



(21) 申请号 202310230376.0

(22) 申请日 2023.03.10

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 115927128 A

(43) 申请公布日 2023.04.07

(73) 专利权人 广州优科生物科技有限公司
地址 510440 广东省广州市白云区鹤龙街
鹤龙一路88号C区402

(72) 发明人 林朝栋 李邯郸 徐梦漪 黄福山

(74) 专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司 44102

专利代理师 廖碧淳

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

C12P 39/00 (2006.01)

A61K 8/99 (2017.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

C12R 1/245 (2006.01)

(56) 对比文件

US 2014106016 A1, 2014.04.17

WO 2014096086 A2, 2014.06.26

CN 101904872 A, 2010.12.08

CN 104284653 A, 2015.01.14

CN 108697633 A, 2018.10.23

CN 110151675 A, 2019.08.23

CN 115554226 A, 2023.01.03

US 2019343856 A1, 2019.11.14

WO 2021162415 A1, 2021.08.19

任野宝等. 微生物多糖合成关键基因挖掘的研究进展.《微生物学通报》.2021,第48卷(第06期),第2131-2142页.

耿晓琦等. 透明颤菌胞外多糖发酵优化及抗肿瘤活性评价.《中国新药杂志》.2020,第29卷(第19期),第2229-2238页.

Audrey Gueniche等. Vitreoscilla filiformis Extract for Topical Skin Care: A Review.《Frontiers in Cellular and Infection Microbiology》.2021,(第11期),第1-13页.

审查员 周耕民

权利要求书2页 说明书12页

(54) 发明名称

一种透明颤菌发酵产物及其制备方法与应用

(57) 摘要

本发明提供了一种透明颤菌发酵产物及其制备方法与应用。本发明公开了干酪乳杆菌联合长双歧杆菌在提升透明颤菌发酵产物中活性成分含量方面的应用；将干酪乳杆菌与长双歧杆菌用于线状透明颤菌的发酵，可显著提升透明颤菌发酵产物中胞外多糖、总多糖、小分子多肽等活性成分的含量，使得到的透明颤菌发酵产物具有优异的控油保湿、抗炎维稳、舒缓抗敏和抗皱抗衰等功效。

1. 干酪乳杆菌联合长双歧杆菌在提升线状透明颤菌发酵产物中活性成分含量的应用, 其特征在于, 所述活性成分的制备方法包括如下步骤:

1) 将干酪乳杆菌与长双歧杆菌接种于发酵培养基中进行无氧发酵;

2) 无氧发酵后在80~85 °C下灭菌15~25min, 得到培养液, 并将培养液的pH调节至6.5~7.0;

3) 再将线状透明颤菌接种于步骤2)中所述培养液中进行培养即得;

所述步骤1)中干酪乳杆菌与长双歧杆菌的质量比为0.8~1.2:0.8~1.2, 干酪乳杆菌与长双歧杆菌在发酵培养基中的接种总浓度为2~4wt%, 无氧发酵为在32~36 °C下进行无氧发酵15~24 h;

所述步骤3)中的线状透明颤菌在培养液中的接种浓度为2~5wt%, 培养条件为在30~35 °C、180~250 rpm/min下培养12~48 h;

所述发酵培养基由以下质量百分数的各组分组成: 谷物提取液5%~10%, 麦芽提取物1.0%~2.0%, 酵母浸粉0.2%~0.3%, 蛋白胨0.4%~0.6%, 低聚果糖0.5%~1.0%, 海藻糖0.2%~0.3%, 脱脂奶粉0.5%~2.0%, 磷酸二氢钾0.07%~0.11%, 氯化钙0.004%~0.006%, 余量为水; 所述谷物提取液为小米、黑米与马铃薯的水提液。

2. 干酪乳杆菌联合长双歧杆菌在制备线状透明颤菌发酵产物的发酵剂中的应用, 其特征在于, 所述发酵剂包括干酪乳杆菌与长双歧杆菌在发酵培养基中进行无氧发酵后的发酵产物与线状透明颤菌;

所述干酪乳杆菌与长双歧杆菌在发酵培养基中进行无氧发酵后的发酵产物的制备方法包括如下步骤:

将干酪乳杆菌与长双歧杆菌接种于发酵培养基中进行无氧发酵, 在无氧发酵后进行灭菌处理即得;

所述干酪乳杆菌与长双歧杆菌的质量比为0.8~1.2:0.8~1.2, 干酪乳杆菌与长双歧杆菌在发酵培养基中的接种总浓度为2~4wt%, 无氧发酵为在32~36 °C下进行无氧发酵15~24 h。

3. 一种用于制备线状透明颤菌发酵产物的发酵剂, 其特征在于, 包括干酪乳杆菌与长双歧杆菌在发酵培养基中进行无氧发酵后的发酵产物与线状透明颤菌;

所述干酪乳杆菌与长双歧杆菌在发酵培养基中进行无氧发酵后的发酵产物的制备方法包括如下步骤:

将干酪乳杆菌与长双歧杆菌接种于发酵培养基中进行无氧发酵, 在无氧发酵后进行灭菌处理即得;

