

# 屎肠球菌 132 胆盐水解酶基因的克隆表达与酶学特性

杨玲双<sup>1,2</sup>, 谢新强<sup>2</sup>, 李滢<sup>2</sup>, 张菊梅<sup>2</sup>, 丁郁<sup>2</sup>, 吴清平<sup>2\*</sup>, 王涓<sup>1\*</sup>

(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642) (2. 广东省科学院微生物研究所, 广东省微生物安全与健康重点实验室, 华南应用微生物国家重点实验室, 广东广州 510075)

**摘要:** 该研究旨在探究降胆固醇潜在菌株屎肠球菌 132 胆盐水解酶 (bile salt hydrolase, BSH) 的活性, 通过 PCR 技术克隆目的基因并在大肠杆菌 BL21 中表达, 同时探讨其酶学特性。利用茚三酮法对其菌体破碎液 BSH 活性进行测定, 比酶活达 0.55 U/mg。通过克隆其目的基因, 连接 pET-28a(+) 的表达载体并进行异源表达, 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 实验显示, 该酶分子量约 37 ku。当底物为甘氨酸胆酸钠 (glycocholic acid, GCA)、pH 5.50 时, BSH 酶活达 4.93 U/mg。酶学特性结果表明, GCA 为底物、pH 5.50、温度为 30 °C 时达最适条件, BSH 水解能力最强, 酶活达 6.59 U/mg, 温度在 4~30 °C 时, pH 为 5~7 有较好的热稳定和 pH 稳定性。不同离子对酶活的影响实验表明 Na<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup> 均对酶活有激活作用; Mn<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup> 对酶活影响不大, 但 Ni<sup>2+</sup>、Al<sup>3+</sup>、Li<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup> 均对酶活有强抑制作用, 比酶活降到 10% 以下, 几乎丧失活性。通过酶反应动力学得出该酶的  $V_{max}$  为 6.44  $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ ,  $K_m$  值为 3.16 mmol/L。因此, 通过 *bsh* 基因克隆并异源表达, 提高了屎肠球菌 132 BSH 活性, 并且 BSH 水解各类胆盐能力较强, 为降胆固醇功能食品的开发与应用奠定基础。

**关键词:** 屎肠球菌 132; 胆盐水解酶; 基因克隆; 异源表达; 酶学特性

文章编号: 1673-9078(2022)08-35-43

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.8.1167

## Cloning, Heterologous Expression, and Enzymatic Characteristics of the Bile Salt Hydrolase Gene from *Enterococcus faecium* 132

YANG Lingshuang<sup>1,2</sup>, XIE Xinqiang<sup>2</sup>, LI Ying<sup>2</sup>, ZHANG Jumei<sup>2</sup>, DING Yu<sup>2</sup>, WU Qingping<sup>2\*</sup>, WANG Juan<sup>1\*</sup>

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China) (2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Safety and Health, State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510075, China)

**Abstract:** The bile salt hydrolase (BSH) activity of a potentially cholesterol-lowering strain, *Enterococcus faecium* 132, was studied. The target gene was cloned and expressed in *Escherichia coli* BL21, and its enzymatic characteristics were examined. The BSH activity of *E. faecium* 132 lysate was determined using the ninhydrin method, and its specific enzyme activity was 0.55 U/mg. The *bsh* gene of *E. faecium* 132 was cloned into the expression vector pET-28a(+) for heterologous expression in BL21. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis showed that the molecular weight of the resulting enzyme was approximately 37 ku. The recombinant BSH showed optimal hydrolytic activity (6.59 U/mg) when glycocholic acid (GCA) was used as a substrate at a pH of 5.50 and temperature of 30 °C, while also exhibiting good thermal and pH stability within a temperature range of 4~30 °C and pH range of 5~7. The effect of different

引文格式:

杨玲双, 谢新强, 李滢, 等. 屎肠球菌 132 胆盐水解酶基因的克隆表达与酶学特性[J]. 现代食品科技, 2022, 38(8): 35-43

YANG Lingshuang, XIE Xinqiang, LI Ying, et al. Cloning, heterologous expression, and enzymatic characteristics of the bile salt hydrolase gene from *Enterococcus faecium* 132 [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(8): 35-43

收稿日期: 2021-11-18

基金项目: 广东省重点研发计划项目 (2018B020205002); 广东省科技厅项目 (2019QN01N107); 广东省科学院科技发展创新驱动发展能力建设发展项目 (2020GDASYL-20200301002); 广东省重点实验室 (2020B121201009)

作者简介: 杨玲双 (1995-), 女, 博士研究生, 研究方向: 应用微生物, E-mail: yangls8272@163.com; 共同第一作者: 谢新强 (1981-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 健康功能微生物, E-mail: woshixinqiang@126.com

通讯作者: 吴清平 (1962-), 男, 博士, 研究员, 中国工程院院士, 研究方向: 微生物安全与健康, E-mail: wuqp203@163.com; 共同通讯作者: 王涓 (1986-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品安全与健康, E-mail: wangjuan@scau.edu.cn

metal ions on enzyme activity indicated that BSH activity was activated by  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , and  $\text{Mg}^{2+}$ , unaffected by  $\text{Mn}^{2+}$  or  $\text{Fe}^{2+}$ , but inhibited by  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Li}^{2+}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ , and  $\text{Zn}^{2+}$ , with enzyme activity decreasing to  $< 10\%$ , and an almost complete loss of enzyme activity. Enzymatic kinetics revealed that the  $V_{\max}$  of this enzyme was  $6.44 \mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ , and the  $K_m$  value was  $3.16 \text{ mmol/L}$ . Therefore, through the cloning and heterologous expression of the *bsh* gene in *E. coli* BL21, significant improvements can be made to *E. faecium* 132 BSH activity, and various bile salts were strongly hydrolyzed, thus implying that this recombinant BSH can be used in the development and application of cholesterol-lowering functional foods.

