

沈晓静, 黄璐璐, 聂凡秋, 等. 云南小粒咖啡花多糖提取工艺优化及其抗氧化活性分析 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(4): 238–245.
doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021060237

SHEN Xiaojing, HUANG Lulu, NIE Fanqiu, et al. Study on Optimization of Extraction Technology and Antioxidant Activity of Polysaccharides from Yunnan *Coffea arabica* Flowers[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(4): 238–245. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021060237

· 工艺技术 ·

云南小粒咖啡花多糖提取工艺优化 及其抗氧化活性分析

沈晓静^{1,2}, 黄璐璐¹, 聂凡秋¹, 王 青¹, 杨俊滔¹, 颜成慧³, 姜薇薇^{1,*}

(1. 云南农业大学理学院, 食品科学技术学院, 云南昆明 650201;

2. 云南省天然药物药理重点实验室, 昆明医科大学, 云南昆明 650500;

3. 隆阳区坝湾民族中学, 云南保山 678000)

摘 要: 本文旨在优化咖啡花多糖 (ACP) 的提取工艺, 并评价其抗氧化活性。以咖啡花多糖得率为评价指标, 通过对超声温度、超声时间、液料比、超声功率、浸泡时间和醇沉浓度 6 个工艺条件对咖啡花多糖得率影响的考察, 选取了影响较大的超声温度、超声时间和超声功率 3 个工艺条件进行响应面分析。再通过 DPPH、ABTS⁺ 自由基清除实验和 FRAP 法评估其抗氧化能力。结果表明, 超声提取咖啡花多糖的最佳工艺条件为超声温度 69.5 °C, 超声时间 93 min, 超声功率 175 W, 液料比 10:1 mL/g, 浸泡时间 30 min, 乙醇浓度 80%, 该条件下多糖得率为 2.292%。结果表明, 咖啡花多糖的 DPPH 自由基清除能力 IC₅₀ 值为 3.844 mg·mL⁻¹; 以 Trolox 当量来表示其 ABTS⁺ 自由基清除能力为 0.921 mmol Trolox/g ACP; 以 Fe²⁺ 当量来表示其还原能力为 0.0565 mmol Fe²⁺/g ACP, 咖啡花多糖具有一定的抗氧化活性。本研究将为咖啡副产品的综合利用与开发提供一定的参考理论依据。

关键词: 咖啡花, 多糖, 提取, 抗氧化活性

中图分类号: TS201.2

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2022)04-0238-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021060237



本文网刊:

Study on Optimization of Extraction Technology and Antioxidant Activity of Polysaccharides from Yunnan *Coffea arabica* Flowers

SHEN Xiaojing^{1,2}, HUANG Lulu¹, NIE Fanqiu¹, WANG Qing¹, YANG Juntao¹,
YAN Chenghui³, JIANG Weiwei^{1,*}

(1. College of Food Science and Technology, College of Science, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

2. Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, Kunming Medical University, Kunming 650500, China;

3. Ethnic Middle School of Longyang Bawan, Baoshan 678000, China)

Abstract: To optimize the extraction technology and study antioxidant activity of polysaccharide from coffee flower (ACP), ultrasonic temperature, ultrasonic time, ratio of fluid-solid, ultrasonic power, sample immersion time and volume percentage of ethanol were investigated by using polysaccharide extraction yield as indicator. Then ultrasonic temperature, ultrasonic time and ultrasonic power were used as mainly influence factors, the extraction technology was optimized by response surface method. Antioxidant activity of ACP was investigated by DPPH· and ABTS⁺ scavenging effects, and FRAP assays. The results demonstrated that the ultrasonic extraction optimum technological conditions were: Ultrasonic temperature 69.5 °C, ultrasonic time 93 min, ultrasonic power 175 W, ratio of fluid-solid 10:1 mL/g, sample immersion

收稿日期: 2021-06-29

基金项目: 云南省天然药物药理重点实验室开放研究基金项目 (70120030506); 云南省教育厅科学研究基金项目 (2020J0241); 云南省农业基础研究联合专项面上项目 (2018FG001-037)。

作者简介: 沈晓静 (1988-), 女, 硕士, 实验师, 研究方向: 功能食品研究与开发, Email: 690361382@qq.com。

* 通信作者: 姜薇薇 (1982-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 天然产物化学研究, Email: 17366529@qq.com。

time 30 min, and volume percentage of ethanol 80%. Under the the yield of polysaccharides was 2.292%. The results indicated that the value of IC_{50} based on DPPH $\cdot$ scavenging effect of ACP was 3.844 mg·mL $^{-1}$, the ABTS $^{+}$ scavenging activity was 0.921 mmol Trolox/g ACP. The FRAP values of ACP by FRAP assay was 0.0565 mmol Fe $^{2+}$ /g ACP, which showed that ACP had weak antioxidant activity. This study would provide a theoretical basis for the comprehensive utilization and development of coffee by-products.

Key words: coffee flowers; polysaccharide; extraction; antioxidant activity

咖啡为茜草科(Rubiaceae)咖啡属(*Coffea*)植物,主要分布在南美、中美洲、非洲和亚洲等国家,全球超过 80 个国家种植^[1]。根据《中华本草》记载,咖啡具有醒神、利尿、健胃的功效,主治精神倦怠、食欲不振,常作为醒神、利尿和健胃药使用。现代研究表明,咖啡中含有生物碱、酚酸类、黄酮类、萜类等多种活性成分,具有肝脏保护、神经保护、抗氧化、抗糖尿病等多种药理活性^[2-3]。

