

卢方云, 杨彪, 马晶晶, 等. 胆盐水解酶酶学性质与基因结构研究进展 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(8): 469–475. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022060319

LU Fangyun, YANG Biao, MA Jingjing, et al. Progress on Enzymatic Properties and Gene Structure of Bile Salt Hydrolase[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(8): 469–475. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022060319

· 专题综述 ·

胆盐水解酶酶学性质与基因结构研究进展

卢方云^{1,2}, 杨彪^{1,2,3}, 马晶晶^{1,2,3}, 杨静^{1,2,3}, 李鹏鹏^{1,2,3}, 徐为民^{1,2,3}, 王道营^{1,2,3,*}, 邹烨^{1,2,3,*}

(1. 江苏大学食品与生物工程学院, 江苏镇江 212001;

2. 江苏省农业科学院农产品加工所, 江苏南京 210014;

3. 农业农村部农产品冷链物流技术重点实验室, 江苏南京 210014)

摘要:胆盐水解酶(Bile salt hydrolase, BSH)广泛存在于哺乳动物胃肠道中,是肠道菌群在生长、繁殖过程中产生的一种胞内酶,可以调节宿主的胆汁酸平衡,影响脂质代谢,有控制胆固醇、调节肠道疾病的作用,并且BSH这种调控作用可以实现益生菌部分益生功能,因此BSH一直是研究热点。BSH结构和底物特异性的详细知识是开发BSH相关产品的坚实基础。本文介绍了BSH的来源及活性检测方法,BSH基因结构、酶学性质及底物识别机制,最后讨论了BSH在畜禽业食品工业及医药等方面的应用,期望为胆盐水解酶的深入研究及其在食品、保健品及医药方面的开发利用提供参考。

关键词:胆盐水解酶,肠道微生物,酶学性质,结构基础,应用

中图分类号:Q556

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2023)08-0469-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022060319



本文网刊:

Progress on Enzymatic Properties and Gene Structure of Bile Salt Hydrolase

LU Fangyun^{1,2}, YANG Biao^{1,2,3}, MA Jingjing^{1,2,3}, YANG Jing^{1,2,3}, LI Pengpeng^{1,2,3}, XU Weimin^{1,2,3},
WANG Daoying^{1,2,3,*}, ZOU Ye^{1,2,3,*}

(1. College of Food and Bioengineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212001, China;

2. Institute of Agricultural Products Processing, Jiangsu Academy of Agricultural Science, Nanjing 210014, China;

3. Key Laboratory of Agricultural Products Cold Chain Logistics Technology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanjing 210014, China)

Abstract: Bile salt hydrolase (BSH) is an intracellular enzyme which is produced by intestinal flora during the period of growth and reproduction. This enzyme has been suggested to be involved in the host's bile acid balance, lipid metabolism and metabolic responses. Therefore, BSH has always been a research hotspot. Detailed knowledge of BSH structure and substrate preferences is a solid foundation for the development of BSH related products. This review explains the source and distribution of BSH, test method for BSH activity. It also introduces enzymatic properties and genetic organization. Finally, the potential applications of BSH research are briefly discussed. This review would provide theoretical basis for the in-depth research of BSH, developments of related functional foods, and other industry applications.

Key words: bile salt hydrolase; intestinal microflora; enzymatic properties; structural basis; applications

胆盐水解酶(Bile salt hydrolase, BSH)是肠道菌群在生长发育过程中产生的一类代谢产物,属于N-

端亲核水解酶(Ntn)超家族中胆酰甘氨酸水解酶(CGHS)家族,是 bsH 基因编码的胞内酶,具有重要的

收稿日期: 2022-06-30

基金项目: 国家现代农业产业技术体系资助(CARS-41)。

作者简介: 卢方云(1997-),女,硕士研究生,研究方向: 畜禽副产物的高值化开发和综合利用, E-mail: lufangyun123@163.com。

* 通信作者: 王道营(1979-),男,博士,研究员,研究方向: 肉品加工与质量控制, E-mail: wdy0373@aliyun.com。

邹烨(1986-),女,博士,副研究员,研究方向: 畜禽副产物的高值化开发和综合利用, E-mail: zouye@jaas.ac.cn。

生理作用^[1]。BSH 作用于酰胺键,能够调节胆酸池的组成,将结合态胆汁酸催化水解为游离氨基酸和游离态胆汁酸,该反应在胆汁酸代谢及肝肠循环中具有重要作用^[2]。20 世纪 70 年代就开始了 BSH 的研究,1967 年首次从产气荚膜梭菌中部分纯化了 BSH,关于 BSH 的研究主要集中在 BSH 基因克隆及纯化、高 BSH 菌株筛选、BSH 在胃肠道中的作用机制及降胆固醇机理等方面^[3]。

