



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117547566 A

(43) 申请公布日 2024.02.13

(21) 申请号 202311568374.9	A61Q 19/02 (2006.01)
(22) 申请日 2023.11.22	A61Q 19/08 (2006.01)
(83) 生物保藏信息	C12P 39/00 (2006.01)
CCTCC NO:M20232110 2023.11.02	C12P 1/02 (2006.01)
(71) 申请人 上海相宜本草化妆品股份有限公司	C12P 1/04 (2006.01)
地址 200444 上海市宝山区城银路121号	A61K 125/00 (2006.01)
(72) 发明人 谢松霖 吕智 屠一栋 陈彬和	C12R 1/865 (2006.01)
苗君	C12R 1/84 (2006.01)
(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所	C12R 1/72 (2006.01)
有限公司 11038	C12R 1/78 (2006.01)
专利代理师 陈樱樱 谭玮	C12R 1/645 (2006.01)
(51) Int. Cl.	C12R 1/25 (2006.01)
A61K 36/41 (2006.01)	C12R 1/23 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)	C12R 1/245 (2006.01)
A61P 17/18 (2006.01)	C12R 1/225 (2006.01)
A61K 8/9789 (2017.01)	C12R 1/24 (2006.01)

权利要求书2页 说明书11页

(54) 发明名称

一种具有提高的美白及抗氧化能力的红景天发酵提取液、其制备方法及其应用

(57) 摘要

本发明提供了一种通过先酵母菌发酵,后乳杆菌发酵的两步发酵法制备具有提高的美白及抗氧化能力的红景天发酵提取液的方法。本发明还涉及通过所述两步发酵法制得的红景天发酵提取液和包含所述红景天发酵提取液的药物制剂或化妆品组合物。本发明进一步涉及所述红景天发酵提取液在制备药物或化妆品组合物中的用途。

1. 一种通过两步发酵制备红景天发酵提取液的方法,其中所述方法包括以下步骤:
 - (a) 用酵母菌对红景天原料进行第一次发酵,得到第一次发酵提取液;
 - (b) 用乳杆菌对步骤(a)中所得的第一次发酵液进行第二次发酵,得到第二次发酵提取液。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中在第一次发酵结束后且在第二次发酵开始前,对第一次发酵提取液进行灭活,优选通过升温进行灭活,更优选在80~100℃下进行灭活。
3. 根据权利要求2所述的方法,其中灭活进行5分钟至1小时,优选5分钟至40分钟,更优选10分钟至30分钟,最优选约20分钟。
4. 根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中在进行第二次发酵时,在发酵液中另外加入乳杆菌发酵所需的营养物质,优选碳源,更优选葡萄糖、果糖、蔗糖、阿拉伯糖、麦芽糖,最优选葡萄糖。
5. 根据权利要求4所述的方法,其中所加入的葡萄糖的量使得添加后酵母菌发酵液中的葡萄糖终浓度为10~20g/L。
6. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述方法还任选地包括以下步骤:
 - (c) 对步骤(b)所得的第二次发酵提取液进行离心和除菌过滤。
7. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中步骤(a)中的红景天原料为红景天根,优选为红景天根粉,更优选为粒度为40-60目的红景天根粉。
8. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中在步骤(a)中,将红景天原料加入到发酵培养液中,且红景天原料在所述发酵培养液中的含量为10~50g/L。
9. 根据权利要求8所述的方法,其中发酵培养液包含氮源、碳源和生长因子,任选地还包含无机盐和水。
10. 根据权利要求9所述的方法,其中发酵培养液包含胰蛋白胨、酵母提取物和葡萄糖,任选地还包含 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 KH_2PO_4 和水。
11. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述酵母菌选自扣囊覆膜酵母、酿酒酵母、假丝酵母、孢汉逊酵母、毕赤酵母、克鲁维酵母或其组合,且所述乳杆菌选自鼠李糖乳杆菌、植物乳杆菌、嗜酸乳杆菌、干酪乳杆菌、短乳杆菌、保加利亚乳杆菌、罗伊氏乳杆菌、唾液乳杆菌或其组合。
12. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中用酵母菌发酵的发酵时间为24~48h,且用乳杆菌发酵的发酵时间为18~32h。
13. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中在步骤(a)的第一次发酵中,加入的酵母菌的量为 $1.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^6$ CFU/ml;在步骤(b)的第二次发酵中,加入的乳杆菌的量为 $1.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^6$ CFU/ml。
14. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中在步骤(b)的第二次发酵中,以乳杆菌种子液的形式加入乳杆菌,所述乳杆菌种子液的菌体浓度为 $1.0 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^8$ CFU/ml,且乳杆菌种子液接种量为所述红景天酵母菌发酵液的0.5-2%,pH控制在5.5-6.5。
15. 一种红景天发酵提取液,所述红景天发酵提取液通过权利要求1-14中任一项所述的方法制备。
16. 一种药物制剂或化妆品组合物,其包含权利要求15所述的红景天发酵提取液。
17. 根据权利要求15所述的红景天发酵提取液在制备具有美白和/或抗氧化能力的药

物或化妆品组合物中的用途。

一种具有提高的美白及抗氧化能力的红景天发酵提取液、其制备方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种红景天发酵提取液的制备方法。本发明还涉及通过所述制备方法制备的具有提高的美白及抗氧化能力的红景天发酵提取液、包含所述发酵提取液的药物制剂或化妆品组合物。本发明进一步涉及所述红景天发酵提取液在制备药物或化妆品组合物中的用途。

