



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109363984 B

(45) 授权公告日 2022.03.11

(21) 申请号 201811212655.X

A61Q 19/08 (2006.01)

(22) 申请日 2018.10.18

A61Q 19/02 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 109363984 A

(56) 对比文件

CN 107184522 A, 2017.09.22

CN 101284122 A, 2008.10.15

CN 107304391 A, 2017.10.31

(43) 申请公布日 2019.02.22

(73) 专利权人 浙江大学自贡创新中心

地址 643000 四川省自贡市高新工业园区

金川路69号

专利权人 广州华玺生物科技有限公司

审查员 马蕊华

(72) 发明人 钟晓明 吴铭杰

(74) 专利代理机构 杭州求是专利事务所有限公

司 33200

代理人 忻明年

(51) Int. Cl.

A61K 8/9789 (2017.01)

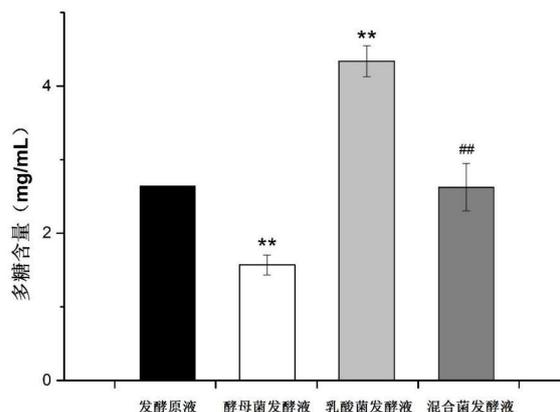
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

一种青刺果油粕发酵液及其制备方法和在化妆品中的应用

(57) 摘要

本发明公开了一种青刺果油粕发酵液及其制备方法和在化妆品中的应用。本发明包括如下步骤:步骤1、以青刺果油粕与水的混合物为发酵底物,加入酶进行酶解,以酿酒酵母菌为发酵菌种于23-30℃进行单独发酵,或以乳酸菌为发酵菌种于30-40℃进行单独发酵,或以酿酒酵母菌和乳酸菌为发酵菌种于30-40℃进行混合发酵,得到发酵产物;步骤2:取发酵产物,离心收集上清液,即为青刺果油粕发酵液。实验表明,本发明制备的青刺果发酵原浆具有较好的自由基清除能力以及酪氨酸酶抑制能力,可用于美白抗衰老化妆品中。本发明以提取完油脂后的油粕为原料,提高了青刺果的利用率以及经济附加值,且制备工艺简单,无需其他有机试剂,绿色环保,具有广阔的应用前景。



1. 一种青刺果油粕发酵液的制备方法,其特征在于包括如下步骤:

步骤1、以青刺果油粕与水的混合物为发酵底物,加入酶进行酶解,以乳酸菌为发酵菌种于30-40℃进行单独发酵;

步骤2:取发酵产物,离心收集上清液,即为青刺果油粕发酵液;

所述的发酵产物制备实现如下:将0.2g乳酸菌干粉、8mg果胶酶、10g青刺果油粕干粉和200mL水混合,然后37℃培养48小时,然后收集整个发酵体系,即为发酵产物;

所述的乳酸菌和青刺果油粕配比为 10^7 cfu:10g;

当青刺果油粕发酵液为青刺果油粕乳酸菌发酵原浆时,呈淡黄色至棕黄色液体、pH=3.6-3.9。

2. 一种青刺果油粕发酵液的制备方法,其特征在于包括如下步骤:

步骤1、以青刺果油粕与水的混合物为发酵底物,加入酶进行酶解,酿酒酵母菌和乳酸菌为发酵菌种于30-40℃进行混合发酵,得到混合发酵产物;

步骤2:取混合发酵产物,离心收集上清液,即为青刺果油粕发酵液;

所述的混合发酵产物的制备实现如下:将0.2g乳酸菌干粉、20mL活化后的酵母菌菌液、8mg果胶酶、10g青刺果油粕干粉和200mL水混合,37℃培养48小时,然后收集整个发酵体系,即为混合发酵产物,且酿酒酵母菌粉与乳酸菌菌粉混合的质量比为3:1;

所述的酵母菌菌液的制备实现如下:

将0.6g酿酒酵母EC1118干粉加入至10mL无菌水中,然后加入10mL青刺果油粕原液,35℃水浴活化酵母20min;

