



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103610633 B

(45) 授权公告日 2015. 08. 05

(21) 申请号 201310566375. X

审查员 陈红霞

(22) 申请日 2013. 11. 14

(30) 优先权数据

10-2013-0120984 2013. 10. 11 KR

(73) 专利权人 芽美化妆品有限公司

地址 韩国首尔

(72) 发明人 李境录 洪一 李桃灵 朴成敏

李正鲁 李露林

(74) 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司

公司 11127

代理人 吕俊刚 金玲

(51) Int. Cl.

A61K 8/99(2006. 01)

A61K 8/97(2006. 01)

A61Q 19/08(2006. 01)

A61Q 19/02(2006. 01)

A61Q 19/00(2006. 01)

A61P 29/00(2006. 01)

A61P 37/08(2006. 01)

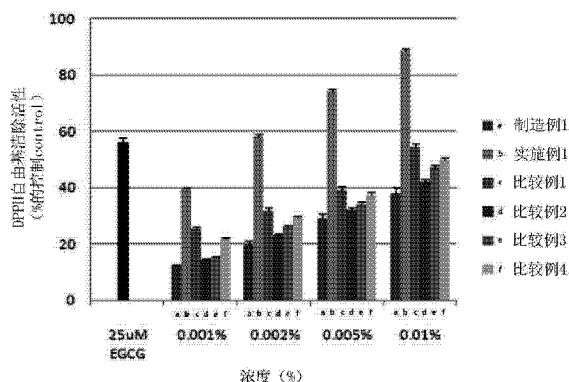
权利要求书2页 说明书12页 附图3页

(54) 发明名称

含有人参果阿魏菇发酵液的化妆料组合物

(57) 摘要

本发明涉及含有人参果阿魏菇发酵液的化妆料组合物。本发明的人参果阿魏菇发酵液能够作为抗氧化、抗炎、促进胶原蛋白合成、皮肤皱纹改善、美白、保湿、皮肤壁改善、过敏性改善用而有用地使用。



1. 一种化妆料组合物,其含有人参果阿魏菇发酵液来作为有效成分,该人参果阿魏菇发酵液是利用阿魏菇来使人参果提取物发酵而得到的,其中,

该人参果提取物是通过如下方式制造的:在用净水洗涤人参果并干燥之后全部粉碎,之后利用 100 目的筛子制作得更精细,添加 70%乙醇以使人参果粉碎物成为 150g/L,每隔五小时回流提取三次并进行冷浸,之后,在用沃特曼 #3 滤纸进行过滤之后,在 50℃ 以下进行减压浓缩和冷冻干燥,

该人参果阿魏菇发酵液是通过如下方式制造的:在通过上述制造出的人参果提取物减压浓缩物 5g 中作为碳素源添加 1%~4%葡萄糖,在追加添加 0.2%~0.5%蛋白胨之后进行灭菌,此处,接种阿魏菇菌株培养液以成为 25g/L 并进行培养,培养是利用 5L 发酵罐来在 37℃ 下、维持 pH 5-7 而培养了七天,在进行培养之后对培养液进行离心分离而去除一次培养菌,之后在 121℃、15 分钟、1.5 气压的条件下进行灭菌,使得不会达成进一步的培养。

2. 一种化妆料组合物,其含有人参果阿魏菇发酵液的提取液来作为有效成分,该人参果阿魏菇发酵液的提取液是利用阿魏菇来使人参果提取物发酵而得到的,其中,

该人参果提取物是通过如下方式制造的:在用净水洗涤人参果并干燥之后全部粉碎,之后利用 100 目的筛子制作得更精细,添加 70%乙醇以使人参果粉碎物成为 150g/L,每隔五小时回流提取三次并进行冷浸,之后,在用沃特曼 #3 滤纸进行过滤之后,在 50℃ 以下进行减压浓缩和冷冻干燥,

该人参果阿魏菇发酵液是通过如下方式制造的:在通过上述制造出的人参果提取物减压浓缩物 5g 中作为碳素源添加 1%~4%葡萄糖,在追加添加 0.2%~0.5%蛋白胨之后进行灭菌,此处,接种阿魏菇菌株培养液以成为 25g/L 并进行培养,培养是利用 5L 发酵罐来在 37℃ 下、维持 pH 5-7 而培养了七天,在进行培养之后对培养液进行离心分离而去除一次培养菌,之后在 121℃、15 分钟、1.5 气压的条件下进行灭菌,使得不会达成进一步的培养,

该该人参果阿魏菇发酵液的提取液是通过如下方式制造的:在上述发酵之后,在去除一次培养菌的人参果发酵物中添加乙醇使得最终成为 70% (V/V) 乙醇水溶液,每隔五小时进行三次回流提取并进行冷浸,然后用沃特曼 #3 滤纸进行了过滤,当过滤结束时,将在上述提取的步骤中得到的提取液送到浓缩罐而在 50℃ 以下进行减压浓缩和冷冻干燥。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的化妆料组合物,其特征在于,
上述化妆料组合物用于抗氧化。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述的化妆料组合物,其特征在于,
上述化妆料组合物用于抗炎。

5. 根据权利要求 1 或 2 所述的化妆料组合物,其特征在于,
上述化妆料组合物用于皮肤皱纹改善。

6. 根据权利要求 1 或 2 所述的化妆料组合物,其特征在于,
上述化妆料组合物用于皮肤美白。

7. 根据权利要求 1 或 2 所述的化妆料组合物,其特征在于,
上述化妆料组合物用于皮肤保湿。

8. 根据权利要求 1 或 2 所述的化妆料组合物,其特征在于,
上述化妆料组合物用于改善过敏性。

9. 根据权利要求 1 或 2 所述的化妆料组合物,其特征在于,

上述发酵液添加相对于化妆料组合物的总重量的 0.0001 重量%～100.0 重量%。

含有人参果阿魏菇发酵液的化妆料组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及含有人参果阿魏菇发酵液作为有效成分的化妆料组合物,更具体地讲,涉及含有利用阿魏菇菌丝体来使人参果提取物发酵而制造出的发酵液作为有效成分的化妆料组合物。

背景技术

[0002] 皮肤老化可分为内因性老化(intrinsic, chronological aging)和光老化(photoaging)这两种 [Gilchrest BA :J. Am. Acad. Dermatol. , 21, 610-613 (1989)]。内因性老化是随着年龄的增长,因活体的生理功能下降而自然引起的老化现象 [Braverman IM等 :J. Invest. Dermatol. , 78, 434-443 (1982)]。光老化是指皮肤反复暴露在光线下而皮肤的外观或功能发生变化的现象 [Ridder GM等 :J. Am. Acad. Dermatol. , 25, 751-760 (1991)]。除了上述以外,皮肤老化有可能随着紫外线、压力、疾病状态、环境因素、伤口、年龄增长而因活性氧簇被激活而引起,在这种状态严重时会破坏存在于活体内的抗氧化防御网,使细胞和组织受损而促使成人病和老化的产生。进一步具体地讲,作为皮肤的主要组成物质的脂质、蛋白质、多糖类以及核酸等被氧化而破坏皮肤细胞和组织,其结果,出现皮肤老化现象。特别是,蛋白质的氧化是作为皮肤的结缔组织的胶原蛋白、玻尿酸、弹性蛋白、蛋白聚糖、纤维连接蛋白等被切断而引起严重的过度炎症反应,对皮肤的弹力产生影响,该反应进一步严重时,由于 DNA 的变异而引起突变、引发癌症、免疫功能下降。

