

## 黄花菜发酵液的化妆品功效评价

闫雅倩<sup>1</sup>, 张玉芝<sup>1</sup>, 付豪<sup>1</sup>, 张雨萱<sup>1</sup>, 王冬冬<sup>1</sup>,  
杨丽<sup>2\*</sup>, 李萌<sup>1\*</sup>, 王昌涛<sup>1</sup>

(1. 北京工商大学 化学与材料工程学院 北京市植物资源研究开发重点实验室, 北京 100048; 2. 北京中德联合化妆品研究所有限公司, 北京 100048)

**摘要:** 使用植物乳杆菌和酿酒酵母菌发酵制得了两种黄花菜发酵液, 考察了样品对 HaCaT 细胞存活率的影响, 分析了其抗炎性功效、抗氧化功效、美白功效、安全性功效。结果表明, 与水提液 (空白对照) 相比, 两种发酵液的抗氧化能力更强。在细胞水平上, 两种黄花菜发酵液均表现出对 UVB 诱导损伤细胞的修复作用, 相对于经过 UVB 照射后的细胞模型组, 细胞 I 型胶原蛋白 (COL-I)、过氧化氢酶 (CAT) 活力均提高。两种黄花菜发酵液的酪氨酸酶活性抑制率远高于水提液, 表现出良好的美白效果。通过 HaCaT 细胞中炎症因子 IL-6、TNF- $\alpha$  和 COX-2 表达量可以看出, 样品组中炎症因子的表达量显著低于模型组, 说明黄花菜发酵液的抗炎性能力大于水提液。通过鸡胚绒毛尿囊膜实验 (HET-CAM) 可以得出, 样品作用其前后均无出血现象, 表明黄花菜发酵液无刺激性。

**关键词:** 黄花菜; 发酵; 抗炎性; 美白性; 医药与日化原料

**中图分类号:** TQ630; TQ658 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214 (2023) 05-1073-09

## Cosmetic efficacy evaluation of *Hemerocallis citrina* Baroni fermentation broth

YAN Yaqian<sup>1</sup>, ZHANG Yuzhi<sup>1</sup>, FU Hao<sup>1</sup>, ZHANG Yuxuan<sup>1</sup>, WANG Dongdong<sup>1</sup>,  
YANG Li<sup>2\*</sup>, LI Meng<sup>1\*</sup>, WANG Changtao<sup>1</sup>

(1. Beijing Key Laboratory of Plant Resources Research and Development, College of Chemistry and Materials Engineering, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China; 2. Beijing Sino-German Joint Cosmetic Research Institute Co. Ltd., Beijing 100048, China)

**Abstract:** Two kinds of daylily broth fermented by *Lactobacillus plantarum* and *Saccharomyces cerevisiae*, respectively, were synthesized, and their influence on the survival rate of HaCaT cells as well as their anti-inflammatory, antioxidant, whitening and safety effects were investigated and analyzed. The results showed that compared with the water extract (blank control), the two kinds of daylily fermentation broth exhibited stronger antioxidant capacity. Both broth samples displayed repair effect on UVB-induced damage at cellular level, and the activities of collagen- I (COL- I ) and catalase (CAT) were elevated in comparison to those of the cell model group after UVB irradiation. Moreover, both broth samples showed much higher tyrosinase activity inhibition rate than the control water extract, showing good whitening effect. Meanwhile, HaCaT cells treated with both broth samples displayed much lower expression of inflammatory factors IL-6, TNF- $\alpha$  and COX-2 compared with those treated with water extract, indicating higher anti-inflammatory capacity of daylily fermentation broth. Results from chick chorioallantoic membrane test demonstrated that there was no bleeding occurred before and after treatment with the samples, suggesting no irritation from the fermented broth.

**Key words:** *Hemerocallis citrina* Baroni; fermentation; anti-inflammatory; whitening; drug and cosmetic materials

收稿日期: 2022-07-25; 定用日期: 2022-11-14; DOI: 10.13550/j.jxhg.20220713

作者简介: 闫雅倩 (2000—), 女, 硕士生, E-mail: 2217081829@qq.com。联系人: 杨丽 (1988—), 女, 助理研究员, E-mail: yang.li@caiq-schrader.com.cn; 李萌 (1981—), 女, 副教授, E-mail: limeng@btbu.edu.cn。

黄花菜 (*Hemerocallis citrina* Baroni) 是一种草本植物<sup>[1]</sup>。黄花菜含有丰富的蛋白质、脂类、胡萝卜素、糖类以及丰富的微量元素。食用黄花菜不仅能提高皮肤的弹性和紧致度,防止老化,而且有助于保持皮肤白皙。黄花菜的优势在于:其花蕾及根等部位中含有大量生物活性成分,例如:类黄酮类、生物碱类、皂苷等。黄花菜中黄酮类化合物是其重要有效成分之一,具有延缓衰老、抗氧化、清除自由基等功能<sup>[2]</sup>。黄花菜还可以表现出抗菌、抗炎、有效改善睡眠等多方面的生物活性功能<sup>[3]</sup>,而且其在市场中易获取,原料廉价,成分简单无害。

由于市场上的化妆品仅含有低比例黄花菜成分并且有限的提取条件使其不能充分发挥黄花菜的功效,因此,选用微生物发酵的方法制备黄花菜发酵液。通过对发酵条件的控制、选择合适的菌种和发酵工艺可以大规模生产所需产品。发酵技术的优点在于无危险性,易操作性<sup>[4]</sup>。大量实验证明,经过发酵后的原料活性物含量增多,抗衰老性能增强,抗炎效果上升。例如:李慧文<sup>[5]</sup>通过体内外免疫功能调节实验证实,酵母发酵对于免疫功能活性有影响。王冬冬等<sup>[6]</sup>发现,红酒酵母发酵得到的体积分数 1% 的葡萄籽发酵液作用在 B16 细胞后,胞内黑色素相对含量降到 55.62%,说明发酵液能够抑制黑色素的生成,具有美白功效。吴迪等<sup>[7]</sup>发现,相较于水提液,葛根发酵液有良好的抗氧化效果以及抗衰老的功效。刘平平等<sup>[8]</sup>发现,发酵后的仙人掌可有效抑制炎症因子 IL-8 的表达,有良好的抗炎性。不同的温度、料液比和时间对黄花菜发酵均有影响。张江宁等<sup>[9]</sup>以黄花菜发酵液的总糖、总酸、总多酚为评价指标,通过单因素实验考察 3 个因素对产品品质的影响。在料液比(g:mL)1:16,温度为 37.5 °C、时间为 6.2 d 的条件下,黄花菜乳酸菌发酵液总酸实测值为 18.7 g/kg,总多酚实测值 83.4 mg/100 mL,与响应面预测值吻合。

在以上实验基础上,本文使用植物乳杆菌和酿酒酵母菌发酵制备得到两种黄花菜发酵液,并对其抗氧化性、抗炎性、美白性和安全性进行评价,以期弥补当前黄花菜发酵液在化妆品领域研究的不足,为开发与制备微生物发酵成分相关的化妆品的原料提供理论支撑。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

