



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111132662 A

(43)申请公布日 2020.05.08

(21)申请号 201880062136.1

(22)申请日 2018.09.21

(30)优先权数据

10-2017-0124489 2017.09.26 KR

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.03.25

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2018/011260 2018.09.21

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/066413 KO 2019.04.04

(71)申请人 高丽大学校产学协力团

地址 韩国首尔市城北区安岩路145(邮递区号:02841)

(72)发明人 林承泽 吴受晋

努恩提尼·里蒂布特

(74)专利代理机构 北京同立钧成知识产权代理有限公司 11205

代理人 杨文娟 臧建明

(51)Int.Cl.

A61K 8/9794(2006.01)

A61Q 19/02(2006.01)

A61Q 19/08(2006.01)

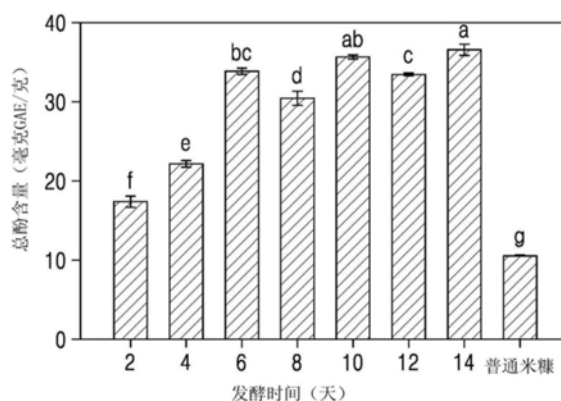
权利要求书1页 说明书8页 附图7页

(54)发明名称

含有发酵米副产物提取物或其部分作为活性成分的抗氧化剂、皮肤美白以及减少皱纹的多功能化妆品组合物

(57)摘要

本发明涉及一种含有发酵米副产物提取物或其部分作为活性成分的抗氧化剂、皮肤美白以及减少皱纹的多功能化妆品组合物。通过使用根据本发明的发酵米副产物提取物或其部分,可通过发酵、提取以及分馏增加米副产物之总酚含量,且可提供显示高抗氧化剂能力和极佳皮肤美白和减少皱纹效果的化妆品组合物。



1. 一种抗氧化剂、皮肤美白以及抗皱纹多功能化妆品组合物,包括来自发酵米副产物的提取物或其部分作为活性成分。

2. 根据权利要求1所述的抗氧化剂、皮肤美白以及抗皱纹多功能化妆品组合物,其中来自所述发酵米副产物的所述提取物是通过用选自酱油曲霉 (*Aspergillus sojae*)、米曲霉 (*Aspergillus oryzae*)、泡盛曲霉 (*Aspergillus awamori*)、米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 以及从毛红曲菌 (*Monascus pilosus*) 组成的群中的至少一种真菌种类接种米副产物,发酵所述接种米副产物,且提取所述发酵米副产物来制备。

3. 根据权利要求2所述的抗氧化剂、皮肤美白以及抗皱纹多功能化妆品组合物,其中所述发酵进行6天到14天。

4. 根据权利要求2所述的抗氧化剂、皮肤美白以及抗皱纹多功能化妆品组合物,其中所述发酵通过用0.1重量份到20重量份的所述真菌种类接种100重量份的所述米副产物并在20℃到45℃下培育所述接种米副产物来进行。

5. 根据权利要求1所述的抗氧化剂、皮肤美白以及抗皱纹多功能化妆品组合物,其中所述发酵米副产物用选自水、具有1至4个碳原子的无水或含水醇、乙酸乙酯、丙酮、甘油、乙二醇、丙二醇以及丁二醇组成的群中的至少一种溶剂来提取。

6. 根据权利要求1所述的抗氧化剂、皮肤美白以及抗皱纹多功能化妆品组合物,其中所述部分通过用选自己烷、氯仿、乙酸乙酯、丁醇、水以及其混合溶剂组成的群中的溶剂分馏来自所述发酵米副产物的所述提取物来制备。

7. 根据权利要求1所述的抗氧化剂、皮肤美白以及抗皱纹多功能化妆品组合物,其中将所述组合物制备成配制物,所述配制物选自以下组成的群:溶液、外用软膏、乳膏、泡沫、滋养乳液、软化乳液、包装、软水、乳化液、化妆基质、香精、肥皂、液体清洁剂、沐浴制剂、防晒霜、防晒油、悬浮液、糊剂、凝胶、乳液、粉末、含表面活性剂的清洁剂、油、粉底、乳化液粉底、蜡粉底、贴剂以及喷雾。

8. 根据权利要求1所述的抗氧化剂、皮肤美白以及抗皱纹多功能化妆品组合物,其中所述米副产物是米胚芽或米糠。

含有发酵米副产物提取物或其部分作为活性成分的抗氧化剂、皮肤美白以及减少皱纹的多功能化妆品组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及一种含有发酵米副产物提取物或其部分作为活性成分的抗氧化剂、皮肤美白以及减少皱纹的多功能化妆品组合物。

背景技术

[0002] 皮肤衰老可大致分为由内在因素引起的衰老和由外在因素引起的衰老。皮肤衰老根据其原因在皮肤中引起结构和功能改变。因为皮肤暴露在外部环境中,所以大多数与皮肤年龄相关的变化都受到外部环境因素(例如紫外线)影响。随着日渐衰老,皮肤变得干燥、暗沉并失去其弹性,从而导致皱纹的数量增加。

[0003] 氧自由基(oxygen free radical)是衰老的主要原因且在需要氧气的新陈代谢过程中不可避免地产生。非常不稳定的氧自由基攻击身体组织,以使细胞氧化并且损伤细胞,从而导致皮肤衰老。

[0004] 氧自由基使细胞膜中的体内(in vivo)蛋白质或脂质氧化,从而损害身体功能且损伤DNA。因此,氧自由基还可诱发突变和癌变。此外,氧自由基攻击胶原蛋白(collagen)和皮肤纤维,以致皮肤衰老,结果导致皮肤下垂和松弛,从而形成皱纹。

[0005] 人体具有酶防御系统,例如对抗过多的氧自由基的超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)。20多岁的人由于其抗氧化剂酶防御系统的高活性而在保持健康方面不具有困难。然而,由于抗氧化剂酶的功能随着年龄的增长而快速减弱,人体容易暴露在氧自由基中,从而加速衰老。因此,适当去除氧自由基对抗衰老是必要的。

[0006] 衰老导致皮肤结构发生不同组织学变化,但其通常会使得表皮变薄,表皮与真皮之间的界面变平,且弹性纤维的数量减少,从而导致皱纹形成。

[0007] 由于皮肤随着年龄的增长或在紫外线的影响下日渐衰老,因此皮肤皱纹基本上与真皮层中的胶原蛋白(collagen)和弹性蛋白(elastin)的变化相关联。皮肤中减少的胶原蛋白和弹性蛋白降低了皮肤的弹性,最终导致皱纹形成。