[0003] 因此,清除在身体的代谢过程中产生的活性氧簇或通过紫外线照射、炎症反应而产生的活性氧簇来保护细胞膜,并且通过积极的新陈代谢而使已损伤的细胞再生,从而使细胞繁殖才能够使皮肤修复并维持健康的皮肤。关于老化,参与其中的不仅有活性氧簇,还有被称为 MMP (Matrix metalloproteinase) 的酶,在活体内如胶原蛋白那样的细胞外基质的合成和分解可被适当地调节,但是,随着老化,其合成减少,促进作为分解胶原蛋白的酶的基质金属蛋白质分解酶(MMP)的表达,从而皮肤的弹力降低而形成皱纹。另外,通过暴露在紫外线中也会激活这种分解酶。因此,要求开发出调节通过紫外线而在细胞内引发激活的 MMP 表达或能够抑制其活性的物质。但是,到目前为止作为化妆品材料使用的原料大部分仅简单地抑制分解酶(MMP)的活性。

[0004] 另一方面,黑色素是通过存在于色素细胞内的酪氨酸酶的作用而从酪氨酸变化为多巴(dopa)、多巴醌(dopaquinone)并经由多巴色素(dopachrome)等而生成的。黑色素存在于皮肤内而保护身体不受紫外线等的伤害,在体内荷尔蒙分泌调节中表现出重要的功能。但是,公知的是,当黑色素生产过度时,会形成雀斑、黑斑等,促使皮肤老化,对引发皮肤癌起到重要的作用,当前正积极地进行用于预防黑色素生产过度的研究开发。已往,抗坏血酸(日本特开平 4-9320)、对苯二酚(日本特开平 6-192062)、曲酸(日本特开昭 56-7710)、熊果苷(日本特开平 4-93150)以及植物提取物等因表现出酪氨酸酶抑制活性而被利用为美白化妆料。但是,这些成分在化妆品剂型中稳定性差而被分解并着色,或者产生异味,或者活体内的功效、效果不明显或在稳定性上存在问题,因此,目前其使用受到了限制。

[0005] 另一方面,在人体中,皮肤是起到保护活体不受外部环境影响的保护膜的功能的器官,起到在防止人体内的活体成分、即水或电解质等的损失的同时使有害物质无法从外部侵入到人体内的作用。这种皮肤大致区分为表皮层、真皮层以及皮下脂肪层。表皮层由角质细胞和黑色素细胞构成,由于皮肤最外层的角质细胞层与外部环境直接接触,因此要求物理性、化学性或对于物质透过的很强的抵抗性,且应该在防止水分从人体向外部损失的同时自身也保留适当的水分,由此来维持柔软性。

[0006] 一般而言,皮肤的水分量在真皮层中为 70% 左右,但随着靠近表皮层而减少,从而在角质细胞层中约成为 10% 至 30%。从真皮层供给的水主要通过被动扩散而移动到角质层上部并最终排出到外部。将这称为经皮水分损失(Trans Epidermal Water Loss :TEWL),公知有将这种经皮水分损失维持为适当程度的物质是作为角质细胞层的脂质膜成分的皮脂成分和表皮脂质。

[0007] 另一方面,公知为在角质细胞层中存在被称为天然保湿因子(Natural Moisturizing Factor :NMF)的具有亲水性的保水功能的物质,在皮肤的保湿中起到重要的作用。正常的角质细胞层在水分维持在 10% 至 30% 左右时,皮肤光滑而柔嫩,正常地发挥身体保护功能。但是,如果角质细胞层的水分含量为 10% 以下,则皮肤变得粗糙,失去身体的保护功能,产生老化现象。例如,在干性皮肤的情况下,角质细胞的集聚力减弱,从而出现如鳞片那样的角质细胞从皮肤表面呈白色脱落的结垢现象。如上所述皮肤被干性化是因为角质细胞层的水分含量比正常皮肤少。此外,即使是健康的皮肤,也因恶劣的外部环境,即风、寒冷天气、阳光、洗脸、刮脸等而产生水分不足现象,导致皮肤状态变差。

[0008] 因此,适当地维持皮肤角质细胞层的水分含量是非常重要的。为此,在化妆品中添加与皮脂类似的成分或如 NMF 成分或多元醇那样的保湿剂等来使用。例如,作为水溶性多元醇,羟基(OH 基)为三个以上的甘油、山梨醇等,虽然表现出出色的保湿能力,但非常粘,在使用时会感到不舒服,羟基(OH 基)为两个的丙烯乙二醇、1,3-丁二醇等,有时会产生皮肤的负作用。另外,作为其他天然保湿因子的吡咯烷酮羧酸钠(PCA-Na)、乳酸钠(Sodium lactate)、尿素等,存在因电解性强而损害化妆料的乳化稳定性的问题。虽然氨基酸、胶原蛋白、弹性蛋白等也具有保湿能力,但其保湿能力是有限的。

[0009] 角质层能够保留水分的能力能够通过皮脂成分和由氨基酸、乳酸、尿素以及无机盐等构成的天然保湿因子(NMF)而被调节,在皮肤外用剂中如天然保湿因子那样安全且使用性优秀,保湿效果好的物质的开发成为化妆品中重要研究课题之一。

[0010] 另一方面,最近为了减少由于各种化学物质等引起的皮肤刺激,开发有很多利用了天然物质的化妆品。天然材料不仅对皮肤的负作用少,而且最近随着消费者们对于利用了天然材料的化妆品的响应提高,作为化妆品原料的开发价值进一步得到提高。

[0011] 本发明人,在研究了各种天然物质可作为化妆品应用的可能性的结果,在通过阿魏菇菌丝体来使人参果的提取物发酵而制造出的提取物中,确认到抗氧化、抗炎、促进胶原蛋白合成、改善皮肤皱纹、美白、保湿、改善皮肤壁、改善过敏性的效果,完成了本发明。

[0012] (专利文献 0001) 韩国专利授权号第 100887631 号(授权日期:2009.03.02),涉及含有人参果提取物的皮肤外用剂组合物,公开有特征是含有人参果提取物作为有效成分的化妆品。

发明内容

[0013] 本发明人的目的在于,开发并提供利用了能够适用到皮肤化妆料,对人体无害且安全性非常高的人参果的化妆料组合物。

[0014] 本发明提供含有利用阿魏菇来使人参果提取物发酵而得到的人参果阿魏菇发酵液来作为有效成分的化妆料组合物。

[0015] 另一方面,关于上述本发明的化妆料组合物,作为一例可以是抗氧化用、抗炎用、皮肤皱纹改善用、皮肤美白用、皮肤保湿用以及过敏性改善用中选择出的任意一个。

[0016] 另一方面,在上述本发明的化妆料组合物中,关于上述人参果提取物,作为一例可以是使用从以下的组中选择出的任意一个提取溶剂来进行提取的,该组由水、碳数 1 个~ 4 个的无水或含水低级醇、丙酮、乙酸乙酯、醋酸丁酯以及 1,3- 丁二醇构成。

