



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 111956536 A

(43) 申请公布日 2020.11.20

(21) 申请号 202010429465.4 *A61Q 19/02* (2006.01)
(22) 申请日 2020.05.20 *A61K 36/185* (2006.01)
(30) 优先权数据 *A61P 29/00* (2006.01)
62/849,996 2019.05.20 US *A61P 37/04* (2006.01)
A61P 39/06 (2006.01)
(71) 申请人 百岳特生物技术(上海)有限公司 *A61P 17/00* (2006.01)
地址 201506 上海市金山区金山工业区金 *A23L 19/00* (2016.01)
舸路989号 *A23L 29/00* (2016.01)
(72) 发明人 林咏翔 李韶郁
(74) 专利代理机构 北京市立康律师事务所
11805
代理人 梁挥 曾学明
(51) Int. Cl.
A61K 8/9789 (2017.01)
A61Q 19/08 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书13页
序列表3页 附图6页

(54) 发明名称

刺果番荔枝发酵物在制备组合物中的用途

(57) 摘要

本发明提供一种刺果番荔枝发酵物在制备紧致肌肤、抗糖化、及基因调节的组合物中的用途。该刺果番荔枝发酵物通过以下步骤汁液制得：(a) 以水浸提刺果番荔枝果实而获得刺果番荔枝汁液；(b) 添加酿酒酵母至该刺果番荔枝汁液及进行发酵以获得第一中间发酵物；(c) 添加乳酸杆菌至该第一中间发酵物及进行发酵以获得第二中间发酵物；以及(d) 添加醋酸杆菌至该第二中间发酵物及进行发酵以获得该刺果番荔枝发酵物。该刺果番荔枝发酵物促进胶原蛋白紧致，抑制蛋白质糖化，促进特定基因的表达，及/或抑制黑色素生成相关基因MITF的表达，因此有助于推迟皮肤老化现象。

1. 一种刺果番荔枝发酵物在制备紧致肌肤及抗糖化的组合物中的用途,其中该刺果番荔枝发酵物通过以下步骤制得:

- (a) 以水浸提刺果番荔枝果实而获得刺果番荔枝汁液;
- (b) 添加酿酒酵母至该刺果番荔枝汁液及进行发酵以获得第一中间发酵物;
- (c) 添加乳酸杆菌至该第一中间发酵物及进行发酵以获得第二中间发酵物;以及
- (d) 添加醋酸杆菌至该第二中间发酵物及进行发酵以获得该刺果番荔枝发酵物。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中该乳酸杆菌为胚芽乳酸杆菌,且该醋酸杆菌为醋化醋酸杆菌。

3. 根据权利要求1所述的用途,其中该酿酒酵母进行发酵1至2天,该乳酸杆菌进行发酵1至2天,及该醋酸杆菌进行发酵4至6天。

4. 根据权利要求1所述的用途,其中该酿酒酵母的添加量为该刺果番荔枝汁液重量的0.02%至0.5%,该乳酸杆菌的添加量为该刺果番荔枝汁液重量的0.01至0.25%,及该醋酸杆菌的添加量为该刺果番荔枝汁液重量的1%至10%。

5. 根据权利要求1所述的用途,其中该刺果番荔枝与水的重量比为1:2至1:5。

6. 一种刺果番荔枝发酵物在制备基因调节的组合物中的用途,其中该刺果番荔枝发酵物通过以下步骤制得:

- (a) 以水浸提刺果番荔枝果实而获得刺果番荔枝汁液;
- (b) 添加酿酒酵母至该刺果番荔枝汁液及进行发酵以获得第一中间发酵物;
- (c) 添加乳酸杆菌至该第一中间发酵物及进行发酵以获得第二中间发酵物;以及
- (d) 添加醋酸杆菌至该第二中间发酵物及进行发酵以获得该刺果番荔枝发酵物;

且其中该基因调节促进编码伴随蛋白T复合体次单元6A (CCT6A)、伴随蛋白T复合体次单元8 (CCT8)、磷酸酶及张力蛋白同源物诱导激酶1 (PINK1)、端粒酶反转录酶 (TERT)、端粒酶核糖核酸组分 (TERC)、鞘磷脂磷酸二酯酶1 (SMPD1)、白介素-10 (IL-10)、或白介素-18 (IL-18) 的基因的表达量,及/或抑制编码黑色素生成基因编码小眼畸形相关转录因子 (MITF) 的基因的表达量。

7. 根据权利要求6所述的用途,其中该乳酸杆菌为胚芽乳酸杆菌,且该醋酸杆菌为醋化醋酸杆菌。

8. 根据权利要求6所述的用途,其中该酿酒酵母进行发酵1至2天,该乳酸杆菌进行发酵1至2天,及该醋酸杆菌进行发酵4至6天。

9. 根据权利要求6所述的用途,其中该酿酒酵母的添加量为该刺果番荔枝汁液重量的0.02%至0.5%,该乳酸杆菌的添加量为该刺果番荔枝汁液重量的0.01至0.25%,及该醋酸杆菌的添加量为该刺果番荔枝汁液重量的1%至10%。

10. 根据权利要求6所述的用途,其中该刺果番荔枝与水的重量比为1:2至1:5。

刺果番荔枝发酵物在制备组合物中的用途

技术领域

[0001] 本发明关于一种植物发酵物的美容及保健用途,特别关于一种刺果番荔枝发酵物在制备紧致肌肤、抗糖化、及基因调节的组合物中的用途。

现有技术

[0002] 皮肤提供个体对抗阳光中紫外线辐射、病原体、摩擦力等环境因子的第一阶段保护。皮肤由外向内依序包含表皮层、主要由结缔组织构成的真皮层、及皮下组织。表皮层包含最外侧的角质层并且不断更新。表皮层与真皮层间存在持续分裂的细胞,例如皮肤纤维母细胞(skin fibroblasts)、角质形成细胞(keratinocytes)、及黑色素细胞(melanocytes)。真皮层含有胶原蛋白(collagen)、弹性蛋白(elastin)、及玻尿酸(hyaluronic acid)等分子,其赋予肌肤弹性和支撑力量。随着年龄增长,皮肤会出现皱纹、细纹、松弛、凹陷、毛孔粗大等老化现象。这些皮肤老化现象的形成与诸多因素有关,原因之一是真皮层中的纤维母细胞施加于细胞外间质(extracellular matrix)的收缩力变弱,另一原因是具有正常功能的胶原蛋白与弹性蛋白的含量随年龄增加而减少。因此,皮肤抗老化的策略包括设法提升真皮层中结缔组织的紧致程度,以及减少健康的胶原蛋白与弹性蛋白流失。

[0003] 糖化反应(glycation)是导致皮肤丧失健康的胶原蛋白及弹性蛋白的原因之一。糖化反应是指还原糖的醛(酮)基与含胺基物质(例如蛋白质、核酸等)的胺基之间的一种非酶促反应,其最终生成糖化终产物(advanced glycated end products, AGEs)。糖化反应会影响胶原蛋白聚集形成纤维,而且糖化终产物修饰的胶原蛋白纤维变得僵硬而易脆。此外,糖化终产物累积于皮肤内细胞外间质会干扰周围细胞的增生、分化、移动、或基因表达,甚至会促进可分解胶原蛋白与弹性蛋白的基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase)生成,以及增加可引起发炎反应的细胞因子分泌。这些因素最终会促成皮肤老化。

[0004] 此外,在细胞层次,老化可能的内部机制包括染色体末端的端粒(telomere)缩短、蛋白质质量不良、粒线体功能下降等。因而,皮肤抗老化的标靶宜包括细胞内的端粒酶反应、粒线体活性、及蛋白质质量管控等。

[0005] 有鉴于此,开发一种能促进真皮层结缔组织紧致,抑制糖化反应,并且提升皮肤细胞自身抗老化能力的组合物,以维持皮肤的年轻状态,实有其必要。

发明内容

[0006] 因此,本发明的一个目的在提供一种刺果番荔枝(*Annona muricata*)发酵物在制备紧致肌肤及抗糖化的组合物中的用途,其中该刺果番荔枝发酵物通过以下步骤制得:(a)以水浸提刺果番荔枝果实而获得刺果番荔枝汁液而获得刺果番荔枝汁液,(b)添加酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)至该刺果番荔枝汁液及进行发酵以获得第一中间发酵物,(c)添加乳酸杆菌(*Lactobacillus* spp.)至该第一中间发酵物及进行发酵以获得第二中间发酵物,以及(d)添加醋化醋酸杆菌(*Acetobacter* spp.)至该第二中间发酵物及进行发酵

以获得该刺果番荔枝发酵物。

[0007] 在本发明的一个实施例中,该乳酸杆菌为胚芽乳酸杆菌 (*Lactobacillus plantarum*),且该醋酸杆菌为醋化醋酸杆菌 (*Acetobacter aceti*)。

[0008] 在本发明的一个实施例中,该酿酒酵母进行发酵1至2天,该乳酸杆菌进行发酵1至2天,及该醋酸杆菌进行发酵4至6天。

[0009] 在本发明的一个实施例中,该酿酒酵母的添加量为该刺果番荔枝汁液重量的0.02%至0.5%,该乳酸杆菌的添加量为该刺果番荔枝汁液重量的0.01至0.25%,及该醋酸杆菌的添加量为该刺果番荔枝汁液重量的1%至10%。

