



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113143812 B

(45) 授权公告日 2022.03.25

(21) 申请号 202011640720.6

(22) 申请日 2020.12.31

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113143812 A

(43) 申请公布日 2021.07.23

(83) 生物保藏信息
CGMCC No.21528 2020.12.23
CGMCC No.21527 2020.12.23

(73) 专利权人 江苏瑞霆生物科技有限公司
地址 214142 江苏省无锡市新吴区长江南
路35号-323厂房

(72) 发明人 袁明来 赵炳天 杜养标

(74) 专利代理机构 南京禹为知识产权代理事务
所(特殊普通合伙) 32272
代理人 刘峰

(51) Int.Cl.
A61K 8/9789 (2017.01)
A61Q 19/00 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 111518709 A, 2020.08.11

审查员 原浩杰

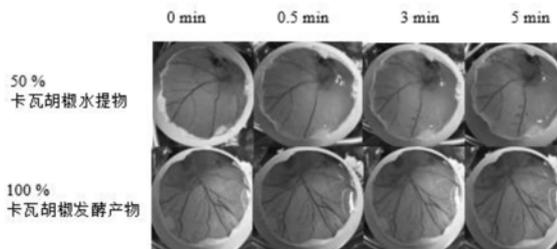
权利要求书1页 说明书11页 附图1页

(54) 发明名称

一种卡瓦胡椒发酵物的制备方法和产品及其在化妆品中的应用

(57) 摘要

本发明公开了一种卡瓦胡椒发酵物的制备方法和产品及其在化妆品中的应用,将菌种接种至发酵培养基中,恒温培养,发酵结束,将发酵液灭活;将灭活的发酵液离心,取离心后上清液,陶瓷膜过滤,即得所述卡瓦胡椒发酵物;其中,所述菌种包括酿酒酵母菌和乳酸杆菌,接种量按照发酵体系质量百分比计,所述酿酒酵母菌接种量为5%,所述乳酸杆菌接种量为5%。本发明提供一种卡瓦胡椒发酵物的制备方法,制得的卡瓦胡椒发酵产物温和无刺激,相对于化工提取,更加绿色、环保、安全,且对脂肪细胞分泌油脂效果抑制率达到94.2%,在化妆品中有广泛的应用。



1. 一种卡瓦胡椒发酵物的制备方法,其特征在于:包括,
将菌种接种至含有卡瓦胡椒根的发酵培养基中,恒温培养,发酵结束,将发酵液灭活;
将灭活的发酵液离心,取离心后上清液,陶瓷膜过滤,即得所述卡瓦胡椒发酵物;其中,
所述菌种包括酿酒酵母菌和植物乳杆菌,接种量按照发酵体系体积百分比计,所述酿酒酵母菌接种量为5%,所述植物乳杆菌接种量为5%;

所述酿酒酵母菌*Saccharomyces cerevisiae*,其保藏编号为CGMCC No.21527,保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心;

所述植物乳杆菌*Lactobacillus plantarum*,其保藏编号为CGMCC No.21528,保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心。

2. 如权利要求1所述卡瓦胡椒发酵物的制备方法,其特征在于:所述卡瓦胡椒根,其制备方法为:将卡瓦胡椒根清洗干净并烘干后,分别用粉碎机粉碎至100目。

3. 如权利要求1或2所述卡瓦胡椒发酵物的制备方法,其特征在于:所述发酵培养基,以g/L计,包括卡瓦胡椒根20~40,大米粉为3~8,脱脂奶粉为3~8,蜂蜜15~25,葡萄糖15~25;

发酵培养基pH 6.0~7.5,纯水1.0L,经过121℃灭菌20min制得。

4. 如权利要求1或2所述卡瓦胡椒发酵物的制备方法,其特征在于:所述恒温培养,包括,将菌种接种至发酵培养基中,在25~40℃、180~250rpm恒温培养摇床中培养24~48h。

5. 权利要求1~4中任一所述卡瓦胡椒发酵物的制备方法制得的卡瓦胡椒发酵物,其特征在于:所述卡瓦胡椒发酵物温和无刺激,且对脂肪细胞分泌油脂效果抑制率达到94.2%。

6. 权利要求5所述卡瓦胡椒发酵物的制备方法制得的卡瓦胡椒发酵物在制备化妆品中的应用。

一种卡瓦胡椒发酵物的制备方法和产品及其在化妆品中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于植物发酵技术领域,具体涉及到一种卡瓦胡椒发酵物的制备方法和产品及其在化妆品中的应用。

