



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113913315 B

(45) 授权公告日 2024. 01. 30

(21) 申请号 202111452337.2

(22) 申请日 2021.12.01

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113913315 A

(43) 申请公布日 2022.01.11

(83) 生物保藏信息
GDMCC NO.61987 2021.10.28

(73) 专利权人 广州暨创生物医药研究院有限公司

地址 510000 广东省广州市白云区江高镇
雄郭西路88号5栋101房

(72) 发明人 刘琳 赵裕栋 于忠国 黄琳
陈慧敏 周鑫杰

(74) 专利代理机构 北京品源专利代理有限公司
11332

专利代理师 赵颖

(51) Int. Cl.
C12N 1/18 (2006.01)
C12N 15/01 (2006.01)
C12N 13/00 (2006.01)

C12P 1/02 (2006.01)
A61K 8/9728 (2017.01)
A61Q 19/02 (2006.01)
C12R 1/865 (2006.01)

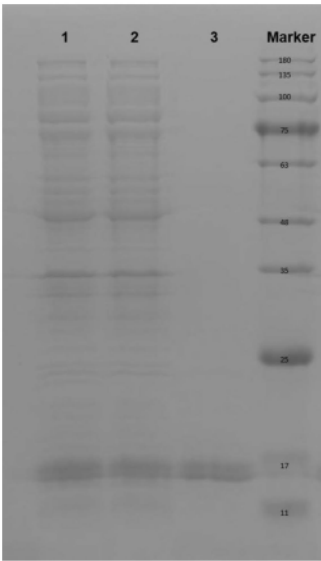
(56) 对比文件
US 2018135142 A1, 2018.05.17
CN 111471119 A, 2020.07.31
KR 101863895 B1, 2018.06.01
CN 110272835 A, 2019.09.24
CN 111514048 A, 2020.08.11
CN 113576956 A, 2021.11.02
KR 20050058664 A, 2005.06.17
WO 2021223366 A1, 2021.11.11
CN 113621669 A, 2021.11.09
郭丽. 高档化妆品中常见两种美白成分. 中国化妆品. 2020, 第11卷第88-92页.
罗春红; 吴双; 龙德权; 张如. 一款酵母水的美白功效评价. 香料香精化妆品. 2020, (第02期), 第39-41页. (续)

审查员 朱兵

权利要求书1页 说明书11页 附图5页

(54) 发明名称
一种具有美白祛斑功效的酵母及其应用

(57) 摘要
本发明提供了一种具有美白祛斑功效的酵母及其应用。所述具有美白祛斑功效的酵母命名为Saccharomyces cerevisiae, 保藏在广东省微生物菌种保藏中心, 保藏编号为GDMCC NO.61987, 保藏日期为2021年10月28日, 保藏地址为广州市先烈中路100号大院59号5楼。本发明还提供了所述具有美白祛斑功效的酵母的筛选方法、培养方法、利用其制备的具有美白祛斑功效的酵母提取物以及一种美白祛斑精华液。所述具有美白祛斑功效的酵母易培养, 产量高, 能够抑制酪氨酸酶的活性以及黑素的生成; 含有所述酵母提取物的化妆品美白功效显著, 应用价值极高。



[接上页]

(56) 对比文件

刘鹏程;杜佳丽;郑凤娟;王玉恬;吴敏;张文

武.三元耐盐复合菌种在碱减量废水处理中的应用.印染.2017,(第07期),第14-17页.

1. 一种具有美白祛斑功效的酵母, 其特征在于, 所述具有美白祛斑功效的酵母命名为酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) JC-101-998, 保藏在广东省微生物菌种保藏中心, 保藏编号为GDMCC NO.61987, 保藏日期为2021年10月28日, 保藏地址为广州市先烈中路100号大院59号5楼。

2. 一种权利要求1所述的具有美白祛斑功效的酵母的培养方法, 其特征在于, 所述培养方法包括:

将所述具有美白祛斑功效的酵母接种于YPD培养基中, 培养。

3. 根据权利要求2所述的具有美白祛斑功效的酵母的培养方法, 所述培养为震荡培养, 所述震荡培养的温度为25~32℃, 所述震荡培养的震荡转速为100~200rpm, 所述震荡培养的时间为3~5d。

4. 根据权利要求2所述的具有美白祛斑功效的酵母的培养方法, 其特征在于, 所述YPD培养基包括: 葡萄糖25~50g/L、酵母粉15~30g/L、蛋白胨20~35g/L、硫酸镁1.5~4g/L、磷酸二氢钠1.5~5g/L、磷酸氢二钠1.5~5g/L、甘油0.5~2g/L、尿嘧啶15~25mg/L以及维生素B1 0.001~0.003g/L, pH值为6~7。

5. 权利要求1所述的具有美白祛斑功效的酵母在制备具有美白祛斑功效的产品中的应用。

6. 一种具有美白祛斑功效的酵母提取物, 其特征在于, 所述具有美白祛斑功效的酵母提取物为以权利要求1所述的具有美白祛斑功效的酵母为原料, 经过发酵培养、收集菌体、制备菌体匀浆液并纯化的过程制备得到;

所述发酵培养的方法与权利要求2-4中任一项所述的培养方法相同;

所述菌体匀浆液的制备方法包括冰浴高压匀浆;

所述纯化前还包括过滤的步骤;

所述过滤所用滤膜的孔径为0.45μm;

所述纯化包括分子筛纯化;

所述分子筛包括Superdex™30prep grade分子筛。

7. 一种美白祛斑精华液, 其特征在于, 所述美白祛斑精华液含有权利要求6所述的具有美白祛斑功效的酵母提取物。

8. 根据权利要求7所述的美白祛斑精华液, 其特征在于, 所述美白祛斑精华液还包括植物提取物、保湿剂和生物多肽。

9. 根据权利要求8所述的美白祛斑精华液, 其特征在于, 所述植物提取物包括海藻提取物。

10. 根据权利要求8所述的美白祛斑精华液, 其特征在于, 所述保湿剂包括甘露醇。

11. 根据权利要求8所述的美白祛斑精华液, 其特征在于, 所述生物多肽包括乙酰基四肽-5和纤连蛋白。

12. 根据权利要求7所述的美白祛斑精华液, 其特征在于, 以质量分数计, 所述美白祛斑精华液包括具有美白祛斑功效的酵母提取物1%~5%、海藻提取物1%~2%、甘露醇1%~2%、乙酰基四肽-5 0.05%~0.2%、纤连蛋白0.15%~0.5%和水。

一种具有美白祛斑功效的酵母及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于微生物定向诱变育种技术和微生物功效技术领域,尤其涉及一种具有美白祛斑功效的酵母及其应用。

背景技术

[0002] 随着经济的发展和人们生活水平的提高,美白化妆品成为国内护肤品市场中最活跃的领域之一,美白护肤品的研发以及功效性评价自然成为研究者和消费者关注的焦点。由于消费者的消费观念逐渐趋于理性化,传统遮盖性的物理美白产品已经不能满足消费者的需求,研制一种有效的美白祛斑原料是未来的发展方向。

[0003] 人体皮肤的颜色取决于黑色素的含量与分布,可以通过抑制黑色素生成、阻断黑色素运输等途径达到美白肌肤的效果。随着生物医学技术在食品药品等领域的快速发展,分子药理学技术在化妆品安全性和功效性评价等领域中得到了推广和应用。因此,通过体外细胞实验来进行功效评价成为了检验化妆品原料功效的重要手段。细胞实验可以避免动物实验中由于动物个体差别而引起的实验误差,使实验更具重复性。美白类化妆品体外细胞水平评价体系的建立,为美白祛斑原料的研发与应用提供了筛选依据。

