

## 研究报告

## 鸡源和猪源乳杆菌胆盐水解酶的表达及酶学性质比较

郭芳芳 王雅蕾 李忍 吴晓敏 黄建国 杨兵 徐福洲\*

(北京市农林科学院畜牧兽医研究所 畜禽疫病防控技术北京市重点实验室 北京 100097)

**摘要:**【目的】随着抗生素生长促进剂(AGPs)在动物饲料中逐步禁止使用, AGPs 替代物的研究成为热点。由于胆盐水解酶(BSH)在脂类代谢中的关键作用, 成为 AGPs 替代物研究的一个重要方向。在原核表达和纯化的基础上鉴定鸡源和猪源乳杆菌 BSH 在酶学性质方面的差异性。

【方法】分别对鸡源胆盐水解酶(BSHc)和猪源胆盐水解酶(BSHp)基因进行原核表达和蛋白纯化, 通过测定对 6 种甘氨酸结合胆盐和牛磺结合胆盐的水解效率获得两种酶的酶学动力学性质, 进而测定了温度、pH 和金属离子对酶活力的影响。【结果】BSHc 和 BSHp 对甘氨酸结合胆盐的水解效率高于牛磺结合胆盐, BSHc 对甘氨酸结合胆盐的水解效率较 BSHp 稍高; BSHc 和 BSHp 的最适酶解温度分别为 45 °C 和 42 °C; BSHc 和 BSHp 的最适反应 pH 分别为 6.0 和 5.4; 含有  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$  和  $\text{Zn}^{2+}$  的金属盐对 BSHc 和 BSHp 的酶活力均具有不同程度的抑制作用, 特别是  $\text{Cu}^{2+}$  和  $\text{Fe}^{3+}$  抑制作用比较强; 含有  $\text{Na}^{+}$ 、 $\text{K}^{+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  和  $\text{Ca}^{2+}$  的金属盐对 BSHc 和 BSHp 酶活力的抑制作用相对较弱或无抑制作用, 但  $\text{KIO}_3$  对 BSHc 和 BSHp 酶活力具有强抑制作用, KI 和  $\text{CaCl}_2$  对 BSHp 酶活力也具有较强的抑制作用。【结论】原核表达和纯化的 BSHc 和 BSHp 对甘氨酸结合胆盐的水解效率高于牛磺结合胆盐, BSHc 的最适酶解温度和 pH 稍高于 BSHp,  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$  和  $\text{Zn}^{2+}$  等金属离子对 BSHc 和 BSHp 酶活力具有明显抑制作用, 试验结果为鉴定 BSH 抑制物进而研制 AGPs 替代物奠定了基础。

**关键词:** 胆盐水解酶, 酶活力, 温度, pH, 金属离子

## Expression and characterization of bile salt hydrolase from chicken and porcine *Lactobacillus*

GUO Fang-Fang WANG Ya-Lei LI Ren WU Xiao-Min

HUANG Jian-Guo YANG Bing XU Fu-Zhou \*

(Beijing Key Laboratory for Prevention and Control of Infectious Diseases in Livestock and Poultry, Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China)

**Abstract: [Objective]** With the gradual prohibition of the use of antibiotic growth promoters (AGPs)

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No. 31572527); The Special Program on Science and Technology Innovation Capacity Building of BAAFS (No. KJCX20150703, KJCX20161503)

\*Corresponding author: Tel: 86-10-51503203; E-mail: fuzhouxu@163.com

**Received:** June 07, 2017; **Accepted:** August 30, 2017; **Published online** (www.cnki.net): September 07, 2017

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(No. 31572527); 北京市农林科学院科技创新能力建设专项项目(No. KJCX20150703, KJCX20161503)

