

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
A61K 7/48
B01J 13/02 C12N 9/02



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 01127736.X

[45] 授权公告日 2004 年 2 月 4 日

[11] 授权公告号 CN 1136834C

[22] 申请日 2001.8.14 [21] 申请号 01127736.X
[71] 专利权人 广东省微生物研究所
地址 510070 广东省广州市先烈中路 100 号
[72] 发明人 韩木兰 李科德

[74] 专利代理机构 广州科粤专利代理有限责任公
司
代理人 余炳和

权利要求书 2 页 说明书 6 页

[54] 发明名称 一种微囊化的酵母多酶复合体的制
备方法

[57] 摘要

本发明提供一种适用于护肤品配方的酵母多酶
复合体及其微囊化的生物制品—微囊化的酵母多酶
复合体的制备方法，其工艺流程包括：发酵—→诱
导产酶—→温和提取—→浓缩干燥—→脂质体包埋
—→微囊化。 本发明工艺设计合理，适合工业化
生产；产品性能稳定，适应市场需求。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种微囊化的酵母多酶复合体的制备方法，其特征在于工艺流程包括：

(1) 制备酵母多酶复合体：

(1.1) 菌种发酵：

菌种：采用面包酵母[Saccharomyces cerevisiae]；

种子及发酵培养基：糖蜜发酵培养液，高温灭菌；

发酵过程：按三级种子发酵并扩大至发酵罐；

发酵条件： 温度 25~35℃，通气量 0.6:1~1:1， 搅拌速度 20~300 转/分钟，罐压 0.01~0.08MPa， pH 维持 4.0~7.0，发酵 4~8 小时后补加发酵液总量（重量）0.001%~0.01%的双氧水，继续发酵 4~18 小时；

(1.2) 发酵结束后，离心收集菌体，得酵母泥；

(1.3) 将所得的酵母泥用异丙醇处理，酵母泥:异丙醇=1:0.1~20(重量比)，过滤，得酵母渣，再加入 pH5.5~9.0 的磷酸缓冲液，酵母渣:缓冲液=1:0.1~10（重量比），同时加入溶菌酶常温处理，离心取上清液；

(1.4) 将所得的上清液低温真空浓缩，再经冷冻干燥即得酵母多酶复合体；

(2) 制备酵母多酶复合体的脂质体：

(2.1) 将饱和大豆卵磷脂、胆固醇、双十六烷基磷酸酯溶于乙醚制成膜材；

(2.2) 按顺序将甘露糖醇微粉，EDTA 二钠盐加入到膜材中，减压搅拌均匀；

(2.3) 加入酵母多酶复合体微粉，搅拌均匀；

(2.4) 在 20~35℃温度下旋转蒸发除去乙醚，得到具有流动性酵母多酶复合体的脂质体粉体；

上述制备脂质体的各材料配比（重量百分比）为： 酵母多酶复合体 10—80%，饱和大豆卵磷脂 1—10%，胆固醇 1—10%，EDTA 二钠 0.1—0.5%，甘露糖醇 1—5%，双十六烷基磷酸酯 0.1—2%；

(3) 微囊化：

(3.1) 以高分子聚合物为壁材，将壁材加入乙醇中，混合均匀即成壁材成膜溶液；

(3.2) 将囊心材料 — 酵母多酶复合体的脂质体粉末悬浮于流化床上，控制温度在 40~50℃；

(3.3) 用离心喷雾将壁材成膜溶液喷入流化床中，使物料干燥并成膜；

(3.4) 冷却, 过筛分级, 即得不同规格的产品。

2. 根据权利要求 1 所述的微囊化的酵母多酶复合体的制备方法, 其特征在于所述的工艺流程中的步骤(1.2) 发酵结束后, 将发酵液用紫外线进行照射后再离心收集菌体, 得酵母泥。

3. 根据权利要求 2 所述的微囊化的酵母多酶复合体的制备方法, 其特征在于所述的紫外线照射剂量为 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^6$ 尔格/毫升。

4. 根据权利要求 1 所述的微囊化的酵母多酶复合体的制备方法, 其特征在于所述的工艺流程中的步骤(1.3)中, 用异丙醇处理酵母泥, 是按酵母泥:异丙醇=1:1~10(重量比)的比例向酵母泥中加入异丙醇。

5. 根据权利要求 1 或 4 所述的微囊化的酵母多酶复合体的制备方法, 其特征在于所述的工艺流程中的步骤(1.3)中酵母泥用异丙醇处理的时间为 30 分钟至 120 分钟。

6. 根据权利要求 1 所述的微囊化的酵母多酶复合体的制备方法, 其特征在于所述的工艺流程中的步骤(1.3)中按酵母渣:缓冲液=1:1~5(重量比)的比例加入 pH7.5~8.5 的磷酸缓冲液。