我国咖啡种植以小粒咖啡为主且 99% 以上分布在云南。云南小粒咖啡内含物质丰富,除咖啡因、绿原酸、葫芦巴碱等成分外,还含有包括 masicarosides I~II^[4], paniculose VI^[4], cofaryloside I^[4], villanovane I^[4], caffarolides A~H^[5], caffruenol A-B^[6], caffruones A-D^[6] 和 caffruolide A-B^[7] 等在内的一些新型萜类化合物。其中,caffarolides C、D 和 F 被证实具有一定的体外激活血小板聚集活性^[5]; caffruenol A-B 和 caffruolide A-B 具有抑制脂多糖诱导的 264.7 巨噬细胞 NO 产生的作用^[7]。随着对咖啡的深入研究,咖啡的附加值不断提高。近年来,基于咖啡副产品中含有丰富的酚酸、类黄酮、萜类、生物碱等生物活性成分,可作为抗氧化、保护肝脏和神经等天然可持续活性成分来源,使得咖啡副产品的研究越来越受到研究者的关注^[8-10]。Campa 等报道了咖啡叶中含有酚类化合物^[11]; Chen 对咖啡叶中丰富的生物碱、黄酮、酚酸、萜类等的化学成分和抗氧化、抗炎、抗菌等药理活性进行了综述^[12],并研究了咖啡叶加工方式和叶龄对其化学成分和活性的影响^[13]。另外,付晓萍等^[14-15]发现云南小粒咖啡果皮的粗提物对受损人脐静脉内皮细胞有一定的保护和恢复作用,还具有潜在的抗氧化效果,并发现其中的主要花青素为矢车菊素-3-葡萄糖苷和矢车菊素-3-芸香糖苷。

咖啡花作为咖啡种植产业中的主要副产物通常被丢弃。然而,已有的研究发现咖啡花化学成分丰富,Stashenko 等^[16]采用 GC-MS 分析了小粒咖啡花中的挥发和半挥发成分成分,结果共确定了 150 个化合物,以正十五烷含量最高,香叶醇次之。此外,Nguyen 等^[17]对咖啡花中的活性成分进行了研究,结果发现咖啡花中酚类化合物含量高,因此咖啡花可作为获取天然抗氧化活性成分的原料。另外,咖啡花中还含有咖啡因、葫芦巴碱。咖啡因具有降低患神经退行性疾病的风险^[18-19];葫芦巴碱则可预防糖尿病和肾损伤,同时还具有治疗神经退行性疾病的作用^[20-21]。Pinheiro 等^[22]通过 HPLC 分析了不同干燥

和提取方式下咖啡花中的葫芦巴碱、绿原酸、没食子酸和咖啡因 4 种活性成分的含量,其中以咖啡因和葫芦巴碱含量最高;并采用 ABTS 和 DPPH 实验评估了抗氧化活性,证实了咖啡花具有抗氧化活性并可作为制作茶饮料潜在的原料。目前对咖啡花的研究报道尚少,但从已有的报道可以看出,咖啡花作为潜在的生物活性化合物来源,具有广阔的应用前景。

多糖(polysaccharides)是由 10 个以上单糖经糖苷键结合而成的大分子化合物,广泛存在于动物、植物和微生物中。多糖结构复杂,具有不同的构象和相对分子质量,以及链内和链间氢键的二级结构。现代研究表明,多糖具有抗氧化^[23-24]、抗衰老^[25]、免疫调节^[26]、抗炎^[27]、抗肿瘤^[28]等药理活性。多糖的生物活性与其纯度、化学结构、溶解度等有关。近年来,多糖的生物活性成为天然药物的研究热点,也是发掘新型药物和开发功能性食品的渠道,因此多糖在医药领域和食品领域具有重要地位。我国云南是咖啡种植的主要产区,咖啡花具有潜在的开发价值,但是目前对云南咖啡花的开发研究较少,咖啡花潜在的价值未能挖掘。因此本文以云南小粒咖啡花为探究对象,开展对其活性多糖的研究,旨在深入挖掘云南小粒咖啡的综合利用价值。

本文以多糖得率为评价指标,对采自云南省保山市的咖啡花进行多糖提取工艺的优化及其抗氧化能力进行测定,为进一步的开发具有生物活性的多糖提供基础数据,并为进一步开发和研究云南小粒咖啡和提高其附加值提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

咖啡花 云南省保山市;无水乙醇 天津化学试剂有限公司;蒽酮 纯度 98.0%,国药集团化学试剂有限公司;浓硫酸、盐酸 重庆川东化工有限公司;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(ABTS)、2,4,6-三吡啶基三嗪(TPTZ)、芦丁 纯度 98.0%,上海瑞永生物科技有限公司;水溶性维生素 E 纯度 98.0%,合肥博美生物科技有限公司;六水合三氯化铁 分析纯,西陇科学股份有限公司;过硫酸钾 分析纯,天津市大茂化学试剂厂;PBS 缓冲液、醋酸钠缓冲液 厦门海标科技有限公司。

FA2104N 型电子天平、722-分光光度计 上海菁华科技有限公司;KQ-250DB 超声仪、SHZ-D(III)循环水式真空泵 巩义市予华仪器有限公司;旭曼-

1000Y 多功能粉碎机 永康市铂欧五金制品有限公司; 800 电动离心机 金坛市富华仪器有限公司; VFD-3000 真空冷冻干燥机 北京博医康实验仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 咖啡花多糖的提取 参考郑婷婷等^[29]的方法,并加以修改。将采自云南保山市的咖啡花在室温下阴干后,采用粉碎机粉碎并过 80 目筛后备用。称取咖啡花粉末 2.0 g,加入 20.0 mL 纯水,浸泡 30 min, 40 ℃ 下 100 W 超声 30 min,冷却至室温,经真空抽滤后保留滤液。在滤液中加入乙醇至浓度为 80% 进行沉淀,静置 12 h。4000 r/min 离心 10 min 后弃去上清液,沉淀加水溶解后-80 ℃ 下冻干,得粗多糖。配制 5 mg·mL⁻¹ 的咖啡花多糖溶液,备用。

1.2.2 多糖标准曲线的制备和咖啡花多糖含量的测定 参考蒽酮-硫酸法^[30]绘制葡萄糖标准曲线。分别配制 0.0、25.0、50.0、100.0、150.0 和 200.0 μg/mL 葡萄糖标准溶液。精密吸取不同浓度的上述葡萄糖标准溶液 1.00 mL,加入 1.00 mL 纯水,置于 25 mL 具塞试管。加入 5.0 mL 2.1 mg·mL⁻¹ 蒽酮-硫酸溶液摇匀,冰水浴冷却,沸水浴加热 7 min,迅速置于冰水浴中冷却至室温。以去离子水作为空白对照,在 625 nm 处进行比色测定吸光度 A。以无水葡萄糖含量为横坐标(0.0、25.0、50.0、100.0、150.0、200.0 μg),吸光度值为纵坐标,绘制标准曲线,得标准曲线方程为: $Y=0.0051X-0.0092(R^2=0.9970)$ (式中: Y 为吸光度, X 为葡萄糖量, μg)。