黄花菜,北京同仁堂股份有限公司;1,1-二苯基苦基苯肼(DPPH),美国 Sigma-Aldrich 公司;酿酒酵母,中国食品发酵工艺研究院有限公司;植物乳

杆菌,北京市植物资源研究开发重点实验室;总抗氧化能力检测试剂盒(ABTS 法)、活性氧自由基(ROS)检测试剂盒、胞内过氧化氢酶(CAT)检测试剂盒、TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 COX-2 ELISA 试剂盒、过氧化氢酶检测试剂盒、I 型胶原蛋白(COL-I)酶联免疫检测试剂盒、CCK-8 试剂盒,上海碧云天生物技术有限公司;HaCaT 细胞、B16 细胞,中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心;DMEM 培养基、胎牛血清、成纤维细胞生长添加剂、青霉素/链霉素、体积分数 0.05% 的胰蛋白酶,美国 Gibco 生命技术公司;去离子水,深圳市广川环保科技有限公司;磷酸盐缓冲液(PBS),赛默飞世尔科技(中国)有限公司;EasyScript<sup>®</sup> One Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 反转录试剂盒、TransStart<sup>®</sup> Top Green qPCR SuperMix,北京全式金生物技术有限公司;MRS 琼脂培养基、酵母浸出粉胨葡萄糖培养基(YPD 培养基),广州市百菱生物科技有限公司。

Sigma 1-14 微型离心机,德国西格玛离心机有限公司;DJW-5KVA 智能型交流净化稳压电源,北京力能恒电电子科技有限公司;96 孔细胞培养板,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;ABI7300 型荧光定量聚合酶链式反应仪,美国应用生物系统公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 黄花菜水提液(S1)的制备

首先将黄花菜放入研磨机中研磨成粉末状,称取黄花菜粉 3 g 与去离子水 297 g 加入培养瓶中,121 °C 灭菌,4800 r/min 离心分离 30 min 后,再一次在 121 °C 灭菌锅进行灭菌 30 min,得到黄花菜水提液 240 g,得率为 80%。

#### 1.2.2 植物乳杆菌发酵制备黄花菜发酵物(S2)

(1)挑取植物乳杆菌单菌落接入 MRS 琼脂培养基,于 28 °C、180 r/min 条件下培养 48 h,得到植物乳杆菌菌液。

(2)将 2 g 植物乳杆菌菌液接种到发酵底物中(发酵底物是由 3 g 黄花菜粉与 295 g 去离子水配制),在 37 °C,180 r/min 的摇床中培养 16 h 后,取出,在 4800 r/min 离心分离 30 min,取上清液即为植物乳杆菌发酵制备的黄花菜发酵物(S2)250 g,得率为 83%。

#### 1.2.3 酿酒酵母发酵制备黄花菜发酵物(S3)

(1)挑取酿酒酵母单菌落接入已配制完成的 YPD 培养基中,于 28 °C、180 r/min 条件下培养 48 h,得到酿酒酵母菌液。

(2)将 10 g 酿酒酵母菌液与发酵底物(发酵底物是由 3 g 黄花菜粉与 287 g 去离子水配制)融合后,在 28 °C,180 r/min 的摇床中培养 48 h 后,取出,

在 4800 r/min 离心分离 30 min, 取上清液即为酿酒酵母发酵制备的黄花菜发酵物(S3) 250 g, 得率为 83%。

#### 1.2.4 HaCaT 和 B16 细胞的培养

在细胞培养瓶中, 将 HaCaT 和 B16 细胞置于完全培养液(含体积分数 10%胎牛血清和体积分数 1%青霉素-链霉素的 DMEM 培养液)中, 将培养瓶置于 37 °C, 体积分数 5% CO<sub>2</sub> 潮湿的培养箱中进行培养。每 2 d 更换 1 次 DMEM 培养基, 当细胞密度达到 80%~90%进行传代。

细胞的传代(含 HaCaT 和 B16 细胞): 取出细胞培养瓶, 倒掉瓶内培养基, 使用 PBS 清洗细胞 2 遍; 每瓶加入 2 mL 胰蛋白酶; 待细胞完全消化悬浮后, 加入 4 mL 完全培养液(含体积分数 10%胎牛血清和体积分数 1%青霉素-链霉素的 DMEM 培养液)终止消化; 将细胞悬浮液转移至 15 mL 离心管中, 于 1000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液后加入 4 mL DMEM 培养基, 将细胞沉淀与培养基吹打均匀, 然后平均分配转移至 3 个 T75 培养瓶中, 在体积分数 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C 的培养箱中进行传代培养。

#### 1.2.5 细胞增殖/毒性实验

采用 CCK-8 试剂盒进行细胞增殖/毒性实验。

(1) 收集 HaCaT 细胞培养液, 使用 DMEM 培养基, 制成 1×10<sup>4</sup> 个/mL 的细胞悬浮液, 在 96 孔板中每孔加入 100 μL 细胞悬浮液。

(2) 在体积分数 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C 孵育 12 h 或隔夜, 弃细胞培养液, 实验组每孔加入 100 μL 用去离子水稀释成不同体积分数的样品溶液(样品为无血清 DMEM 培养基培养的黄花菜水提液和两种发酵液)。每个体积分数设定 5 个复孔。同时, 设置对照组(含有细胞+无血清 DMEM 培养基), 空白组(只加入 PBS)。

(3) 将 96 孔板在体积分数 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C 的培养箱中孵育 24 h, 然后每孔加入 10 μL 的 CCK-8 溶液, 再次孵育 2 h 后, 在 450 nm 波长处测溶液的吸光度。按式(1)计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率}/\% = \frac{\text{OD}_{\text{实验组}} - \text{OD}_{\text{空白组}}}{\text{OD}_{\text{对照组}} - \text{OD}_{\text{空白组}}} \times 100 \quad (1)$$

#### 1.2.6 黄花菜发酵液抗炎功效测定

##### 1.2.6.1 HaCaT 细胞炎性因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6、COX-2 表达量的测定

采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测 HaCaT 细胞炎性因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6、COX-2 的表达量(具体方法见试剂盒说明书)。按照 1.2.4 节进行细胞培养, 计数 HaCaT 细胞, 以 1×10<sup>4</sup> 个/孔加入 96 孔培养板中。在细胞培养箱中培养 12 h, 弃培养基后加入 1 mL PBS, 再用 UVB(照射剂量为 19.18 mJ/cm<sup>2</sup>, 照射时间为 15 s)照射细胞, 吸出 PBS, 加入用无血清

DMEM 培养基稀释培养的体积分数为 2.5%的黄花菜发酵液。后续按照 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 COX-2 ELISA 试剂盒说明书进行炎性因子表达量的测定。空白组不加细胞, 不加样品处理; 模型组为经过 UVB 照射后的细胞模型。

##### 1.2.6.2 HaCaT 细胞炎性因子 TNF- $\alpha$ mRNA、IL-6 mRNA 相对表达量的测定

样品作用于 HaCaT 细胞后, 使用总 RNA 抽提试剂提取 RNA, 具体操作参照说明书。随后, 根据 EasyScript<sup>®</sup>One Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 反转录试剂盒说明进行逆转录。