[0008] 黑色素具有保护身体免受例如胺、自由基以及金属离子的细胞毒性剂侵害的功能,但其过度产生导致皮肤色素沉着,例如黄褐斑和雀斑,且促进皮肤衰老。

[0009] 黑色素(melanin)是一种广泛分布在自然界中的酚类聚合物,且是一种黑色色素和蛋白质的复合物。黑色素的合成开始于黑色素细胞(melanocyte)中酪氨酸(tyrosine)向DOPA的转化。然后,使DOPA氧化成DOPA醌(DOPA-quinone)。酪氨酸酶(tyrosinase)(氧化酶)参与DOPA醌的转化。此后,使DOPA醌自动氧化成黑褐色黑色素。出于此原因,可基于抑制酪氨酸酶的酶活性以阻止黑色素生成来对美白化妆品的美白效果进行预计。

[0010] 米糠(rice bran)是指在将糙米磨成精米时得到的果皮、种皮以及糊粉的粉状产品。众所周知,米中95%的营养成分存在于米糠中,且米胚芽和功能成分存在于糙米的糊粉层中。米糠含有高质量蛋白质、膳食纤维以及各种维生素和矿物质,且富含天然产生的抗氧化剂,例如生物活性酚类化合物(phenolic compound)、类黄酮化合物(flavonoid)

compound)、 γ -谷维素(γ -oryzanol)、 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)、神经酰胺(ceramide)、三烯生育酚(tocotrienol)以及植物固醇(phytosterols)、水溶性维生素以及例如钙、磷以及铁的矿物质。

[0011] 尽管米副产物(包含米糠)中存在各种功能成分,但大多数米副产物被浪费,或仅用于有限的应用,例如牲畜饲料。最近在食品工业中开发了米糠油,且目前正在通过对包含米糠的米副产物的各种功能性的研究来开发用于在食品和化妆品工业中利用米糠的技术。然而,这些技术仍处于早期开发阶段。

[0012] 在此方面,韩国专利公开案第10-2012-0117539号公开一种包含米糠提取物的美白和抗皱纹组合物。然而,组合物的美白和抗皱纹效果未能达到令人满意的水平。

[0013] 因此,本发明的发明人已对包含米糠的米副产物的功效进行了研究,且因此,发现使用来自发酵米副产物的提取物或其部分实现显著改善的抗氧化剂、皮肤美白以及抗皱纹效果。已基于这一发现完成了本发明。

发明内容

[0014] 本发明要解决的问题

[0015] 本发明致力于解决以上问题,且旨在提供包含来自发酵米副产物的提取物或其部分作为活性成分的抗氧化剂、皮肤美白以及抗皱纹多功能化妆品组合物。

[0016] 解决问题的方式

[0017] 本发明的一方面提供一种包含来自发酵米副产物的提取物或其部分作为活性成分的抗氧化剂、皮肤美白以及抗皱纹多功能化妆品组合物。

[0018] 根据本发明,来自发酵米副产物的提取物可通过用选自酱油曲霉(*Aspergillus sojae*)、米曲霉(*Aspergillus oryzae*)、泡盛曲霉(*Aspergillus awamori*)、米曲霉(*Aspergillus oryzae*)以及从毛红曲菌(*Monascus pilosus*)组成的群中的至少一种真菌种类接种米副产物,发酵所述接种米副产物,且提取所述发酵米副产物来制备。

[0019] 发酵可进行6天到14天。

[0020] 发酵可通过用0.1重量份到20重量份的真菌种类接种100重量份的米副产物并在20℃到45℃下培育所述接种米副产物来进行。

[0021] 根据本发明,发酵米副产物可用选自水、具有1至4个碳原子的无水或含水醇、乙酸乙酯、丙酮、甘油、乙二醇、丙二醇以及丁二醇组成的群中的至少一种溶剂来提取。

[0022] 根据本发明,所述部分可通过用选自己烷、氯仿、乙酸乙酯、丁醇、水以及其混合溶剂组成的群中的溶剂分馏来自发酵米副产物的提取物来制备。

[0023] 根据本发明,可将组合物制备成配制物,所述配制物选自以下组成的群:溶液、外用软膏、乳膏、泡沫、滋养乳液、软化乳液、包装、软水、乳化液、化妆基质、香精、肥皂、液体清洁剂、沐浴制剂、防晒霜、防晒油、悬浮液、糊剂、凝胶、乳液、粉末、含表面活性剂的清洁剂、油、粉底、乳化液粉底、蜡粉底、贴剂以及喷雾。

[0024] 根据本发明,米副产物可以是米胚芽或米糠。

[0025] 本发明的效果

[0026] 通过一系列发酵、提取以及可选分馏制备的提取物或其部分的使用实现根据本发明的化妆品组合物的总酚含量增加、高抗氧化剂活性以及显著皮肤美白和抗皱纹效果。

附图说明

[0027] 图1是示出实例的来自在不同时间内发酵的米糠的提取物的总酚含量的图。

[0028] 图2是示出实例的来自在不同时间内发酵的米糠的提取物的DPPH自由基清除活性的图。

[0029] 图3是示出实例的来自在不同时间内发酵的米糠的提取物的酪氨酸酶抑制活性的图,测量所述酪氨酸酶抑制活性以研究提取物的美白活性。

[0030] 图4是示出实例的来自在不同时间内发酵的米糠的提取物的弹性蛋白酶抑制活性的图,测量所述弹性蛋白酶抑制活性以研究提取物的抗皱纹效果。

[0031] 图5示出标准化合物 (standard compound) 在280纳米 (nm) 处的HPLC的结果,特别是(1) 没食子酸 (gallic acid)、(2) 4-羟基苯甲酸 (4-hydroxybenzoic acid) 以及(3) 香草酸 (vanillic acid) 的HPLC峰。

[0032] 图6示出标准化合物 (standard compound) 在320纳米处的HPLC的结果,特别是(1) 咖啡酸 (caffeic acid)、(2) 香豆酸 (coumaric acid)、(3) 芥子酸 (sinapic acid) 以及(4) 阿魏酸 (ferulic acid) 的HPLC峰。

[0033] 图7示出实例的 (a) 来自未发酵米糠的提取物和来自发酵了 (b) 2天、(c) 4天、(d) 6天、(e) 8天、(f) 10天、(g) 12天以及 (h) 14天的米糠的提取物的HPLC的结果,在280纳米的UV检测波长下测量所述结果以识别提取物中的生物活性物质。

[0034] 图8示出实例的 (a) 来自未发酵米糠的提取物和来自发酵了 (b) 2天、(c) 4天、(d) 6天、(e) 8天、(f) 10天、(g) 12天以及 (h) 14天的米糠的提取物的HPLC的结果,在320纳米的UV检测波长下测量所述结果以识别提取物中的生物活性物质。

[0035] 图9示出实例的 (a) 来自未发酵米糠的提取物和来自发酵了 (b) 2天、(c) 4天、(d) 6天、(e) 8天、(f) 10天、(g) 12天以及 (h) 14天的米糠的提取物的HPLC的结果,在360纳米的UV检测波长下测量所述结果以识别提取物中的生物活性物质。