精密吸取一定体积上述配制的 5 mg/mL 的咖啡花多糖溶液于 25 mL 具塞试管,加入纯水补至 2.00 mL。加入 5.0 mL 2.1 mg·mL⁻¹ 蒽酮-硫酸溶液摇匀,冰水浴冷却,沸水浴加热 7 min,迅速置于冰水浴中冷却至室温。以去离子水作为空白对照,在 625 nm 处进行比色测定吸光度 A。根据葡萄糖标准曲线方程计算咖啡花多糖得率,每个样品重复 3 次,结果以平均值表示,计算公式如下:

$$\text{咖啡花多糖得率}(\%) = \frac{X \times m_1 \times 10^{-3}}{5 \times V \times m_s} \times 100$$

式中: X 为 V 体积咖啡花多糖溶液中多糖含量, μg; V 为多糖溶液测定的体积, mL; 5 为配制的咖啡花多糖溶液浓度 5 mg·mL⁻¹; m_1 为冻干咖啡花粗多糖总质量, g; m_s 为称取咖啡花样品的质量, g。

1.2.3 单因素实验 在超声辅助提取咖啡花多糖的过程中,影响多糖得率的重要因素主要有超声温度、超声时间、液料比、超声功率、浸泡时间和醇沉浓度,分别对各个因素进行试验。

超声温度选取 40、50、60、70、80 ℃ 五个水平;超声时间选取 30、60、90、120、150 min 五个水平;液料比 10:1、15:1、20:1、25:1、30:1 mL/g 五个水平;超声功率选取 100、125、150、175、200 W 五个

水平;浸泡时间选取 30、60、90、120、150 min 五个水平;乙醇浓度选取 75%、80%、85%、90%、95% 五个水平,分别进行单因素实验。当筛选其中一个参数时,其余因素分别为:超声温度 40 ℃、超声时间 30 min、液料比 10:1 mL/g、超声功率 100 W、浸泡时间 30 min 以及醇沉浓度 80%。

1.2.4 响应面优化试验 根据 Box-Behnken 试验设计原理,以咖啡花多糖得率为响应变量,从单因素试验结果中选取 3 个多咖啡花多糖得率影响最大的因素,见表 1。以咖啡花多糖得率为指标优化超声温度、超声时间和超声功率。

表 1 响应面分析因素和水平
Table 1 Response surface analysis factors and levels

水平	因素		
	A 超声温度(℃)	B 超声时间(min)	C 超声功率(W)
1	60	60	150
2	70	90	175
3	80	120	200

1.2.5 抗氧化能力实验

1.2.5.1 DPPH 自由基清除实验 参考文献[31]描述的方法进行 DPPH 自由基清除实验。取 3.9 mL 0.075 mmol/L DPPH 反应液与 100 μL 不同浓度多糖溶液混合。室温下暗处反应 30 min,于 515 nm 下分别测量吸光值,以芦丁为阳性对照, DPPH 自由基清除率计算式为: $I\% = [(A_0 - A_s)/A_0] \times 100$ (式中: A_s 为样品溶液的吸光度; A_0 为未加样品溶液的吸光度),抗氧化活性以 50% 抑制率(IC₅₀)表示。

1.2.5.2 ABTS⁺自由基清除实验 参考文献[32]描述的方法进行 ABTS⁺自由基清除实验。分别取 2 mL 的多糖溶液加入到 2 mL ABTS⁺自由基溶液中,均匀混合后,室温反应 6 min,测定 734 nm 下紫外吸收,芦丁为阳性对照。ABTS⁺自由基清除能力计算公式如下: $I(\%) = [(A_0 - A_s)/A_0] \times 100$ (式中: A_s 为样品溶液的吸光度; A_0 为未加样品溶液的吸光度)标准曲线是通过测定不同浓度 Trolox 标准溶液绘制($I\% = 0.0247C - 0.0046, R^2 = 0.9937$),样品的 ABTS 抗氧化活性表示为 mmol Trolox/g。

1.2.5.3 FRAP 法 参考文献[33]描述的方法进行 FRAP 抗氧化能力测定。取 5.0 mL TPTZ、5.0 mL 20 mmol/L FeCl₃ 和 50 mL 醋酸钠缓冲溶液(300 mmol/L, pH3.6)配制成 FRAP 工作液;100 μL 样品与 300 μL 水和 3.0 mL FRAP 工作液混合,放置于 37 ℃ 的水浴锅中反应 30 min;于 595 nm 下测定吸光度。以 FeSO₄ 为标准品制作标准曲线($A = 0.572C - 0.008, R^2 = 0.9974$),芦丁为阳性对照,根据标准曲线计算还原能力,以 mmol FeSO₄/g 多糖表示。

1.3 数据处理

所有试验均重复三次,取平均值。采用 Design

Expert 8.0.6 软件进行响应面试验设计与分析。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

单因素实验结果如图 1 所示。超声温度对咖啡花多糖得率的影响: 超声温度 40~80 ℃, 多糖得率为 1.0048%~1.7982%。在 40~70 ℃ 范围内, 咖啡花多糖得率随超声温度的升高而逐渐升高, 至 70 ℃ 时达到最大, 超过 70 ℃ 后得率开始下降。这可能是由于在高温条件下咖啡花多糖的结构遭到破坏而造成多糖得率下降, 这在文献 [29,34-35] 也有相似报道。超声温度选择为 70 ℃。

超声时间对咖啡花多糖得率的影响: 超声时间 30~150 min, 多糖得率为 1.0369%~1.5853%, 多糖得率随超声时间的增加而升高, 至 90 min 时达到最大, 90 min 后, 随超声时间的增加, 得率开始下降。这是由于短时间的超声提取不利于多糖的充分溶解, 而长时间的超声提取又会使多糖降解反而导致得率下降, 这在文献 [29,34-35] 也有相似报道。因此, 超声时间选择为 90 min。

