



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106580789 A

(43)申请公布日 2017.04.26

(21)申请号 201611196952.0

(22)申请日 2016.12.22

(71)申请人 北京工商大学

地址 100037 北京市海淀区阜成路33号

申请人 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 王冬冬 史豆豆

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限

公司 11245

代理人 关畅 吴爱琴

(51)Int.Cl.

A61K 8/9789(2017.01)

A61Q 19/08(2006.01)

A61P 17/18(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种丹参发酵原浆化妆品及其制备方法与
应用

(57)摘要

本发明提供一种丹参发酵原浆化妆品及其制备方法与应用。所述丹参发酵原浆的制备方法,包括如下步骤:将丹参干粉、水和菌液混合得到初始体系,对初始体系进行发酵培养,得到丹参发酵原浆。所述菌液中,菌种为乳酸乳球菌。所述丹参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)清除羟自由基;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丹参中提取活性物质,操作简单,且由于不添加任何外来物质,制备得到的丹参发酵物即丹参发酵原浆对皮肤安全无伤害,具有更高的抗衰老活性。

1. 一种丹参发酵原浆的制备方法,包括如下步骤:将丹参干粉、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,得到丹参发酵原浆。

2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于: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、丹参干粉和水的配比为 $(5 \sim 10\text{mL}) : (18 \sim 22)\text{g} : 280\text{mL}$ 。

3. 根据权利要求1或2所述的制备方法,其特征在于:所述发酵培养的温度为 $35 \sim 45^\circ\text{C}$;时间为 $45 \sim 55\text{h}$ 。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的制备方法,其特征在于:所述菌液中,菌种为乳酸乳球菌;

所述丹参干粉来自丹参的地下部分,由粉碎机粉碎后过筛得到。

5. 根据权利要求4中所述的制备方法,其特征在于:所述乳酸乳球菌为乳酸乳球菌 *Lactococcus lacti*。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的制备方法,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、取上清液得到丹参发酵原浆的步骤。

7. 根据权利要求6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 。

8. 由权利要求1-7中任一项所述制备方法制备得到的丹参发酵原浆。

9. 权利要求8所述的丹参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) 清除羟自由基;
- 3) 抗氧化;
- 4) 抗衰老。

10. 根据权利要求9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。

一种丹参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,具体涉及一种丹参发酵原浆化妆品及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 丹参为唇形科鼠尾草植物丹参*Salvia miltiorrhiza* Bunge的干燥根及根茎,是最常用的活血化瘀中药之一,首载于《神农本草经》,被列为草部上品。丹参,味苦,性微寒,入心、肝经,具有活血调经、祛瘀止痛、凉血消痈、清心除烦、养血安神的功效。古有“一味丹参,功同四物”的说法:补血生血,功过归地;调血敛血,力堪芍药;逐瘀生新,性倍川芎。丹参主要通过“养血”的作用来达到活血化瘀的目的。丹参作为传统的活血化瘀中药,也是现代医学研究的主要中药之一。其主要化学成分为脂溶性的二萜醌类化合物和水溶性的酚酸类化合物。近年研究发现,丹参在改善脑缺血再灌注损伤、血液流变学及血小板功能等方面有药理活性。

[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、提取率高和环保的的新型提取方法越来越备受人们关注。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丹参发酵原浆的制备方法。

[0005] 本发明所提供的丹参发酵原浆的制备方法,包括如下步骤:将丹参干粉、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,得到丹参发酵原浆。

[0006] 上述制备方法中,所述丹参干粉来自丹参的根,由粉碎机粉碎后过筛得到,粒径可为30~40目,具体可为30目。

[0007] 所述菌液中,菌种为乳酸乳球菌,具体可为乳酸乳球菌*Lactococcus lactis*,ATCC编号为19435。

[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、丹参干粉和水的配比可为(5~10mL):(18~22)g:280mL,具体可为8mL:20g:300mL。

[0011] 所述发酵培养的温度可为35~45℃,具体可为37℃;时间可为45~55h,具体可为48h。

[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、取上清液得到丹参发酵原浆的步骤。

[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丹参发酵原浆也属于本发明的保护范围。

[0016] 上述丹参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) 清除羟自由基;