7. 根据权利要求 1 所述的微囊化的酵母多酶复合体的制备方法, 其特征在于所述的工艺流程中的步骤(1.3)中按 0.1~0.01% (重量百分比) 的量加入溶菌酶常温处理。

8. 根据权利要求 1 所述的微囊化的酵母多酶复合体的制备方法, 其特征在于所述的工艺流程中的步骤(1.3)中, 用所说的磷酸缓冲液和溶菌酶处理酵母渣的时间为 10 至 20 小时。

9. 根据权利要求 1 所述的微囊化的酵母多酶复合体的制备方法, 其特征在于所述的微囊化工艺步骤中, 所述的高分子聚合物壁材为乙基纤维素、PEG-6000、甲基硅氧烷单体中的一种或几种的组合物。

一种微囊化的酵母多酶复合体的制备方法

本发明涉及一种微胶囊化的酶制品的制备方法。

目前国内在护肤品、药品中所使用的超氧化物歧化酶 SOD 一般为植物提取或动物血液提取的水溶液，其同源性差、半衰期短，酶活低；即使是脂质体制剂，也存在包埋率低，不稳定，不利于存放，在护肤品配方中配伍性差等缺点。

本发明的目的是提供一种适用于护肤品配方的酵母多酶复合体及其微囊化的生物制品——微囊化的酵母多酶复合体的制备方法，这种生物制品主要是酵母 SOD 酶、过氧化物酶、活性肽、氨基酸、 β -(1, 3)-葡聚糖、低聚糖、维生素、矿物质等组成的复合体，以微囊化的脂质体的形式将酵母多酶复合体包封于脂质体和微胶囊双分子层中，该制品作为抗衰老、抗氧化、美白保湿剂，具有良好的配方配伍性能和稳定性。

本发明的工艺流程如下：

发酵→诱导产酶→温和提取→浓缩干燥→脂质体包埋→微囊化。

具体的工艺步骤包括：

(1) 制备酵母多酶复合体：

(1.1) 菌种发酵：

菌种：采用面包酵母[Saccharomyces cerevisiae]；

种子及发酵培养基：糖蜜发酵培养液，高温灭菌；

发酵过程：按三级种子发酵并扩大至发酵罐；

发酵条件： 温度 25~35℃，通气量 0.6:1~1:1， 搅拌速度 20~300 转/分钟，罐压 0.01~0.08MPa， pH 维持 4.0~7.0，发酵 4~8 小时后补加发酵液总量（重量）0.001%~0.01%的双氧水，继续发酵 4~18 小时；

(1.2) 发酵结束后，离心收集菌体，得酵母泥；

(1.3) 将所得的酵母泥用异丙醇处理，酵母泥:异丙醇=1:0.1~20(重量比)，过滤，得酵母渣，再加入 pH5.5~9.0 的磷酸缓冲液，酵母渣:缓冲液=1:0.1~10(重量比)，同时加入溶菌酶常温处理，离心取上清液；

(1.4) 将所得的上清液低温真空浓缩，再经冷冻干燥即得酵母多酶复合体；

(2) 制备酵母多酶复合体的脂质体:

(2.1) 将饱和大豆卵磷脂、胆固醇、双十六烷基磷酸酯溶于乙醚制成膜材;

(2.2) 按顺序将甘露糖醇微粉, EDTA 二钠盐加入到膜材中, 减压搅拌均匀;

(2.3) 加入酵母多酶复合体微粉, 搅拌均匀;

(2.4) 在 20~35℃ 温度下旋转蒸发除去乙醚, 得到具有流动性酵母多酶复合体的脂质体粉体;

上述制备脂质体的各材料配比(重量百分比)为: 酵母多酶复合体 10—80%, 饱和大豆卵磷脂 1—10%, 胆固醇 1—10%, EDTA 二钠 0.1—0.5%, 甘露糖醇 1—5%, 双十六烷基磷酸酯 0.1—2%;

(3) 微囊化:

(3.1) 以高分子聚合物为壁材, 将壁材加入乙醇中, 混合均匀即成壁材成膜溶液;

(3.2) 将囊心材料 — 酵母多酶复合体的脂质体粉末悬浮于流化床上, 控制温度在 40~50℃;

(3.3) 用离心喷雾将壁材成膜溶液喷入流化床中, 使物料干燥并成膜;

(3.4) 冷却, 过筛分级, 即得不同规格的产品。

为进一步提高酶活, 在本发明的发酵工艺过程中, 发酵液在添加双氧水处理后可再用紫外线辐射处理, 即在所述的工艺流程中的步骤(1.2)中, 于发酵结束后, 再将发酵液用紫外线照射, 其剂量一般为 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^6$ 尔格/毫升, 用紫外线进行照射后再离心收集菌体, 得酵母泥。