液料比对咖啡花多糖得率的影响: 料液比对多糖得率的影响较小, 液料比 10:1~30:1 mL/g 时多糖得率为 1.1790%~1.3357%。多糖得率随液料比的升高而升高, 至 25:1 mL/g 时达到最大, 25:1 mL/g 后, 随液料比的升高, 得率反而下降。溶剂较少会导致多糖不能充分的溶出而使多糖得率较低; 较多的溶剂又会使多糖溶解而不易沉淀析出, 同时也会因溶剂吸收超声波辐射而导致得率降低, 这在文献 [29,34-35] 也有相似报道。考虑到液料比对得率的影响较小, 为了节省试剂用量, 因此, 液料比选择为 10:1 mL/g。

超声功率对咖啡花多糖得率的影响: 超声功率选取 100~200 W, 多糖得率为 1.1185%~1.8583%, 多糖得率随超声功率的增大而升高, 至 175 W 时达到最大, 175 W 后, 随超声功率的增大, 得率反而下降。超声功率增加可以有效地破坏细胞和组织使多糖溶解于溶剂中, 因此增大超声功率有利于多糖的析出; 但是, 较大的超声波所产生的破碎效应和热效应同时会增加咖啡花中的杂质溶出, 热效应又使多糖成分破坏从而引起多糖得率降低, 这在文献 [36-37] 也有相

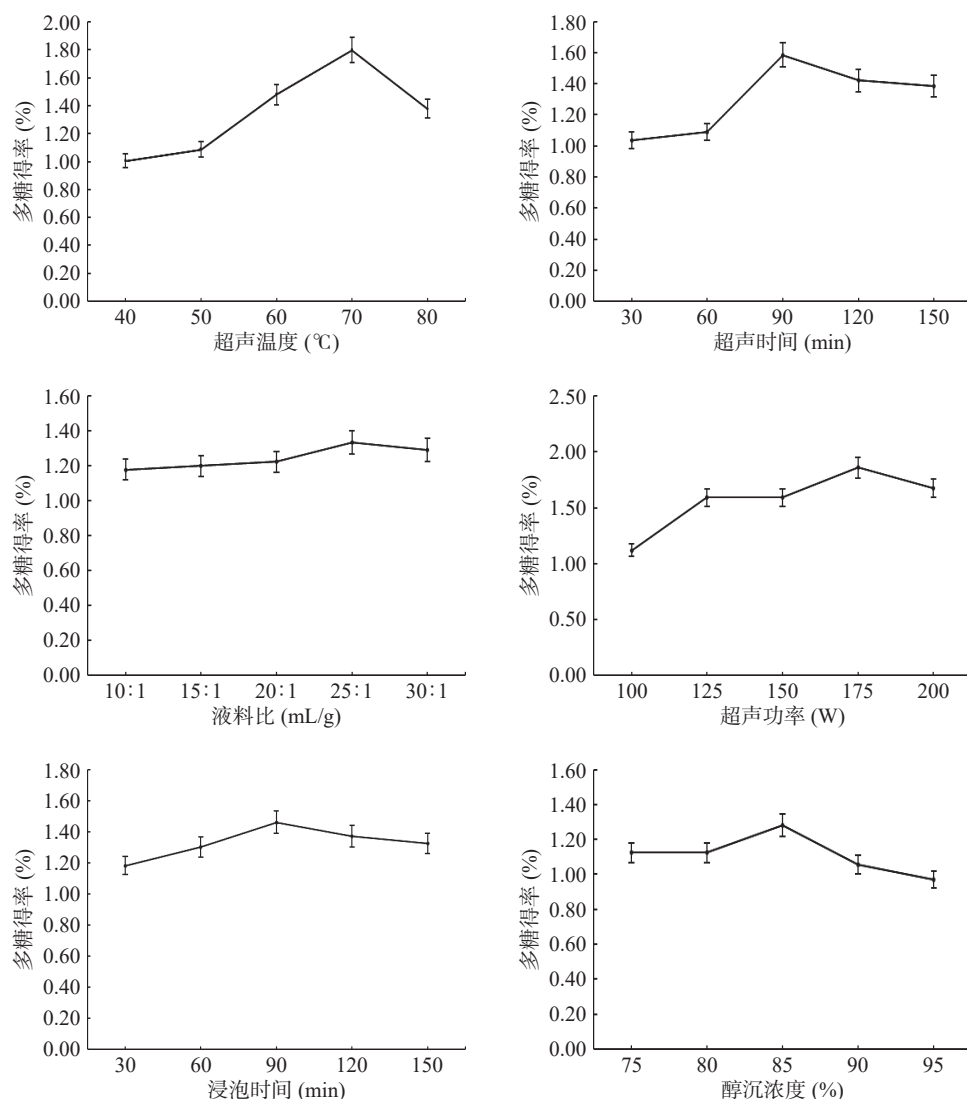


图 1 单因素实验结果

Fig.1 Results of single factor experiments

似报道。因此,超声功率选择为 175 W。

浸泡时间对咖啡花多糖得率的影响:浸泡时间对多糖得率的影响较小,浸泡时间 30~150 min,多糖得率为 1.1827%~1.4609%。30~90 min 范围内,多糖得率随浸泡时间的增加而升高,至 90 min 时达到最大,90 min 后,随浸泡时间的增加,得率略有下降,且趋于平缓。浸泡时间的延长可利于多糖在超声过程中的析出,并减少能耗。但是过长的浸泡并不能带来较高的得率,过长的浸泡也会使其他成分析出影响多糖得率。这与文献 [38] 报道相似。考虑到浸泡时间的影响较小,为了节省时间,浸泡时间选择为 30 min。

醇沉浓度对咖啡花多糖得率的影响:醇沉浓度对多糖得率的影响较小,醇沉浓度 75%~95%,多糖得率为 0.9703%~1.2806%。多糖得率随乙醇浓度的升高而升高,至 85% 时达到最大,85% 后,随乙醇浓度的升高,得率反而下降。水提醇沉是利用多糖不溶于醇的性质而使其沉淀析出。当随着乙醇的加入量增加,多糖因不溶于乙醇而沉淀析出,得率增大,当醇沉浓度超过 85% 以后,并不能提高多糖得率,反而造成试剂的浪费。这与文献 [38] 报道相似。为简化操作,本文采用直接加入乙醇调节醇浓度的方法进行沉淀,同时,由于 80% 与 85% 多糖得率差别不大,但可节约试剂减少浪费。因此,醇沉浓度选择为 80%。