越来越多研究发现 BSH 对肠道微生物和宿主生理代谢具有重要调节作用,仅 BSH 活性就可以显著影响宿主的脂质代谢和体重增加^[1]。胆盐水解酶的解结合会导致脂质吸收不良,这可能导致宿主体重减轻,通过抑制肠道 BSH 的活性,将促进脂肪代谢和能量收获,从而改善食用动物的生长性能和饲料效率^[4]。BSH 的解结合作用可以影响宿主体内胆固醇的动态平衡^[5]。广泛的肠道微生物区系研究表明,BSH 是开发新型非抗生素食品添加剂、提高动物饲料产量和设计控制人类肥胖的新措施的关键因素,通过 BSH 介导饮食干预肝肠疾病具有巨大潜力,BSH 活性作为益生菌筛选的标记,在功能性食品研究与开发中具有重要意义。胆盐水解酶与益生菌降胆固醇有一定关系,但具体机制尚不明确,BSH 对肠道菌的重要性也不清楚,为了对胆盐水解酶有更深入全面的认识,本文对 BSH 来源分布、酶学性质以及结构和应用方面进行了综述,对于进一步深入研究胆盐水解酶作用机制及其在食品工业、医药及其他方面的应用提供参考。

1 胆盐水解酶来源及分布

研究发现 BSH 广泛分布在肠道细菌中,并且在人类和小鼠肠道环境中观察到的 BSH 蛋白存在细微差异,这反映该酶的宿主物种特异性。系统发育分析表明,以共轭胆汁酸形式存在的选择性压力促使 BSH 活性的表达,富含结合胆汁酸和非结合胆汁酸的自然环境,如肠道粪便通常容易分离出有 BSH 活性的菌株^[6]。哺乳动物和人体的肠道和粪便是分离产 BSH 菌株的主要来源,例如,研究者从小鸡胃肠道菌群中分离了 12 株 *Lactobacillus* 菌株(如 *L. reuteri*、*L. brevis*、*L. salivarius*、*L. gallinarum* 和 *L. panis*),人体粪便中分离出 3 株菌株(*L. fermentum*、*Streptococcus bovis* ATCC 43143 和 *Enterococcus faecalis* UK873),这些菌株具有水解结合胆汁盐的能力,并且这些微生物作为益生菌制剂与宿主肠道微生物群具有良好相容性。后面研究者也从蔬菜、温泉和牛奶中分离出了具有 BSH 活性的微生物^[7]。从奶酪中分离出来的植物乳杆菌菌株 DGIA1 对甘胆酸钠、甘氨酸脱氧胆酸盐、牛磺胆酸盐和牛磺酸脱氧胆酸盐有很高的水解能力^[8]。表 1 中列出了部分产 BSH 菌株,BSH 主要分布在革兰氏阳性的肠道细菌中,例如乳杆菌属(*Lactobacillus*)、双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、肠球菌属(*Bifidobacterium*)、梭状芽孢杆菌

属(*Clostridium*)和拟杆菌属(*Bacteroides*)等。其中双歧杆菌和乳杆菌等益生菌尤为受到人们关注,并且研究发现双歧杆菌来源的胆盐水解酶的活性较乳杆菌来源的胆盐水解酶的酶活高得多^[9]。

表 1 部分产胆盐水解酶菌株及来源
Table 1 Microbial sources of bile salt hydrolase

菌株	来源	参考文献
植物乳杆菌(<i>L. plantarum</i> DGIA1)	奶酪	[8]
嗜酸乳杆菌(<i>L. acidophilus</i> LA15)	开菲尔颗粒	[7]
植物乳杆菌(<i>L. plantarum</i> WCFS1)	人体唾液	[7]
副干酪乳杆菌(<i>L. paracasei</i> RN025880)	传统酵素	[10]
芽孢杆菌(<i>Bacillus polyfermenticus</i>)	朝鲜泡菜	[11]
枯草芽孢杆菌(<i>B. subtilis</i> Bn1)	牛奶	[7]
克里斯滕森菌(<i>C. minuta</i> DSM33407)	人体	[12]
粪肠球菌(<i>E. faecalis</i> UK873)	人体	[7]
酵母菌(<i>Yeasts</i>)	绿橄榄	[13]
片球菌(<i>Pediococcus</i> spp)	红酒	[14]