以下为本发明所采用的有关优化技术特征或参数:

1、在所述的工艺流程中的步骤(1.3)中, 用异丙醇处理酵母泥, 是按酵母泥: 异丙醇=1:1~10(重量比)的比例向酵母泥中加入异丙醇。

2、在所述的工艺流程中的步骤(1.3)中, 酵母泥用异丙醇处理的时间为 30 分钟至 120 分钟。

3、在所述的工艺流程中的步骤(1.3)中按酵母渣:缓冲液=1:1~5(重量比)的比例加入 pH7.5~8.5 的磷酸缓冲液。

4、在所述的工艺流程中的步骤(1.3)中按反应物总量 0.1~0.01%(重量百分比)的量加入溶菌酶常温处理。

5、在所述的工艺流程中的步骤(1.3)中,用所说的磷酸缓冲液和溶菌酶处理酵母渣的时间为10至20小时。

6、所述的微囊化工艺步骤中,所述的高分子聚合物壁材为乙基纤维素、PEG-6000、甲基硅氧烷单体中的一种或几种的组合物。

本发明具有以下技术特点和效果:

1.本专利技术是利用现代生物工程技术发酵生产酵母,诱导产酶,所产生的多酶复合体系由超氧化物歧化酶SOD酶、过氧化物酶、活性肽、氨基酸、 β -(1,3)-葡聚糖、低聚糖、维生素、矿物质、辅酶因子等协同作用因子组成,具有很强的抗辐射、抗氧化、抗衰老等性能;

2.通过温和处理,可以最大程度地保持其生物活性;

3.这种复合体系,经磷脂包埋后,能更好地穿入细胞,进入细胞后,能促进细胞新陈代谢、活化细胞、促进氧和营养元素的吸收;

4.酵母多酶复合体经微胶囊包埋后可以更好地保持其生物活性,微囊化的酵母多酶复合体不仅具有很好的稳定性,而且具有缓释功能;

5.本专利技术工艺设计合理,适合工业化生产;产品性能稳定,适应市场需求。

实施例一

(1) 酵母多酶复合体的制备

(1.1) 将面包酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 活化至三级种,按10%接种量接入发酵罐。种子及发酵液的培养基组成(重量百分比):糖蜜10—12%, H_3PO_4 0.25—0.3%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.5%, 尿素0.3%, $MgSO_4$ 0.03%, $ZnSO_4$ 0.006%, 余量为水, pH 5.5。121℃灭菌20分钟。

发酵参数:罐压0.05mPa,搅拌速度120转/分钟,温度30℃, pH5—7,发酵8小时后补加发酵液总量(重量)0.01%的双氧水,继续发酵4小时。

(1.2) 发酵结束,将发酵液用剂量为 5×10^3 尔格/毫升的紫外线进行照射后,4000转/分钟离心收集酵母泥,酵母泥用异丙醇溶液按酵母泥:异丙醇=1:9的比例(重量比)配成酵母乳,处理两小时,真空抽滤,得酵母渣菌体。按菌体:缓冲液=1:3的比例(重量比)加入pH8.2的磷酸缓冲液,同时按反应物总量(重量)0.01%的量加入溶菌酶,常温处理20小时后,5000转/分钟离心得上清液。

(1.3) 上清液低温真空浓缩,再冷冻干燥,得酵母多酶复合体冻干粉。

(2) 脂质体的制备

(2.1) 将饱和大豆卵磷脂 5 公斤、胆固醇 4 公斤、双十六烷基磷酸酯 0.5 公斤溶于乙醚 80 公斤，混合均匀后即为膜材；

(2.2) 按顺序将甘露醇微粉 4 公斤、EDTA 二钠盐 0.1 公斤，加入到膜材中，减压搅拌均匀；

(2.3) 加入酵母多酶复合体冻干粉 80 公斤，搅拌均匀，速度 50 转/分钟；

(2.4) 在 20-35℃ 旋转蒸发除去乙醚，得到具有流动性酵母多酶复合体的脂质体粉体。

(3) 微囊化

(3.1) 把 6 公斤含 50% 甲基硅氧烷单体的丙酮溶液与 10 公斤乙醇溶液混合成壁材成膜溶液；

(3.2) 把 100 公斤酵母多酶复合体的脂质体粉末悬浮于流化床上，物料温度：40-50℃；

(3.3) 15 分钟内以喷雾的形式将壁材溶液喷入流化床中，在 70℃ 的温度下干燥成膜，

(3.4) 冷却，过 100 目筛，得微囊化的酵母多酶复合体粉状产品。

实施例二

(1) 酵母多酶复合体的制备：

将面包酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 活化至三级种，按 10% 接种量接入发酵罐。种子及发酵液的培养基组成（重量百分比）：糖蜜 10—12%， H_3PO_4 0.25—0.3%， $(NH_4)_2SO_4$ 0.5%，尿素 0.3%， $MgSO_4$ 0.03%， $ZnSO_4$ 0.006%，余量为水，pH 5.5。121℃ 灭菌 20 分钟；