当青刺果油粕发酵液为青刺果油粕酵母菌和乳酸菌混合发酵原浆时,呈淡黄色至棕黄色液体、pH=3.8-4.1。

3. 根据权利要求1或2所述的一种青刺果油粕发酵液的制备方法,其制备的青刺果油粕发酵液应用于制备美白抗衰老化妆品。

一种青刺果油粕发酵液及其制备方法和在化妆品中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物发酵技术领域,具体涉及一种青刺果油粕发酵液及其制备方法和在化妆品中的应用。

背景技术

[0002] 青刺果又名阿那斯果,分布于在云南、贵州、四川、西藏等地。它主要生长于海拔1000-3000米的高寒山区或路边,耐旱耐寒,对环境的适应能力极强。其根、叶、果、均可食用或入药,具有清热解毒、活血化瘀、消炎止痛、健胃消食等作用。此外,青刺果油成分与人体脂质十分接近,能够很好地保持皮肤表面的水分和营养,并具有很好的抗衰老作用。作为青刺果油提炼工艺中的废弃物,青刺果油粕仍含有很多如维生素、蛋白质、黄酮等活性物质。但青刺果油粕却未得到很好的利用,成为亟待开发的植物资源之一。

[0003] 近年来,发酵技术在化妆品植物活性原料开发上有着很好的应用前景,微生物不仅能够有效富集植物活性成分、提高功效,还可以降低来自植物中其他物质的毒副作用。同时,微生物发酵还能降低有机试剂的使用,减少污染及能耗,已然成为化妆品工业上的研究热点之一。本发明利用酿酒酵母或乳酸菌或其混合菌发酵青刺果油粕,制备出青刺果油粕发酵原浆,其抗氧化活性和酪氨酸酶抑制率都有不同程度的提高,为青刺果油粕的有效利用提供了一个新的理论基础。

发明内容

[0004] 本发明的目的是针对现有技术的不足,提供一种青刺果油粕发酵液及其制备方法与在化妆品中的应用;

[0005] 本发明提供了供一种青刺果油粕发酵液的制备方法,具体包括如下步骤:

[0006] 步骤1、以青刺果油粕与水的混合物为发酵底物,以酿酒酵母菌为发酵菌种于23-30℃进行单独发酵,或以乳酸菌为发酵菌种于30-40℃进行单独发酵,或以酿酒酵母菌和乳酸菌为发酵菌种于30-40℃进行混合发酵,得到发酵产物;

[0007] 所述的乳酸菌包括保加利亚乳杆菌、嗜热链球菌、嗜酸乳杆菌、乳酸乳球菌、植物乳杆菌、干酪乳杆菌、副干酪乳杆菌的一种或多种的等比例混合。

[0008] 酿酒酵母菌和青刺果油粕配比为 10^5 - 10^8 cfu:5-15g,具体为 10^6 cfu:10g;

[0009] 乳酸菌和青刺果油粕配比为 10^6 - 10^9 cfu:5-15g,具体为 10^7 cfu:10g;

[0010] 所述酿酒酵母菌发酵条件为:T=23-30℃,20-40小时,具体为25℃,48小时;

[0011] 所述乳酸菌发酵条件为:T=30-40℃,40-50小时,具体为37℃,48小时;

[0012] 所述的以酿酒酵母菌和乳酸菌混合发酵条件为:T=30-40℃,40-50小时,具体为37℃,48小时;

[0013] 发酵体系为0.4-1.0g酿酒酵母菌粉或0.1-0.5g乳酸菌菌粉或二者混合、5-10mg果胶酶、5-15g青刺果油粕、180-250mL无菌水;

[0014] 当二者混合时,酿酒酵母菌粉与乳酸菌菌粉混合的质量比为3:1;

[0015] 具体的:0.6g酿酒酵母菌粉或0.2g乳酸菌干粉或0.6g酿酒酵母菌粉与0.2g乳酸菌干粉混合、8mg果胶酶、10g青刺果油粕、200mL无菌水进行配比发酵;

[0016] 步骤2:取发酵产物,离心收集上清液,即为青刺果油粕发酵液。

[0017] 所述离心方法为:3000-6000rpm,5-25min,具体为4000rpm,15min;

[0018] 所述当青刺果油粕发酵液为青刺果油粕酵母菌发酵原浆时,呈淡黄色至棕黄色液体、pH=4.1-4.4;为青刺果油粕乳酸菌发酵原浆时,呈淡黄色至棕黄色液体、pH=3.6-3.9;为青刺果油粕酵母菌和乳酸菌混合发酵原浆式,呈淡黄色至棕黄色液体、pH=3.8-4.1。