[0010] 在本发明的一个实施例中,该刺果番荔枝与水的重量比为1:2至1:5。

[0011] 本发明的另一目的在提供一种前述刺果番荔枝在制备基因调节的组合物中的用途。所述基因调节促进编码伴随蛋白T复合体(chaperonin containing TCP1 complex, CCT)次单元6A(CCT6A)、伴随蛋白T复合体次单元8(CCT8)、磷酸酶及张力蛋白同源物诱导激酶1(phosphatase and tensin homolog(PTEN)-induced putative kinase 1,PINK1)、端粒酶反转录酶(telomerase reverse transcriptase,TERT)、端粒酶核糖核酸组分(telomerase RNA component,TERC)、鞘磷脂磷酸二酯酶1(sphingomyelin phosphodiesterase 1,SMPD1)、白介素-10(interleukin 10,IL-10)、或白介素-18(interleukin 18,IL-18)的基因的表达量,及/或抑制编码小眼畸形相关转录因子(microphthalmia-associated transcription factor,MITF)的基因的表达量。

[0012] 本发明揭示经过特定发酵过程的刺果番荔枝发酵物具备促进胶原蛋白紧致与抑制蛋白质醱化的功效。此外,透过基因调节,刺果番荔枝发酵物能增加抗老化、皮肤保湿、抗发炎、及先天免疫力相关蛋白质的产生,并且降低黑色素生成相关蛋白的形成。因此,对个体施予有效量的刺果番荔枝发酵物有助于推迟皮肤老化现象,如皮肤松弛、干燥、皱纹、及黑斑,甚至有益于推迟个体老化过程及提升各体免疫力,增进成人健康。因此,刺果番荔枝发酵物可用于制备抑紧致肌肤及抗醱化的组合物,或可用于制备基因调节的组合物。该组合物可具有粉末、颗粒、溶液、胶体、或膏体的剂型,且可制成食品、饮品、营养补充剂、医药品、或保养品,通过口服或局部施用方式给予个体。

[0013] 以下将配合附图进一步说明本发明的实施方式,下述所列举的实施例用以阐明本发明的发明特点及应用,而非以限定本发明的范围,任何本领域技术人员,在不脱离本发明的精神和范围内,当可做些许更动与润饰,因此本发明的保护范围当视后附的申请专利范围所界定的范围为准。

附图说明

[0014] 图1显示含胶原蛋白固态胶体以刺果番荔枝汁液或本发明一实施例的刺果番荔枝发酵物处理后的相对直径(%)。

[0015] 图2显示刺果番荔枝汁液或本发明一实施例的刺果番荔枝发酵物对牛血清蛋白醱化的作用效果。

[0016] 图3显示人类皮肤纤维母细胞以刺果番荔枝汁液或本发明一实施例的刺果番荔枝发酵物处理24小时后,相对于对照组细胞的CCT6A、CCT8、PINK1、TERT、及TERC基因的相对表达量。

[0017] 图4显示人类外周血单核细胞以本发明一实施例的刺果番荔枝发酵物处理24小时后,相对于对照组细胞的SMPD1基因的相对表达量。

[0018] 图5显示人类外周血单核细胞以本发明一实施例的刺果番荔枝发酵物处理24小时后,相对于对照组细胞的MITF基因的相对表达量。

[0019] 图6显示人类单核细胞株以刺果番荔枝汁液或本发明一实施例的刺果番荔枝发酵物处理24小时后,相对于对照组细胞的IL-10基因的相对表达量。

[0020] 图7显示人类单核细胞株以刺果番荔枝汁液或本发明一实施例的刺果番荔枝发酵物处理24小时后,相对于对照组细胞的IL-18基因的相对表达量。

[0021] 图8显示刺果番荔枝汁液或本发明一实施例的刺果番荔枝发酵物中总多酚含量。

[0022] 图9显示受试者服用刺果番荔枝汁液或本发明一实施例的刺果番荔枝发酵物第0周与第4周后,脸部肌肤的紫外线色斑数量。

[0023] 图10显示受试者服用刺果番荔枝汁液或本发明一实施例的刺果番荔枝发酵物第0周与第4周后,脸部肌肤的含水量。

[0024] 图11显示受试者服用刺果番荔枝汁液或本发明一实施例的刺果番荔枝发酵物第0周与第4周后,脸部肌肤的皱纹数量。

[0025] 图12显示受试者服用刺果番荔枝汁液或本发明一实施例的刺果番荔枝发酵物第0周与第4周后,血液中谷胱甘肽S转移酶的活性。

[0026] 图13显示受试者服用刺果番荔枝汁液或本发明一实施例的刺果番荔枝发酵物第0周与第4周后,血液中IL-10基因的表达量。

具体实施方式

[0027] 本发明揭露一种刺果番荔枝发酵物,其经水浸提及三阶段发酵而制得,具体而言,该刺果番荔枝发酵物的制备利用酿酒酵母、乳酸杆菌、及醋酸杆菌对刺果番荔枝汁液依序进行发酵。以下实施例详细说明该刺果番荔枝发酵物具备促进胶原蛋白紧致、抑制蛋白质糖化、及基因调节等多种功效,其中该基因调节包括促进编码伴随蛋白T复合体(CCT)次单元6A(CCT6A)、伴随蛋白T复合体次单元8(CCT8)、磷酸酶及张力蛋白同源物诱导激酶1(PINK1)、端粒酶反转录酶(TERT)、端粒酶核糖核酸组分(TERC)、鞘磷脂磷酸二酯酶1(SMPD1)、白介素-10(IL-10)、或白介素-18(IL-18)的基因的表达量,及/或抑制编码小眼畸形相关转录因子(MITF)的基因的表达量。

[0028] 定义

[0029] 本文中所使用数值为近似值,所有实验数据皆表示在20%的范围内,优选为在10%的范围内,最优选为在5%的范围内。

[0030] 本文所述的刺果番荔枝发酵物是刺果番荔枝(*Annona muricata*)果实的发酵物。刺果番荔枝是番荔枝(*Annonaceae*)番荔枝属(*Annona*)的常绿乔木,别名罗李亮果。其果实呈心脏形且有芳香味,表面有刺状突起,果肉可食用。

[0031] 如本文中所使用的,用语“酿酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)”、“乳酸杆菌(*Lactobacillus spp.*)”以及“醋酸杆菌(*Acetobacter spp.*)”分别意欲涵盖那些本领域技术人员可易于获得的酿酒酵母菌、乳酸菌以及醋酸杆菌(例如,可购自国内或国外寄存机构),或者利用本领域中所惯用的微生物分离方法而从天然来源中所分离纯化出的酿酒酵

母菌、乳酸杆菌以及醋酸杆菌株。

[0032] 本文所述的医药组合物可利用本领域技术人员所详知的技术而制备成适合于非经肠地道 (parenterally) 或口服地 (orally) 投药的剂型 (dosage form), 其包括但不限于: 注射品 (injection) [例如, 无菌的水性溶液 (sterile aqueous solution) 或分散液 (dispersion)], 粉末 (sterile powder)、锭剂 (tablet)、片剂 (troche)、口含锭 (lozenge)、丸剂 (pill)、胶囊 (capsule)、分散性粉末 (dispersible powder)、细颗粒 (granule)、溶液、悬浮液 (suspension)、乳剂 (emulsion)、糖浆 (syrup)、酏剂 (elixir)、浓浆 (slurry) 以及类似之物。

[0033] 本文所述的医药组合物可包含广泛使用于药物制造技术的医药上可接受的载剂 (pharmaceutically acceptable carrier)。该医药上可接受的载剂可包含一或多种选自下列所构成的组中的试剂: 溶剂 (solvent)、乳化剂 (emulsifier)、悬浮剂 (suspending agent)、分解剂 (decomposer)、黏结剂 (binding agent)、赋形剂 (excipient)、安定剂 (stabilizing agent)、螯合剂 (chelating agent)、稀释剂 (diluent)、胶凝剂 (gelling agent)、防腐剂 (preservative)、润滑剂 (lubricant)、吸收延迟剂 (absorption delaying agent)、脂质体 (liposome) 以及类似之物。该些试剂的选用与数量落在本领域技术人员的专业素养与例行技术范畴内。

[0034] 前述医药上可接受的载剂可包含选自由下列所构成的组中的溶剂: 水、生理盐水 (normal saline)、磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffered saline, PBS)、含糖溶液、含醇水溶液 (aqueous solution containing alcohol)、及它们的组合。

[0035] 材料与方法

[0036] 微生物

[0037] 自食品工业发展研究所生物资源保存及研究中心 (Bioresource Collection and Research Center, BCRC) 购买酿酒酵母 (BCRC 20271)、胚芽乳酸杆菌 (BCRC910805)、及醋化醋酸杆菌 (BCRC 11688)。

[0038] 材料

[0039] 自 Thermo Fisher Scientific 公司购买含 Earle's 平衡盐溶液的 Eagle's 最低基本培养基 (Gibco Eagle's minimum essential medium, MEM)、RPMI 1640 培养基 (Gibco RPMI medium 1640)、胎牛血清 (Gibco fetal bovine serum, FBS)、青霉素/链霉素 (Gibco penicillin/streptomycin)、非必需氨基酸、碳酸氢钠、丙酮酸钠、磷酸缓冲盐溶液 (Gibco phosphate buffered saline, PBS)、及大鼠尾部第一型胶原蛋白 (Gibco)。自 Lonza 购买 X-VIVO 10 无血清培养基 (购自 Lonza, 编号 (BE) 04-380Q)。自 Sigma 公司购买氢氧化钠。自 J.T. Baker 公司购买 99.9% 冰醋酸。