[0017] 另一方面,在上述本发明的化妆料组合物中,关于上述发酵液,优选添加相对于化妆料组合物的总重量的 0.0001 重量%~ 100.0 重量%。

[0018] 另一方面,在本发明中使用的人参果(*Panax ginseng* C. A. Meyer)也称为人参浆果(*Ginseng berry*),一年中仅在七月中旬在四年以上的人参上开出约一个星期期间的果实。到目前为止,人参果的提取物以各种用途被广泛使用,但是没有如本发明那样,利用阿魏菇的发酵而确认比单纯提取物形态显著高的抗氧化、抗炎、促进胶原蛋白合成、皮肤皱纹改善、美白、保湿、皮肤壁改善、过敏性改善效果的研究。

[0019] 另一方面,阿魏菇(*Pleurotus ferulae* Lenzi.)是担子菌纲的蚝蘑和属于蚝蘑的蘑菇的一种,由于野生于中国新疆地区的被称为阿魏的树根上,因此被称为阿魏菇,从 1983 年开始进行了人工栽培。据传,第一次采取阿魏菇的地方为 1863 年的意大利西西里岛的马东尼(Madonie)山。阿魏菇被公知为营养的宝库,悠悠的松香绝佳的阿魏菇在中国从古代开始就被公知为,治疗胃和肾脏障碍以及停止咳嗽并去除炎症,防治妇科类疾病的医学功效非常优秀。

[0020] 本发明人作为原料使用各种蘑菇来使人参果进行发酵,结果发现,通过阿魏菇菌丝体发酵的发酵液的抗氧化、抗炎、促进胶原蛋白合成、皮肤皱纹改善、美白、保湿、皮肤壁改善、过敏性改善效果等效果优异,从而完成了本发明。

[0021] 另一方面,在本发明化妆料组合物中,上述人参果的提取物能够按照本领域技术人员的公知方法、即在常温和常压的条件下使用常用的溶剂来制造。作为一例,作为本发明的组合物的有效成分的人参果的提取物是使用从由水,碳数 1 个~ 4 个的无水或含水低级醇、丙酮、乙酸乙酯、醋酸丁酯以及 1,3- 丁二醇构成的组选择出的溶剂来提取或利用上述溶剂提取人参果之后,对其进行混合来制造的。此时,上述溶剂优选为酒精,更优选为乙醇,乙醇更优选为 70% 乙醇。上述提取溶剂的适当的添加量为人参果干燥重量的 1 倍~ 15 倍,更优选为 5 倍~ 10 倍,最优选为 7 倍。

[0022] 另一方面,本发明的人参果阿魏菇发酵液不仅包含通过上述的提取法得到的提取物,还包含经过一般的净化过程处理后的提取物。例如,通过利用具有一定分子量截留值的超滤膜的分离、基于各种色谱法系统(为了进行按照大小、电荷、疏水性或亲水性进行分离而制作的)的分离等追加实施的各种净化方法得到的分隔物也包含在本发明的人参果阿魏菇发酵液中。

[0023] 另外,本发明的人参果阿魏菇发酵液还包含通过减压蒸馏和冷冻干燥或喷雾干燥

等追加过程而将发酵液制造成粉末状态的物质。

[0024] 另一方面,根据本发明的优选实施例,添加到本发明的化妆料组合物的人参果阿魏菇发酵液的含量优选为相对于化妆料组合物总重量的 0.0001 重量%~100.0 重量%,更优选为 0.001 重量%~90.0 重量%,最优选为 0.1 重量%~85.0 重量%。

[0025] 另一方面,根据下述实验,本发明的人参果阿魏菇发酵液表现出优秀的抗氧化效果(参照:实施例 1)、优秀的抗炎效果(参照:实施例 3)、优秀的胶原蛋白合成效果(参照:实施例 4)、优秀的皱纹改善效果(参照:实施例 5)、优秀的美白效果(参照:实施例 6)。

[0026] 另外,在含有具有这种效果的人参果阿魏菇发酵液来作为有效成分而制造出的化妆料组合物的情况下,皮肤保湿改善效果(参照:实施例 7)、皮肤壁改善效果(参照:实施例 8)、过敏性改善效果(参照:实施例 9)非常显著。

[0027] 另一方面,在本发明的化妆料组合物中,关于化妆料组合物,作为一例可以由溶液、悬浮液、乳化液、膏、凝胶、面霜、润肤露、粉、肥皂、含有表面活性剂的洁面霜、油、粉饼、乳状粉底、蜡粉底以及喷雾构成的组选择出的任意一个剂型,但并不一定限定于这些剂型。

[0028] 另一方面,本发明的组合物能够追加含有在化妆领域中通常使用的辅助剂、例如亲水性或亲油性胶凝剂、亲水性或亲油性活性剂、防腐剂、抗氧化剂、溶剂、芳香剂、填充剂、阻滞剂、色素、吸收剂以及颜料。这些各种辅助剂的量是在本领域中通常使用的量,例如相对于化妆料组合物总重量的 0.0001 重量%~100.0 重量%。但是,在任何情况下,辅助剂及其比率被选择为不会对本发明的化妆料组合物的优选性质产生坏影响的程度。

[0029] 本发明的人参果阿魏菇发酵液与人参果的单纯提取物相比,能够确认抗氧化、抗炎、促进胶原蛋白合成、改善皮肤皱纹、美白、保湿、改善皮肤壁、改善过敏性的效果显著增加。

[0030] 因此,本发明提供具有如上所述的优秀的功能性的化妆料组合物。

附图说明

[0031] 图 1 是比较了在制造例 1 中得到的人参果提取物与在实施例 1、比较例 1 至比较例 4 中得到的人参果发酵液的按照浓度(0.001%、0.002%、0.005%、0.01%)自由基清除功能的曲线图。在图 1 中,'EGCG'为表没食子儿茶素没食子酸酯(Epigallocatechin gallate),'a'为制造例 1 的人参果提取物,'b'为实施例 1 的人参果阿魏菇发酵液,'c'为比较例 1 的人参果松茸发酵液,'d'为比较例 2 的人参果蘑菇发酵液,'e'为比较例 3 的人参果桑黄菌发酵液,'f'为在比较例 4 中得到的人参果灵芝发酵液。

[0032] 图 2 是比较了在制造例 1 中得到的人参果提取物与在实施例 1、比较例 1 至比较例 4 中得到的人参果发酵液的按照浓度(0.001%、0.002%、0.005%、0.01%)5-脂氧合酶(Lipoxygenase)抑制能力的曲线图。在图 2 中,'NDGA'表示去甲二氢愈创木酸(Nordihydroguaiaretic acid),'a'为制造例 1 的人参果提取物,'b'为实施例 1 的人参果阿魏菇发酵液,'c'为比较例 1 的人参果松茸发酵液,'d'为比较例 2 的人参果蘑菇发酵液,'e'为比较例 3 的人参果桑黄菌发酵液,'f'为在比较例 4 中得到的人参果灵芝发酵液。

[0033] 图 3 是测量了在制造例 1 中得到的人参果提取物与在实施例 1、比较例 1 至比较例 4 中得到的人参果发酵液的按照浓度(0.001%、0.002%、0.005%、0.01%)胶原蛋白合成增加率的结果。在图 3 中,'L-AA'为 L-抗坏血酸(L-ascorbic acid),'a'为制造例 1 的人参果