背景技术

[0002] 红景天是景天科多年生草本或亚灌木,为生长在高海拔无污染地带的珍惜野生植物。红景天是中国传统的药用植物,含有丰富的活性化合物,包括红景天苷、酪醇、黄酮类化合物、香豆素、有机酸等,具有抗氧化、美白、抗衰老、抗炎、抗疲劳等作用。在化妆品领域,红景天提取物具有美白和抗氧化能力。

[0003] 中草药发酵是利用微生物以中草药为底物进行发酵的过程。在发酵后,中草药活性物质含量提高,毒副作用降低且更易于分离提纯和应用。上述改变得益于微生物丰富的酶系和强大的生物转化能力。此外,微生物发酵的代谢产物与药物成分发生协同作用也可能增强药效。发酵的条件温和、物美价廉的特性也为其广泛的发展应用奠定了基础。

[0004] 关于红景天发酵的研究的现有技术包括:

[0005] CN110772460A公开了“一种红景天发酵提取液的制备方法及应用”,其特征在于先使用纤维素酶和果胶酶对红景天根粉进行酶解,再加入氮源、碳源、无机盐以及水,将酵母菌种子液接种到此培养基中进行发酵。此发明仅使用酵母单一菌种发酵,没有使用可能对红景天抗氧化能力有显著提升作用的其它菌种。

[0006] CN112472634A公开了“一种红景天提取物、其制备方法及应用”,其特征在于将德氏乳杆菌、红景天根粉、培养基混合发酵而得的发酵液经灭菌后,以乙醇、甲醇、丙酮、丁二醇或戊二醇提取获得。由于红景天对细菌的生长有较强抑制作用,在红景天含量较高的培养基里直接加入乳杆菌则生长受抑制,不能较好的发挥乳杆菌的作用。

[0007] CN103131730A公开了“利用吸附剂的红景天发酵物的制造方法”,解决难以用乳酸菌单独发酵红景天的问题。该发明采用选自酸性白土、膨润土、硅藻土、活性炭及弱碱性阴离子交换树脂中的一种以上的吸附剂处理红景天提取物的步骤,以及在未吸附于所述吸附剂的滤液中接种乳酸菌进行发酵的步骤。吸附剂处理红景天提取物后可解除对乳酸菌的生长抑制作用,但是吸附剂造成了红景天活性物质的损失。

[0008] CN103127202B公开了“利用红参的红景天发酵物的制造方法及含有该发酵物的改善疲劳和提高运动能力的组合物”。该发明也是为了解决难以用乳酸菌单独发酵红景天的问题,提供一种红景天发酵物的制造方法,该方法在红景天提取物中混合红参提取物或将红景天和红参混合而制造红景天和红参的混合提取物,在该混合提取物中接种乳酸菌进行发酵。该方法需要增加红参作为原料,且红景天所允许的添加量较低。

[0009] CN104257545B公开了“一种红景天发酵原浆化妆品及其制备方法”,其特征在于将

红景天根粉、水与发酵菌混合而得的初始体系发酵而得的发酵液经灭菌、离心而得的上清液,即为红景天发酵原浆化妆品。发酵过程没有添加酵母菌生长所需的营养成分,使得酵母菌生长受限,且可能消耗红景天本身的活性成分。

[0010] CN106265846A公开了“一种提高红景天抗氧化能力的发酵方法”,其特征在于将红景天粉碎干燥后与蒸馏水混合,100℃提取两次,过滤和离心除杂后得上清液。所得提取液中加入葡萄糖,接种黑曲霉种子液进行发酵。发酵后红景天的抗氧化能力增强。使用红景天水提液发酵,药渣中的活性成分没有充分释放,导致浪费。

[0011] CN112754960A公开了“一种含有酵母菌和红景天发酵产物提取物的化妆品、制备方法及其应用”,其特征在于超声波提取法获得红景天提取液,再接种酵母菌种子液发酵,灭菌后加入30-50%溶剂,过滤得到酵母菌和红景天发酵产物提取物。此发明使用单一酵母菌,且发酵过程没有添加酵母菌生长所需的营养成分,酵母菌无法充分生长代谢,且消耗红景天本身的活性成分。

[0012] 现有技术中存在的问题在于:

[0013] (1) 现有技术中红景天发酵一般采用单一菌种,即植物发酵中常用的酵母菌或乳杆菌;

[0014] (2) 酵母菌单一菌种发酵得到的红景天提取液的抗氧化能力较差;

[0015] (3) 乳杆菌发酵红景天虽然能显著提升红景天发酵提取液的抗氧化能力,但是由于红景天对细菌的生长有较强抑制作用,在红景天含量较高的培养基里直接加入乳杆菌则其生长受抑制,不能较好的发挥乳杆菌的作用;

[0016] (4) 使用吸附剂处理红景天提取物后可消除其对乳杆菌的生长抑制作用,但是吸附剂造成了红景天活性物质的损失。

[0017] 因此,目前仍存在对具有提高的美白及抗氧化能力的红景天发酵提取液及其制备方法和应用的强烈需求。

发明内容

[0018] 本发明通过对红景天进行先用酵母菌后用乳杆菌的两步发酵,得到了具有提高的美白及抗氧化能力的红景天发酵提取液,解决了现有技术中红景天发酵提取液制备方法中存在的问题并克服了现有技术中存在的缺点。

