

研究报告

抑制黑色素合成的乳酸菌胞外多糖的筛选和性质研究

杨英歌^{1*} 黄继翔² 马凯³ 陈亮⁴

(1. 徐州生物工程职业技术学院 江苏 徐州 221000)

(2. 菏泽优科生物科技有限公司 山东 菏泽 274000)

(3. 江苏紫石微康生物科技有限公司 江苏 吴江 215200)

(4. 上海比金生物科技有限公司 上海 200120)

摘要:【目的】筛选可抑制黑色素合成的乳酸菌胞外多糖。【方法】通过观察凝乳拉丝外观筛选产胞外多糖的乳酸菌菌株,测量胞外多糖对 B16 黑色素瘤细胞黑色素合成和细胞活力的影响。对胞外多糖进行纯化,并通过 PMP 衍生-HPLC、红外光谱、抑制酪氨酸酶活性、抗氧化能力对其单糖组成和结构、作用机制进行研究。【结果】筛选到一株乳酸菌 *Lactobacillus rhamnosus* HLAB122,发酵产生的胞外多糖在 5 g/L 浓度下可使 B16 细胞黑色素产量下降至空白对照的 32.7%,且在 96 h 内对细胞活力无影响。纯化后的多糖由鼠李糖、葡萄糖、半乳糖构成,各单糖摩尔比为 1:5.44:5.37。该胞外多糖不抑制酪氨酸酶活力且抗氧化性微弱。【结论】*L. rhamnosus* HLAB122 产生的胞外多糖在个人护理产品中有潜在应用价值。

关键词: 乳酸菌,胞外多糖,抑制,黑色素

Screening and study on exopolysaccharide from lactic acid bacteria to inhibit melanin synthesis

YANG Ying-Ge^{1*} HUANG Ji-Xiang² MA Kai³ CHEN Liang⁴

(1. Xuzhou Vocational College of Bioengineering, Xuzhou, Jiangsu 221000, China)

(2. Heze BioUnique Biotechnology Co. Ltd., Heze, Shandong 274000, China)

(3. Jiangsu PurpleStone MicroHealth Biotechnology Co. Ltd., Wujiang, Jiangsu 215200, China)

(4. Shanghai Biogene Biotechnology Co. Ltd., Shanghai 200120, China)

Abstract: [Objective] To screen exopolysaccharide from lactic acid bacteria for inhibiting melanin synthesis. [Methods] Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria were screened by observing theropy appearance in skim milk media. Effects of exopolysaccharides on melanin synthesis and cell viability were measured on B16 melanoma cell. Exopolysaccharide was purified by chromatography columns of DEAE-52 cellulose and Sephadex G100. Monosaccharide composition and basic structural information were studied by PMP-HPLC and FT-IR method. Tyrosinase inhibiting activity and antioxidant activity were studied. [Results] Exopolysaccharide from *Lactobacillus rhamnosus* HLAB122 (LR122EPS) could inhibit melanin synthesis of B16 melanoma cell. Compared with the

*Corresponding author: E-mail: ygyang_1982@163.com

Received: March 31, 2016; Accepted: September 07, 2016; Published online (www.cnki.net): September 30, 2016

*通讯作者: E-mail: ygyang_1982@163.com

收稿日期: 2016-03-31; 接受日期: 2016-09-07; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-09-30

control, melanin production decreased to 32.7% at 5 g/L of LR122EPS, cell viability was not changed within 96 hours. Purified LR122EPS was composed of rhamnose, glucose, and galactose in a molar ratio of 1:5.44:5.37. LR122EPS could not inhibit tyrosinase activity and its antioxidation was weak.

[Conclusion] Exopolysaccharide LR122EPS had the potential in products to inhibit melanin synthesis.

