

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(2):197-203; 4 February 2010
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

一株具有抑制单胺氧化酶作用的干酪乳杆菌筛选

王豪, 郭本恒^{2*}, 吴正钧², 王荫榆²

(¹ 上海海洋大学食品学院, 上海 201306)

(² 光明乳业股份有限公司技术中心, 上海 200436)

摘要:【目的】通过体外模型从健康人体粪便内分离筛选出具有抑制单胺氧化酶(MAO)活性的乳酸菌,为今后乳酸菌体内抗衰老的研究提供参考。【方法】采用单胺氧化酶体外抑制模型对乳酸菌的发酵上清及无细胞提取物进行了筛选,并对筛选出的样品进行了两种指标的测定,即样品的剂量效应,以及样品与酶的预保温时间对酶活抑制率的影响;同时利用膜分离技术对不同分子量范围的样品进行了MAO的抑制测定。以筛选出的菌株JH-23为目的菌,通过16S rDNA序列分析及API细菌鉴定系统对菌株进行鉴定。【结果】筛选出的菌株JH-23无细胞提取物对MAO的抑制率达到33.7%。样品经冻干后,在反应浓度为16 mg/mL时抑制率达到53.2%,且MAO抑制率随预保温时间的增加而上升,在30 min之后抑制效果趋于平稳;粗样品经48 h透析后,透析液中的MAO抑制率较透析前明显升高。菌株JH-23的鉴定结果显示其属于干酪乳杆菌。【结论】开发了一种以单胺氧化酶作为靶位酶的新式体外筛选模型,该模型方便快捷且灵敏性高,对之后的抗衰老体内研究有所帮助。筛选出的干酪乳杆菌JH-23细胞裂解物对MAO有抑制作用,其中起到MAO抑制作用的主要是细胞内的小分子类物质。

关键词: 乳酸菌;单胺氧化酶;体外筛选模型

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 02-0197-07

人口老化是21世纪人类面临的一个主要难题。与衰老有关的疾病,比如老年痴呆症、帕金森氏综合症等,已逐渐成为人类健康的大敌和社会繁荣的沉重负担。当前,能提供益生作用,控制老化和延长寿命的功能性食品越来越受到青睐。已有部分研究指出,一些功能性物质如异黄酮等具有抗衰老的功效^[1-3],而牡荆素则可以通过其抗氧化活性来发挥其抗衰老效果^[4]。在各种具有潜在抗衰老作用的物质中,益生菌作为一种食用安全菌,其是否具有抗衰老的功效是很值得我们去深入研究的。

近年来关于益生菌降血脂、抗高血压、降胆固醇等功能性作用已得到证实,但对于益生菌的抗衰老作用研究的很少。其实早在1905年,著名的微生物学家梅契尼科夫就发现保加利亚人饮用乳酸菌发酵的酸奶可以长寿,一般认为益生菌的抗衰老作用是因为菌体产生超氧化物歧化酶(SOD),通过清除体内代谢过程中产生的过量超氧阴离子自由基来达到延缓衰老的效果;同时产生乳酸抑制了肠道腐败菌的生长,从而减少了这些细菌所产生的毒胺、胺基质、氨、硫化氢等致癌物质和其它毒性物质,使机体衰老过程变得缓慢^[5]。但目前益生菌的抗衰老研究大多集中于动物或人体试验,还未见有益生菌的体外抗衰老的研究报道,这可能是由于衰老的发生机制与生理生化改变比较复杂,故体外抗衰老的功能评价缺乏简单的衰老指标。

本实验首次以单胺氧化酶作为筛选靶位酶,建

基金项目: 国家科技支撑计划“十一五”奶业重大专项(2006BAD04A14)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-21-66318962; E-mail: guobenheng@brightdairy.com

作者简介: 王豪(1984-),男,上海人,硕士研究生,主要从事乳品微生物研究。E-mail: wanghao840818@126.com

收稿日期: 2009-07-30; **修回日期:** 2009-09-24

立了具有抑制单胺氧化酶的益生菌体外筛选模型,可为今后的益生菌抗衰老研究提供较为客观的指导性作用。单胺氧化酶(monoamine oxidase, MAO, EC 1.4.3.4)属黄素蛋白酶类,此酶存在于肝、脑、肾等组织细胞的线粒体中,与线粒体结合紧密且定位较好,一般认为在正常的肝细胞质内 MAO 活性最强^[6]。MAO 在机体内的主要功能是催化内源性和外源性单胺类物质的代谢。MAO 的含量从 45 岁起随年龄增加而急剧增加,因此被认为是老化的标志,故又称之为老化相关酶,该酶活性的不断升高会引起整个机体逐步衰老^[7]。据报道,帕金森病、老年痴呆病以及近年来都市中较为流行的抑郁症等病理性衰老疾病均与 MAO 活性异常有关^[8-9],说明 MAO 与衰老有密切关系。

