



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106726949 B

(45)授权公告日 2020.10.27

(21)申请号 201611197114.5

A61Q 19/08(2006.01)

(22)申请日 2016.12.22

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号

CN 102690858 A,2012.09.26

申请公布号 CN 106726949 A

CN 105147564 A,2015.12.16

(43)申请公布日 2017.05.31

CN 104434549 A,2015.03.25

CN 105395468 A,2016.03.16

(73)专利权人 北京工商大学

审查员 周晶

地址 100037 北京市海淀区阜成路33号

专利权人 上海全丽生物科技有限公司

(72)发明人 王昌涛 李萌 方祥铭 方晓薇

赵丹 张佳婵 许丹妮

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

公司 11245

代理人 关畅 吴爱琴

(51)Int.Cl.

A61K 8/9789(2017.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种葡萄籽发酵原浆化妆品及其制备方法与应用

(57)摘要

本发明提供一种葡萄籽发酵原浆化妆品及其制备方法与应用。所述葡萄籽发酵原浆的制备方法,包括如下步骤:将葡萄籽干粉、水和菌液混合得到初始体系,对初始体系进行发酵培养,得到葡萄籽发酵原浆。所述菌液中,菌种为乳酸乳球菌,具体可为乳杆菌。所述葡萄籽发酵原浆在制备具有下述1)-4)中至少一种功能的化妆品中的应用或在直接作为具有下述1)-4)中至少一种功能的化妆品中的应用,也在本发明的保护范围内:1)清除DPPH自由基;2)刺激胶原蛋白产生;3)抗氧化;4)抗衰老。所述化妆品为面膜、精华液或爽肤水。本发明方法利用发酵工程技术从葡萄籽中提取活性物质,操作简单,且由于不添加任何外来物质,制备得到的葡萄籽发酵物即葡萄籽发酵原浆对皮肤安全无伤害,具有更高的抗衰老活性。

1. 一种葡萄籽发酵原浆的制备方法,包括如下步骤:将葡萄籽干粉、水和菌液混合得到初始体系,对所述初始体系进行发酵培养,得到葡萄籽发酵原浆;

所述制备方法中,所述菌液浓度为 $(10^5 \sim 10^8)$ CFU/mL;

所述初始体系中,所述菌液、葡萄籽干粉和水的配比为 $(5 \sim 8\text{mL}) : (20 \sim 25)\text{g} : 300\text{mL}$;

所述发酵培养的温度为 $40 \sim 50^\circ\text{C}$;时间为 $30 \sim 45\text{h}$;

所述菌液中,菌种为德氏乳杆菌保加利亚亚种*Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*。

2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于:所述葡萄籽干粉通过将新鲜葡萄籽烘干粉碎得到。

3. 根据权利要求1或2所述的制备方法,其特征在于:所述制备方法还包括对所述发酵培养后得到的发酵液依次进行灭菌、离心、取上清液得到葡萄籽发酵原浆的步骤。

4. 根据权利要求3所述的制备方法,其特征在于:所述灭菌的条件如下:灭菌温度为 $115 \sim 121^\circ\text{C}$;灭菌时间为 $25 \sim 35\text{min}$;

所述离心的条件如下:离心转速为 $3800 \sim 4200\text{r/min}$;离心时间为 $10 \sim 15\text{min}$;离心半径为 9cm 。

5. 由权利要求1-4中任一项所述制备方法制备得到的葡萄籽发酵原浆。

6. 权利要求5所述的葡萄籽发酵原浆在制备具有下述至少一种功能的化妆品中的应用或在直接作为具有下述至少一种功能的化妆品中的应用:

- 1) 清除DPPH自由基;
- 2) 刺激胶原蛋白产生;
- 3) 抗氧化;
- 4) 抗衰老。

7. 根据权利要求6所述的应用,其特征在于:所述化妆品为面膜、精华液或爽肤水。

一种葡萄籽发酵原浆化妆品及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种葡萄籽发酵原浆化妆品及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 葡萄籽中多种成分具有极高的营养价值和保健价值。葡萄籽中含有丰富的水蛋白质、氨基酸、矿物质、脂肪、碳水化合物和膳食纤维等多种营养素。此外,还含有多种功能性成分,包括原花青素、葡萄籽油、白藜芦醇、维生素E、单宁等,这些成分均具有较高的营养价值和美容保健作用。葡萄籽中的多酚类天然抗氧化剂无论是含量还是种类都比葡萄皮和葡萄果肉丰富得多,籽中的这些多酚类物质表现出了极强的抗氧化能力。将葡萄籽进行发酵并加以应用,可充分发挥葡萄籽中功能性成分的美容功效,生物利用率高。