[0036] 图10示出用于在实例中从发酵米副产物中制备提取物的部分的工艺。

[0037] 图11是示出实例的来自发酵米糠的提取物的部分的酪氨酸酶抑制活性的图,测量所述酪氨酸酶抑制活性以研究部分的美白活性。

[0038] 图12是示出实例的来自发酵米糠的提取物的部分的弹性蛋白酶抑制活性的图,测量所述弹性蛋白酶抑制活性以研究部分的抗皱纹效果。

具体实施方式

[0039] 现在将更详细地描述本发明。

[0040] 本发明提供一种包含来自发酵米副产物的提取物或其部分作为活性成分的抗氧化剂、皮肤美白以及抗皱纹多功能化妆品组合物。

[0041] 来自发酵米副产物的提取物优选地通过用选自酱油曲霉 (*Aspergillus sojae*)、米曲霉 (*Aspergillus oryzae*)、泡盛曲霉 (*Aspergillus awamori*)、米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 以及从毛红曲菌 (*Monascus pilosus*) 组成的群中的至少一种真菌种类接种米副产物,发酵接种米副产物,且提取发酵米副产物来制备。如从以下的实例部分中可特别看出,来自用酱油曲霉 (*Aspergillus sojae*) 发酵的米副产物的提取物中在总酚含量、DPPH自由基清除活性 (DPPH radical scavenging activity, DPPH)、抗氧化剂活性、

酪氨酸酶抑制活性以及弹性蛋白酶抑制活性方面表现出显著地改善的特性。

[0042] 发酵优选地进行6天到14天。如从以下的实例部分中可以看出,如果发酵时间短于上文定义的下限,那么在总酚含量、DPPH自由基清除活性(DPPH)、抗氧化剂活性、酪氨酸酶抑制活性以及弹性蛋白酶抑制活性方面的影响可以忽略不计。同时,如果发酵时间超过上文定义的上限,那么上述效果不会进一步改善。

[0043] 发酵优选地通过用0.1重量份到20重量份的真菌种类接种100重量份的米副产物且在20℃到45℃下培育接种米副产物来进行。

[0044] 发酵米副产物可用选自自由水、具有1至4个碳原子的无水或含水醇、乙酸乙酯、丙酮、甘油、乙二醇、丙二醇以及丁二醇组成的群中的至少一种溶剂来提取。提取溶剂更优选地选自水、具有1至4个碳原子的无水或含水醇以及其混合物。具有1至4个碳原子的醇的实例包含甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇、正丁醇以及叔丁醇。提取溶剂最优选为含水乙醇(其中乙醇优选地以30体积比到90体积比,更优选以40体积比到70体积比的量存在)或含水甲醇(其中甲醇优选地以30体积比到90体积比、更优选以40体积比到70体积比的量存在)。

[0045] 如本文中所使用,术语“部分”是指通过分馏包含各种组分的混合物以将具体组分或一组具体组分与混合物分离而得到的产物。分馏不限于特定方法,且可由所属领域中已知的任何合适的方法来进行。根据非限制性实例,部分可通过用溶剂处理来自发酵米副产物的提取物来制备。

[0046] 用于获得部分的溶剂不限于特定种类,且可以是所属领域中已知的任何溶剂。合适的分馏溶剂的非限制性实例包含:极性溶剂,包含例如乙醇和丁醇的水和醇;和非极性溶剂,例如己烷(hexane)、乙酸乙酯(ethyl acetate)、丙酮(acetone)以及氯仿(chloroform)。这些分馏溶剂可单独使用或以其中的两种或大于两种的混合物使用。

[0047] 在以下的实例部分中,用90%的乙醇提取发酵米糠,且提取物用己烷、氯仿、乙酸乙酯、丁醇以及水逐步地分馏。特定来说,与其它溶剂部分相比,发酵米糠的提取物的己烷和乙酸乙酯部分具有高酪氨酸酶和弹性蛋白酶抑制活性。

[0048] 根据本发明的化妆品组合物的总重量计,来自发酵米副产物的提取物的含量是0.01重量比到40重量比,优选地为0.1重量比到10重量比。来自发酵米副产物的提取物呈粉末或液体形式。

[0049] 米副产物可以是米胚芽或米糠。

[0050] 可将本发明的化妆品组合物制备成配制物,所述配制物选自自由以下组成的群:溶液、外用软膏、乳膏、泡沫、滋养乳液、软化乳液、包装、软水、乳化液、化妆基质、香精、肥皂、液体清洁剂、沐浴制剂、防晒霜、防晒油、悬浮液、糊剂、凝胶、乳液、粉末、含表面活性剂的清洁剂、油、粉底、乳化液粉底、蜡粉底、贴剂以及喷雾,但不限于此。

[0051] 本发明的化妆品组合物可还包含混合在普通皮肤化妆品中的至少一个化妆品可接受载体。这类化妆品可接受载体的实例包含(但不限于)油、水、表面活性剂、保湿剂、低级醇、增稠剂、螯合剂、颜料、防腐剂以及香料。

[0052] 化妆品可接受载体可根据化妆品组合物的配制物而不同。

[0053] 配制物可以是软膏、糊剂、乳膏或凝胶。在这种情况下,载体可选自(但不限于)动物油、植物油、蜡、石蜡、淀粉、黄芪胶、纤维素衍生物、聚乙二醇、硅酮、皂土、二氧化硅、滑石、氧化锌以及其混合物。

[0054] 可替代地,配制物可以是粉末或喷雾。在这种情况下,载体可选自(但不限于)乳糖、滑石、二氧化硅、氢氧化铝、硅酸钙以及聚酰胺粉末。特定来说,当配制物是喷雾时,组合可还包含一或多种喷射剂(propellant)(例如氯氟烃、丙烷/丁烷以及二甲醚),所述喷射剂可单独使用或以其中的两种或大于两种的混合物使用。

[0055] 可替代地,配制物可以是溶液或乳化液。在这种情况下,载体可选自(但不限于)溶剂、增溶剂以及乳化剂。合适的载体的实例包含(但不限于)水、乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苯甲酯、丙二醇或1,3-丁基乙二醇油,特别是棉籽油、花生油、玉米胚芽油、橄榄油、蓖麻油、芝麻油、甘油脂族酯(glycerol aliphatic ester)、聚乙二醇以及脱水山梨醇脂肪酸酯(sorbitan fatty acid ester)。这些载体可以单独使用或以其中的两种或大于两种的混合物使用。

[0056] 可替代地,配制物可以是悬浮液。在这种情况下,载体可选自(但不限于)液体稀释剂,例如水、乙醇和丙二醇;悬浮剂,例如乙氧基化异硬脂醇、聚氧乙烯山梨醇酯和聚氧乙烯脱水山梨醇酯;微晶纤维素;间氢氧化铝(metahydroxide);皂土;琼脂以及黄芪胶。这些载体可以单独使用或以其中的两种或大于两种的混合物使用。