MAO 抑制剂意味着有潜在的抗衰老作用,利用该体外模型对益生菌中具有体外抑制 MAO 的活性成分进行筛选,筛选出的 MAO 抑制剂可采用衰老动物模型加以验证,从而有利于对抗衰老的作用机理进行深入研究。

1 材料和方法

1.1 实验菌种

取样于健康人体粪便以及光明乳业技术中心保藏的菌种。

1.2 主要试剂和仪器

单胺氧化酶(自制);犬尿胺(Sigma 公司);TIANamp 基因组 DNA 提取试剂盒;MRS 固体培养基及液体培养基(Merck 公司);其它为实验室常规分析纯化学试剂。KAT25 高速组织分散机(德国 IKA 公司),Avanti J30I 高速冷冻离心机(Beckman Coulter 公司),APV1000 型高压均质机(丹麦 APV 公司),真空冷冻干燥机(Labconco 公司),SPECORD 205 型紫外分光光度计(德国耶拿公司)。

1.3 乳酸菌的分离

从健康人体的粪便中取样,用无菌 PBS 缓冲液进行 10 倍梯度稀释,取 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 四种稀释度涂布于 MRS 筛选琼脂平板上,37℃ 厌氧培养 36-72 h 后,挑选单菌落,划线纯化,挑单菌落转接到无菌 MRS 液体培养基,37℃ 培养 24 h,再按 1% 接种量转接到无菌 MRS 液体培养基中扩培(37℃, 24 h),重复 3 次,作为实验菌株。转接过程中所有的平板和液体管 4℃ 保存。

1.4 待筛样品的制备

实验菌株经活化 3 代后,1% 接种量转接于灭菌

MRS 液体培养基中,37℃ 厌氧培养 24 h 后,4℃, $11325 \times g$ 离心 15 min,分别收集发酵上清及菌体。发酵上清采用 1 mol/L NaOH 调节 pH 值至 7.6 左右,4℃ 保存;菌体经 PBS(20 mmol/L, pH 7.6)洗涤 3 次,重悬浮于 PBS,高压均质(25000 psi)破碎细胞后,4℃, $17,418 \times g$ 离心 15 min,收集上清液,即为无细胞提取物(CFE),4℃ 保存。

1.5 单胺氧化酶的制备

单胺氧化酶从 Wistar 老龄大鼠的肝脏匀浆中提取,具体方法详见参考文献[10]

1.6 单胺氧化酶抑制剂活性的测定

参考 Weissbach^[11] 等和 Schmidt^[12] 等方法改进,用上述制备的酶液 50 μL 先和 100 μL 供试样品于 37℃ 条件下保温 30 min,结束后向其中加入浓度为 1 mmol/L 的底物犬尿胺 100 μL 及磷酸钾缓冲液(0.2 mol/L, pH 7.6)750 μL ,总反应体系 1 mL,混匀 30 s。在 360 nm 波长下,测定开始时底物和酶样品混合液的吸光值(A_1),37℃ 保温 60 min 后再测其吸光值(A_2);空白对照的吸光值(ΔA_0)是以 100 μL 的样品溶剂代替待测样品。最后按下述公式计算:

$$\text{Monoamine oxidase inhibitory rate (\%)} = 1 - [(A_1 - A_2) / \Delta A_0] \times 100\%$$

1.7 单胺氧化酶抑制剂量效关系

筛选出的样品经真空冷冻干燥,冻干后的样品称重并保存于干燥器内。取冻干后的样品粉末按一定梯度配成不同浓度的溶液,参照 1.6 的方法测定不同浓度下,样品对单胺氧化酶的抑制率。

1.8 不同条件对单胺氧化酶抑制率的影响

1.8.1 不同预保温时间:吸取样品溶液 100 μL (反应浓度为 16 mg/mL)与 50 μL 单胺氧化酶在 37℃ 下分别温育 10、20、30、40、50 min。之后向其中加入浓度为 1 mmol/L 的底物犬尿胺 100 μL 及磷酸钾缓冲液(0.2 mol/L, pH 7.6)750 μL ,测定流程与 1.6 相同。