**Key words:** *Enterococcus faecium* 132; bile salt hydrolase; gene cloning; heterologous expression; enzymatic characteristics

甘氨酸或牛磺酸结合胆汁酸被称为胆盐<sup>[1]</sup>,是哺乳动物消化脂质所必需的。胆盐水解酶 (bile salt hydrolase, BSH),也称为结合 BSH (conjugated bile salt hydrolase, CBSH)、结合胆汁酸水解酶 (conjugated bile acid hydrolase, CBAH) 和胆酰甘氨酸水解酶 (cholyglycine hydrolase, CGH),属于 N 端亲核水解酶家族<sup>[2]</sup>,是一种催化甘氨酸/牛磺酸结合胆汁酸水解为去结合胆汁酸和氨基酸残基的酶<sup>[3]</sup>。BSH 主要来源于梭菌 (*Clostridium*)、拟杆菌 (*Bacteroides*)、乳杆菌 (*Lactobacillus*)、李斯特菌 (*Listeria*)、肠球菌 (*Enterococcus*)、双歧杆菌 (*Bifidobacterium*) 等<sup>[4]</sup>。具有 BSH 活性的微生物能耐受胆汁、在胃肠道定殖、维持宿主代谢和能量获取的能力<sup>[5]</sup>。BSH 酶能将结合胆盐水解成去结合形式和释放游离氨基酸,而去结合胆盐的可溶性较差,不被肠细胞吸收而随粪便排出体外;另一方面则是促进胆汁酸合成,因胆固醇为胆汁酸的前体,故能降低血清胆固醇<sup>[6]</sup>。益生菌对胆盐的水解能力经常被列入益生菌菌株筛选的标准之一,但不同微生物的 BSHs 具有不同的蛋白结构和底物特异性,潜在 BSH 抑制剂的鉴定依赖于 BSH 的晶体结构的可用性<sup>[7,8]</sup>。不同种属之间 BSH 的亚基组成、大小、最适温度、pH 均存在差异性,但 BSH 有 6 个严格的保守催化位点,其中 Cys2 埋藏在所有 Ntn 酶保守的  $\alpha\beta\alpha$  核心中形成活性位点,另外还有 5 个重要的催化残基 (Arg18、Asp21、Asn82、Asn175、Arg228)<sup>[9]</sup>。乳杆菌和双歧杆菌作为有益微生物的代表,其 BSH 酶被广泛研究,比如植物乳杆菌 WCFS1 发现有 4 个 *bsh* 基因<sup>[10]</sup>,约氏乳杆菌 PF01 发现 3 个 *bsh* 基因<sup>[11]</sup>,嗜酸乳杆菌 NCFM 发现 2 个 *bsh* 基因,且均显示不同的底物特异性<sup>[12]</sup>。在唾液乳杆菌 JCM1046 和 UCC118 中也发现了 2 个 *bsh* 基因,其中第二个基因在分类水平上被重新编码为青霉素 V 酰基酶 (PVA)<sup>[13]</sup>。屎肠球菌广泛存在禽类肠道中,是肠道中重要的菌类,因其能产生乳酸,故归属于乳酸菌。近年来,益生屎肠球菌越来越受到关注,益生肠球菌对维持平衡起到关键作用,近年来广泛应用于幼龄动物的肠道保健和疾病防疫上<sup>[14]</sup>。屎肠球菌还能产生抗菌肽,抑制致病菌的生长,在食品中添加

能延长食品保质期等功能,但对其 BSH 研究相对较少。本团队前期对屎肠球菌 132 全基因组序列注释结果发现,屎肠球菌 132 含有胆酰甘氨酸水解酶 (EC 3.5.1.24) 基因。并且在体内能降低 SD 大鼠体重、血清胆固醇、甘油三酯、缓解肝损伤<sup>[15]</sup>。有综述报道抑制肠道 BSH 活性会增加脂质代谢和获取能量,从而提高饲料动物的生长性能和饲料效率<sup>[16]</sup>,故对 BSH 研究具有重要意义。本研究对屎肠球菌 132 *bsh* 基因进行异源表达纯化,探究不同底物、pH、以及温度对酶活力的影响,为进一步研究屎肠球菌相关胆盐水解酶以及潜在降胆固醇机制提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

#### 1.1.1 菌株和质粒

屎肠球菌 132 (*Enterococcus faecium* strain 132)、大肠杆菌 ATCC 8739 (*Escherichia coli* ATCC 8739)、pET-28a (+)质粒由广东省微生物研究所微生物安全与健康发展中心团队保藏提供。DH5 $\alpha$ 、BL21 大肠杆菌感受态细胞购自生工生物工程(上海)有限公司。

#### 1.1.2 培养基

MRS (de Man, Rogosa and Sharpe) 固体和液体培养基、LB (Luria-Bertani) 固体和液体培养基,购自广东环凯微生物科技有限公司;

发酵培养基: 35 g/L 胰蛋白胨、20 g/L 酵母粉、5 g/L NaCl。

#### 1.1.3 主要生化试剂

甘氨酸、牛磺酸、甘氨酸胆酸钠 (GCA)、甘氨酸氧胆酸钠 (GDCA)、甘氨酸鹅氧胆酸钠 (GCDCA)、牛磺胆酸钠 (TCA)、牛磺氧胆酸钠 (TDCA)、牛磺鹅氧胆酸钠 (TCDCA)、DMSO、 $\beta$ -巯基乙醇,上海麦克林生物科技有限公司;  $\text{CaCO}_3$ 、柠檬酸钠、EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid), 咪唑,广州化学试剂厂; 茚三酮显色液,上海罗恩试剂; DL2000 DNA Marker, 广州东盛生物有限公司; *Nhe I*、*Xho I* 限制性内切酶、Pushion master mix、T<sub>4</sub>DNA Ligase、

cut@smart buffer, 美国 NEB 公司; PCR 产物纯化试剂盒、质粒提取试剂盒, 美国 omega 公司; SDS-PAGE 上样缓冲液、标准蛋白 Marker, 上海碧云天生物技术有限公司。

裂解液 (g/L): NaCl 5.60 g、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.63 g、咪唑 4.76 g, pH 7.60~7.80。

洗脱液 (g/L): NaCl 8.40 g、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.18 g、咪唑 13.60 g, pH 7.20。

交换液 (g/L): NaCl 5.60 g、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.18 g、pH 7.20。

## 1.2 仪器与设备

WBK-4B 型电热恒温水浴锅, 广东环凯微生物科技有限公司; Seven CompactTMS210 型数字 pH 计, 美国 Mettler Toledo 公司; Microfuge®16 台式冷冻离心机, 美国 Beckman Coulter 公司; EPOCH2 酶标仪, 美国 Biotek 公司; C150 凝胶成像系统, 美国 Azure Biosystems 公司; Biometra DNA 扩增循环仪, 德国 Biometra 公司。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 胆盐水解酶活力分析

MRS 固体培养基中加 0.20% 牛磺脱氧胆酸钠、

0.37 g/L CaCl<sub>2</sub>, 121 °C 灭菌 20 min, 倒平板晾干。再将无菌滤纸片均匀放入平板上, 每个滤纸片均匀滴加 10 μL 菌液, 37 °C 厌氧培养 72 h。观察滤纸周围有无沉淀圈出现<sup>[17]</sup>。若平板中出现沉淀圈, 说明菌株可能具有潜在胆盐水解酶活性。