[0003] 植物活性成分因其高的安全性和功能活性,已明显地渗入到食品、医药、化妆品等行业。因此,利用各种提取技术从植物中提取具有高活性的成分已经成为目前的研究热点。传统的提取技术包括有机溶剂提取法、热水提取法、系统溶剂提取法等,但这些方法产品安全性低、耗时长、提取率低。安全性高、提取率高和环保的新型提取方法越来越受人们关注。微生物法提取植物活性成分是利用微生物在生长过程中分泌的多种酶,从而对植物中的活性成分进行提取和修饰。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种葡萄籽发酵原浆的制备方法。

[0005] 本发明所提供的葡萄籽发酵原浆的制备方法,包括如下步骤:将葡萄籽干粉、水和菌液混合得到初始体系,对所述初始体系进行发酵培养,得到葡萄籽发酵原浆。

[0006] 上述制备方法中,所述葡萄籽干粉通过将新鲜葡萄籽烘干粉碎得到,粒径可为30~40目,具体可为40目。

[0007] 所述菌液中,菌种为乳酸乳球菌,具体可为乳杆菌,具体可为德氏乳杆菌,更具体可为德氏乳杆菌保加利亚亚种*Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*。

[0008] 所述菌液浓度可为 $(10^5 \sim 10^8)$ CFU/mL。

[0009] 所述菌液的pH值可为6.5~7.5,具体可为7.0

[0010] 所述初始体系中,所述菌液、葡萄籽干粉和水的配比可为(5~8mL):(20~25)g:300mL,具体可为6mL:22g:300mL。

[0011] 所述发酵培养的温度可为40~50℃,具体可为45℃;时间可为30~45h,具体可为36h。

[0012] 上述制备方法还包括对所述发酵培养后得到的发酵液依次进行灭菌、离心、取上清液得到葡萄籽发酵原浆的步骤。

[0013] 所述灭菌的条件如下:灭菌温度可为115~121℃,具体可为115℃;灭菌时间可为25~35min,具体可为30min。

[0014] 所述离心的条件如下:离心转速可为3800~4200r/min,具体可为4000r/min;离心时间可为10~15min,具体可为10min;离心半径可为9cm。

[0015] 上述方法制备得到的葡萄籽发酵原浆也属于本发明的保护范围。

[0016] 上述葡萄籽发酵原浆在制备具有下述1)-4)中至少一种功能的化妆品中的应用或在直接作为具有下述1)-4)中至少一种功能的化妆品中的应用,也在本发明的保护范围内:

[0017] 1) 清除DPPH自由基;

[0018] 2) 刺激胶原蛋白产生;

[0019] 3) 抗氧化;

[0020] 4) 抗衰老。

[0021] 上述应用中,所述化妆品包括但不限于:面膜、精华液或爽肤水。

[0022] 本发明方法利用发酵工程技术从葡萄籽中提取活性物质,操作简单,且由于不添加任何外来物质,制备得到的葡萄籽发酵物即葡萄籽发酵原浆对皮肤安全无伤害,具有更高的抗衰老活性。

[0023] 本发明具有如下有益效果:

[0024] (1) 本发明提供的葡萄籽发酵物(即葡萄籽发酵原浆)的制备方法采用发酵工程技术,通过选择合适的菌种及发酵条件,从葡萄籽中提取得到活性物质。一方面,可最大程度保留植物中的活性成分,且相对于传统的水提法,避免了有机溶剂的引入,安全环保;另一方面,不需要添加酶等外来物质,不仅节约生产成本,而且最大化的简化了生产步骤,使该发酵技术能够实现大量生产、工业化生产,并能够充分保证产品质量的稳定性。

[0025] (2) 本发明提供的葡萄籽发酵原浆含有健康皮肤不可或缺的氨基酸、矿物质等自然成分,且由于在制备过程中未引入外来物质,不含任何化学成分,可以直接作为面膜或精华液或爽肤水的成品使用,比现有市面上的其他产品更加天然,不会给肌肤造成任何负作用。

[0026] (3) 本发明提供的葡萄籽发酵原浆,具有较强的抗氧化能力可清除DPPH自由基、促进胶原蛋白生成,提高机体生命力,从而延缓细胞老化,具有抗衰老的功效。