Keywords: Lactic acid bacteria, Exopolysaccharide, Inhibit, Melanin

乳酸菌胞外多糖是一类在来源、结构、功能上具有高度多样性的胞外聚合物,胞外多糖可提高乳酸菌细胞抗逆性、抑制噬菌体感染^[1-2];在酸奶、奶酪等发酵食品中可改善产品的粘稠度、持水性等感官特性^[3];在人体健康和生理领域,乳酸菌胞外多糖具有抗氧化、抗肿瘤、免疫调节、介导细胞粘附等功能^[4-8]。拓展乳酸菌胞外多糖的应用范围,对乳酸菌胞外多糖的持续研究十分重要。以护肤品为代表的个人护理产品可作为一个新的应用方向,在个人护理产品中,减少皮肤中黑色素合成以改善肤色是消费者最关注的目标之一。目前用于个人护理产品的黑色素合成抑制剂多为熊果苷、酚类、曲酸、抗坏血酸等小分子化合物,多糖的研究报道相对较少。银耳多糖^[9]、绿茶多糖^[10]、日本扁柏多糖^[11]被认为可抑制黑色素合成而用于个人护理产品中,贻贝多糖 MJs 可抑制 B16 黑色素瘤细胞中黑色素合成^[12],分离自海藻的昆布多糖、裙带菜多糖可抑制酪氨酸酶活性,但未报道对黑色素合成的抑制效果^[13]。在乳酸菌胞外多糖中,仅报道过一种来自 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SBT0495 菌株的磷酸化胞外多糖可抑制 B16 细胞中黑色素合成^[14]。筛选可抑制黑色素合成的乳酸菌胞外多糖,有利于加深对乳酸菌胞外多糖的认识和新型皮肤护理成分的开发,提高实用化水平。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和细胞: *Lactobacillus bulgaricus*、*L. casei*、*L. rhamnosus*、*L. acidophilus*、*Streptococcus thermophilus* 共 89 株,均为徐州生物工程职业技术学院实验室保存; *Bifidobacterium lactis* B19、*B. longum* BL21 菌株由江苏紫石微康生物技术公司惠赠。小鼠黑色素瘤 B16 细胞株(下称 B16 细胞)由上

海比金生物科技有限公司惠赠。

1.1.2 主要试剂和仪器: CCK-8 试剂盒、蘑菇酪氨酸酶(500 U/mg)和多巴(L-DOPA),上海宝曼生物科技有限公司;蛋白胨、酵母浸粉,北京奥博星生物技术有限公司;葡聚糖凝胶 Sephadex G-100、纤维素 DEAE-52、DMEM 低糖培养液和新生牛血清(标准级),上海研生生化试剂有限公司;MRS 肉汤培养基,青岛海博生物技术有限公司;其余试剂为市售分析纯或生物试剂。1100 HPLC System,美国 Agilent 公司;Nicolet 6700 FT-IR 红外光谱仪,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;DHSPlateSmart 型 96 孔板离心机,北京鼎昊源科技有限公司。

1.1.3 培养基: MRS 平板为 MRS 肉汤培养基中补充琼脂 1.5% (质量比)。脱脂乳液体培养基:脱脂乳粉 15%,蛋白胨 0.5%,酵母浸粉 0.5% (质量比),pH 自然,0.067 MPa 灭菌 15 min,迅速冷却后使用。B16 细胞培养液:含 5% (体积比)新生牛血清的 DMEM 低糖培养液。

1.2 产胞外多糖菌株的筛选

待测菌株划线接种至 MRS 平板活化后接种至 MRS 肉汤培养基,37 °C 静置培养 24 h 后为种子液,以 3% (体积比)接种至脱脂乳液体培养基,37 °C 静置培养 24 h,用玻璃棒搅碎凝乳至均匀,观察凝乳状态并选择凝乳有拉丝的菌株。

1.3 胞外多糖的制备、纯化与结构分析

1.3.1 胞外多糖的制备: 种子液以 3% (体积比)接种至 MRS 液体培养基,37 °C 静置培养 24 h,培养液经离心除菌体、浓缩、Sevage 法除蛋白、乙醇沉淀、真空冷冻干燥获得胞外多糖粗提物^[15]。苯酚-硫酸法测量样品总糖含量^[16]。

1.3.2 胞外多糖的纯化: 胞外多糖粗提物以 10 g/L 溶于蒸馏水,上 DEAE-52 柱(2.6 cm×50 cm),依次

使用 0、0.1、0.3 和 0.5 mol/L NaCl 梯度洗脱, 每管收集 10 mL。苯酚-硫酸法跟踪多糖分布, 各主峰收集液合并冻干后测量对 B16 细胞黑色素合成的抑制效果。将活性峰部分以 10 g/L 溶于蒸馏水, 上 Sephadex G-100 柱(1.6 cm×100 cm), 0.2 mol/L NaCl 溶液洗脱, 每管收集 10 mL, 检测同上, 活性峰收集液合并冻干后得结构和性质研究用样品。

1.3.3 胞外多糖的结构分析: 使用 PMP (1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮) 衍生化-HPLC 方法测定单糖组成^[17], 以葡萄糖、甘露糖、核糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、半乳糖、木糖、阿拉伯糖、岩藻糖共 10 种单糖为标样。溴化钾压片后测量红外光谱(FT-IR)。