引物及探针的设计和合成: 根据美国国家生物技术信息中心发布的基因序列, 通过 Primer Express 软件设计出目的基因的特异性引物(包含管家基因  $\beta$ -actin), 其序列见表 1。

表 1 Real-Time PCR 引物序列  
Table 1 Real-Time PCR primer sequences

基因	方向	序列
$\beta$ -actin	F	TGGCACCCAGCACAATGAA
	R	TGGCACCCAGCACAATGAA
TNF- $\alpha$	F	AGGACAGAAGAGCAACTGAGATCG
	R	TTGGGATGCTGACACTCCATGCA
IL-6	F	GACAGCCACTCACCTCTTCA
	R	TTCACCAGGCAAGTCTCCTC

#### 1.2.7 黄花菜发酵液抗氧化功效分析

##### 1.2.7.1 DPPH 自由基清除实验<sup>[10]</sup>

DPPH 溶液(2×10<sup>-4</sup> mol/L)的配制: 精确称取 DPPH 20 mg, 用无水乙醇溶解并定容至 250 mL。按照表 2 顺序及添加量向试管中分别加入不同体积分数样品水溶液, 混合均匀, 在酶标仪 517 nm 波长处测吸光度, 并按式(2)计算 DPPH 自由基清除率。

表 2 样品加液要求  
Table 2 Sample liquid addition requirements

	T	T <sub>0</sub>	C	C <sub>0</sub>
不同体积分数的样品水溶液/mL	1	1	—	—
无水乙醇/mL	2	2	3	3
DPPH 溶液/mL	1	—	1	—
无水乙醇/mL	—	1	—	1

注: “—”为此步骤不加该溶剂。

DPPH 自由基清除率/%=

$$\left[ \frac{1 - (T - T_0)}{C - C_0} \right] \times 100 \quad (2)$$

式中: T—样品管吸光值, 即样品与 DPPH 反应后溶液吸光值; T<sub>0</sub>—样品本底吸光值; C—DPPH 管吸光值, 即未加样品时 DPPH 溶液吸光值; C<sub>0</sub>—溶剂本底吸光值。所得结果以(平均值±标准差)表示, 讨论部分均使用平均值。

##### 1.2.7.2 羟基自由基清除实验<sup>[11]</sup>

将 0.5 mL 浓度为 0.75 mol/L 邻二氮菲无水乙醇

溶液倒入试管中,依次加入 1 mL 浓度为 0.15 mol/L PBS 和 0.5 mL 蒸馏水,摇匀后再加入 0.5 mL 浓度为 0.75 mmol/L 硫酸亚铁和 0.5 mL 体积分数 0.01% 过氧化氢溶液,将试管置于 37 °C 水浴 60 min 后,在波长 536 nm 处测其吸光值,记为损伤管吸光度 ( $A_{\text{损伤}}$ ),未损伤管以 0.5 mL 蒸馏水代替损伤管中的 0.5 mL 体积分数 0.01% 过氧化氢溶液,操作方法如上,所得数据记为  $A_{\text{未损伤}}$ ,样品管用去离子水稀释成不同体积分数的样品水溶液代替损伤管中的蒸馏水,可测得样品管中的吸光度,记为  $A_{\text{样品}}$ ,按式 (3) 计算样品对羟基自由基的清除率。

$$\text{羟基自由基清除率}/\% = \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{损伤}}}{A_{\text{未损伤}} - A_{\text{损伤}}} \times 100 \quad (3)$$

### 1.2.7.3 总抗氧化能力测定

参考文献 [12] 测定样品的总抗氧化能力 (TEAC)。标准溶液的配制:将浓度为 10 mmol/L 的 Trolox 标准溶液用蒸馏水稀释成 0.15、0.3、0.6、0.9、1.2 和 1.5 mmol/L 的溶液。得到标准曲线方程为:  $y = -0.584x + 0.5288$  ( $R^2 = 0.9984$ )。

样品测定:在每个检测孔中加入 200  $\mu\text{L}$  2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐 (ABTS) 工作液。将 96 孔分为空白对照孔、标准溶液检测孔和样品液检测孔。分别加入 10  $\mu\text{L}$  蒸馏水或 PBS、10  $\mu\text{L}$  不同浓度 Trolox 标准溶液、10  $\mu\text{L}$  用去离子水稀释的体积分数为 2.5% 的不同发酵液,轻轻混匀。孵育 2~6 min 后在 734 nm 处测溶液的吸光值。将样品所得的吸光值代入标准曲线方程后,得到其总抗氧化能力数值。

### 1.2.7.4 I 型胶原蛋白含量测定

取体积分数为 2.5% 的发酵液和水提液,经 0.22  $\mu\text{m}$  无菌滤膜过滤后作用于 HaCaT 细胞 24 h,收集细胞培养液于无菌离心管中,于 4 °C、2500 r/min 下离心 20 min,保存上清液。使用 I 型胶原蛋白 (COL-I) 酶联免疫检测试剂盒进行检测。

### 1.2.7.5 CAT 含量测定

收集对数生长期状态良好的 HaCaT 细胞以  $1 \times 10^6$  个细胞/孔密度铺于 96 孔板 12 h 后,弃细胞培养基,选择体积分数为 2.5% 的黄花菜水提液和发酵液为样品组,模型组和空白组加入无血清 DMEM,将其作用 HaCaT 细胞 24 h 后倒掉, PBS 清洗 2 遍,加入 250  $\mu\text{mol/L}$  的过氧化氢作用 2 h 后倒掉 (空白组不加过氧化氢作用), PBS 清洗 2 遍,置于冰上,加入提前配制好的细胞裂解液 100  $\mu\text{L}$ ,待细胞完全裂解后,吸取板内裂解液,于 4 °C、10000 r/min 条件下离心 10 min,取上清液进行 CAT 含量测定,按照试剂盒说明书进行操作。

### 1.2.8 黄花菜发酵液美白功效测定

通过胞内酪氨酸酶活性抑制实验来评价黄花菜发酵液美白功效。

将对数生长期期间的 B16 细胞,接种于 96 孔细胞培养板,在 37 °C,体积分数 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养过夜。加入用 DMEM 稀释成体积分数为 2.5% 的样品溶液。未加样品组为对照组,每组 3 个复孔。孵化 48 h 后,弃上清液,用 PBS 清洗 1 次。在每个孔中加入 100  $\mu\text{L}$  的细胞裂解液,用刮刀刮去细胞,1500 r/min 离心上清液 10 min。将 50  $\mu\text{L}$  上清液倒入已含有 50  $\mu\text{L}$  体积分数 1% 左旋多巴的 96 孔板中,并在体积分数 5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中于 37 °C 培养 1 h,在 475 nm 处测溶液的吸光度。按式 (4) 计算细胞反应体系下酪氨酸酶的相对活性。

$$A_{\text{细胞}}/\% = (\text{OD}_{\text{样品}} - \text{OD}_{\text{空白组}}) / (\text{OD}_{\text{对照组}} - \text{OD}_{\text{空白组}}) \times 100 \quad (4)$$