提取物,'b'为实施例1的人参果阿魏菇发酵液,'c'为比较例1的人参果松茸发酵液,'d'为比较例2的人参果蘑菇发酵液,'e'为比较例3的人参果桑黄菌发酵液,'f'为在比较例4中得到的人参果灵芝发酵液。

[0034] 图4是测量了在制造例1中得到的人参果提取物与在实施例1、比较例1至比较例4中得到的人参果发酵液的按照浓度(0.001%,0.002%,0.005%,0.01%)MMP-1抑制能力的结果。在图4中,'retinol'表示视黄醇,'a'为制造例1的人参果提取物,'b'为实施例1的人参果阿魏菇发酵液,'c'为比较例1的人参果松茸发酵液,'d'为比较例2的人参果蘑菇发酵液,'e'为比较例3的人参果桑黄菌发酵液,'f'为在比较例4中得到的人参果灵芝发酵液。

[0035] 图5是比较了在制造例1中得到的人参果提取物与在实施例1、比较例1至比较例4中得到的人参果发酵液的按照浓度(0.001%、0.002%、0.005%、0.01%)酪氨酸酶抑制能力的曲线图。在图5中,'Kojic acid'表示曲酸,'a'为制造例1的人参果提取物,'b'为实施例1的人参果阿魏菇发酵液,'c'为比较例1的人参果松茸发酵液,'d'为比较例2的人参果蘑菇发酵液,'e'为比较例3的人参果桑黄菌发酵液,'f'为比较例4的人参果灵芝发酵液。

具体实施方式

[0036] 以下,通过以下实施例更详细地说明本发明的内容。但是,以下实施例用于进一步具体说明本发明,本发明的权利范围不限于以下实施例。

[0037] [制造例1:人参果提取物的制造]

[0038] 在用净水洗涤人参果并干燥之后全部粉碎,之后利用100目的筛子制作得更精细。添加70%乙醇以使人参果粉碎物成为150g/L,每隔五小时回流提取三次并进行冷浸。之后,在用沃特曼(whatman) #3滤纸进行过滤之后,在50℃以下进行减压浓缩和冷冻干燥。

[0039] [实施例1:人参果阿魏菇发酵液的制造]

[0040] 在通过上述制造例1制造的人参果减压浓缩物5g中作为碳素源添加1%~4%葡萄糖,在追加添加0.2%~0.5%蛋白胨之后进行灭菌。此处,接种阿魏菇(*Pleurotus ferulae* Lenzi.)菌株培养液以成为25g/L并进行培养。培养是利用5L发酵罐来在37℃下、维持pH5-7而培养了七天。在进行培养之后对培养液进行离心分离而去除一次培养菌,之后进行灭菌(121℃、15分钟、1.5气压),使得不会达成进一步的培养。

[0041] 在发酵之后,在去除一次培养菌的人参果发酵物中添加乙醇使得最终成为70%(V/V)乙醇水溶液,每隔五小时进行三次回流提取并进行冷浸,然后用沃特曼(whatman) #3滤纸进行了过滤。当过滤结束时,将在上述提取步骤中得到的提取液送到浓缩罐而在50℃以下进行减压浓缩和冷冻干燥。

[0042] [比较例1:人参果松茸发酵液的制造]

[0043] 在该比较例1中,通过松茸菌丝体来使在制造例1中得到的人参果提取物发酵而制造出人参果松茸发酵液。除了松茸以外的其余的实验方法与实施例1相同。

[0044] [比较例2:人参果蘑菇发酵液的制造]

[0045] 在该比较例中,通过蘑菇菌丝体来使在制造例1中得到的人参果提取物发酵而制造出人参果蘑菇发酵液。除了蘑菇以外的其余的实验方法与实施例1相同。

[0046] [比较例 3:人参果桑黄菌发酵液的制造]

[0047] 在该比较例中,通过桑黄菌菌丝体来使在制造例 1 中得到的人参果提取物发酵而制造出人参果桑黄菌发酵液。除了桑黄菌以外的其余的实验方法与实施例 1 相同。

[0048] [比较例 4:人参果灵芝发酵液的制造]

[0049] 在该比较例中,通过灵芝菌丝体来使在制造例 1 中得到的人参果提取物发酵而制造了人参果灵芝发酵液。除了灵芝以外的其余的实验方法与实施例 1 相同。

[0050] [实施例 1:利用了人参果提取物和发酵液的 DPPH 法的抗氧化评价]

[0051] 使在制造例 1 中得到的人参果提取物粉末和在实施例 1、比较例 1 至比较例 4 中得到的人参果发酵液粉末悬浮在净水中,评价了按照浓度(0.001%、0.002%、0.005%、0.01%)自由基清除能力(free radical scavenging activity)。

[0052] DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) 测量法是在 540nm 下测量吸光度来得到去除抑制剂(inhibitor)稳定的自由基 DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical)而脱色的程度的方法。对于所使用的试料如下述表 1 那样进行实验,利用下述的数学式 1 对自由基清除活性进行了测量。对照组为表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG, Epigallocatechin gallate)。表没食子儿茶素没食子酸酯(Epigallocatechin gallate, EGCG, 左旋表没食子儿茶精-3-没食子酸酯)是作为绿茶叶的提取物的多酚类的一种,公知为起到很强的抗氧化作用。

[0053] 【表 1】

[0054]

	试料 (Material)	对照组 (Ctrl group)	对照组的空白 (Blank of C)	实验组 (Exp. Group)	实验组的空白 (Blank of E)
A	DPPH(MeOH)	180	(180 MeOH)	180	(180 MeOH)
B	样本(Sample)	(20 溶剂)	(20 溶剂)	20	20

[0055] [数学式 1]

[0056]

$$\text{清除活性(\%)} = \frac{[(C-D)-(A-B)]}{(C-D)} \times 100$$

[0057] A:实验组的吸光度

[0058] B:实验组的空白的吸光度

[0059] C:对照组的吸光度

[0060] D:对照组的空白的吸光度

[0061] 另一方面,在蘑菇发酵液中,特别是阿魏菇发酵液(实施例 1)表现出最高的自由基清除活性。由于自由基清除活性越高抗氧化效果越优秀,因此可知人参果阿魏菇发酵液的抗氧化效果比人参果提取物的抗氧化效果高。

[0062] 另一方面,如从图 1 的结果可知,人参果发酵液(实施例 1、比较例 1 至比较例 4)与
人参果提取物(制造例 1)相比,自由基清除活性在所有的浓度下都优秀。在图 1 中,'a' 为
制造例 1 的人参果提取物,'b' 为实施例 1 的人参果阿魏菇发酵液,'c' 为比较例 1 的人参
果松茸发酵液,'d' 为比较例 2 的人参果蘑菇发酵液,'e' 为比较例 3 的人参果桑黄菌发酵

液, 'f' 为在比较例 4 中得到的人参果灵芝发酵液。

[0063] [实施例 2 : 人参果提取物和发酵液的细胞生存率评价]