[0057] 可替代地,配制物可以是肥皂。在这种情况下,载体可选自(但不限于)脂肪酸的碱金属盐、脂肪酸的半酯盐、脂肪酸蛋白质水解产物、羟乙基磺酸盐、羊毛脂衍生物、脂肪醇、植物油、甘油以及糖。这些载体可以单独使用或以其中的两种或大于两种的混合物使用。

[0058] 本发明的实施方式

[0059] 将参考以下实例更详细地解释本发明。对于本领域的技术人员来说明显的是,这些实例并不旨在限制本发明的范围。

[0060] 实例1.从发酵米糠中制备提取物

[0061] (1) 制备发酵米糠

[0062] 将酱油曲霉(*Aspegillus sojae*) KCCM 60354在马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)中培养,直到发生孢子形成为止(第14天)。收集孢子,将其洗涤两次并且在80℃下存放,以供进一步使用。米糠与水以1:1(w/w)的比率混合,且使用高压釜(autoclave)在121℃下除菌20分钟。将除菌米糠转移到皮氏培养皿(petri dish)中。将1重量份的真菌孢子(1毫升(ml)孢子溶液(spore solution)(1×10^6 孢子/毫升(spores/ml)))与100重量份的米糠(100克的米糠)充分混合。混合物在25℃下培育14天。在培育过程中,每隔2天收集样本,且在20℃下存放所述样本,以供进一步分析。

[0063] (2) 从发酵米糠制备提取物

[0064] 用95%乙醇提取在不同培育时间收集的发酵米糠样本中的每一个,以100转/分钟在25℃下将其振荡24小时,过滤,且以3500转/分钟(rpm)将其离心分离15分钟。这种提取过程重复两次。收集上清液,使其蒸发且冻干以从发酵米糠中制备提取物。

[0065] 实例2.从发酵米糠中制备提取物的部分

[0066] 在发酵的第6天,用己烷、氯仿、乙酸乙酯、丁醇以及水以1:10(v/v)的比率将来自米糠的乙醇提取物(FRB-D6:95%乙醇)逐步分馏,以分离活性成分(图10)。收集己烷(FRB-H)、氯仿(FRB-C)、乙酸乙酯(FRB-E)、丁醇(FRB-B)以及水(FRB-W)部分,使其蒸发且冻干,以用于进一步实验。

[0067] 实验实例1.总酚含量(Total phenolic content, TPC)测量

[0068] 通过修改后的安斯沃思和吉莱斯(Ainsworth and Gillespie)方法来测量来自发酵米糠的提取物的总酚含量(TPC)。具体来说,将200微升的10% (v/v) 福林-乔卡尔试剂(Folin-Ciocalteu reagent)和800微升(μ l)的700mM Na_2CO_3 与100微升的来自发酵米糠的提取物中的每一种混合。将混合物在室温下静置2小时。此后,使用分光光度计在765纳米下测量混合物的吸光度。使用没食子酸标准曲线(gallic acid standard curve)计算TPC。结果在图1中示出。

[0069] 如图1中所示,来自自由酱油曲霉(*Aspegillus sojae*)发酵的米糠的所有提取物显示出比普通米糠更高的总酚含量。总酚含量倾向于随着发酵时间增加而增加。特定来说,发现来自发酵了14天的米糠的提取物的总酚含量($36.5 \pm 0.7 \text{mgGAE/g}$)比普通米糠的总酚含量($10.6 \pm 0.1 \text{mgGAE/g}$)高了约3倍。

[0070] 实验实例2. 抗氧化剂活性测量

[0071] 来自发酵米糠的提取物中的每一种的抗氧化剂活性通过测量提取物的2,2-二苯基-1-苦基肼(DPPH)自由基清除活性(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity)来观测。具体来说,将450微升的100mM Tris-HCl缓冲液(pH 7.4)和1毫升的0.1mM DPPH溶液与50微升来自发酵米糠的提取物中的每一种混合。混合物在室温下在暗处静置30分钟。此后,使用分光光度计在517纳米下读取混合物的吸光度。使用方程式1计算DPPH自由基清除活性(%):

[0072] [式1]

[0073] $\text{DPPH自由基清除活性}(\%) = (\text{空白样本的吸光度} - (\text{样本的吸光度} / \text{空白样本的吸光度}) \times 100$

[0074] 结果在图2中示出。如图2中所示,与普通米糠的DPPH自由基清除活性相比,来自自由酱油曲霉(*Aspegillus sojae*)发酵的米糠的提取物的DPPH自由基清除活性得到了改良。特定来说,来自发酵了10天的米糠的提取物的DPPH自由基清除活性($63.9 \pm 0.9\%$)比普通米糠的DPPH自由基清除活性($15.7 \pm 0.2\%$)高了约4倍。

[0075] 实验实例3. 美白活性测量

[0076] (1) 来自发酵米糠的提取物中的每一种的美白活性通过测量提取物的酪氨酸酶抑制活性(tyrosinase inhibition activity)来观测。具体来说,将40微升的来自发酵米糠的提取物中的每一种在pH 6.5下溶解于40微升的酪氨酸酶(240单位/毫升(U/ml))中,与5%DMSO和80微升的50mM磷酸钾缓冲液(potassium phosphate buffer) (P缓冲液(P buffet))混合,在25℃下培育10分钟,且加入40微升的0.85mM L-3,4-二羟基苯丙胺酸(L-3,4-dihydroxyphenylalanine, L-DOPA)。接下来,将混合物在25℃下连续地培育5分钟,且使用微孔板分光光度计(microplate spectrophotometer) (Bio-Tek)测量490纳米下的吸光度。使用方程式2计算酪氨酸酶抑制活性(%):

[0077] [式2]

[0078] $\text{酪氨酸酶抑制活性}(\%) = (((A-B) - (C-D)) / (A-B)) \times 100$

[0079] 其中A=含有酪氨酸酶的空白样本的吸光度

[0080] B=不具有酪氨酸酶的空白样本的吸光度

[0081] C=含有酪氨酸酶的样本的吸光度

[0082] D=不具有酪氨酸酶的样本的吸光度

[0083] 结果在图3中示出。如图3所示,普通米糠的酪氨酸酶抑制活性极低,为约27.8%,而来自发酵了2天到10天的米糠的提取物中的每一种的酪氨酸酶抑制活性得到改良。特定来说,来自发酵了6天的米糠的提取物的酪氨酸酶抑制活性约为100%,这比普通米糠的酪氨酸酶抑制活性($IC_{50}=1.55$ 毫克/毫升(mg/ml))高约3.6倍。

[0084] (2) 在发酵的第6天,来自米糠的乙醇提取物(FRB-D6:95%乙醇)的部分中的每一个的美白活性通过测量部分的酪氨酸酶抑制活性(tyrosinase inhibition activity)来观测。实验过程与如(1)中所解释的相同。结果在图11和表1中示出。