2.2 响应面试验结果

2.2.1 响应面试验结果 超声温度、超声时间和超声功率影响较大,因此在上述单因素实验基础上,对超声温度、超声时间和超声功率三个条件进行响应面法优化,结果见表 2。

表 2 响应面试验设计与结果
Table 2 Design and results of response surface experiment

序号	A	B	C	Y 多糖得率(%)
1	0	-1	1	1.7876
2	0	0	0	2.1604
3	1	1	0	2.0868
4	0	-1	-1	1.8405
5	0	0	0	2.2839
6	0	1	1	1.8266
7	1	0	1	1.5849
8	1	-1	0	1.2049
9	0	0	0	2.3920
10	-1	0	-1	1.8112
11	-1	-1	0	1.9720
12	0	1	-1	1.8358
13	0	0	0	2.2226
14	0	0	0	2.3695
15	1	0	-1	1.4638
16	-1	1	0	1.4904
17	-1	0	1	1.5989

以多糖得率(Y)为考察响应指标,建立其与超声温度、超声时间和超声功率三个因素的回归模型,得到二次回归方程为:

$$Y=2.29-0.067A+0.054B-0.019C+0.34AB+0.083AC+0.011BC-0.40A^2-0.19B^2-0.27C^2$$

2.2.2 方差的显著性检验 对上述回归模型进行显著性检验,结果见表 3。

表 3 多糖得率方差分析结果
Table 3 Results of variance analysis of yield of polysaccharides

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	1.82	9	0.20	23.82	0.0002	**
A	0.035	1	0.035	4.17	0.0805	
B	0.024	1	0.024	2.78	0.1393	
C	2.938×10^{-3}	1	2.938×10^{-3}	0.35	0.5748	
AB	0.46	1	0.46	54.77	0.0001	*
AC	0.028	1	0.028	3.27	0.1133	
BC	4.774×10^{-4}	1	4.774×10^{-4}	0.056	0.8193	
A ²	0.68	1	0.68	80.40	<0.0001	**
B ²	0.16	1	0.16	18.79	0.0034	**
C ²	0.30	1	0.30	35.75	0.0006	**
残差	0.059	7	8.486×10^{-3}			
失拟项	0.021	3	7.132×10^{-3}	0.75	0.5764	不显著
纯误差	0.038	4	9.502×10^{-3}			
总差	1.88	16				
$R^2=0.9684$						
$R^2_{Adj}=0.9277$						

注: *为显著($P<0.05$); **为极显著($P<0.01$)。

由表 3 方差分析结果得,总模型显著($P<0.0001$),该模型达到极显著水平,表明不同因素间的差异显著;根据回归方程一次项系数绝对值大小可知,各因素对总多糖得率的影响顺序为: A>B>C,即超声温度>超声时间>超声功率。失拟项 $P=0.5764>0.05$,失拟项检验不显著,说明未知因素对试验结果的影响较小,残项主要由随机误差引起,表明模型选择适当正确。AB 的影响显著($P<0.05$),A²、B²、C² 的影响极显著($P<0.01$),在整个模型中,模型中的调整系数 $R^2_{Adj}=0.9277$,说明 92.77% 的响应值变化可以通过模型进行解释,决定系数 $R^2=0.9684$,表明模型可信度高,且模型与实验拟合良好,可用此模型进行分析与预测^[39-42]。

2.2.3 响应曲面及等高线 各因素交互作用对咖啡花多糖得率影响的响应面图见图 2。由超声温度和超声时间两者的交互作用可知,二者交互作用显著;当超声温度不变时,咖啡花多糖的得率随超声时间的增加先上升后下降;当超声时间不变时,咖啡花多糖得率随超声温度的升高先增大后减小。由超声温度和超声功率两者的交互作用可知,当超声温度不变时,咖啡花多糖的得率随超声功率的增加先上升后下降;当超声功率不变时,咖啡花多糖得率随超声温度的升高先增大后减小。由超声时间和超声功率两者的交互作用可知,当超声时间不变时,咖啡花多糖的得率随超声功率的增加先上升后下降;当超声功率不变时,咖啡花多糖得率随超声时间的升高先增大后减小。