1.4 B16 细胞黑色素形成率与活力测定

B16 细胞培养环境为 5% CO₂ 气体环境下 37 °C 静置培养。取生长良好的 B16 细胞, 弃去培养液, 用 PBS 溶液清洗 2 次, 0.25% 胰酶消化 2–3 min 后吸去上液, 加入培养液吹打, 调节细胞浓度为 5×10^4 – 1×10^5 个/mL, 96 孔板中每孔加入 100 μ L, 培养 12 h 至细胞贴壁。黑色素形成率测定: 更换为含 3 g/L 胞外多糖粗品的培养液, 以不含胞外多糖的培养液为对照, 继续培养 56 h 后吸去培养液, 用 0.25% 胰酶消化后 1 500 r/min 离心 5 min 弃上清, 每孔加入含 10% (体积比) 二甲亚砜的 1 mol/L NaOH 溶液 200 μ L, 65 °C 水浴 1 h, 490 nm 下测吸光值 A ($n=5$)。黑色素产率(%)=试验组 A_{490} /对照组 $A_{490} \times 100$ 。细胞活力测定: 更换为含 1–5 g/L 胞外多糖的培养液, 分别培养 24、48、72、96 h 后每孔加入 CCK-8 溶液 10 μ L, 继续孵育 2 h 后测 450 nm 下吸光值 A ($n=5$)。以不含胞外多糖的培养液为对照, 以无细胞培养基为空白。细胞活力(%)=(试验组 A_{450} –空白 A_{450})/(对照组 A_{450} –空白 $A_{450}) \times 100$ 。

1.5 胞外多糖的酪氨酸酶抑制性和抗氧化性测定

蘑菇酪氨酸酶、多巴分别溶于磷酸盐缓冲液 (0.05 mol/L、pH 6.8) 配制为 500 U/mL 酪氨酸酶液、7.6 mmol/L 多巴溶液。在 700 μ L 磷酸盐缓冲液中依

次加入 50 μ L 酶液、100 μ L 待测液、150 μ L 多巴溶液, 混匀后 25 °C 水浴 20 min, 立即测量 475 nm 下吸光值。待测液中, 以磷酸盐缓冲液为空白, 含 2.5 g/L α -熊果苷的磷酸盐缓冲液为阳性对照, 胞外多糖以 10–50 g/L 浓度溶于磷酸盐缓冲液中, 反应体系中的终浓度为熊果苷 0.25 g/L, 胞外多糖为 1–5 g/L, 每种样品 3 个重复。酪氨酸酶活性抑制率(%)=(空白 A_{475} –试验组 A_{475})/空白 $A_{475} \times 100$ 。

测量胞外多糖的羟基自由基(\cdot OH)清除率、超氧阴离子自由基(\cdot O₂⁻)清除率^[18], 胞外多糖在反应体系中浓度为 1–5 g/L, 以不同浓度维生素 C 为阳性对照。

2 结果与分析

2.1 抑制黑色素合成的胞外多糖筛选

91 个乳酸菌菌株在含 15% (质量比) 脱脂乳粉的培养基中发酵, 12 个菌株的凝乳在搅拌均匀后有明显拉丝外观(图 1), 将其在 MRS 液体培养基中培养并提取制备胞外多糖粗品, 以 3 g/L 浓度加入 B16 细胞培养液, 培养 56 h 后测量黑色素形成率(表 1), 与空白对照组相比, *L. rhamnosus* HLAB122 菌株产生的胞外多糖粗品可使 B16 细胞的黑色素产率降低至 47.8%, 镜检可见 B16 细胞中黑色素颗粒明显减少(图 2); 苯酚-硫酸法测得其总糖含量为 92.43%, 证实为多糖。



图 1 *L. rhamnosus* HLAB122 菌株在脱脂乳液体培养基发酵后产生的拉丝现象

Figure 1 The ropy appearance of skim milk culture fermented by *L. rhamnosus* HLAB122

表 1 不同菌株的胞外多糖产率及胞外多糖粗品对 B16 细胞黑色素合成的影响

Table 1 The exopolysaccharide yields of strains and effect on melanin formation percentage of B16 cell

菌株 Strains	多糖产率 Exopolysaccharide yield (mg/L MRS)	黑色素形成率 Melanin formation percentage (%)
<i>L. bulgaricus</i> HLAB058	371.3	102.3±2.4
<i>L. casei</i> HLAB079	194.7	98.2±1.4
<i>L. casei</i> HLAB087	695.2	94.8±5.2
<i>L. casei</i> HLAB090	428.7	106.1±1.9
<i>L. rhamnosus</i> HLAB122	593.5	47.8±4.4
<i>L. rhamnosus</i> HLAB126	295.5	93.4±3.2
<i>L. acidophilus</i> HLAB184	598.2	103.9±1.4
<i>S. thermophilus</i> HLAB006	243.9	99.0±2.3
<i>S. thermophilus</i> HLAB023	1 028.3	82.6±5.7
<i>S. thermophilus</i> HLAB037	432.8	90.5±6.9
<i>B. lactis</i> B19	593.4	98.7±2.9