[0064] 对在上述制造例 1 中得到的人参果提取物和在实施例 1、比较例 1 至比较例 4 中得到的人参果发酵液给细胞带来的毒性进行了测量。使在制造例 1 中得到的人参果提取物粉末和在实施例 1、比较例 1 至比较例 4 中得到的人参果发酵液粉末悬浮在净水中, 按照浓度 (0.001%、0.002%、0.005%、0.01%) 进行组合之后, 通过下述的方法测量了细胞生存率。

[0065] 细胞毒性是对利用 MTT { 溴化 3-(4,5-二甲基-2-基)-2,5-二苯基四唑 (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) } 试剂测量细胞生存率的莫斯曼 (Mosmann) 方法进行变形而实施的。

[0066] 将 HDF 在 96-孔板上以 1×10^4 cells/well 的浓度进行分株并在 37℃、5%

[0067] CO₂ 下培养了 24 小时。在去除培养基并按照浓度对试料进行处理得到的培养基中培养 24 小时之后去除培养基, 用 PBS (Phosphatebuffered saline, 磷酸盐缓冲生理盐水) 洗涤两次。将 MTT 以 5mg/mL 溶到 PBS 并添加 50L, 在 37℃、5% 的 CO₂ 下培养了两小时。每一孔 (well) 投入 100L 的 DMSO (Dimethyl sulfoxide, 二甲基亚砷), 在搅拌 10 分钟之后在 540nm 下测量了吸光度。

[0068] 测量结果, 在各试料的所有浓度下没有显现出细胞毒性 (未图示)。由此能够确认本发明的人参果阿魏菇发酵液对人体无害且安全性非常优秀。

[0069] [实施例 3 : 人参果提取物和发酵液的抗炎评价 (5-脂氧合酶抑制)]

[0070] 使在上述制造例 1 中得到的人参果提取物粉末和在实施例 1、比较例 1 至比较例 4 中得到的人参果发酵液粉末悬浮在净水中并按照浓度 (0.001%、0.002%、0.005%、0.01%) 进行 5-脂氧合酶 (Lipoxygenase) 抑制活性实验而评价了抗炎效果。

[0071] 脂氧合酶 (lipoxygenase) 是生成起到参与活体内炎症反应或过敏反应等的各种化学介质作用的各种物质的酶, 抑制脂氧合酶的物质会带来抑制各种化学介质 (chemicalmediators) 的生成的结果, 因此对过敏有效。即, 5-脂氧合酶 (Lipoxygenase) 抑制活性越高抗炎效果越好。在本实施例中, 关于脂氧合酶的活性度测量, 能够利用基质和酶测量过氧化物生成程度来表示。

[0072] 如下述表 2 那样使用试料并进行了实验, 利用上述数学式 1 对 5-脂氧合酶 (lipoxygenase) 抑制活性进行了测量。对照组为油脂的抗氧化作用强的去甲二氢愈创木酸 (NDGA, Nordihydroguaiaretic acid)。

[0073] 【表 2】

[0074]

	试料	对照组 (Control Group)	对照组的空 白 (Blank of C)	实验组 (Exp. Group)	实验组的空 白 (Blank of E)
A	缓冲剂(Buffer)	2ml	2ml	2ml	2ml
B	样本(Sample)	(20ul溶剂)	(20ul溶剂)	20ul	20ul
B	酶(Enzyme)	40ul	-	20	-
C	基质(Substrate)	70ul	70ul	70ul	70ul

[0075] 如从图 2 的结果可知,本发明的人参果发酵液(实施例 1、比较例 1 至比较例 4)与人参果提取物(制造例 1)相比,5-脂氧合酶(Lipoxygenase)抑制活性比较优秀。特别是,在发酵液中,阿魏菇发酵液(实施例 1)表现出最高的 5-脂氧合酶(Lipoxygenase)抑制活性,确认到人参果阿魏菇发酵液的抗炎效果比人参果提取物的抗炎效果高。

[0076] 另一方面,在图 2 中,'a' 为制造例 1 的人参果提取物,'b' 为实施例 1 的人参果阿魏菇发酵液,'c' 为比较例 1 的人参果松茸发酵液,'d' 为比较例 2 的人参果蘑菇发酵液,'e' 为比较例 3 的人参果桑黄菌发酵液,'f' 为在比较例 4 中得到的人参果灵芝发酵液。

[0077] [实施例 4:人参果提取物和发酵液的胶原蛋白合成量评价]

[0078] 使在上述制造例 1 中得到的人参果提取物和在实施例 1、在比较例 1 至比较例 4 中得到的发酵液粉末悬浮在净水中,按照浓度(0.001%、0.002%、0.005%、0.01%)评价了胶原蛋白生成合成增加率。

[0079] 将 HDF (Human Dermal Fibroblast,人真皮成纤维细胞)在 24-孔板以 5×10^4 细胞/孔的浓度进行分株并在 37℃、5%CO₂ 下培养了 24 小时,在添加了在上述制造例 1 中得到的人参果提取物和在实施例 1、比较例 1 至比较例 4 中制造的人参果发酵液的无血清 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium,达尔伯克改良伊格尔培养基)培养基和作为对照组没有包含人参果发酵液和人参果提取物的无血清 DMEM 培养基中,分别追加培养了 24 小时。在进行培养之后,收集各孔(well)的上清液,利用胶原蛋白试剂盒(kit)测量原胶原(procollagen)类型 I C-肽(PICP)的量并换算为 ng/ml,对由此合成的胶原蛋白量进行了测量。胶原蛋白生成合成增加率(%)是按照下述数学式 2 来计算的,对照组为对皮肤具有促进胶原蛋白合成的效果的 L-抗坏血酸(L-AA, L-ascorbic acid)。

[0080] [数学式 2]

[0081] 胶原蛋白生成合成增加率(%)=实验组的胶原蛋白量/对照组的胶原蛋白量 $\times 100$

[0082] 如从图 3 的结果可知,本发明的人参果发酵液(实施例 1、比较例 1 至比较例 4)的胶原蛋白合成量在所有浓度下比人参果提取物(制造例 1)高。特别是,在发酵液中,阿魏菇发酵液(实施例 1)表现出最高的胶原蛋白合成量。

[0083] 另一方面,在图 3 中,'a' 为制造例 1 的人参果提取物,'b' 为实施例 1 的人参果阿魏菇发酵液,'c' 为比较例 1 的人参果松茸发酵液,'d' 为比较例 2 的人参果蘑菇发酵液,'e' 为比较例 3 的人参果桑黄菌发酵液,'f' 为在比较例 4 中得到的人参果灵芝发酵液。

[0084] [实施例 5:人参果提取物和发酵液的皱纹改善评价]

[0085] 使在上述制造例 1 中得到的人参果提取物和在实施例 1、比较例 1 至比较例 4 中得到的发酵液粉末悬浮在净水中而按照浓度(0.001%、0.002%、0.005%、0.01%)评价了皱纹改善效果。

[0086] 为了实验,利用 UV (Ultraviolet,紫外线)室将提取物和发酵液涂到 HDF (Human Dermal Fibroblast,人真皮成纤维细胞)并以 5J/cm² 的能量照射 UVA (UltravioletA,长波紫外线)。关于紫外线照射量和培养时间,通过预备实验确立了在成纤维细胞中 MMP (Matrix metalloproteinase,基质金属蛋白酶)表达量达到最大的条件。对于阴性对照组,包裹银箔纸而在 UVA 的环境下维持了相同时间。UVA 放射量是利用 UV 辐射计而进行了测量。照射 UVA 的期间的细胞为之前分株后的培养基原样,在照射 UVA 之后,更换为加入样本的培养基并进行 24 小时培养,之后回收培养基并涂布在 96-孔板上。对一次抗体(MMP-1(Ab-5))