[0040] 细胞培养

[0041] 以下实施例所用细胞包括购自食品工业发展研究所生物资源保存及研究中心 (Bioresource Collection and Research Center, BCRC) 的人类皮肤纤维母细胞 CCD-966SK (ATCC BCRC 60153), 购自美国典型培养物保存中心 (American Type Culture Collection, ATCC) 的人类单核细胞株 (human monocytic cell line) THP-1 (ATCC TIB-202), 及分离自捐赠者血液的人类外周血单核细胞 (peripheral mononuclear mononuclear cell, PBMC)。CCD-966SK 细胞在 37°C、5% 二氧化碳的条件下培养于添加 10%

FBS、0.1mM非必需氨基酸、1.5g/L碳酸氢钠、及1mM丙酮酸钠的MEM培养基,以下称MEM细胞培养基。THP-1细胞在37℃、5%二氧化碳的条件下培养于添加10%的FBS及1%的青霉素/链霉素的RPMI 1640培养基,以下称RPMI细胞培养基。外周血单核细胞在37℃、5%二氧化碳的条件下培养于X-VIVO10无血清培养基,以下称X-VIVO细胞培养基。

[0042] 胶原蛋白紧致试验(collagen contraction assay)

[0043] 本试验包含两部分。在第一部分,将0.2mL胶原蛋白溶液(含3mg/mL胶原蛋白的0.1%醋酸水溶液)加入含0.4mL MEM细胞培养基的1.6mL微量离心管,再立即加入1μL 1M氢氧化钠水溶液及混合所得混合物,而后使该混合物在室温固化20分钟。在另外的微量离心管重复前述步骤,但增加氢氧化钠水溶液的用量(如2μL、3μL及更多),直至确定产生固态胶体(约在中性pH,此时细胞培养中酚红指示剂呈粉红色)所需的氢氧化钠水溶液用量。

[0044] 在第二部分,在无菌状态下配制胶原蛋白溶液(含3mg/mL胶原蛋白的0.1%醋酸水溶液)及皮肤纤维母细胞悬浮液(含 1.5×10^5 个CCD-966SK细胞/mL的MEM培养基)。其后,将3.3mL的该胶原蛋白溶液加入6.6mL的该细胞悬浮液,再立即加入适当量的1M氢氧化钠水溶液及混合所得混合物,以获得即将固化的含有皮肤纤维母细胞的胶原蛋白胶体。将该胶体依500μL/孔迅速移入24孔培养盘,并在室温下静置20分钟即获致含有皮肤纤维母细胞的胶原蛋白固态胶体。将指定培养基依500μL/孔加入该24孔培养盘,并利用微量吸管使该固态胶体的边缘脱离对该24孔培养盘的黏附后,将该24孔培养盘置于培养箱内,在37℃、5%二氧化碳的湿润空气中隔夜培养,期间使用装设在该培养箱顶端的数字相机拍摄该固态胶体在培养开始及结束时的影像,以量测该固态胶体在不同时点的直径及计算其在指定处理后的相对直径。

[0045] 基因表达量分析

[0046] 目标基因的信息核糖核酸(mRNA)表达量的测定基于定量聚合酶链锁反应(quantitative polymerase chain reaction,简称qPCR),或基于核酸杂交技术。以下分述各目标基因表达量的测定方法。

[0047] 抗发炎及调节先天免疫力基因的表达

[0048] 人类单核细胞株THP-1中抗发炎及调节先天免疫力基因的表达量利用qPCR测定,其步骤简述如下。依据厂商使用说明,利用RNA提取试剂盒(RNA Extraction Kit;Geneaid)自经指定处理的细胞分离出RNA,在37℃下以反转录酶SuperScript[®] III Reverse Transcriptase(Invitrogen)将2000ng RNA反转录为互补脱氧核糖核酸(cDNA)。其后,利用qPCR套组(KAPA CYBR FAST qPCR Kit (2X);KAPA Biosystems)以及目标基因与作为内部对照的甘油醛3-磷酸脱氢酶(Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase,GAPDH)基因的引物对(表1)在PCR反应仪(Step One Plus Real-Time PCR system;Applied Biosystems)中对前述cDNA进行qPCR,并分析PCR产物的解链曲线(melting curve)。

[0049] 最终,使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法测定目标基因的相对表达量。所谓相对表达量定义为目标基因相对于对照组的相应基因的RNA表达量的倍数。该方法以GAPDH基因的循环阈值(C_T)作为内部对照的参考基因的循环阈值,按照以下公式计算倍数变化:

[0050] $\Delta C_T = \text{实验组或对照组的} C_T - \text{内部对照的} C_T$

[0051] $\Delta \Delta C_T = \text{实验组的} \Delta C_T - \text{对照组的} \Delta C_T$

[0052] 倍数变化 = $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 平均值

[0053] 统计分析使用Excel软件中的STDEV函数计算各基因相对表达量的标准偏差,并以单尾学生t检定(TTEST)判断数据间差异在统计上的显著性。

[0054] 表1

基因	正向引物(F)及反向引物(R)的核苷酸序列	SEQ ID NO
<i>IL-10</i>	F: TCAAGGCGCTGTGAATCC	1
	R: GATGTCAAACACTCACTCATGGCT	2
<i>IL-18</i>	F: TCTTCATTGACCAAGGAAATCGG	3
	R: TCCGGGGTGCATTATCTCTAC	4
<i>GAPDH</i>	F: CTGGGCTACACTGAGCACC	5
	R: AAGTGGTCGTTGAGGGCAATG	6

[0056] 抗老化基因的表达

[0057] 皮肤纤维母细胞CCD-966SK中抗老化基因的表达量利用qPCR测定,其步骤类似前述抗发炎基因表达的测定。抗老化基因及作为内部对照的GAPDH基因的引物对如表2所示。

[0058] 表2

基因	正向引物(F)及反向引物(R)的核苷酸序列	SEQ ID NO
<i>CCT6A</i>	F: TGGCCAGAACATCTCTTCGTACT	7
	R: AGTCCACTACAGCCTCTGTTAAGACA	8
<i>CCT8</i>	F: TCTTCATTGACCAAGGAAATCGG	9
	R: TCCGGGGTGCATTATCTCTAC	10
<i>PINK1</i>	F: CTGTGGTGGCTAGTGCTCCT	11
	R: TCCAGACGTGAGACAGTTGG	12
<i>TERT</i>	F: GGACTGCGCTTGGCTGCG	13
	R: GTCGGAAGCAGAGGTCAGGCA	14
<i>TERC</i>	F: AAGAGTTGGGCTCTGTCAGC	15
	R: GACTCGCTCCGTTCCCTCTTC	16
<i>GAPDH</i>	F: CTGGGCTACACTGAGCACC	5
	R: AAGTGGTCGTTGAGGGCAATG	6

[0061] 保湿及黑色素形成相关基因的表达

[0062] 外周血单核细胞中保湿及黑色素生成相关基因的表达量基于核酸杂交技术,利用NanoString多重基因单分子计数分析(NanoString nCounter analysis,简称nCounter分析)测定,其步骤简述如下。依据厂商使用说明,利用RNA提取试剂盒(RNA Extraction Kit;

Geneaid) 自经指定处理的细胞分离出RNA。其后,将75ng该RNA与目标基因的荧光条形码标记探针杂交,并利用纳米序列计数仪(NanoString nCounter;购自NanoString technologies公司,美国)对前述RNA进行直接计数。各目标基因的相对表达量以nSolver分析软件(nSolver™Analysis Software version 4.0)计算。

[0063] 总多酚含量的测定

[0064] 样品中总多酚含量以Folin-Ciocalteu比色法进行定量,其是利用多酚具有的抗氧化特性而进行的,该Folin-Ciocalteu比色法所用的试剂中,含有磷钨酸(Phosphotungstic acid)、及磷钼酸(Phosphomolybdic acid),其被多酚类物质还原(即由Mo6⁺变为Mo5⁺)后,会生成能够吸收750nm波长的光的蓝色的化合物,且该蓝色化合物在750nm的吸光值与待测物中总多酚的含量呈正比,因而可以用于定量待测物中总多酚的含量。

[0065] 在Folin-Ciocalteu比色法中,使用没食子酸(Gallic acid,购自Sigma,美国,编号为G7384)作为标准品,以制作吸光值对浓度的标准曲线。首先,精密称取10.0g的没食子酸置于10mL的容量瓶中,再加入ddH₂O至总体积达10mL,即完成没食子酸的标准品溶液(Gallic acid stock,1000μg/mL);接着,将该标准品溶液稀释10倍至浓度为100μg/mL(100μL的Gallic acid stock+900μL的ddH₂O,未使用完的Gallic acid stock则储存于-20℃下),接着将该100μg/mL的没食子酸进行系列稀释成0、20、40、60、80、及100μL/mL的没食子酸(如表3所示),并分别取100μL的各浓度的标准溶液至10mL的玻璃试管中,再分别加入500μL的Folin-Ciocalteu的酚试剂(购自Merck,德国,编号为1.09001.0500)混合均匀并静置3分钟后,加入400μL的7.5%的碳酸钠(Sodium carbonate,将7.5g的无水碳酸钠定量至100mL的ddH₂O中,其中该无水碳酸钠购自Sigma,美国,编号为31432)均匀混合后静置反应30-60分钟,优选为30分钟,再以震荡(Vortex)混合静置至确定无气泡后,分别取出200μL的各管反应溶液置于96孔培养板中,并测量其在750nm的吸光值,以绘制标准溶液的回归曲线公式。