2.2 *L. rhamnosus* HLAB122 胞外多糖的纯化及分子结构

使用 DEAE-52 离子交换柱进行梯度洗脱, 在 0.3 mol/L NaCl 洗脱下得一主峰(图 3A), 多糖回收后处理 B16 细胞表明该峰为活性峰。继续使用 Sephadex G-100 柱处理得到单一峰(图 3B), 收集浓缩冻干后获得纯化多糖(下称 LR122EPS), 在 3 g/L

浓度下 B16 细胞的黑色素形成率为 44.9%±6.7%。

使用 PMP 衍生化-HPLC 方法鉴定单糖组成, LR122EPS 由鼠李糖、葡萄糖、半乳糖组成, 摩尔比为 1:5.44:5.37 (图 3D)。在 LR122EPS 的红外谱图中(图 3E), 3 423 cm^{-1} 的-OH 伸缩振动吸收峰和 2 900-3 000 cm^{-1} 的 C-H 的吸收峰为糖类的特征峰, 856.97 cm^{-1} 处有一吸收峰, 但与典型的 830 cm^{-1} (α -糖苷键)、890 cm^{-1} (β -糖苷键)有偏离, 尚不能确认糖苷键类型; 1 038-1 120 cm^{-1} 的 3 个峰提示吡喃糖苷的存在。

2.3 LR122EPS 对 B16 细胞黑色素合成的抑制及机制初探

LR122EPS 浓度与 B16 细胞黑色素合成呈负相关(图 4A), 5 g/L 的 LR122EPS 可使 B16 细胞的黑色素形成率降低至 32.7%, 但多糖浓度达到 4 g/L 后降低幅度趋缓; B16 细胞使用 1-5 g/L LR122EPS 处理 24-96 h, 细胞活力无变化(图 4B), 提示其具有良好的安全性。对于作用机制, 以 α -熊果苷、维生素 C 分别作为抑制酪氨酸酶活、抗氧化的阳性对照, 1-5 g/L 的 LR122EPS 对酪氨酸酶活性没有明显的抑制作用, 对 $\cdot\text{OH}$ 和 $\cdot\text{O}_2^-$ 的清除能力微弱(表 2), 提示 LR122EPS 可能通过抑制酪氨酸酶活性和抗氧化之外的作用机制来抑制黑色素的合成。