因此,以多糖得率作为评价标准,通过对超声时间、超声温度和超声功率三个条件的响应面法优化

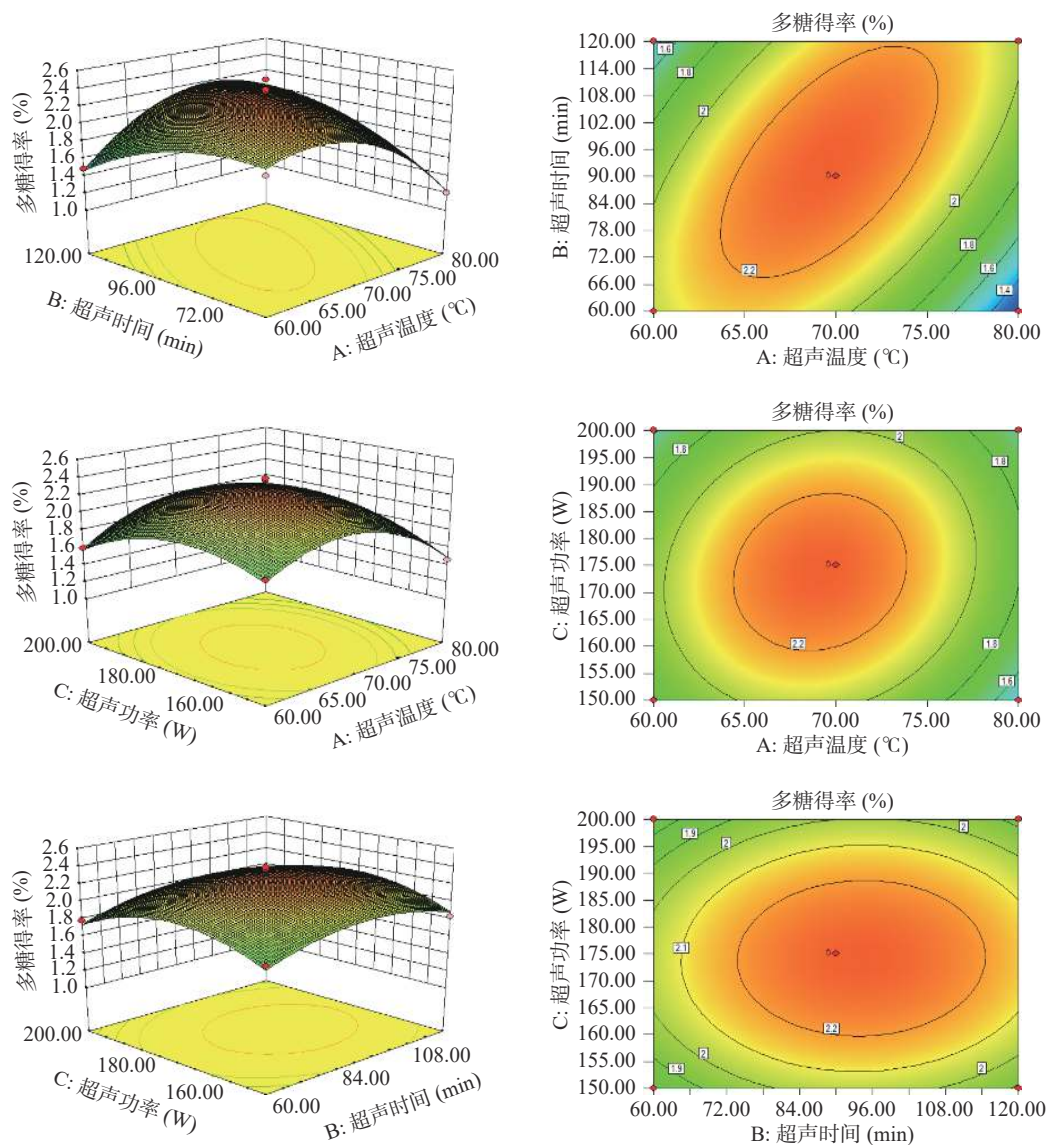


图 2 各因素交互作用对多糖得率影响的三维曲面和等高线

Fig.2 Three-dimensional surface plot and contour map for the interactive effects of four extraction parameters on yield of polysaccharides

结果为: 超声温度 69.56 ℃、超声时间 92.99 min 和超声功率 174.01 W, 预测此条件下 2.290%。根据实际情况操作选取超声温度 69.5 ℃、超声时间 93.00 min 和超声功率 175W、浸泡时间 30 min、液料比 10:1 mL/g 和乙醇浓度 80% 进行 4 次平行试验, 平均得率为 2.292%±0.061%。基本接近试验所获得的理论值, 表明预测值和真实值之间有很好的拟合性, 因此本研究中利用响应面获得的优化工艺参数准确可靠^[43]。

2.3 抗氧化能力实验结果

DPPH 实验是一种高效、灵敏的植物抗氧化能力评价模型, 被测样品的自由基清除能力与其潜在的提供质子能力相关; ABTS 实验被广泛用于估计植物样品的抗氧化能力, 其可以测试样品中的亲脂性和亲水性成分的抗氧化活性; FRAP 法通过将 Fe³⁺-TPTZ 还原为 Fe²⁺-TPTZ 来评估天然产物的还原能力^[44-45]。咖啡花多糖抗氧化实验结果见表 4, 咖啡花多糖对

表 4 咖啡花多糖的抗氧化活性

Table 4 Antioxidant activities of polysaccharides from coffee flowers

样品	DPPH(IC ₅₀ , mg/mL)	ABTS(mmol Trolox/g)	FRAP(mmol Fe ²⁺ /g)
多糖	3.844	0.921	0.0565
芦丁	0.218	14.221	0.6267

DPPH 自由基、ABTS⁺自由基均表现出了一定的抗氧化活性, 但与芦丁相比, 其抗氧化活性较低。

3 结论

本实验以云南小粒咖啡花为原料, 采用超声辅助提取云南小粒咖啡花多糖, 通过对超声时间、超声温度、液料比、超声功率、浸泡时间和醇沉浓度 6 个因素考察的基础上, 发现超声时间、超声温度和超声功率对咖啡花多糖的提取具有重要的影响。再通过响应面优化超声时间、超声温度和超声功率, 确定咖啡花多糖的最佳工艺条件为: 超声温度 69.5 ℃, 超声

时间 93 min, 超声功率 175 W, 液料比 10:1 mL/g, 浸泡时间 30 min, 乙醇浓度 80%。该条件下多糖得率为 2.292%±0.061%。该方法能有效提高咖啡花多糖的得率, 同时缩短了提取时间和减少乙醇的使用量。抗氧化实验结果表明, 咖啡花多糖显示弱抗氧化能力。本研究将为进一步的开展咖啡花多糖分离纯化以及活性功能研究提供参考, 也将为咖啡的进一步开发利用提供理论依据和支撑。