[0066] 表3. 系列稀释没食子酸标准品的配方

浓度(μg/mL)	0	20	40	60	80	100
没食子酸的标准品溶液	0 μL	20 μL	40 μL	60 μL	80 μL	100 μL
ddH ₂ O	100 μL	80 μL	60 μL	40 μL	20 μL	10 μL

[0068] 肌肤紫外线色斑的测量

[0069] 以VISIA肌肤检测仪(CIS-VISIA.7 VISIA Complexion Analysis System, Canfield scientific,美国,序号V71214)进行全脸紫外线色斑检测,其使用高解析单眼相机搭配三种光源(全光谱波长、紫外光及偏光波域的光源)来拍摄脸部肌肤并取得清晰图文件后,利用专业软件进行紫外线色斑数量分析。

[0070] 肌肤含水量的测量

[0071] 以CKCutometer® dual MPA 580多探头肤质分析仪(CK electronic,德国)进行皮肤含水量的测定,其中利用电容测量来测量皮肤水合作用的状态,且利用探头按压皮肤来

进行测量。

[0072] 肌肤皱纹的测量

[0073] 以VISIA肌肤检测仪 (CIS-VISIA.7 VISIA Complexion Analysis System, Canfield scientific, 美国, 序号V71214) 进行全脸皱纹检测, 其使用高解析单眼相机搭配三种光源 (全光谱波长、紫外光及偏光波域的光源) 来拍摄脸部肌肤并取得清晰图文件后, 利用专业软件进行皱纹数量分析。

[0074] 谷胱甘肽S转移酶活性的测定

[0075] 其中, 谷胱甘肽S转移酶 (Glutathione S-transferase, GST) 活性利用GST-RBC生化比色法进行测定, 其中使用谷胱甘肽S转移酶测定试剂套组 (GTS assay kit, 购自abcam, 编号ab112132) 分析红血球细胞中谷胱甘肽S转移酶的活性, 其中将待测血液样品以该谷胱甘肽S转移酶测定试剂套组在室温下进行染色15分钟, 并以PBS清洗与回溶后, 置于流式细胞仪 (Accuri C6 Plus, BD) 中进行分析, 其中检测荧光信号为FL1 channel (Ex/Em=490/525nm), 并以该荧光信号作为红血球细胞中谷胱甘肽S转移酶的活性。

[0076] 实施例1

[0077] 刺果番荔枝发酵物的制备

[0078] 本文所述的刺果番荔枝发酵物是刺果番荔枝 (*Annona muricata*) 果实的发酵物, 其经水浸提及三阶段发酵而制得, 以下举例说明该发酵物的制备步骤。

[0079] 首先, 将刺果番荔枝的果实洗净及去皮, 以研磨、搅碎等方式破碎该果实以获得刺果番荔枝果泥, 再将刺果番荔枝果泥与水依1:2至1:5的重量比混合以进行浸提, 其中重量比优选为1:3。该浸提在60°C至100°C, 优选为80°C至95°C进行0.5至2小时以获得刺果番荔枝汁液。该浸提完成后, 添加5%至15% (w/w), 优选为8%至10% (w/w), 更优选为8% (w/w) 的葡萄糖至该刺果番荔枝汁液, 使其pH值约为3.5至3.7及白利糖度约为9.5至10.2, 其中pH值优选为3.56且白利糖度优选为9.7。

[0080] 经上述步骤所得刺果番荔枝汁液冷却至室温后用于三阶段发酵。各阶段的优选发酵条件如下:

[0081] 阶段一: 添加酿酒酵母 (BCRC 20271) 至该刺果番荔枝汁液, 并在25°C至35°C进行发酵1至2天以获得第一中间发酵物。该酿酒酵母的添加量为该刺果番荔枝汁液重量的0.02%至0.5% (w/w); 在本发明的一个优选实施例中, 以刺果番荔枝果泥与水依1:3的重量比例混合所得的刺果番荔枝汁液, 为计算该酿酒酵母的添加量。

[0082] 阶段二: 添加胚芽乳酸杆菌 (BCRC 910805) 至该第一中间发酵物, 并在25°C至35°C进行发酵1至2天以获得第二中间发酵物。该胚芽乳酸杆菌的添加量为该刺果番荔枝汁液重量的0.01%至0.25% (w/w); 在本发明的一优选实施例中, 以刺果番荔枝果泥与水依1:3的重量比例混合所得的刺果番荔枝汁液, 为计算该胚芽乳酸杆菌的添加量。

[0083] 阶段三: 添加醋化醋酸杆菌 (BCRC 11688) 至该第二中间发酵物, 并在25°C至35°C进行发酵4至6天以获得刺果番荔枝发酵物, 其pH值约为3.3至3.5及白利糖度约为1.8至2.5, 其中pH值优选为3.4且白利糖度优选为2。该醋化醋酸杆菌的添加量为该刺果番荔枝汁液重量的1%至10% (w/w); 在本发明的一优选实施例中, 以刺果番荔枝果泥与水依1:3的重量比例混合所得的刺果番荔枝汁液, 为计算该醋化醋酸杆菌的添加量。

[0084] 该刺果番荔枝发酵物可进一步在45°C至70°C进行减压浓缩而获得浓缩产物, 并可

透过200至400目(mesh)的滤网过滤以移除残余固体物。经过浓缩、过滤的刺果番荔枝发酵物可选择性地添加50至70% (w/w)、优选为60% (w/w) 异麦芽寡糖(白利糖度约为30至50、优选为40)。最终,经加工处理的刺果番荔枝发酵物在后续利用前在95℃至120℃灭菌70至90分钟。

[0085] 实施例2

[0086] 刺果番荔枝发酵物促进胶原蛋白紧致

[0087] 为探讨本发明刺果番荔枝发酵物的皮肤紧致效果,利用胶原蛋白紧致试验,评估含有皮肤纤维母细胞的胶原蛋白固态胶体以依据实施例1制得的刺果番荔枝发酵物处理后的尺寸变化,并使用如实施例1所载的刺果番荔枝汁液进行对比试验,其中以实施例1制备所得的本发明刺果番荔枝发酵物皆具有以下测试的功效。简言之,制备含有人类皮肤纤维母细胞CCD-966SK的胶原蛋白固态胶体,将其隔夜培养于含0.25mg/mL刺果番荔枝发酵物的500 μ L MEM细胞培养基、含0.25mg/mL刺果番荔枝汁液的500 μ L MEM细胞培养基、或单纯500 μ L MEM细胞培养基(对照组),并观察该固态胶体在培养开始及结束时的直径,以计算该固态胶体在不同处理后的相对直径。

[0088] 图1显示经前述不同处理的胶原蛋白固态胶体的相对直径,其以百分比表示固态胶体在培养结束时相对于培养开始时的直径比值;**表示相比对照组为 $p < 0.01$ 。依据图1,相比对照组胶体在隔夜培养后的相对直径约为75%,施予刺果番荔枝汁液使胶体的相对直径略减少至约68%。意外地,刺果番荔枝发酵物的处理使胶体的相对直径显著减少至约63%。此结果显示刺果番荔枝发酵物能有效增强皮肤纤维母细胞施于胶原蛋白胶体的收缩力,因此具备皮肤紧致及减少皮肤皱纹的效果。

[0089] 实施例3

[0090] 刺果番荔枝发酵物抑制蛋白质糖化

[0091] 身体内蛋白质的糖化反应会导致蛋白质结构改变与功能缺失,进而促进老化与相关疾病发生。为探讨本发明刺果番荔枝发酵物是否能抑制蛋白质糖化,利用抗糖化分析测定依实施例1制得的刺果番荔枝发酵物对牛血清蛋白(BSA)糖化的抑制作用,并使用如实施例1所载的刺果番荔枝汁液进行对比试验,其中以实施例1制备所得的本发明刺果番荔枝发酵物皆具有以下测试的功效。简言之,利用200mM磷酸盐缓冲溶液(pH 7.4)配制60mg/mL的胶原蛋白溶液(含0.06%叠氮化钠)及1.5M果糖溶液。为进行蛋白质糖化反应,将0.25mL胶原蛋白溶液与0.25mL果糖溶液的混合物与0.25mL的刺果番荔枝发酵物样品(浓度为500mg/mL)、刺果番荔枝汁液样品(浓度为500mg/mL)、或样品溶剂(对照组)均匀混合,在50℃反应24小时,再添加胺基胍(aminoguanidine, AG, 购自Sigma)以中止糖化反应。使用分光荧光计(spectrofluorometer, FLx 800, BioTek)测量前述反应液(0.1mL)在0小时与24小时的荧光强度(激发波长360nm, 放射波长460nm),并依下列公式计算蛋白质糖化终产物(AGEs)生成率: $[(\text{样品荧光强度}_{24\text{小时}} - \text{样品荧光强度}_{0\text{小时}}) / (\text{对照组荧光强度}_{24\text{小时}} - \text{对照组荧光强度}_{0\text{小时}})] \times 100\%$ 。