附图说明

[0027] 图1为葡萄籽发酵原浆对DPPH自由基清除率的关系曲线。

[0028] 图2为葡萄籽发酵原浆促进胶原蛋白合成的关系曲线。

具体实施方式

[0029] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0030] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0031] 下述实施例中的液体培养基由溶质和溶剂组成,溶剂为水,溶质及其在液体培养基中的浓度为:葡萄糖20g/L,蛋白胨20g/L,酵母膏10g/L,pH值为7.0。

[0032] 下述实施例中的YPD培养基由溶质和溶剂组成,溶剂为水,溶质及其在液体培养基中的浓度为:酵母提取物1%(质量分数),胰蛋白胨2%(质量分数),葡萄糖2%(质量分数),pH值为7.0。

[0033] 下述实施例中的葡萄籽干粉来自市面销售,40目。

[0034] 下述实施例中的德氏乳杆菌为德氏乳杆菌保加利亚亚种 *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*。

[0035] 下述实施例中的菌液按照如下步骤制得：

[0036] 1、菌种的活化

[0037] 挑取德氏乳杆菌菌落一环于液体培养基中，放入摇床中将菌种活化，得到活化后的德氏乳杆菌。

[0038] 2、菌种的纯化

[0039] 将步骤1得到的活化后的菌液梯度稀释铺板，以便获取单菌落，得到纯化后乳杆菌。

[0040] 3、菌种的扩大培养

[0041] 将步骤2得到的纯化后的菌种接种到YPD培养基 (pH值为7.0) 中，在25℃的摇床中培养，当OD值=0.5-1.0时，得到发酵菌液 (菌种处在对数期，浓度为 $10^5 \sim 10^8$ CFU/mL)。

[0042] 实施例1、制备葡萄籽发酵原浆

[0043] 按照如下步骤制备葡萄籽发酵原浆：

[0044] (1) 将6mL步骤3得到的浓度为 $10^5 \sim 10^8$ CFU/mL的发酵菌液接种到22g的葡萄籽干粉和300mL的水中，得到发酵体系；

[0045] (2) 将上述发酵体系在45℃摇床中发酵36小时，得到发酵产物；

[0046] (3) 将上述发酵产物115℃下灭菌30min，使菌失活，得到灭菌后的发酵产物；将灭菌后的发酵产物在4000r/min，离心半径为9cm的条件下离心10min，弃沉淀，收集上清液，即为葡萄籽发酵原浆。

[0047] 实施例2、葡萄籽发酵原浆在作为化妆品中的应用

[0048] 一、葡萄籽发酵原浆的性质

[0049] 将实施例1所制备所得的发酵原浆经活性炭脱色、去味。其外观为粘稠液体、颜色为淡黄色至棕黄色。pH值6.2-7.0，粘度190-230cP，可溶性固含物含量3.0-3.5%，菌落总数小于50CFU/mL，无致病菌检出。根据化妆品卫生标准GB7916-87，化妆品细菌总数不高于1000CFU/mL，所以此发酵原浆符合化妆品质量要求。

[0050] 对该葡萄籽发酵原浆进行成分分析，粗多糖检测方法参照GB/T 5009.8-2008；黄酮检测方法参照GB/T 5009.124-2003，蛋白质检测方法参照GB5009.5-2010，原花青素检测方法参照GB/T 22244-2008，所得结果如下：

[0051] 本发明制得的葡萄籽发酵原浆含粗多糖2.48g/kg、总黄酮17.36g/kg、总蛋白7.73g/kg、原花青素1.39g/kg。

[0052] 二、葡萄籽发酵原浆的安全性检测

[0053] 人体斑贴试验主要是用于检测化妆品终产品或原料的刺激性。本发明对实施例1中获得的葡萄籽发酵原浆进行人体封闭式斑贴试验，旨在对其潜在皮肤刺激性进行评估。

[0054] 1、试验对象

[0055] 选择合适的志愿者30人，年龄范围在18-60岁随机选择。

[0056] 2、试验方法

[0057] 称取0.020g-0.025g固体样品或半固体的样品放入斑试器中备用。将液体样品0.2mL到0.025mL滴加在滤纸片上，再将滤纸片置于斑试器内。每个样品均设置空白对照，在

对照斑试器孔内加入与样品等量的样品溶剂,如蒸馏水或橄榄油(本实施例采用蒸馏水)。

[0058] 试验部位选为人体背部,利用无刺激性的胶带将斑试器固定贴敷于受试者背部。测试周期持续24h。为了试验结果的准确、可信和科学,在测试期间志愿者按照要求,不能摘掉斑试器,亦不可使受试部位接触水。24h后去除斑试器,静置30min后,等待压痕消失,观察皮肤的反应。如果试验结果为阴性,则需要在斑贴试验后24h和48h分别再观察一次。