菌体胆盐水解酶的定量分析<sup>[18]</sup>: 将屎肠球菌 132 接种于 MRS 肉汤中, 大肠杆菌 ATCC 8739 接种于 LB 肉汤中 37 °C 培养 18 h, 培养液经 8000 ×g 离心 5 min 后收集菌体, 用无菌的 PBS 缓冲液洗涤两遍后将菌体重悬于 PBS 缓冲液中。取 1 mL 菌悬液, 加 1 μL 1 mol/L 维生素 C 进行破碎 (30% 功率, 6 s 停 4 s, 100 min), 13000 ×g 离心 3 min 收集上清, 即为粗酶液。利用改良 Bradford 蛋白浓度试剂盒测定粗酶液蛋白浓度, 并绘制蛋白浓度标准曲线。粗酶液对甘胆酸钠解离体系如表 1 所示。

表 1 中溶液温和涡旋混匀后于 37 °C 孵育 30 min, 置于高温使酶失活, 于 16000 ×g 离心 10 min, 吸取 250 μL 茚三酮显色液加入 750 μL 上清中, 同时配制标准曲线样品浓度 (0、0.10、0.20、0.30、0.40、0.50 mmol/L); 将样品、对照、空白 1、空白 2、标准曲线样品于显色液振荡混匀, 沸水浴 15 min, 冰浴 3 min, 静置 5 min 后于 OD<sub>570</sub> 处测吸光度。实际吸光度值=样品吸光度值-空白 1 吸光度值-空白 2 吸光度值。

表 1 胆盐水解酶酶促反应

Table 1 Bile salt hydrolase enzymatic reaction

试剂	样品, 对照/mL	空白 1/mL	空白 2/mL
100 mmol/L pH 6 柠檬酸盐缓冲液	0.30	0.30	0.30
2.50 mmol/L GCA-柠檬酸盐溶液	0.20	-	0.20
0.01 mmol/L 巯基乙醇溶液	0.30	0.30	0.30
55 mmol/L EDTA 溶液	0.30	0.30	0.30
双蒸水	0.30	0.50	0.50
粗酶液	0.20	0.20	-

注: “-”表示无。

BSH 总酶活定义为: 单位时间内、单位体积的酶液使结合型胆盐水解产生氨基酸的微摩尔数, 单位 μmol/(min·mL); 1U=μmol/min。

BSH 比酶活定义为: 单位时间内、单位质量的总蛋白中的酶液使结合型胆盐水解产生氨基酸的微摩尔数, 单位 μmol/(min·mg)。

### 1.3.2 DNA 的提取和引物设计

利用团队前期全基因组测序信息中找到相关 *bsh* 基因 (GenBank 登录号: MZ031135), 总片段长度为 975 bp, 以 *Nhe I* 和 *Xho I* 为双酶切位点, 引物为 BSHf: 5'-AAAAAAGCTAGCATGTGTACGTCTATTA CTTATGTAAC-3', 和 BSHr: 5'-GTGGTGCTCGAGC

TAATTTATATATTTAATTTGTTG-3', 引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成。将培养好的菌体, 按照广州美基生物技术有限公司细菌基因组 DNA 提取试剂盒方法, 提取基因组 DNA。

### 1.3.3 目的基因的克隆、表达载体的构建

利用上述基因组 DNA 和引物进行 PCR 扩增, 扩增体系 (50 μL): 上下游引物各 2.5 μL (10 μmol/L)、DMSO 1.5 μL、Pushion master mix 25 μL、模板 DNA 1 μL、灭菌超纯水补足 50 μL。反应条件: 98 °C 预变性 30 s; 98 °C 10 s, 58 °C 20 s, 72 °C 40 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳中进行验证。利用美国 omega 公司产物纯化试剂盒

(D6492-03) 进行 PCR 产物纯化, 选取 pET-28a (+) 质粒和 PCR 产物进行双酶切, 酶切体系 (50  $\mu$ L): *Nhe* I 2  $\mu$ L、*Xho* I 2  $\mu$ L、cut@smart buffer 5  $\mu$ L、pET-28a (+)质粒/PCR 产物 25  $\mu$ L, 灭菌超纯水补足 50  $\mu$ L, 酶切 2 h 后对酶切 PCR 产物进行纯化, 利用 Omega 公司胶回收试剂盒 (D2500-02) 对酶切质粒进行胶回收。利用 *T*<sub>4</sub> 连接酶对酶切 PCR 产物和回收质粒进行酶连

反应, 16  $^{\circ}$ C 过夜连接并导入 DH5 $\alpha$  大肠杆菌感受态细胞中, 利用抗性基因 (卡那霉素) 平板筛选进行菌落 PCR、双酶切验证, 提取质粒送至苏州金唯智生物技术有限公司进行测序, 利用 DNAMAN 9 软件进行同源比对, 确定插入序列是否正确, 命名正确的质粒为 pET-28a-BSH。最后将提取得到的正确质粒转化大肠杆菌 BL21 感受态细胞用于异源表达。