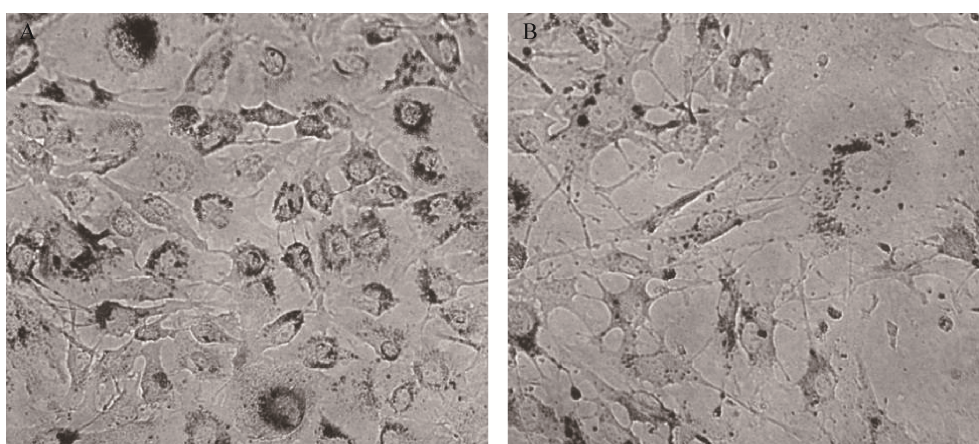
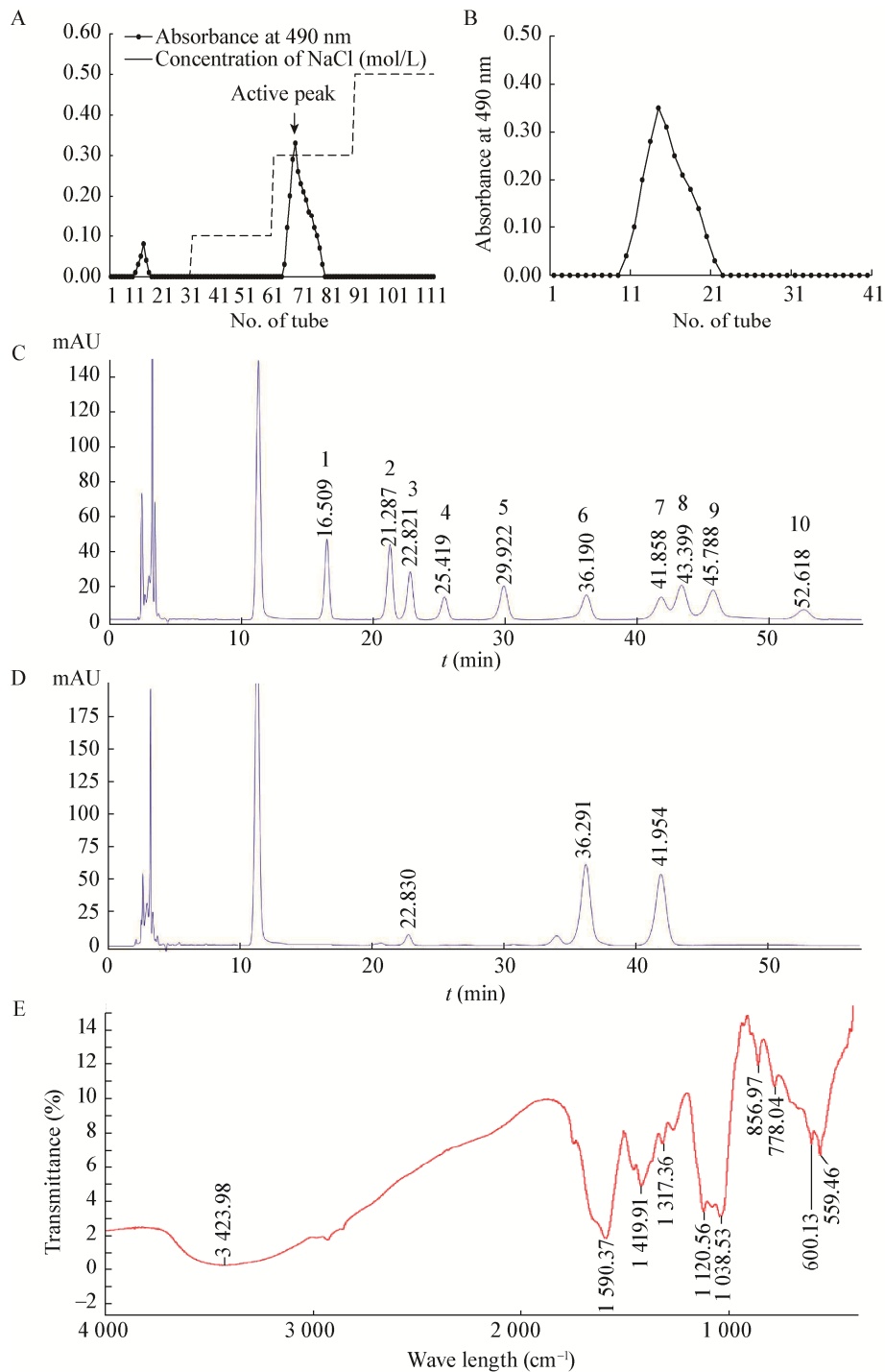


图 2 *L. rhamnosus* HLAB122 胞外多糖对 B16 细胞黑色素合成的影响(400×)

Figure 2 The effect of *L. rhamnosus* HLAB122 extracellular polysaccharide on melanin formation in B16 cells (400×)

注: A: 空白对照; B: 胞外多糖 3 g/L.

Note: A: Blank control; B: Exopolysaccharide from *L. rhamnosus* HLAB122 (3 g/L).

图3 *L. rhamnosus* HLAB122 胞外多糖的纯化与结构分析Figure 3 Purification and structural analysis of exopolysaccharide from *L. rhamnosus* HLAB122

注: A: DEAE-52 柱洗脱曲线; B: Sephadex G-100 柱洗脱曲线; C: 单糖标样色谱(1: 甘露糖; 2: 核糖; 3: 鼠李糖; 4: 葡萄糖醛酸; 5: 半乳糖醛酸; 6: 葡萄糖; 7: 半乳糖; 8: 木糖; 9: 阿拉伯糖; 10: 岩藻糖); D: LR122EPS 单糖组成色谱; E: LR122EPS 红外光谱。

Note: Elution curve of crude exopolysaccharide on DEAE-52 cellulose column (A) and Sephadex G-100 column (B); C: HPLC image of standard monosaccharide (1: Mannose; 2: Ribose; 3: Rhamnose; 4: Glucuronic acid; 5: Galacturonic acid; 6: Glucose; 7: Galactose; 8: Xylose; 9: Arabinose; 10: Fucose); D: HPLC image of monosaccharide from LR122EPS; E: FT-IR spectra of LR122EPS.