[0019] 本申请的技术方案采用两步发酵法,先接种酵母菌发酵,再接种乳杆菌发酵,乳杆菌可以在酵母菌发酵后的红景天发酵液中生长增殖。经酵母菌发酵后的红景天提取液对乳杆菌的抑菌作用减弱,克服了现有技术发酵工艺中较高的红景天含量抑制乳杆菌的生长从而限制通过乳杆菌发酵红景天的问题。经两步发酵的红景天发酵液在1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)和酪氨酸酶的抑制能力上有较大提升。

[0020] 在本发明的第一方面涉及一种通过两步发酵制备红景天发酵提取液的方法,其中所述方法包括以下步骤:

[0021] (a) 用酵母菌对红景天原料进行第一次发酵,得到第一次发酵提取液;

[0022] (b) 用乳杆菌对步骤(a)中所得的第一次发酵液进行第二次发酵,得到第二次发酵提取液。

[0023] 本发明的第二方面涉及一种红景天发酵提取液,其是通过根据本发明的第一方面

所述的方法制备的。

[0024] 本发明的第三方面涉及一种化妆品组合物,其包含根据本发明的第二方面的红景天发酵提取液。

[0025] 本发明的第四方面涉及一种药物制剂,其包含根据本发明的第二方面的红景天发酵提取液。

[0026] 本发明的第五方面涉及根据本发明第二方面的红景天发酵提取液在制备具有美白和/或抗氧化能力的药物或化妆品组合物中的用途。

[0027] 发明详述

[0028] 定义

[0029] 在本文中使用的术语“s”、“min”和“h”分别代表“秒”、“分钟”和“小时”。

[0030] 如本文所使用的术语“包含”,其与“包括”、“含有”或“特征在于”同义,是包含性的或开放式的,不排除另外的、未描述的要素或方法步骤。然而,在文中,每次述及“包括”,都意在涵盖“基本上由.....组成”和“由.....组成”的备选实施方案,其中“由.....组成”排除没有指明的任何要素或步骤,“基本上由.....组成”允许包括未描述的、不实质上影响所论及的组合物或方法的必要或基本特征和新颖性特征的其它要素或步骤。

[0031] 在本文中使用的术语“约”是指该术语所修饰的数值的 $\pm 10\%$,更优选为 $\pm 5\%$,最优选为 $\pm 2\%$,因此本领域的普通技术人员能够清楚地根据所修饰的数值确定术语“约”的范围。

[0032] 红景天发酵提取液的制备方法

[0033] 在本发明的第一方面涉及一种通过两步发酵制备红景天发酵提取液的方法,其中所述方法包括以下步骤:

[0034] (a) 用酵母菌对红景天原料进行第一次发酵,得到第一次发酵提取液;

[0035] (b) 用乳杆菌对步骤(a)中所得的第一次发酵液进行第二次发酵,得到第二次发酵提取液。

[0036] 在本发明的第二方面涉及一种通过两步发酵制备红景天发酵提取液的方法,其中所述方法包括以下步骤:

[0037] (a) 用酵母菌对红景天原料进行第一次发酵,得到第一次发酵提取液;

[0038] (a') 对第一次发酵提取液进行灭活,优选通过升温进行灭活,得到灭活后的第一次发酵提取液;

[0039] (b) 向步骤(a')中所得的灭活后的第一次发酵提取液中加入乳杆菌发酵所需的营养物质,优选葡萄糖,并加入乳杆菌进行第二次发酵,得到第二次发酵提取液;和任选地,

[0040] (c) 对步骤(b)所得的第二次发酵提取液进行离心和除菌过滤。

[0041] 在本发明的第三方面涉及一种通过两步发酵制备红景天发酵提取液的方法,其中所述方法包括以下步骤:

[0042] (a) 在发酵培养液中加入红景天原料和酵母菌进行发酵,得到第一次发酵提取液;

[0043] (a') 对第一次发酵提取液进行灭活,优选通过升温进行灭活,得到灭活后的第一次发酵提取液;

[0044] (b) 向步骤(a')中所得的灭活后的第一次发酵提取液中加入乳杆菌发酵所需的营养物质,优选葡萄糖,并加入乳杆菌进行第二次发酵,得到第二次发酵提取液;和任选地,

[0045] (c) 对步骤(b)所得的第二次发酵提取液进行离心和除菌过滤。

[0046] 在一些实施方案中,所述红景天原料为红景天根、红景天茎或红景天的其它部位。在一些实施方案中,所述红景天原料为红景天根。在一些实施方案中,所述红景天原料为红景天根粉。在一些实施方案中,所述红景天根粉的粒度为1~10目、10~20目、20~30目、30~40目、40~50目、50~60目、60~70目、70~80目、80~90目、90~100目、100~150目、150~200目、200~250目、250~300目、300~350目、350~400目、400~450目、450~500目、500~550目、550~600目、600~650目、650~700目、700~750目、750~800目、800~850目、850~900目、900~950目或950~1000目。在一些实施方案中,所述红景天根粉的粒度为40-60目。

[0047] 在一些实施方案中,所述红景天原料在所述发酵培养液中的含量为1~10g/L、10~20g/L、20~30g/L、30~40g/L、40~50g/L、50~60g/L、60~70g/L、70~80g/L、80~90g/L、90~100g/L、100~150g/L、150~200g/L、200~250g/L、250~300g/L、300~350g/L、350~400g/L、400~450g/L或450~500g/L。在一些实施方案中,所述红景天原料在所述发酵培养液中的含量为10~50g/L。