所述干酪乳杆菌与长双歧杆菌的质量比为0.8~1.2:0.8~1.2, 干酪乳杆菌与长双歧杆菌在发酵培养基中的接种总浓度为2~4wt%, 无氧发酵为在32~36 °C下进行无氧发酵15~24 h。

4. 根据权利要求3所述发酵剂, 其特征在于, 还含有发酵培养基, 所述发酵培养基由以下质量百分数的各组分组成: 谷物提取液5%~10%, 麦芽提取物1.0%~2.0%, 酵母浸粉0.2%~0.3%, 蛋白胨0.4%~0.6%, 低聚果糖0.5%~1.0%, 海藻糖0.2%~0.3%, 脱脂奶粉0.5%~2.0%, 磷酸二氢钾0.07%~0.11%, 氯化钙0.004%~0.006%, 余量为水; 所述谷物提取液为小米、黑米与马铃薯的水提液。

5. 一种线状透明颤菌发酵产物的制备方法,其特征在于,由权利要求3~4任一所述发酵剂发酵得到。

6. 根据权利要求5所述制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

1) 将干酪乳杆菌与长双歧杆菌接种于发酵培养基中进行无氧发酵;

2) 无氧发酵后在80~85 °C下灭菌15~25min,得到培养液,并将培养液的pH调节至6.5~7.0;

3) 再将线状透明颤菌接种于步骤2)中所述培养液中进行培养即得;

所述步骤1)中干酪乳杆菌与长双歧杆菌的质量比为0.8~1.2:0.8~1.2,干酪乳杆菌与长双歧杆菌在发酵培养基中的接种总浓度为2~4wt%,无氧发酵为在32~36 °C下进行无氧发酵15~24 h;

所述步骤3)中的线状透明颤菌在培养液中的接种浓度为2~5wt%,培养条件为在30~35 °C、180~250 rpm/min下培养12~48 h。

一种透明颤菌发酵产物及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明属于微生物发酵技术领域。更具体地,涉及一种透明颤菌发酵产物及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 线状透明颤菌(*Vitreoscilla Filiformis*),属于贝日阿托氏菌属(*Beggiatoe*),是一种无色、滑动、丝状的革兰阴性菌,在沼泽、腐烂植物等贫氧的环境中生长旺盛。线状透明颤菌发酵可产生胞外多糖(*exopolysaccharides, EPS*)等次生代谢产物,这些代谢产物具有抗氧化、抗炎等功效,深受学者们重视。

[0003] 然而,现有线状透明颤菌的发酵产物中胞外多糖等活性成分含量较低,活性不甚理想,阻碍了其实际应用。

发明内容

[0004] 本发明针对现有技术的不足,旨在提供一种能够提升透明颤菌发酵产物活性成分含量的制备方法。本发明通过将干酪乳杆菌、长双歧杆菌、线状透明颤菌按特定顺序进行混合发酵,制备得到一种胞外多糖等活性成分含量显著升高的透明颤菌发酵产物。

[0005] 本发明的第一目的是提供干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)联合长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)在提升透明颤菌发酵产物中活性成分含量方面的应用。

[0006] 本发明的第二目的是提供干酪乳杆菌联合长双歧杆菌在制备透明颤菌发酵产物的发酵剂中的应用。

[0007] 本发明的第三目的是提供一种制备透明颤菌发酵产物的发酵剂。

[0008] 本发明的第四目的是提供一种透明颤菌发酵产物的制备方法。

[0009] 本发明的第五目的是提供上述方法制备得到的透明颤菌发酵产物。

[0010] 本发明的第六目的是提供上述透明颤菌发酵产物在制备医学、美容或化妆品用组合物中的应用。

[0011] 本发明的第七目的是提供一种医学、美容或化妆品用组合物。

[0012] 本发明上述目的通过以下技术方案实现:

[0013] 本发明将干酪乳杆菌与长双歧杆菌用于与线状透明颤菌混合发酵,显著提升了透明颤菌发酵产物中胞外多糖、总多糖、小分子多肽、总固形物等活性成分的含量,使得到的透明颤菌发酵产物具有优异的控油保湿、抗炎维稳、舒缓抗敏和抗皱抗衰等功效。因此,干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)联合长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)在提升透明颤菌发酵产物中活性成分含量方面的应用、干酪乳杆菌联合长双歧杆菌在制备透明颤菌发酵产物的发酵剂中的应用,以及包括干酪乳杆菌和长双歧杆菌,还包括线状透明颤菌的一种制备透明颤菌发酵产物的发酵剂也应在本发明的保护范围之内。

[0014] 优选地,所述发酵剂还含有发酵培养基。

[0015] 优选地,所述发酵培养基由以下质量百分数的各组分组成:谷物提取液5%~10%,

麦芽提取物1.0%~2.0%，酵母浸粉0.2%~0.3%，蛋白胨0.4%~0.6%，低聚果糖0.5%~1.0%，海藻糖0.2%~0.3%，脱脂奶粉0.5%~2.0%，磷酸二氢钾0.07%~0.11%，氯化钙0.004%~0.006%，余量为水。