[0019] 本发明还保护一种产品,其特征为如权利要求6所述为青刺果油粕酵母菌发酵原浆,其具有抗氧化/DPPH自由基清除或/和美白功效。

[0020] 本发明还保护青刺果油粕酵母菌发酵原浆的制备方法。

[0021] 本发明还保护青刺果油粕酵母菌发酵原浆的应用。

[0022] 本发明还保护一种产品,其特征为如权利要求6所述为青刺果油粕乳酸菌发酵原浆,其具有抗氧化/DPPH自由基清除或/和美白功效。

[0023] 本发明还保护青刺果油粕乳酸菌发酵原浆的制备方法。

[0024] 本发明还保护青刺果油粕乳酸菌发酵原浆的应用。

[0025] 以上任一所述产品具体可为化妆品。所述化妆品包括但不限于:面膜、护肤霜或爽肤水。

[0026] 本发明利用生物技术发酵技术,通过选择合适的微生物和及其发酵条件,充分利用微生物的降解及转化作用,使青刺果油提炼中的副产物得到很好的利用,发酵过程中不添加其他有机试剂,提高了安全性和环保性,得到的发酵原浆比原来拥有更高的抗氧化活性和自由基清除能力,并具有较好的美白效果。

附图说明

[0027] 图1不同工艺处理的青刺果油粕发酵液中多糖含量的比较

[0028] 图2不同工艺处理的体积分数为3%的青刺果油粕发酵液对DPPH自由基清除效果影响

[0029] 图3不同工艺处理的青刺果油粕发酵液体外对酪氨酸酶活性的影响

[0030] 图4不同体积分数的青刺果油粕混合菌发酵液中对DPPH自由基清除效果

具体实施方式

[0031] 下面结合具体实施例对本发明作更进一步的说明,以便本领域的技术人员更了解本发明,但并不因此限制于本发明。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料,如无特殊说明,均为常规生化试剂商店购买得到的。以下实施例中的定量试验,均设置三次重复实验,结果取平均值。

[0032] 酿酒酵母EC1118 (*Saccharomyces cerevisiae* EC1118):购自法国拉曼集团。DPPH:购自西格玛奥德里奇(中国)化学有限公司,产品CAS号为1898-66-4。

[0033] 青刺果干粉的制备方法:取青刺果(果实),充分烘干后粉碎,得到青刺果干粉。青刺果产自云南丽江。

[0034] 乳酸菌干粉为保加利亚乳杆菌、嗜热链球菌、嗜酸乳杆菌、植物乳杆菌、干酪乳杆

菌等比例混合后经冷冻干燥后的粉末。

[0035] 实施例1、青刺果油粕酵母发酵液的制备方法

[0036] 一、制备青刺果油粕原液

[0037] 将烧瓶置于套式加热器中。把脱脂棉放入提取器底部,称取30g青刺果干粉于索氏提取器的提取器中,连接好烧瓶、提取器、回流冷凝管,并接通冷凝水,加热至60℃。沸腾后,溶剂的蒸气从烧瓶进到冷凝管中,冷凝后的溶剂回流到提取器中,浸取样品。溶剂在提取器内到达一定的高度时,就携带所提取的物质一同从侧面的虹吸管流入烧瓶中。溶剂就这样在仪器内循环流动,把所要提取的物质集中到下面的烧瓶内。提取时间为60min。