[0092] 图2显示前述职不同样品对牛血清蛋白糖化的抑制作用。依据图2,刺果番荔枝汁液无法抑制牛血清蛋白的糖化,然而刺果番荔枝发酵物显著减少糖化终产物生成约13%。此结果显示刺果番荔枝汁液因为本文所述发酵制成而转变为具备抑制蛋白质糖化的能力,因此有益于体内蛋白质维持正常功能,并且减少糖化终产物引起的氧化压力增加,进而推迟

老化的进展。例如,刺果番荔枝发酵物可通过抑制胶原蛋白及弹力蛋白的糖化而减少皮肤中具正常功能的胶原蛋白及弹力蛋白的流失,亦可降低皮肤细胞的氧化压力,因此推迟皮肤老化。

[0093] 实施例4

[0094] 刺果番荔枝发酵物促进抗老化基因的表达

[0095] 为探讨本发明刺果番荔枝发酵物对皮肤细胞抗老化能力的影响,以qPCR测定人类皮肤纤维母细胞CCD-966SK以依实施例1制得的刺果番荔枝发酵物处理后,其抗老化相关蛋白质的基因表达量变化。同时,使用如实施例1所载的刺果番荔枝汁液进行对比试验。该抗老化相关蛋白质包括伴随蛋白T复合体(CCT)次单元如CCT6A及CCT8、磷酸酶及张力蛋白同源物诱导激酶1(PINK1)、端粒酶反转录酶(TERT)、及端粒酶核糖核酸组分(TERC),其中以实施例1制备所得的本发明刺果番荔枝发酵物皆具有以下测试的功效。简言之,将CCD-966SK细胞依 1.5×10^5 个细胞/孔接种于六孔培养盘,各孔含有2mL MEM细胞培养基。在37°C培养细胞24小时后,移除该细胞培养基并以PBS溶液清洗细胞。其后,以含40mg/mL刺果番荔枝发酵物的2mL MEM细胞培养基(实验组1)、含40mg/mL刺果番荔枝汁液的2mL MEM细胞培养基(实验组2)、或者单纯以2mL MEM细胞培养基(对照组)处理细胞。前述三组细胞在37°C培养24小时后用于qPCR分析。

[0096] 图3显示前述三组细胞中CCT6A、CCT8、PINK1、TERT、及TERC基因的相对表达量;*及**分别表示相比对照组为 $p < 0.05$ 及 $p < 0.01$ 。依据图3,相比对照组,刺果番荔枝汁液的处理对CCT6A、CCT8、PINK1、TERT、及TERC基因的表达无显著影响。然而,刺果番荔枝发酵物的处理使CCT6A、CCT8、PINK1、TERT、及TERC基因的表达量显著增加。鉴于先前研究指出伴随蛋白T复合体协助蛋白质正常折叠,PINK1促进老化粒线体更新,TERT及TERC参与端粒酶反应以延长端粒,图3所示数据显示刺果番荔枝发酵物能通过促进CCT6A、CCT8、PINK1、TERT、及TERC等多种抗老化基因的表达,使皮肤纤维母细胞持续保有分裂能力,并且改善皮肤细胞的蛋白质质量与粒线体活性,因此有助于维持皮肤细胞的活力及推迟肌肤老化。

[0097] 实施例5

[0098] 刺果番荔枝发酵物促进保湿基因的表达且抑制黑色素生成相关基因的表达

[0099] 为探讨本发明刺果番荔枝发酵物对皮肤保湿及黑色素生成的影响,利用n-Counter分析测定人类外周血单核细胞(PBMC)依实施例1制得的刺果番荔枝发酵物处理后,其保湿与黑色素生成相关蛋白的基因表达量变化。该保湿相关蛋白包括鞘磷脂磷酸二酯酶1(SMPD1);该黑色素生成相关蛋白质包括小眼畸形相关转录因子(MITF),其中以实施例1制备所得的本发明刺果番荔枝发酵物皆具有以下测试的功效。简言之,将细胞依 1×10^5 个细胞/孔接种于六孔培养盘,各孔含有2mL X-VIVO 10细胞培养基。在37°C培养细胞24小时后,移除该细胞培养基并以细胞裂解液(Geneaid)收集细胞。其后,以含5mg/mL刺果番荔枝发酵物的2mL X-VIVO 10细胞培养基(实验组)或者单纯以2mL X-VIVO10细胞培养基(对照组)处理细胞。该两组细胞在37°C培养24小时后用于nCounter分析。

[0100] 图4显示前述二组细胞中SMPD1基因的相对表达量;***表示相比对照组为 $p < 0.001$ 。依据图4,相比对照组,以刺果番荔枝发酵物处理细胞24小时显著提升SMPD1基因的表达量约155%,显示刺果番荔枝发酵物能促进细胞产出角质层脂质主要成分之一的神经酰胺(ceramide),因此提升皮肤的角质层屏障力及减少皮肤中水分散失,进而避免皮肤干燥与

松弛。

[0101] 图5显示前述二组细胞中MITF基因的相对表达量；***表示相比对照组为 $p < 0.001$ 。依据图5，相比对照组，刺果番荔枝发酵物的处理显著抑制MITF基因的表达量约62%。此结果说明刺果番荔枝发酵物能通过抑制黑色素生成相关蛋白质的形成而达到皮肤美白效果。

[0102] 实施例6

[0103] 刺果番荔枝发酵物促进抗发炎及调节先天免疫力基因的表达

[0104] 为探讨本发明刺果番荔枝发酵物对个体免疫状态的影响，以qPCR测定人类外周血单核细胞(PBMC)以依实施例1制得的刺果番荔枝发酵物处理后，其免疫调节细胞激素的基因表达量变化。同时，使用如实施例1所载的刺果番荔枝汁液进行对比试验。该免疫调节细胞激素包括白介素-10(IL-10)及白介素-18(IL-18)，其中以实施例1制备所得的本发明刺果番荔枝发酵物皆具有以下测试的功效。简言之，将人类外周血单核细胞依 1×10^5 个细胞/孔接种于6孔盘，各孔含有2mL RPMI细胞培养基。在37℃培养细胞24小时后，移除该细胞培养基并以PBS溶液清洗细胞。其后，以含40mg/mL刺果番荔枝发酵物的2mL RPMI细胞培养基(实验组1)、含40mg/mL刺果番荔枝汁液的2mL RPMI细胞培养基(实验组2)、或者单纯以2mL RPMI细胞培养基(对照组)处理细胞。前述三组细胞在37℃培养24小时后用于qPCR分析。

[0105] 图6及图7分别显示前述三组细胞中IL-10及IL-18基因的相对表达量；*表示相比对照组为 $p < 0.05$ 。依据图6，相比对照组，刺果番荔枝汁液的处理略为抑制抗发炎基因IL-10的表达。相对地，刺果番荔枝发酵物的处理使IL-10基因的表达量上调约80%。此结果说明刺果番荔枝发酵物能通过促进抗发炎细胞激素IL-10的合成而避免过度发炎造成的身体损伤。

[0106] 依据图7，相比对照组，刺果番荔枝汁液的处理对IL-18基因的表达无显著影响，但刺果番荔枝发酵物的处理使IL-18基因的表达量显著上调约50%。鉴于IL-18的作用之一是促进自然杀手细胞的活性，此结果说明刺果番荔枝发酵物有提升个体先天免疫力的潜力。

[0107] 实施例7

[0108] 刺果番荔枝发酵物中总多酚含量的提升

[0109] 为探讨本发明三阶段发酵制程对刺果番荔枝发酵物中活性成分的影响，使用Folin-Ciocalteu比色法测定依实施例1制得的刺果番荔枝发酵物中总多酚的含量，同时使用相同方法测定如实施例1所载的刺果番荔枝汁液中总多酚的含量以进行对比试验，其中以实施例1制备所得的本发明刺果番荔枝发酵物皆具有以下测试的功效。简言之，分别将该刺果番荔枝汁液、及本发明的刺果番荔枝发酵物直接与水以1:5的重量比进行稀释，接着分别取100μL的该刺果番荔枝汁液的稀释液、及本发明的刺果番荔枝发酵物的稀释液于不同10mL的玻璃试管中，再以前述Folin-Ciocalteu比色法测定该刺果番荔枝汁液、及本发明的刺果番荔枝发酵物中总多酚的浓度。

[0110] 依据图8，刺果番荔枝汁液仅含有约18μg/mL的总多酚含量，而本发明的金银花发酵物中总多酚含量却显著的高达约52μg/mL，为刺果番荔枝汁液的约3倍。此结果显示，本发明的三段式发酵制成可显著提高本发明刺果番荔枝发酵物中总多酚的含量，以达到提升功效成份，增强保健抗氧化功效的目的。

[0111] 实施例8

[0112] 刺果番荔枝发酵物减少人体脸部肌肤的紫外线色斑

[0113] 为探讨本发明刺果番荔枝发酵物在人体验证中,实际对肌肤产生的美白功效,使用肤质检测仪测定依实施例1制得的刺果番荔枝发酵物作用后,人体肌肤的紫外线色斑的淡化程度,其中以实施例1制备所得的本发明刺果番荔枝发酵物皆具有以下测试的功效。简言之,募集8位年龄介于30-55岁的肌肤欠佳的成年人为受试者,每日服用6mL的本发明的刺果番荔枝发酵物,并分别在服用前、及服用28日后,以前述肌肤紫外线色斑的测量方法,分别测量该些受试者的肌肤。其中,以使用前紫外线色斑数量为100%,相对于使用前所得出的百分比,为使用后的改善状况百分比。