[0085] [表1]

部分 (Fraction)	IC_{50} (毫克/毫升 (mg/ml))
FRB-D6	1.55
FRB-H	1.27
FRB-C	5.56
FRB-E	0.59
FRB-B	—
FRB-W	—

[0087] 如图11中所示,发现FRB-D6、FRB-H以及FRB-E的酪氨酸酶抑制活性非常高($\geq$ 约97%)。然而,如表1中所示,FRB-D6、FRB-H以及FRB-E的 IC_{50} 值明显不同。特定来说,FRB-E的 IC_{50} 是0.59毫克/毫升,比粗提取物(FRB-D6)的 IC_{50} 低了2.6倍。

[0088] 实验实例4. 抗皱纹活性测量

[0089] (1) 来自发酵米糠的提取物中的每一种的抗皱纹活性通过测量提取物的弹性蛋白酶抑制活性(elastase inhibition activity)来观测。具体来说,将100微升的2mM Tris缓冲液(pH 8.0)和10微升的弹性蛋白酶(1.1单位/毫升)与30微升的来自发酵米糠的提取物中的每一种混合,在25℃下培育10分钟,且加入40微升的3毫克/毫升N-Succ-Ala-Ala-Ala-对硝基苯胺(N-Succ-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide, SANA)。将混合物在25℃下连续地培育20分钟,且使用微孔板分光光度计(microplate spectrophotometer) (Bio-Tek) 测量410纳米下的吸光度。使用方程式3计算弹性蛋白酶抑制活性(%) :

[0090] [式3]

[0091] 弹性蛋白酶抑制活性(%) = $((A-B) - (C-D)) / (A-B) \times 100$

[0092] 其中A=含有弹性蛋白酶的空白样本的吸光度

[0093] B=不具有弹性蛋白酶的空白样本的吸光度

[0094] C=含有弹性蛋白酶的样本的吸光度

[0095] D=不具有弹性蛋白酶的样本的吸光度

[0096] 结果在图4中示出。如图4中所示出,来自自由酱油曲霉(*Aspegillus sojae*)发酵的米糠的提取物的弹性蛋白酶抑制活性 $\geq 90\%$,且高于普通米糠的弹性蛋白酶抑制活性(约42%)。特定来说,来自发酵了6天的米糠的提取物显示出最高弹性蛋白酶抑制活性,且测量为具有3.70毫克/毫升的 IC_{50} 。

[0097] (2) 在发酵的第6天,来自发酵了6天的米糠的乙醇提取物(FRB-D6:95%乙醇)的部分中的每一个的抗皱纹活性通过测量部分的弹性蛋白酶抑制活性(elastase inhibition activity)来观测。实验过程与如(1)中所解释的相同。结果在图12和表2中示出。

[0098] [表2]

[0099]	部分 (Fraction)	IC ₅₀ (毫克/毫升 (mg/ml))
	FRB-D6	3.7
	FRB-H	0.11
	FRB-C	1.34
	FRB-E	0.12
	FRB-B	0.67
	FRB-W	2.43

[0100] 如图12中所示,除了FRB-H以外的所有部分的弹性蛋白酶抑制活性都非常高($\geq 94\%$)。然而,如表2中所示,部分的IC₅₀值明显不同。特定来说,发现FRB-H的IC₅₀最低(0.11毫克/毫升),且FRB-E的IC₅₀为0.12毫克/毫升,比粗提取物(FRB-D6)的IC₅₀低了33倍。

[0101] 实验实例5. 识别生物活性物质

[0102] 通过HPLC分析(HPLC analysis)来测量来自酱油曲霉(*Aspegillus sojae*)发酵的米糠的提取物中的生物活性物质的分布。具体来说,通过0.2微米过滤器来过滤来自发酵米糠的提取物中的每一种,且使用DIONEX UltiMate 3000(美国加利福尼亚州赛默科技公司(Thermo Scientific,CA,USA))和反相Acclaim™ 120C18(5微米)柱(4.6×250毫米,美国加利福尼亚州赛默科技公司(Thermo Scientific,CA,USA))进行HPLC。流动相是0.05%磷酸(phosphoric acid)(溶液A)和乙腈(acetonitrile)(溶液B)的梯度混合物。梯度程序(gradient program)如下:0分钟(min),0%B;10分钟,7%B;20分钟,10%B;30分钟,12%B;50分钟,23%B;70分钟,35%B;80分钟,50%B;90分钟,0%B。流动速率为(The flow rate was)0.5毫升/分钟(ml/min),且温度设置为40℃。使用UV-Vis检测器在280纳米、320纳米以及360纳米的UV检测波长下测量光谱。结果在图5至图9中示出。

[0103] 如图5至图7中所示,从发酵6天后,开始在280纳米的UV检测波长(UV)下检测没食子酸(gallic acid)、4-羟基苯甲酸(4-hydroxybenzoic acid)以及香草酸(vanillic acid)。如图6和图8中所示,在320纳米的UV检测波长下检测酚酸(咖啡酸、香豆酸、芥子酸以及阿魏酸)。如图9所示,在360纳米的UV检测波长(UV)下检测各种类黄酮化合物。