[0004] 目前市面上的美白祛斑原料种类繁多,普通的物理原料仅具有遮盖功能,与皮肤相容性差,且不可长期使用。化学原料的生产工艺复杂,引入的提纯试剂过多,制备工序也较为繁琐,存在一定的安全隐患。生物原料以其良好的生物相容性脱颖而出,其中酵母提取物类原料有着普通原料不可比拟的优势。研究表明,酵母提取物能显著降低黑色素,人体试验结果表明酵母可以有效改善遗传性皮肤过敏,同时减少皮肤的经皮水分散失,可以媲美维生素的安全性,具有改善皮肤状况(如改善皮肤粗糙度等)的作用,同时受试者评价显示酵母提取物具有良好的亮白皮肤的作用。

[0005] 与传统原料相比,酵母发酵成分活性高、分子量小、易于吸收。酵母提取物生物相容性较好,可以抑制酪氨酸酶的表达,抑制黑色素的生成,阻断黑色素的运输,加快表皮细胞的代谢速度。酵母提取物在黑色素生成过程中可以阻断信号通路,从根源解决问题,对皮肤的美白祛斑起着重要的作用。但酵母提取物在实际应用中存在一定的问题:1.酵母提取物具有多种功效,但没有非常明确的侧重点,无法满足用户对化妆品需求的精准分类和定位;2.酵母提取物成分复杂,大多数厂家不能阐明关键成分、作用机制以及比例含量;3.目前已应用于化妆品领域的原料大多制备工艺复杂,且成本较高。

[0006] 因此,如何提供一种具有明确功能的酵母原料,减少纯化提取过程的繁杂步骤并降低成本,以解决目前化妆品原料在实际生产中出现的成本高、功效不精确等弊端,已成为亟待解决的问题。

发明内容

[0007] 针对现有技术的不足和实际需求,本发明提供一种具有美白祛斑功效的酵母及其应用,所述酵母具有良好的酪氨酸酶活性抑制以及黑素含量抑制的效果,能够提亮肤色,美

白祛斑,具有实际应用的价值。

[0008] 为达此目的,本发明采用如下技术方案:

[0009] 第一方面,本发明提供了一种具有美白祛斑功效的酵母,所述具有美白祛斑功效的酵母命名为*Saccharomyces cerevisiae* JC-101-998,保藏在广东省微生物菌种保藏中心,保藏编号为GDMCC NO.61987,保藏日期为2021年10月28日,保藏地址为广州市先烈中路100号大院59号5楼。

[0010] 本发明中,通过诱变酿酒酵母建立菌种库,利用分子筛初步筛选,并通过酪氨酸酶活性抑制实验、黑素含量抑制实验等进行高通量复筛检测,机制清晰,功效明确,获得的酵母菌株具有良好的美白祛斑功效。所述酵母菌株还具有良好的生物活性,可通过发酵进行大规模生产,为后续相关产品的开发与制备创造了条件。

[0011] 第二方面,本发明提供了一种第一方面所述的具有美白祛斑功效的酵母的筛选方法,所述筛选方法包括:

[0012] 诱变、初筛和复筛后,得到所述具有美白祛斑功效的酵母。

[0013] 优选地,所述初筛包括室温常压等离子体诱变(ARTP)。

[0014] 优选地,所述初筛包括分子筛高通量筛选。

[0015] 优选地,所述复筛包括通过酪氨酸酶活性抑制实验和/或黑素含量抑制实验进行高通量复筛。

[0016] 本发明中,所述筛选方法构建在酪氨酸酶抑制活性、黑素细胞黑素含量抑制实验的基础上,功效明确,机制清晰,避免了以往酵母提取物成分复杂、功效模糊的问题,为相关应用奠定了基础。

[0017] 第三方面,本发明提供一种第一方面所述的具有美白祛斑功效的酵母的培养方法,所述培养方法包括:

[0018] 将所述具有美白祛斑功效的酵母接种于YPD培养基中,培养。

[0019] 优选地,所述培养为震荡培养,所述震荡培养的温度为25~32℃,例如可以是25℃、26℃、27℃、28℃、29℃、30℃、31℃或32℃等,所述震荡培养的震荡转速为100~200rpm,例如可以是100rpm、110rpm、120rpm、130rpm、140rpm、150rpm、160rpm、170rpm、180rpm、190rpm或200rpm等,所述震荡培养的时间为3~5d,例如可以是3d、3.5d、4d、4.5d或5d等,该数值范围内的其他具体点值均可选择,在此便不再一一赘述。

[0020] 优选地,所述葡萄糖在所述YPD培养基中的浓度为25~50g/L,例如可以是25g/L、30g/L、35g/L、40g/L、45g/L或50g/L等,该数值范围内的其他具体点值均可选择,在此便不再一一赘述。

[0021] 优选地,所述酵母粉在所述YPD培养基中的浓度为15~30g/L,例如可以是15g/L、16g/L、17g/L、18g/L、19g/L、20g/L、21g/L、22g/L、23g/L、24g/L、25g/L、26g/L、27g/L、28g/L、29g/L或30g/L等,该数值范围内的其他具体点值均可选择,在此便不再一一赘述。

[0022] 优选地,所述蛋白胨在所述YPD培养基中的浓度为20~35g/L,例如可以是20g/L、21g/L、22g/L、23g/L、24g/L、25g/L、26g/L、27g/L、28g/L、29g/L、30g/L、31g/L、32g/L、33g/L、34g/L或35g/L等,该数值范围内的其他具体点值均可选择,在此便不再一一赘述。

[0023] 优选地,所述硫酸镁在所述YPD培养基中的浓度为1.5~4g/L,例如可以是1.5g/L、2g/L、2.5g/L、3g/L、3.5g/L或4g/L等,该数值范围内的其他具体点值均可选择,在此便不再

一一赘述。

[0024] 优选地,所述磷酸二氢钠在所述YPD培养基中的浓度为1.5~5g/L,例如可以是1.5g/L、2g/L、2.5g/L、3g/L、3.5g/L、4g/L、4.5g/L或5g/L等,该数值范围内的其他具体点值均可选择,在此便不再一一赘述。

[0025] 优选地,所述磷酸氢二钠在所述YPD培养基中的浓度为1.5~5g/L,例如可以是1.5g/L、2g/L、2.5g/L、3g/L、3.5g/L、4g/L、4.5g/L或5g/L等,该数值范围内的其他具体点值均可选择,在此便不再一一赘述。

[0026] 优选地,所述甘油在所述YPD培养基中的浓度为0.5~2g/L,例如可以是0.5g/L、0.6g/L、0.7g/L、0.8g/L、0.9g/L、1g/L、1.1g/L、1.2g/L、1.3g/L、1.4g/L、1.5g/L、1.6g/L、1.7g/L、1.8g/L、1.9g/L或2g/L等,该数值范围内的其他具体点值均可选择,在此便不再一一赘述。

[0027] 优选地,所述尿嘧啶在所述YPD培养基中的浓度为15~25mg/L,例如可以是15mg/L、16mg/L、17mg/L、18mg/L、19mg/L、20mg/L、21mg/L、22mg/L、23mg/L、24mg/L或25mg/L等,该数值范围内的其他具体点值均可选择,在此便不再一一赘述。

[0028] 优选地,所述维生素B1在所述YPD培养基中的浓度为0.001~0.003g/L,例如可以是0.001g/L、0.002g/L或0.003g/L等,该数值范围内的其他具体点值均可选择,在此便不再一一赘述。

[0029] 优选地,所述YPD培养基的pH值为6~7,例如可以是6、6.5或7等,该数值范围内的其他具体点值均可选择,在此便不再一一赘述。

[0030] 作为优选技术方案,本发明所述YPD培养基包括:葡萄糖25~50g/L、酵母粉15~30g/L、蛋白胨20~35g/L、硫酸镁1.5~4g/L、磷酸二氢钠1.5~5g/L、磷酸氢二钠1.5~5g/L、甘油0.5~2g/L、尿嘧啶15~25mg/L以及维生素B10.001~0.003g/L,pH值为6~7。