1.8.2 不同分子量范围的菌株 CFE:称取菌株 JH-23 的 CFE 冻干粉,配制成 70 mg/mL 的水溶液,利用 Cellu·Sep® H1-1KD 的透析袋对该样品溶液进行去离子水透析(4℃, 48 h),透析前截留液为 5 mL,70 mg/mL 的样品溶液,透析液为 100 mL 去离子水。透析后将截留液和透析液分别旋转蒸发浓缩至约 5 mL,然后测定其对单胺氧化酶的抑制率。

1.9 菌株鉴定

1.9.1 菌落和菌体形态以及液体培养特征观察:分

离纯化后的实验菌株在 MRS 平板划线分离,37℃ 厌氧培养 48 h,观察菌落形态;实验菌株按 1% 接种量接到 MRS 液体中,37℃ 培养 24 h,观察液体生长情况;接种环挑取 6 h 培养液到载玻片涂片,革兰氏染色,显微镜观察菌体形态并摄影记录。

1.9.2 生长曲线的测定^[13]:活化好的菌株按 1% 接种量分别接于 200 mL MRS 及 10% 脱脂奶粉液体培养基(SKM)中,37℃ 恒温培养 24 h,每隔 2 h 测定培养液中的活菌数和 pH 值。发酵液 pH 值用 pH 计测定,活菌数采用平板计数法,以活菌数对数值和 pH 值对时间作图得到菌株的生长曲线。

1.9.3 筛选菌株的属种鉴定:分别采用 16S rDNA 分子生物学和碳水化合物发酵实验对菌株进行鉴定。

①16S rDNA 基因序列分析:PCR 扩增反应采用 25 μL 体系,反应条件:95℃ 5 min;95℃ 0.5 min,

56℃ 1 min,72℃ 1.5 min,35 个循环;72℃ 10 min。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测后送至 Invitrogen 公司测序。序列的同源性在 GenBank 数据库中使用 BLAST 工具进行比较并确定待测细菌的分类地位。

②碳水化合物实验:按法国梅里埃(bioMérieux)公司的细菌鉴定产品 API 50 CH 使用手册,采用 API 50 CH 试剂盒试剂中 API CHL 培养基进行 49 种碳水化合物的发酵试验。

2 结果和分析

2.1 抑制单胺氧化酶的益生乳酸菌筛选

活化 3 代的菌株按 1% 接种量转接到 MRS 液体培养基中,37℃ 厌氧培养 24 h,测定菌株 MRS 发酵上清及菌体无细胞提取物对单胺氧化酶的抑制率,部分结果如图 1 所示。

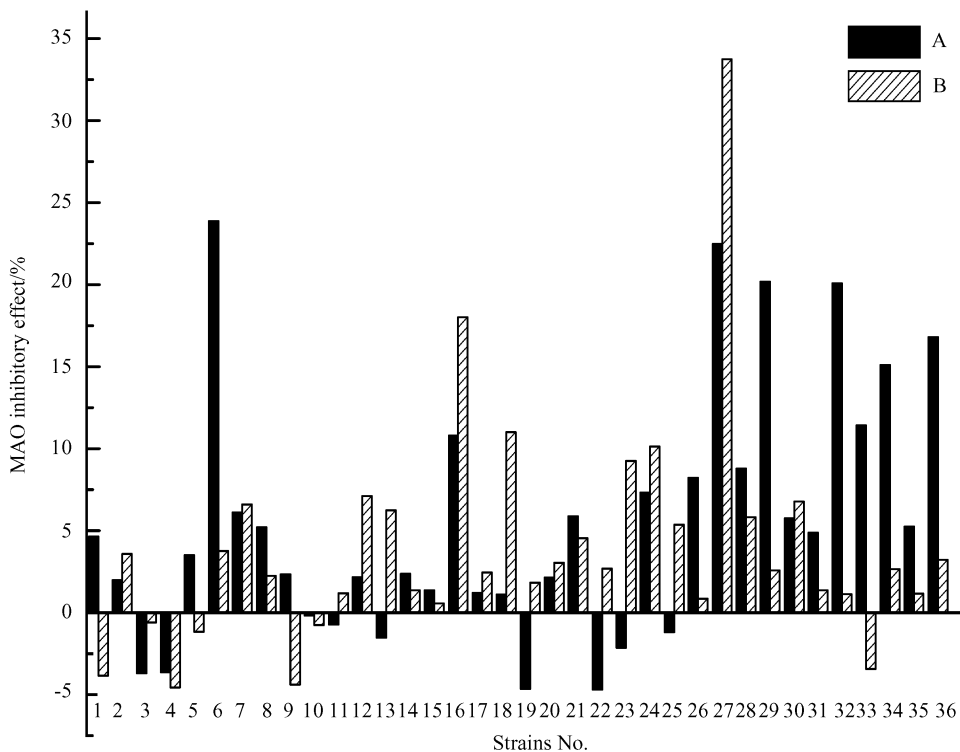


图 1 菌株 MRS 发酵上清(A)和菌株无细胞提取物(B)对单胺氧化酶的抑制效果

Fig. 1 MAO inhibitory effect of fermented MRS supernatant from screened strains (A) and cell-free extracts from screened strains (B).