[0038] 收集提取后的青刺果油粕于60℃烘干,将10g青刺果油粕、8mg果胶酶和200mL无菌水混合,即为青刺果油粕原液。

[0039] 二、制备酵母菌菌液

[0040] 将0.6g酿酒酵母EC1118干粉加入至10mL无菌水中,然后加入10mL青刺果油粕原液,35℃水浴活化酵母20min。

[0041] 三、制备青刺果油粕酵母发酵原浆

[0042] 1.将20mL活化后的酵母菌菌液和200mL青刺果油粕原液混合,然后置于25℃静置发酵48h,然后收集整个发酵体系,即为发酵产物。

[0043] 2.取步骤1的产物,4000rpm离心10min,收集上清液,即为青刺果油粕发酵原浆。

[0044] 四、青刺果油粕酵母菌发酵原浆的性质

[0045] 青刺果油粕酵母菌发酵原浆:外观为淡黄色至棕黄色液体、pH=4.1-4.6;粗多糖浓度为62.8mg/L,总黄酮浓度为0.21mg/mL。

[0046] 实施例2、制备青刺果油粕乳酸菌发酵原浆

[0047] 一、制备青刺果油粕原液

[0048] 同实施例1中第一步

[0049] 二、制备青刺果油粕乳酸菌发酵原浆

[0050] 1.将0.2g乳酸菌干粉、8mg果胶酶、10g青刺果干粉和200mL水混合,然后37℃培养48小时,然后收集整个发酵体系,即为发酵产物。

[0051] 2.取步骤1的产物,4000rpm离心10min,收集上清液,即为青刺果油粕乳酸菌发酵原浆。

[0052] 三、青刺果油粕乳酸菌发酵原浆的性质

[0053] 青刺果油粕乳酸菌发酵原浆:外观为淡黄色至棕黄色液体、pH=3.6-3.9;粗多糖浓度为173.4mg/L,总黄酮浓度为0.22mg/mL。

[0054] 实施例3、制备青刺果油粕混合发酵原浆

[0055] 一、制备青刺果油粕原液

[0056] 同实施例1中第一步

[0057] 二、制备酵母菌菌液

[0058] 将0.6g酿酒酵母EC1118干粉加入至10mL无菌水中,然后加入10mL青刺果油粕原液,35℃水浴活化酵母20min。

[0059] 三、制备青刺果油粕混合发酵原浆

[0060] 1.将0.2g乳酸菌干粉、20mL活化后的酵母菌菌液、8mg果胶酶、10g青刺果干粉和

200mL水混合,37℃培养48小时,然后收集整个发酵体系,即为发酵产物。

[0061] 2.取步骤1的产物,4000rpm离心10min,收集上清液,即为青刺果油粕混合发酵原浆。

[0062] 四、青刺果油粕乳酸菌发酵原浆的性质

[0063] 青刺果油粕乳酸菌发酵原浆:外观为淡黄色至棕黄色液体、pH=3.8-4.1;粗多糖浓度为105.1mg/L,总黄酮浓度为0.25mg/mL。

[0064] 实施例4、青刺果油粕发酵原浆作为化妆品中的应用

[0065] 一、青刺果油粕酵母菌/乳酸菌/混合发酵原浆的抗氧化性能检测

[0066] 抗氧化活性采用DPPH法评价样品对自由基清除效率。DPPH自由基为稳定的有机自由基,大部分为人工合成,分子式为 $C_{18}H_{12}N_5O_6$ 。其乙醇或甲醇溶液为紫红色,当向DPPH自由基溶液中加入去自由基剂时,紫红色溶液会被还原成淡黄色溶液,其褪色程度与接收电子数量成线性关系,因而可以通过吸光度进行定量检测。

[0067] DPPH溶液为溶解于无水乙醇、浓度为 $6 \times 10^{-5} \text{mol/L}$ 的DPPH溶液。

[0068] 不同体积分数的青刺果油粕酵母菌/乳酸菌/混合发酵原浆的稀释溶剂为无水乙醇。

[0069] DPPH自由基清除实验的具体实验步骤为:

[0070] 1.青刺果油粕酵母菌/乳酸菌/混合发酵原浆0.5mL与2.5mL DPPH溶液混合(实验组);

[0071] 2.0.5mL无水乙醇与2.5mL DPPH溶液混合(空白组);

[0072] 3.室温避光静置30min后,测定三个组别的 A_{518} 。

[0073] 4.DPPH自由基清除率计算公式:清除率%=(实验组-空白组)/空白组

[0074] 由图2可知,青刺果油粕经发酵过后其DPPH清除率均有不同程度的提高,且均为显著性提高。由图4可知,实施例3制备的青刺果油粕混合菌发酵原浆在5%浓度以上范围对DPPH的清除率均在80%以上。青刺果油粕发酵原浆具有很好的抗氧化活性,能够清除细胞自由基,延缓细胞衰老,具有抗衰老的作用。

[0075] 二、青刺果酵母菌、乳酸菌发酵原浆的酪氨酸酶抑制率

[0076] 酪氨酸酶是已知的在皮肤黑色素生物合成代谢中的一种关键酶,其活性程度与黑色素的形成的数量和沉积起主要作用。大多数美白剂是通过阻断或者抑制酪氨酸酶活性,抑制黑色素的形成以达到美白的效果。

[0077] PB缓冲液为0.1mol/L、pH=6.8的 NaH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 缓冲液;

[0078] 酪氨酸酶液为溶解于PB缓冲液中,浓度为200U/mL的酶溶液;