[0031] 本发明中,通过对所述酵母菌株的培养条件以及培养基组分进行优化,促进了酵母的增殖与分裂,提高了菌体的产量,为后续菌株的产业化生产与开发创造了条件。

[0032] 第四方面,本发明提供第一方面所述的具有美白祛斑功效的酵母在制备具有美白祛斑功效的产品中的应用。

[0033] 第五方面,本发明提供一种具有美白祛斑功效的酵母提取物,所述具有美白祛斑功效的酵母提取物以第一方面所述的具有美白祛斑功效的酵母为原料,经过发酵培养、收集菌体、制备菌体匀浆液并纯化的过程制备得到。

[0034] 优选地,所述发酵培养的方法与第三方面所述的培养方法相同。

[0035] 优选地,所述菌体匀浆液的制备方法包括冰浴高压匀浆。

[0036] 优选地,所述纯化前还包括过滤的步骤。

[0037] 优选地,所述纯化包括分子筛纯化。

[0038] 第六方面,本发明提供一种美白祛斑精华液,所述美白祛斑精华液含有第五方面所述的具有美白祛斑功效的酵母提取物。

[0039] 优选地,所述美白祛斑精华液还包括植物提取物、保湿剂和生物多肽。

[0040] 优选地,所述植物提取物包括海藻提取物。

[0041] 优选地,所述保湿剂包括甘露醇。

[0042] 优选地,所述生物多肽包括乙酰基四肽-5和纤连蛋白。

[0043] 优选地,所述具有美白祛斑功效的酵母提取物在所述美白祛斑精华液中的质量分数为1%~5%,例如可以是1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%或5%等,该数值范围内的其他具体点值均可选择,在此便不再一一赘述。

[0044] 优选地,所述海藻提取物在所述美白祛斑精华液中的质量分数为1%~2%,例如可以是1%、1.1%、1.2%、1.3%、1.4%、1.5%、1.6%、1.7%、1.8%、1.9%或2%等,该数值范围内的其他具体点值均可选择,在此便不再一一赘述。

[0045] 优选地,所述甘露醇在所述美白祛斑精华液中的质量分数为1%~2%,例如可以是1%、1.1%、1.2%、1.3%、1.4%、1.5%、1.6%、1.7%、1.8%、1.9%或2%等,该数值范围内的其他具体点值均可选择,在此便不再一一赘述。

[0046] 优选地,所述乙酰基四肽-5在所述美白祛斑精华液中的质量分数为0.05%~0.2%,例如可以是0.05%、0.1%、0.15%或0.2%等,该数值范围内的其他具体点值均可选择,在此便不再一一赘述。

[0047] 优选地,所述纤连蛋白在所述美白祛斑精华液中的质量分数为0.15%~0.5%,例如可以是0.15%、0.2%、0.25%、0.3%、0.35%、0.4%、0.45%或0.5%等,该数值范围内的其他具体点值均可选择,在此便不再一一赘述。

[0048] 作为优选技术方案,本发明所述美白祛斑精华液,以质量分数计,包括具有美白祛斑功效的酵母提取物1%~5%、海藻提取物1%~2%、甘露醇1%~2%、乙酰基四肽-5 0.05%~0.2%、纤连蛋白0.15%~0.5%和水。

[0049] 相比于现有技术,本发明具有如下有益效果:

[0050] (1) 本发明通过常压室温等离子体诱变技术对工业酿酒酵母菌种进行诱变,获得了突变率更高的突变库,进一步丰富了菌种多样性及稳定性;利用分子筛高通量初筛酿酒酵母菌种突变库,再将初筛后所得的酵母提取物以酪氨酸酶活性抑制实验、黑素含量抑制实验来进行高通量复筛,功效明确,机制清晰,获得了具有美白祛斑功效的酵母菌株;

[0051] (2) 本发明通过对酵母的培养条件、使用的培养基进行优化,提高了酵母菌体的产量,且操作简便,无需专业的仪器与设备,为相关产品的工业化生产提供了条件;

[0052] (3) 使用所述具有美白祛斑功效的酵母菌株制备得到的酵母提取物可以抑制酪氨酸酶的活性以及抑制黑素的生成,制成美白祛斑精华液后,对于紫外线诱导的人体皮肤黑化模型具有良好的提亮肤色的作用,功效显著,具有极大的价值,应用前景广阔。

附图说明

[0053] 图1为本发明实施例1中酵母菌株JC-101的培养结果图片,图中,A-活化后的原始菌株JC-101的培养结果图片(比例尺=10mm);B-ARTP诱变后的菌株的培养结果图片(比例尺=10mm);C-筛选得到的具有美白祛斑功效的酵母菌株的培养结果图片(比例尺=10mm);D-筛选得到的具有美白祛斑功效的酵母菌株的形态图片(比例尺=5 μ m);

[0054] 图2为本发明实施例1中酪氨酸酶活性抑制实验的结果图片;

[0055] 图3为本发明实施例1中黑素含量抑制实验的结果图片;

[0056] 图4为本发明实施例3中SDS-PAGE的检测结果图片,图中,泳道1-菌体匀浆液,泳道2-酵母提取物,泳道3-纯化时的流穿液,泳道Marker-标准蛋白分子量Marker;

[0057] 图5为本发明实施例3中高效液相色谱的检测结果图片;

- [0058] 图6为本发明实施例4中不同实验时期皮肤ITA°值的变化情况的结果图片；
[0059] 图7为本发明实施例4中不同实验时期皮肤MI值的变化情况的结果图片；
[0060] 图8为本发明实施例5中不同实验时期皮肤ITA°值的变化情况的结果图片；
[0061] 图9为本发明实施例5中不同实验时期皮肤MI值的变化情况的结果图片；
[0062] 图10为本发明实施例6中不同实验时期皮肤ITA°值的变化情况的结果图片；
[0063] 图11为本发明实施例6中不同实验时期皮肤MI值的变化情况的结果图片。

具体实施方式

[0064] 为进一步阐述本发明所采取的技术手段及其效果,以下结合实施例和附图对本发明作进一步地说明。可以理解的是,此处所描述的具体实施方式仅仅用于解释本发明,而非对本发明的限定。

[0065] 实施例中未注明具体技术或条件者,按照本领域内的文献所描述的技术或条件,或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可通过正规渠道商购获得的常规产品。

[0066] 材料与方法:

[0067] 具有美白祛斑功效的酵母来自工业酿酒酵母菌株JC-101,该菌株命名为 *Saccharomyces cerevisiae* JC-101-998,于2021年10月28日保藏在广东省微生物菌种保藏中心(GDMCC),地址为广州市先烈中路100号大院59号5楼,邮编510070,保藏编号为GDMCC NO.61987。

[0068] 工业酿酒酵母菌株JC-101保存在广州暨创医美生物科技有限公司。

[0069] 酵母粉购自赛默飞世尔科技公司。

[0070] 蛋白胨购自美国BD公司。

[0071] 胰蛋白酶购自赛默飞世尔科技有限公司。

[0072] 考马斯亮蓝购自北京博奥龙免疫技术有限公司。

[0073] 实施例1

[0074] 本实施例以工业酿酒酵母菌株(*Saccharomyces cerevisiae*)JC-101作为原始菌株,通过诱变、初筛以及复筛,筛选具有美白祛斑功效的酵母,步骤如下:

[0075] (1) 菌种活化及发酵培养:

[0076] 将-80℃保存的工业酿酒酵母菌株JC-101划线接种到YPD固体培养基斜面上进行活化,在30℃培养箱中培养5d,培养结果如图1中的A图所示;挑取单菌落接种于YPD液体培养基中,在30℃、150rpm下振荡培养5天;