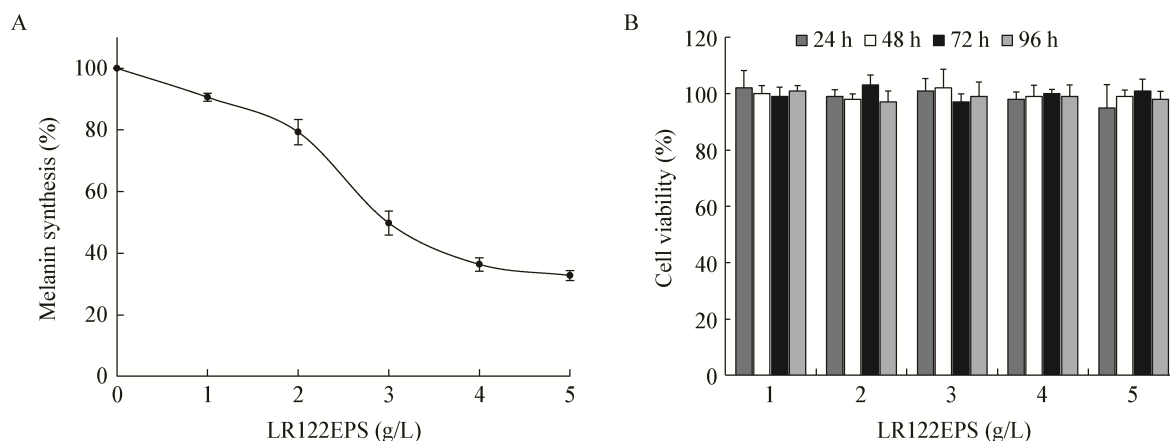


图4 LR122EPS对B16细胞的黑色素形成率(A)和细胞活力(B)的影响

Figure 4 The effect of LR122EPS on melanin synthesis (A) and cell viability (B) of B16 cell

表2 LR122EPS对酪氨酸酶活性的影响及自由基清除能力
Table 2 The inhibition effect on tyrosinase and radical scavenging ability of LR122EPS

样品 Sample	剂量 Dosage (g/L)	酪氨酸酶活性抑制率 Inhibition percentage on tyrosinase (%)	·OH 清除率 ·OH scavenging percentage (%)	·O ₂ ⁻ 清除率 ·O ₂ ⁻ scavenging percentage (%)
LR122 胞外多糖	1.00	2.4±0.3	1.64±0.39	2.48±0.62
LR122EPS	2.00	1.9±1.2	1.57±0.28	3.25±0.37
	3.00	3.1±0.6	1.93±0.45	5.08±0.26
	4.00	2.1±1.0	3.22±0.58	5.19±0.67
	5.00	2.7±0.9	4.18±0.25	6.39±0.72
α-熊果苷 α-Arbutin	0.25	54.3±0.7	14.60±0.47	27.40±0.54
维生素 C Vitamin C	0.10	20.5±0.4	29.70±0.14	52.10±0.57
	0.20	32.9±1.1	53.80±0.19	69.30±0.33

3 讨论

乳酸菌胞外多糖的生理功能是目前研究的热点,主要集中在免疫调节、抗肿瘤等方向,但受限于药品开发所需的功效、性价比、投入需求等多方面因素的制约,鲜见基于乳酸菌胞外多糖的医药产品获得市场层面的实际应用,因此拓展新的应用领域对于乳酸菌胞外多糖研究的实用化十分重要。以护肤品为代表的个人护理产品是一个新方向,其技术基础与生物医药类似而进入门槛较低,更有利于乳酸菌胞外多糖研究的实用化。对人体皮肤外观的

研究表明,皮肤的色泽和色度特点是影响表观年龄的重要因素^[19],以东亚国家为代表的东方审美观更看重肤色。影响肤色的最主要因素是表皮中黑色素颗粒的形态和数量,黑色素颗粒由表皮基底层中的黑色素细胞合成并分泌,其主要成分是酪氨酸经酪氨酸酶系多步催化聚合而成的黑色素^[20],减少表皮中黑色素的合成可使肤色在观感上更为白皙。能够抑制黑色素合成的乳酸菌胞外多糖将有良好的应用前景。

筛选获得产胞外多糖的乳酸菌菌株是研究乳

酸菌胞外多糖结构和功能的基础, 由于菌株特性和产多糖条件的多样性, 尚未有准确便捷的初筛方法, 已报道的筛选方法包括观察菌落外观^[21]、钉红平板法^[22]、观察凝乳质构^[23]等。观察凝乳质构方法的理论基础为: 乳酸菌在发酵过程中产生的胞外多糖分散在酪蛋白因 pH 降低而形成的网络结构中, 搅拌使酪蛋白网络结构破坏, 乳清及溶解在其中的胞外多糖形成连续相。胞外多糖的高分子特性使其具有拉丝外观^[24-25]。使用该方法筛选到 12 个乳酸菌菌株, 在小鼠黑色素瘤 B16 细胞模型上, *L. rhamnosus* HLAB122 产生的胞外多糖对黑色素形成的抑制效果最大, 3 g/L 时黑色素产率为空白对照的 47.8%。