[0079] L-酪氨酸溶液为溶解于PB缓冲液中,浓度为0.5mg/mL的酪氨酸溶液;

[0080] 酪氨酸酶抑制实验的具体步骤为:

[0081] 1.实验组:将100 μL 青刺果油粕酵母菌/乳酸菌/混合发酵原浆、1.75mL的0.1mol/L pH6.8磷酸缓冲液稀释和1mL的酪氨酸酶混合,25℃孵育10min,后加入1mL的L-酪氨酸溶液,继续孵育10min,测定其 A_{475} 。

[0082] 2.对照组:将2mL的0.1mol/L pH6.8磷酸缓冲液稀释和1mL的酪氨酸酶混合,25℃孵育10min,后加入1mL的L-酪氨酸溶液,继续孵育10min,测定其 A_{475} 。

[0083] 3.实验组空白:将100 μL 青刺果油粕酵母菌/乳酸菌/混合发酵原浆与2.75mL的

0.1mol/L pH6.8磷酸缓冲液稀释混合,25℃孵育10min,后加入1mL的L-酪氨酸溶液,继续孵育10min,测定其 A_{475} 。

[0084] 4.对照组空白:将3mL的0.1mol/L pH6.8磷酸缓冲液稀释置于25℃孵育10min,后加入1mL的L-酪氨酸溶液,继续孵育10min,测定其 A_{475} 。

[0085] 5.酪氨酸酶抑制率%计算公式:

[0086] $[(\text{对照组}-\text{对照组空白})-(\text{实验组}-\text{实验组空白})] \times 100 / (\text{对照组}-\text{对照组空白})$

[0087] 由图3可知,青刺果油粕经发酵后提高了其酪氨酸酶抑制率,且均为显著性提高,说明青刺果油粕发酵原浆具有抑制酪氨酸酶的能力,能够抑制黑色素的形成,具有很好的美白效果。