[0077] 将活化后的JC-101接入发酵培养基中,在30℃、150rpm下振荡培养,直至菌体生长至对数期。

[0078] YPD培养基的配方如下:葡萄糖30g/L、酵母粉20g/L、蛋白胨20g/L、硫酸镁1.5g/L、磷酸二氢钠1.5g/L、磷酸氢二钠3g/L、甘油1g/L、尿嘧啶20mg/L和维生素B1 0.001g/L(固体培养基添加琼脂20g/L),pH值为6.5。

[0079] YPD培养基的制备方法如下:称量好所需的各种组分,将除葡萄糖之外的所有组分加入500mL水中溶解,定容至850mL,高压灭菌后,添加150mL质量分数为20%的过滤除菌的葡萄糖溶液。

[0080] (2) 诱变:

[0081] 通过室温常压等离子体诱变技术进行诱变,步骤如下:

[0082] 取1mL培养至对数中期的菌液,置于1.5mL离心管中,4℃下8000rpm离心5min,弃上清;

[0083] 用含有5%甘油的生理盐水洗涤3次后,吸取10μL菌悬液置于细胞计数板上,用显微镜计数菌体数量,根据计数结果稀释菌体浓度为 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ /mL;

[0084] 取10μL菌悬液均匀涂布于无菌的载片表面,然后将载片置于ARTP诱变育种仪的载台上进行诱变处理,

[0085] ARTP诱变处理条件为:

[0086] 高纯氦气(99.99%):流速15L/min,输入功率120W,照射距离2mm,处理温度低于40℃,诱变100s;

[0087] 菌体诱变完成后,用镊子将载片放到装有1mL生理盐水的EP管中,持续充分振荡1min,把附着在载片上的菌体充分洗脱下来,形成菌悬液,对照组直接取10μL菌液加入1mL生理盐水中。

[0088] (3) 初筛:

[0089] 通过分子筛高通量筛选进行初筛,步骤如下:

[0090] 用移液枪吸取200μL诱变后的酵母菌悬液涂布于无抗性YPD平板表面,30℃培养72h,培养结果如图1中的B图所示。挑取菌落直径大、生长优势的菌株,置于无抗性的YPD液体培养基中,30℃下培养48h;

[0091] 取1mL菌液用于菌种保种及菌株标号标记,其余菌液用于菌体匀浆液的制备,步骤如下:

[0092] 配置重悬液(20mM Tris-HCl和0.1M NaCl,pH为7.0),按菌体湿重(g):重悬液(mL)=1:15的比例加入重悬液,在10000rpm下重悬3min;

[0093] 使用组织捣碎匀浆机在800bar下高压匀浆2次:将探头插入匀浆中,距离容器底部3cm,设定功率10%,超声时间3s,间隔时间5s,超声时间20min,超声次数3次,此过程在冰浴中进行;

[0094] 菌体破碎后使用大型低温离心机在4℃下17000g离心30min,收集上清液即为菌体匀浆液;

[0095] 菌体匀浆液使用0.45μm滤膜过滤后,使用SuperdexTM30prep grade分子筛进行纯化,方法及条件如下:

[0096] 用20mM PB缓冲液(18℃,pH值为7.0)以0.80cm/h(体积流速4.4mL/min)的线性流速平衡9V柱床;

[0097] 过滤后的菌体匀浆液按10%(C/V)的上样量上样,使用PB缓冲液(18℃,pH值为7.0,电导1ms/cm)以0.8cm/h的线性流速冲洗柱床,为获得较好的纯度,可以分梯度进行洗脱;

[0098] 洗脱时,检测仪示数上升到70以上开始收集,分段接收:70~200以上为第一瓶洗脱,200以上-峰尖-降回200为第二瓶洗脱,200降到70为第三瓶洗脱,紫外降至70以下停止收集,所得洗脱液即为酵母提取物;

[0099] 按照收集液收集量(体积×纯度)的数值高低,初筛收集量排名靠前的ARTP诱变后

的酿酒酵母菌种。

[0100] (4) 复筛:

[0101] 通过酪氨酸酶活性抑制实验和黑素含量抑制实验进行高通量复筛, 步骤如下:

[0102] ①酪氨酸酶活性抑制实验:

[0103] 取对数生长期的B16细胞, 制成单细胞悬液, 以 7×10^3 个/孔的量接种于96孔细胞培养板(边缘孔用无菌PBS填充), 将细胞置于 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 细胞培养箱中孵育1d, 至细胞单层铺满孔底;

[0104] 分别加入含高浓度(2%)、中浓度(0.2%)和低浓度(0.02%)三个浓度梯度酵母提取物的细胞培养基, 加入等量PBS溶液的细胞孔作为阴性对照, 加入等量曲酸溶液的细胞孔作为阳性对照, 每一组分别设3个重复孔, 继续在 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 细胞培养箱中孵育, 48h后弃去培养基, 用pH 7.4的PBS洗涤2次;

[0105] 每孔加1%浓度的TritonX-100溶液 $50\mu\text{L}$, 迅速置于 -80°C 冻存30min, 室温融化使细胞完全破裂, 加入 37°C 预热后1%浓度的L-多巴溶液 $10\mu\text{L}$, 37°C 孵育2h, 置于酶标仪测定波长490nm处的吸光度值, 并通过以下公式计算酪氨酸酶活性抑制率:

[0106] 酪氨酸酶活性抑制率(%) = $1 - \text{实验组平均吸光度值} / \text{阴性对照组平均吸光度值} \times 100\%$ 。

[0107] 测试结果如图2所示, 有图可知, 不同浓度的酵母提取物与酪氨酸酶水平变化呈现剂量-效应关系, 且变化水平具有统计学意义($p < 0.05$), 表明该酵母提取物具有酪氨酸酶抑制作用。将阴性对照组的抑制率设为阈值, 筛选出抑制率大于阈值的菌株, 即具有酪氨酸酶抑制功效的酵母菌株。

[0108] ②黑素含量抑制实验:

[0109] 取对数生长期的B16细胞, 制成单细胞悬液, 以 2×10^5 个/孔的量接种于6孔细胞培养板;

[0110] 分别加入含高浓度(2%)、中浓度(0.2%)和低浓度(0.02%)三个浓度梯度酵母提取物的细胞培养基, 加入等量PBS溶液的细胞孔作为阴性对照, 加入等量7%抗坏血酸钠溶液的细胞孔作为阳性对照, 每一组分别设3个重复孔, 将细胞置于 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 细胞培养箱中孵育, 72h后弃去培养基, 用pH 7.4的PBS洗涤2次;

[0111] 加入0.25%胰蛋白酶消化并收集细胞, 超声处理细胞, 1000rpm下离心10min;

[0112] 离心后的沉淀用体积分数10%的三氯乙酸和乙醇洗涤, 然后在1200g条件下离心5min, 弃上清液, 加入1mol/L的NaOH(含10%DMSO), 并于 80°C 水浴中保温2h;

[0113] 使用酶联免疫检测仪在470nm处测量各组的吸光值, 并通过以下公式计算黑素合成相对含量:

[0114] 黑素合成相对含量(%) = $[(\text{实验组平均吸光度值} / \text{实验组细胞密度}) / (\text{阴性对照组平均吸光度值} / \text{阴性对照组细胞密度})] \times 100\%$ 。

[0115] 测试结果如图3所示, 由图可知, 不同浓度的酵母提取物与黑素合成相对含量的变化呈现剂量-效应关系, 且变化水平具有统计学意义($p < 0.05$), 表明该酵母提取物具有抑制黑素生成的作用。将阴性对照组的黑素合成相对含量设为阈值, 筛选出抑制率大于阈值的菌株, 即具有抑制黑素生成的美白祛斑功效的酵母菌株。

[0116] 筛选同时具有酪氨酸酶抑制功效和抑制黑素生成功效的酵母菌株, 即为具有美白

祛斑功效的酵母菌株。

[0117] 经过上述操作,成功筛选到一株具有美白祛斑功效的酵母,培养结果如图1中的C图所示,菌落呈白色圆形,中心隆起不透明,表面光滑边缘整齐,直径1~2mm,其形态图片如图1中的D图所示,细胞呈球形或卵圆形,单个或多个存在,直径5~10 μ m。对菌株进行后续的检测。