[0048] 在一些实施方案中,所述发酵培养液为本领域技术人员已知的酵母菌发酵常用的发酵培养液。在一些实施方案中,所述发酵培养液包含氮源、碳源和生长因子。在一些实施方案中,所述发酵培养液包含氮源、碳源、生长因子、无机盐以及水。在一些实施方案中,所述发酵培养液包含酵母提取物,其中所述酵母提取物为所述发酵培养液提供氮源和生长因子。在一些实施方案中,所述氮源为微生物培养常用氮源,包括无机氮源,例如,氨水、硫酸铵、氯化铵、硝酸盐等;和有机氮源例如蛋白胨、酵母粉、鱼粉、菌丝体等。在一些实施方案中,所述碳源为微生物培养常用碳源,例如但不限于,蔗糖、葡萄糖、果糖、乳糖、甘露醇、甘油、半乳糖或麦芽糖醇等。在一些实施方案中,所述无机盐为微生物培养常用无机盐,例如但不限于, K_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 $MgSO_4$ 、 $MnSO_4$ 、 $CaCl_2$ 等。在一些实施方案中,所述发酵培养液包含胰蛋白胨、酵母提取物和葡萄糖。在一些实施方案中,所述发酵培养液包含胰蛋白胨、酵母提取物、葡萄糖、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 KH_2PO_4 和水。

[0049] 在一些实施方案中,所述发酵培养液包含胰蛋白胨,其中所述胰蛋白胨的含量为5~10g/L、10~15g/L、15~20g/L、20~25g/L、25~30g/L、30~35g/L、35~40g/L、40~45g/L或45~50g/L。在一些实施方案中,所述发酵培养液包含胰蛋白胨,其中所述胰蛋白胨的含量为15~20g/L。

[0050] 在一些实施方案中,所述发酵培养液包含酵母提取物,其中所述酵母提取物的含量为1~4g/L、4~8g/L、8~12g/L、12~16g/L、16~20g/L、20~24g/L、24~28g/L、28~32g/L或32~36g/L。在一些实施方案中,所述发酵培养液包含酵母提取物,其中所述酵母提取物的含量为8~12g/L。

[0051] 在一些实施方案中,所述发酵培养液包含葡萄糖,其中所述葡萄糖的含量为5~10g/L、10~15g/L、15~20g/L、20~25g/L、25~30g/L、30~35g/L、35~40g/L、40~45g/L、45~50g/L、50~60g/L、60~70g/L、70~80g/L、80~90g/L或90~100g/L。在一些实施方案中,所述发酵培养液包含葡萄糖,其中所述葡萄糖的含量为20~30g/L。

[0052] 在一些实施方案中,所述发酵培养液包含 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$,其中所述 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 的含量为0.1~0.3g/L、0.3~0.6g/L、0.6~0.8g/L、0.8~1.0g/L、1.0~1.3g/L、1.3~1.5g/L、

1.5~1.8g/L、1.8~2.0g/L、2.0~2.5g/L、2.5~3.0g/L、3.0~3.5g/L、3.5~4.0g/L、4.0~4.5g/L或4.5~5.0g/L。在一些实施方案中,所述发酵培养液包含 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$,其中所述 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 的含量为0.3~0.8g/L。

[0053] 在一些实施方案中,所述发酵培养液包含 KH_2PO_4 ,其中所述 KH_2PO_4 的含量为0.1~0.5g/L、0.5~1g/L、1~2g/L、2~3g/L、3~4g/L、4~5g/L、5~6g/L、6~7g/L、7~8g/L、8~9g/L、9~10g/L、10~15g/L、15~20g/L、20~25g/L或25~30g/L。在一些实施方案中,所述发酵培养液包含 KH_2PO_4 ,其中所述 KH_2PO_4 的含量为1~3g/L。

[0054] 在一些实施方案中,所述酵母菌选自扣囊覆膜酵母(*Saccharomycopsis fibuligera*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、假丝酵母(*Candida*)、孢汉逊酵母(*Hanseniaspora opuntiae*)、毕赤酵母(*Pichia fermentans*)、克鲁维酵母(*Kluyveromyces*)及其组合。在一些实施方案中,所述酵母菌选自扣囊覆膜酵母、酿酒酵母及其组合。

[0055] 在一些实施方案中,所加入的酵母菌的量为 $1.0 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^7$ CFU/ml,优选为 $1.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^6$ CFU/ml,最优选为 $5.0 \times 10^5 \sim 9.0 \times 10^5$ CFU/ml。

[0056] 在一些实施方案中,用酵母菌发酵的发酵时间为1~12h、12~24h、24~36h、36~48h、48~60h、60~72h、72~84h、84~96h、96~108h或108~120h。在一些实施方案中,用酵母菌发酵的发酵时间为24~48h。

[0057] 在一些实施方案中,用酵母菌发酵时的发酵温度为约10°C、11°C、12°C、13°C、14°C、15°C、16°C、17°C、18°C、19°C、20°C、21°C、22°C、23°C、24°C、25°C、26°C、27°C、28°C、29°C、30°C、31°C、32°C、33°C、34°C、35°C、36°C、37°C、38°C、39°C、40°C、41°C、42°C、43°C、44°C、45°C、46°C、47°C、48°C、49°C、50°C。在一些实施方案中,用酵母菌发酵时的发酵温度为10°C~50°C,优选为25°C~35°C,更优选为25°C~30°C,最优选为约28°C。