式中:  $A_{\text{细胞}}$  为细胞反应体系下酪氨酸酶相对活性,%;  $\text{OD}_{\text{样品}}$  为含有待测样反应体系的吸光度;  $\text{OD}_{\text{空白组}}$  为不含任何物质空板的吸光度;  $\text{OD}_{\text{对照组}}$  为不含待测样反应体系的吸光度。

### 1.2.9 黄花菜发酵液安全性功效测定

通过鸡胚绒毛尿囊膜实验 (HET-CAM) 来评价黄花菜发酵液的安全性功效。

将 300  $\mu\text{L}$  黄花菜发酵液直接渗透到绒毛膜 (CAM) 中 5 min,观察绒毛膜毒性参数 (如出血、血凝、血管溶解等) 的变化。每一受试物用 6 只鸡胚进行测试,采用终点评估法 (ES) 进行实验,根据血管出血现象进行评分,根据分数将其刺激性进行分类,ES 评分范围见表 3。

表 3 HET-CAM 终点评估法的眼刺激性预测模型  
Table 3 Prediction model of eye irritation based on HET-CAM endpoint assessment method

评分标准	刺激性分类
ES < 6	无刺激性
6 ≤ ES < 12	轻度刺激性
12 ≤ ES < 15	中度刺激性
ES ≥ 15	重度刺激性

受试物包括:阴性对照 (体积分数 0.9% 氯化钠水溶液)、阳性对照 (0.1 mol/L 氢氧化钠水溶液) 和 3 个样品 (6 个平行)。对 CAM 进行形态学观察和打分。

## 2 结果与讨论

### 2.1 黄花菜植物乳杆菌发酵液理化指标

黄花菜植物乳杆菌发酵液为浅棕红色黏稠液体, pH=4.4,黏度为 0.16 Pa·s,可溶性固含物质量分数 1.7%,菌落总数小于 50 CFU/mL,无致病菌检出。根据化妆品卫生标准 GB 7916—87,黄花菜植物乳杆菌发酵液符合化妆品质量要求。

### 2.2 黄花菜酿酒酵母发酵液理化指标

黄花菜酿酒酵母发酵液为淡粉色至棕红色黏稠

液体, pH=4.3, 黏度为 0.16 Pa·s, 可溶性固含物质量分数为 1.5%, 菌落总数小于 50 CFU/mL, 无致病菌检出。根据化妆品卫生标准 GB 7916—87, 黄花菜酿酒酵母发酵液符合化妆品质量要求。

### 2.3 样品对 HaCaT 细胞存活率的影响

不同体积分数的样品溶液对细胞存活率的影响如图 1 所示。

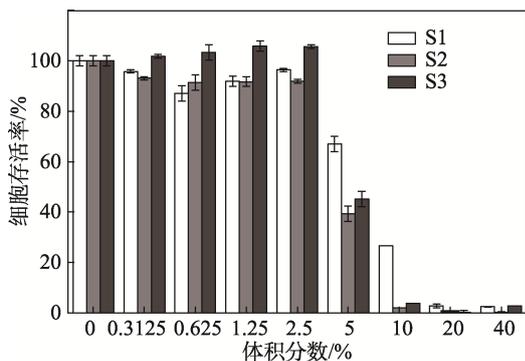


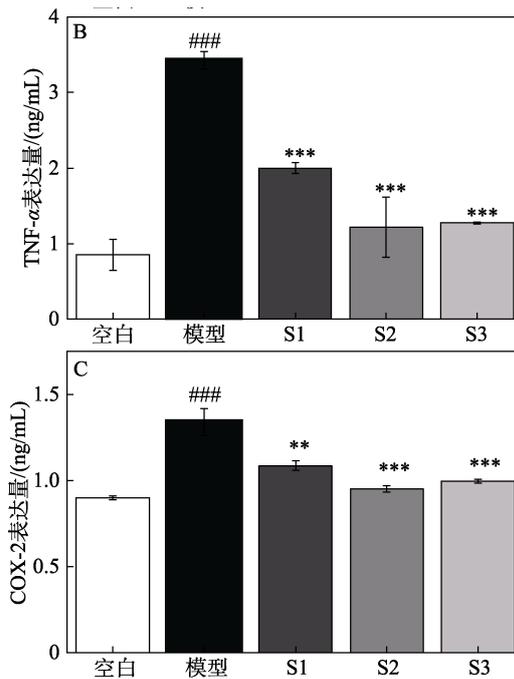
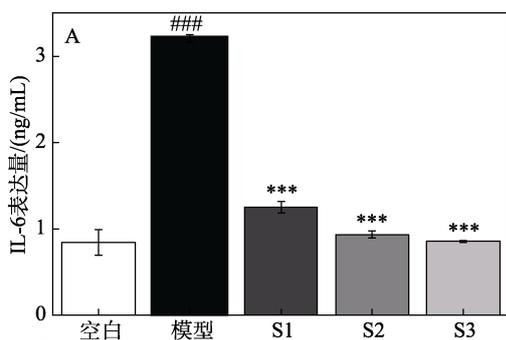
图 1 不同体积分数 S1、S2、S3 的溶液对细胞存活率的影响  
Fig. 1 Effects of S1、S2、S3 with different volume fraction on the survival rate of cell

从图 1 可以看出, 当体积分数为 0~2.5% 时, 样品对 HaCaT 细胞无毒性, 并且 S3 显示出对 HaCaT 细胞有增殖作用。而当体积分数为 5% 时, S1、S2、S3 对 HaCaT 细胞表现出毒性。因此, 选择体积分数为 2.5% 的 S1、S2、S3 应用于后续抗炎性功效评价、总抗氧化能力检测、COL- I 表达量、CAT 表达量、美白功效评价和安全功效评价实验。

### 2.4 抗炎性功效分析

#### 2.4.1 炎症因子蛋白水平表达量分析

IL-6、TNF- $\alpha$  和 COX-2 是人体中发挥重要影响的炎症因子, 当发生炎症反应时, 3 种炎症因子表达水平会迅速上升, 引起病情加重<sup>[13-14]</sup>。IL-6 是由多种细胞分泌产生的, 与机体的炎症反应、免疫反应等息息相关。它主要由巨噬细胞直接分泌, 其主要功能是调节免疫细胞, 诱导细胞凋亡等<sup>[15]</sup>。使用 ELISA 法检测样品对 3 种炎症因子蛋白的表达量, 结果如图 2 所示。



A—IL-6; B—TNF- $\alpha$ ; C—COX-2; “###”表示与空白相比, 差异高度显著 ( $P < 0.001$ ); “\*\*\*”表示与模型组相比, 差异极显著 ( $P < 0.01$ ); “\*\*\*\*”表示与模型组相比, 差异高度显著 ( $P < 0.001$ ), 下同