[0016] 优选地，所述发酵培养基的pH为6.2~6.5。

[0017] 优选地，所述发酵培养基还进行灭菌，如在115~125 °C下灭菌15~25 min，进一步优选为在121 °C下灭菌20 min。

[0018] 优选地，所述谷物提取液为小米、黑米与马铃薯的水提液。

[0019] 本申请将小米、黑米与马铃薯进行水提，得到的谷物提取液富含小分子、维生素、天然低聚糖类、微量元素等成分，并将其与麦芽提取物、低聚果糖、脱脂奶粉等原料相结合，制得的发酵培养基进一步提升了线状透明颤菌的发酵效率，以及透明颤菌发酵产物中胞外多糖、总多糖、小分子多肽等活性成分的产率，显著提升了产物的品质。

[0020] 优选地，所述谷物提取液的制备方法为：将粉碎的小米、黑米与马铃薯加入水中，于75~80 °C下提取0.5~1.0 h即得。

[0021] 优选地，所述小米、黑米、马铃薯与水的质量比为1~10:2~4:4~10:60~100。

[0022] 优选地，所述粉碎为粉碎至40~60目。

[0023] 优选地，所述提取后还进行冷却、离心。

[0024] 优选地，所述冷却为冷却至40~50 °C。

[0025] 优选地，所述麦芽提取物的制备方法为：将粉碎的大麦芽、大麦与小麦混匀，将得到的麦芽混合物加入水中，再加入 α -淀粉酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶进行酶解，于40~60 °C下提取1~2 h，再于78~82 °C下提取8~12 min，过滤、浓缩即得。

[0026] 优选地，所述大麦芽、大麦与小麦的质量比为55~65:25~35:8~12，最优选为60:30:10。

[0027] 优选地，所述麦芽混合物与水的质量比为20~30:70~80。

[0028] 优选地，所述 α -淀粉酶在水中的终浓度为0.04wt%~0.06wt%，最优选为0.05wt%。

[0029] 优选地，所述中性蛋白酶在水中的终浓度为0.04wt%~0.06wt%，最优选为0.05wt%。

[0030] 优选地，所述碱性蛋白酶在水中的终浓度为0.05wt%~0.07wt%，最优选为0.06wt%。

[0031] 本发明还提供了一种透明颤菌发酵产物的制备方法，所述透明颤菌发酵产物由上述发酵剂发酵得到。

[0032] 优选地，先将干酪乳杆菌与长双歧杆菌接种于发酵培养基中进行无氧发酵，得到培养液；再将线状透明颤菌接种于所述培养液中进行培养即得。

[0033] 本发明采用特定的混合发酵方式——顺序发酵，即首先由干酪乳杆菌与长双歧杆菌进行无氧发酵、再由线状透明颤菌进行发酵的方式，结合特定成分的发酵培养基，显著提升了透明颤菌发酵产物中胞外多糖、总多糖、小分子多肽等活性成分的含量，使透明颤菌发酵产物温和无刺激，具有优异的控油保湿、抗炎维稳、舒缓抗敏和抗皱抗衰的功效。

[0034] 优选地，所述干酪乳杆菌与长双歧杆菌的质量比为0.8~1.2:0.8~1.2，最优选为1:1。

[0035] 优选地，所述干酪乳杆菌与长双歧杆菌在发酵培养基中的接种总浓度为2~4

wt%。

[0036] 优选地,所述无氧发酵为在32~36 °C下进行无氧发酵15~24 h。

[0037] 优选地,所述无氧发酵后还进行灭菌。优选地,灭菌条件如在80~85 °C下灭菌15~25 min。

[0038] 优选地,所述接种线状透明颤菌前,还将培养液的pH调节至6.5~7.0。

[0039] 优选地,所述线状透明颤菌在培养液中的接种浓度为2~5 wt%。

[0040] 优选地,所述培养为在30~35 °C、180~250 rpm/min下培养12~48 h。

[0041] 优选地,所述培养为恒温培养。

[0042] 优选地,所述培养后还进行离心、过滤。

[0043] 上述方法制得的透明颤菌发酵产物外观均匀,呈无色至淡黄色液体,气味清新,涂抹于皮肤上有明显的滋润感和亲肤感,且含有较多的胞外多糖、总多糖、小分子多肽等活性成分,具有优异的控油保湿、抗炎维稳、舒缓抗敏和抗皱抗衰的功效,因此,上述方法制备得到的透明颤菌发酵产物,以及上述透明颤菌发酵产物在制备化妆品、医学或美容用组合物中的应用均应在本发明的保护范围之内。

[0044] 此外,本发明还提供了一种化妆品、医学或美容用组合物,该组合物包含上述透明颤菌发酵产物,以及化妆品、医学或美容用可接受的辅料。

[0045] 本发明具有以下有益效果:

[0046] 1. 本发明将干酪乳杆菌与长双歧杆菌用于与线状透明颤菌混合发酵,显著提升了透明颤菌发酵产物中胞外多糖、总多糖、小分子多肽等活性成分的含量,使得到的透明颤菌发酵产物具有优异的控油保湿、抗炎维稳、舒缓抗敏和抗皱抗衰等功效。

[0047] 2. 本发明采用特定的混合发酵方式——顺序发酵,即首先由干酪乳杆菌与长双歧杆菌进行无氧发酵、再由线状透明颤菌进行发酵的方式,结合特定成分的发酵培养基,不仅限制了环境杂菌的共生,提高了透明颤菌发酵产物的安全性,还提升了菌体的生长速度与次生代谢物质含量,使透明颤菌发酵产物的理化指标更加稳定。

具体实施方式

[0048] 以下结合具体实施例来进一步说明本发明,但实施例并不对本发明做任何形式的限定。除非特别说明,本发明采用的试剂、方法和设备为本技术领域常规试剂、方法和设备。

[0049] 除非特别说明,以下实施例所用试剂和材料均为市购。

[0050] 干酪乳杆菌、长双歧杆菌、线状透明颤菌均来自广州优科生物科技有限公司。

[0051] 实施例1一种透明颤菌发酵产物的制备方法

[0052] S1. 将质量比为1:1的干酪乳杆菌与长双歧杆菌按总浓度为3 wt%接种于5000 mL在121 °C下灭菌20 min后的发酵培养基中,在34 °C下进行无氧发酵20 h,再在82 °C下灭菌20 min,得到培养液;

[0053] S2. 将S1所得培养液的pH调节至6.8,再将线状透明颤菌按浓度为4 wt%接种于培养液中,在33 °C、220 rpm/min下恒温培养30 h,再在管式离心机中进行离心(进料速度150 L/h),离心所得上清液再用100 μm滤膜进行过滤,即得到所述透明颤菌发酵产物;

[0054] 其中,所述发酵培养基的pH为6.3,由以下质量百分数的各组分组成:谷物提取液8%,麦芽提取物1.5%,酵母浸粉0.3%,蛋白胨0.5%,低聚果糖0.8%,海藻糖0.3%,脱脂奶粉

1.5%，磷酸二氢钾0.1%，氯化钙0.005%，余量为水；

[0055] 所述谷物提取液的制备方法为：将粉碎至50目的5质量份小米、3质量份黑米与7质量份马铃薯加入80质量份水中，于78℃下提取0.8 h后，冷却至45℃，离心即得；

[0056] 所述麦芽提取物的制备方法为：将60质量份大麦芽、30质量份大麦与10质量份小麦混匀，并用粉碎机粉碎，将得到的麦芽混合物加入到300质量份水中，再加入 α -淀粉酶、中性蛋白酶与碱性蛋白酶至其在水中的终浓度分别为0.05wt%、0.05wt%与0.06wt%，升温至50℃提取1.5 h，再升温至80℃保持10 min，然后采用滤布过滤得到澄清液，采用真空旋转蒸发器将澄清液的质量浓缩至20%，得到麦芽提取物。

[0057] 实施例2 一种透明颤菌发酵产物的制备方法

[0058] S1. 将质量比为1.2:0.8的干酪乳杆菌与长双歧杆菌按总浓度为4 wt%接种于5000 mL在115℃下灭菌25 min后的发酵培养基中，在36℃下进行无氧发酵15 h，再在80℃下灭菌25 min，得到培养液；

[0059] S2. 将S1所得培养液的pH调节至7.0，再将线状透明颤菌按浓度为5 wt%接种于培养液中，在30℃、250 rpm/min下恒温培养12 h，再在管式离心机中进行离心（进料速度100 L/h），离心所得上清液再用100 μ m滤膜进行过滤，即得到所述透明颤菌发酵产物；

[0060] 其中，所述发酵培养基的pH为6.2，由以下质量百分数的各组分组成：谷物提取液5%，麦芽提取物2.0%，酵母浸粉0.3%，蛋白胨0.4%，低聚果糖1.0%，海藻糖0.2%，脱脂奶粉0.5%，磷酸二氢钾0.07%，氯化钙0.006%，余量为水；

[0061] 所述谷物提取液的制备方法为：将粉碎至60目的1质量份小米、4质量份黑米与4质量份马铃薯加入100质量份水中，于75℃下提取1.0 h，冷却至40℃，离心即得；

[0062] 所述麦芽提取物的制备方法为：将55质量份大麦芽、25质量份大麦与12质量份小麦混匀，并用粉碎机粉碎，将得到的麦芽混合物加入到368质量份水中，再加入 α -淀粉酶、中性蛋白酶与碱性蛋白酶至其在水中的终浓度分别为0.04wt%、0.04wt%与0.07wt%，升温至40℃提取2 h，再升温至78℃保持12 min，然后采用滤布过滤得到澄清液，采用真空旋转蒸发器将澄清液的质量浓缩至20%，得到麦芽提取物。

