 Nrf2 活性增加相关的基因增强解毒并刺激对抗氧化应激的内源性防御。

[0040] 本发明的产品可以用于通过降低前列腺素 E2 水平减少炎症。

[0041] 许多健康问题和疾病都与氧化应激和炎症相关。本发明的产品可以用于治疗或预防消费了由本发明产品制备的饮料的人或动物中的这样的问题或疾病。相关的问题和疾病是例如皮肤病，例如 UV-辐射造成的光损伤、异位性皮炎、湿疹、刮治术、瘙痒、过敏症状、脑功能障碍、炎症、肥胖和癌症，例如皮肤癌和肺癌。

[0042] 本发明的产品还可以通过例如降低血糖水平和/或增高血中瘦蛋白 (leptin)、胰岛素和/或 c-肽的水平，用作抗糖尿病剂；通过例如增加骨矿物质密度，例如通过增高雌激

素和/或黄体酮和/或碱性磷酸酶活性的血清水平，作为骨重构剂；作为例如具有抗血管生成效应的抗转移剂。

实施例

[0043] 实施例 1

[0044] 用约氏乳杆菌新鲜细胞处理 NESCAFE **PROTECT®**

[0045] 使约氏乳杆菌 (CNCM I-1225) 的细胞生长 (7.0E08cfu/ml) 并将其离心 (5000g，10 分钟)，将沉淀以 0.61g/ml 的浓度重悬于磷酸盐缓冲液 (50mM，pH 7.0) 中。加入 30mg/ml 的 NESCAFE **PROTECT®** (干燥的生的和烘烤的咖啡豆的共同提取物)，将混合物在 37℃孵育。在不同的反应时间取出样品，离心 (3000g，5 分钟) 并通过 0.45μm 孔径的注射器过滤器 (Millipore SLHA 025BS) 过滤并用 HPLC 分析。

[0046] 在相同的反应条件下但是没有细菌，平行进行反应对照。

[0047] 用约氏乳杆菌提取物 (裂解的细胞) 处理 NESCAFE **PROTECT®**

[0048] 使约氏乳杆菌 (CNCM I-1225) 的细胞生长 (7.0E08cfu/ml) 并将其离心 (5000g，10 分钟)，将沉淀以 0.61g/ml 的浓度重悬于磷酸盐缓冲液 (50mM，pH 7.0) 中。然后使用玻璃珠法裂解细胞。将 600μl 的细胞制备物置于螺旋帽的管中并在 0℃加入 600μl 的玻璃珠。然后将管放入 Mini-Beadbeater 强烈震荡 1 分钟，在冰上冷却，并在 Mini-Beadbeater 中再放 1 分钟。然后将粗制细胞提取物加入 900μl 的 NESCAFE **PROTECT®** 溶液中 (30mg/ml，磷酸盐缓冲液 pH 7.0) 并在 37℃孵育混合物。在不同的反应时间取出样品，离心 (3000g，5 分钟)，通过 0.45μm 孔径的注射器过滤器 (Millipore SLHA 025BS) 过滤并用 HPLC 分析。

[0049] 用喷雾干燥的约氏乳杆菌制备物处理 NESCAFE **PROTECT®**

[0050] 将 30mg 的 NESCAFE **PROTECT®** 溶于 1ml 磷酸盐缓冲液 (50mM，pH 7.0) 中或 1ml 水中。向该溶液中加入 10mg 喷雾干燥的约氏乳杆菌制备物 (CNCMI-1225)(3.3E9cfu/g)。然后在 37℃孵育混合物，在不同的反应时间取出样品。离心 (3000g，5 分钟) 和过滤 (0.45μm 孔径的注射器过滤器，Millipore SLHA 025BS) 后，用 HPLC 分析样品。