从图 1-A 可以看出,多数乳酸菌的发酵 MRS 上清对单胺氧化酶的抑制率在 25% 以内,其中有少数菌种出现促进单胺氧化酶活性的作用(单胺氧化酶抑制率为负者)。在这 36 株实验菌株中,其中有 6 株表现出较好的单胺氧化酶抑制作用,它们分别是 6 号菌株(ST-III,抑制率 23.87%)、27 号菌株(JH-23,抑制率 22.46%)、29 号菌株(JH30,抑制率

20.18%)、32 号菌株(BD-II,抑制率 20.08%)、34 号菌株(LGG,抑制率 15.10%)和 36 号菌株(FF82,抑制率 16.80%)。

从图 1-B 可看出,多数菌株的无细胞提取物(CFE)对单胺氧化酶的抑制率在 10% 以内,但也有少数乳酸菌 CFE 对单胺氧化酶的活性抑制效果较为明显,例如 16 号菌株(Pro-5,抑制率 18.02%)及

27 号菌株 (JH-23, 抑制率 33.73%)。

综合乳酸菌的 MRS 发酵上清和 CFE 对单胺氧化酶的抑制结果,可以看出 MRS 发酵上清的抑制效果普遍要高于 CFE 的抑制效果。这可能是因为在发酵过程中,乳酸菌胞外抑制 MAO 的活性物质较胞内活性更强,菌体分泌的 MAO 抑制性产物扩散至胞外所致。在这两项筛选结果中发现,乳酸菌 JH-23 的 CFE 比其它菌株的发酵上清及 CFE 有更为明显的单胺氧化酶抑制效果,抑制率为 33.73%,因此选定菌株 JH-23 的 CFE 作为合适的单胺氧化酶抑制剂,针对这株具有抑制老化相关酶的益生乳酸菌,进行以下的实验研究。

2.2 菌株 JH-23 的 CFE 对单胺氧化酶活性抑制的量效关系

菌株 JH-23 的无细胞提取物经冻干后,以不同反应浓度:1、2、4、8、16 mg/mL 与单胺氧化酶在 37 °C 水浴下温育。结果显示(图 2),随着抑制剂浓度的增大,单胺氧化酶的抑制率呈明显的上升趋势,有明显的剂量效应。当样品终浓度达到 16 mg/mL 时,抑制率升至 53.18%,说明菌株 JH-23 的 CFE 对 MAO 的体外抑制效果较为显著。

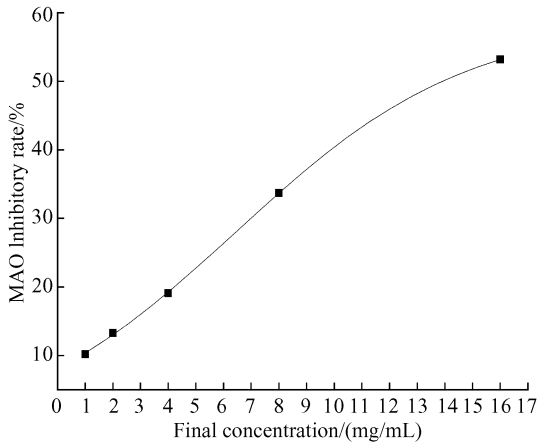


图 2 JH-23 无细胞提取物对 MAO 的量效抑制关系

Fig. 2 Dose-dependent inhibitory actions of cell-free extracts of JH-23 on monoamine oxidase.