[0063] 实施例3 一种透明颤菌发酵产物的制备方法

[0064] S1. 将质量比为0.8:1.2的干酪乳杆菌与长双歧杆菌按总浓度为2 wt%接种于5000 mL在125℃下灭菌15 min后的发酵培养基中，在32℃下进行无氧发酵24 h，再在85℃下灭菌15 min，得到培养液；

[0065] S2. 将S1所得培养液的pH调节至6.5，再将线状透明颤菌按浓度为2 wt%接种于培养液中，在35℃、180 rpm/min下恒温培养48 h，再在管式离心机中进行离心（进料速度200 L/h），离心所得上清液再用100 μ m滤膜进行过滤，即得到所述透明颤菌发酵产物；

[0066] 其中，所述发酵培养基的pH为6.5，由以下质量百分数的各组分组成：谷物提取液10%，麦芽提取物1.0%，酵母浸粉0.2%，蛋白胨0.6%，低聚果糖0.5%，海藻糖0.3%，脱脂奶粉2.0%，磷酸二氢钾0.11%，氯化钙0.004%，余量为水；

[0067] 所述谷物提取液的制备方法为：将粉碎至40目的10质量份小米、2质量份黑米与10质量份马铃薯加入60质量份水中，于80℃下提取0.5 h，冷却至50℃，离心即得；

[0068] 所述麦芽提取物的制备方法为：将65质量份大麦芽、35质量份大麦与8质量份小麦混匀，并用粉碎机粉碎，将得到的麦芽混合物加入到252质量份水中，再加入 α -淀粉酶、中性

蛋白酶与碱性蛋白酶至其在水中的终浓度分别为0.06wt%、0.06wt%与0.05wt%，升温至60℃提取1 h，再升温至82℃保持8 min，然后采用滤布过滤得到澄清液，采用真空旋转蒸发器将澄清液的质量浓缩至20%，得到麦芽提取物。

[0069] 对比例1

[0070] 同实施例1，区别在于，不进行S1，即发酵过程具体为：将发酵培养基在121℃下灭菌20 min，并将其pH调节至6.8后，将线状透明颤菌按浓度为4 wt%接种于5000 mL发酵培养基中，在33℃、220 rpm/min下恒温培养30 h，再在管式离心机中进行离心（进料速度150 L/h），离心所得上清液再用100 μm滤膜进行过滤，即得到所述透明颤菌发酵产物。

[0071] 对比例2

[0072] 同实施例1，区别在于，S1的发酵培养基中仅接种干酪乳杆菌，即S1具体为：

[0073] 将干酪乳杆菌按浓度为3 wt%接种于5000 mL在121℃下灭菌20 min后的发酵培养基中，在34℃下进行无氧发酵20 h，再在82℃下灭菌20 min，得到培养液。

[0074] 对比例3

[0075] 同实施例1，区别在于，S1的发酵培养基中仅接种长双歧杆菌，即S1具体为：

[0076] 将长双歧杆菌按浓度为3 wt%接种于5000 mL在121℃下灭菌20 min后的发酵培养基中，在34℃下进行无氧发酵20 h，再在82℃下灭菌20 min，得到培养液。

[0077] 对比例4

[0078] 同实施例1，区别在于，先将线状透明颤菌接种于发酵培养基中，再接种干酪乳杆菌与长双歧杆菌进行无氧发酵，即S1与S2具体为：

[0079] S1. 将发酵培养基在121℃下灭菌20 min，并将其pH调节至6.8后，将线状透明颤菌按浓度为4 wt%接种于5000 mL发酵培养基中，在33℃、220 rpm/min下恒温培养30 h后，得到培养液；

[0080] S2. 将培养液的pH调节至6.3，再将质量比为1:1的干酪乳杆菌与长双歧杆菌按总浓度为3 wt%接种于培养液中，在34℃下进行无氧发酵20 h，再在82℃下灭菌20 min后，在管式离心机中进行离心（进料速度150 L/h），离心所得上清液再用100 μm滤膜进行过滤，即得到所述透明颤菌发酵产物。

[0081] 对比例5

[0082] 同实施例1，区别在于，将谷物提取液中的小米替换为大米。

[0083] 测试例1理化性质和活性成分含量测试

[0084] 一、测试方法

[0085] (1) 外观和气味：分别将100g实施例1~3和对比例1~5所得产物置于洁净烧杯中，观察外观，嗅闻气味；

[0086] (2) pH值：按照《化妆品安全技术规范》2015年版中的理化检验方法，检测实施例1~3和对比例1~5所得产物的pH值；

[0087] (3) 总固形物含量：分别将2g (m_0) 实施例1~3和对比例1~5所得产物置于95℃下干燥120min，取出放入干燥器中，冷却至25℃后，称重 m_1 ；再按照固含量= $(m_1/m_0) * 100\%$ 的公式计算固含量；

[0088] (4) 总多糖含量：按照蒽酮—硫酸法，检测实施例1~3和对比例1~5所得产物的总多糖含量；

[0089] (5) 电导率:根据GB/T 6908的方法,检测实施例1~3和对比例1~5所得产物的电导率;