[0104] 工业适用性

[0105] 本发明的组合物由于其高抗氧化剂活性和显著皮肤美白和抗皱纹效果而适用于化妆品产品。

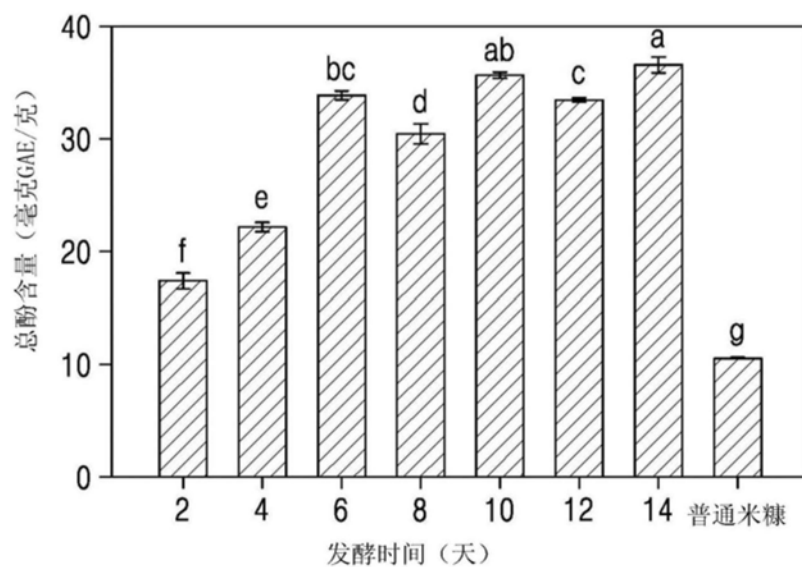


图1

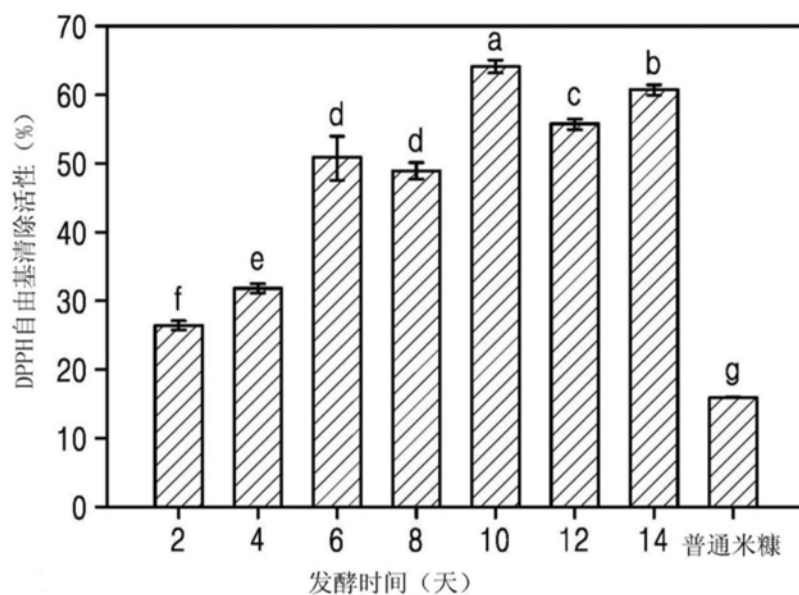


图2

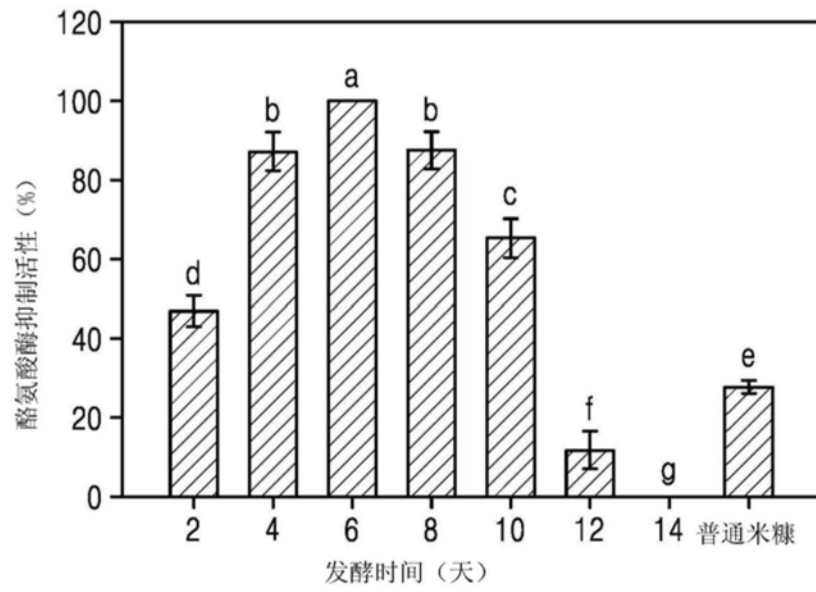


图3