发酵参数：罐压 0.01mPa，搅拌速度 150 转/分钟，温度 25℃，pH5—7，发酵 4 小时补充发酵液总量（重量）0.001%的 H_2O_2 ，继续发酵 18 小时；

发酵结束，将发酵液用剂量为 5×10^4 尔格/毫升的紫外线照射后，4000 转/分钟离心收集酵母泥，酵母泥用异丙醇溶液按酵母泥：异丙醇=9：1 的比例（重量比）配成酵母乳，处理两小时，真空抽滤，得酵母渣菌体。按菌体：缓冲液=1:10（重量比）的比例加入 pH8.2 的磷酸缓冲液，同时按反应物总量（重量）0.01% 的量加入溶菌酶，常温处理 20 小时后，5000 转/分钟离心得上清液。上清液低温真空浓缩，再

冷冻干燥，得酵母多酶复合体冻干粉。

(2) 脂质体的制备：

将饱和大豆卵磷脂 10 公斤、胆固醇 1 公斤、双十六烷基磷酸酯 0.1 公斤溶于乙醚 80 公斤，混合均匀后即为膜材；

按顺序将甘露醇微粉 1 公斤、EDTA 二钠盐 0.5 公斤，加入到膜材中，减压搅拌均匀；

加入酵母多酶复合体冻干粉 80 公斤，搅拌均匀，速度 50 转/分钟；

在 20-35℃ 旋转蒸发除去乙醚，得到具有流动性酵母多酶复合体的脂质体粉体。

(3) 微囊化

将 6 公斤含 50% 的甲基硅氧烷单体的丙酮溶液与 10 公斤乙醇溶液混合成壁材成膜溶液；

将 100 公斤酵母多酶复合体的脂质体粉末悬浮于流化床上，物料温度：40—50℃；

15 分钟以内喷雾的形式将壁材成膜溶液喷入流化床中；在 70℃ 的温度下干燥成膜；

冷却，过 100 目筛，得微囊化的酵母多酶复合体粉状产品。

实施例三

(1) 酵母多酶复合体的制备

将面包酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 活化至三级种，按 10% 接种量接入发酵罐。种子及发酵液的培养基组成（重量百分比）：糖蜜 10—12%， H_3PO_4 0.25—0.3%， $(NH_4)_2SO_4$ 0.5%，尿素 0.3%， $MgSO_4$ 0.03%， $ZnSO_4$ 0.006%，余量为水，pH 5.5。121℃ 灭菌 20 分钟；

发酵参数：罐压 0.08mPa，搅拌速度 100 转/分钟，温度 35℃，pH5—7，发酵 6 小时补充发酵液总量（重量）0.005% 的 H_2O_2 ，继续发酵 10 小时；

发酵结束，将发酵液用剂量为 5×10^5 尔格/毫升的紫外线照射，4000 转/分钟离心收集酵母泥，酵母泥用异丙醇溶液按酵母泥：异丙醇=1：20 的比例（重量比）配成酵母乳，处理两小时，真空抽滤，得酵母渣菌体。按菌体：缓冲液=1：3 的比例（重量比）加入 pH8.2 的磷酸缓冲液，同时按反应物总量（重量）0.01% 的量加入溶菌酶常温处理 20 小时后，5000 转/分钟离心得上清液。上清液低温真空浓缩，再冷冻干

燥，得酵母多酶复合体冻干粉。

（2）脂质体的制备

将饱和大豆卵磷脂 1 公斤、胆固醇 10 公斤、双十六烷基磷酸酯 2 公斤溶于乙醚 80 公斤，混合均匀后即为膜材；

按顺序将甘露醇微粉 5 公斤、EDTA 二钠盐 0.2 公斤，加入到膜材中，减压搅拌均匀；

加入酵母多酶复合体冻干粉 80 公斤，搅拌均匀，速度 50 转/分钟；

在 20-35℃ 旋转蒸发除去乙醚，得到具有流动性酵母多酶复合体的脂质体粉体。

（3）微囊化

将 0.3 公斤乙基纤维素、0.5 公斤 PEG-6000、0.3 公斤油性色料，溶于乙醇中，混合均匀得壁材成膜溶液 10 公斤；

将 100 公斤酵母多酶复合体的脂质体粉末悬浮于流化床上，物料温度：40—50℃；

15 分钟以内喷雾的形式将壁材成膜溶液喷入流化床中；在 70℃ 的温度下干燥成膜，过 100 目筛，得微囊化的酵母多酶复合体粉状产品。