参考文献

- [1] DE LOS SANTOS-BRIONES C, HERNANDEZ-SOTOMAYOR S M T. Coffee biotechnology[J]. *Brazilian J Plant Physiol*, 2006, 18: 217-227.
- [2] 沈晓静, 字成庭, 辉绍良, 等. 咖啡化学成分及其生物活性研究进展[J]. *热带亚热带植物学报*, 2021, 29(1): 112-122. [SHEN X J, ZI C T, HUI S L, et al. Advances on chemical components and biological activities of coffee[J]. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 2021, 29(1): 112-122.]
- [3] EVA B P, TÍMEA B, NORA P. Phytochemical overview and medicinal importance of *Coffea* species from the past until now[J]. *Asina Pac J Trop Med*, 2016, 9(12): 1127-1135.
- [4] SHU Y, LIU J Q, PENG X R, et al. Characterization of diterpenoid glucosides in roasted puer coffee beans[J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(12): 2631-2637.
- [5] WANG X, MENG Q Q, PENG X R, et al. Identification of new diterpene esters from green Arabica coffee beans, and their platelet aggregation accelerating activities[J]. *Food Chem*, 2018, 263: 251-257.
- [6] WANG X, PENG X R, LU J, et al. New dammarane triterpenoids, caffruones A-D, from the cherries of *Coffea arabica*[J]. *Nat Prod Bioprospect*, 2018, 8(6): 413-418.
- [7] WANG X, PENG X R, LU J, et al. Ent-kaurane diterpenoids from the cherries of *Coffea arabica*[J]. *Fitoterapia*, 2019, 132: 7-11.
- [8] REBOLLO-HERNANZA M, ZHANG Q Z, AGUILERA Y, et al. Phenolic compounds from coffee by-products modulate adipogenesis-related inflammation, mitochondrial dysfunction, and insulin resistance in adipocytes, via insulin/PI3K/AKT signaling pathways[J]. *Food Chem Toxicol*, 2019, 132: 1-16.
- [9] NURIA MARTINEZ-SAEZ, MARÍA DOLORES DEL CASTILLO. Development of sustainable novel foods and beverages based on coffee by-products for chronic diseases[J]. *Encyclopedia of Food Security and Sustainability*, 2019(1): 307-315.
- [10] TIZIAN K, JONATHAN I K, VERA G, et al. A review of coffee by-products including leaf, flower, cherry, husk, silver skin, and spent grounds as novel foods within the european union[J]. *Foods*, 2020, 9: 665.
- [11] CAMPA C, MONDOLOT L, RAKOTONDRAVAO A, et al. A survey of mangiferin and hydroxycinnamic acid ester accumulation in coffee (*Coffea*) leaves: Biological implications and uses[J]. *Annals of Botany*, 2012, 110(3): 595-613.
- [12] CHEN X M. A review on coffee leaves: Phytochemicals, bioactivities and applications[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2019, 59(6): 1008-1025.
- [13] CHEN X M, MA Z, KITTS D D. Effects of processing method and age of leaves on phytochemical profiles and bioactivity of coffee leaves[J]. *Food Chemistry*, 2018, 249: 143-153.
- [14] 付晓萍, 张云鹤, 谷大海, 等. 云南小粒种咖啡果皮粗提取物对人脐静脉内皮细胞抗氧化损伤的研究[J]. *食品科技*, 2016, 41(12): 183-188. [FU X P, ZHANG Y H, GU D H, et al. Effect on anti-oxidative injuries of human umbilical vein endothelial cell of crude extracts from Yunnan arabica coffee husk[J]. *Food Sci Technol*, 2016, 41(12): 183-188.]
- [15] 张云鹤, 付晓萍, 梁文娟, 等. 云南小粒种咖啡果皮粗提取物花青素成分及抗氧化活性研究[J]. *食品科技*, 2016, 41(5): 219-223. [ZHANG Y H, FU X P, LIANG W J, et al. Antioxidant activity and compisition of anthocyanins of crude extracts from Yunnan arabica coffee husk[J]. *Food Sci Technol*, 2016, 41(5): 219-223.]
- [16] ELENA E S, JAIRO RENÉ M, SILVIA CÁRDENAS-VARGAS, et al. GC-MS study of compounds isolated from *Coffea arabica* flowers by different extraction techniques[J]. *J Sep Sci*, 2013, 36(17): 2901-2914.
- [17] THI MINH THU N, EUN JIN CHO, SONG Y, et al. Use of coffee flower as a novel resource for the production of bioactive compounds, melanoidins, and bio-sugars[J]. *Food Chem*, 2019, 29: 125120.
- [18] LAURENT C, EDDARKAOUI S, DERISBOURG M, et al. Beneficial effects of caffeine in a transgenic model of Alzheimer's disease-like taupathology[J]. *Neurobiol Aging*, 2014, 35(9): 2079-2090.
- [19] SINGH S, SINGH K, PATEL S, et al. Nicotine and caffeine-mediated modulation in the expression of toxicant responsive genes and vesicular monoamine transporter-2 in 1-methyl 4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetra- hydropyridine-induced Parkinson's disease phenotype in mouse[J]. *Brain Res*, 2008, 1207: 193-206.
- [20] SHAO X N, CHEN C, MIAO C S, et al. Expression analysis of microRNAs and their target genes during experimental diabetic renal lesions in rats administered with ginsenoside Rb1 and trigonelline[J]. *Die Pharm*, 2019, 74(8): 492-498.
- [21] ZHOU J Y, ZHOU S W. Protection of trigonelline on experimental diabetic peripheral neuropathy[J]. *Evid Based Compl Alternat Med*, 2012, 2012: 164219.
- [22] FLÁVIA DE ABREU PINHEIRO, LUZIA FERREIRA ELIAS, MILTON DE JESUS FILHO, et al. Arabica and Conilon coffee flowers: Bioactive compounds and antioxidant capacity under different processes[J]. *Food Chem*, 2020, 336: 127701.
- [23] ZHAO S J, HAN Z M, YANG L M, et al. Extraction, characterization and antioxidant activity evaluation of polysaccharides from *Smilacina japonica*[J]. *Int Biol Macromol*, 2020, 151: 576-583.
- [24] 郑婷婷, 张文杰, 严亮, 等. 水-碱连续提取黄皮疣柄牛肝菌粗多糖的理化性质及抗氧化活性研究[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(15): 84-89. [ZHENG T T, ZHANG W J, YAN L, et al. Physicochemical properties and antioxidant activity of water-alkali continuous extraction of crude polysaccharides from *Leccinellum crocipodium* (Letellier.) Watliag[J]. *Science and Technology of Food*