背景技术

[0002] 卡瓦胡椒是胡椒科多年生直立灌木类药用植物,其根、茎、叶可入药,有效部位为脂溶性树脂部分。卡瓦胡椒以其无成瘾性、来源渠道合法,并被欧洲卫生部门认为是抗焦虑良药等诸多因素,而日渐被人们所熟悉并迅速风行起来。

[0003] 卡瓦胡椒的主要药效成分是卡瓦内酯(Kawalactones)、麻醉椒碱、醉椒素(Kawain)等,卡瓦内酯类含量高达30%~70%,能够双效调节神经递质,具有抗焦虑和抑郁、镇静催眠、局部麻醉、抗惊厥等多种作用;还具有抗炎、抗真菌等功效,且未观察到药物依赖性。其提取物采用乙醇动态提取法提取所得,卡瓦内酯的提取率在13%~23%不等,提取效率低,且乙醇用量大,工艺复杂,提取成本高。根据文献报道,卡瓦胡椒提取物具有一定的细胞毒性,作用在皮肤上会有一些刺激性。

发明内容

[0004] 本部分的目的在于概述本发明的实施例的一些方面以及简要介绍一些较佳实施例。在本部分以及本申请的说明书摘要和发明名称中可能会做些简化或省略以避免使本部分、说明书摘要和发明名称的目的模糊,而这种简化或省略不能用于限制本发明的范围。

[0005] 鉴于上述和/或现有技术中存在的问题,提出了本发明。

[0006] 因此,本发明的目的是,克服现有技术中的不足,提供一种卡瓦胡椒发酵物的制备方法。

[0007] 为解决上述技术问题,本发明提供了如下技术方案:一种卡瓦胡椒发酵物的制备方法,包括,

[0008] 将菌种接种至发酵培养基中,恒温培养,发酵结束,将发酵液灭活;

[0009] 将灭活的发酵液离心,取离心后上清液,陶瓷膜过滤,即得所述卡瓦胡椒发酵物;其中,

[0010] 所述菌种包括酿酒酵母菌和植物乳杆菌,接种量按照发酵体系体积百分比计,所述酿酒酵母菌接种量为5%,所述植物乳杆菌接种量为5%。

[0011] 作为本发明所述卡瓦胡椒发酵物制备方法的一种优选方案,其中:所述卡瓦胡椒根,其制备方法为:将卡瓦胡椒根清洗干净并烘干后,分别用粉碎机粉碎至100目。

[0012] 作为本发明所述卡瓦胡椒发酵物制备方法的一种优选方案,其中:所述酿酒酵母菌*Saccharomyces cerevisiae*,其保藏编号为CGMCC No.21527,保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心。

[0013] 作为本发明所述卡瓦胡椒发酵物制备方法的一种优选方案,其中:所述植物乳杆

菌*Lactobacillus plantarum*,其保藏编号为CGMCC No.21528,保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心。

[0014] 作为本发明所述卡瓦胡椒发酵物制备方法的一种优选方案,其中:所述发酵培养基,以g/L计,包括卡瓦胡椒根20~40,大米粉为3~8,脱脂奶粉为3~8,蜂蜜15~25,葡萄糖15~25;

[0015] 发酵培养基pH 6.0~7.5,纯水1.0L,经过121℃灭菌20min制得。

[0016] 作为本发明所述卡瓦胡椒发酵物制备方法的一种优选方案,其中:所述恒温培养,包括,将菌种接种至发酵培养基中,在25~40℃、180~250rpm恒温培养摇床中培养24~48h。

[0017] 本发明的再一个目的是,克服现有技术中的不足,提供一种卡瓦胡椒发酵物的制备方法制得的产品。

[0018] 为解决上述技术问题,本发明提供了如下技术方案:一种卡瓦胡椒发酵物的制备方法制得的卡瓦胡椒发酵物,所述卡瓦胡椒发酵产物温和无刺激,且对脂肪细胞分泌油脂效果抑制率达到94.2%

[0019] 本发明的另一个目的是,克服现有技术中的不足,提供一种卡瓦胡椒发酵物的制备方法制得的卡瓦胡椒发酵物在化妆品中的应用。

[0020] 本发明有益效果:

[0021] (1)本发明提供一种卡瓦胡椒发酵物的制备方法,制得的卡瓦胡椒发酵产物温和无刺激,相对于化工提取,更加绿色、环保、安全,且对脂肪细胞分泌油脂效果抑制率达到94.2%,在化妆品中有广泛的应用。