[0118] 实施例2

[0119] 本实施例对实施例1筛选到的具有美白祛斑功效的酵母菌株进行检测,步骤如下:

[0120] 菌体生物量测定

[0121] 对酵母菌株进行发酵培养,步骤与实施例1中的相同;

[0122] 取50mL酵母发酵培养液,置于100mL离心管中,4℃下8000rpm离心15min,弃上清;用蒸馏水洗涤后离心,重复3次,弃上清;

[0123] 菌体沉淀在60℃干燥器中烘至恒重,在干燥器中冷却至常温后称重。

[0124] 菌体生物量测定的结果显示,酵母菌株的菌体生物量为5~10g/L。

[0125] 酵母提取物多肽测定

[0126] 制备酵母提取物,制备方法与实施例1中的相同;

[0127] 精密量取待测溶液1mL,按照蛋白质含量测定法(中国药典2010年版第二部附录VIIM第二法),根据线性回归方程计算酵母提取物溶液中的多肽含量为2~4g/L。

[0128] 将水作为空白校正,对酵母提取物溶液进行稀释,分别检测稀释后的溶液在波长260nm及280nm下的吸光度,使示数在0.2~0.8之间;

[0129] 根据公式计算浓度和收率:

[0130] $C = (1.45 \times OD_{280} - 0.74 \times OD_{260}) \times \text{稀释倍数}$,式中,C:样品浓度(mg/mL); OD_{280} :280nm处的紫外吸收值; OD_{260} :260nm处的紫外吸收值;

[0131] 收率=下样蛋白量/上样蛋白量 $\times 100\%$ 。

[0132] 其中,下样蛋白量为最终酵母提取物收集液中的蛋白量;上样蛋白量为菌体匀浆液上样分子筛的蛋白量。

[0133] 根据公式计算蛋白收率为30%~40%。

[0134] 遗传稳定性检测

[0135] 将菌株连续传代8次,用每一代的菌种进行发酵培养,检测发酵产物中的菌体生物量和多肽含量。

[0136] 结果显示,经连续传代8次后,每代菌种发酵产物中的菌体生物量和多肽含量稳定,证明该酵母菌株具有良好的稳定性。

[0137] 根据上述检测结果,证明筛选到的酵母菌株具有美白祛斑功效,且具有良好的稳定性。将酵母菌命名为*Saccharomyces cerevisiae* JC-101-998,于2021年10月28日保藏在广东省微生物菌种保藏中心(GDMCC),地址为广州市先烈中路100号大院59号5楼,邮编510070,保藏编号为GDMCC NO.61987。

[0138] 实施例3

[0139] 本实施例对酵母菌株JC-101-998的提取物进行测定,步骤如下:

[0140] 制备菌株JC-101-998的提取物,方法与实施例1中的相同。

[0141] 酵母提取物的SDS-PAGE电泳检测

[0142] 将菌体匀浆液、纯化时的流穿液以及酵母提取物分别与上样缓冲液混合,在沸水中处理10min后,在4℃下10000rpm离心3min,取10 μ L上清上样;

[0143] 电泳时,样品在浓缩胶时电压为90V,在分离胶时电压为120V,电流设定为50mA;

[0144] 4 $\times$ 上样缓冲液的制备方法如下:称取Tris 0.303g、溴酚蓝2mg、SDS 0.8g、甘油4mL和盐酸189 μ L,用水补足至10mL;

[0145] SDS-PAGE电极缓冲液的制备方法如下:称取Tris 3g、甘氨酸14.4g和SDS1g,用水定容至1L;

[0146] 电泳结束后取出分离胶置于考马斯亮蓝染色液R250中,在50rpm中摇晃15min进行染色;染色结束后取出分离胶置于脱色液中,在50rpm中摇晃3h进行脱色;

[0147] 考马斯亮蓝染色液的制备方法如下:称取考马斯亮蓝R250 2.5g、无水乙醇250mL和10%三氯乙酸溶液80mL,使用水定容至1L;

[0148] 考马斯亮蓝脱色液的制备方法如下:称取无水乙醇500mL和10%三氯乙酸溶液100mL,使用水定容至1L。

[0149] SDS-PAGE的检测结果如图4所示,由图可以看出,该酵母提取物高度富集于分子量16kDa左右。

[0150] 酵母提取物的高效液相色谱检测

[0151] 使用高效液相色谱对酵母提取物的纯度进行检测,条件如下:

[0152] 色谱柱: Promosil®C18, 5 μ m, 4.6 $\times$ 150mm, 100Å;

[0153] 流动相:0.1%三氟乙酸水溶液:0.1%三氟乙酸:乙腈溶液=85:15;

[0154] 流速:1.0mL/min;进样量:10 μ L;柱温:30℃;波长:215nm。

[0155] 检测结果如图5所示,对结果进行统计,如表1所示。

[0156] 表1

[0157]

序号	峰面积 (mV $\times$ min)	比例 (%)	保留时间 (min)	聚合度
1	10958170	75.88	20.397	十肽以上
2	1261089	8.73	19.799	十肽以下
3	971624	6.73	19.290	五肽以上
4	586642	4.06	18.813	四肽、五肽
5	663893	4.59	18.389	二肽、三肽
6	172	0.01	-	氨基酸

[0158] 由图5和表1可知,高效液相色谱结果显示,该酵母提取物80%以上主要为十肽,剩余为小分子活性肽及其他微量物质。

[0159] 实施例4

[0160] 本实施例提供一种美白祛斑精华液,以质量分数计,所述美白祛斑精华液的组分为JC-101-998的提取物4%、海藻提取物1.5%、甘露醇1.5%、乙酰基四肽-5 0.01%和纤连蛋白0.3%,余量为水。

[0161] 其中,所述JC-101-998的提取物的制备方法与实施例1中相同。

[0162] 将所述美白祛斑精华液在超净工作台内过滤分装,经无菌实验、稳定性及安全性检测后,用于祛斑美白功效的测试。

[0163] 招募30名18~60岁健康男性或女性志愿者,随机分为三组,每组10名志愿者。三组分别进行阴性对照、美白祛斑精华液以及阳性对照的实验,以上臂部位作为测试区域,测试部位肤色ITA°值在20°~41°范围内。用日光模拟仪在相同照射点按0.75倍MED剂量每天紫外照射1次,连续照射4d,使皮肤进入黑化期,建立人体皮肤黑化模型。

[0164] 在照射结束后第5天,对测试区皮肤颜色进行肤色检测,随后涂抹样品,以蒸馏水作为阴性对照,以7%抗坏血酸溶液作为阳性对照。连续涂抹样品4周,在涂抹后1周、2周、3周和4周分别对皮肤颜色进行仪器检测并记录。

[0165] 利用皮肤色度仪分别测量各测试区域的L*、a*、b*值,每个区域测试3次,记录并计算ITA°值,ITA°值越大,代表肤色越浅,反之肤色越深;利用皮肤黑素检测仪分别测量各测试区域的MI值,每个测试区测试三次,并记录。MI值越小,皮肤黑素含量越低,反之黑素含量越高。

[0166] 不同实验时期皮肤ITA°值的变化情况的结果图片如图6所示,皮肤MI值的变化情况的结果图片如图7所示。由图可知,在涂抹所述美白祛斑精华液前后,ITA°差值或MI差值与阴性对照相比有显著改善,且改善水平具有统计学意义($p<0.05$),表明该美白祛斑精华液具有美白祛斑的作用,验证了所述菌株具有美白祛斑的功效。