[0059] 3、试验结果

[0060] 斑贴试验结果如表1所示,表1中各符号表示的含义如下:“-”=阴性反应;“±”=可疑反应:仅有微弱红斑;“+”=弱阳性反应(红斑反应):红斑、浸润、水肿、可有丘疹;“++”=强阳性反应(疱疹反应):红斑、浸润、水肿、丘疹、疱疹;反应可超出受试区;“+++”=极强阳性反应(融合性疱疹反应):明显红斑、严重浸润、水肿、融合性疱疹;反应超出受试区。

[0061] 判断标准:根据化妆品卫生规范2007,30例受试者中出现1级皮肤不良反应的人数多于5例,或出现二级皮肤不良反应的人数多于2例,或出现任何1例三级或三级以上皮肤不良反应时,则判定受试物对人体有不良反应,反之,则视为对人体无不良反应。

[0062] 表1、实施例1获得的葡萄籽发酵原浆的斑贴试验结果

样品名称	反应程度	反应例数(去除斑试器)			反应人数
		30 分钟后	24 小时后	48 小时后	
空白	—	30	30	30	0
	±	—	—	—	
	+	—	—	—	
	++	—	—	—	
	+++	—	—	—	
葡萄籽发酵原浆	—	28	30	30	2
	±	2	—	—	
	+	—	—	—	
	++	—	—	—	
	+++	—	—	—	

[0063] 从表1中可以看出:实施例1得到的葡萄籽发酵原浆产生2例可疑反应,说明本发明提供的葡萄籽发酵原浆均具有安全性,不会给人体带来不良反应。

[0064] 三、葡萄籽发酵原浆的抗氧化性能检测

[0065] DPPH是一种早期合成的有机自由基,常用来评估抗氧化物的供氢能力,它在有机溶剂中非常稳定,呈紫色,而且在517nm处有一个特征吸收峰,当遇到自由基清除剂时,DPPH的孤对电子被配对而使其退色,也就是在最大吸收波长处的吸光值变小。因此,可通过测定吸光值的变化来评价样品对DPPH自由基的清除效果。

[0066] 取不同量的实施例1制备得到的葡萄籽发酵原浆溶于去离子水中,制得体积百分浓度为0.63%、1.25%、2.5%、5%和10%的一系列葡萄籽发酵原浆待测液。

[0067] DPPH自由基清除实验的具体实验步骤为:

[0068] (1) 取等体积(一般为3mL)的待测液与 2×10^{-4} mol/L的DPPH溶液混匀(A₁管);

[0069] (2) 取等体积的无水乙醇(待测物溶剂)与 2×10^{-4} mol/L的DPPH溶液混匀(A₂管);

[0070] (3) 取等体积的无水乙醇与待测液混匀(A₃管);

[0071] (4) 反应30min后,在517nm下测A₁、A₂、A₃管吸光度值。

[0073] 清除率计算公式为:清除率(%) = $[(A_2+A_3) - A_1] / A_2$ (1)

[0074] 以葡萄籽发酵原浆待测液的体积百分浓度为横坐标,清除率为纵坐标,制作葡萄籽发酵原浆对DPPH自由基清除作用曲线,见图1。

[0075] 由图1可知,实施例1所得葡萄籽发酵原浆在稀释10倍后对DPPH自由基清除率达105.16%,0.1%(体积百分浓度)的葡萄籽发酵原浆可清除50%的DPPH自由基。说明葡萄籽发酵原浆具有很强的抗氧化能力可清除自由基,促进细胞代谢,增强细胞活力,改善机体的结构和功能,提高机体生命力,从而延缓细胞老化,发挥其抗衰老的作用。

[0076] 四、葡萄籽发酵原浆刺激胶原蛋白生成

[0077] 胶原蛋白是人体皮肤的主要成分,起到支撑器官,保护机体的功能。同时胶原蛋白是维持皮肤与肌肉弹性的主要成分,随着年龄的增长、紫外线照射等内外因素,胶原蛋白的合成能力下降,皮肤的胶原蛋白含量每年以平均1%的速度递减,一旦胶原蛋白缺乏,胶原纤维就会发生交联固化,使细胞间粘多糖减少,胶原蛋白与弹力蛋白交互构成有规则的网目结构会逐渐崩解,同时可导致真皮的纤维断裂,脂肪萎缩,汗腺及皮脂腺分泌减少,皮肤便会失去弹性并变薄老化,使皮肤出现色斑、皱纹、皴裂等一系列老化现象。通过检测葡萄籽发酵原浆作用对胶原蛋白合成的影响。