[0090] (6) 胞外多糖含量:取2 mL实施例1~3和对比例1~5所得产物置于离心机中,于10000 r/min下离心5 min除菌体并收集上清液,加入4 mL无水乙醇醇沉12 h后于5000 r/min下离心5 min,弃去乙醇上清,胞外多糖沉淀后加水复溶,得到待测溶液,并用蒽酮-硫酸法测定待测溶液中的胞外多糖含量。

[0091] (7) 小分子多肽含量:采用双缩脲法检测实施例1~3和对比例1~5所得产物中小分子多肽的含量。

[0092] 二、测试结果

[0093] 测试结果如表1所示。

[0094] 表1

[0095]

	实施例 1	实施例 2	实施例 3	对比例 1	对比例 2	对比例 3	对比例 4	对比例 5
外观	淡黄色 液体	淡黄色 液体	淡黄色 液体	黄色液 体	黄色液 体	淡黄色 液体	淡黄色 液体	淡黄色 液体
气味	特征性 气味	特征性 气味	特征性 气味	特征性 气味	特征性 气味	特征性 气味	特征性 气味	特征性 气味
pH 值	6.34	6.29	6.32	6.65	6.50	6.44	6.54	6.51
总固形物%	7.35	7.04	7.13	5.00	6.28	5.38	5.20	6.36
总多糖%	5.74	5.62	5.59	3.03	4.31	4.78	5.02	5.16
电导率 us/cm	176	198	180	289	217	294	251	213
胞外多糖 g/L	0.75	0.71	0.72	0.33	0.52	0.39	0.30	0.53
小分子多肽 g/L	1.63	1.61	1.57	1.01	1.20	1.45	1.27	1.43

[0096] 研究表明,对发酵产物的活性成分以及电导率等指标影响最大的因素是发酵菌的选择与发酵顺序。由实施例1~3和对比例1~4的结果对比可见,实施例1~3所得产物的胞外多糖、总多糖、小分子多肽等活性成分的含量显著高于对比例1~4,电导率显著低于对比例1~4,表明发酵菌的选择与发酵顺序对发酵产物的活性成分以及电导率等指标具有非常明显的影响。

[0097] 另外由对发酵培养基成分的研究表明,对发酵产物的活性成分以及电导率等指标影响较为明显的是谷物提取液成分,其中最为明显的是小米,如对比例5的展示。

[0098] 测试例2舒缓抗炎-炎症因子抑制实验

[0099] 一、实验方法

[0100] 以RAW264.7巨噬细胞为研究对象,通过脂多糖LPS(细菌内毒素)刺激细胞建立细胞炎症模型。接种巨噬细胞(1.0×10^4 个/孔)至12孔板,在培养箱以37℃、5% CO₂通气量条件下孵育24 h后,分别加入实施例1~3和对比例1~5所得产物经水稀释得到的4μL1%(v/v)稀释液,再于2 h后加入LPS至其在稀释液中的终浓度为1 μg/mL,作为样品组。并设置对照组1(不添加发酵产物的稀释液,只添加LPS的稀释液)和对照组2(不添加LPS的稀释液,只添加

发酵产物的稀释液)。收集上清液,离心,用ELISA试剂盒检测RAW264.7巨噬细胞中促炎性炎症因子TNF- α 的释放量水平。

[0101] 二、实验结果

[0102] 根据以下公式计算TNF- α 抑制率:

[0103] TNF- α 抑制率(%)=(对照组1炎症因子浓度-样品组炎症因子浓度)/对照组1炎症因子浓度-对照组2炎症因子浓度)×100%。

[0104] TNF- α 抑制率越高,说明样品的抗炎效果越好。TNF- α 抑制的测试结果如表2所示。

[0105] 表2

项目	TNF- α 抑制率%
实施例 1	72.1
实施例 2	69.1
实施例 3	68.4
[0106] 对比例 1	32.5
对比例 2	43.0
对比例 3	49.8
对比例 4	50.2
对比例 5	59.3

[0107] 可见,实施例1~3所得产物的TNF- α 抑制率显著高于对比例1~5,表明本申请采用特定方法发酵得到的透明颤菌发酵产物具有优异的抗炎性能。

[0108] 测试例3抗皱抗衰老-弹性蛋白酶活性抑制实验

[0109] 一、实验方法

[0110] 以弹性蛋白酶(猪胰)为研究对象,设置样品组和阴性对照组,每组设立3个平行。样品组分别取实施例1~3和对比例1~5所得产物经水稀释得到的10 μ L5%(v/v)稀释液加入到96孔板中,阴性对照组取10 μ L水加入到96孔板中,再向所有组别的96孔板中加入20 μ L浓度为0.1 U/mL的弹性蛋白酶溶液。将96孔板置于25 $^{\circ}$ C恒温培养箱中孵育15 min,再加入50 μ L浓度为1 mg/mL的底物(纯度为98%的N-琥珀酰-L-丙氨酰-L-丙氨酸),使用酶标仪测量样品在410 nm下的吸光度,并计算样品对弹性蛋白酶活性的抑制率。

[0111] 二、实验结果

[0112] 根据以下公式计算弹性蛋白酶活性抑制率:

[0113] 弹性蛋白酶活性抑制率(%)=[(Δ A- Δ B)/ Δ A]×100%, Δ A表示阴性对照组的吸光度值, Δ B代表样品组的吸光度值。

[0114] 弹性蛋白酶活性抑制率越高,说明样品的抗衰老效果越好。弹性蛋白酶活性抑制的测试结果如表3所示。

[0115] 表3

项目	弹性蛋白酶活性抑制率%
实施例 1	59.3
实施例 2	57.0
实施例 3	58.5
[0116] 对比例 1	20.1
对比例 2	32.2
对比例 3	37.4
对比例 4	35.8
对比例 5	48.9

[0117] 可见,实施例1~3所得产物的弹性蛋白酶活性抑制率显著高于对比例1~5,表明本申请采用特定方法发酵得到的透明颤菌发酵产物具有优异的抗衰老效果。

[0118] 测试例4抗皱抗衰老-DPPH自由基清除实验

[0119] 一、实验方法

[0120] 分别对样品组和空白对照组的DPPH自由基清除率(%)进行检测。

[0121] 采用96孔板,每组设置三个复孔,体系为200 μ L。样品组:取实施例1~3和对比例1~5所得产物溶于100 μ L蒸馏水中,使待测样品在体系中的终浓度为1%(v/v),再加入100 μ L 0.1 mM的DPPH溶液;空白对照组:取100 μ L蒸馏水,再加入100 μ L 0.1 mM的DPPH溶液。反应体系构建完成后,避光摇晃10 min,使用酶标仪分别测试样品组和空白对照组在520 nm处的吸光度。

[0122] 二、实验结果

[0123] 根据以下公式计算DPPH自由基清除率:清除率(%)= $[(A_0 - A_x) / A_0] \times 100\%$, A_0 为空白对照组吸光度, A_x 为样品组吸光度。

[0124] DPPH自由基清除率越高,说明样品的抗皱效果越好。DPPH自由基清除的测试结果如表4所示。

[0125] 表4

项目	DPPH 清除率%
实施例 1	68.9
实施例 2	64.8
实施例 3	61.4
[0126] 对比例 1	34.2
对比例 2	38.5
对比例 3	37.1
对比例 4	32.6
对比例 5	49.0

[0127] 可见,实施例1~3所得产物的DPPH清除率显著高于对比例1~5,表明本申请采用特定方法发酵得到的透明颤菌发酵产物具有优异的抗皱效果。

[0128] 测试例5舒缓敏感-拮抗乳酸刺激试验

[0129] 一、实验方法

[0130] (1)将实施例1~3和对比例1~5所得透明颤菌发酵产物按以下质量百分数的各组分制备8种精华液:透明颤菌发酵产物5%、甜菜碱1%、甘油1%、对羟基苯乙酮0.5%、1,2-己二醇0.5%、卡波姆940 0.15%、三乙醇胺0.1%、EDTA二钠0.02%、银耳多糖0.1%、去离子水余量;

[0131] (2)以10%(v/v)乳酸溶液为刺激源,每组筛选10名对乳酸刺激敏感的志愿者(18~50岁,男女不限)进行试验。在志愿者两测鼻唇沟部位分别贴敷10%(v/v)乳酸溶液(刺激组)、含5%(v/v)精华液+10%(v/v)乳酸的水溶液(样品组),涂抹后5 min时对刺痛、瘙痒的感觉进行打分,分数为0~3分。其中,0分代表无刺痛、无瘙痒,1分代表轻度刺痛、轻度瘙痒,2分代表中度刺痛、中度瘙痒,3分代表强刺痛、强瘙痒。

[0132] 二、实验结果

[0133] 根据以下公式计算分数差值:

[0134] 分数差值=刺激组刺激分数平均值-样品组刺激分数平均值。

[0135] 分数差值越大,说明精华液对乳酸刺激的拮抗效果越好。分数差值的测试结果如表5所示。

[0136] 表5

项目	5 min 刺痛分数差值	5 min 瘙痒分数差值
实施例 1	0.41	0.92
实施例 2	0.40	0.87
实施例 3	0.38	0.82
[0137] 对比例 1	0.11	0.24
对比例 2	0.19	0.32
对比例 3	0.21	0.27
对比例 4	0.15	0.31
对比例 5	0.28	0.49

[0138] 可见,实施例1~3的5 min刺痛与瘙痒分数差值均显著高于对比例1~5,表明由本申请透明颤菌发酵产物制得的精华液对乳酸刺激的拮抗效果较佳。

[0139] 测试例6皮肤角质层水分含量和水分散失测试

[0140] 一、实验方法

[0141] 根据《化妆品保湿功效评价指南(QB/T4256-2011)》对测试例5所得8种精华液进行评价。选取30~55岁受试者,男女不限,分为8组,每组15名。测试实验开始前2天,所有受试者脸部不能使用任何产品(包括但不限于化妆品或外用药品)。