[0114] 依据图9,服用本发明的刺果番荔枝发酵物后,比服用前显著地减少5.9%的皮肤紫外线色斑,且改善率高达88.9%(结果未显示),此结果显示本发明的刺果番荔枝发酵物能有效减少皮肤紫外线色斑,具有肌肤色的淡斑美白的功效。

[0115] 实施例9

[0116] 刺果番荔枝发酵物提升人体脸部肌肤的含水量

[0117] 为探讨本发明刺果番荔枝发酵物在人体验证中,实际对肌肤产生的保湿功效,使用多探头肤质分析仪测定依实施例1制得的刺果番荔枝发酵物作用后,人体肌肤的含水量提升的程度,其中以实施例1制备所得的本发明刺果番荔枝发酵物皆具有以下测试的功效。简言之,募集8位年龄介于30-55岁的肌肤欠佳的成年人为受试者,每日服用6mL的本发明的刺果番荔枝发酵物,并分别在服用前、及服用28日后,以前述肌肤含水量的测量方法,分别测量该些受试者的肌肤。其中,以使用前肌肤含水量为100%,相对于使用前所得出的百分比,为使用后的提升状况百分比。

[0118] 依据图10,服用本发明的刺果番荔枝发酵物后,比服用前显著地提升肌肤含水量,且改善率高达88.9%(结果未显示),此结果显示本发明的刺果番荔枝发酵物能确实具有肌肤保湿的功效。

[0119] 实施例10

[0120] 刺果番荔枝发酵物减少人体脸部肌肤的皱纹

[0121] 为探讨本发明刺果番荔枝发酵物在人体验证中,实际对肌肤产生的抗老化功效,使用肤质检测仪测定依实施例1制得的刺果番荔枝发酵物作用后,人体肌肤的皱纹的改善程度,其中以实施例1制备所得的本发明刺果番荔枝发酵物皆具有以下测试的功效。简言之,募集8位年龄介于30-55岁的肌肤欠佳的成年人为受试者,每日服用6mL的本发明的刺果番荔枝发酵物,并分别在服用前、及服用28日后,以前述肌肤皱纹的测量方法,分别测量该些受试者的肌肤。其中,以使用前皱纹数量为100%,相对于使用前所得出的百分比,为使用后的改善状况百分比。

[0122] 依据图11,服用本发明的刺果番荔枝发酵物后,比服用前显著地减少肌肤皱纹的数量,此结果显示本发明的刺果番荔枝发酵物能有效减少皮肤的皱纹,具有肌肤抗老化的功效。

[0123] 实施例11

[0124] 刺果番荔枝发酵物减少人体血液中的谷胱甘肽S转移酶

[0125] 谷胱甘肽S转移酶(Glutathione S-transferase,GST)广泛存在于哺乳动物各组织中,用以催化谷胱甘肽(Glutathione,GSH)与化学物质的亲电子基团进行结合,最终形成硫醚氨酸排出体外,在体内解毒的功能上起重要作用。GSH-ST具有消除体内过氧化物及解

毒的双重功能。其中,谷胱甘肽S转移酶在谷胱甘肽过氧化物酶 (Glutathione peroxide, GSH-PX) 活力低下的条件下,只有清除体内脂质过氧化物 (Lipid peroxide, LPO) 的功能。

[0126] 为探讨本发明刺果番荔枝发酵物实际在提升人体抗氧化及免疫力的功效,使用生化比色法测定依实施例1制得的刺果番荔枝发酵物作用后,人体血球细胞中谷胱甘肽S转移酶的活性,其中以实施例1制备所得的本发明刺果番荔枝发酵物皆具有以下测试的功效。简言之,募集8位年龄介于30-55岁的免疫力欠佳的成人为受试者,每日服用6mL的本发明的刺果番荔枝发酵物,并分别在服用前、及服用28日后,分别将受试者血液中的红血球细胞以红血球分离液进行分离,并将该经分离的受试者血液以PBS调整至 10^6 cells/mL后,以前述谷胱甘肽S转移酶活性的测定方法,分别测量该些受试者血液中谷胱甘肽S转移酶的活性。其中,以使用前谷胱甘肽S转移酶的活性为1,使用后所得出的数值为使用前的倍数。

[0127] 依据图12,服用本发明的刺果番荔枝发酵物后,受试者血液中谷胱甘肽S转移酶的活性,比服用前显著地提升17%,且改善率高达100% (结果未显示),此结果显示本发明的刺果番荔枝发酵物能有效提升抗氧化与免疫力的指标酵素,确实具有提升人体中整体抗氧化及免疫力的功效。

[0128] 实施例12

[0129] 刺果番荔枝发酵物提升人体血液中抗发炎基因的表达

[0130] 为探讨本发明刺果番荔枝发酵物实际在提升人体抗发炎的功效,以qPCR测定人体中人类外周血单核细胞以实施例1制得的刺果番荔枝发酵物作用后,其免疫调节的细胞激素的基因表达量变化,其中以实施例1制备所得的本发明刺果番荔枝发酵物皆具有以下测试的功效。简言之,募集8位年龄介于30-55岁的免疫力欠佳的成人为受试者,每日服用6mL的本发明的刺果番荔枝发酵物,并分别在服用前、及服用28日后,分别将受试者血液中的人类外周血单核细胞以淋巴球分离液进行分离,并将该经分离的受试者血液以PBS调整至 10^6 cells/mL后,用于前述qPCR分析以定量该人类外周血单核细胞中IL-10基因的表达量。

[0131] 依据图13,显示前述三组细胞中IL-10基因的相对表达量;*表示相比对照组为 $p < 0.05$ 。其中,相比服用前对照组,服用本发明的刺果番荔枝发酵物后,受试者血液中IL-10基因的表达量,比服用前显著地提升13.5%,且改善率高达77.8% (结果未显示),此结果说明刺果番荔枝发酵物能通过促进抗发炎细胞激素IL-10的合成而避免过度发炎造成的身体损伤。

[0132] 综上所述,上述实验数据显示经过特定发酵过程的刺果番荔枝发酵物具备促进胶原蛋白紧致与抑制蛋白质糖化的功效。此外,透过基因调节,刺果番荔枝发酵物能增加抗氧化、皮肤保湿、抗发炎、及先天免疫力相关蛋白质的产生,并且降低黑色素生成相关蛋白的形成。因此,对个体施予有效量的刺果番荔枝发酵物有助于推迟皮肤老化现象,如皮肤松弛、干燥、皱纹、及黑斑,甚至有益于推迟个体老化过程及提升个体免疫力,增进成人健康。因此,刺果番荔枝发酵物可用于制备抑紧致肌肤及抗糖化的组合物,或可用于制备基因调节的组合物。该组合物可具有粉末、颗粒、溶液、胶体、或膏体的剂型,且可制成食品、饮品、营养补充剂、医药品、或保养品,通过口服或局部施用方式给予个体。

序列表

	<110> 百岳特生物技术(上海)有限公司	
	<120> 刺果番荔枝发酵物在制备组合物中的用途	
	<160> 16	
	<170> PatentIn version 3.5	
	<210> 1	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213>	
	<400> 1	
	tcaaggcgct gtgaatcc	18
	<210> 2	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213>	
[0001]	<400> 2	
	gatgtcaaac tcactcatgg ct	22
	<210> 3	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213>	
	<400> 3	
	tcttcattga ccaaggaaat cgg	23
	<210> 4	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213>	
	<400> 4	
	tccggggtgc attatctcta c	21
	<210> 5	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213>	

	<400> 5 ctgggctaca ctgagcacc	19
	<210> 6 <211> 21 <212> DNA <213>	
	<400> 6 aagtggctcgt tgagggcaat g	21
	<210> 7 <211> 23 <212> DNA <213>	
	<400> 7 tggccagaac atctctcgt act	23
[0002]	<210> 8 <211> 26 <212> DNA <213>	
	<400> 8 agtccactac agcctctggt aagaca	26
	<210> 9 <211> 23 <212> DNA <213>	
	<400> 9 tcttcattga ccaaggaaat cgg	23
	<210> 10 <211> 21 <212> DNA <213>	
	<400> 10 tccggggtgc attatctcta c	21

	<210> 11	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213>	
	<400> 11	
	ctgtggtggc tagtgcct	20
	<210> 12	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213>	
	<400> 12	
	tccagacgtg agacagttgg	20
	<210> 13	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213>	
[0003]	<400> 13	
	ggactgcgct tggctgcg	18
	<210> 14	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213>	
	<400> 14	
	gtcgggaagca gaggtcaggc a	21
	<210> 15	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213>	
	<400> 15	
	aagagttggg ctctgcagc	20
	<210> 16	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213>	
[0004]	<400> 16	
	gactcgctcc gttcctcttc	20