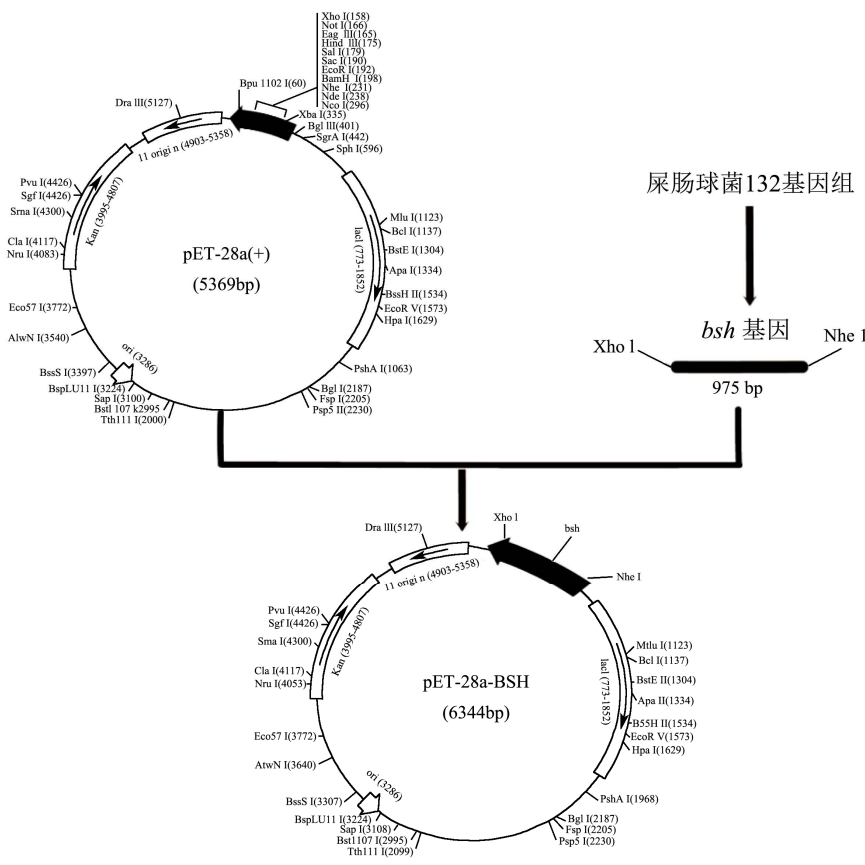


图1 重组质粒构建示意图

Fig.1 Schematic diagram of recombinant plasmid construction

### 1.3.4 BSH 的异源表达和纯化

将含有 pET-28a-BSH 的大肠杆菌 BL21 接种于含卡那霉素的发酵培养基中, 37  $^{\circ}$ C、200 r/min, 培养 4 h 后调整温度为 18  $^{\circ}$ C, 加终浓度至 0.4 mmol/L IPTG 进行诱导表达, 诱导 48 h 后, 10000  $\times$ g, 离心 20 min, 收集菌体重悬于含 0.1%溶菌酶裂解液中, 放-80  $^{\circ}$ C 中备用。

将菌体进行冰浴超声破碎 (30%功率, 6 s 停 4 s, 30 min), 4  $^{\circ}$ C 离心取上清, 过 0.8  $\mu$ m 滤膜即得到粗酶液。粗酶液过 HisTrap Fast Flow 镍柱<sup>[19]</sup>(Cytiva 厂家, 美国丹纳赫集团), 用裂解液洗脱杂质蛋白, 再利用洗脱液洗脱目的蛋白, 30 ku 超滤管浓缩目的蛋白, 交换液重悬和离心除去咪唑, 用蛋白浓度测定试剂盒进行蛋白定量, 纯化蛋白中加 20%甘油, 保存于-80  $^{\circ}$ C 冰箱, 备用。

### 1.3.5 BSH 酶的底物特异性分析

反应体系: 20  $\mu$ L 酶液、0.5  $\mu$ L 1 mol/L 维生素 C 溶液、100  $\mu$ L pH=6、6 mmol/L 胆酸盐、80  $\mu$ L 的双蒸水, 轻轻充分混匀后置于 37  $^{\circ}$ C 恒温水浴锅中孵育 30 min, 反应结束后置于高温使酶失活, 于 16000 $\times$ g 离心 10 min, 上清加入 60  $\mu$ L 茚三酮显色液, 迅速置于沸水浴中反应 15 min, 冰浴 3 min, 静置 5 min 后于 570 nm 处测吸光度, 以不加酶液为对照。样品实际吸光度值=吸光度值-对照吸光度值。根据甘氨酸标准曲线计算生成的氨基酸的量, 计算比酶活, 以最高酶活力为 100%, 计算相对酶活, 重复三次实验。

胆酸盐分别为 6 mmol/L GCA、6 mmol/L GDCA、6 mmol/L GCDCA、6 mmol/L TCA、6 mmol/L TDCA、6 mmol/L TCDCA。

### 1.3.6 BSH 的最适 pH 和 pH 稳定性

以 6 mmol/L GCA 为底物, 将反应体系 (详见 1.3.5) 分别置于不同 pH (3.0、4.0、5.0、5.5、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0) 下反应按 1.3.5 方法计算相对酶活。

以 6 mmol/L GCA 为底物, 将不加底物的反应体系分别置于不同 pH (3.0、4.0、5.0、5.5、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0) 下孵育 1 h, 置于 1.3.5 方法进行反应并计算相对酶活。

### 1.3.7 BSH 的最适温度和热稳定性

6 mmol/L GCA 为底物, 将反应体系 (详见 1.3.5) 分别置于不同温度 (4、20、30、40、50、60、70 °C) 下反应, 按 1.3.5 方法计算相对酶活。

6 mmol/L GCA 为底物, 将不加底物的反应体系分别置于不同温度 (4、20、30、40、50、60、70 °C) 下孵育 1 h, 置于 1.3.5 方法进行反应并计算相对酶活。

### 1.3.8 不同金属离子对 BSH 活力的影响

6 mmol/L GCA 为底物, 反应体系 (详见 1.3.5) 中分别加入终浓度为 5 mmol/L 不同金属离子 (NaCl、CaCl<sub>2</sub>、MgSO<sub>4</sub>、MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、LiCO<sub>3</sub>、Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>·8H<sub>2</sub>O、NiSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O、CoSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、ZnSO<sub>4</sub>), 测定相对酶活, 以未加金属离子的比酶活为 100%。

### 1.3.9 BSH 反应动力学参数的测定

将不同浓度 (2、4、6、8、10、20 mmol/L) 的 GCA 加入 1.3.5 反应体系中反应 30 min, 按 1.3.5 方法计算相对酶活。利用 GraphPad Prism 8.4.3 软件, 根据米氏方程 (Michaelis-Menten) 拟合数据, 并计算 BSH 最大反应速率 ( $V_{max}$ ), 米氏常数 ( $K_m$ ) 值。

### 1.3.10 数据处理

结果以实验的均数±标准差 (mean±SD) 表示, 每次实验 3 次重复。采用 Microsoft Excel 365 软件计算平均值和 SD 值, Graph Pad 8.4.3 进行绘图。利用在线软件 Swiss Model 对 BSH 的 3-D 结构进行了同源模拟。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌体破碎液胆盐水解酶活力的测定

屎肠球菌 132 在含牛磺脱氧胆酸钠 MRS 平板上具有明显的沉淀圈 (图 2), 推测屎肠球菌 132 可能具有胆盐水解酶活性。经胆盐水解酶定量分析结果表明, 屎肠球菌 132 总酶活为 0.20 U/mL, 比酶活为 0.55 U/mg。先前有研究报道, 张芬<sup>[20]</sup>利用茚三酮法, 以 GDCA 为底物, 测定 10 株肠球菌的比酶活在 0.11~1.86 U/mg, 本研究屎肠球菌 132 比酶活力处于中等水平。