[0022] (2)本发明提供了酿酒酵母菌*Saccharomyces cerevisiae*,其保藏编号为CGMCC No.21527,保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心;植物乳杆菌*Lactobacillus plantarum*,其保藏编号为CGMCC No.21528,保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,通过两者相互组合发酵卡瓦胡椒,来生产抗脂质分泌的卡瓦胡椒化妆品组成物,对脂肪细胞分泌油脂效果抑制率达到94.2%,同时使得最终的卡瓦胡椒发酵产物性质温和,无刺激;相对于化工提取,更加绿色、环保、安全。

附图说明

[0023] 为了更清楚地说明本发明实施例的技术方案,下面将对实施例描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动性的前提下,还可以根据这些附图获得其它的附图。其中:

[0024] 图1为本发明实施例中阳性对照、阴性对照样品对CAM刺激结果对比图。

[0025] 图2为本发明实施例中卡瓦胡椒发酵前后样品对CAM刺激结果对比图。

具体实施方式

[0026] 为使本发明的上述目的、特征和优点能够更加明显易懂,下面结合说明书实施例对本发明的具体实施方式做详细的说明。

[0027] 在下面的描述中阐述了很多具体细节以便于充分理解本发明,但是本发明还可以

采用其他不同于在此描述的其它方式来实施,本领域技术人员可以在不违背本发明内涵的情况下做类似推广,因此本发明不受下面公开的具体实施例的限制。

[0028] 其次,此处所称的“一个实施例”或“实施例”是指可包含于本发明至少一个实现方式中的特定特征、结构或特性。在本说明书中不同地方出现的“在一个实施例中”并非均指同一个实施例,也不是单独的或选择性的与其他实施例互相排斥的实施例。

[0029] 本发明中植物乳杆菌*Lactobacillus plantarum*,于2020年12月23日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号,中国科学院微生物研究所,保藏编号为CGMCC No.21528;本发明中酿酒酵母菌*Saccharomyces cerevisiae*,于2020年12月23日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号,中国科学院微生物研究所,保藏编号为CGMCC No.21527。

[0030] 测试方法

[0031] 脂肪细胞分化抑制效果的测试方法:

[0032] 人皮下脂肪细胞(BNCC338404;HPA-S)培养在12Well培养皿中,培养基采用10% FBS的DMEM培养基,长满到90%时,用MD1 cocktail (IBMX 0.5mM,地塞米松1 μ M,胰岛素1 μ g/mL)处理两天,第三天用含有胰岛素1 μ g/mL的完全培养基培养3天,然后更换成不含胰岛素的完全培养基再培养。开始诱导时添加样品,每更换培养基时共同添加样品处理(最终浓度为1%发酵液)。分化的细胞中脂肪的量用Oil Red O来染色,然后用异丙醇溶解,在540nm测定吸光度。

[0033] 抑制率% = $[1 - (A_{\text{样品}}/A_{\text{空白}})] * 100$

[0034] 中性脂肪粒细胞-甘油三酯抑制效果测定方法:

[0035] 与上述方法一样,用MDI诱导人皮下脂肪细胞,然后细胞中产生的甘油三酯的量,采用甘油三酯ELISA kit测定(sigma,USA),测定结果跟未处理组对比。

[0036] 培养基

[0037] 乳酸菌培养基(MRS培养基)(g/L):

[0038] 蛋白胨10.0,牛肉膏10.0,酵母粉5.0,柠檬酸氢二铵2.0,葡萄糖20,吐温801mL,乙酸钠5.0,磷酸氢二钾2.0,硫酸镁0.58,硫酸锰0.25,(固体含有琼脂18)蒸馏水1.0L,pH 6.5,pH,121 $^{\circ}$ C灭菌20min。

[0039] 酵母菌培养基(YPD培养基)(g/L):

[0040] 蛋白胨20,酵母粉10,葡萄糖20,pH 6.5,纯水1.0L,121 $^{\circ}$ C灭菌20min。

[0041] 曲霉菌培养基,大米粉发酵培养基(g/L):大米粉20,葡萄糖10。

[0042] PDA培养基:马铃薯200g加入1L纯化水,煮沸30min,用纱布过滤浸汁,加入20g葡萄糖、20g琼脂粉,加水定容至1000mL,pH自然,121 $^{\circ}$ C灭菌倒入茄形瓶凝固备用。

[0043] 菌种活化方法:

[0044] 乳酸菌:从甘油冻管中取出200 μ L菌液,涂布至MRS固体培养基中,在37 $^{\circ}$ C培养箱中培养24h;待长出单菌落后,再继续挑选单菌落转接至新平板上,在37 $^{\circ}$ C培养箱中培养24h后,放置在4 $^{\circ}$ C冰箱备用。

[0045] 酵母菌:从甘油冻管中取出200 μ L菌液,涂布至YPD固体培养基中,在30 $^{\circ}$ C培养箱中培养48h;待长出单菌落后,再继续挑选单菌落转接至新平板上,在30 $^{\circ}$ C培养箱中培养48h

后,放置在4℃冰箱备用。

[0046] 曲霉菌:从甘油冻管中取出200μL菌液,涂布至PDA固体培养基上,在30℃条件下培养72h,长出孢子后,放置在4℃冰箱备用。

[0047] 曲霉菌菌丝体培养:培养好的孢子,用灭菌生理盐水在超净工作台中,将孢子洗下,按照 10^8 个孢子每毫升接种至大米粉培养基中,培养48h长出菌丝体备用。

[0048] 种子液准备:

[0049] 乳酸菌传代:取活化好的乳酸菌平皿,挑取2至3环乳酸菌,接种至装有100mLMRS液体培养基的250mL三角摇瓶中,并将其置于恒温培养摇床中,于220Rpm、37℃条件下培养24h备用。

[0050] 酵母菌传代:取活化好的酵母菌平皿,挑取2至3环乳酸菌,接种至装有100mLYPD液体培养基的250mL三角摇瓶中,并将其置于恒温培养摇床中,于220Rpm、30℃条件下培养24h备用。

[0051] 卡瓦胡椒根、茎、叶发酵培养基:

[0052] 取卡瓦胡椒根、茎、叶,清洗干净并烘干后,分别用粉碎机粉碎至100目,制成卡瓦胡椒根、茎、叶粉末备用。

[0053] 卡瓦胡椒根、茎、叶粉末分别配伍大米粉,脱脂奶粉,蜂蜜,葡萄糖,磷酸氢二钾,调节适当pH,121℃灭菌20~30min后作为发酵培养基。

[0054] 实施例1

[0055] 乳酸菌发酵卡瓦胡椒的筛选过程:

[0056] 一种卡瓦胡椒的发酵稀产物,采用乳酸菌发酵,菌种包括化妆品原料目录中可使用乳酸菌(筛选于窖池酒醅中)。

[0057] 发酵培养基(g/L):卡瓦胡椒根30,大米粉5,脱脂奶粉5,蜂蜜20,葡萄糖20,pH 7.0,纯水1.0L,121℃灭菌20min。

[0058] 发酵过程:将培养好的乳酸菌按照10%的比率接种至200mL装有发酵培养基的500mL三角摇瓶中,在37℃、220Rpm恒温培养摇床中培养36h,其中青春双歧杆菌与厌氧培养箱中培养。发酵结束的发酵液经过灭活备用。

[0059] 取灭活发酵液离心,取离心后上清用200nm陶瓷膜膜过滤,采用1%浓度滤液测定抗脂质分泌功效。

[0060] 经过测试,筛选出乳酸菌、卡瓦胡椒发酵产物抗脂质分泌效果最佳的菌株,为植物乳杆菌。

[0061] 实施例2:

[0062] 酵母菌发酵卡瓦胡椒的筛选过程

[0063] 一种卡瓦胡椒的发酵产物,包括卡瓦胡椒酵母菌发酵产物,采用酵母菌发酵,菌种包括复膜酵母、酿酒酵母、啤酒酵母、毕赤酵母等,等化妆品目录中可使用安全菌株。

[0064] 发酵培养基(g/L):

[0065] 卡瓦胡椒根(茎、叶)30,大米粉5,脱脂奶粉5,蜂蜜20,葡萄糖20,pH 7.0,纯水1.0L,121℃灭菌20min。

[0066] 发酵过程:将培养好的酵母菌按照10%的比率接种至200mL装有发酵培养基的500mL三角摇瓶中,在30℃、220Rpm恒温培养摇床中培养36h,发酵结束的发酵液经过灭活备

用。

[0067] 取灭活发酵液离心,取离心后上清用200nm陶瓷膜过滤,采用滤液测定抗脂质分泌功效。

[0068] 经过测试,筛选出卡瓦胡椒酵母菌发酵产物抗脂质分泌效果最佳的菌株,为酿酒酵母。

[0069] 实施例3

[0070] 曲霉菌发酵卡瓦胡椒的过程:

[0071] 一种卡瓦胡椒的发酵产物,包括卡瓦胡椒曲霉菌发酵产物,采用米曲霉、红曲霉等发酵卡瓦胡椒(曲霉菌包括:米曲霉平展变种、紫色红曲霉,来源于购自中国工业微生物菌种保藏常管理中心,编号为CICC 2337,CICC 41602);

[0072] 发酵培养基(g/L):

[0073] 卡瓦胡椒根(茎、叶)40,大米粉10,脱脂奶粉10,蜂蜜20,pH 6.5,纯水1.0L,121℃灭菌20min。

[0074] 按照5%接种量将种子培养液接种至发酵培养基中,在摇床上以220Rpm,30℃培养48h,发酵结束发酵液经过灭活备用。

[0075] 取灭活发酵液离心,取离心后上清用200nm陶瓷膜过滤,采用滤液测定抗脂质分泌功效。

[0076] 经过测试,筛选出卡瓦胡椒曲霉菌发酵产物抗脂质分泌效果最佳的菌株,为米曲霉。

[0077] 实施例4

[0078] 曲霉菌、酵母菌、乳酸菌混菌发酵体系筛选:

[0079] 一种卡瓦胡椒的发酵产物,采用米曲霉、酿酒酵母、植物乳杆菌,相互混合发酵。

[0080] 发酵培养基(g/L)

[0081] 卡瓦胡椒根(茎、叶)40,大米粉10,脱脂奶粉10,蜂蜜20,葡萄糖20,pH 7.0,纯水1.0L,121℃灭菌20~30min。

[0082] 混合发酵体系,在30℃、220Rpm条件下发酵48h,发酵结束发酵液经过灭活备用。

[0083] 取灭活发酵液离心,取离心后上清用200nm陶瓷膜过滤,采用滤液测定抗脂质分泌功效。

[0084] 实施例5

[0085] 采用酿酒酵母、植物乳杆菌突变株发酵卡瓦胡椒筛选过程:

[0086] 优选的酿酒酵母、植物乳杆菌,采用紫外诱变和化学诱变剂诱变方法对目标菌株进行突变,筛选得到突变后的酿酒酵母30株,植物乳杆菌30株。

[0087] 将筛选得到的共60株菌对卡瓦胡椒进行发酵后,筛选出每种菌中发酵液抗脂质分泌效果最佳且稳定的三株菌,酿酒酵母004(以下代称S4)、酿酒酵母011(以下代称S11)、酿酒酵母023(以下代称S23)、植物乳杆菌003(以下代称L3)、植物乳杆菌005(以下代称L5)、植物乳杆菌013(以下代称L13)。

[0088] 如表:筛选出的30株酿酒酵母和30株植物乳杆菌发酵卡瓦胡椒所得卡瓦胡椒发酵产物,取1%浓度的发酵产物测定其抑制脂肪细胞分化效果:

[0089] 表1所筛选菌种抑制脂肪细胞分泌脂质的效果

	酿酒酵母菌 (Saccharomyces ce revisiae; S)	植物乳杆菌 (Lactobacillus ;L)
[0090]	001 17.65	14.75
	002 0.00	4.80
	003 29.53	68.02
	004 74.82	50.77
	005 16.60	92.37
	006 41.77	28.81
	007 26.10	0.00
	008 13.19	29.28
	009 33.28	54.06
	010 0.00	57.81
	011 92.40	48.58
	012 61.59	21.14
	013 0.00	75.71
	014 18.57	10.37
	015 20.37	10.59
	016 13.54	46.02
	017 27.08	14.48
	018 68.11	0.00
[0091]	019 15.39	9.77
	020 0.00	15.54
	021 12.35	11.40
	022 11.93	10.73
	023 80.64	23.61
	024 22.56	18.25
	025 20.82	9.96
	026 7.84	13.02
	027 0.00	11.99
	028 20.91	9.19
	029 12.81	0.00
	030 29.61	0.00

[0092] 实施例6

[0093] 将实施例5中筛选出的酿酒酵母和植物乳杆菌进行随机组合发酵卡瓦胡椒,发酵培养基为:

[0094] 卡瓦胡椒根(茎、叶)40,大米粉10,脱脂奶粉10,蜂蜜20,葡萄糖20,pH 7.0,纯水1.0L,121℃灭菌20~30min。

[0095] 两株菌混合发酵,各占5%(菌种浓度为培养至:酵母菌OD600=8~10,乳酸菌OD600=2~3),总共菌为10%,在220rpm,30℃条件下发酵50h,发酵结束后,发酵液灭活。