抑制剂终浓度增至 16 mg/mL 后之所以不再继续增大浓度是因为此时的单胺氧化酶抑制效果已经明确,虽然继续增大抑制剂浓度还可能加大 MAO 的体外抑制率,但是并不一定能反映在动物实验上,后续工作将着重在动物体内的 MAO 抑制效果的研究上。需注意的是此酶在体内的抑制不宜过高,这是由于单胺氧化酶涉及到人体神经系统的调控作用,如果抑制作用过大,则会造成神经递质多巴胺含量的增多,容易出现呼吸加速,心律失常等

现象;同时,在进食富含单胺类的物质后,会导致体内单胺大量吸收而造成血压急剧上升^[14]。

在量效关系图中发现,虽然单胺氧化酶的抑制作用较为理想,但是所对应的抑制剂浓度偏高,这是由于 CFE 粗提物中发挥 MAO 抑制作用的活性成分还未经过分离纯化,其中还含有其它杂质所致。今后,降低抑制剂的反应浓度是实验中急需解决的问题,以期能最终应用到工业化生产中。

2.3 抑制剂和单胺氧化酶的不同预保温时间对该酶抑制率的影响

预保温实验是了解物质作用机制与物质作用靶标常用的方法之一。如图 4 所示,样品与 MAO 的预保温时间在前 30 min 内,单胺氧化酶抑制率呈急剧上升的趋势,抑制率提高了近 2.5 倍,在 30 min 之后趋于平稳,抑制率维持在 54% 左右。表明在添加底物犬尿胺之前,将抑制剂与酶在 37 °C 下预先温育能显著提高单胺氧化酶的抑制率,此酶是 JH-23 无细胞提取物发挥抑制作用的一个靶子。

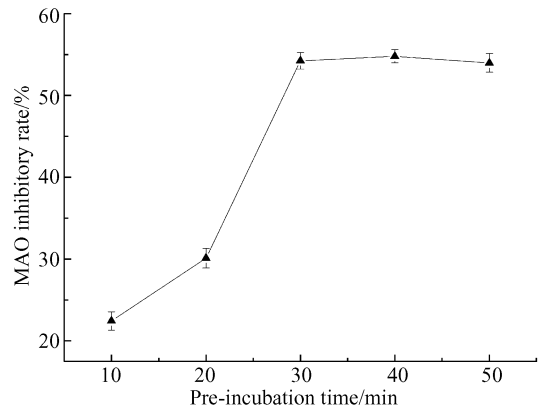


图 3 不同预保温时间下 JH-23 无细胞提取物对 MAO 的抑制影响

Fig. 3 Effects of different pre-incubation time on MAO inhibition of CFE from JH-23.

2.4 不同分子量范围的 CFE 对单胺氧化酶的抑制影响

上述实验均采用的是菌株 CFE 的粗提物,未能对其中发挥 MAO 抑制作用的活性成分进行分类,因此考虑采用膜分离技术对样品进行初分。实验中利用 Cellu · Sep® H1-1KD 的透析袋对该样品溶液进行了去离子水透析(4 °C, 48 h),透析后将截留液和透析液分别旋转蒸发浓缩至约 5 mL,测定截留液和透析液中的单胺氧化酶抑制率。

从表 1 中可以看出,经过 48 h 透析后,透析液中单胺氧化酶抑制率明显增大,说明在 JH-23 的细胞裂解物中,对单胺氧化酶起抑制作用的主要是小

分子类物质(MWCO < 1 KD),而截留液中单胺氧化酶抑制率降低了约 20%,说明细胞裂解物中诸如蛋白和核酸等大分子物质对单胺氧化酶的抑制作用并不明显,由此可确定起抑制作用的是细胞中的小分子产物。透析液经真空冷冻干燥后得到淡黄色的干粉状物质,质量为 34.6 mg。

表 1 透析前后 CFE 的截留液和透析液对 MAO 抑制率的变化

Table 1 The variation of MAO inhibition generated by retentates and dialysates of cell-free extracts before and after dialysis

Treated	MAO inhibitory rate(%)	
	Retentates (MWCO > 1 KD)	Dialysates (MWCO < 1 KD)
Pre-dialysis	30.20%	0.02%
Post-dialysis(48 h)	10.07%	28.79%

2.5 抑制单胺氧化酶的菌株 JH-23 的菌种鉴定结果

2.5.1 JH-23 菌落和菌体形态以及液体培养特征观察:菌株 JH-23 在 MRS 平板上划线分离,37℃ 厌氧培养 48 h,菌株生长良好,其菌落大小 0.3 mm - 2 mm。菌落圆形,边缘整齐,正面凸起,乳白色,不透明,表面湿润光滑。菌体革兰氏染色显示 JH-23 为 G⁺,杆状细菌,不产芽孢,菌体大小为 0.4 μm - 1.0 μm 宽,2 μm - 8 μm 长。

JH-23 实验菌株在液体 MRS 中培养,4 h 左右培养液开始浑浊并伴有菌体细胞沉淀物产生,12 h 左右生长物均匀浑浊,轻轻摇动没有气泡产生,16 h 有大量菌体沉淀,沉淀结构疏松,24 h 乳白色沉淀明显。