\*通讯作者: Tel: 86-10-51503203; E-mail: fuzhouxu@163.com

**收稿日期:** 2017-06-07; **接受日期:** 2017-08-30; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2017-09-07

in animal feed, studies on AGPs alternatives are becoming hot topics. As the bile salt hydrolase plays a key role in lipid metabolism, it has become an important direction in AGPs alternatives. This study is aimed to determine the difference in enzymatic properties of bile salt hydrolase from chicken and porcine *Lactobacillus* based on the prokaryotic expression and purification. **[Methods]** The encoding genes of chicken bile salt hydrolase (BSHc) and porcine bile salt hydrolase (BSHp) were expressed in *E. coli* and purified by His-tag affinity column chromatography. The purified products were used to identify the BSH kinetic properties by hydrolyzing the six glycoconjugated and tauroconjugated bile salts. Effects of temperature, pH and metal ion compounds on the BSH activity were also determined respectively. **[Results]** BSHc and BSHp displayed higher catalytic efficiencies on glycoconjugated bile salts than that of tauroconjugated bile salts, while BSHc had a slightly higher hydrolysis activity on glycoconjugated bile salts than BSHp. The higher enzymatic activity of BSHc and BSHp were observed at the temperature of 45 °C and 42 °C, respectively. The optimal pH for BSHc and BSHp were 6.0 and 5.4, respectively. The metal ion compounds containing  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ , and  $\text{Zn}^{2+}$  displayed different degrees of inhibition on BSHc and BSHp activity, especially higher inhibition observed in  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Fe}^{3+}$  compounds. The inhibition of the compounds containing  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , and  $\text{Ca}^{2+}$  on BSHc and BSHp activity was relatively weak or no inhibition, but  $\text{KIO}_3$  had a strong inhibitory effect on BSHc and BSHp activity, KI and  $\text{CaCl}_2$  also had strong inhibitory effects on BSHp activity. **[Conclusion]** Based on prokaryotic expression and protein purification, BSHc and BSHp displayed higher catalytic efficiencies on glycoconjugated bile salts than that of tauroconjugated bile salts. The optimal temperature and pH for BSHc was higher than that for BSHp. The metal ion compounds containing  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ , and  $\text{Zn}^{2+}$  displayed significant inhibition on BSHc and BSHp activity. The results will be helpful for identification of BSH inhibitors and development of AGPs alternatives.

**Keywords:** Bile salt hydrolase, Enzymatic activity, Temperature, pH, Metal ion

为提高畜禽的生产效率, 抗生素生长促进剂 (Antibiotic growth promoters, AGPs) 广泛应用于饲料中, 对提高饲料转化率、降低疫病发生率等方面发挥了重要作用<sup>[1]</sup>。但是 AGPs 的长期使用产生了一系列问题, 如细菌耐药性增加、畜产品抗生素药物残留等, 直接威胁人类的健康和食品安全, 因此欧盟国家率先禁止了 AGPs 在动物饲料中的添加<sup>[2-3]</sup>。目前世界范围内逐渐限制和禁止在动物饲料中添加 AGPs 已是大势所趋。

随着 AGPs 的限用和禁用, 近年来抗生素替代品的研究成为热点, 而揭示 AGPs 作用机制成为研制抗生素替代品的关键。研究发现, AGPs 可显著降低肠道中胆盐水解酶 (Bile salt hydrolase, BSH) 的活性, 促进肠道中脂类的代谢和利用水平, 提高了饲料转化率<sup>[4]</sup>。

BSH 是由肠道菌群合成的一种酶, 这些肠道菌群包括乳杆菌、双歧杆菌、肠球菌、梭菌、多形杆菌等<sup>[5]</sup>, AGPs 既可通过抑制肠道菌群来降低 BSH

活性, 又可直接作用于 BSH。BSH 的主要功能是水解结合状态的牛磺胆酸盐和甘氨酸胆盐形成氨基酸和游离胆汁酸, 游离的胆酸在低 pH 条件下可与胆固醇结合形成沉淀并被排出体外, 从而降低了机体对胆固醇的吸收<sup>[6]</sup>。然而结合胆盐在肠道中脂类代谢和吸收方面发挥关键作用, BSH 的分泌降低了结合胆盐的功能, 因此有效的 BSH 抑制物可能是研制 AGPs 替代物的一个重要方向, 通过抑制 BSH 提高结合胆盐对脂类代谢的作用<sup>[4]</sup>。

本试验拟对鸡源 BSH<sup>[7]</sup>和猪源 BSH<sup>[8]</sup>分别进行原核蛋白表达, 并通过酶学性质的比较, 分析不同来源 BSH 在酶学性质方面的差异, 为鉴定 BSH 抑制物进而研制 AGPs 替代物奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 重组表达质粒

分别包含鸡源胆盐水解酶 (BSHc) 和猪源胆盐水解酶 (BSHp) 编码基因的重组表达质粒

pET21b-BSHc 和 pET21b-BSHp 由美国田纳西大学林军教授惠赠, 其中 BSHc 来自鸡源唾液乳杆菌(*Lactobacillus salivarius*), BSHp 来自猪源嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)。