[0051] 用喷雾干燥的约氏乳杆菌 (CNCM I-1225) 制备物处理生咖啡豆

[0052] 将 30mg 干燥的生咖啡豆提取物溶于 1ml 磷酸盐缓冲液 (50mM，pH7.0) 中或 1ml 水中。向该溶液中加入 10mg 喷雾干燥的约氏乳杆菌制备物 (3.3E9cfu/g)。然后在 37℃孵育混合物，在不同的反应时间取出样品。离心 (3000g，5 分钟) 和过滤 (0.45μm 孔径的注射器过滤器，Millipore SLHA 025BS) 后，用 HPLC 分析样品。

[0053] 用浓缩的约氏乳杆菌 (CNCM I-1225) 制备物处理 **NESCAFE®**

[0054] 将 400mg NESCAFE SPECIAL **FILTRE®** (干燥的烘烤咖啡豆的提取物) 溶于 1ml 的沸水中，将溶液在室温冷却至 37℃。向 250μl 的该咖啡溶液中加入不同量的浓缩的约氏乳杆菌制备物 (50μl，100μl，350μl，750μl)，并用水调整体积至 1ml。然后在 37℃将混合物孵育 2 小时和 4 小时。离心 (3000g，5 分钟) 和过滤后，用 HPLC 分析样品。

[0055] HPLC 分析

[0056] 将咖啡样品稀释至 1 % w/w 并在 CC 250/4Nucleosil 100 5-C18 柱 (Macherey-Nagel) 上用 RP-HPLC 分析。洗脱系统为 1mL/min 流速的 Millipore 水、0.1 % TFA 和 CH_3CN。该方法允许使用外部标准校准曲线同时测定咖啡酰奎尼酸 (CQA)、阿魏酰奎

尼酸 (FQA)、二咖啡酰奎尼酸 (diCQA)、阿魏酰奎尼酸内酯、咖啡酸 (CA) 和阿魏酸 (FA)(在 325nm 的吸收)。相对于在 0 时间 (t0) 的参照或相对于在相同的时间无细菌时的参照表示结果。

[0057] 抗氧化应答元件 (ARE) 荧光素酶测定法

[0058] 将含有存在于大鼠谷胱甘肽 -S- 转移酶 A2(GSTA2) 中的 8 个 ARE 拷贝的 pGL-8xARE 以及含有新霉素选择性标记的 pcDNA 3.1 质粒稳定转染进入人 MCF7 细胞中 (Wang 等人, Cancer Res.66,10983-10994,2006)。ARE(抗氧化应答元件)是转录因子 Nrf2 的结合位点,转录因子 Nrf2 调控涉及解毒和对抗氧化应激的内源性防御的基因。pGL-8xARE 质粒含有 8 个 Nrf2 结合位点下游的荧光素酶基因,荧光素酶基因允许监测 Nrf2 的活性。

[0059] 为了用咖啡处理,将 AREc 32 细胞接种于 96 孔微滴度板的 DMEM 生长培养基中。在用不同的咖啡处理 24 小时后,测定萤火虫荧光素酶活性。

[0060] 蛋白质表达

[0061] 通过用胶原酶溶液灌注 Sprague-Dawley 大鼠的肝脏获得原代肝细胞 (Sidhu 等人.,Arch.Biochem.Biophys.301,103-113,1993)。发现细胞存活率(通过台盼蓝排除测试估计)的范围为 90-95%之间。将细胞以 $1.5x10^5$ 细胞 /cm^2 的密度植于 60mm 塑料组织培养碟的 3ml William 氏培养基中,所述培养基补充了下列成分 :2mM L- 谷氨酰胺、10mM Hepes pH7.4、ITS+、15000U 青霉素 / 链霉素、100nM 地塞米松和 5%胎牛血清 (Hi-clone)。令肝细胞粘附 2 小时,然后用 EBSS 洗涤从而去除碎片和未粘附的细胞。加入新鲜的含有 25nM 地塞米松的无血清培养基,然后覆盖一层基质胶 (233g/ml)。更换培养基后每两天向培养物中加入新鲜的基质胶。为了研究咖啡对解毒酶和抗氧化蛋白表达的作用,在蛋白质提取和 western 印迹分析前,种植细胞 48 小时时间的 24 小时后将测试材料加入培养基中 (Cavin 等人.,Food Chem Tox.46,1239-48,2008)。