[0058] 在一些实施方案中,用酵母菌发酵时的pH为约4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.2、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9或7.0。在一些实施方案中,用酵母菌发酵时的pH为4-7,优选为5-6,更优选为5.2-5.8,最优选为约5.5。

[0059] 在一些实施方案中,在第一次发酵结束后且在第二次发酵开始前,对第一次发酵提取液进行灭活,优选通过升温进行灭活。在一些实施方案中,灭活的温度为50~60°C、60~70°C、70~80°C、80~90°C、90~100°C、100~110°C、110~120°C、120~130°C、130~140°C或140~150°C。在一些实施方案中,灭活的温度为80~100°C。

[0060] 在一些实施方案中,对第一次发酵提取液进行灭活的灭活时间为5分钟至10分钟、10分钟至15分钟、15分钟至20分钟、20分钟至25分钟、25分钟至30分钟、30分钟至35分钟、35分钟至40分钟、40分钟至45分钟、45分钟至50分钟、50分钟至55分钟或55分钟至60分钟。在一些实施方案中,对第一次发酵提取液进行灭活的灭活时间为5分钟至1小时,优选5分钟至40分钟,更优选10分钟至30分钟,最优选约20分钟。

[0061] 在一些实施方案中,在进行用乳杆菌的第二次发酵时,在发酵液中另外加入乳杆菌发酵所需的营养物质。在一些实施方案中,所述营养物质可以是碳源。在一些实施方案中,所述碳源可以是葡萄糖、果糖、蔗糖、阿拉伯糖、麦芽糖。在一些实施方案中,在进行用乳杆菌的第二次发酵时,在发酵液中另外加入葡萄糖。

[0062] 在一些实施方案中,在进行用乳杆菌的第二次发酵时,在发酵液中另外加入的乳杆菌发酵所需的营养物质被预先灭菌,优选通过高温灭菌。在一些实施方案中,所述高温灭菌是在80~90℃、90~100℃、100~110℃、110~120℃、120~130℃、130~140℃或140~150℃下进行的,优选在110~120℃下进行,最优选在115℃下进行。在一些实施方案中,所述预先灭菌的灭菌时间为5分钟至10分钟、10分钟至15分钟、15分钟至20分钟、20分钟至25分钟、25分钟至30分钟、30分钟至35分钟、35分钟至40分钟,优选10分钟至30分钟,最优选约20分钟。

[0063] 在一些实施方案中,在进行用乳杆菌的第二次发酵时所加入的葡萄糖的量为使得添加后酵母菌发酵液中的葡萄糖终浓度为1~5g/L、5~10g/L、10~15g/L、15~20g/L、20~25g/L、25~30g/L、30~35g/L、35~40g/L、40~45g/L、45~50g/L、50~60g/L、60~70g/L、70~80g/L、80~90g/L或90~100g/L。在一些实施方案中,在进行用乳杆菌的第二次发酵时所加入的葡萄糖的量为使得添加后酵母菌发酵液中的葡萄糖终浓度为1~100g/L,优选10~20g/L。

[0064] 在一些实施方案中,所述乳杆菌选自鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*)、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)、干酪乳杆菌(*Lacticaseibacillus casei*)、短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)、保加利亚乳杆菌(*Lactobacillus bulgaricus*)、罗伊氏乳杆菌(*Lactobacillus reuteri*)、唾液乳杆菌(*Lactobacillus salivarius*)及其组合。在一些实施方案中,所述乳杆菌选自鼠李糖乳杆菌、植物乳杆菌、嗜酸乳杆菌、干酪乳杆菌及其组合。

[0065] 在一些实施方案中,所加入的乳杆菌的量为 $1.0 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^7$ CFU/ml,优选 $1.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^6$ CFU/ml,最优选 $5.0 \times 10^5 \sim 9.0 \times 10^5$ CFU/ml。

[0066] 在一些实施方案中,在用乳杆菌进行的第二次发酵中,以乳杆菌种子液的形式加入乳杆菌,所述乳杆菌种子液的菌体浓度为 $1.0 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^8$ CFU/ml,乳杆菌种子液接种量为所述红景天酵母菌发酵液的0.5-2%。

[0067] 在一些实施方案中,用乳杆菌发酵的发酵时间为1~12h、12~18h、18~24h、24~26h、26~28h、28~30h、30~32h、32~36h、36~42h、42~48h、48~60h或60~120h。在一些实施方案中,用乳杆菌发酵的发酵时间为18~32h。

[0068] 在一些实施方案中,用乳杆菌发酵时的发酵温度为约10℃、11℃、12℃、13℃、14℃、15℃、16℃、17℃、18℃、19℃、20℃、21℃、22℃、23℃、24℃、25℃、26℃、27℃、28℃、29℃、30℃、31℃、32℃、33℃、34℃、35℃、36℃、37℃、38℃、39℃、40℃、41℃、42℃、43℃、44℃、45℃、46℃、47℃、48℃、49℃、50℃。在一些实施方案中,用乳杆菌发酵时的发酵温度为10℃~50℃,优选为25℃~45℃,更优选为30℃~40℃,最优选为约35℃。

[0069] 在一些实施方案中,用乳杆菌发酵时的pH为约4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.2、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9或7.0。在一些实施方案中,用乳杆菌发酵时的pH为4-7,优选为5.5-6.5,最优选为约6。