## 1.2 主要试剂和仪器

甘氨酸(Glycocholic acid, GCA)、甘氨酸脱氧胆酸(Glycodeoxycholic acid, GDCA)、甘氨酸鹅脱氧胆酸(Glycochenodeoxycholic acid, GCDCA)、牛磺胆酸(Taurocholic acid, TCA)、牛磺脱氧胆酸(Taurodeoxycholic acid, TDCA)、牛磺鹅去氧酸(Taurochenodeoxycholic acid, TCDCA)购自 Sigma-Aldrich 公司。蛋白纯化预装柱 HisTrap FF 1 mL、HisTrap Desalting 5 mL、AKTA purifier 蛋白纯化系统购自 GE 公司; Mini Trans-blot 半干转印仪购自 Bio-Rad 公司。

## 1.3 重组蛋白的诱导表达

重组表达质粒 pET21b-BSHc 和 pET21b-BSHp 分别转化入 BL21(DE3)中进行表达。具体表达过程为: 重组表达菌株接种于 5 mL 含 100  $\mu\text{g/mL}$  氨苄青霉素的 Luria-Bertani (LB)培养基<sup>[7]</sup>中, 37 °C、180 r/min 振荡培养过夜, 再以体积比 1:100 的比例转接于 25 mL 含 100  $\mu\text{g/mL}$  氨苄青霉素的 LB 培养基中, 培养至  $OD_{600}$  值为 0.6–0.8 时, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 37 °C、180 r/min 振荡培养 3 h。离心收集细菌沉淀, 按体积比 10:1 加入 PBS 缓冲液(pH 7.5), 超声破碎细菌, 经 4 °C、10 000 $\times g$  离心 10 min, 分别收集上清和沉淀, SDS-PAGE 电泳分析蛋白表达情况。

## 1.4 SDS-PAGE 和 Western blot

将含有重组表达质粒 pET21b-BSHc、pET21b-BSHp 及空质粒 pET21b 的 BL21(DE3)培养菌液经超声破碎后进行 SDS-PAGE 电泳, 采用 12% 分离胶和 5% 的浓缩胶, 电泳后进行考马斯亮蓝染色, 鉴定表达情况。将未染色的蛋白电泳胶利用 Mini Trans-blot 半干转印仪转印至 PVDF 膜上, 经洗膜、封闭后与 1:1 000 稀释的 anti-His 单抗反应, 再与 1:5 000 稀释的 HRP 标记的羊抗鼠二抗反应后

进行显色和拍照。

## 1.5 重组蛋白的纯化

将 HisTrap FF 1 mL 预装柱连接在 AKTA purifier 蛋白纯化系统, 依次泵入 10 mL 20%乙醇溶液、纯水和 Loading buffer (10 mmol/L 咪唑、300 mmol/L NaCl、50 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.0)用于清洗和平衡柱子; 表达菌沉淀经超声处理并离心后取上清液进行 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤, 泵入蛋白纯化系统; 然后泵入 15 mL Washing buffer (60 mmol/L 咪唑、300 mmol/L NaCl、50 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 10% 甘油, pH 7.0); 最后泵入 5 mL Elution buffer (300 mmol/L 咪唑、300 mmol/L NaCl、50 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 10% 甘油, pH 7.0)进行蛋白洗脱。根据紫外检测数据收集洗脱液中的表达蛋白。对收集的表达蛋白液进行脱盐处理, 首先将 HisTrap Desalting 5 mL 预装柱连接到纯化系统中, 泵入 25 mL Dialyzing buffer (50 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 10% 甘油, pH 7.0), 然后加入上述收集的表达蛋白液, 根据紫外检测数据收集流出液, SDS-PAGE 电泳检测蛋白纯化效果。

## 1.6 BSH 酶活力测定

BSH 酶活力测定方法参照 Wang 等<sup>[7]</sup>方法, 即取 178  $\mu\text{L}$  0.1 mol/L PBS 缓冲液(pH 6.0), 加入 100 mmol/L BSH 酶解底物 10  $\mu\text{L}$ 、1 mol/L DTT 2  $\mu\text{L}$ 、1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  BSH 蛋白纯化溶液 10  $\mu\text{L}$ , 振荡混匀后置 37 °C 水浴反应 30 min。取 50  $\mu\text{L}$  反应液加入 50  $\mu\text{L}$  15%三氯乙酸充分混匀终止反应, 室温 10 000 $\times g$  离心 5 min, 所得溶液为酶反应液。取酶反应液 50  $\mu\text{L}$  加入 950  $\mu\text{L}$  茚三酮混合溶液(溶于 0.5 mol/L 柠檬酸钠盐缓冲液 pH 5.5 的 1%茚三酮 250  $\mu\text{L}$ , 甘油 600  $\mu\text{L}$ , 0.5 mol/L 柠檬酸钠盐缓冲液 100  $\mu\text{L}$ ), 沸水浴 14 min 后置于冰水中冷却 3 min, 室温下静置 5 min, 测定  $OD_{570}$  吸光值。