[0062] 前列腺素 E2 形成测定法

[0063] 用不同的咖啡处理人结肠 HT-29 细胞 15 小时,然后用促炎症反应剂 TNF-α (10ng/ml) 共同孵育 6 小时。使用竞争性酶免疫测定法 (EIA) 测定 HT-29 细胞中 PGE2 产生的分析 (Cavin 等人.,BBRC 327,742-49,2005)。

[0064] 结果

[0065] 水解绿原酸产生酚酸

[0066] 实验 1 :用不同的反应时间和细胞制备物量用约氏乳杆菌新鲜细胞处理 NESCAFE PROTECT®。结果显示在表 1 中。

[0067] 表 1. 实验 1 的结果

[0068]

时间 (h)	6	24	6	24	6	24
细胞制备物 (uL)	750	750	350	350	100	100
相对于 t=0 时未处理的参照的浓度 (%)						
CQA	3	0	14	3	39	15
FQA	8	0	17	4	42	17
diCQA	0	0	0	0	23	2
CA	13215	13238	14282	15981	10111	13661
FA	7776	8845	7234	8861	4594	6691
质量平衡 (mmol/g 干物质)						
消耗的绿原酸	0.20	0.21	0.18	0.20	0.13	0.17
形成的 CA 和 FA	0.20	0.20	0.21	0.24	0.14	0.20

[0069] 实验 2 :用不同的反应时间和细胞制备物量用约氏乳杆菌提取物（裂解的细胞）处理 NESCAFE **PROTECT®**。结果显示于表 2 中。

[0070] 表 2. 实验 2 的结果

[0071]

时间 (h)	2	2	6	6
细胞制备物 (uL)	350.0	100.0	350.0	100.0

[0072]

相对于 t=0 时未处理的参照的浓度（%）				
CQA	10	32	6	14
FQA	15	36	11	18
diCQA	1	8	1	1
CA	13901	10729	16300	12581
FA	7771	5581	9720	6960

[0073] 实验 3：用喷雾干燥的约氏乳杆菌制备物处理 NESCAFE **PROTECT®**。结果显示于表 3 中。

[0074] 表 3. 实验 3 的结果。作为相对于 t = 0 时未处理的对照的%给出 CQA、FQA、CA 和 FA。

[0075]

时间 (h)	2	6	24
CQA	73	67	32
FQA	82	60	34
CA	3598	6140	7879
FA	1109	2183	3686

[0076] 实验 4. 用喷雾干燥的约氏乳杆菌制备物处理生咖啡提取物。结果显示于表 4 中。

[0077] 表 4. 实验 4 的结果。作为相对于 t = 0 时未处理的对照的%给出 CQA、FQA、CA 和 FA。

[0078]

时间 (h)	4	6	16	24
CQA	77	69	58	50
FQA	79	71	48	52
diCQA	67	53	32	20
CA	2673	3762	5182	6145
FA	961	1429	1963	2432

[0079] 实验 5. 用浓缩的约氏乳杆菌制备物处理NESCAFE®。结果显示于表 5 中。

[0080] 表 5. 实验 5 的结果。作为相对于 t = 0 时未处理的对照的%给出 CQA、FQA、CA 和 FA。

[0081]

细胞量	50μL/1mL	100μL/1mL	350μL/1mL	750μL/1mL	50μL/1mL	100μL/1mL	350μL/1mL	750μL/1mL
时间(h)	2	2	2	2	4	4	4	4
CQA	92	80	46	25	76	60	33	17
FQA	90	82	61	41	89	74	53	37
diCQA	86	68	23	6	75	56	15	6
CA	1737	2885	5752	7292	1763	2803	4491	5514
FA	1509	2468	5327	7586	786	1266	2408	3281

[0082] 表 6 显示未经处理水解绿原酸的生咖啡豆提取物（对照样品）的两个不同样品中一些化合物的绝对浓度。

[0083] 表 6. 未经处理的生咖啡豆提取物（对照样品）的组成。以每克干物质中的毫克数给出浓度。

[0084]