#### 图 2 样品对 3 种炎症因子蛋白的表达量

Fig. 2 Expression levels of three inflammatory factors in samples

从图 2 可以看出, 空白组的 IL-6、TNF- $\alpha$ 、COX-2 的表达量分别为 0.8、0.9 和 0.9 ng/mL, 模型组对 3 种炎症因子蛋白的表达量分别升为 3.2、3.4 和 1.3 ng/mL。而用体积分数为 2.5% 的 S1、S2、S3 处理细胞后, 炎症因子蛋白的表达量显著降低, S1 处理后 3 种炎症因子蛋白的表达量分别为 1.2、2.0 和 1.1 ng/mL; S2 处理后 3 种炎症因子蛋白的表达量分别为 1.0、1.2 和 0.9 ng/mL; S3 处理后 3 种炎症因子蛋白的表达量分别为 0.9、1.3 和 1.0 ng/mL。并且 S2、S3 处理后的炎症因子蛋白表达量均低于 S1, 说明两种发酵液具有更好的抗炎功效。经过 UVB 诱导的 HaCaT 炎症模型组, 辐射刺激下产生 ROS, 增加了炎症细胞因子蛋白表达量, 而黄花菜发酵液有效地扭转了此结果, 这是由于黄花菜发酵液的主要活性成分是酚类物质, 酚类具有明显的抗炎性<sup>[9]</sup>。

#### 2.4.2 炎症因子基因水平表达量分析

不同样品对基因层面炎症因子的相对表达量如图 3 所示。

由图 3 可以看出, 空白组的炎症蛋白 mRNA 相对表达量均为 1.0。UVB 照射显著诱导 HaCaT 细胞分泌炎症因子, 模型组 IL-6 mRNA 相对表达量升到 1.9, TNF- $\alpha$  mRNA 相对表达量升到 2.1。经过体积分数为 2.5% 的 S1、S2、S3 预处理后, 炎症因子的基因相对表达量显著降低。S1 处理后炎症因子 IL-6 和 TNF- $\alpha$  的 mRNA 相对表达量分别为 1.3 和 1.6;

S2 处理后炎症因子 IL-6 和 TNF- $\alpha$  的 mRNA 相对表达量分别为 1.2 和 1.0; S3 处理后炎症因子 IL-6 和 TNF- $\alpha$  的 mRNA 相对表达量分别为 1.2 和 1.1, 并且 S2 和 S3 降低的程度大于 S1。李祎等<sup>[16]</sup>研究表明, 透明质酸酶活性与抗炎性有关, 而黄花菜发酵后, 产生大量酚类活性物质, 导致透明质酸酶活性提高, 从而增强其抗炎功效。

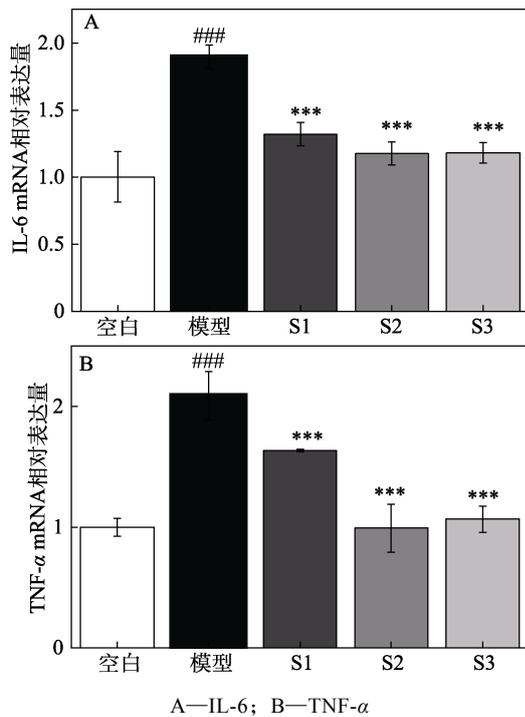


图 3 样品对炎症因子基因的相对表达量

Fig. 3 Relative expression level of inflammatory factor genes in samples

## 2.5 抗氧化功效分析

### 2.5.1 DPPH 自由基清除率分析

不同体积分数发酵液对 DPPH 自由基的清除效果见图 4。

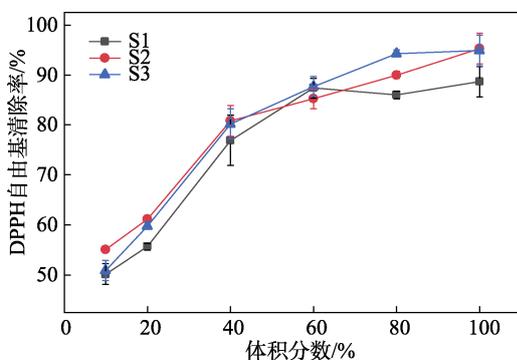


图 4 S1、S2、S3 对 DPPH 自由基的清除作用

Fig. 4 Scavenging effect of S1, S2, S3 on DPPH free radical

由图 4 可知, S1、S2、S3 对 DPPH 自由基的清除效果相近。S1 的 IC<sub>50</sub> (对自由基清除率达到 50%

时所需的抑制剂体积分数) 为 11.753%, S2 的 IC<sub>50</sub> 为 9.944%, S3 的 IC<sub>50</sub> 为 11.558%。从吴秀仪等<sup>[17]</sup>研究可知, V<sub>C</sub> 对 DPPH 自由基的 IC<sub>50</sub> 为 0.23%, 当 V<sub>C</sub> 质量浓度为 1.0 g/L 时, DPPH 自由基的清除率达 98.53%。IC<sub>50</sub> 值越小, 说明抗氧化剂的自由基清除能力越强, 虽然 S1、S2、S3 对 DPPH 自由基的清除效果不如 V<sub>C</sub>, 但均表现出随样品体积分数增加, 清除自由基活性随之增强的趋势。

### 2.5.2 羟基自由基的清除能力分析

羟基自由基是一种活性氧, 可与生物体内的糖、蛋白质、DNA、碱基、磷脂、有机酸等发生化学反应, 造成组织细胞的损伤, 因此, 被认为是毒性最大的自由基<sup>[18]</sup>。不同体积分数发酵液对羟基自由基的清除效果见图 5。

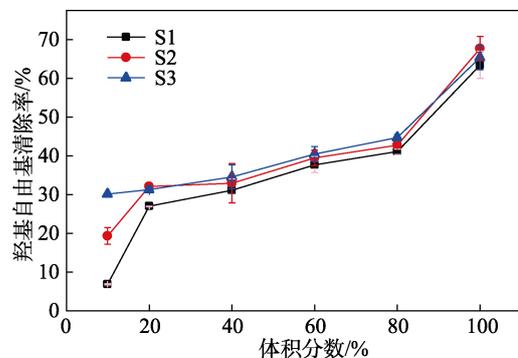


图 5 S1、S2、S3 对羟基自由基的清除作用

Fig. 5 Scavenging effect of S1, S2, S3 on hydroxyl radical

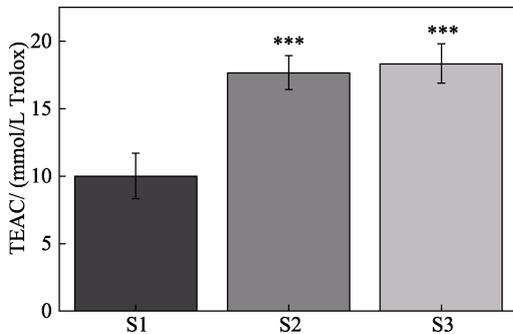
由图 5 可知, S1、S2、S3 对羟基自由基的清除效果明显。随着样品体积分数的增加, 清除率不断升高。S1 的 IC<sub>50</sub> 为 82.892%, S2 的 IC<sub>50</sub> 为 82.154%, S3 的 IC<sub>50</sub> 为 82.034%。从吴秀仪等<sup>[17]</sup>研究可知, V<sub>C</sub> 对羟基自由基的 IC<sub>50</sub> 为 0.24%, 当 V<sub>C</sub> 质量浓度为 1.0 g/L 时, 对羟基自由基的清除率达 98.82%。羟基自由基的清除作用与金属离子的螯合作用密切相关<sup>[19]</sup>。不同菌类发酵所得的胞外成分不同, 对金属离子的螯合能力各有差异。因此, 水提液和发酵液对羟基自由基的清除程度不同。而黄花菜发酵液对金属离子的螯合能力强, 可有效中和羟基自由基, 消除其不良作用。