## 1.7 酶学动力学标准曲线的绘制

在上述酶活力测定过程中, BSH 酶解底物浓度分别设定为 10、20、40、60、80、100 mmol/L, 测定 BSH 酶解反应液的  $OD_{570}$  吸光值, 绘制  $OD_{570}$  吸光值和 BSH 酶解底物浓度的标准曲线, 测定结

果利用 Origin 软件 Hill 方程计算相应的  $V_{\max}$  和  $K_m$  数值。

### 1.8 温度对 BSH 酶活力的影响

在酶活力测定过程中, 酶解底物 GCA 反应混合液分别置于 25、30、35、40、42、45、50、55、60 °C 水浴中进行酶解反应, 测定  $OD_{570}$  吸光值, 鉴定不同反应温度对酶活力的影响。

### 1.9 pH 值对 BSH 酶活力的影响

在酶活力测定过程中, 将酶解底物 GCA 反应混合液中 PBS 缓冲液的 pH 值分别设定为 3.0、3.4、4.0、4.4、5.0、5.4、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0, 进行酶解反应, 测定  $OD_{570}$  吸光值, 鉴定反应缓冲液不同 pH 值对酶活力的影响。

### 1.10 金属离子对 BSH 酶活力的影响

在酶活力测定过程中, 首先将 BSH 蛋白酶液分别与金属盐 KCl、MgSO<sub>4</sub>、MnSO<sub>4</sub>、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、MnCl<sub>2</sub>、ZnSO<sub>4</sub>、ZnCl<sub>2</sub>、CuCl<sub>2</sub>、CuSO<sub>4</sub>、MgCl<sub>2</sub>、FeCl<sub>3</sub>、CaCl<sub>2</sub>、KI 混匀后 37 °C 水浴反应 30 min, 反应液中金属离子终浓度为 10 mmol/L, 然后加入酶解底物 GCA 进行酶解反应, 同时以不添加金属盐的酶解反应作为对照, 测定  $OD_{570}$  吸光值。以不添加金属盐的酶活力为 100%, 金属盐对酶活力的抑制百分率(%)=100×(不添加金属盐的酶活力平均值-添加金属盐的酶活力平均值)/不添加金属盐的酶活力平均值, 通过计算抑制百分率鉴定不同金属离子对酶活力的影响。

## 2 结果与分析

### 2.1 BSH 原核表达与蛋白纯化结果

*BSHc* 基因长度为 975 bp, 编码 324 aa, 分子量大小约为 37 kD; *BSHp* 基因长度为 951 bp, 编码 316 aa, 分子量大小约为 35 kD。 *BSHc* 和 *BSHp* 基因片段在原核表达载体 pET21b 中表达及纯化产物经 SDS-PAGE 电泳分析结果如图 1A (*BSHc*)和图 1B (*BSHp*)所示, 结果显示两个基因片段均表达良好; 表达蛋白与 anti-His 单抗进行的 Western blot 检测结果显示 *BSHc* 和 *BSHp* 在相应位置均与 anti-His 单

抗反应显示单一的条带(图 1C), 结果提示携带 His 标签的表达蛋白大小与预期一致。

### 2.2 BSH 水解不同胆盐底物的酶学动力学测定结果

分别测定了 *BSHc* 和 *BSHp* 对 6 种胆盐底物 GCA、GDCA、GCDCA、TCA、TDCA、TCDCA 的酶活力, 并绘制不同底物浓度下的酶学动力学标准曲线, 利用 Origin 软件 Hill 方程计算相应的  $V_{\max}$  和  $K_m$  数值, 计算结果如表 1 所示。结果显示, *BSHc* 和 *BSHp* 对甘氨酸结合胆盐的水解效率显著高于牛磺结合胆盐; *BSHc* 对甘氨酸结合胆盐的水解效率较 *BSHp* 高。