2 胆盐水解酶活性检测方法

BSH 活性很大程度上代表了一种常见的作用于胆汁的微生物生物转化能力,BSH 活性与胆盐耐受性之间存在一定联系,并可以作为筛选益生菌的一项重要标准^[15]。基于 BSH 与底物反应的原理已有多检测其活性的方法,其中定性检测的方法包括平板筛选法、放射性同位素标记法和薄层色谱法等,定量方法包括茚三酮法、高效液相色谱法、糠醛法和三硝基苯磺酸法等^[16-17]。

2.1 定性检测方法

平板法是实验过程中最常用的一种方法,操作简便,可以快速地从待测菌株中筛选出目标菌株,其检测的主要原理是结合胆汁酸和非结合胆汁酸的不同物理化学性质,BSH 将结合型胆汁酸水解成游离型胆汁酸和氨基酸,游离型胆汁酸在水中溶解性差,从而在琼脂中沉淀出来从而产生光晕。平板法筛选时培养基中常用的底物有牛磺脱氧胆酸和牛磺胆酸,由于 BSH 表现出不同的底物特异性,在平板中添加其他结合胆盐(如甘氨酸鹅去氧胆酸、甘氨酸胆酸等)可以达到特定的筛选目的^[18]。放射性同位素标记法采用放射性同位素标记的胆盐作为底物,结果准确,灵敏度高,稳定性好,但价格昂贵不易操作^[19]。薄层色谱法利用各成分的极性不同从而达到分离目的,可用于胆盐的定性分离和鉴定,与光密度法相结合可实现胆盐的定量分析,该方法准确度较高,但成本高。随着数字图像技术的发展,将数字图像分析软件与平面色谱法相结合的高效薄层色谱法与传统方法相比具有更高的分离效率及准确度,操作简单,经济有效^[20]。

2.2 定量检测方法

定量检测方法根据检测对象的不同分为两种类型,一种是通过检测 BSH 水解结合态胆汁盐生成的氨基酸的浓度来反应 BSH 活力,如茚三酮法和三硝

基苯磺酸法;另一种则是通过测定结合胆盐或游离胆盐变化确定酶活,如高效液相色谱法和糠醛法。糠醛法和三硝基苯磺酸法因具有一定毒害作用,已较少使用。茚三酮法在酶活性定量检测方法中具有成本低、操作便捷的优势,在国内外实验中得到广泛应用,其检测过程主要包括胆盐水解反应和反应生成氨基酸的量化^[21]。高效液相色谱法准确度与灵敏度都较高,并且高效液相色谱方法可以同时检测多种胆盐为底物时的反应,可研究 BSH 对不同底物的降解区别,通过液相色谱图可以直观地看到 BSH 的降解偏好,便于进行特定的筛选^[22]。

3 胆盐水解酶的基本结构和酶学性质

3.1 胆盐水解酶空间结构

目前,已经报道了四个特定物种的 BSH 晶体结构,包括来自长双歧杆菌的 BIBSH^[23]、产气荚膜双歧杆菌的 CpBSH^[24]、粪肠球菌的 EfBSH^[25] 和唾液乳杆菌的 LsBSH^[26],BSH 主要以同源四聚体的结构存在,BSH 分子单体采用 NTN 水解酶的 $\alpha\beta\alpha$ 四层三级结构折叠,两个反向平行的 β -片层夹在两个 α -螺旋之间,单体和单体之间通过氢键、疏水作用及静电相互作用连接形成四聚体,如图 1 所示,单体的总体四聚体排列和其他 NTN 水解酶家族成员所描述的生理组装是一致的^[27]。部分 BSH 以同源六聚体或八聚体形式存在,同一生物体中的 BSH 同系物可能表现出不同的单体结构^[2],在脆弱芽孢杆菌 ATCC 25285 中发现了同源二聚体、同源六聚体和同源八聚体三种形式的 BSH^[28]。

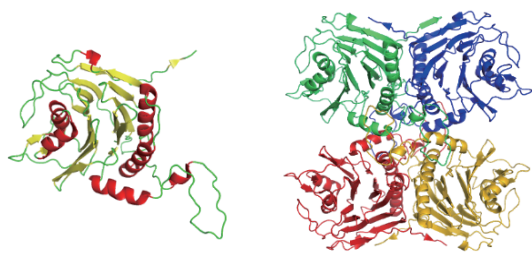


图 1 粪肠球菌来源的胆盐水解酶的单体和四聚体结构 (PDB:4WL3)