[0078] 采用0.22um滤膜对葡萄籽发酵原浆进行过滤,使用无血清的DMEM培养基将样品稀释为0.06%、0.53%和5%(体积百分浓度),作用于成纤维细胞24h后,取上清液。胶原蛋白含量具体检测方法参照南京建成生物科技有限公司生产的人I型胶原(COLI)酶联免疫检测试剂盒。

[0079] 以葡萄籽发酵原浆浓度为横坐标,胶原蛋白浓度为纵坐标,制作葡萄籽发酵原浆对胶原蛋白合成作用柱状图。见图2。

[0080] 由图2可知,实施例1获得的葛根发酵原浆对胶原蛋白合成有促进作用。1%和5%浓度的葡萄籽发酵原浆作用下,胶原蛋白浓度分别为11.14ng/ml,14.92ng/ml,均高于未加葡萄籽发酵原浆的对照组。因此,葡萄籽发酵原浆有促进胶原蛋白合成,从而起到减缓皮肤衰老的功效。

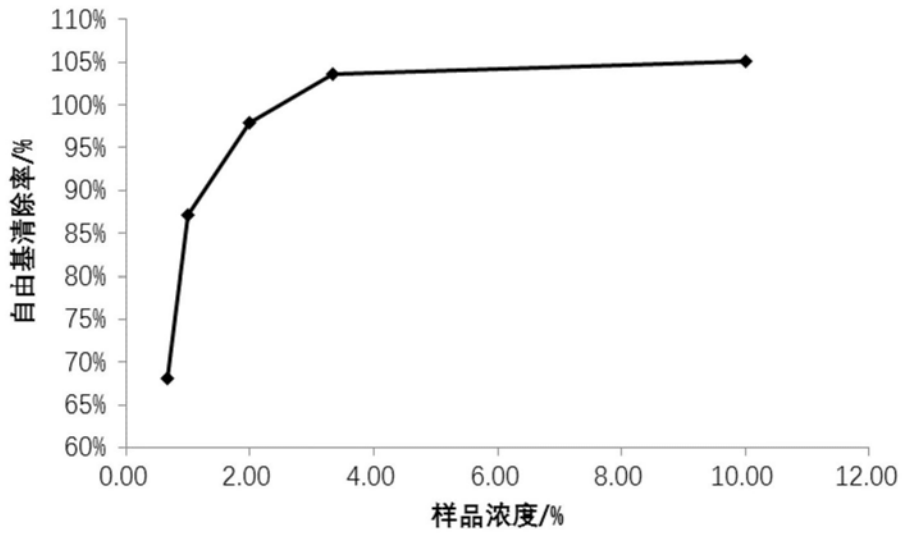


图1

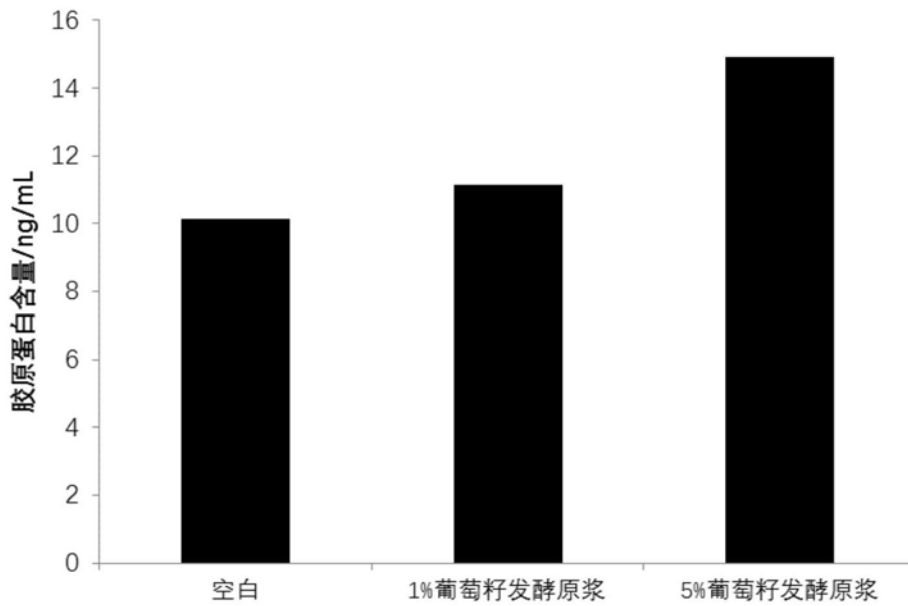


图2