2.5.2 JH-23 生长曲线的测定:菌株 JH-23 接种于 MRS 液体培养基和 SKM 中,37℃ 恒温培养 24 h,其产酸及活菌数变化见图 4。

图 4-A 显示,在 MRS 培养基中,JH-23 在 2 h 进入对数生长期,12 h 左右进入稳定期。进入稳定期前,随着培养时间的增加,pH 不断降低。进入稳定期后,pH 下降趋势渐缓。说明稳定期 JH-23 仍在生长,只是生长和死亡形成动态平衡^[15],24 h 培养结束,pH 值为 3.70,培养液中 JH-23 活菌浓度为 1.01×10^9 CFU/mL;但是 JH-23 在 SKM 培养基中生长较缓慢,如图 4-B 所示,JH-23 起始菌数为 1.47×10^7 CFU/mL,24 h 培养后菌数为 2.82×10^8 CFU/mL,JH-23 在 SKM 中的产酸能力很弱,16 h 以后 pH 保持在 5.8 左右,24 h 培养后未凝乳。

2.5.3 菌株 JH-23 的属种鉴定:菌株 JH-23 的 16S rDNA 部分序列长约 1500 bp,根据菌株 JH-23 的

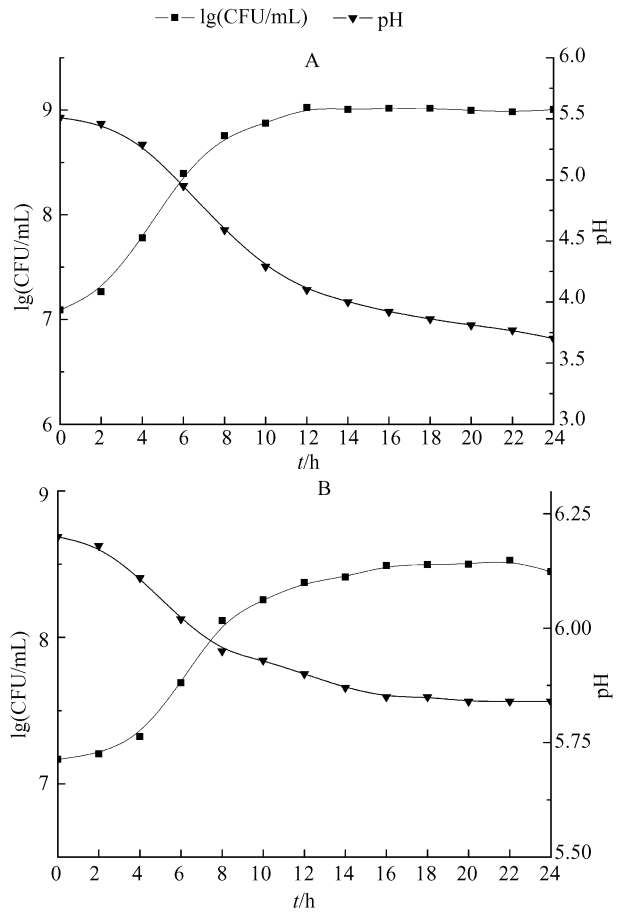


图 4 菌株 JH-23 在 MRS (A) 和 SKM (B) 中的生长曲线

Fig. 4 Growth curve of strain JH-23 in MRS broth (A) and skim milk (B). Symbols: ■, lg(CFU/mL); ▼, pH value.

16S rDNA 测序结果进行 BLASTn 分析,结果表明:菌株 JH-23 与 *Lactobacillus casei* BL23 相似性为 100%,与 *Lactobacillus casei* ATCC 334 相似性为 100%,综合同源性分析,菌株 JH-23 属于干酪乳杆菌。

同时,利用法国梅里埃公司的 API 细菌鉴定系统(碳水化合物发酵情况略)对菌株 JH-23 进行鉴定,鉴定结果亦为干酪乳杆菌。经过上述两种方法的双重鉴定,菌株 JH-23 确定为干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*),命名为 *Lactobacillus casei* JH-23。

3 讨论

在以往的益生乳酸菌功能性研究中,抗衰老方面的探索极为有限且鲜有报道,采用的抗衰老的测定指标不尽相同,这是由于衰老的发生涉及到人体的变化因素种类繁多,如氧化损伤和免疫能力下降都与衰老过程息息相关,所以抗衰老的功能评价缺