	A	B
3-咖啡酰奎尼酸	13.88	15.57
4-咖啡酰奎尼酸	17.58	20.08
5-咖啡酰奎尼酸	81.16	85.45
总的 CQA	112.62	121.10
3-阿魏酰奎尼酸	0.00	0.00
4-阿魏酰奎尼酸	3.29	4.41

[0085]

5-阿魏酰奎尼酸	17.70	19.77
总的 FQA	20.99	24.18
CA	0.39	0.47
FA	0.25	0.23
3-咖啡酰奎尼酸内酯	0.00	0.00
4-咖啡酰奎尼酸内酯	0.00	0.00
总的内酯	0.00	0.00
3,4-二咖啡酰奎尼酸	6.80	4.34
3,5-二咖啡酰奎尼酸	5.53	8.35
4,5-二咖啡酰奎尼酸	0.12	8.85
总的二咖啡酰奎尼酸	12.45	21.55

[0086] 蛋白质表达

[0087] 通过 western 印迹，在大鼠原代肝细胞中，处理 48 小时后 200ug/ml 的 NESCAFE RED **CUP®**（烘烤咖啡豆的提取物）没有产生 GST 亚基 (GSTA4、GSTP1) 和血红素加氧酶 1(HO-1) 的蛋白质表达增加，在 400ug/ml 时 GSTP1 和 HO-1 有弱的诱导。相反，使用 200ug/ml 和 400ug/ml 的用约氏乳杆菌处理的 NESCAFE **PROTECT®**对于 GSTA4、GSTP1 和 HO-1 都观察到不同蛋白质表达的更强诱导。结果作为 Western 印迹凝胶显示于图 1 中。

[0088] 从雄性大鼠（用具有 5％的 NESCAFE RED **CUP®**相对于 NESCAFE **PROTECT®**和约氏乳杆菌处理的 NESCAFE **PROTECT®**的饮食喂食 2 周）的肝脏中获得的数据证实了大鼠原代肝细胞中观察到的效果。相对于未处理的 NESCAFE **PROTECT®** (GSTP1 ;NQO1) 和未处理的 NESCAFE RED **CUP®** (GSTP1 ;NQO1)，发现用约氏乳杆菌处理的 NESCAFE **PROTECT®**最强烈诱导解毒酶的表达 (GSTP1 ;NQO1)。结果作为 Western 印迹凝胶显示于图 2 中。

[0089] 抗氧化应答元件 (ARE) 荧光素酶测定法

[0090] 以几个拷贝的大鼠 GSTA2-ARE 报告基因构建体稳定转染的人乳腺癌细胞 (AREc32) 被用于证明咖啡激活 Nrf2-ARE 途径。未经处理水解绿原酸的生咖啡提取物和用约氏乳杆菌处理 24 小时的不同的生咖啡提取物产生了依赖剂量的 Nrf2 荧光素酶报告基因活性的增加（见表 7）。

[0091] 表 7. 通过咖啡诱导 Nrf2 的活性（萤火虫荧光素酶活性，AU）。

[0092]

咖啡提取物 ug/ml	未经处理的生咖啡提取物	经处理的生咖啡提取物 1	经处理的生咖啡提取物 2	经处理的生咖啡提取物 3
0	0	0	0	0
200	0.3+/-0.1	15.2+/-1.5	22.1+/-1.6	22.6+/-2.4
300	0.8+/-0.1	29.0+/-3.0	40.5+/-1.6	32.1+/-6.0
400	1.0+/-0.1	40.4+/-6.6	59.3+/-1.9	47.3+/-3.4
600	2.0+/-0.2	77.7+/-10.5	90.4+/-0.7	80.4+/-8.2
800	2.8+/-0.1	77.3+/-4.9	80.7+/-7.3	96.2+/-4.1