[0096] 取灭活发酵液离心,取离心后上清用200nm陶瓷微滤膜过滤,采用滤液测定抗脂质分泌功效。

[0097] 六株菌进行混菌发酵,所得发酵产物抗脂质分泌效果如表所示:

[0098] 表2混菌发酵体系抑制脂肪细胞分泌脂质的效果

[0099]

抑制率%	S4	S11	S23	L3	L5	L13
S4	35.2					
S11	46.3	46.8				
S23	50.3	25.8	38.5			
L3	9.8	22.7	38.5	32.5		
L5	36.5	29.7	95.7	85.8	42.4	
L13	39.8	43.9	74.3	30.3	28.7	35.9

[0100] 混菌发酵卡瓦胡椒所得产物对脂肪细胞分泌油脂的抑制效果研究中,用最终浓度0.5%的发酵产物来进行抑制脂肪细胞分泌油脂实验,测定结果显示S23+L5混菌体系发酵产物抑制率高达95.7%;其次为L3+L5混菌体系,抑制率为85.5%。

[0101] 在对S23+L5、L3+L5发酵卡瓦胡椒产物检测中,发现S23+L5体系发酵产物在终浓度0.5%时仍能发挥强大的抑制脂肪细胞分泌油脂的效果,抑制率为94.2%。S23+L5体系,所述酿酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*),其保藏编号为CGMCC No.21527,保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,所述植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*),其保藏编号为CGMCC No.21528,保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心。

[0102] 实施例7

[0103] 卡瓦胡椒发酵产物安全性:

[0104] 经过本专利方法发酵所得卡瓦胡椒发酵产物(实施案例6中经过筛选得到的两株有保藏号的菌株混合发酵所得卡瓦胡椒发酵产物)温和无刺激:

[0105] 鸡胚绒毛尿囊膜实验:

[0106] 测试原理:

[0107] 利用CAM膜或者血管呈现的特定信息,如出血、血管溶解、凝血、小血管直径微小改变等,可以评估受试物产生的刺激能力。

[0108] 试验方法:

[0109] CAM制备:购买0d龄鸡胚,50~60g,孵化过程中,每天翻动一次,孵化至5d龄时,检查鸡胚发育状态,6天时,剥去蛋壳部分,暴露白色蛋膜;小心用镊子去除内膜,确保血管膜不受损。

[0110] 试验过程:

[0111] 每组至少6只鸡胚,取受试物原样0.1mL直接滴加于CAM表面,观察CAM反应情况,并记录作用5min内每种毒性效应出现的时间,精确到秒,包括出血、凝血和血管融解3种反应,并记录反应的程度。阳性对照和阴性对照采用相同的操作过程。

[0112] 阳性对照(PC1):1.0%SDS溶液。

[0113] 阳性对照(PC2):0.1mol/LNaOH溶液

[0114] 阴性对照(NC):0.9%NaCl溶液。

[0115] 测试样品(TA):卡瓦胡椒发酵前、后样品。

[0116] 数据分析:

[0117] 记录每个检测终点出现的时间和反应程度,应用以下公式计算刺激评分(IS),结果保留小数点后两位:

$$[0118] \quad IS = \frac{(301 - \text{secH}) \times 5}{300} + \frac{(301 - \text{secL}) \times 7}{300} + \frac{(301 - \text{secC}) \times 9}{300}$$

[0119] sec H、sec L和sec C分别代表CAM膜上观察到开始发生出血、血管融解和凝血的平均时间(秒)。

[0120] 表3刺激评分法结果评价标准

刺激评分IS	预测分类 Prediction classification
IS < 1	无刺激性Non-irritant (NI)
[0121] 1 ≤ IS < 5	轻度刺激性Slightly irritant (SI)
5 ≤ IS < 9	中度刺激性Moderately irritant (MI)
IS ≥ 10	强刺激性/腐蚀性Strong irritant/Corrosive (Co)

[0122] 阳性对照、阴性对照样品对CAM刺激结果,见图1。卡瓦胡椒发酵前后样品对CAM刺激结果,见图2。

[0123] 卡瓦胡椒发酵产物对CAM的刺激效果,见表4。

[0124] 表4

样品	出血 (sec H)	血管融解 (sec L)	凝血 (sec C)	刺激评分 (IS)
0.9%NaCl溶液	/	/	/	0
1.0%SDS溶液	30	100	256	10.55
[0125] 0.1mol/LNaOH溶液	1	30	181	14.92
50%卡瓦胡椒水提取物	34	128	286	8.937
100%卡瓦胡椒发酵产物	/	/	/	0