[0070] 在一些实施方案中,还进一步包含对第二次发酵提取液进行离心和除菌过滤的步骤。

[0071] 红景天发酵提取液

[0072] 本发明的第四方面涉及一种红景天发酵提取液,其是通过根据本发明的第一方面至第三方面中的任一方面所述的方法制备的。

[0073] 在一些实施方案中,经两步发酵获得的所述红景天发酵提取液比同等条件下仅经酵母菌或乳杆菌发酵获得的红景天发酵提取液的美白能力更强。

[0074] 在一些实施方案中,经两步发酵获得的所述红景天发酵提取液比同等条件下只经酵母菌或乳杆菌发酵获得的红景天发酵提取液的抗氧化能力更强。

[0075] 药物制剂和化妆品组合物

[0076] 本发明的第五方面涉及一种化妆品组合物,其包含根据本发明的第四方面的红景天发酵提取液。

[0077] 本发明的第六方面涉及一种药物制剂,其包含根据本发明的第四方面的红景天发酵提取液。

[0078] 在一些实施方案中,所述药物制剂或化妆品组合物用于皮肤护理。在一些实施方案中,所述药物制剂或化妆品组合物用于美白、抗氧化或抗皮肤老化。在一些实施方案中,所述药物制剂或化妆品组合物包含红景天发酵提取液作为活性成分以及一种或多种药学上或美容学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。在一些实施方案中,所述药物制剂或化妆品组合物为霜剂、乳液、糊剂、软膏剂、面膜、凝胶剂、洗剂或精华液。在一些实施方案中,本发明的药物制剂或化妆品组合物还可以含有一种或多种其它成分,如植物提取物、营养性添加剂、表面活性剂、香精与香料、色素、防腐剂、抗氧剂、保湿剂、紫外线吸收剂、收敛剂、助渗剂、pH值调节剂等。本领域技术人员可以根据他们的常识和具体需要进行选择。

[0079] 红景天发酵提取液用于制备药物或化妆品组合物的用途

[0080] 本发明的第七方面涉及根据本发明第四方面的红景天发酵提取液在制备具有美白和/或抗氧化能力的药物或化妆品组合物中的用途。

具体实施方式

[0081] 本发明可通过以下实施方案进行实施,但本发明并不限于此。

[0082] 本发明实施方案中采用的仪器设备均为本领域常规仪器设备并可采用符合相应标准的仪器设备替代。

[0083] 本发明实施方案中采用的中草药原料药如无明确指示均为市售可得的,本发明实施方案中采用的试剂如无明确指示均为市售分析纯化学试剂。

[0084] 本发明所提及的原材料及仪器设备均为本领域常用原材料及仪器设备,仅为示例,并不旨在限定本发明的保护范围。本领域技术人员可以基于本发明的公开的内容选取等效的原材料及相关仪器设备。

[0085] 实验材料、试剂、设备和统计学分析方法

[0086] 实施例中的菌种来源:扣囊覆膜酵母购于中国普通微生物菌种保藏管理中心(地址:武汉大学),保藏号CGMCC 2.5608;鼠李糖乳杆菌为本实验室自行分离菌株,该菌株已经被保藏在中国典型培养物保藏中心(CCTCC),相关保藏信息如下:

	物种	菌株	保藏号	保藏日期
[0087]	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	LR-2210	M20232110	2023年11月02日

[0088] 红景天原料:大花红景天,购于上海百合缘大药房。

[0089] 实验设备:(1) 5L玻璃发酵罐,上海保兴BIOTECH-5JGY;(2) 恒温振荡器,上海智诚ZWY-2102C;(3) 洁净工作台,苏净安泰HVS-1300-U;(4) 高速粉碎机,浙江红景天工贸有限公司DE-300g。

[0090] 实验试剂:酵母提取物、胰蛋白胨购至英国OXOID,500g/瓶;牛肉浸粉购至青岛海博生物技术有限公司,250g/瓶;其余试剂购至上海泰坦科技股份有限公司的General-reagent品牌,包装规格500g/瓶。

[0091] 统计学方法:实验结果为三个平行实验数据的均值±标准差,使用配对t检验(paired t-test)检验组间差异是否有统计学意义。统计软件为SigmaPlot 14.0。

[0092] 实施例1:红景天用酵母菌和鼠李糖乳杆菌两步发酵

[0093] (1) 种子液的制备

[0094] 酵母种子液:在超净工作台上取扣囊覆膜酵母冻存液0.5mL接种到装有50ml培养基的250ml三角瓶中,28℃,180rpm培养16h,菌体处于对数生长期。种子培养基成分:胰蛋白胨20g/L,酵母提取物10g/L,葡萄糖20g/L,pH5.5,115℃,20min灭菌。

[0095] 乳杆菌种子液:在超净工作台上取鼠李糖乳杆菌冻存液0.5mL接种到装有50ml培养基的250ml三角瓶中,37℃,静置培养16h,菌体处于对数生长期。种子培养基成分:胰蛋白胨10g/L,酵母提取物5g/L,葡萄糖20g/L,牛肉浸粉8g/L,柠檬酸铵2g/L,Tween80 1g/L,乙酸钠5g/L, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2g/L, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.1g/L,pH6.5,115℃,20min灭菌。