图2 屎肠球菌 132 胆盐水解酶定性分析

Fig.2 Qualitative analysis of bile salt hydrolyase in *E. faecium* strain 132

### 2.2 表达载体的构建和 BSH 的纯化

目的基因经过克隆、重组质粒到质粒导入 BL21 感受态细胞后进行诱导表达, 利用超声破碎菌体收集上清并过镍柱纯化。如图 3a 所示, 在 1000 bp 左右, 出现一条清晰的目的条带, 表明 BSH 克隆成功; 纯化蛋白经 SDS-PAGE 蛋白凝胶实验得到一条清晰明亮的条带 (图 3b), 条带大小约为 37 ku, 为常见 BSH 蛋白条带, 说明 BSH 蛋白被成功表达并纯化。有研究报道屎肠球菌包含两个 *bsh* 基因, 且这两个基因长度均为 975 bp, 条带大小在 37 ku 左右<sup>[20]</sup>, 而本研究 *bsh* 基因, 条带大小与之一致。

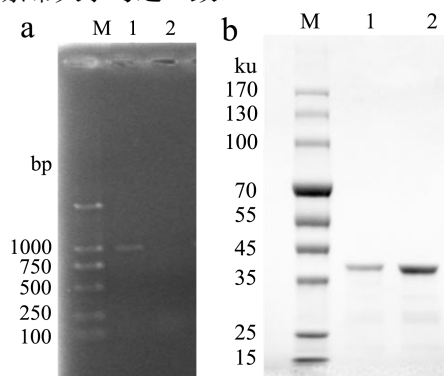


图3 纯化的 BSH 蛋白 SDS-PAGE

Fig.3 Purified SDS-PAGE of purified recombinant BSH protein

注: (a) 1 目的基因 PCR 扩增产物, 2 阴性对照; M: DL2000 DNA marker (100~2000 bp); (b) 1 和 2: 纯化的 BSH 蛋白; M: 标准蛋白 Marker。

### 2.3 BSH 的底物特异性

为探究 BSH 的底物特异性, 利用茚三酮显色法对 6 种结合胆盐进行底物特异性分析。结果如图 4 所示, pH=6 对 GCA 解离中酶活达 4.93 U/mg, 相比于粗酶液, 酶活力增加了近 10 倍 (每次比酶活/粗酶液比酶活)。BSH 对 GCA、TCA 均较高的酶活力, 对 GDCA、GCDCA、TDCA 的相对酶活能达到 80%, TCDCA 特异性最差, 达 60%。不同种属酶的活性位点、底物特异性稍有差异。有研究报道, 屎肠球菌 WEFA23 对

GDCA 水解能力较强<sup>[20]</sup>, 与本研究结果较为一致, 对甘氨酸类水解能力较强。而另一个研究则报道屎肠球菌 NW2 对 TDCA 水解最强, 但对 GCA 的水解也能达到 82%<sup>[21]</sup>, 而本研究对这两种结合胆酸的水解均都大于 80%, 与之结果较为类似。BSH 的底物特异性也可能归因于酰胺键附近的位阻, 随着酰胺键附近空间位阻的增加, 胆盐水解速率降低<sup>[22]</sup>。BSH 对底物特异性有所差异, 对甘氨酸结合胆酸活性最高, 故选取 GCA 为底物进行酶学特性研究。

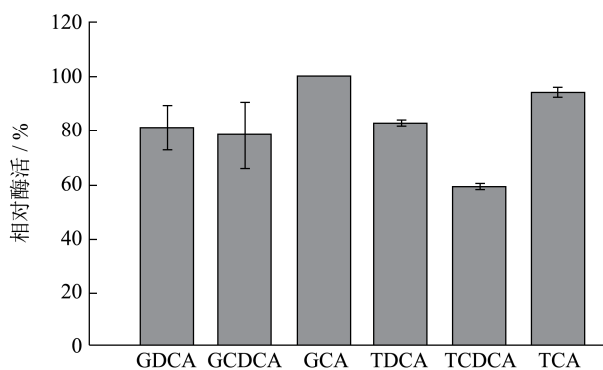


图 4 BSH 的底物特异性

Fig.4 Substrate specificity of recombinant BSH

## 2.4 BSH 最适 pH 及 pH 稳定性

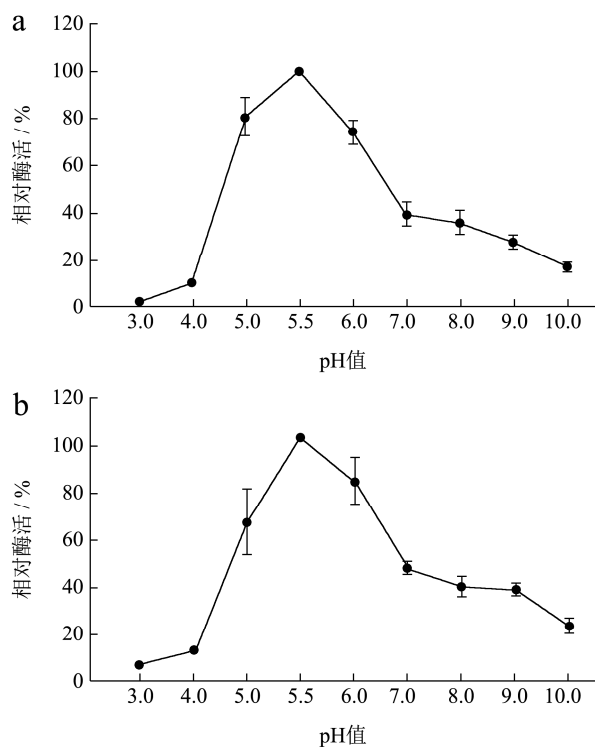


图 5 BSH 最适 pH 及 pH 稳定性

Fig.5 The optimal pH and the pH stability of BSH

注: a: BSH 最适 pH; b: BSH 的 pH 稳定性。

在不同 pH 条件下反应并测定 BSH 的相对酶活, 结果如图 5a 所示, 在 pH=5.50 时达到最高比酶活, 达

6.59 U/mg, 与文献报道的屎肠球菌 NW2 中 BSH2 最适 pH 相一致<sup>[21]</sup>; 当 pH=5 时, BSH 相对酶活下降至 80%; pH>7 时酶活开始急剧下降; pH=10 时下降至 20%; pH<4 时 BSH 酶活几乎丧失。BSH 适应 pH 范围较广, 在 pH=5~10 均有一定的活性。当酶经 1 h 的不同 pH 缓冲液孵育后, pH<4 时 BSH 酶活几乎丧失, 与乳杆菌属 100-100 菌株来源的 BSH (pH 3.80~4.50) 差别较大<sup>[23]</sup>, 说明其稳定性较差; 在 pH 为 5~7 时, 酶稳定性较好, 与长双歧杆菌 SBT2928 来源的 BSH (pH 5~7) 较为一致<sup>[24]</sup>; pH>7 时酶活开始急剧下降; pH=10 时下降至 20%, 稳定性开始下降, 可能由于结构遭到破坏造成稳定性差, 表明该酶对高酸碱均不耐受。任婧<sup>[25]</sup>在综述中提到, 甘氨酸类胆盐在酸性条件下有非常强的毒性, 此时 BSH 则优先水解甘氨酸类胆盐, 因其大部分研究 BSH 的最适条件都是以甘氨酸类胆盐为底物, 故会得出 BSH 倾向微酸性条件 (pH=5~6)。