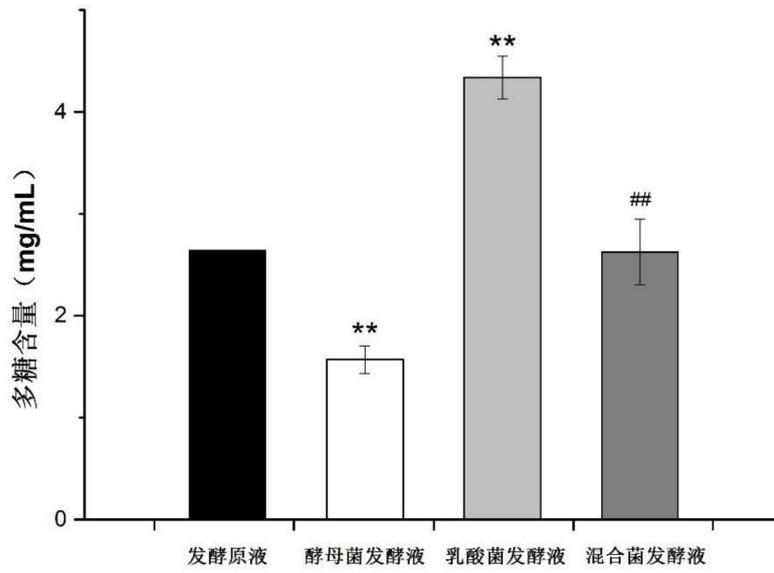


图1

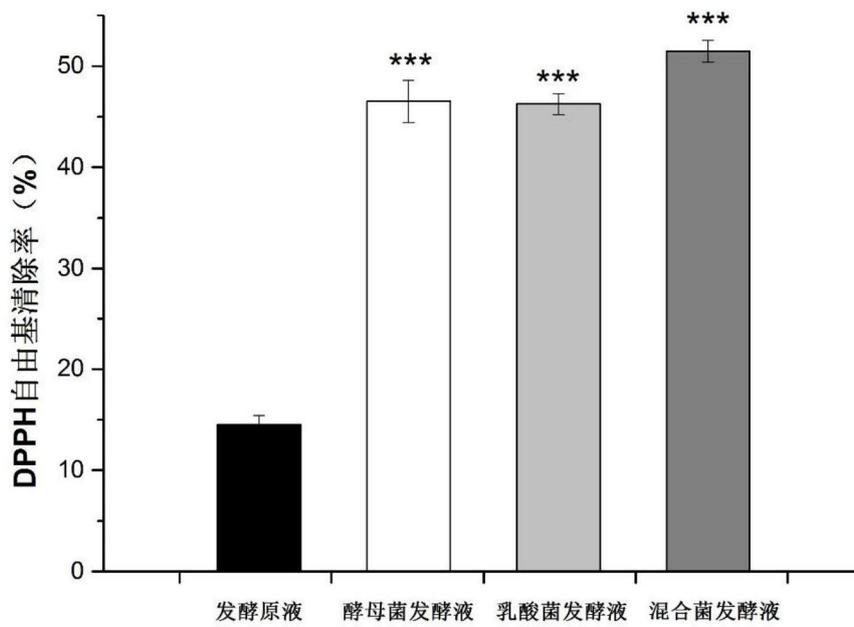


图2

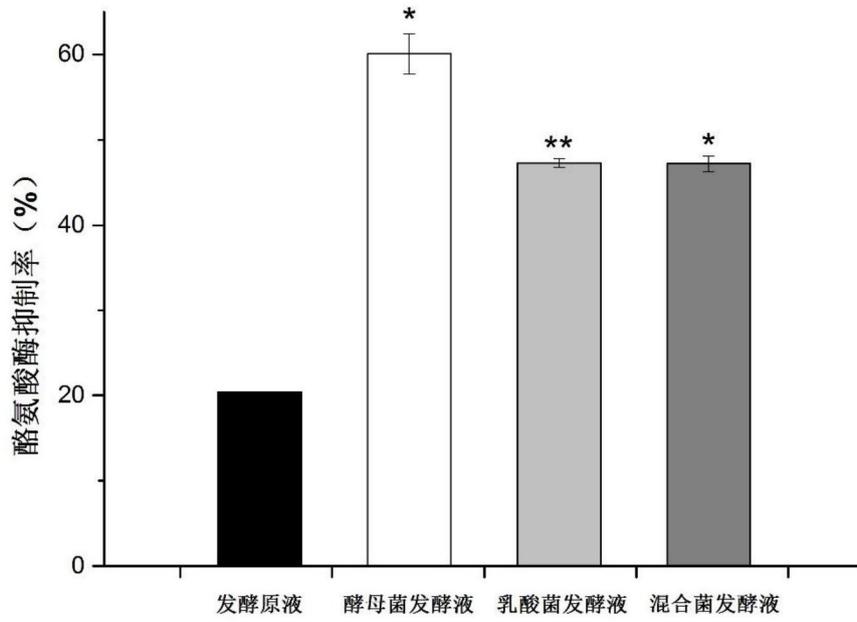


图3

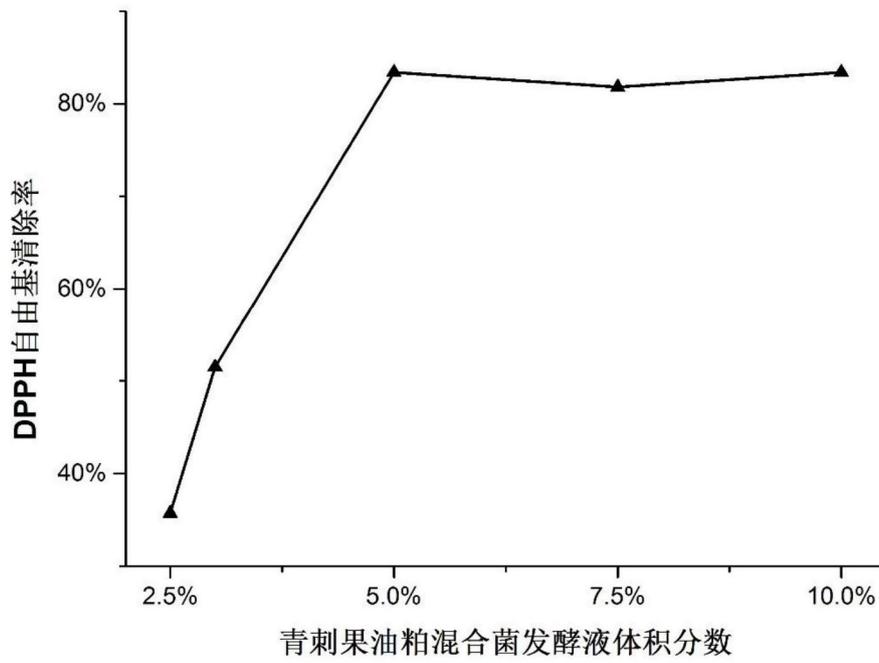


图4