单克隆抗体和 MMP-2 (Ab-3) 单克隆抗体) 进行处理并在 37℃ 下使其反应 60 分钟。在使作为二次抗体的抗鼠 IgG (小鼠(whole mouse), 碱性磷酸酶共轭物(alkaline phosphatase conjugated)) 再次反应 60 分钟左右之后, 使碱性磷酸酶基质溶液(1mg/ml-nitrophenyl phosphate indiethanolamine, 缓冲液) 在常温下反应 30 分钟, 通过酶标仪在 405nm 下测量了吸光度。作为对照组使用了没有添加试料的溶液。

[0087] 如从图 4 的结果可知, 在所有浓度(0.001%、0.002%、0.005%、0.01%) 下, 本发明的人参果发酵液(实施例 1、比较例 1 至比较例 4) 的 MMP-1 表达抑制活性比人参果提取物(制造例 1) 的 MMP-1 表达抑制活性优秀。

[0088] 特别是, 在发酵液中, 阿魏菇发酵液(实施例 1) 表现出最高的 MMP-1 表达抑制活性。一般而言, MMP-1 表达抑制活性越高皮肤皱纹改善效果越好, 判断为人参果阿魏菇发酵液的皮肤皱纹改善效果比人参果提取物的皮肤皱纹改善效果好。

[0089] 另一方面, 在图 4 中, 'a' 为制造例 1 的人参果提取物, 'b' 为实施例 1 的人参果阿魏菇发酵液, 'c' 为比较例 1 的人参果松茸发酵液, 'd' 为比较例 2 的人参果蘑菇发酵液, 'e' 为比较例 3 的人参果桑黄菌发酵液, 'f' 为在比较例 4 中得到的人参果灵芝发酵液。

[0090] [实施例 6 : 人参果阿魏菇发酵液的酪氨酸酶抑制效果]

[0091] 为了观察含有本发明的人参果阿魏菇发酵液的化妆料的酪氨酸酶(Tyrosinase) 抑制效果, 进行了如下的实验。在将酶酪氨酸酶(EC1.14.18.1) 溶解到 0.05M 磷酸盐缓冲液(pH6.5) 中成为 1,100unit/ml (最终为 55unit), 将作为基质(Substrate) 的 L- 酪氨酸(Tyrosine) ($C_9H_{11}NO_3$, 181.19) 溶解到 0.1M 磷酸盐缓冲液(phosphatebuffer, pH6.5) 中成为 1.5mM (最终为 225uM) 之后, 分别在 0.1M 磷酸钠缓冲液(sodium phosphatebuffer, pH6.5) 中稀释并进行反应(表 3), 在 37℃ 下反应 20 分钟, 之后利用酶标仪在 492nm 下测量了吸光度。对照组为对抑制酪氨酸酶活性并抑制黑色素生成具有效果的曲酸(Kojic acid)。

[0092] 【表 3】

[0093]

	试料(Material)	对照组 (Control Group)	对照组的空白 (Blank of C)	实验组 (Exp. Group)	实验组的空白 (Blank of E)
A	缓冲剂(Buffer)	140	150	140	150
B	样本(Sample)	(20溶剂)	(20溶剂)	20	20
B	酶(Enzyme)	10	-	10	-
C	基质(Substrate)	30	30	30	30

[0094] (单位 : μ l)

[0095] [数学式 3]

[0096] 抑制率 (%) = $[(C-D) - (A-B)] / (C-D) \times 100$

[0097] A : 实验组的吸光度

[0098] B : 实验组的空白的吸光度

[0099] C : 对照组的吸光度

[0100] D : 对照组的空白的吸光度

[0101] 如从图 5 的结果可知,本发明的人参果发酵液(实施例 1、比较例 1 至比较例 4)的酪氨酸酶抑制活性在所有浓度(0.001%、0.002%、0.005%、0.01%)下比人参果提取物(制造例 1)的酪氨酸酶抑制活性优秀。

[0102] 特别是,确认到在发酵液中本发明的人参果阿魏菇发酵液的酪氨酸酶抑制效果(美白效果)比人参果提取物的酪氨酸酶抑制效果(美白效果)优秀。

[0103] 酪氨酸酶(EC1.14.18.1)为在黑色素合成途径(melanosynthetic pathway)中具有催化剂功能的重要酶,一般酪氨酸酶抑制活性越高皮肤美白的效果越好而且对于作为由黑色素细胞的恶化引起的肿瘤的黑素瘤(melanoma)的繁殖抑制也越具有效果。

[0104] 另一方面,在图 5 中,'a'为制造例 1 的人参果提取物,'b'为实施例 1 的人参果阿魏菇发酵液,'c'为比较例 1 的人参果松茸发酵液,'d'为比较例 2 的人参果蘑菇发酵液,'e'为比较例 3 的人参果桑黄菌发酵液,'f'为在比较例 4 中得到的人参果灵芝发酵液。

[0105] [剂型例 1 和剂型比较例 1:含有人参果阿魏菇发酵液的化妆料的制造]

[0106] 以下述表 4 的组合来制造含有 30.0 重量%的实施例 1 的人参果阿魏菇发酵液的化妆料组合物,将此作为剂型例 1,制造不含有参果阿魏菇发酵液的化妆料组合物而作为剂型比较例 1。

[0107] 【表 4】

[0108]

成分	剂型 例1含量(重量%)	剂型比较例1含量(重量%)成分
制造例1	-	30.0
实施例1	30.0	-
1,3-BG	10.0	10.0
甘油	5.1	5.1
丙烯乙二醇	4.2	4.2
醋酸生育酚	3.0	3.0
液体石蜡	4.6	4.6
三乙醇胺	1.0	1.0
角鲨烷	3.1	3.1
夏威夷果油	2.5	2.5
聚阿魏盐60	1.6	1.6
阿魏醇倍半硬脂酸	1.6	1.6

[0109]

尼泊金丙酯	0.6	0.6
羧基乙烯基聚合物	1.5	1.5
香	微量	微量
防腐剂	微量	微量
净水	余量	余量
计	100	100

[0110] [实施例 7:人参果阿魏菇发酵液的皮肤保湿力改善效果]

[0111] 为了观察含有本发明的人参果阿魏菇发酵液的化妆品的皮肤保湿力改善效果,进

行了如下的实验。

[0112] 将没有皮肤疾病的二十岁~四十岁的 40 名为对象,以每组 20 名分成两个组,按照组将上述剂型例 1 和剂型比较例 1 的滋养霜每天两次涂到脸和前半部,涂一个月。预先在涂抹开始前在恒温、恒湿条件(24℃、湿度 40%)下利用水分测量器(Corneometer, CM820courage Khazaka electronic GmbH,德国)对皮肤电导度进行测量而作为基本值,对经过一周、两周、四周后的皮肤电反应增加率(%)进行测量并评价了其增加率。将其结果示出在下述表 5。

[0113] 【表 5】

[0114]