[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丹参中提取活性物质,操作简单,且由于不添加任何外来物质,制备得到的丹参发酵物即丹参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) 本发明提供的丹参发酵物(即丹参发酵原浆)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,从丹参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) 本发明提供的丹参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) 本发明提供的丹参发酵原浆,具有较强的抗氧化能力可清除DPPH自由基和羟自由基,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为丹参发酵原浆对DPPH自由基清除率的关系曲线。

[0028] 图2为丹参发酵原浆对羟自由基清除率的关系曲线。

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] 下述实施例中的丹参干粉(来自丹参的根)来自市面销售,30目。
- [0034] 下述实施例中的乳酸乳球菌*Lactococcus lacti*,ATCC编号为19435,可从ATCC购买得到。
- [0035] 下述实施例中的丹参菌液按照如下步骤制得:
- [0036] 1、菌种的活化
- [0037] 挑取乳酸乳球菌*Lactococcus lacti*菌落一环于液体培养基中,放入摇床中将菌种活化,得到活化后的菌液。
- [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,得到纯化后乳酸乳球菌。
- [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、制备丹参发酵原浆
- [0043] 按照如下步骤制备丹参发酵原浆:
- [0044] (1)将8mL步骤3得到的浓度为 $10^5\sim 10^8$ CFU/mL的发酵菌液接种到20g的丹参干粉和300mL的水中,得到发酵体系;
- [0045] (2)将上述发酵体系在37℃摇床中发酵48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,即为丹参发酵原浆。
- [0047] 实施例2、丹参发酵原浆在作为化妆品中的应用
- [0048] 一、丹参发酵原浆的性质
- [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6.1-6.8,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] 对该丹参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;总酚检测方法参照GB/T 8313-2008所得结果如下:
- [0051] 本发明制得的丹参发酵原浆含粗多糖16.61g/kg、总黄酮0.51g/kg、总酚0.37g/kg、总蛋白7.50g/kg。
- [0052] 二、丹参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中获得的丹参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获得的丹参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
	±	—	—	—	
	+	—	—	—	
	++	—	—	—	
	+++	—	—	—	
丹参发酵原浆	—	29	30	30	0
	±	—	—	—	
	+	—	—	—	
	++	—	—	—	
	+++	—	—	—	

[0064] 从表1中可以看出:实施例1得到的丹参发酵原浆产生1例可疑反应,说明本发明提供的丹参发酵原浆均具有安全性,不会给人体带来不良反应。

[0065] 三、丹参发酵原浆的抗氧化性能检测

[0066] 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。

[0067] 取不同量的实施例1制备得到的丹参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%的一系列丹参发酵原浆待测液。

[0068] DPPH自由基清除实验的具体实验步骤为:

[0069] (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);

[0070] (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);

[0071] (3) 取等体积的无水乙醇与待测液混匀(A₃管);

[0072] (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] 以丹参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,制作丹参发酵原浆对DPPH自由基清除作用曲线,见图1。

[0075] 由图1可知,实施例1所得丹参发酵原浆在稀释10倍后对DPPH自由基清除率达92.57%,0.934%(体积百分浓度)的丹参发酵原浆可清除50%的DPPH自由基,说明丹参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] 羟自由基清除实验:

[0077] (1) 在25ml比色管中加入2mmol/L FeSO₄ 3ml、1mmol/L H₂O₂3ml,摇匀;其中H₂O₂是最后加入并启动整个反应。

[0078] (2) 接着加入6mmol/L水杨酸3ml,摇匀;

[0079] (3) 于37℃水浴加热15min后取出,测其吸光度A₀;

[0080] (4) 然后分别加入一定浓度的待测液0.2ml、0.4ml、0.6ml、0.8ml、1.0ml;

[0081] (5) 然后再分别加入蒸馏水0.8ml、0.6ml、0.4ml、0.2ml、0ml,摇匀,继续水浴加热15min,取出测其吸光度A_x。

[0082] (6) 为消除后加的共1.0ml待测液和蒸馏水所造成的体系吸光度值的降低,方法同上,恒温15min后测其吸光度值A₀₀,加1ml蒸馏水,摇匀后再测一次其吸光度A_{xx}, A_{降低} = A₀₀ - A_{xx}。