[0126] 根据SN/T • 2329-2009的判定标准,卡瓦胡椒发酵产物无刺激,而卡瓦胡椒水提取物

(未发酵)50%浓度即达到中度刺激。发酵后,明显降低了卡瓦胡椒刺激性。

[0127] 实施例8

[0128] 皮肤经皮失水、皮肤角质层水分含量和皮肤血红素测定:

[0129] 样品涂抹在手臂上后,若出现刺激,则皮肤经皮失水增高,角质层水分含量降低,皮肤血红素含量升高。

[0130] 表5测试样品信息、以及测试者涂样手臂部位

样	样品名称	检测编号	部位
/	水	A	左下
/	卡瓦胡椒发酵前水提	B	左中
/	卡瓦胡椒发酵产物	C	左下

[0132] 表6测试部位

检测项目	测试/分析部位
皮肤经皮水分流失	前臂屈侧
皮肤角质层水分含量	前臂屈侧
皮肤血红素	前臂屈侧

[0134] 表7测试时间点

检测项目	检测时间点
皮肤经皮水分流失	0h-2h-4 h-6d-8d
皮肤角质层水分含量	0h-2h-4 h-6d-8d
皮肤血红素	0h-2h-4 h-6d-8d

[0137] 测试方案:

[0138] (1) 检测样品安排

[0139] 样品及对照:表1中的测试样品原物

[0140] (2) 方案

[0141] 样品(用量:0.020g-0.025g)涂抹于受试者前臂屈侧(3×3cm)。在涂抹前(0h)、涂用样品后2、4、6和8h进行皮肤角质层水分含量、皮肤经皮水分流失、皮肤血红素测试。

[0142] 样品使用方法:每2h清水洗去残留液并重新涂抹。

[0143] *此人体测试均在正常室温/湿度条件下(温度为20℃,相对湿度40-60%)所得到。

[0144] 受试者情况

[0145] 有效人数:10人;性别:男5人,女5人;年龄:25至37岁;脱落情况:无

[0146] 测试结果

[0147] 表8.皮肤角质层水分含量平均值

皮肤角质层水分含量/C. U.		0	2 h	4 h	6 h	8 h
[0148] 平均值	水	44	42.6	46.7	47.98	49.6
	卡瓦胡椒发酵产物	44	44.6	46.5	48.79	48.81
	卡瓦胡椒发酵前水提物	42	37.1	35.4	32.48	30.74
初始值的差值	水		-2.2	1.88	3.09	4.71
	卡瓦胡椒发酵前水提物		-0.2	1.54	3.82	3.84
	卡瓦胡椒发酵产物		-5.7	-7.44	-10.44	-12.18

[0149] 表9. 皮肤经皮水分流失平均值

皮肤经皮水分流失量/g/hm		0 h	2 h	4 h	6 h	8 h
[0150] 平均值	水	6.05	6.4	6	6.35	6.6
	卡瓦胡椒发酵产物	7.5	7.85	7.2	7.55	7.15
	卡瓦胡椒发酵前水提物	6.45	8.1	8.95	9.75	10.2
初始值的差值	水		0.35	-0.05	0.3	0.55
	卡瓦胡椒发酵产物		0.35	-0.3	0.05	-0.35

[0151]	卡瓦胡椒发酵前水提物		1.65	2.5	3.3	3.75
--------	------------	--	------	-----	-----	------

[0152] 表10. 皮肤血红素平均值

皮肤血红素		0 h	2 h	4 h	6 h	8 h
[0153] 平均值	水	196	206.9	199.1	201.4	209.1
	卡瓦胡椒发酵产物	221.8	226	219.86	223.85	224.2
	卡瓦胡椒发酵前水提物	212.2	224.45	232.7	239.6	244.6
初始值的差值	水		10.9	3.1	5.4	13.1
	卡瓦胡椒发酵产物		4.2	-1.94	2.05	2.4
	卡瓦胡椒发酵前水提物		12.25	20.5	27.4	32.4