乏统一的指标。而且,目前在抗衰老的研究方面缺乏相关的体外实验指标,国内外的益生菌抗衰老研究大多热衷于体内的功能性实验,如有研究者用双歧杆菌活菌液喂饲衰老小鼠,发现血液中抗衰老生化指标(超氧化物歧化酶 SOD,谷胱甘肽过氧化物酶 GSH-Px)比对照组显著升高,衰老生化指标(过氧化脂质 LPO,丙二醛 MDA)显著降低^[16],表明双歧杆菌具有一定的延缓动物衰老的作用。王跃等^[17]研究表明双歧杆菌的脂磷壁酸(LTA)通过提高衰老小鼠的抗氧化活性及上调抗衰老基因 Klotho 的表达,从而发挥其延缓衰老的作用。此外,还发现 LTA 可延缓肝脏与骨髓衰老,下调细胞衰老主导基因 p16 的表达^[18]。Hiromi Kimoto-Nira^[19]等采用快速老化小鼠模型,发现 SAMP6 小鼠服用 *Lactococcus lactis subsp. cremoris* H61 菌株后小鼠脾细胞产生更多的 Th1 型细胞因子 IL-12 和 γ -干扰素 (IFN- γ),能够抑制某些老化现象。虽然采用动物实验获得的结果说服力较强,但是成本高且风险性大,不适合开展菌种的筛选工作,因此在抗衰老菌种的研发上急需一种可靠的,重复性和重现性高的体外筛选模型。

此次研究开发出一种新型的益生乳酸菌筛选模型:以单胺氧化酶作为靶位酶建立的体外筛选模型,该模型方便快捷且灵敏性高,可为之后的体内抗衰老功能性验证提供可靠的实验数据及信息来源。在此基础上,应用特定的衰老动物模型对体外试验所获得的结果予以验证,这样便能够更为客观有效地评价筛选出的菌种发挥其抗衰老功效的作用机理。本次实验采用该体外模型从健康人体粪便中筛选出 7 株具有一定 MAO 抑制率的乳酸菌,其中菌株 JH-23 无论是其 MRS 发酵上清还是 CFE 都有较为明显的 MAO 抑制效果,特别是其 CFE 对 MAO 的初筛抑制率达到 33.7%。菌株 JH-23 的 CFE 经冻干后,在反应浓度为 16 mg/mL 时抑制率可提高到 53.2%,且 MAO 抑制率随预保温时间的增加而上升,在 30 min 之后抑制率趋于平稳,保持在 54%左右,表明菌株 JH-23 的无细胞提取物是一种理想的 MAO 抑制剂;同时利用分子截留量为 1 KD 的透析袋将胞内粗提物进行透析,发现透析液中 MAO 抑制率明显升高,证明发挥主要抑制作用的成分是菌体细胞内的小分子产物 (MWCO < 1 KD)。菌株 JH-23 属于厌氧型的革兰氏阳性杆菌,无芽孢,MRS 培养基比 SKM 培养基更适合其生长,经 16S rDNA 序列比对及 API 碳水化合物发酵

实验鉴定为干酪乳杆菌。

目前,虽然单胺氧化酶体外抑制模型已应用于植物、中草药等药物抗衰老活性成分的筛选过程中,但利用该模型进行乳酸菌源抗衰老活性成分的筛选尚属首次。今后还需进一步将该活性物质分级纯化(目前正在进行中),以期在衰老动物模型上加以验证,进行相关的抗衰老指标的功能性评价。

参考文献

- [1] Lei H, Wang B, Li WP, et al. Anti-aging effect of astragalosides and its mechanism of action. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2003, 24: 230-234.
- [2] Kim SY, Kim SJ, Lee YJ, et al. Protective effects of dietary soy isoflavones against UV-induced skin-aging in hairless mouse model. *Journal of the American College of Nutrition*, 2004, 23: 157-162.
- [3] Rubino C, Farace F, Dessy LA, et al. A prospective study of anti-aging topical therapies using a quantitative method of assessment. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 2005, 115: 1156-1162.
- [4] Kim JH, Lee BC, Sim GS, et al. The isolation and antioxidative effects of vitexin from *Acer palmatum*. *Archives of Pharmacal Research*, 2005, 28: 195-202.
- [5] 董明盛,贾英名.食品微生物学.第一版.北京:中国轻工业出版社,2006.
- [6] 陈剑峰,王恩多.单胺氧化酶.生物化学与生物物理进展(*Progress in Biochemistry and Biophysics*), 2000, 27(5): 504-508.
- [7] 贾雪梅,齐易祥.单胺氧化酶与衰老.国外医学老年医学分册(*Foreign Medical Sciences (Geriatrics)*), 1988(4): 145-147.
- [8] Bodkin JA, Amsterdam JD. Transdermal selegiline in major depression: a double-blind, placebo-controlled, parallel-group study in outpatients. *American Journal of Psychiatry*, 2002, 159: 1869-1875.
- [9] Blandini F, Armentero MT, Fancellu R, et al. Neuroprotective effect of rasagiline in a rodent model of Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, 2004, 187: 455-459.
- [10] Stafford GI, Pedersen PD, J? ger AK, et al. Monoamine oxidase inhibition by southern African traditional medicinal plants. *South African Journal of Botany*, 2007, 73: 384-390.
- [11] Weissbach H, Smith TE, Daly JW, et al. A rapid spectrophotometric assay of monoamine oxidase based on the rate of disappearance of kynuramine. *Journal of Biological Chemistry*, 1960, 235: 1160-1163.