对 *L. rhamnosus* HLAB122 产生的胞外多糖使用 DEAE-52 离子交换柱和 Sephadex G-100 柱进行处理, 得到纯化的胞外多糖 LR122EPS。其单糖组成为鼠李糖、葡萄糖、半乳糖, 摩尔比为 1:5.44:5.37, 与已知组成的乳酸菌胞外多糖不同^[3], 是一种未见报道的单糖组成模式; 其红外光谱仅能确认为含有吡喃糖苷的多糖。从单糖组成和红外光谱得到的信息有限, 不能更多地阐明 LR122EPS 的结构。

对 LR122EPS 的进一步研究表明其具有良好的安全性, 5 g/L 浓度下培养 96 h 对 B16 细胞活力无影响。来自 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SBT0495 的胞外多糖^[14], 在 B16 细胞模型中, 0.5%–1.0% 多糖处理组的黑色素产率约为空白对照的 80%–55%, 但细胞活力同时下降约 12%–35%。LR122EPS 在功效和安全性上均优于该胞外多糖, 具有良好的应用前景。

细胞中黑色素的合成包括多个步骤, 可针对的靶点较多, 因此抑制黑色素合成的活性成分在作用机制上具有高度多样性, 例如氢醌对黑色素细胞具有细胞毒作用, 曲酸通过螯合 Cu^{2+} 抑制酪氨酸酶活性, 熊果苷等含酚羟基的化合物通过竞争性结合抑制酪氨酸酶活性, 抗坏血酸、半胱氨酸等通过抗氧化性抑制黑色素合成等; 已知作用机制的活性成分多为小分子化合物, 高分子多糖抑制黑色素合成的

研究少见报道。银耳胞外多糖可抑制酪氨酸酶活性^[9], 绿茶多糖和日本扁柏多糖的作用机制未知^[10-11]。分离自贻贝蒸煮液的多糖 MJPs 具有强烈的抗氧化性和免疫调节活性, 可抑制 B16 细胞中黑色素合成且无细胞毒性^[12]。分离自海藻的昆布多糖、裙带菜多糖可抑制酪氨酸酶活性^[13]。LR122EPS 在 1–5 g/L 浓度下对 B16 细胞活力无影响, 表明无细胞毒作用; 在体外测试中对酪氨酸酶活性无明显抑制作用, 对 $\cdot\text{OH}$ 和 $\cdot\text{O}_2^-$ 自由基的清除能力微弱; 其作用机制尚待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Hong SH, Marshall RT. Natural exopolysaccharides enhance survival of lactic acid bacteria in frozen dairy desserts[J]. Journal of Dairy Science, 2001, 84(6): 1367-1374
- [2] Broadbent JR, McMahon DJ, Welker DL, et al. Biochemistry, genetics, and applications of exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*: a review[J]. Journal of Dairy Science, 2003, 86(2): 407-423
- [3] de Vuyst L, Degeest B. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria[J]. FEMS Microbiology Reviews, 1999, 23(2): 153-177
- [4] Gu XM, Kong J, Wang FS, et al. Exopolysaccharide I (EPS I) purified from a strain of lactic acid bacterium Z₂₂₂ and studying on the effect of EPS I on the immunofunction of mice planted with S₁₈₀[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2003, 43(2): 251-256 (in Chinese)
顾笑梅, 孔健, 王富生, 等. 一株乳酸菌所产胞外多糖对荷瘤小鼠机体免疫功能影响的研究[J]. 微生物学报, 2003, 43(2): 251-256
- [5] Li WX, Chen Q, Li PL, et al. Study on immunoregulation effect of exopolysaccharide produced by *Bifidobacterium* spp.[J]. Microbiology China, 2009, 36(6): 931-935 (in Chinese)
李伟欣, 陈倩, 李平兰, 等. 一种双歧杆菌胞外多糖免疫调节功能研究[J]. 微生物学通报, 2009, 36(6): 931-935
- [6] Chen X, Jiang HR, Yang YM, et al. Effect of exopolysaccharide from *Bifidobacterium bifidum* on cell of gastric cancer and human telomerase reverse transcriptase[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2009, 49(1): 117-122 (in Chinese)
陈旭, 江虹锐, 杨艳梅, 等. 两歧双歧杆菌胞外多糖对胃癌细胞及端粒酶逆转录酶的影响[J]. 微生物学报, 2009, 49(1): 117-122
- [7] Li C, Wang CF, Yang GL. Progress in intestinal adhesion and immunoregulatory effect of extracellular polysaccharides of lactic acid bacteria[J]. Food Science, 2014, 35(11): 314-318 (in Chinese)
李超, 王春风, 杨桂连. 乳酸菌胞外多糖肠道黏附及免疫调节作用研究进展[J]. 食品科学, 2014, 35(11): 314-318
- [8] Welman AD, Maddox IS. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges[J]. Trends in Biotechnology, 2003, 21(6): 269-274
- [9] Yand SH, Liu HI, Tsai SJ. Edible tremella polysaccharide for skin care: U.S., 11/095,525[P]. 2005-4-1. <https://www.google.com/patents/US20060222608>
- [10] Kwon SS, Yeom MH, Kim DH, et al. Method for preparing polysaccharide of green tea and cosmetic composition for skin whitening, moisturization and anti-wrinkle effects comprising