[0096] (2) 红景天酵母发酵液的制备

[0097] 红景天根经烘干、粉碎,过60目筛得红景天根粉备用。发酵在5L自动玻璃发酵罐中进行,装液2.5L,将红景天根粉以50g/L的终浓度加入至发酵培养基(含胰蛋白胨20g/L,酵母提取物10g/L,葡萄糖20g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g/L, KH_2PO_4 2g/L,pH5.5)中。在115℃,30min灭菌,冷却后接种步骤(1)酵母种子液。发酵工艺:搅拌300rpm,温度28℃,通气1.5L/min,压力0.03MPa,发酵周期36h。发酵结束后80℃,20min灭活。

[0098] (3) 鼠李糖乳杆菌二次发酵液的制备

[0099] 在步骤(2)灭活后的发酵液中补加灭菌的50ml 70% (w/w) 葡萄糖溶液,接种步骤(1)乳杆菌种子液,进行二次发酵。发酵工艺:搅拌50rpm,温度35℃,表层通气0.5L/min,压力0.01MPa,碱液控制pH6.0,发酵周期28h,葡萄糖耗尽。

[0100] (4) 发酵液除杂除菌

[0101] 步骤(3)得到的红景天二次发酵液经过以10000×g离心10min和用0.22um膜过滤除菌后,得到红景天发酵产物滤液。

[0102] 实施例2:

[0103] 实施例1中的红景天根粉由50g/L改为25g/L。

[0104] 对比例1:50g/L红景天提取液未发酵

[0105] 红景天根经烘干、粉碎,过60目筛得红景天根粉备用。称取125g红景天根粉至纯水

中,定容2.5L,115℃,20min灭菌。冷却后红景天提取液经过以10000×g离心10min和用0.22um膜过滤除菌后,得到红景天提取物滤液。

[0106] 对比例2:25g/L红景天提取液未发酵

[0107] 红景天根经烘干、粉碎,过60目筛得红景天根粉备用。称取62.5g红景天根粉至纯水中,定容2.5L,115℃,20min灭菌。冷却后红景天提取液经过以10000×g离心10min和用0.22um膜过滤除菌后,得到红景天提取物滤液。

[0108] 对比例3:50g/L红景天仅用酵母发酵

[0109] 实施例1的发酵方法中,省去第三步“鼠李糖乳杆菌二次发酵液的制备”,即为红景天酵母发酵液的制备方法。

[0110] 对比例4:25g/L红景天仅用酵母发酵

[0111] 实施例2的发酵方法中,省去第三步“鼠李糖乳杆菌二次发酵液的制备”,即为红景天酵母发酵液的制备方法。

[0112] 对比例5:50g/L红景天仅用鼠李糖乳杆菌发酵

[0113] (1) 种子液的制备

[0114] 乳杆菌种子液:在超净工作台上取鼠李糖乳杆菌冻存液0.5mL接种到装有50ml培养基的250ml三角瓶中,37℃,静置培养16h,菌体处于对数生长期。种子培养基含有胰蛋白胨10g/L,酵母提取物5g/L,葡萄糖20g/L,牛肉浸粉8g/L,柠檬酸铵2g/L,Tween80 1g/L,乙酸钠5g/L, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2g/L, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.1g/L,pH6.5,115℃,20min灭菌。

[0115] (2) 红景天鼠李糖乳杆菌发酵液的制备

[0116] 红景天根经烘干、粉碎,过60目筛得红景天根粉备用。发酵在5L自动玻璃发酵罐中进行,装液2.5L,将红景天根粉以50g/L的终浓度加入至发酵培养基(含胰蛋白胨10g/L,酵母提取物5g/L,葡萄糖20g/L,牛肉浸粉8g/L,柠檬酸铵2g/L,Tween801g/L,乙酸钠5g/L, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2g/L, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.1g/L,pH6.5)中。在115℃,20min灭菌,冷却后接种步骤(1)鼠李糖乳杆菌种子液。发酵工艺:搅拌50rpm,温度35℃,表层通气0.5L/min,压力0.01MPa,碱液控制pH6.0,发酵周期28h。

[0117] (3) 发酵液除杂除菌

[0118] 步骤(2)得到的红景天发酵液经过以10000×g离心10min和用0.22um膜过滤除菌后,得到红景天发酵产物滤液。

[0119] 对比例6:对比例5中的红景天根粉添加量改为25g/L。

[0120] 实验结果

[0121] 未经酵母发酵的红景天提取液对乳杆菌有明显抑制,接种鼠李糖乳杆菌后,鼠李糖乳杆菌被抑制,活菌数目大幅度减少,因此鼠李糖杆菌几乎不能通过生长代谢消耗葡萄糖。而经酵母菌发酵后的红景天提取液对鼠李糖乳杆菌的抑菌作用减弱,鼠李糖乳杆菌在培养基中可生长代谢,并耗尽培养基中的葡萄糖。发酵后的红景天提取液在美白和抗氧化能力上均有提高。

[0122] 1) 两步发酵法降低了红景天发酵提取液对鼠李糖乳杆菌的抑菌作用

[0123] 为了对比酵母菌发酵前后红景天对鼠李糖乳杆菌的抑菌作用,检测了鼠李糖乳杆菌发酵液中活菌数量的变化,结果如下表1所示。

[0124] 表1

发酵方法	发酵 0h 活菌数 CFU/mL	发酵 28h 活菌数 CFU/mL
无红景天对照组	$(6.7 \pm 1.1) \times 10^5$	$(9.5 \pm 2.4) \times 10^7$
[0125] 实施例 1 (50g/L 红景天)	$(8.3 \pm 0.8) \times 10^5$	$(1.9 \pm 1.3) \times 10^6$
实施例 2 (25g/L 红景天)	$(8.1 \pm 2.0) \times 10^5$	$(7.1 \pm 0.7) \times 10^6$
对比例 4 (50g/L 红景天)	$(7.8 \pm 1.7) \times 10^5$	$(8.7 \pm 2.1) \times 10$
对比例 5 (25g/L 红景天)	$(6.9 \pm 1.1) \times 10^5$	$(6.9 \pm 1.3) \times 10^2$