[0167] 实施例5

[0168] 本实施例提供一种美白祛斑精华液,以质量分数计,所述美白祛斑精华液的组分为JC-101-998的提取物5%、海藻提取物1%、甘露醇1%、乙酰基四肽-5 0.05%和纤连蛋白0.15%,余量为水。

[0169] 其中,所述JC-101-998的提取物的制备方法与实施例1中相同。

[0170] 将所述美白祛斑精华液在超净工作台内过滤分装,经无菌实验、稳定性及安全性检测后,用于祛斑美白功效的测试。

[0171] 实施例6

[0172] 本实施例提供一种美白祛斑精华液,以质量分数计,所述美白祛斑精华液的组分为JC-101-998的提取物1%、海藻提取物2%、甘露醇2%、乙酰基四肽-5 0.2%和纤连蛋白0.5%,余量为水。

[0173] 其中,所述JC-101-998的提取物的制备方法与实施例1中相同。

[0174] 将所述美白祛斑精华液在超净工作台内过滤分装,经无菌实验、稳定性及安全性检测后,用于祛斑美白功效的测试。

[0175] 对实施例5和实施例6制备的祛斑美白精华液进行相同的测试实验,其中实施例5的不同实验时期皮肤ITA°值的变化情况如图8所示,皮肤MI值的变化情况如图9所示,实施例6的不同实验时期皮肤ITA°值的变化情况如图10所示,皮肤MI值的变化情况如图11所示。结果显示实验组的ITA°差值和MI差值与阴性对照、阳性对照相比有显著改善,改善水平同样具有统计学意义,表明相应的产品同样具有美白祛斑的作用。

[0176] 综上所述,本发明通过常压室温等离子体诱变技术、分子筛初筛以及酪氨酸酶活性抑制实验、黑素含量抑制实验复筛,成功筛选到一株具有美白祛斑功效的酵母菌株。所述酵母菌株可以通过发酵进行大规模培养,操作简单,生产效率高,通过对培养条件、使用的培养基进行优化,进一步提高了产量;使用所述酵母菌株制备的酵母提取物具有良好的美白祛斑功效,可以抑制酪氨酸酶的活性以及黑素的生成,制成化妆品,使用后可以明显提亮

肤色,具有应用于生产实际中的价值。

[0177] 申请人声明,本发明通过上述实施例来说明本发明的详细方法,但本发明并不局限于上述详细方法,即不意味着本发明必须依赖上述详细方法才能实施。所属技术领域的技术人员应该明了,对本发明的任何改进,对本发明产品各原料的等效替换及辅助成分的添加、具体方式的选择等,均落在本发明的保护范围和公开范围之内。