### 2.3 温度对 BSH 酶活力的影响

温度对 *BSHc* 和 *BSHp* 酶活力影响的测定结果如图 2 所示。结果显示, *BSHc* 在温度介于 35–50 °C 之间时酶活力较高, 45 °C 时达到最高; 而 *BSHp* 在温度介于 35–45 °C 之间时酶活力较高, 42 °C 时达到最高。在 35–55 °C 之间, 温度为 42 °C 时 *BSHc* 和 *BSHp* 酶活力无显著差异, 而其它温度时 *BSHc* 的酶活力高于 *BSHp*, 特别是在 45 °C 时两者差异显著, 这可能是由于鸡肠道内的正常温度显著高于猪, 鸡源 BSH 在此温度下可发挥更高酶活力的原因。

### 2.4 pH 值对 BSH 酶活力的影响

pH 值对 *BSHc* 和 *BSHp* 酶活力影响的测定结果如图 3 所示。结果显示, *BSHc* 在 pH 值介于 4.0–7.0 之间时酶活力较高, pH 6.0 时酶活力最高; *BSHp* 同样在 pH 值介于 4.0–7.0 之间时酶活力较高, pH 5.4 时酶活力最高。结果提示在 pH 值为 4.0–7.0 的胃酸环境中 *BSHc* 和 *BSHp* 均可保持较高的酶活力。

### 2.5 金属离子对 BSH 酶活力的影响

为测定不同种类金属离子对 BSH 酶活力的影响, 本试验选择含有 Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>、Ca<sup>2+</sup> 的 14 种金属盐类添加至酶反应液中, 通过与未添加金属盐的酶活力进行比较计算出不同金属离子对 BSH 酶活力的抑制百分率, 测定结果如表 2 所示。结果显示, 含有 Cu<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>、Mn<sup>2+</sup> 和 Zn<sup>2+</sup> 的金属盐对 *BSHc* 和 *BSHp* 的酶活力均具有