### 2.5.3 总抗氧化能力分析

体系内的总抗氧化能力体现了其总体的抗氧化水平。抗氧化水平的强弱与其含量的高低、结构中取代基的性质和位置等均有关<sup>[20]</sup>。采用 ABTS 法测定样品的总抗氧化能力如图 6 所示。

从图 6 可以看出, 体积分数为 2.5% 的 S2、S3 的总抗氧化能力相差不大并且二者的总抗氧化能力均大于体积分数为 2.5% 的 S1, 说明发酵液中主要活

性成分<sup>[21]</sup>, 例如: 酚类、多糖含量对总抗氧化能力发挥主要作用, 有助于提升细胞的总抗氧化能力。S3 的总抗氧化能力略强于 S2, 可能是因为酿酒酵母在发酵过程中会产生更多的多糖<sup>[22]</sup>。从赵丹等<sup>[23]</sup>研究可知, 体积分数 1% 的 V<sub>C</sub> 溶液可显著提升被双氧水降低的细胞的总抗氧化能力。



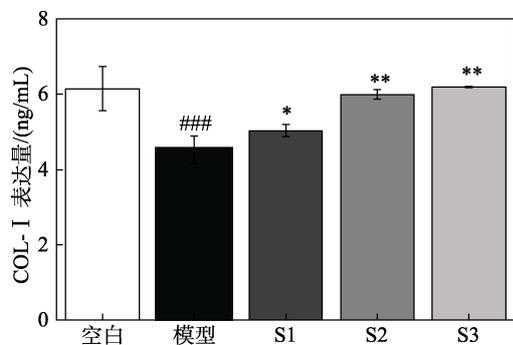
“\*\*\*”表示与 S1 相比, 差异高度显著 ( $P < 0.001$ )

图 6 S1、S2、S3 的总抗氧化能力

Fig. 6 Total antioxidant capacity of aqueous S1, S2, S3

#### 2.5.4 COL- I 表达量分析

皮肤中的弹性与韧性与其所含的胶原蛋白含量紧密相关。COL- I 够促进细胞新陈代谢, 缓解细胞衰老<sup>[24]</sup>。样品对 COL- I 的表达量如图 7 所示。



“\*”表示与模型组相比, 差异显著 ( $P < 0.05$ ), 下同

图 7 S1、S2、S3 的 COL- I 表达量

Fig. 7 COL- I expression level of S1, S2, S3

从图 7 可以明显看出, 空白组的 COL- I 表达量为 6.14 ng/mL; 经 UVB 照射后, 模型组细胞内的 COL- I 表达量降为 4.52 ng/mL; 经过体积分数为 2.5% 的 S1、S2、S3 作用后, 细胞内 COL- I 表达量显著增加, 分别为 5.03、6.00 和 6.19 ng/mL, 且 S3 的 COL- I 表达量较高。UVB 的照射, 不仅阻碍胶原蛋白的合成, 而且促进胶原蛋白的分解, 导致皮肤失去弹性, 形成深层皱纹<sup>[25]</sup>。经过黄花菜发酵液作用后, 胶原蛋白的表达量大幅度提升, 说明发酵液有抗衰功效。

#### 2.5.5 CAT 表达量分析

CAT 是机体内广泛存在的过氧化物分解酶之一, 能够分解过氧化氢<sup>[26]</sup>, 能有效地清除各种活性氧基团, 从而防止这些基团对细胞膜系统的损坏。体积分数为 2.5% 的 S1、S2、S3 的 CAT 表达量结果如图 8 所示。

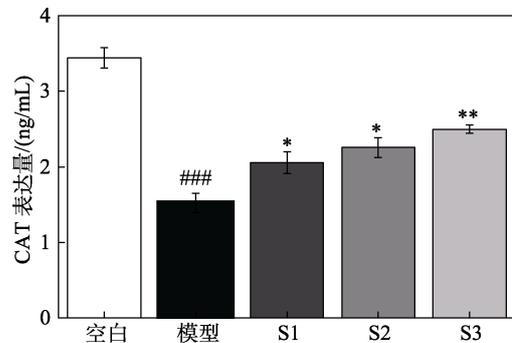


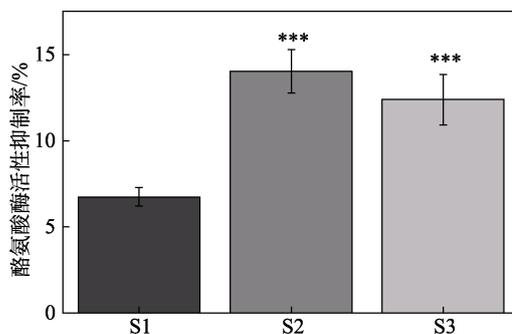
图 8 S1、S2、S3 的 CAT 表达量

Fig. 8 CAT expression levels of S1, S2, S3

由图 8 可以看出, 空白组的 CAT 表达量为 3.44 ng/mL。从莫秋婷等<sup>[27]</sup>研究可知, 体积分数 1% V<sub>C</sub> 的 CAT 相对表达量为 0.8。氧化应激损伤下的 CAT 表达量显著降低, 模型组的 CAT 表达量仅为 1.52 ng/mL; 而体积分数为 2.5% 的 S1、S2、S3 均能显著提高细胞中 CAT 的表达量, 分别为 2.06、2.25 和 2.40 ng/mL, 从而增强对细胞内 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的清除效果, 降低对细胞的氧化应激损伤, 达到抗氧化的效果。

#### 2.6 美白功效分析

B16 能够高表达黑色素, 与人表皮黑素细胞基因高度同源, 是进行皮肤色素实验的常用替代模型<sup>[28]</sup>。酪氨酸酶是黑色素合成过程中的关键催化酶之一, 在黑色素形成进而到达表皮过程中发挥着重要的催化作用, 其表达活性决定着黑色素生成的速度和数量<sup>[29]</sup>。体积分数为 2.5% 的 S1、S2、S3 对酪氨酸酶活性的抑制率如图 9 所示。



“\*\*\*”表示与 S1 相比, 差异高度显著 ( $P < 0.001$ )