## 2.5 BSH 最适温度及热稳定性

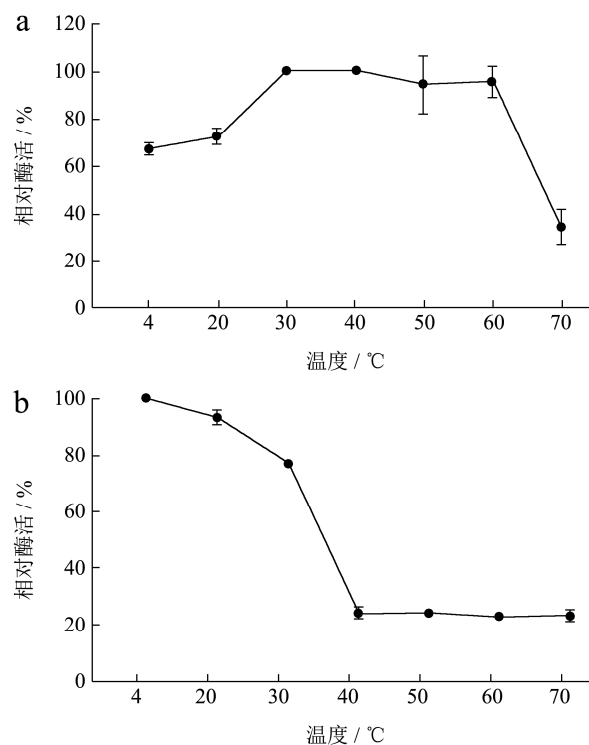


图 6 BSH 最适温度及热稳定性

Fig.6 The optimal temperature and thermal stability for BSH

注: a: BSH 最适温度; b: BSH 的热稳定性。

测定不同温度条件下 BSH 的相对酶活, 结果如图 6a 所示, 在 30 °C 表现出最高酶活力, 与屎肠球菌 NW2 中 BSH2 相一致<sup>[21]</sup>, 当温度在 4~60 °C 范围时均有较高的酶活力, 4~60 °C 酶活力均大于 60%; 当温度高于 60 °C 时, 酶活力迅速下降, 当温度达 70 °C 时, 相对酶活下降至 20%。故 BSH 在 4~60 °C 均有较高酶活。

将酶置于不同温度下孵育 1 h, 再按 1.3.5 体系进行反应并测定相对酶活。从图 6b 可以看出, 当温度 4~30 °C 范围时, 相对酶活达 80%, 这与双歧杆菌来源的重组 BSH 热稳定性较为一致<sup>[19]</sup>; 而当温度 >40 °C 时, 酶活急剧下降至 20%, 热稳定性较差。与植物乳杆菌<sup>[26]</sup>BSH 相比, 本研究的 BSH 耐受 pH 和热稳定性范围较窄, 这可能是由于不同来源和结构所导致。结果表明 BSH 不耐受高温, 为常温酶。

## 2.6 不同金属离子对 BSH 活力的影响

不同的金属离子往往对酶会产生激活或者抑制作用, 通常作为酶的激活剂或者抑制剂, 故本研究在酶反应体系中加入不同金属离子, 探究其对酶的竞争或者抑制作用。结果如表 2 所示, Na<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>均对酶活有激活作用, 为该酶的激活剂; Mn<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>对酶活影响不大; 但 Ni<sup>2+</sup>、Al<sup>3+</sup>、Li<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>均对酶活有强抑制作用, 酶活几乎丧失, 为该酶抑制剂。赵瑞香<sup>[27]</sup>等研究嗜酸乳杆菌 BSH 对 Mn<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>对 BSH 活性有促进作用, 周罗雄等<sup>[21]</sup>研究屎肠球菌 NW2BSH 活力时发现 Co<sup>2+</sup>抑制 BSH 活性, 与本研究均具有较好的一致性。这可能是由于不同离子对酶结构存在破坏作用, 影响稳定性。

表 2 不同金属离子对 BSH 活力的影响

Table 2 The effect of different metal ions on the activity of recombinant BSH

recombinant BSH	
金属离子(5mmol/L)	相对酶活/%
对照	100
Na <sup>+</sup>	106.27±3.05
Ca <sup>2+</sup>	103.93±0.63
Mg <sup>2+</sup>	114.66±2.38
Mn <sup>2+</sup>	95.76±4.50
Fe <sup>2+</sup>	92.29±0.16
Ni <sup>2+</sup>	6.39±0.67
Al <sup>3+</sup>	3.69±0.19
Li <sup>2+</sup>	7.47±0.86
Co <sup>2+</sup>	5.71±0.48
Zn <sup>2+</sup>	4.83±0.86

## 2.7 BSH 反应动力学参数的测定

以 GCA 为底物, 测定 BSH 反应动力学参数。K<sub>m</sub> 值是底物亲和常数, V<sub>max</sub> 为酶促反应最大反应速率, 利用米氏方程拟合曲线。结果如图 7 所示, 米氏曲线呈 S 型, 酶与底物在催化反应时表现出不同的协同作用。根据拟合曲线算出 K<sub>m</sub> 值为 3.16 mmol/L, V<sub>max</sub> 为 6.44 μmol/(min·mg)。与报道的干酪乳杆菌<sup>[28]</sup>(K<sub>m</sub> 值

=4.57 mmol/L) 相近, 而与脆弱拟杆菌<sup>[29]</sup>(K<sub>m</sub> 值=0.35 mmol/L) 有明显差别, 不同菌株 BSH 的 K<sub>m</sub> 值差异较大, 可能由于不同底物、不同来源菌株或者不同 BSH 结构所造成, 这一现象为揭示酶与底物的作用机理和酶的空间结构关系提供参考。