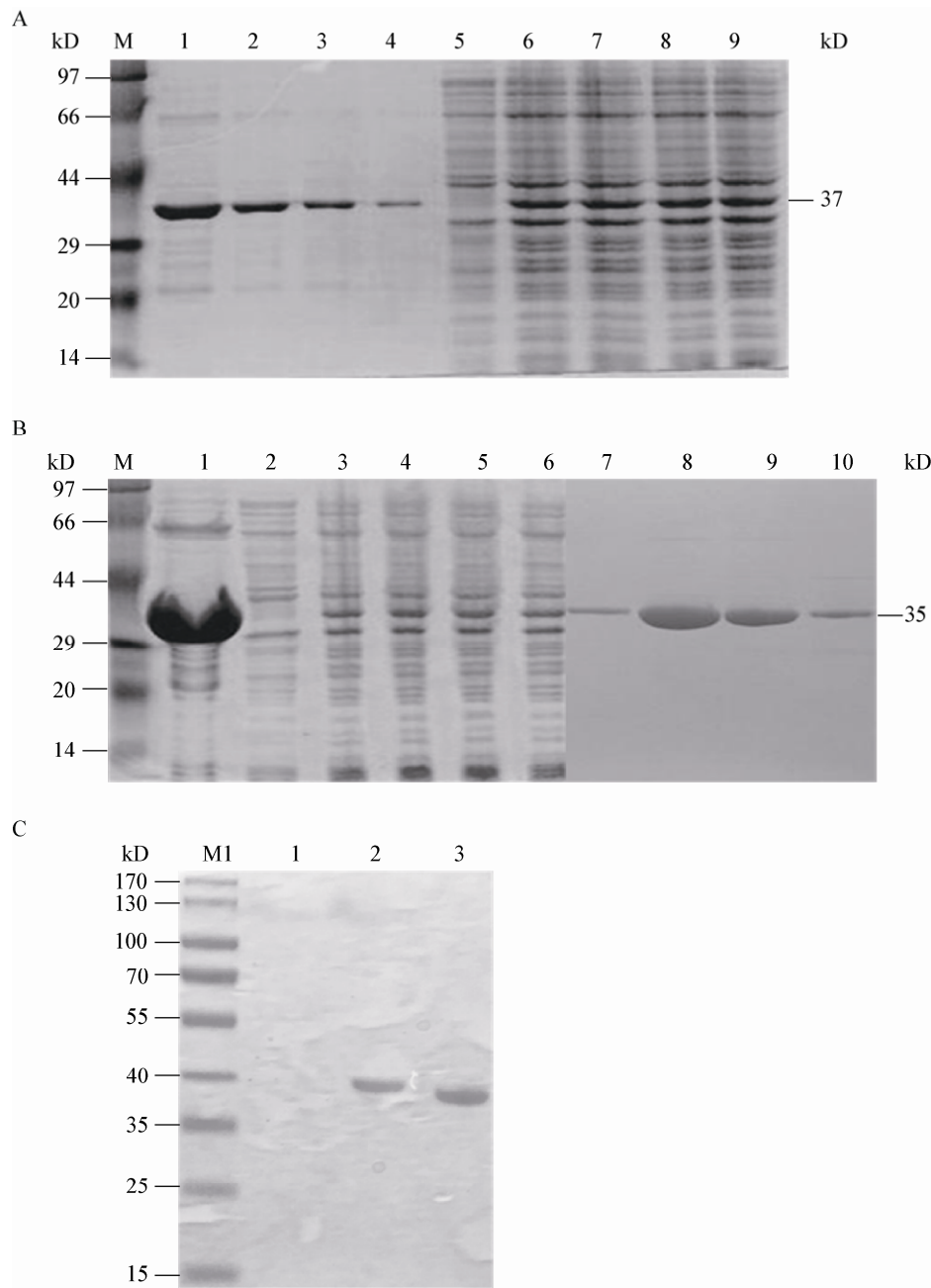


图 1 BSH 原核表达、纯化及 Western blot 结果

Figure 1 Prokaryotic expression, product purification and Western blot of BSH

注：A: *BSHc* 基因表达及纯化结果. M: 蛋白 Marker; 1-4: 不同洗脱收集管中的纯化产物; 5: 诱导前的细菌裂解液; 6-9: 诱导后 3、4、5、6 h 的细菌裂解液. B: *BSHp* 基因表达及纯化结果. M: 蛋白 Marker; 1: 上柱纯化前的表达产物; 2: 诱导前的细菌裂解液; 3-6: 诱导后 3、4、5、6 h 的细菌裂解液; 7-10: 不同洗脱收集管中的纯化产物. C: Western blot 检测结果. M1: 预染 Marker; 1: pET21b; 2: BSHc; 3: BSHp.

Note: A: Prokaryotic expression and product purification of *BSHc*. M: Protein marker; 1-4: Purified products in different elution collection tubes; 5: Bacterial lysate before induction; 6-9: Bacterial lysates at 3, 4, 5, 6 h after induction. B: Prokaryotic expression and product purification of *BSHp*. M: Protein Marker; 1: Bacterial lysate for purification; 2: Bacterial lysate before induction; 3-6: Bacterial lysates at 3, 4, 5, 6 h after induction; 7-10: Purified products in different elution collection tubes. C: Detection result of Western blot. M1: Pre-stained protein marker; 1: pET21b; 2: BSHc; 3: BSHp.

表 1 BSH 水解不同胆盐底物的酶学动力学测定结果  
Table 1 Kinetics of BSH for different substrates of bile salts

底物 Substrate	$V_{\max}$ ( $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ )		$K_m$ (mmol/L)	
	BSHc	BSHp	BSHc	BSHp
GCA	118.95	91.30	41.62	35.72
GDCA	115.06	80.86	40.29	30.82
GCDCA	95.99	63.89	39.32	46.89
TCA	41.05	52.59	61.35	52.97
TDCA	39.32	46.30	57.72	68.34
TCDCa	46.42	27.47	37.61	59.52

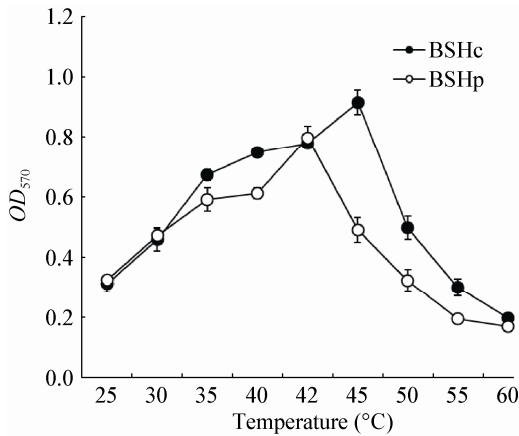


图 2 温度对 BSH 酶活力的影响  
Figure 2 Effect of temperature on BSH activity

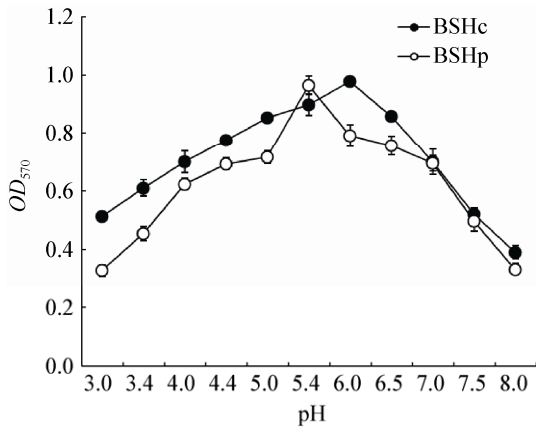


图 3 pH 值对胆盐水解酶的酶活力影响  
Figure 3 Effect of pH on BSH activity

表 2 不同金属盐化合物对 BSH 酶活力的影响  
Table 2 Effect of different metal ion compounds on BSH activity