区分	一周后	两周后	四周后
剂型例 1	55	59	64
剂型比较例 1	26	30	36

[0115] 实验结果,在含有本发明的人参果阿魏菇发酵液的化妆料的剂型例 1 的情况下,与剂型比较例 1 相比,皮肤电反应增加率非常优秀。一般而言,皮肤电反应正比于皮肤水分量,因此判断为含有本发明人参果阿魏菇发酵液的化妆料与不含有本发明人参果阿魏菇发酵液的化妆料相比,维持高的皮肤水分含量(未图示)。

[0116] [实施例 8 :人参果阿魏菇发酵液的皮肤壁改善效果]

[0117] 为了观察含有本发明的人参果阿魏菇发酵液的化妆品的皮肤壁改善效果,进行了如下的实验。

[0118] 在该实施例中,对于上述剂型例 1 和剂型比较例 1 的化妆料,以人为对象利用皮肤水分流失测试探头(TM300, Courage and Khazaka Electronic Co., 德国)对经皮水分损失量(TEWL :Trans-Epidemal Water Loss)进行了比较实验。将二十岁~四十岁女性 40 名为对象,在右侧和左侧脸上涂各试料,利用皮肤水分流失测试探头(TM300, Courage and Khazaka Electronic Co., 德国),对于距眼部偏右侧 3cm、且偏下方 1cm 的部位,测量三次关于涂抹之前和之后一小时、两小时、四小时、六小的经皮水分损失量,使用平均值评价了经皮水分损失量。

[0119] 【表 6】

[0120]

区分	一小时	两小时	四小时	六小时
剂型例 1	15.5	14.6	12.2	9.2
剂型比较例 1	18.1	16.9	13.8	11.2

[0121] 测量了经皮水分损失量的结果,如表 6 所示,由涂抹了在上述剂型例 1 中制造的面霜的实验者的面部皮肤的经皮水分损失量减少可知,判断为含有本发明的人参果阿魏菇发酵液的化妆料比不含有本发明的人参果阿魏菇发酵液的化妆料,对皮肤壁改善具有优秀的效果(未图示)。

[0122] [实施例 9 :人参果阿魏菇发酵液的过敏性改善效果]

[0123] 为了观察含有本发明的人参果阿魏菇发酵液的化妆料的过敏性改善效果,进行了如下的实验。将具有过敏性的实验者(3 岁~40 岁)20 名作为对象,对其中的十人在过敏性皮肤部位每天两次地连续涂抹四周上述剂型例 1 的面霜,对剩余的十人每天两次地连续涂抹四周剂型比较例 1 的面霜。在产品涂抹前(0 周)、产品涂抹四周之后,分别测量了被实验者的实验部位的过敏性皮肤炎严重度,IgE 变化,嗜酸性白血球(Eosinophil)变化、水分含

有量、皮肤酸度。四周的期间内参与实验的所有被实验者都没有异常反应。

[0124] 在下述表 7 中,比较示出了使用了在剂型例 1 和剂型比较例 1 中制造的面霜的实验者的过敏性改善效果。

[0125] 【表 7】

[0126]

区分	过敏性皮肤 炎严重度		IgE 变化		嗜酸性白 血球变化		水分含有量		皮肤酸度	
	前	后	前	后	前	后	前	后	前	后
剂型例1	37.41	28.12	435.9	321.4	317	249	25.84	26.57	5.719	6.071
剂型 比较例1	37.68	31.53	443.7	363.8	321	275	26.31	25.11	5.717	5.833

[0127] $n=20, p < 0.05$

[0128] 实验结果,成为过敏性皮肤诊断标准的过敏性皮肤炎严重度、血液中的 IgE 和嗜酸性白血球的变化、水分含有量、皮肤酸度的改善效果,在涂抹了含有该剂型例 1 的人参果阿魏菇发酵液的面霜的实验者中表现优秀。含有本发明的人参果阿魏菇发酵液的化妆料比不含有本发明的人参果阿魏菇发酵液的化妆料对改善过敏性具有优秀的效果(未图示)。