[0093] 前列腺素 E2 形成测定法

[0094] 在人结肠 HT-29 细胞中评估用约氏乳杆菌处理的生咖啡提取物的潜在抗炎症效果。在用促炎症反应剂 TNF-α 处理后，结肠细胞中诱导了前列腺素 E2(PGE_2) 的水平。在该研究中，用不同的咖啡提取物（未经处理水解绿原酸的生咖啡提取物和用约氏乳杆菌处理 24 小时的不同生咖啡提取物）预处理细胞 24 小时。在试验的最后 6 小时加入 TNF-α (10ng/ml)。数据（见表 8）显示了相对于用 TNF-α 处理的对照细胞，咖啡引起的明显依赖剂量的 PGE_2 形成减少。

[0095] 表 8. 相对于用 TNF-α (AU) 处理的对照细胞，作为咖啡提取物处理结果的 PGE_2 形成的减少。

[0096]

咖啡提取物 ug/ml	未经处理的生咖啡提取物	经处理的生咖啡提取物 1	经处理的生咖啡提取物 2
0	100+/-9	100+/-9	100+/-9
50	110+/-10	18+/-2	43+/-5
100	85+/-9	6+/-0.9	10+/-1.1
200	80+/-8	1+/-0.1	1+/-0.2

[0097] 实施例 2

[0098] 咖啡样品

[0099] 来自 100％罗布斯塔 (Robusta) 生豆的咖啡提取物

[0100] NESCAFE **PROTECT®**，干燥的生豆和烘烤的咖啡豆的共同提取物。

[0101] 酶和细胞

[0102]	微生物	培养基
[0103]	约氏乳杆菌 (CNCM I-1225)	MRS
[0104]	乳双歧杆菌 BB12(CNCM I-3446)	MRS+ 半胱氨酸
[0105]	长双歧杆菌 BB536(ATCC BAA-999)	MRS+ 半胱氨酸

[0106] 绿原酸酯酶 (24U/g)，源自日本曲霉 (Kikkoman，Japan)

[0107] 来自米曲霉的鞣酸酶 (Kikkoman，Japan)

[0108] 细菌细胞的制备

[0109] 在具有良好到达的稳定期后收集 (5000g 离心 10 分钟) 测试的菌株，所述稳定期对应于 37℃缺氧大气中无振荡在培养基中孵育 16 小时。为了菌株的首次激活，将冷冻的储存培养物接种在新鲜培养基中并生长过夜。将这一预培养物用于接种培养物。

[0110] 用细菌细胞处理咖啡提取物

[0111] 在细菌培养和离心后，将沉淀以 0.61g/ml 的浓度重悬于磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 中。向 200μl 的该细胞制备物中，加入 800μl 的咖啡溶液 (3%)，在 37℃孵育混合物 4 小时、16 小时和 24 小时。

[0112] 用绿原酸酯酶孵育咖啡提取物

[0113] 将 200μl 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 中的绿原酸酯酶的溶液加入 800μl 的咖啡溶液 (3%) 中。然后在 37℃孵育混合物 4 小时、16 小时和 24 小时。在反应时间后，通过热处理 (3 分钟，90℃) 停止酶活性，分析前将混合物过滤。

[0114] ARE 荧光素酶测定法

[0115] 如实施例 1

[0116] 结果

[0117] 以几个拷贝的大鼠 GSTA2-ARE 报告基因构建体稳定转染的人乳腺癌细胞 (AREc32) 被用于证明咖啡激活抗氧化 Nrf2-ARE 途径。未经处理水解绿原酸的生咖啡提取物 (未经处理的)、用约氏乳杆菌 (Lj) 处理 24 小时的生咖啡提取物、用乳双歧杆菌 (B1) 处理 24 小时的生咖啡提取物和绿原酸酯酶处理 4 小时的生咖啡提取物 (CE) 都产生了依赖剂量的 Nrf2 荧光素酶报告基因活性的增加 (表 9)。

[0118] 表 9. 未经处理的和经处理的咖啡提取物的 Nrf2 荧光素酶报告基因活性 (AU)

[0119]