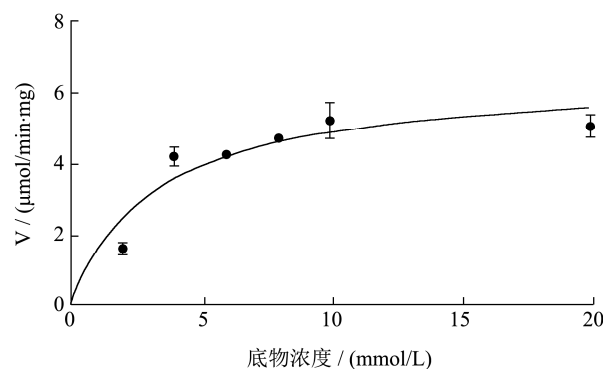


图 7 BSH 反应动力学

Fig.7 Kinetics of recombinant BSH reaction

## 2.8 BSH 3-D 结构同源模拟

利用在线软件 Swiss Model 对 BSH 的 3-D 结构进行了同源模拟, 结果如图 8 所示, 该酶有 324 个氨基酸残基组成, 与来源于粪肠球菌胆盐水解酶 Cys2Ala 突变体晶体同源性最高, 达 82.04%。用计算绝对模型质量的函数 QMEAN 评估模拟得到的模型的可靠性<sup>[30]</sup>。QMEAN 范围为 0~1, 得到的值越大, 说明模型越可靠, 该模型 QMEAN 值为 0.77、全球模型质量评估 (Global model quality estimate, GMQE) 值为 0.94, 说明模拟的 BSH 的 3-D 结构是较为可靠的。

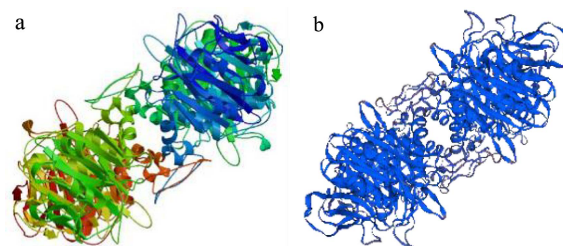


图 8 BSH 3-D 结构同源模拟结构模型

Fig.8 Three-dimensional homology simulation of recombinant BSH structure model

注: a: 粪肠球菌胆盐水解酶 Cys2Ala 突变体晶体结构; b: *E. faecium* strain 132 BSH3-D 结构。

## 3 结论

基于本研究前期发现屎肠球菌 132 具有降胆固醇功能且改善大鼠相关脂质代谢, 通过全基因组测序发现其含有一个 *bsh* 基因, 首先确定其细胞破碎液具有胆盐水解酶活力, 并且构建了 *bsh* 基因表达载体。通过在大肠杆菌 BL21 中表达并纯化得到 BSH, 对其进

行酶学特性研究。研究表明, BSH 偏好水解甘氨酸类胆酸盐, 但是对牛磺酸类胆酸盐水解也能达 60%~90%; 当以 GCA 为底物、pH=5.50、温度为 30 °C 时达最适反应条件, BSH 在偏酸中性中能保持较高的酶活但是该酶热稳定性较差; 不同金属离子对酶活有不同影响, 且该酶反应动力学得出该酶的  $V_{\max}$  为 6.44  $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ ,  $K_m$  值为 3.16 mmol/L。本研究主要探讨屎肠球菌 132 体外 BSH 活性, 通过构建 BSH 表达载体, 探究 pH、温度、不同金属离子对该酶酶活的影响, 后续可进一步研究 BSH 空间结构和潜在活性位点的关系, 或选用食品级乳酸菌表达系统表达 *bsh* 基因, 为在饲料和食品行业中应用奠定理论基础。

### 参考文献

- [1] Treuter E, Fan R, Huang Z, et al. Transcriptional repression in macrophages-basic mechanisms and alterations in metabolic inflammatory diseases [J]. FEBS Letter, 2017, 591(19): 2959-2977
- [2] Benjamin E J, Muntner P, Alonso A, et al. Heart disease and stroke statistics-2019 update: a report from the american heart association [J]. Circulation, 2019, 139(10): e56-e528
- [3] M Öztürk, C Önal. Asparagine 79 is an important amino acid for catalytic activity and substrate specificity of bile salt hydrolase (BSH) [J]. Molecular Biology Reports, 2019, 46(5):4361-4368
- [4] Ikegami T, Honda A. Reciprocal interactions between bile acids and gut microbiota in human liver diseases [J]. Hepatology Research, 2018, 48(1): 15-27
- [5] Lin J, Negga R, Zeng X, et al. Effect of bile salt hydrolase inhibitors on a bile salt hydrolase from *Lactobacillus acidophilus* [J]. Pathogens, 2014, 3(4): 947-956
- [6] Ghada S. Dietary cholesterol and the lack of evidence in cardiovascular disease [J]. Nutrients, 2018, 10(6): 780
- [7] Smith K, Zeng X M, Lin J. Discovery of bile salt hydrolase inhibitors using an efficient high-throughput screening system [J]. PLoS One, 2014, 9(1): e85344
- [8] Song Z, Cai Y, Lao X, et al. Taxonomic profiling and populational patterns of bacterial bile salt hydrolase (BSH) genes based on worldwide human gut microbiome [J]. Microbiome, 2019, 7(1): 9
- [9] Oh H K, Lee J Y, Lim S J, et al. Molecular cloning and characterization of a bile salt hydrolase from *Lactobacillus acidophilus* PF01 [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 18(3): 449-456
- [10] Ren J, Sun K, Wu Z, et al. All 4 bile salt hydrolase proteins are responsible for the hydrolysis activity in *Lactobacillus plantarum* ST-III [J]. Journal of Food Science, 2011, 76(9): M622-628
- [11] Chae J P, Valeriano V D, Kim G B, et al. Molecular cloning, characterization and comparison of bile salt hydrolases from *Lactobacillus johnsonii* PF01 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 114(1): 121-133
- [12] Corzo G, Gilliland S E. Bile salt hydrolase activity of three strains of *Lactobacillus acidophilus* [J]. Journal of Dairy Science, 1999, 82(3): 472-480
- [13] Fang F, Flynn S, Li Y, et al. Characterization of endogenous plasmids from *Lactobacillus salivarius* UCC118 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(10): 3216-3228
- [14] Natarajan P, Parani M. First complete genome sequence of a probiotic enterococcus faecium strain T-110 and its comparative genome analysis with pathogenic and non-pathogenic enterococcus faecium genomes [J]. Journal of Genetics and Genomics, 2015, 42(1): 43-46
- [15] Yang L, Xie X, Li Y, et al. Evaluation of the cholesterol-lowering mechanism of *Enterococcus faecium* strain 132 and *Lactobacillus paracasei* strain 201 in hypercholesterolemia rats [J]. Nutrients, 2021, 13(6): 1982
- [16] Dong Z, Lee B H. Bile salt hydrolases: structure and function, substrate preference, and inhibitor development [J]. Protein Science, 2018, 27(10): 1742-1754
- [17] Dashkevicz M P, Feighner S D. Development of a differential medium for bile salt hydrolase-active *Lactobacillus* spp [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1989, 55(1): 11-16
- [18] Dong Z X, Zhang J, Lee B H, et al. Secretory expression and characterization of a bile salt hydrolase from *Lactobacillus plantarum* in *Escherichia coli* [J]. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic, 2013, 93: 57-64
- [19] 周晓玲,张娟,陈坚,等.双歧杆菌胆盐水解酶基因的表达、纯化与酶学性质[J].食品与生物技术学报,2016,35(8):792-800  
ZHOU Xiaoling, ZHANG Juan, CHEN Jian, et al. Recombinant expression, purification and enzymatic properties of bile salt hydrolase gene from *Bifidobacteria* [J]. Journal of Food and Biotechnology, 2016, 35(8): 792-800
- [20] 张芬.婴儿源肠球菌的安全性评价及其体内外降胆固醇的益生功能和机制探究[D].南昌:南昌大学,2017  
ZHANG Fen. Safety evaluation of *Enterococcus* from infants and its probiotic function and mechanism of cholesterol lowering *in vitro* and *in vivo* [D]. Nanchang: Nanchang University, 2017