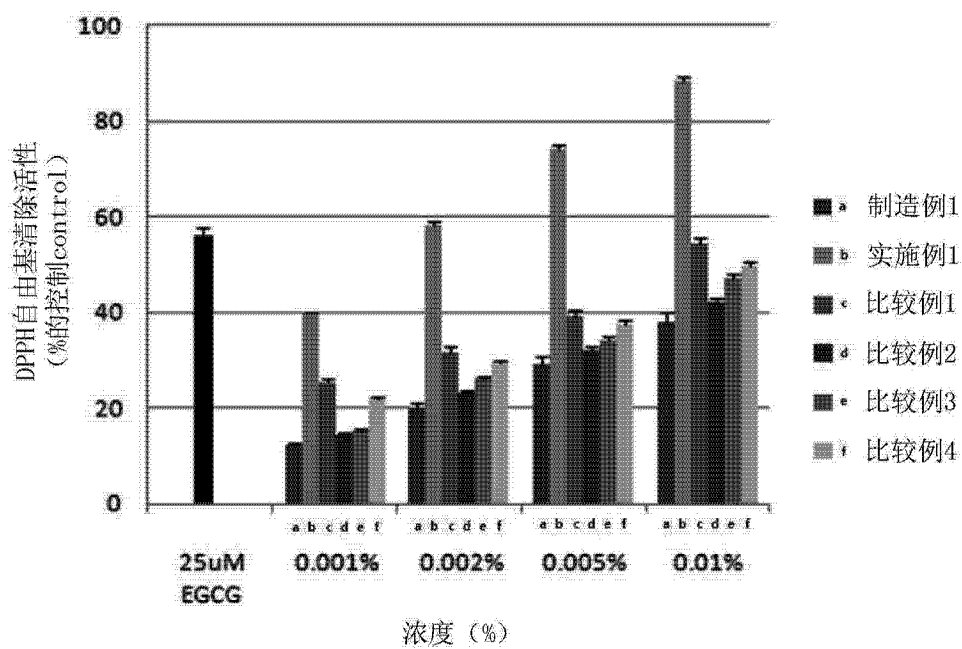


图 1

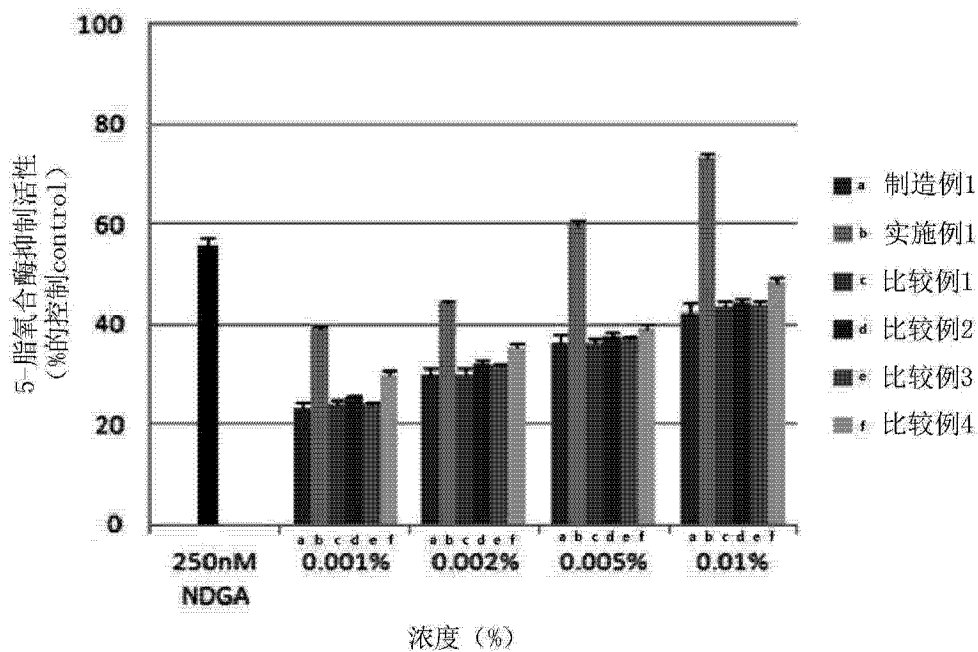


图 2

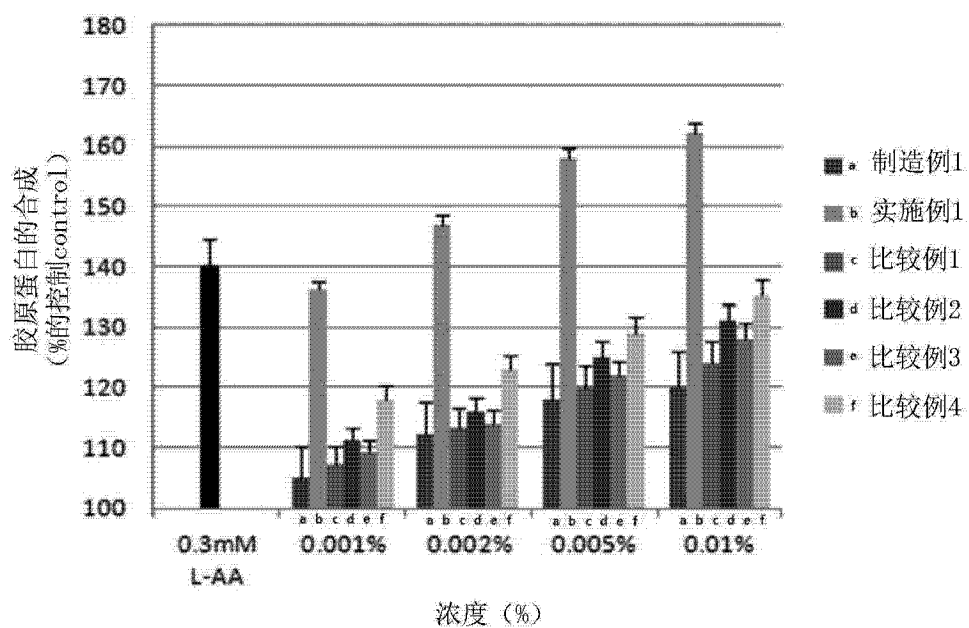


图 3

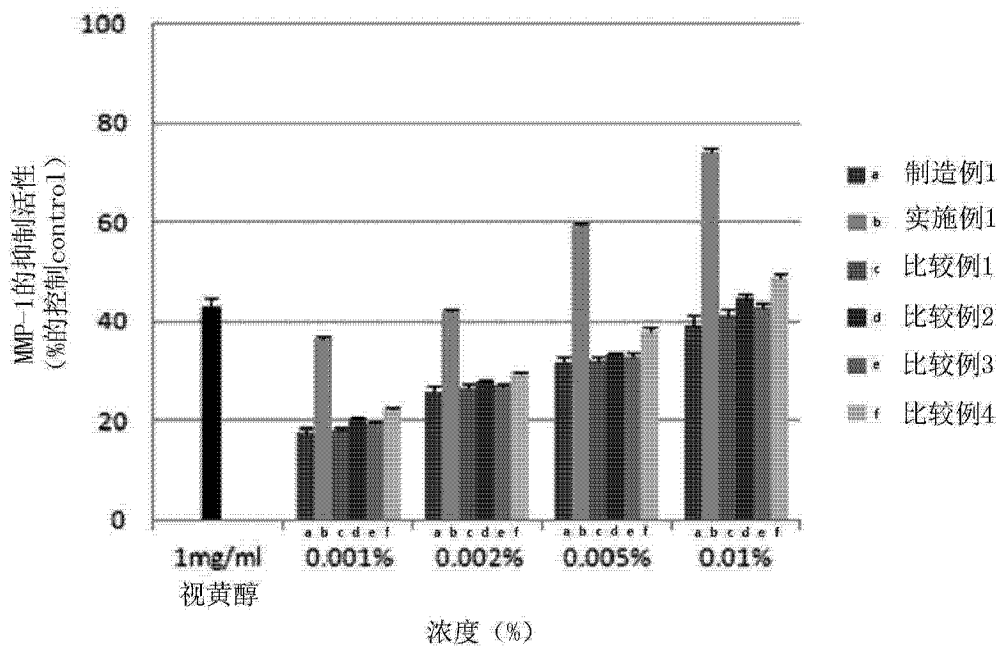


图 4

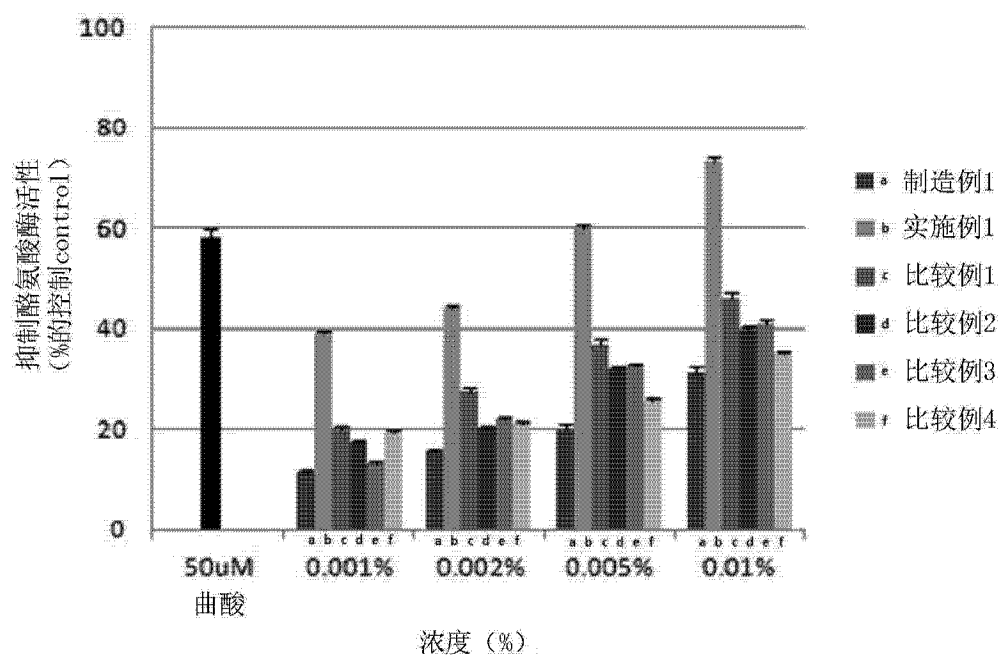


图 5