咖啡 mg/ml	未经处理的生咖啡	用 Lj 处理的生咖啡	用 B1 处理的生咖啡	用 CE 处理的生咖啡
0	0	0	0	0
100	0.3+/-0.1	0.5+/-0.1	0.3+/-0.1	1.0+/-0.1
200	0.8+/-0.1	1.0+/-0.1	1.1+/-0.1	2.1+/-0.2
400	1.0+/-0.1	5.2+/-0.4	3.1+/-0.3	8.2+/-1.4
600	2.0+/-0.2	11.1+/-0.5	7.2+/-1	11.3+/-1.4

[0120] 用不同的微生物和绿原酸酯酶处理生咖啡提取物从而水解绿原酸。结果显示于表 10 中。

[0121] 表 10. 作为处理结果的生咖啡提取物的组成。作为相对于 t = 0 时未处理的对照的%给出 CQA、FQA、CA 和 FA。

[0122]

	约氏乳杆菌			乳双歧杆菌			绿原酸酯酶		
时 间 (h)	4	16	24	4	16	24	4	16	24
CQA	42	15	12	96	79	74	3	2	2
FQA	49	15	15	33	12	6	73	24	23
diCQA	35	6	3	85	70	64	0	0	0
CA	12505	17148	18107	1521	4182	5283	18917	17275	18318
FA	4607	7192	7597	5020	6970	7105	2620	5685	6293

[0123] 用不同的微生物和绿原酸酯酶处理 NESCAFE **PROTECT®**从而水解绿原酸。结果显示于表 11 中。

[0124] 表 11. 作为处理结果的 NESCAFE **PROTECT®**的组成。作为相对于 t = 0 时未处理的对照的%给出 CQA、FQA、CA 和 FA。

[0125]

	约氏乳杆菌			乳双歧杆菌			绿原酸酯酶		
时 间 (h)	4	16	24	4	16	24	4	16	24
CQA	33	13	13	97	81	80	5	3	3
FQA	42	21	20	54	23	20	54	15	14
diCQA	18	2	2	91	72	67	0	0	1
CA	7942	9429	9933	968	2258	2840	10879	10198	10750
FA	4051	5226	5504	3065	4518	5144	2794	5140	5518

[0126] 实施例 3

[0127] 胃小肠模型 (TIM)

[0128] 胃小肠模型 (TIM-1) 包含四个连接的分别代表胃、十二指肠、空肠和回肠的隔室。每个隔室由带有可变形内壁的玻璃外壁组成。所述可变形的壁在 37℃被水包围从而挤压壁，这保证通过胃肠道中的蠕动将食物与分泌的酶混合。

[0129] 在胃肠道的一般生理条件下进行模型中的实验。在实验中，温度保持在 37℃并模拟唾液分泌、胃分泌、胆汁分泌和胰脏分泌。监测模型中的消化过程 6 个小时。在第一个

3.5 小时中，胃内容物被逐渐递送至小肠“幽门瓣”。在实验的结尾，约 80％的小肠内容物通过回盲瓣被逐渐递送至“大肠”。通过分泌 1M HCl，胃的 pH 在约 5 小时内从 6.5 降至 2.0；小肠内容物的 pH 在十二指肠中维持在 6.5，在空肠中维持在 6.8，在回肠中维持在 7.2。通过穿越带有约 5000 道尔顿分子量截断值 (cut-off) 的中空纤维膜泵送透析液从空肠隔室和回肠隔室吸收消化产物和水。