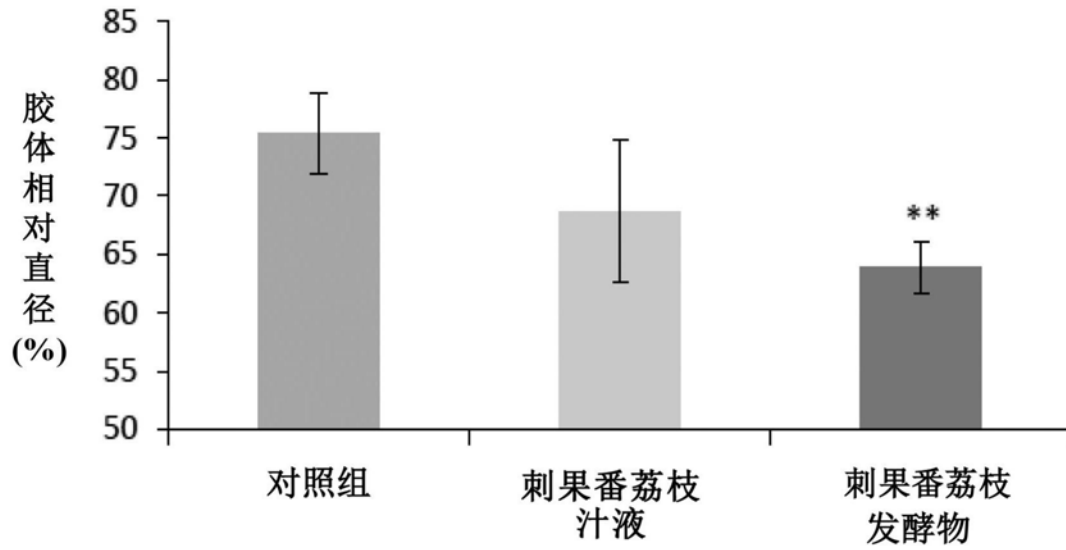


图1

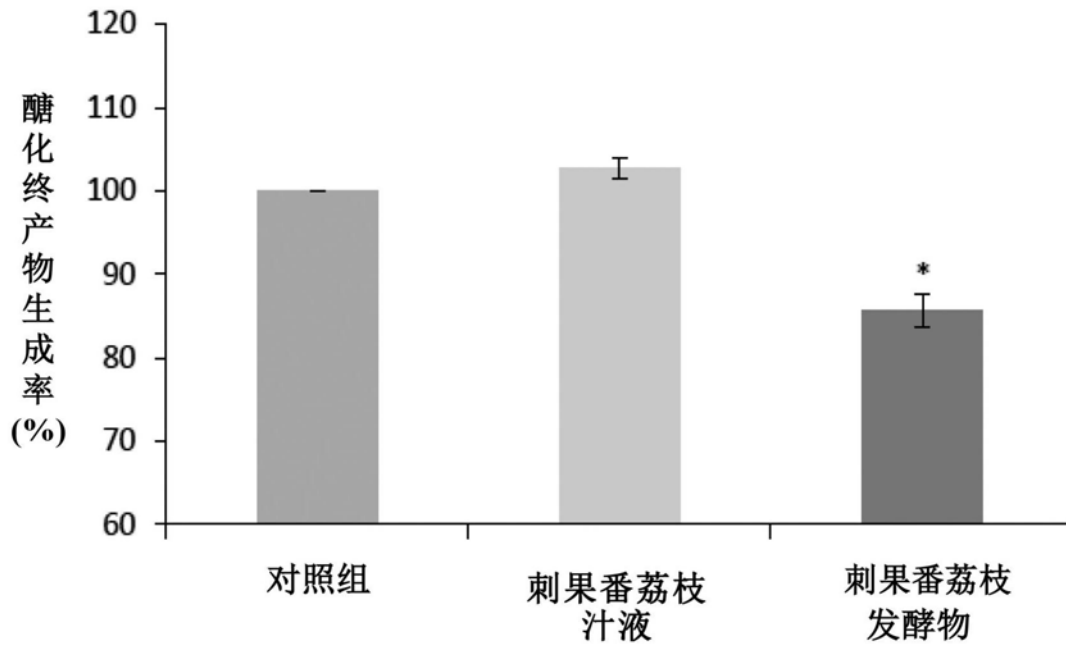


图2

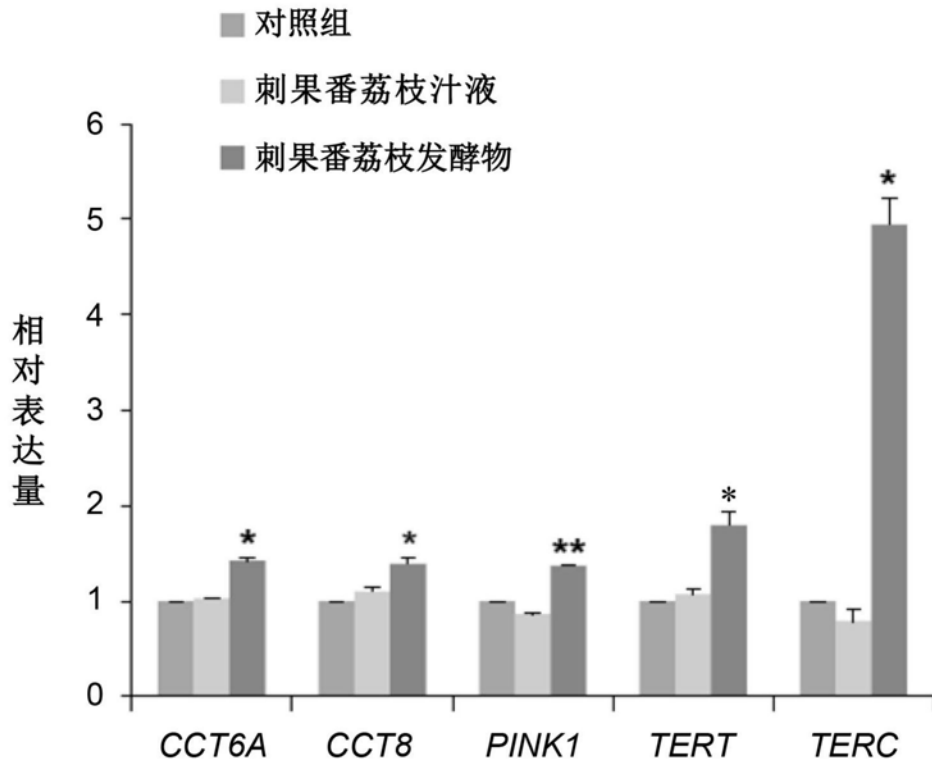


图3

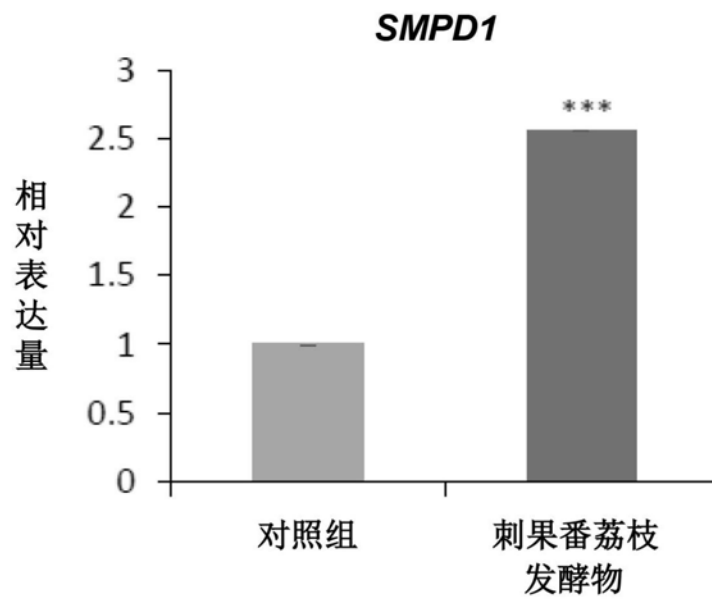


图4

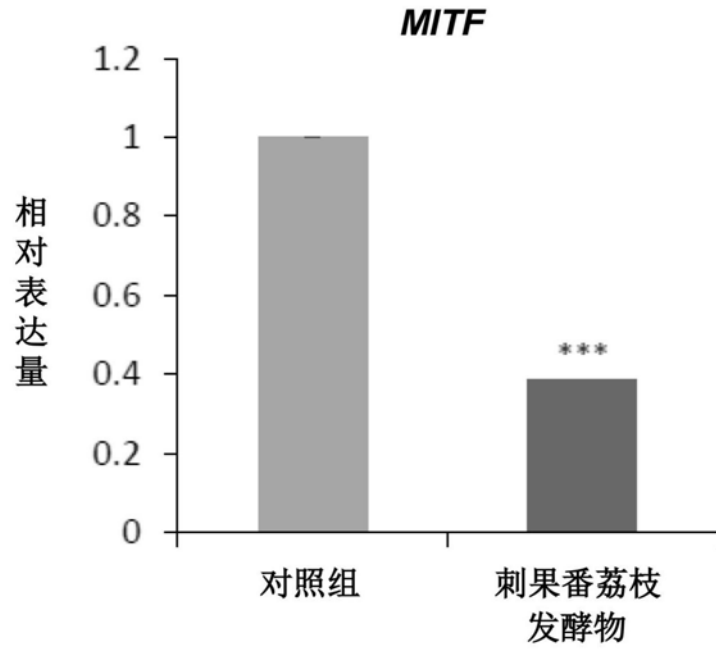


图5

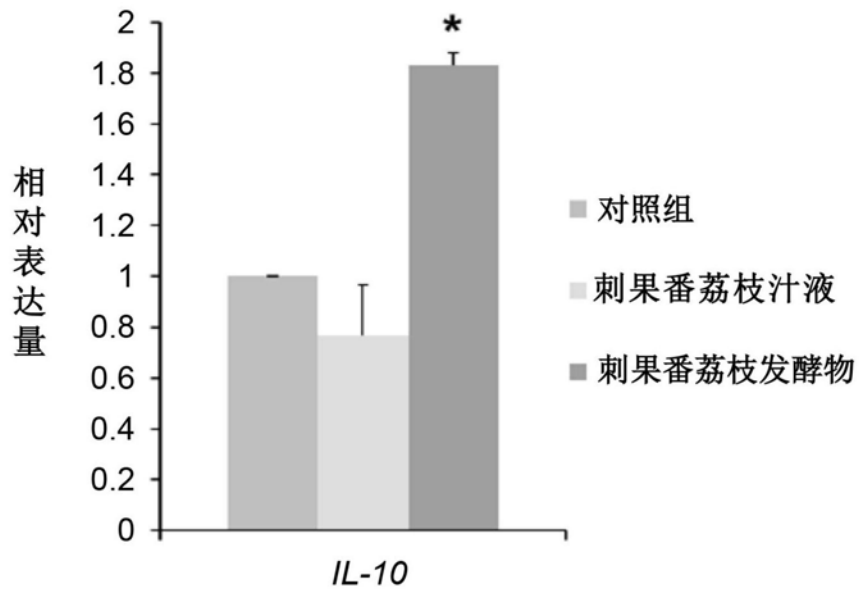


图6