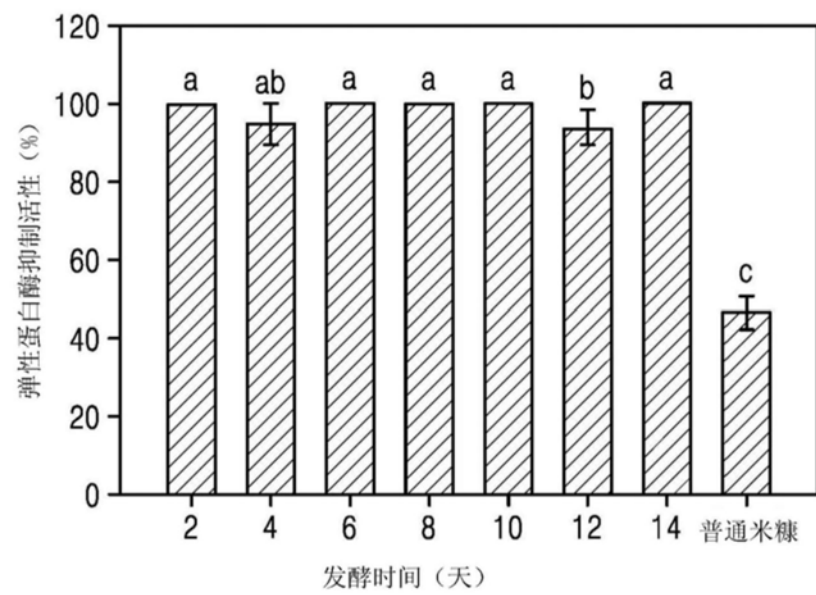


图4

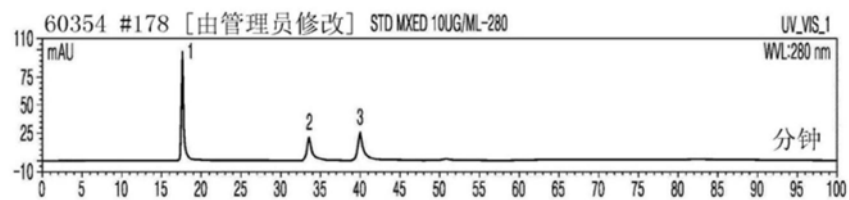


图5

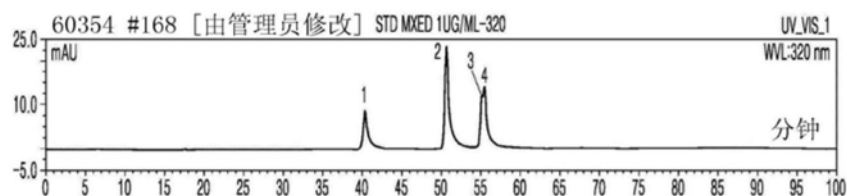


图6

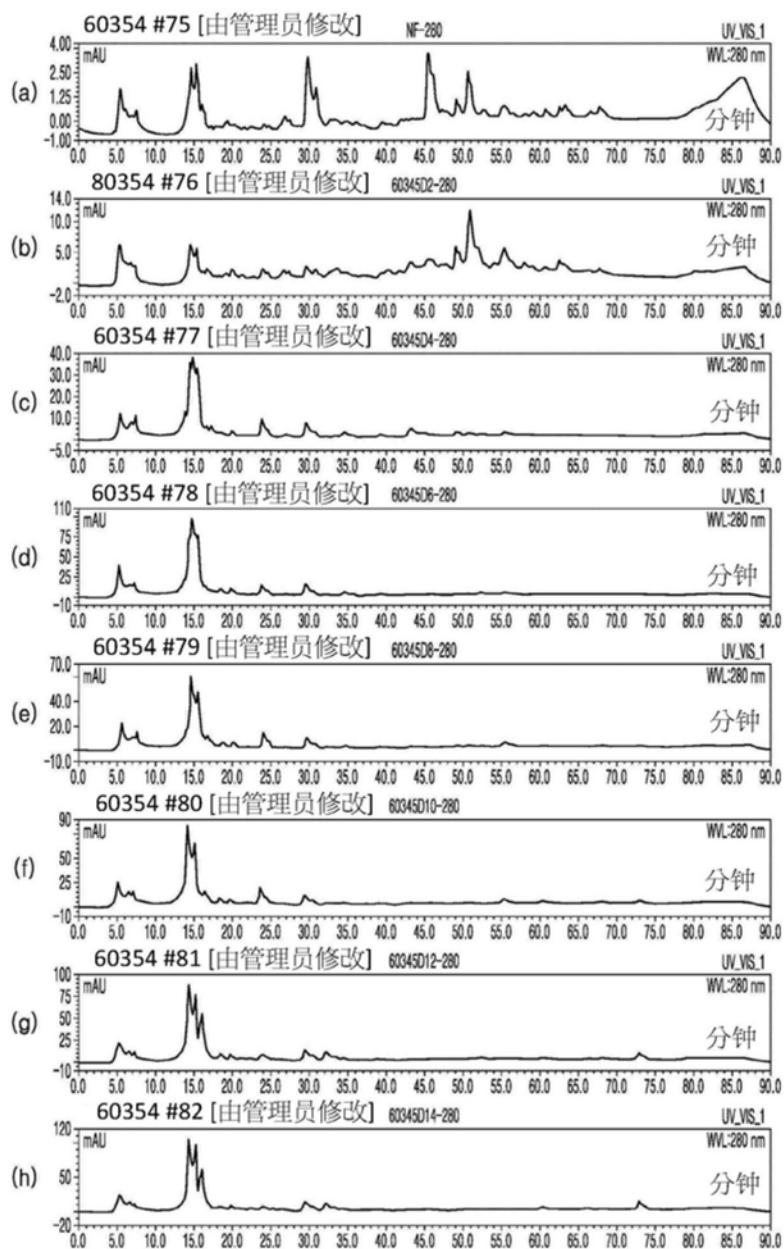


图7

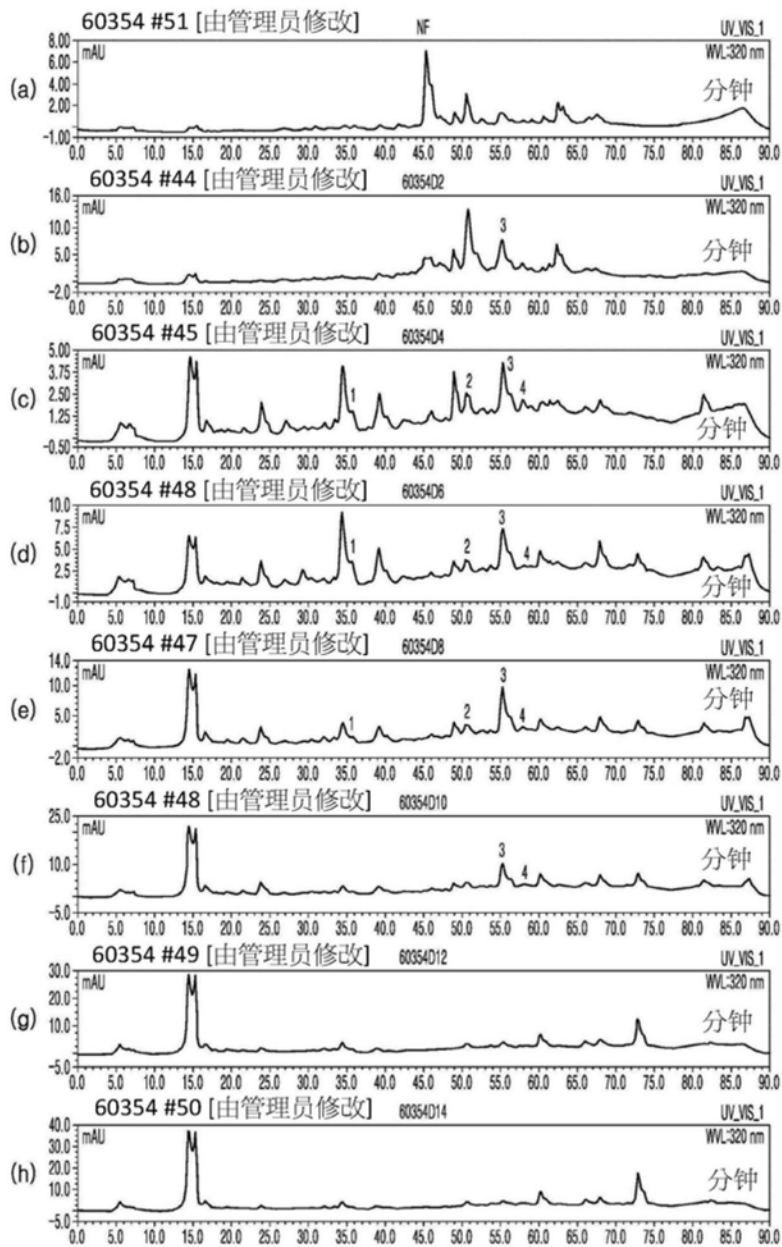