[0130] 模拟咖啡提取物消化

[0131] 将 4.5g NESCAFE **PROTECT®**（生和烘烤咖啡豆的共同提取物）溶解在 310ml 醋酸盐缓冲液 (20mM，pH 6.5) 中。加入 10ml 起始残留物 (5g 胃蛋白酶和 5g 脂肪酶溶液）后，将溶液注入 TIM 的胃隔室。在消化过程中，在 0-2、2-4 和 4-6 小时收集总的透析液。在 6 小时实验后，分析来自胃隔室、十二指肠隔室、空肠隔室和回肠隔室的残留物从而计算绿原酸的质量平衡。使样品通过 0.45μm 孔径的注射器过滤器 (Millipore SLHA 025BS) 并如实施例 1 所述的用 HPLC 分析样品。为了用约氏乳杆菌 (CNCMI-1225) 进行实验，在加入 10ml 起始残留物后，将 310ml 含有总的 3.3E9cfu 喷雾干燥约氏乳杆菌制备物的醋酸盐缓冲液溶液 (20mM，pH 6.5) 置于胃隔室中。然后在起始消化模拟后 15 分钟，将 10ml 含有 4.5g NescafeProtect 的醋酸盐缓冲液通过注射器注射进入胃隔室。在消化过程中，在总的透析液穿越连接至空肠隔室和回肠隔室的半透中空纤维膜后，在 0-2、2-4 和 4-6 小时收集总的透析液。在 0-2、2-4 和 4-6 小时收集总的回肠递送物。在加入 NESCAFE **PROTECT®**后直接从胃隔室取出等份 (1ml) 和在 1 小时时间点从胃隔室取出等份 (1ml)。6 小时后，用 HPLC 分析来自胃隔室、十二指肠隔室、空肠隔室和回肠隔室的残留物从而计算 5- 咖啡酰奎尼酸的质量平衡。用 NESCAFE **COOL®**（带有伴侣和甜味剂的烘烤咖啡提取物）和用正常过滤煮的烘烤和磨碎的咖啡（带有加入的伴侣）以及用可商售获得的 5- 咖啡酰奎尼酸 (5-CQA) 进行相似的试验。

[0132] 结果

[0133] 在加入约氏乳杆菌的实验过程中水解的 5- 咖啡酰奎尼酸 (5-CQA) 的百分比显示在表 12 中。在未加入约氏乳杆菌的对照实验中没有观察到 5- 咖啡酰奎尼酸 (5-CQA) 的水解。

[0134] 表 12. TIM 模型中测定的咖啡提取物中的 5-CQA 和纯 5-CQA 的水解（存在于样品中的总 5-CQA 的水解％）

[0135]

产物	5-CQA 的水解%
5-CQA	48
NESCAFE PROTECT®	34
NESCAFE COOL®	79
过滤煮的烘烤和磨碎的咖啡（带有伴侣）	53

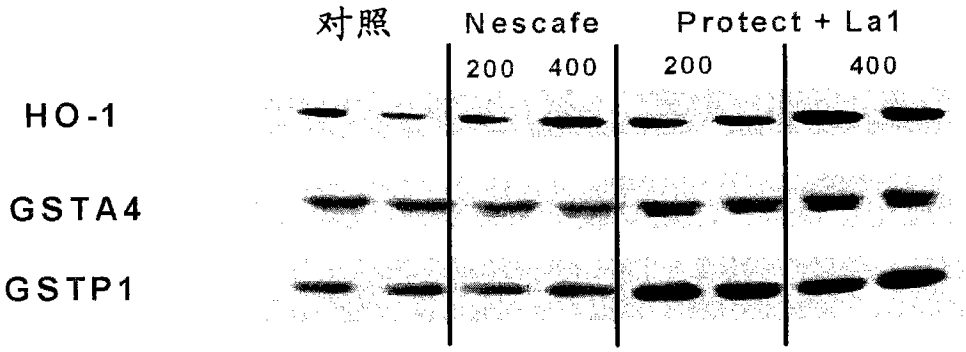

对照
Nescafe
Protect + La1
200
400
200
400
HO-1
GSTA4
GSTP1

图 1

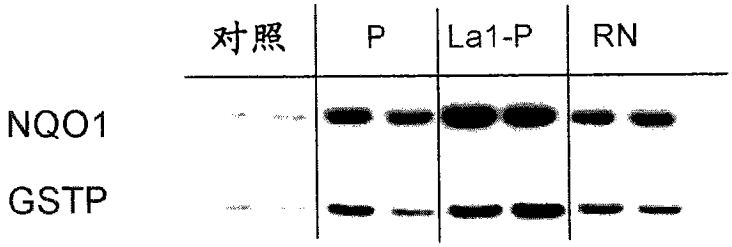

对照
P
La1-P
RN
NQO1
GSTP

图 2