金属盐 Compound	BSHc 抑制率 Inhibition of BSHc (%)	BSHp 抑制率 Inhibition of BSHp (%)
KIO <sub>3</sub>	89.89	78.51
CuCl <sub>2</sub>	89.72	76.69
CuSO <sub>4</sub>	89.08	77.52
FeCl <sub>3</sub>	75.81	50.91
MnSO <sub>4</sub>	36.89	23.31
ZnSO <sub>4</sub>	35.92	42.64
MnCl <sub>2</sub>	29.05	17.85
ZnCl <sub>2</sub>	22.01	23.64
MgSO <sub>4</sub>	11.08	-4.46
KCl	9.06	-13.72
KI	-1.46	61.65
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-1.78	-21.82
MgCl <sub>2</sub>	-3.32	-0.17
CaCl <sub>2</sub>	-8.82	46.94

不同程度的抑制作用，特别是  $\text{Cu}^{2+}$  和  $\text{Fe}^{3+}$  抑制作用比较强；含有  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  和  $\text{Ca}^{2+}$  的金属盐对 BSHc 和 BSHp 酶活力的抑制作用相对较弱或无抑制作用，但也有例外，如  $\text{KIO}_3$  对 BSHc 和 BSHp 酶活力的抑制作用最强，KI 和  $\text{CaCl}_2$  对 BSHp 酶活力也具有较强的抑制作用。结果提示 BSHc 和 BSHp 在与金属离子相互作用的酶活性位点方面存在差异。

### 3 讨论

在肠道微环境中，能够分泌 BSH 的微生物均可接触到胆盐，这些微生物主要包括乳杆菌和双歧杆菌等<sup>[5,9]</sup>，目前已在多种乳杆菌中鉴定了 BSH 的酶活性并对其编码基因进行了研究<sup>[7-8,10-11]</sup>。研究还发现，乳杆菌基因组中可以编码 1-4 种 BSH 酶，其长度通常为 316-338 aa 之间，不同 BSH 酶在酶活性和性质方面存在显著差异<sup>[5]</sup>。本试验利用鸡源唾液乳杆菌和猪源嗜酸乳杆菌中获取的 BSH 基因进行表达和纯化后比较其酶学性质，结果也显示两种 BSH 在酶活性、温度、pH 和抑制物方面均存在一些差异。

本试验分别测定了 BSHc 和 BSHp 对 6 种胆盐底物的酶活力，利用 Origin 软件 Hill 方程计算相应

的  $V_{\max}$  和  $K_m$  数值, 数据拟合符合 Hill 方程, 推测 BSH 属于变构酶, 底物可能与酶的一个亚基上的活性中心结合后, 通过构象的改变, 增强其它亚基活性中心与底物的结合。此外, 本试验在反应体系中加入 DTT 会使动力学曲线的 S 型消失, 需要通过数据拟合, 符合米氏动力学, 提示 DTT 影响催化活性中心半胱氨酸的巯基作用, 从而阻碍了底物与酶的活性中心结合而造成其它亚基构象改变, 最终底物与酶之间的正协同效应消失。

在酶反应体系中温度和 pH 值均是非常重要的影响因素。Oh 等<sup>[8]</sup>对嗜酸乳杆菌 BSH 测定结果显示最适温度和 pH 值分别为 40 °C 和 6.0; Wang 等<sup>[7]</sup>对唾液乳杆菌 BSH 测定结果显示最适温度和 pH 分别为 41 °C 和 5.5。本试验对 BSHc 和 BSHp 测定得出相似的结果, BSHc 在温度 40 °C、pH 6.0 时酶活力较高; BSHp 在温度 30 °C、pH 7.0 时酶活力较高; 而在温度超过 50 °C 或低于 30 °C、pH 高于 9.0 或低于 3.0 等条件下酶活力急剧降低。