图8

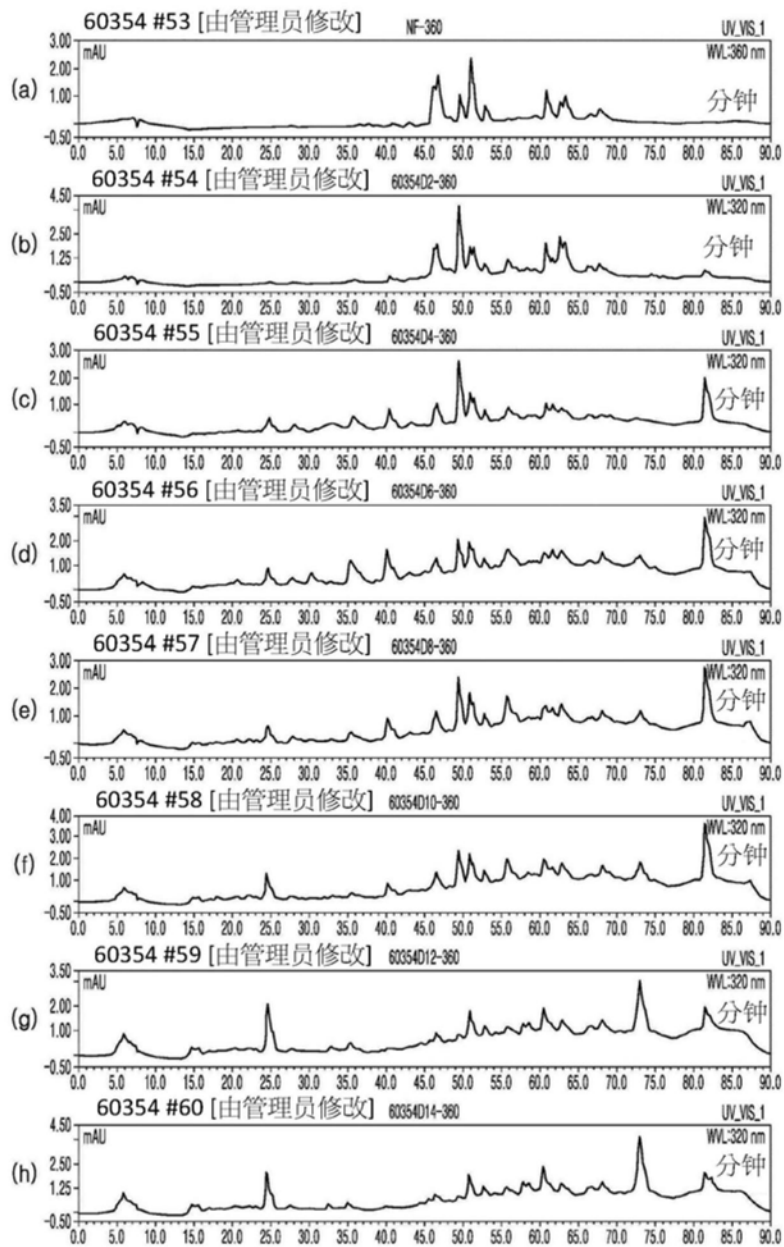


图9

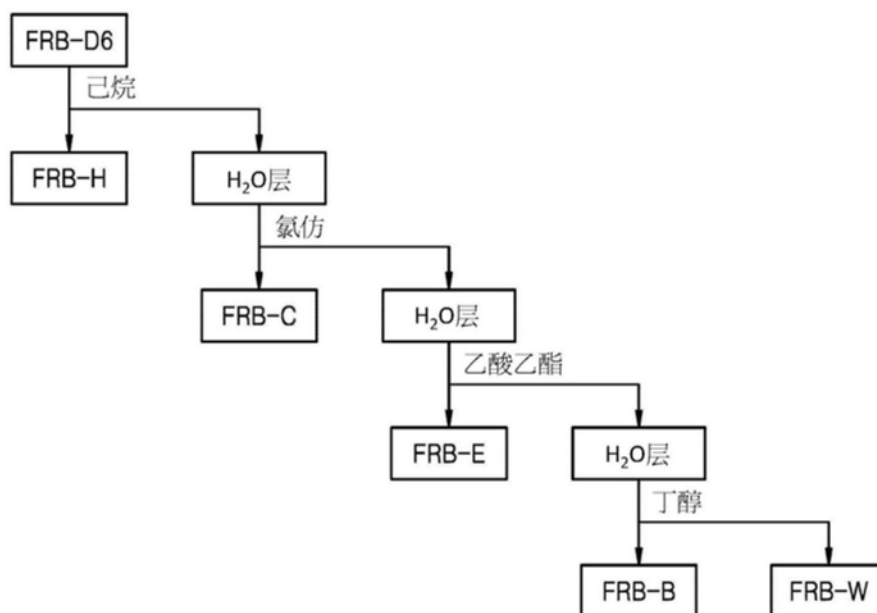


图10

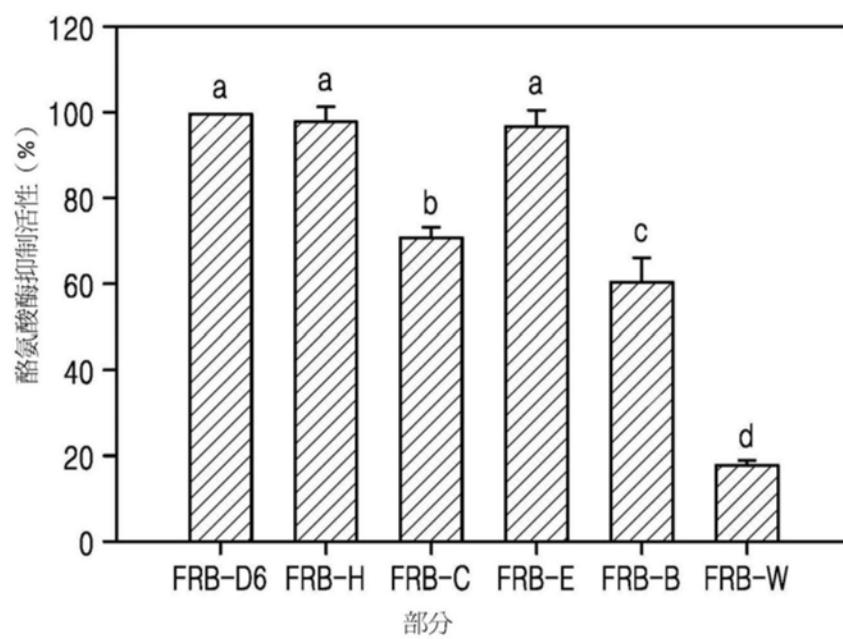


图11

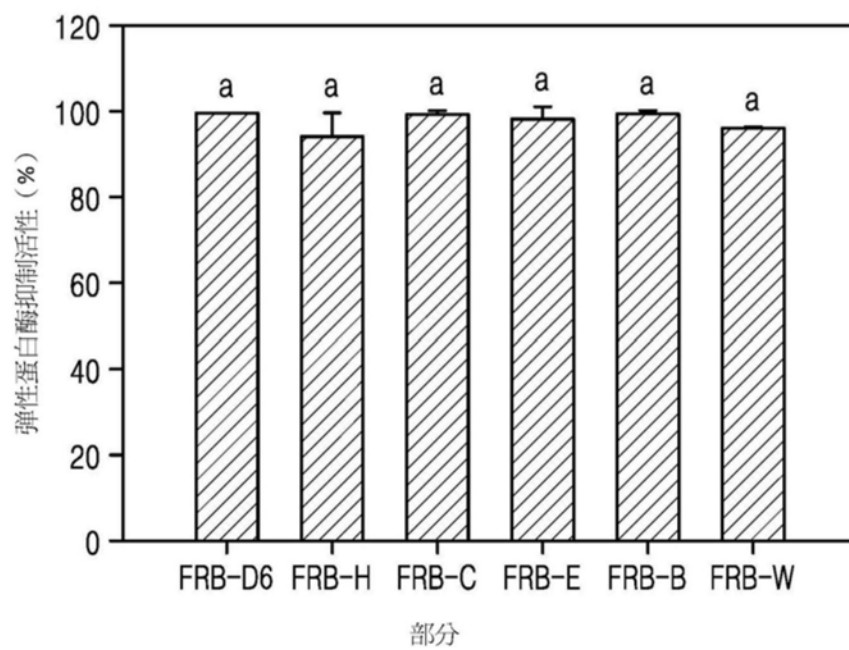


图12