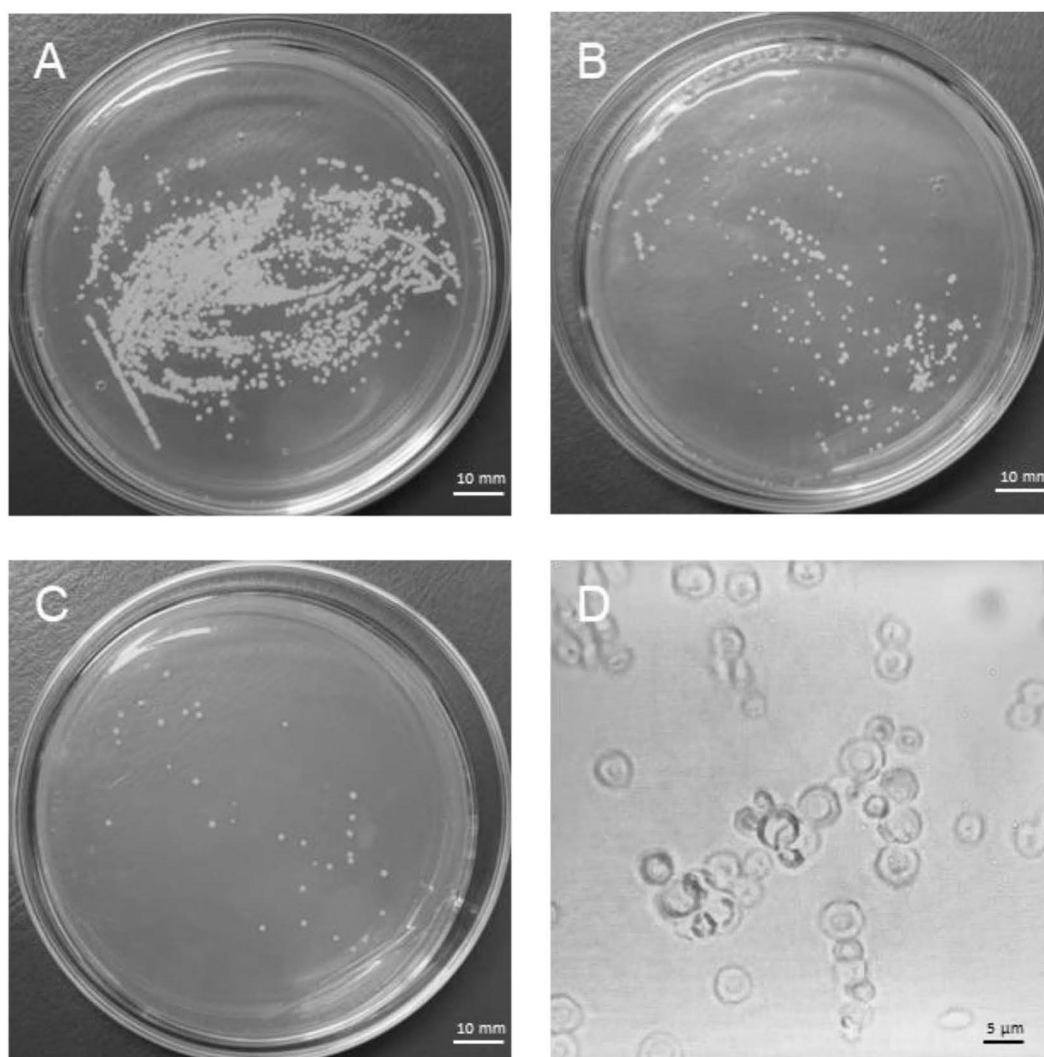


图1

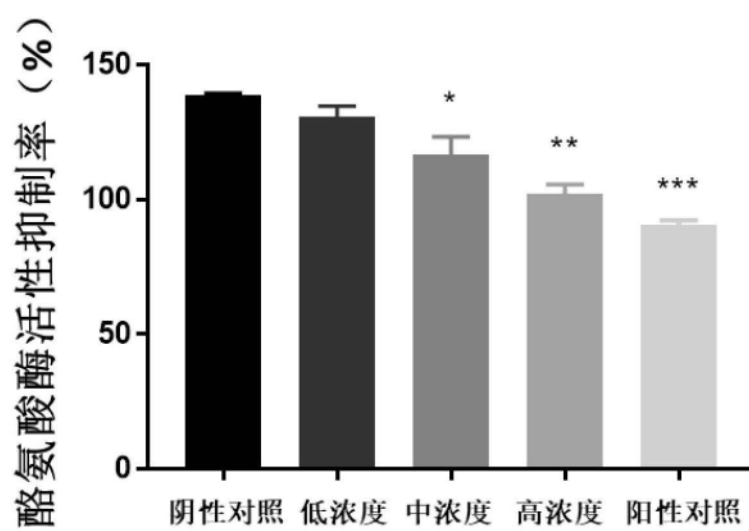


图2

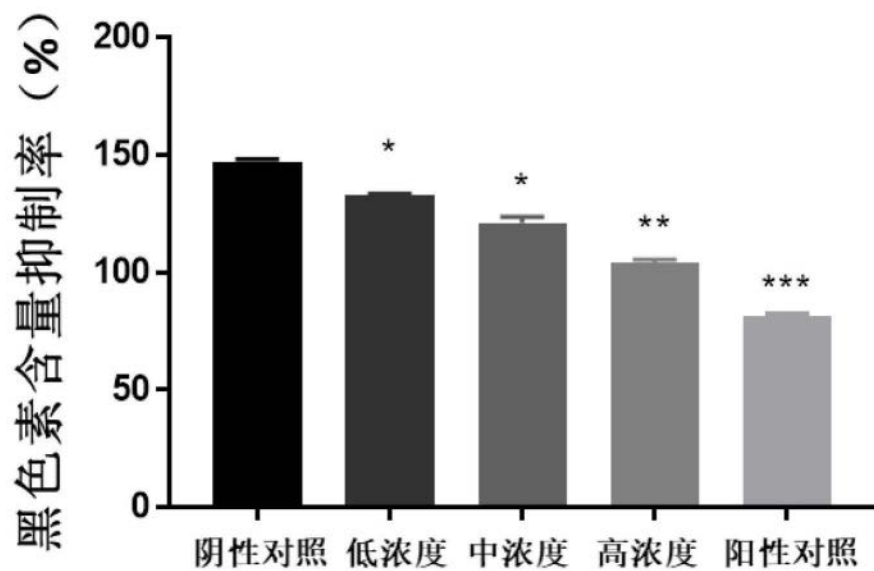


图3

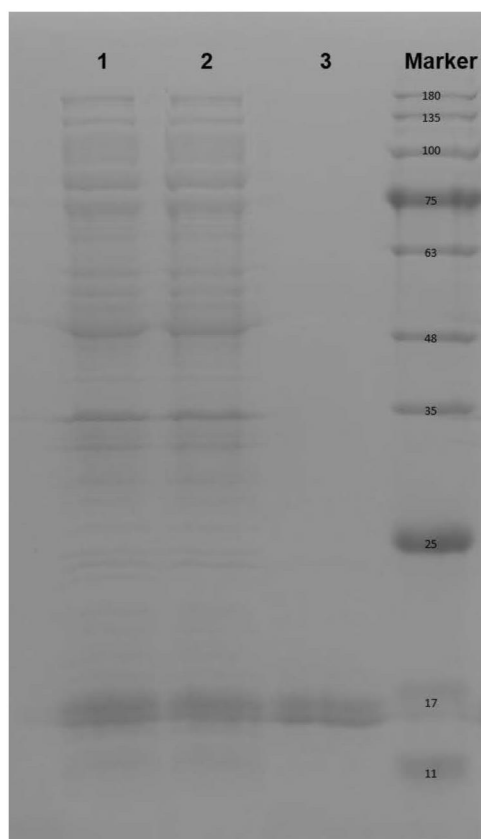


图4

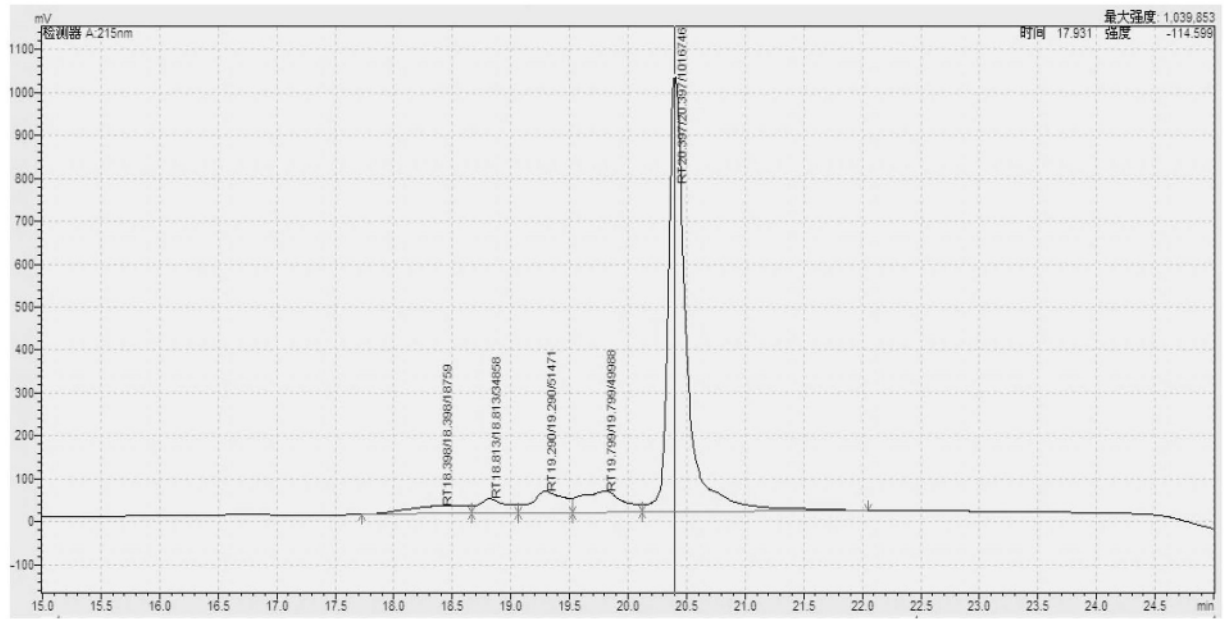


图5

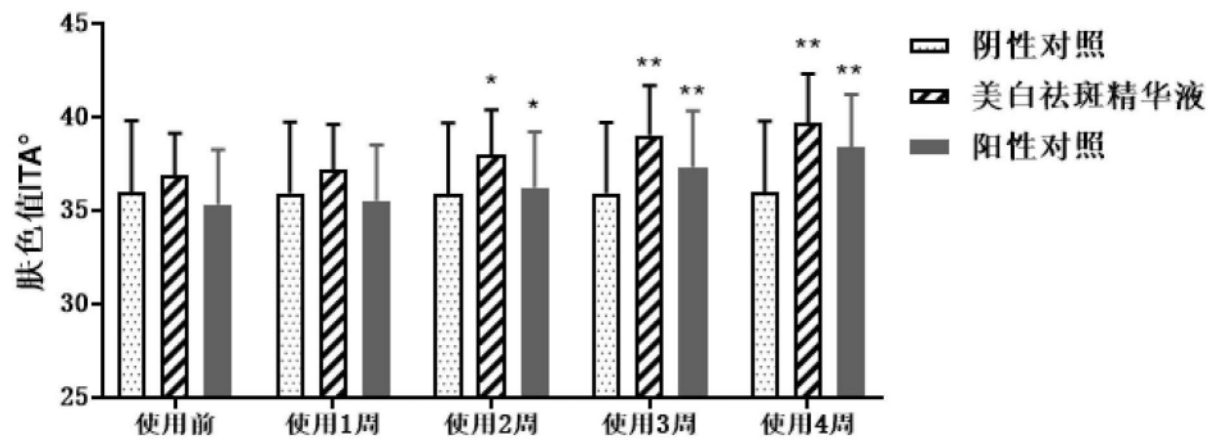