- [21] 周罗雄. 益生屎肠球菌胆盐耐受调控机制的研究[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2019  
ZHOU Luoxiong. Study on the regulation mechanism of bile salt tolerance of *Enterococcus faecium* [D]. Xiayang: Northwest A & F University, 2019
- [22] Sjøvall J, Griffiths W J, Setchell K, et al. Analysis of Bile Acids [M]. Sweden, 2010
- [23] Lundeen S G, Savage D C. Characterization and purification of bile salt hydrolase from *Lactobacillus* sp. strain 100-100 [J]. J Bacteriol, 1990, 172(8): 4171-4177
- [24] Tanaka H, Hashiba H, Kok J, et al. Bile salt hydrolase of *Bifidobacterium longum*-biochemical and genetic characterization [J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(6): 2502-2512
- [25] 任婧, 吴正钧, 王荫榆. 益生菌中胆盐水解酶作用机理研究现状[J]. 中国乳品工业, 2010, 38(2): 45-48  
REN Qian, WU Zhengjun, WANG Yinyu. Research status on the mechanism of bile salt hydrolyase in probiotics [J]. Chinese Dairy Industry, 2010, 38(2): 45-48
- [26] 丁珂, 段锦, 余祖华. 植物乳杆菌 DPP8 胆盐水解酶基因在大肠杆菌中的表达及其酶学性质[J]. 动物营养学报, 2020, 32(7): 3333-3342  
DING Ke, DUAN Jin, YU Zuhua. Expression and characterization of *Lactobacillus plantarum* DPP8 bile saltase gene in *Escherichia coli* [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2020, 32(7): 3333-3342
- [27] 赵瑞香, 李刚, 牛生洋, 等. 嗜酸乳杆菌胆盐水解酶的分离纯化及酶学特性[J]. 食品科学, 2014, 35(5): 165-168  
ZHAO Ruixiang, LI Gang, NIU Shengyang, et al. Isolation, purification and enzymatic characteristics of cholinesterase from *Lactobacillus acidophilus* [J]. Food Science, 2014, 35(5): 165-168
- [28] 王玉文, 王延祥, 李平兰, 等. 胆盐水解酶的分离纯化与部分特性研究[J]. 中国食品学报, 2007, 7(5): 35-41  
WANG Yuwen, WANG Yanxiang, LI Pinglan, et al. Isolation, purification and partial characteristics of bile saline hydrolyase [J]. Chinese Journal of Food Science, 2007, 7(5): 35-41
- [29] Stellwag E J, Hylemon P B. Purification and characterization of bile salt hydrolase from *Bacteroides fragilis* subsp. fragilis [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1976, 452(1): 165-176
- [30] Benkert P, Biasini M, Schwede T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models [J]. Bioinformatics, 2011, 27(3): 343-350

---

(上接第 147 页)

- [32] Sriwan Wongwisansri, Peerada Promdonkoy, Panida Matetaviparee, et al. High-level production of thermotolerant  $\beta$ -xylosidase of *Aspergillus* sp. BCC125 in *Pichia pastoris*: Characterization and its application in ethanol production [J]. Bioresource Technology, 2013, 132(132): 410-413
- [33] Li Qi, Wu Tao, Qi Zhipeng, et al. Characterization of a novel thermostable and xylose-tolerant GH 39  $\beta$ -xylosidase from *Dictyoglomus thermophilum* [J]. BMC Biotechnology, 2018, 18(1): 29-40
- [34] Bhalla Aditya, Bischoff Kenneth M, Sani Rajesh K. Highly thermostable GH39  $\beta$ -xylosidase from a *Geobacillus* sp. strain WSUCF1 [J]. BMC Biotechnology, 2014, 14(14): 396-406
- [35] Juliana Moço Corrêa, Luciana Graciano, Josielle Abrahão, et al. Expression and characterization of a GH39  $\beta$ -xylosidase II from *Caulobacter crescentus* [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2012, 168(8): 2218-2229
- [36] Xu Bo, Dai Liming, Zhang Wenhong, et al. Characterization of a novel salt-, xylose- and alkali-tolerant GH43 bifunctional  $\beta$ -xylosidase/ $\alpha$ -l-arabinofuranosidase from the gut bacterial genome [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2019, 128(4): 429-437
- [37] Andong Zhou, Yanbo Hu, Jingjing Li, et al. Characterization of a recombinant  $\beta$ -xylosidase of GH43 family from *Bacteroides ovatus* strain ATCC 8483 [J]. Biocatalysis and Biotransformation, 2020, 38(1): 46-52
- [38] Tinggang Li, Yi-Rui Wu, Jianzhong He. Heterologous expression, characterization and application of a new  $\beta$ -xylosidase identified in solventogenic *Clostridium* sp. strain BOH3 [J]. Process Biochemistry, 2018, 67(67): 99-104
- [39] Teng Chao, Jia Huiyong, Yan Qiaojuan, et al. High-level expression of extracellular secretion of a  $\beta$ -xylosidase gene from *Paecilomyces thermophila* in *Escherichia coli* [J]. Bioresource Technology, 2011, 102(2): 1822-1830