利用 BSH 在人和动物脂类和胆固醇代谢方面发挥的重要作用<sup>[5]</sup>, 将 BSH 研究与人类控制体重及减肥<sup>[6,12]</sup>结合在一起, 已成为目前的研究热点, 如在小鼠中过量表达 BSH 来提高其酶活性可显著降低小鼠的体重、血清中胆固醇以及肝脏甘油三酯的含量<sup>[6]</sup>。除过量表达 BSH 来控制体重外, 通过抑制 BSH 活性筛选 AGPs 替代物也是目前的一个研究热点<sup>[4]</sup>。由于 AGPs 可显著降低肠道中 BSH 的活性, 更多的结合态胆盐参与脂类代谢和吸收, 促进肠道中脂类利用水平, 提高饲料转化率, 因而通过筛选 BSH 抑制剂来研制 AGPs 替代物将具有重要意义<sup>[13]</sup>。本试验结果显示, 含有  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$  和  $\text{Zn}^{2+}$  的金属盐对 BSH 酶活力均具有不同程度的抑制作用, 特别是  $\text{Cu}^{2+}$  和  $\text{Fe}^{3+}$  抑制作用比较强; 其它研究报道也得出类似的结论<sup>[7]</sup>。进一步研究显示, 利用高通量药物筛选系统对 BSH 抑制剂进行筛选, 不但常用的 AGPs 如四环素、洛克沙酮等被鉴定具有较好的 BSH 抑制效果, 而且一些新的 BSH 抑制剂如核黄素、CAPE 等也被鉴定出来<sup>[14]</sup>。

目前, 我们已对 BSHc 进行了晶体结构解析<sup>[15]</sup>, 对 BSH 与底物或抑制物结合的机制研究也在进行中, 利用筛选的 BSH 抑制剂进行鸡生长试验, 初步显示具有明显的促生长效果, 在这些研究结果的基础上对筛选的 BSH 抑制剂进一步深入研究, 将具有发展成为 AGPs 替代物的潜力。

## 参考文献

- [1] Dibner JJ, Richards JD. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action[J]. Poultry Science, 2005, 84(4): 634-643
- [2] Wegener HC. Antibiotics in animal feed and their role in resistance development[J]. Current Opinion in Microbiology, 2003, 6(5): 439-445
- [3] Millet S, Maertens L. The European ban on antibiotic growth promoters in animal feed: From challenges to opportunities[J]. The Veterinary Journal, 2011, 187(2): 143-144
- [4] Lin J. Antibiotic growth promoters enhance animal production by targeting intestinal bile salt hydrolase and its producers[J]. Frontiers in Microbiology, 2014, 5: 33
- [5] Begley M, Hill C, Gahan CGM. Bile salt hydrolase activity in probiotics[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(3): 1729-1738
- [6] Joyce SA, MacSharry J, Casey PG, et al. Regulation of host weight gain and lipid metabolism by bacterial bile acid modification in the gut[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(20): 7421-7426
- [7] Wang Z, Zeng XM, Mo YM, et al. Identification and characterization of a bile salt hydrolase from *Lactobacillus salivarius* for development of novel alternatives to antibiotic growth promoters[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(24): 8795-8802
- [8] Oh HK, Lee JY, Lim SJ, 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
- [9] Patel AK, Singhanian RR, Pandey A, et al. Probiotic bile salt hydrolase: current developments and perspectives[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2010, 162(1): 166-180
- [10] Gu XC, Luo XG, Wang CX, et al. Cloning and analysis of bile salt hydrolase genes from *Lactobacillus plantarum* CGMCC No.8198[J]. Biotechnology Letters, 2014, 36(5): 975-983
- [11] Jones BV, Begley M, Hill C, et al. Functional and comparative metagenomic analysis of bile salt hydrolase activity in the human gut microbiome[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(36): 13580-13585
- [12] Joyce SA, Shanahan F, Hill C, et al. Bacterial bile salt hydrolase in host metabolism: Potential for influencing gastrointestinal microbe-host crosstalk[J]. Gut Microbes, 2014, 5(5): 669-674
- [13] Lin J, Negga R, Zeng XM, et al. Effect of bile salt hydrolase inhibitors on a bile salt hydrolase from *Lactobacillus acidophilus*[J]. Pathogens, 2014, 3(4): 947-956
- [14] Smith K, Zeng X, Lin J. Discovery of bile salt hydrolase inhibitors using an efficient high-throughput screening system[J]. PLoS One, 2014, 9(1): e85344
- [15] Xu FZ, Guo FF, Hu XJ, et al. Crystal structure of bile salt hydrolase from *Lactobacillus salivarius*[J]. Acta Crystallographica Section F, 2016, 72(5): 376-381