图6

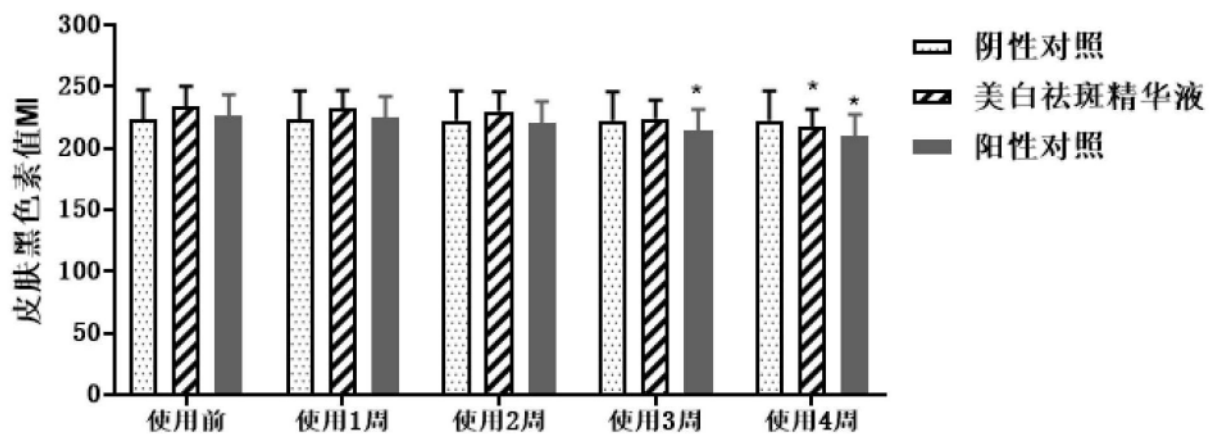


图7

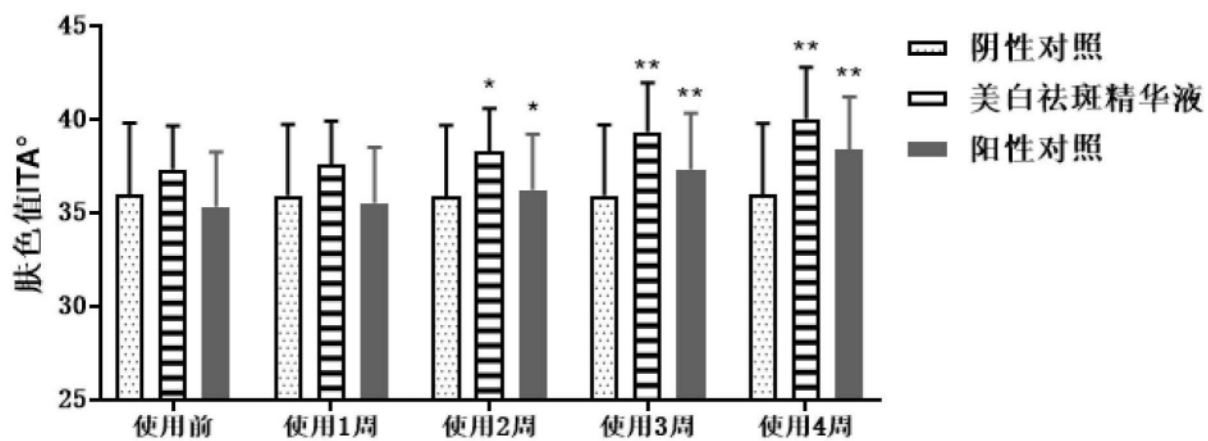


图8

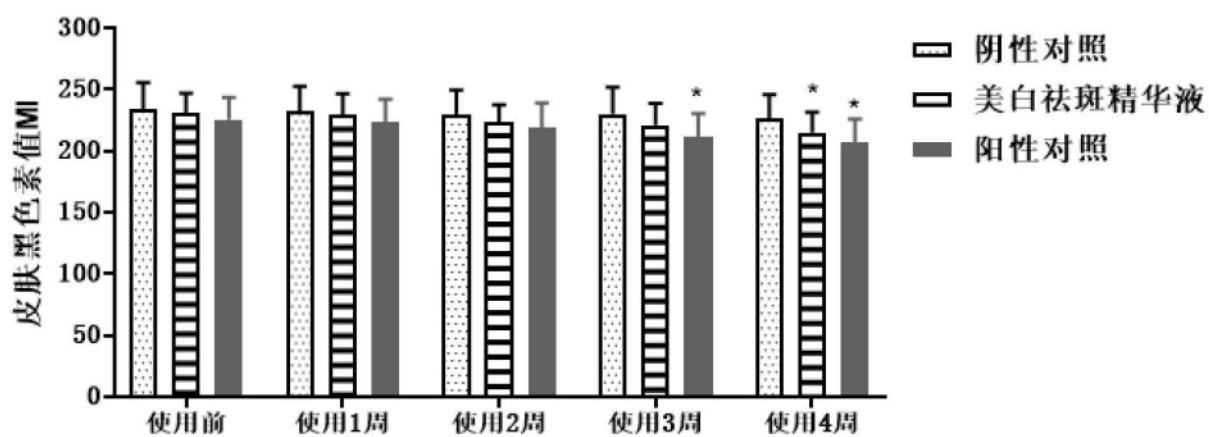


图9

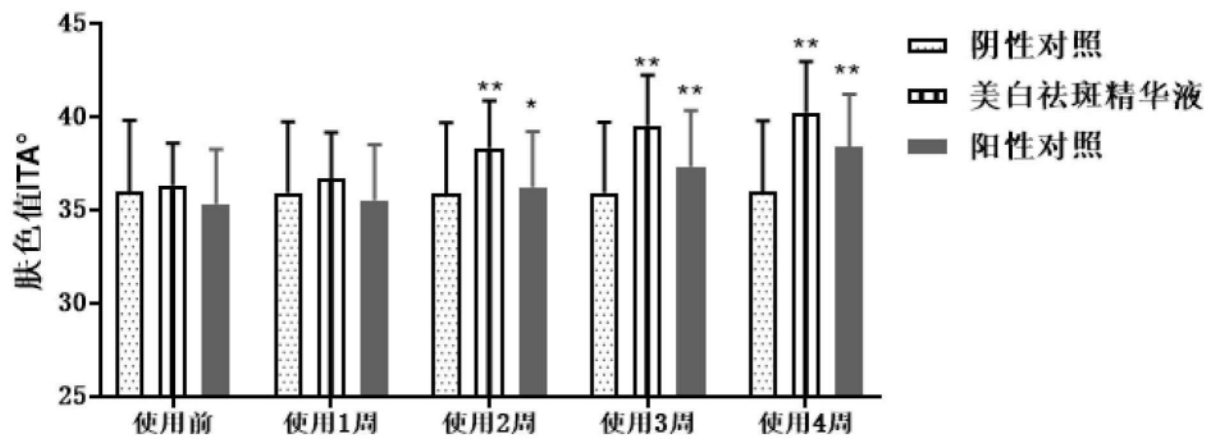


图10

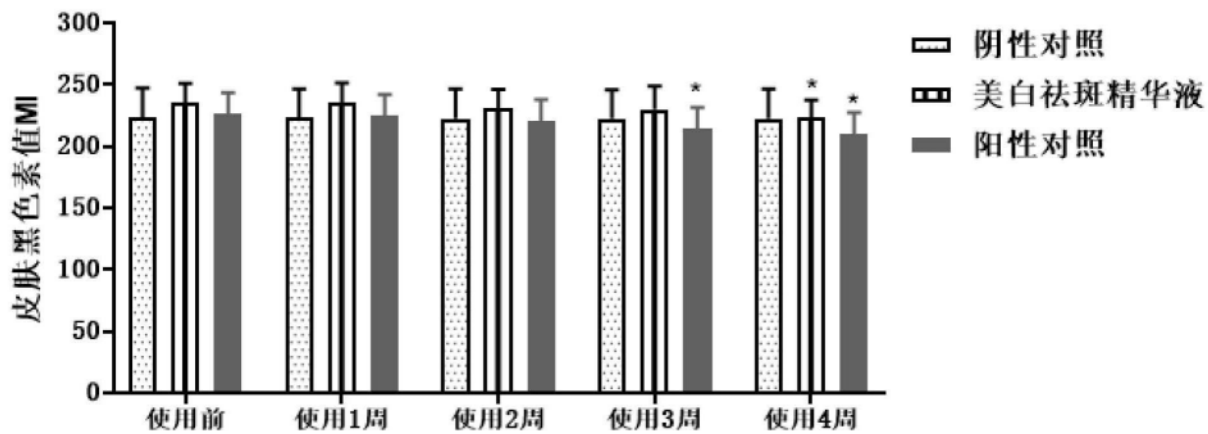


图11