- [12] Schmidt K, Li Z, Schubert B, et al. Screening of entomopathogenic Deuteromycetes for activities on targets involved in degenerative diseases of the central nervous system. *Journal of Ethnopharmacology*, 2003, 89: 251-260.
- [13] Johnson TR, Case CL. Laboratory experiments in microbiology. 4th edition. Redwood City, California: Benjamin/Cummings Publishing Company, 1995.
- [14] Yamada M, Yasuhara H. Clinical pharmacology of MAO inhibitors: safety and future. *Neuro Toxicology*, 2004, 25: 215-221.
- [15] 张以芳, 夏凤毅, 刘旭川. 乳饼制品中乳杆菌分离鉴定及其发酵性能试验. 中国乳品工业 (*China Dairy Industry*), 1999, 27(3): 22-24.
- [16] 兰景刚, 胡宏. 双歧杆菌抗衰老的初步研究. 中国微生物生态学杂志 (*Chinese Journal of Microecology*), 1995, 7(6): 8 - 10.
- [17] 王跃, 张宏娟, 刘明方, 等. 双歧杆菌脂磷壁酸抗氧化作用的实验研究. 中国老年学杂志 (*Chinese Journal of Gerontology*), 2007, 27: 1254-1257.
- [18] 王跃, 付玉荣, 陈淑惠, 等. 双歧杆菌脂磷壁酸对衰老小鼠肝脏与骨髓的影响. 第四军医大学学报 (*Journal of the Fourth Military Medical University*), 2005, 26(8): 700-702.
- [19] Kimoto-Nira H, Suzuki C, Kobayashi M, et al. Anti-ageing effect of a lactococcal strain: analysis using senescence-accelerated mice. *British Journal of Nutrition*, 2007, 98: 1178-1186.

Screening of a *Lactobacillus casei* with monoamine oxidase-inhibitory activity

Hao Wang¹, Benheng Guo^{2*}, Zhengjun Wu², Yinyu Wang²

(¹ Food College of Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

(² Technology Center of Bright Dairy Co, Ltd., Shanghai 200436, China)

Abstract: [Objective] To screen for monoamine oxidase (MAO)-inhibiting lactobacillus from healthy human dejecta in an *in vitro* model, and to provide reference for anti-ageing study *in vivo* of lactobacillus in the future. [Methods] The monoamine oxidase inhibitory model *in vitro* was applied to screen fermented supernatant and cell-free extracts originated from lactic acid bacteria, and two indices based on screened samples were determined, including biological dosage-effect and the effect of pre-incubated time between MAO and inhibitor on suppression rate. Meanwhile, with membrane separation technology, MAO inhibition from different molecular weight range of samples was measured. Screened strain JH-23 was investigated as target probiotic lactobacillus, identified through the sequence analysis of 16S rDNA gene and API system. [Results] The MAO inhibitory rate of cell-free extracts produced by strain JH-23 reached 33.7%. After samples being vacuum freeze-dried, MAO inhibitory rate was up to 53.2% when the reactive concentration was 16 mg/mL. The inhibition was significantly enhanced with the duration of pre-incubation increased, and then the inhibitory effect became steady after 30 minutes. Crude samples were dialyzed for 48 hours, MAO inhibitory effect of dialysates was significantly increased compared with pre-dialysis. The result of bacteria identification demonstrated that strain JH-23 was ascribed to *Lactobacillus casei*. [Conclusion] A new screening model *in vitro*, regarding monoamine oxidase as a target enzyme, was explored in this study. This model was characterized by convenience, rapidity and high sensitivity, and it could be useful for the following anti-aging research *in vivo*. The cell-free extracts of *Lactobacillus casei* JH-23 was inhibitory to MAO, and the intracellular small-molecules played a major role in the inhibition.

Keywords: *Lactobacillus*; monoamine oxidase; screening model *in vitro*

(本文责编:王晋芳)