[0154] 微生物植物发酵,利用微生物细胞生长代谢过程中产生的酶,对卡瓦胡椒组织中的纤维素、多糖、植物细胞壁等大分子物质进行降解,使卡瓦胡椒发酵产物小分子化,增加了产物中的活性成分,如氨基酸、多肽等。其次微生物细胞生长过程,会产生各种有机酸和醇,尤其混菌情况下,所产生的的有机酸类和醇类含量更高。这种含有有机酸、醇的发酵液,在发酵过程不停搅拌的情况下,使得卡瓦胡椒中主要有效成分在发酵液中溶解性更高,有效成分得到更多的保留,从而通过微生物发酵提高了卡瓦胡椒中有效成分的提取效率。且发酵过程控pH、温度、和通气,中和有机酸、挥发出醇,使得最终的卡瓦胡椒发酵产物性质温和,无刺激;相对于化工提取,更加绿色、环保、安全。

[0155] 本发明提供一种卡瓦胡椒发酵物的制备方法,制得的卡瓦胡椒发酵产物温和无刺

激,相对于化工提取,更加绿色、环保、安全,且对脂肪细胞分泌油脂效果抑制率达到94.2%,在化妆品中有广泛的应用。

[0156] 应说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制,尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的精神和范围,其均应涵盖在本发明的权利要求范围当中。

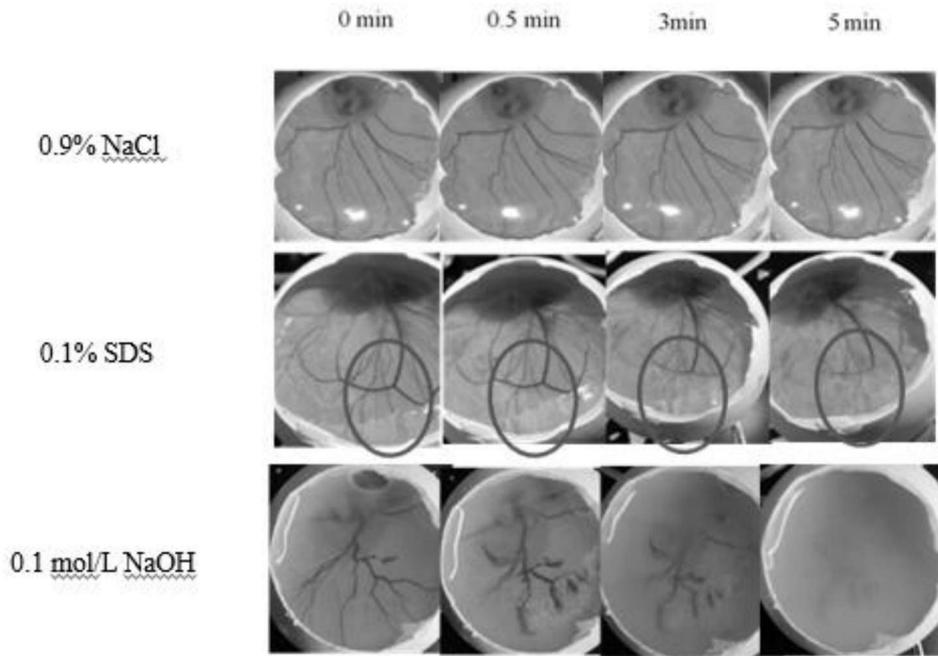


图1

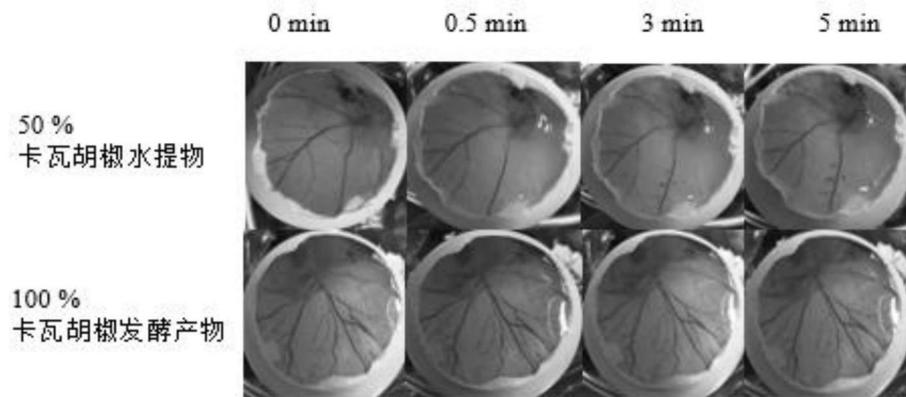


图2