- Industry, 2020, 41(15): 84–89.]
- [25] HUI Y, JUNLI H, CHUANG W. Anti-oxidation and anti-aging activity pf polysaccharide from *Malus micromalus* Makino fruit wine[J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 121: 1203–1212.
- [26] LI J, GU F F, CAI C, et al. Purification, structural characterization, and immunomodulatory activity of the polysaccharides from *Ganoderma lucidum*[J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 143: 806–813.
- [27] ZHAO L, LI M Y, SUN K C, et al. *Hippophae rhamnoides* polysaccharides protect IPEC-J2 cells from LPS-induced inflammation apoptosis and barrier dysfunction *in vitro* via inhibiting TLR4/NF- κ B signaling pathway[J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 155: 1202–1215.
- [28] CHEN L, HUANG G L. Antitumor activity of polysaccharides: An overview[J]. *Curr Drug Targets*, 2018, 19(1): 89–96.
- [29] 郑婷婷, 张文杰, 严亮, 等. 热水法提取黄皮疣柄牛肝菌多糖工艺研究[J]. *食品研究与开发*, 2019, 40(4): 38–42. [ZHENG T T, ZHANG W J, YAN L, et al. Study on extraction technology of polysaccharides of *Leccinum crocipodium* (Letellier.) Watliag by hot water method[J]. *Food Research and Development*, 2019, 40(4): 38–42.]
- [30] 申希峰, 黄杰涛, 张莲姬. 蒽酮-硫酸法测定榛花多糖含量条件的优化[J]. *食品研究与开发*, 2017, 38(18): 150–154. [SHEN X F, HUANG J T, ZHANG L J. Determination of optimal conditions of polysaccharide content of Hazel's flower by anthrone sulfuric acid method[J]. *Food Research and Development*, 2017, 38(18): 150–154.]
- [31] XIAO H, YIN T P, DONG J W, et al. Five new phenolic compounds with antioxidant activities from the medicinal insect *Blaps rynchopetera*[J]. *Molecules*, 2017, 22(8): 1301–1308.
- [32] YIN T P, CAI L, XING Y, et al. Alkaloids with antioxidant activities from *Aconitum handelianum*[J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2016, 18: 603–610.
- [33] HU X F, DING Z B, CHEN Y, et al. Comparative study on the antioxidant activities of ten common flower reas from China[J]. *Open Chem*, 2019, 17(1): 841–848.
- [34] 陈钢, 陈红兰, 苏伟, 等. 响应面分析法优化黄精多糖提取工艺参数[J]. *食品科学*, 2007, 38(18): 198–201. [CHEN G, CHEN H L, SU W, et al. Optimization of extraction technique of *Polygonatic sibiricum* polysaccharides by response surface analysis [J]. *Food Science*, 2007, 38(18): 198–201.]
- [35] 林志娟, 陈永, 尤丽彤, 等. 响应面法优化超声辅助提取太子参多糖工艺研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2013, 25: 846–850. [LIN Z J, CHEN Y, YOU L T, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction conditions of polysaccharides from *Radix pseudostellariae* by response surface methodology[J]. *Natural Product Research and Development*, 2013, 25: 846–850.]
- [36] 康永锋, 薛永刚, 韩巧英, 等. 响应面优化超声辅助提取豌豆总黄酮工艺研究[J]. *食品研究与开发*, 2018, 39(2): 56–61. [KANG Y F, XUE Y G, HAN Q Y, et al. Optimization of the ultrasonic extraction technology of flavonoids from *Pisum sativum* Linn using response surface methodology[J]. *Food Research and Development*, 2018, 39(2): 56–61.]
- [37] 赵巧丽, 庞振才, 张广明, 等. 响应面分析法优化菠萝皮渣多糖提取工艺研究[J]. *食品研究与开发*, 2018, 39(6): 34–40. [ZHANG Q L, PANG Z C, ZHANG G M, et al. Optimization of extraction conditions of polysaccharide from pineapple pomace by response surface methodology[J]. *Food Research and Development*, 2018, 39(6): 34–40.]
- [38] 赵宁, 李伟泽, 张倩, 等. 白及多糖提取工艺[J]. *应用化工*, 2015, 44(12): 34–40. [ZHAO N, LI W Z, ZHANG Q, et al. Study on extraction technology of *Bletilla striata* polysaccharide[J]. *Applied Chemical Industry*, 2015, 44(12): 34–40.]
- [39] 马岚, 王来兵, 杜晓鹏, 等. 响应面法优化蒙药瞿麦中总生物碱提取工艺研究[J]. *化学研究与应用*, 2019, 31(2): 232–238. [MA L, WANG L B, DU X L, et al. Optimization of ultrasonic extraction progress of total alkaloid from mongolian medicine *Dianthus superbis* L. using response surface method[J]. *Chemical Research and Application*, 2019, 31(2): 232–238.]
- [40] 姜坤, 叶焕烽, 叶秦轩, 等. 响应面优化多聚原飞燕草素超声降解工艺及其抗氧化的研究[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(13): 221–229. [JIANG K, YE H F, YE Q X, et al. Research on ultrasonic degradation of polymeric prodelpinidin by response surface methodology and its antioxidant activity[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(13): 221–229.]
- [41] 焦雯姝, 关嘉琦, 史佳鹭, 等. 响应面法优化乳酸乳球菌 KLDS4.0325 产叶酸的培养基成分及发酵条件[J]. *食品科学*, 2020, 41(6): 123–130. [JIAO W S, GUAN J Q, SHI J L, et al. Optimization of medium composition and fermentation conditions for folate production by *Lactococcus lactis* KLDS4.0325 by response surface methodology[J]. *Food Science*, 2020, 41(6): 123–130.]
- [42] 王雯, 王睿智, 王彤, 等. 响应面法优化酶解低温榨取汉麻籽油工艺[J]. *食品科学*, 2019, 40(8): 242–247. [WANG W, WANG R Z, WANG T, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis of cold-pressed hemp seed cake for increased oil yield by response surface methodology[J]. *Food Science*, 2019, 40(8): 242–247.]
- [43] 殷海洋, 刘振春, 张世康, 等. 响应面优化超声波辅助酶法提取油莎豆 ACE 抑制肽的工艺[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(14): 182–187. [YIN H Y, LIU Z C, ZHANG S K, et al. Optimization of ultrasonic-assisted enzymatic extraction of ace inhibitory peptides from *Cyperus esculentus* by response surface method[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(14): 182–187.]
- [44] CHEN Y, ZHANG H, TIAN X, et al. Antioxidant potential of crocins and ethanol extracts of *Gardenia jasminoides* ELLIS and *Crocus sativus* L. : A relationship investigation between antioxidant activity and croc in contents[J]. *Food Chem*, 2008, 109: 484–492.
- [45] LIU S C, LIN J T, WANG C K, et al. Antioxidant properties of various solvent extracts from lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) flowers[J]. *Food Chem*, 2009, 114: 577–581.