[0126] 由活菌检测数据可知,培养基中红景天的存在对鼠李糖乳杆菌的抑菌作用是显著的(对比例4和5vs无红景天对照组),在采用两步发酵法后(实施例1和2),经酵母菌发酵后的红景天发酵液对鼠李糖乳杆菌的抑制作用明显降低(实施例1vs对比例4;实施例2vs对比例5),其中两步发酵的实施例1相对于单步发酵的对比例4对鼠李糖乳杆菌的抑制作用明显降低约5个数量级($(1.9 \pm 1.3) \times 10^6$ vs $(8.7 \pm 2.1) \times 10$),两步发酵的实施例2相对于单步发酵的对比例5对鼠李糖乳杆菌的抑制作用明显降低约4个数量级($(7.1 \pm 0.7) \times 10^6$ vs $(6.9 \pm 1.3) \times 10^2$)。这可能是由于酵母菌降解了红景天中一些抑制乳杆菌生长的成分,且酵母菌代谢产物中丰富的营养物质正好满足乳杆菌对营养的高要求。

[0127] 2) 两步发酵法提高了红景天发酵提取液的美白作用

[0128] 酪氨酸酶是黑色素形成的关键酶,许多美白、祛斑产品以抑制酪氨酸酶达到美白作用,对酪氨酸酶抑制作用的强弱是评价美白能力的主要指标。对实施例1-2和对比例1-6测得的酪氨酸酶抑制IC50的结果如下表2所示。

[0129] 表2

红景天发酵方法	酪氨酸酶抑制 IC50 (体积%)
实施例 1 (50g/L 红景天两步发酵)	$7.67 \pm 0.19^*$
实施例 2 (25g/L 红景天两步发酵)	$14.72 \pm 0.814^{**}$
对照组	
[0130] 对比例 1 (50g/L 红景天未发酵)	11.30 ± 0.71
对比例 2 (25g/L 红景天未发酵)	23.41 ± 1.1
对比例 3 (50g/L 红景天酵母发酵)	8.11 ± 0.1
对比例 4 (25g/L 红景天酵母发酵)	15.97 ± 0.21
对比例 5 (50g/L 红景天鼠李糖乳杆菌发酵)	12.19 ± 0.36
对比例 6 (25g/L 红景天鼠李糖乳杆菌发酵)	23.22 ± 0.57

[0131] *表示与发酵前比较, $p < 0.05$; **表示与发酵前比较, $p < 0.01$

[0132] 由以上表2的结果可以看出,50g/L红景天根粉经二次发酵后的发酵液酪氨酸酶抑制率IC50降低至7.67% (体积%),与对比例1、对比例3和对比例5相比,均具有显著性差异(p值分别为0.015、0.013、0.002)。25g/L红景天根粉经二次发酵后的发酵液酪氨酸酶抑制率IC50降低至14.72% (体积%),与对比例2和对比例6相比,均具有显著性差异(p值分别为0.001、0.005),美白能力有较大幅度提升。

[0133] 3) 两步发酵法提高了红景天发酵提取液的抗氧化能力

[0134] DPPH法是一种常用的测定食品、药品等样品抗氧化性的方法。其原理是基于DPPH自由基与抗氧化剂的反应,通过比较DPPH自由基还原前后的吸光度变化来评估样品的抗氧化能力。对实施例1-2和对比例1-6测得的DPPH清除IC50的结果如下表3所示。

[0135] 表3

红景天发酵方法	DPPH 清除 IC50 (体积%)
实施例 1 (50g/L 红景天两步发酵)	0.121 ± 0.006**
实施例 2 (25g/L 红景天两步发酵)	0.209 ± 0.013**
对照组	
对比例 1 (50g/L 红景天未发酵)	0.214 ± 0.008
[0136] 对比例 2 (25g/L 红景天未发酵)	0.425 ± 0.032
对比例 3 (50g/L 红景天酵母发酵)	0.193 ± 0.011
对比例 4 (25g/L 红景天酵母发酵)	0.379 ± 0.013
对比例 5 (50g/L 红景天鼠李糖乳杆菌发酵)	0.221 ± 0.014
对比例 6 (25g/L 红景天鼠李糖乳杆菌发酵)	0.436 ± 0.010

[0137] **表示与发酵前比较, $p < 0.01$

[0138] 50g/L红景天根粉经二次发酵后DPPH清除率IC50从0.214%降低至0.121% (体积分数),与对比例1、对比例3和对比例5相比,均具有显著性差异(p值分别为0.007、0.003、0.002)。25g/L红景天根粉经二次发酵后的DPPH清除率IC50降低至0.209% (体积分数),与对比例2、对比例4和对比例6相比,均具有显著性差异(p值分别为0.003、0.008、0.001)。经二次发酵后的红景天根提取液抗氧化能力有大幅度提升,且第二次的乳杆菌发酵提升幅度更大。