图 9 S1、S2、S3 对酪氨酸酶活性的抑制率

Fig. 9 Inhibition rate of tyrosinase activity by S1, S2, S3

从图 9 可以看出, 体积分数为 2.5%的 S2、S3 能有效地抑制酪氨酸酶蛋白的表达, 从而抑制酪氨酸酶的活性, 能够有效阻断黑色素的生成, 黄花菜发酵液对酪氨酸酶活性的抑制可能是其较强的抗氧化作用导致的。因此, 发酵液在美白方面具有一定的作用。

### 2.7 安全性功效分析<sup>[30-31]</sup>

鸡胚绒毛尿囊膜实验是利用其尿囊膜与眼结膜组织结构类似的特点, 通过观察尿囊膜暴露于受试

物质后血管的刺激反应, 计算刺激分值对受试物进行评价, 结果见表 4。样品作用在绒毛尿囊膜前后对比图见图 10。

采用 0.1 mol/L NaOH 水溶液作为阳性对照, 刺激评分为 18, 血管溶血明显, 具有强刺激性; 使用体积分数 0.9% NaCl 水溶液作为阴性对照, 刺激评分为 0.04, 血管无溶血; 体积分数为 2.5%的 S1、S2、S3 的刺激评分为 0.09、0.08、0.06, 血管无溶血, 表明黄花菜水提液及发酵液均无眼刺激性。

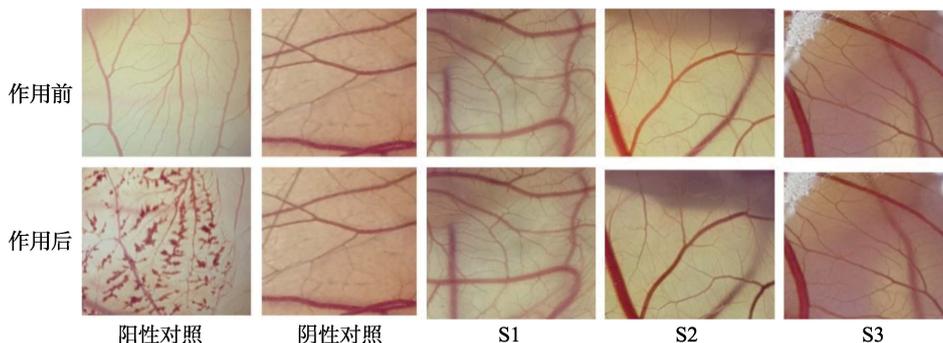


图 10 S1、S2、S3 作用在绒毛尿囊膜前后对比图

Fig. 10 Comparison of S1, S2, S3 before and after the action of CAM

表 4 黄花菜发酵液鸡胚绒毛尿囊膜实验结果

Table 4 Experimental results of HET-CAM in daylily fermentation broth

阴性对照				阳性对照				S1				S2				S3			
编号	出血	血管凝血	血管融解	编号	出血	血管凝血	血管融解	编号	出血	血管凝血	血管融解	编号	出血	血管凝血	血管融解	编号	出血	血管凝血	血管融解
1	0	0.01	0.01	1	3	3	3	1	0	0.05	0	1	0	0	0	1	0	0	0
2	0	0	0.01	2	3	2	3	2	0	0	0	2	0	0	0	2	0	0.02	0
3	0	0	0	3	3	1	3	3	0	0	0	3	0	0.05	0	3	0	0	0.01
4	0	0	0.01	4	3	1	3	4	0	0	0.02	4	0	0	0	4	0	0	0
5	0	0.01	0.01	5	3	0	3	5	0	0.04	0	5	0	0.03	0	5	0	0.04	0
6	0	0	0	6	3	0	3	6	0	0	0	6	0	0	0	6	0	0	0
ES=0.04				ES=18				ES=0.09				ES=0.08				ES=0.06			

### 3 结论

以黄花菜为研究对象, 采用植物乳杆菌和酿酒酵母菌发酵制备两种黄花菜发酵液, 从抗氧化、抗炎性、美白性和安全性多方面验证黄花菜发酵液可修复 UVB 给皮肤带来的伤害。

本文选取体积分数为 2.5%的样品应用于实验。在抗氧化功效评价中, 黄花菜水提液和黄花菜发酵液均能有效地清除 DPPH 自由基, 且与浓度呈正相关, 表明黄花菜水提液和发酵液具有一定的抗氧化活性, 其中 S1 的 IC<sub>50</sub> 为 11.753%, S2 的 IC<sub>50</sub> 为 9.944%, S3 的 IC<sub>50</sub> 为 11.558%。3 种溶液对羟基自由基的清除率随着体积分数的增加而提高, 其中 S1

的 IC<sub>50</sub> 为 82.892%, S2 的 IC<sub>50</sub> 为 82.154%, S3 的 IC<sub>50</sub> 为 82.034%。空白组的 COL- I 表达量为 6.14 ng/mL; UVB 照射能够引起氧化应激反应激活胶原蛋白酶 (MMPs), 从而降低胶原蛋白含量。模型组细胞内的 COL- I 表达量降为 4.52 ng/mL; 经过 S1、S2、S3 作用后, 细胞内 COL- I 表达量显著增加到 5.03、6.00、6.19 ng/mL。空白组的 CAT 表达量为 3.44 ng/mL; 氧化应激损伤下的 CAT 表达量显著降低, 模型组的 CAT 表达量仅为 1.52 ng/mL; 而 S1、S2、S3 均能显著提高细胞中 CAT 的表达量, 分别为 2.06、2.25、2.40 ng/mL。

在抗炎性评价实验中, 空白组的 IL-6、TNF- $\alpha$ 、COX-2 的表达量分别为 0.8、0.9 和 0.9 ng/mL, 模型组对 3 种炎症因子蛋白的表达量分别为 3.2、3.4 和

1.3 ng/mL。而用 S1、S2、S3 处理细胞后, 炎症因子蛋白的表达量显著降低, 因此, 发酵液和水提液有一定的抗炎效果。

在安全性功效评价中, 使用体积分数 0.9% NaCl 水溶液作为阴性对照, 刺激评分为 0.04, 血管无溶血; S1、S2、S3 的刺激评分为 0.09、0.08、0.06, 血管无溶血, 表明黄花菜水提液及发酵液均无眼刺激性。黄花菜发酵液可作为抗衰老、美白、抗炎、抗氧化等功效性原料应用于化妆品中。