- the polysaccharide: U.S., 14/450, 349[P]. 2014-8-4. <https://www.google.com/patents/US20140341827>
- [11] Yeom MH, Park WS, Kim DH, et al. Composition containing *Chamaecyparis obtusa* polysaccharides to be externally applied to the skin: U.S., 13/319,765[P]. 2010-5-27. <https://www.google.com/patents/US20120065159>
- [12] Chen JB. Isolation, purification, structure analysis and activity study of water soluble polysaccharide from mussel cooking liquor[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang Gongshang University, 2008 (in Chinese)
陈静波. 贻贝蒸煮液水溶性多糖的分离纯化, 结构分析和活性研究[D]. 杭州: 浙江工商大学硕士学位论文, 2008
- [13] Kang YY, Zhang MY, Xing SJ, et al. Toxicity and lightening effects of several natural active products on melanocytes[J]. China Surfactant Detergent & Cosmetics, 2005, 35(6): 361-363,379 (in Chinese)
康琰琰, 张美英, 邢少璟, 等. 几种天然活性物对黑色素细胞毒性及美白功效的比较[J]. 日用化学工业, 2005, 35(6): 361-363,379
- [14] Koji I, Morimasa T, Seiji K, et al. Skin-beautifying agent: Japan, 09-249524[P]. 1997-9-22. https://www19.j-platpat.inpit.go.jp/PA1/html/input_e.html
- [15] Ouyang QB, Li PL, Li WX, et al. Isolation and purification of exopolysaccharides produced by *Bifidobacterium* sp. 22-5[J]. Food and Fermentation Industries, 2005, 31(6): 127-130 (in Chinese)
欧阳清波, 李平兰, 李伟欣, 等. 双歧杆菌 22-5 胞外多糖(EPS)的分离、纯化及纯度鉴定[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(6): 127-130
- [16] Zhang WJ. Biochemical Research Technology of Glycoconjugate[M]. 2nd Edition. Hangzhou: Zhejiang University Press, 1999 (in Chinese)
张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 第 2 版. 杭州: 浙江大学出版社, 1999
- [17] Wang W, Wang XQ, Ye H, et al. Optimization of extraction, characterization and antioxidant activity of polysaccharides from *Brassica rapa* L.[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 82: 979-988
- [18] Yuan JF, Cai H, Shan XY, et al. Isolation and purification of exopolysaccharide from the fermentation broth of *Bacillus* sp. And its antioxidant effect[J]. Microbiology China, 2009, 36(10): 1466-1470 (in Chinese)
袁建锋, 蔡恒, 单咸旻, 等. 一株芽孢杆菌胞外多糖的分离纯化及其抗氧化性测定[J]. 微生物学通报, 2009, 36(10): 1466-1470
- [19] Daniel W. Latest skin care development analysed[A]//Caroline J. Cosmetic Science Technology 2012[M]. Hertfordshire: T4 International, 2013: 151-154
- [20] Verschoore M, Liu W, Zhen YX. Basic Science for Modern Cosmetic Dermatology[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2011 (in Chinese)
Verschoore M, 刘玮, 甄雅贤. 现代美容皮肤科学基础[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011
- [21] Tian FW, Ding HS, Ding N, et al. Fast screening and identification of exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria[J]. Food and Fermentation Industries, 2008, 34(3): 15-19 (in Chinese)
田丰伟, 丁虎生, 丁纳, 等. 产胞外多糖的乳酸菌的简便筛选与鉴定[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(3): 15-19
- [22] Stingle F, Neeser JR, Mollet B. Identification and characterization of the eps (Exopolysaccharide) gene cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6[J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178(6): 1680-1690
- [23] Ruas-Madiedo P, de los Reyes-Gavilán CG. Invited review: methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria[J]. Journal of Dairy Science, 2005, 88(3): 843-856
- [24] Hassan AN, Frank JF, Qvist KB. Direct observation of bacterial exopolysaccharides in dairy products using confocal scanning laser microscopy[J]. Journal of Dairy Science, 2002, 85(7): 1705-1708
- [25] Hassan AN, Ipsen R, Janzen T, et al. Microstructure and rheology of yogurt made with cultures differing only in their ability to produce exopolysaccharides[J]. Journal of Dairy Science, 2003, 86(5): 1632-1638