[0142] 测试开始第1天,所有受试者在符合标准的房间(实时动态监测环境温度为20℃~22℃,湿度为40%~60%)内静坐30 min(不能喝水,保持放松)后,洁面,用干的面巾纸擦拭干净,用电容法皮肤水分测定仪测定受试者的皮肤含水量(%),同时用Tewameter TM300皮肤水分流失测试仪测量水分经皮肤散失(TEWL),记为皮肤含水量空白值和水分散失空白值,并做好测量区域标记。测定结束后,涂抹精华液1次(用量均为2.0 mg/cm²),且于当天晚上和之后的每天早晚,均在洁面、干面巾纸擦拭干净后涂抹精华液1次(用量均为2.0 mg/cm²),连续使用4周。

[0143] 4周结束后的次日早上,所有受试者在上述符合标准的房间内静坐30 min(不能喝水,保持放松)后,洁面,干面巾纸擦拭干净,再用电容法皮肤水分测定仪测定每位受试者测量区域标记的皮肤含水量(%),同时用Tewameter TM300皮肤水分流失测试仪测量水分经皮肤散失,记为皮肤含水量实验值和水分散失实验值。

[0144] 二、实验结果

[0145] 根据变化率/=(实验值-空白值)/空白值×100%计算水分含量变化率和水分散失变化率。水分含量变化率越高,说明精华液的保湿效果越好;水分散失变化率越低,说明精华液的修复皮肤屏障功能越好。结果如表6所示。

[0146] 表6

项目	水分含量变化率%	水分散失变化率%
实施例 1	54.6	-44.8
实施例 2	53.0	-40.1
实施例 3	51.2	-41.8
对比例 1	22.1	-19.4
对比例 2	28.8	-29.5
对比例 3	28.1	-24.6
对比例 4	20.5	-20.8
对比例 5	42.4	-32.3

[0147] 可见,实施例1~3的水分含量变化率显著高于对比例1~5,且实施例1~3的水分散失变化率显著低于对比例1~5,表明由本申请透明颤菌发酵产物制得的精华液具有优异的保湿效果和修复皮肤屏障功能。

[0148] 测试例7长期效果考察及受试者主观评价

[0149] 一、长期效果考察

[0150] 对测试例5所得8种精华液的使用效果进行4周时间的跟踪测试。

[0151] 测试开始前,将志愿者(30~55周岁,男女不限)随机平分为9组,每组15人。所有志愿者分别清洁面部后,用VISIA全脸分析仪、皮肤测试仪、Primos皮肤皱纹分析仪分别对皮肤指标(油脂量、红色区域面积、皱纹数量、皱纹深度)进行测试,此时的测试结果作为初始皮肤指标。

[0152] 测试开始,上述志愿者每日早上洁面后使用1次(每次1 mL)测试例5所得8种精华液按摩至吸收,连续使用4周(测试期间不得更换或合用其它同类产品,空白对照组4周内均不使用精华液或其它同类产品),并于4周结束后的次日早上,洁面后(当天不涂抹产品)用VISIA全脸分析仪、皮肤测试仪、Primos皮肤皱纹分析仪分别对皮肤指标(油脂量、红色区域面积、皱纹数量、皱纹深度)进行测试,将得到的测试结果与前述初始皮肤指标进行比较,相应变化率(油脂变化率、红色区域变化率、皱纹数量变化率、皱纹深度变化率)如表7所示。

[0153] 表7

[0155]

项目	油脂变化率%	红色区域变化率%	皱纹数量变化率%	皱纹深度变化率%
实施例 1	-53.6	-30.2	-36.3	-26.4
实施例 2	-50.4	-28.4	-34.6	-21.0
实施例 3	-50.1	-29.8	-33.9	-24.7
对比例 1	-12.2	-12.0	-8.0	-11.8
对比例 2	-25.0	-15.7	-14.9	-17.3
对比例 3	-23.2	-19.0	-17.0	-15.9
对比例 4	-18.3	-6.2	-5.9	-11.5
对比例 5	-32.9	-20.9	-21.9	-18.1
空白对照	-3.4	-4.1	-2.4	-0.5

[0156] 可见,实施例1~3的油脂变化率、红色区域变化率、皱纹数量变化率、皱纹深度变化率均显著低于对比例1~5,表明由本申请透明颤菌发酵产物制得的精华液具有优异的皮肤控油、肌肤敏感修复、皮肤皱纹改善等效果。

[0157] 二、受试者主观评价

[0158] 选取50名志愿者(30~55周岁,男女不限),按照前述长期效果考察的方法连续使用精华液4周后,采用自我感受进行主观评价,统计志愿者的皮肤改善率。其中,主观评价的内容包含受试者的皮肤保湿性、弹性、细纹、紧致、毛孔等方面的改善情况。

[0159] 使用样品28天后,92%的受试者认为肌肤更加滋润,90%的受试者认为肌肤感觉更有弹性,90%的受试者认为细纹淡化明显了,82%的受试者认为肌肤看起来更加紧致,84%的受试者认为肌肤纹理看起来更细腻,68%的受试者认为肌肤毛孔有所缩小。

[0160] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。