[0083] 丹参发酵原浆对羟自由基的清除作用明显,随丹参发酵原浆浓度增大,其清除羟自由基的能力逐渐增强,表明丹参发酵原浆清除羟自由基的能力与其浓度就有显著的量效关系。100%丹参发酵原浆能够清除90.86%羟自由基,清除50%的羟自由基需23.23%(体积百分浓度)的丹参发酵原浆。

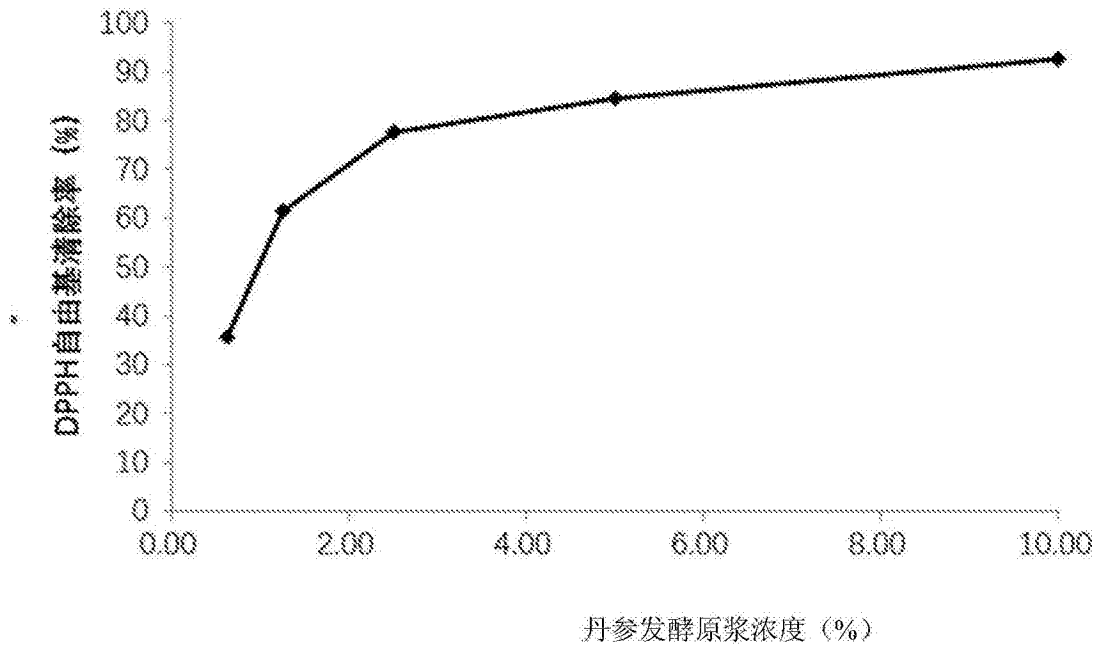


图1

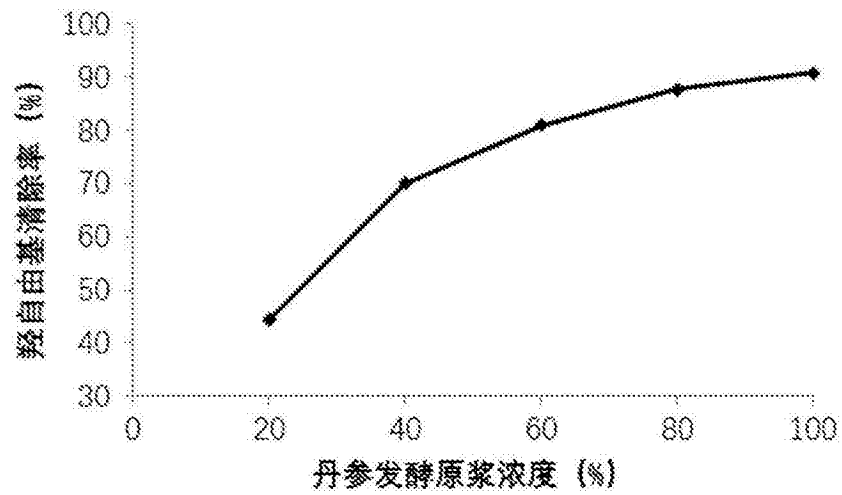


图2