#### 参考文献:

- [1] DENG F M (邓放明), YIN H (尹华), LI J H (李精华), *et al.* On latest application and countermeasure for industrialization exploitation of daylily flower[J]. *Journal of Hunan Agricultural University: Natural Science Edition* (湖南农业大学学报: 自然科学版), 2003, 29(6): 529-532.
- [2] WANG T Y, LI Q, BI K S. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate[J]. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2018, 13(1): 12-23.
- [3] ZHANG Y H (张运晖), ZHAO Y (赵璞), OU Q M (欧巧明), *et al.* Research progress on the post-harvest processing and medicinal mechanism of *Hemerocallis citrina* Baroni[J]. *Anhui Agricultural Science* (安徽农业科学), 2020, 48(20): 6-8.
- [4] HUR S J, LEE S Y, KIM Y C, *et al.* Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods[J]. *Food Chemistry*, 2014, 160: 346-356.
- [5] LI H W (李慧文). Screening of composite *Rhodiola rosea* and immunomodulating effect research[D]. Yanji: Yanbian University (延边大学), 2014.
- [6] WANG D D (王冬冬), SUN Q R (孙倩茹), WANG Z W (王子文), *et al.* Study on the anti-aging and whitening efficacy of grape seed fermentation solution[J]. *Daily Use Chemical Industry* (日用化学工业), 2022, 52(5): 545-552.
- [7] WU D (吴迪), LIU P P (刘平平), LI M (李萌), *et al.* Evaluation of antioxidant and anti-aging effect of pueraria water extracts and pueraria fermentation broth *in vitro*[J]. *Food Industry Technology* (食品工业科技), 2019, 40(12): 285-290, 294.
- [8] LIU P P (刘平平), LI M (李萌), WANG C T (王昌涛), *et al.* Optimization of fermentation process of *Opuntia dillenii* polysaccharide and its anti-inflammatory efficacy[J]. *Food Industry Science and Technology* (食品工业科技), 2018, 39(24): 216-221.
- [9] ZHANG J N (张江宁), YANG C (杨春), NAN X J (南晓洁), *et al.* The lactic acid fermentation of *Hemerocallis fulva*[J]. *Food Industry* (食品工业), 2021, 42(10): 49-54.
- [10] SHI Y, WANG D Y, LU W W, *et al.* Preparation of sweet potato protein polypeptide and its DPPH free radical scavenging effect[J]. *Food Science and Technology*, 2010, (5): 168-172.
- [11] CHEN L H (陈丽花), ZHU C C (朱楚楚), LI R R (李冉冉). Effect of *in vitro* digestion on the antioxidant activity of anti-nutritional peptides from golden melon seeds[J]. *Food Science* (食品科学), 2019, 40(3): 78-86.
- [12] ZHANG X L (张晓利), ZHAO R X (赵瑞香), JIANG J F (姜建福) *et al.* Optimization of extraction process of taxifolin from grape pomace and determination of its antioxidant capacity[J]. *Food Industry Technology* (食品工业科技), 2021, 42(5): 200-205.
- [13] XU S (徐升), LIU Y Z (刘友章), SONG Y F (宋雅芳). Analysis on the treatment of chronic gastritis by the theory of liver and spleen[J]. *Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine* (辽宁中医杂志), 2007, (1): 27.
- [14] TAI J D (陶景德), XIE R H (谢瑞华), WANG S F (王少峰). The relation of *Helicobacter pylori* infection with plasma lipids and inflammatory factor in chronic gastritis patients[J]. *Modern Medicine Journal of China* (中国现代医药杂志), 2013, 15(4): 12-14.
- [15] ZHAO Z W (赵忠武). Correlation between serum inflammatory cytokines and severity of chronic gastritis with hp infection[J]. *Chinese Journal of Public Health Engineering* (中国卫生工程学), 2018, 17(6): 949-951.
- [16] LI H (李祎), WANG P (王萍). Optimization of fermentation process of Dragon sunflower juice and evaluation of its anti-inflammatory and bacteriostatic activity[J]. *Modern Food Technology* (现代食品科技), 2017, 33(6): 248-254, 213.
- [17] WU X Y (吴秀仪), HUANG H (黄和), HUANG J M (黄君梅), *et al.* Study on antioxidant activity of theobromine *in vitro*[J]. *Processing of Agricultural Products* (农产品加工), 2021, (20): 1-4.
- [18] LI H Y (李惠云), JIA Q X (贾清秀). An introduction to the relationship between oxygen radicals and human health[J]. *Journal of Anyang Normal College* (安阳师范学院学报), 2003, (2): 74.
- [19] AHIRE J J, MOKASHE N U, PATIL H J, *et al.* Antioxidative potential of folate producing probiotic *Lactobacillus helveticus* CD6[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2013, 50(1): 26-34.
- [20] REN H (任红), ZHENG S J (郑少杰), ZHANG X L (张小利), *et al.* Research progress on the structure-activity relationship of flavonoid compounds based on different antioxidant mechanism[J]. *Food Industry Technology* (食品工业科技), 2016, 37(2): 384-388.
- [21] ZHOU X J (周向军), GAO Y X (高义霞), ZHANG J (张继). Study on extraction process and antioxidant effect of polyphenols of cauliflower[J]. *Crop Magazine*, (作物杂志) 2012, (1): 68-72.
- [22] BAO Y H (包怡红), LIU Q (刘奇), WANG W (王薇). Optimization of fermentation process conditions of extracellular polysaccharide in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Winemaking* (酿酒), 2012, 39(2): 58-62.
- [23] ZHAO D (赵丹), LIU P P (刘平平), LI M (李萌), *et al.* The effect and mechanism of lactic acid bacteria fermentation extract in protecting skin oxidative damage[J]. *Fine Chemicals* (精细化工), 2022, 39(4): 752-760.
- [24] MARGARET T. The role of collagen and elastin in aged skin: An image processing approach[J]. *Micron* (Oxford, England: 1993), 2004, 35(3): 173-177.
- [25] LIN P, HWANG E, NGO H T T, *et al.* *Sambucus nigra* L. ameliorates UVB-induced photoaging and inflammatory response in human skin keratinocytes[J]. *Cytotechnology*, 2019, 71(5): 1003-1017.
- [26] WANG D D (王丹丹). Protective effects of three plant extracts on oxidative damage induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PC12 cells[D]. Ji'nan: Shandong Normal University (山东师范大学), 2016.
- [27] MO Q T (莫秋婷), LI M (李萌), WANG D D (王冬冬), *et al.* Evaluation of antioxidant and whitening efficacy of *Salvia* fermentation broth *in vitro*[J]. *Daily Chemical Industry* (日用化学工业), 2021, 51(10): 981-989.
- [28] WU X H (吴晓慧), ZHOU J (周洁), WANG Z (王峥), *et al.* Efficacy assessment of lightening cosmetics and their future prospect[J]. *Flavours & Fragrances Cosmetics* (香料香精化妆品), 2007, (3): 33-36.
- [29] WANG Y F, LI S W, HE R J, *et al.* Study on the chemical composition of was an cone and its inhibitory activity of tyrosinase[J]. *Nat Proud Res Dev*, 2021, 33: 1499-1505.
- [30] WANG N (王宁), HONG X Y (洪新宇), SHUAI Y (帅怡), *et al.* Application of chorioallantoic membrane vascular assay in safety evaluation of cosmetics[J]. *Modern Preventive Medicine* (现代预防医学), 2016, 43(22): 4163-4165, 4199.
- [31] HE L C (何立成), ZHU S M (朱社敏), XIE Z (谢珍), *et al.* Feasibility study of the chicken embryonic chorioallantoic membrane vascular test for the evaluation of ocular irritation in cosmetics[J]. *Modern Applied Pharmacy in China* (中国现代应用药学), 2017, 34(8): 1158-1162.