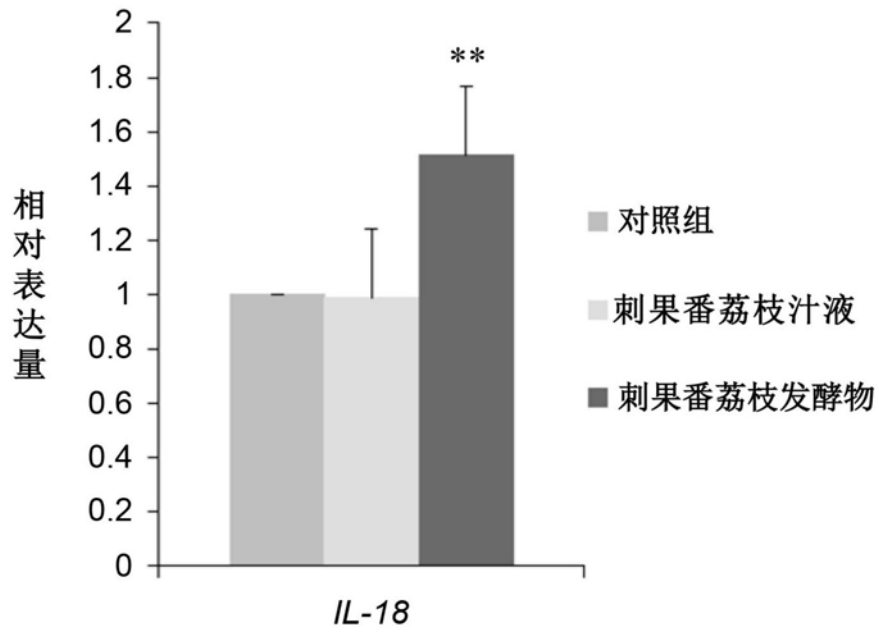


图7

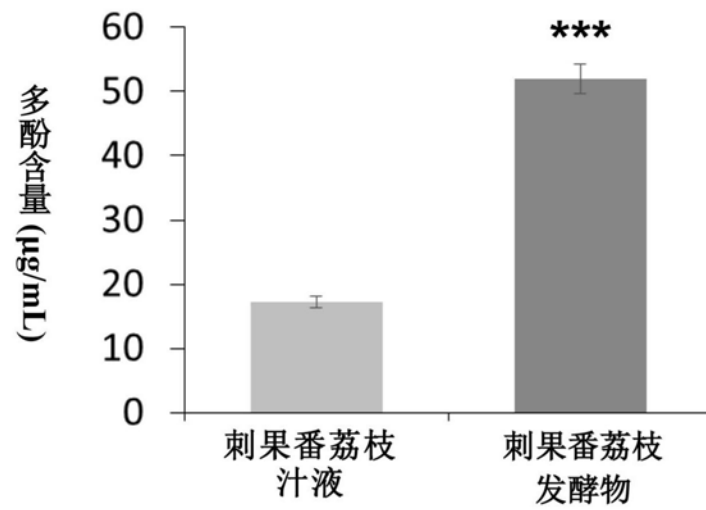


图8

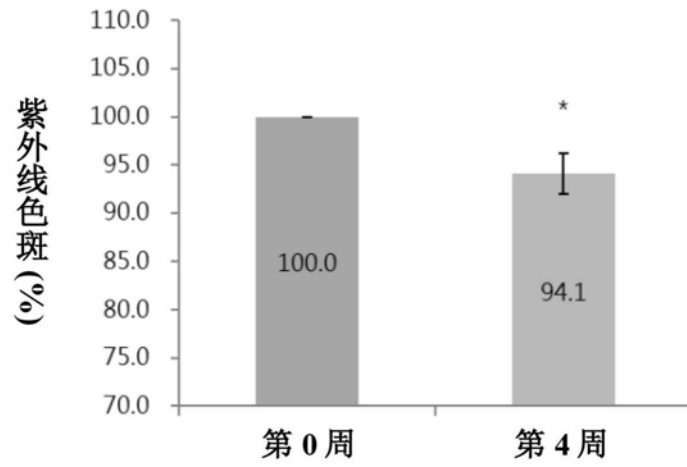


图9

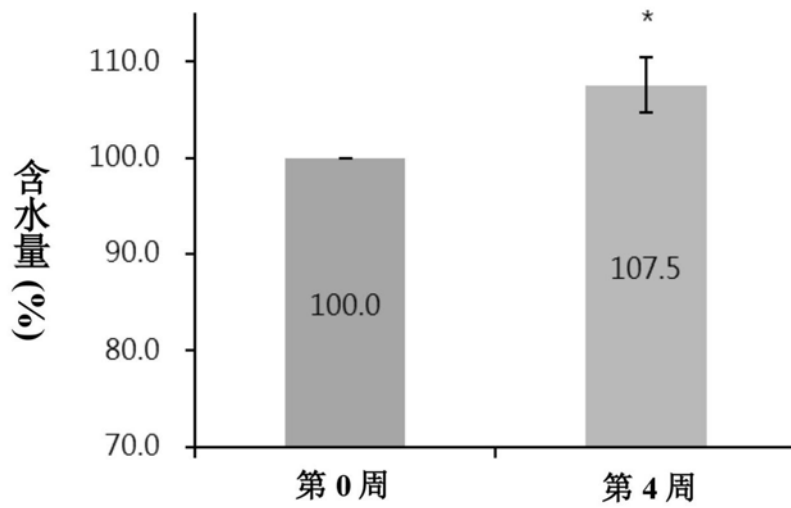


图10



图11

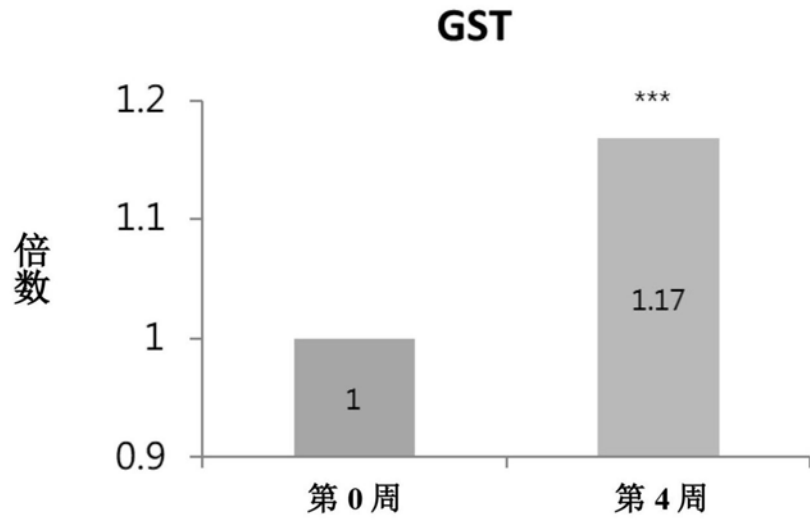


图12

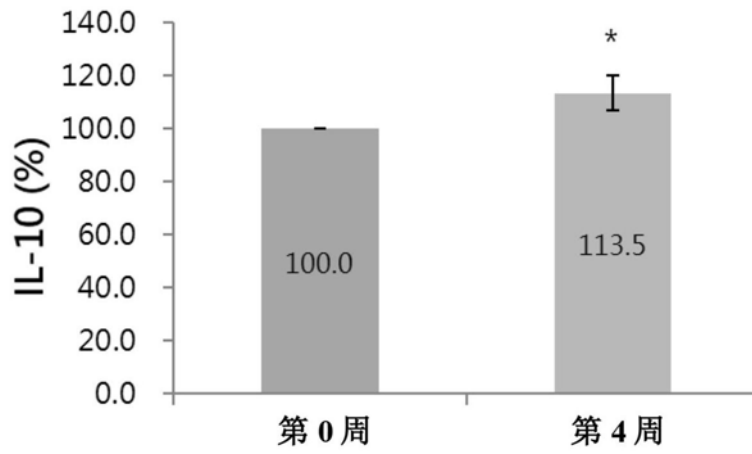


图13