Fig.1 Monomeric and tetrameric structures of EfBSH (PDB:4WL3)

BSH 的结构解析有助于理解酶分子的底物选择性及作用机理,已知胆酰甘氨酸水解酶类有四个结合口袋环,它们构成底物结合口袋,影响酶活力及底物亲和能力^[20]。Ef BSH 中的这四个环由残基 21~25 (环区 1)、57~64 (环区 2)、125~137 (环区 3) 和 255~269 (环区 4) 组成。与其他 BSHs 相比,Ef BSH 的环区 2 延伸的更多,动态性和灵活性增加(图 2),此外,与 Cp BSH 和 Bl BSH 相比,Ef BSH 的结合口袋具有更强的疏水性。活性中心性质的这些变化(如较小的结合袋体积和较高的疏水/亲水比),可能会影响底物的结合^[22]。

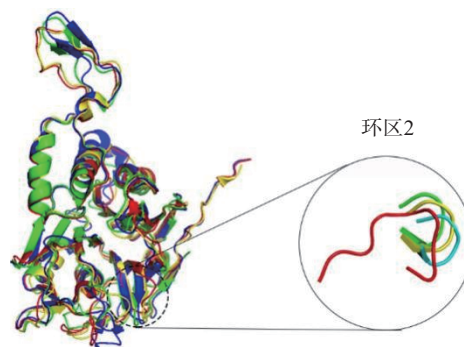


图 2 四种来源胆盐水解酶结构对比图

Fig.2 Structural comparison of four sources of bile salt hydrolases

注: EfBSH (红色) (PDB:4WL3), BIBSH (绿色) (PDB:2HEZ), CpBSH (蓝色) (PDB:2BJF) 和 LsBSH (黄色) (PDB:5HKE)。

3.2 酶学性质

不同来源的 BSH 在氨基酸数量、最适 pH、温度、底物偏好等方面存在差异,这些 BSHs 主要是由 314~338 个氨基酸编码的胞内酶^[3],BSH 的最适 pH 范围较广在 3.8~7.0 之间。除 LjPF01_BSHC 的最适温度为 70 °C 外,大多数 BSH 酶的最适作用温度在 30~55 °C,底物特异性是 BSH 最大的酶学差异,不同来源的 BSH 对不同的胆汁酸有不同的水解能力^[29],相对于牛磺型结合胆汁酸,大部分 BSH 水解甘氨酸型结合胆汁酸的能力更高,来源于乳酸菌属的 BSH 对甘氨酸脱氧胆酸的水解率超过 90%,而对牛磺脱氧胆酸的水解率仅为 33%~45%^[14]。此外,同一菌株的多个 BSH 同系物可能表现出不同的优先活性,如 LjPF01_BSHA 和 LjPF01_BSHC,分别对牛磺酸和甘氨酸结合胆汁酸表现出特异性亲和力^[30]。BSH 活性也与活性位点息息相关,胆盐水解酶的活性位点主要位于两个核心 β 折叠之间^[31],通过对 BSH 和青霉素 V 酰化酶结构的比较,已经在 BSH 的活性位点上发现了几个保守的、重要的催化残基(Cys2、Arg16、Asp19、Asn79、Asn171 和 Arg224),这六个残基在三维结构中是封闭的,形成了 BSH 的核心活性位点,在这六种主要的催化残基中有 5 种都是保守的^[32],根据产气荚膜梭菌的 CpBSH 编号,其几何结构如图 3 所示,其中 Cys2 是公认的活性位点,任何关于此位点的突变都会导致酶失活,重组酶 s 型曲线消失^[33]。周晓玲等^[34]在关于 BSH 的诱导表达研究中发现,在双歧杆菌来源 BSH 的 N 端添加组氨酸标签会导致 N 端催化反应中心 Cys2 结构改变,从而导致表达后失去 BSH 活性,而在 C 端添加组氨酸标签,诱导表达后可以检测到胞内活性。此外,Xu^[35]等通过定点突变对六种结合胆汁酸的诱变和 BSH 活性分析,验证了几个活性位点残基在底物识别和催化中的重要性。其中,Cys2 和 Asn171 对酶活性起关键作用,Tyr24、Phe65 和 Gln257 对底物专一性有贡献^[35]。Öztürk 等对活性位点中 R16 和 D19 残基进行定点突变,R16 和 D19 突变分别导致 BSH 活性的急剧下

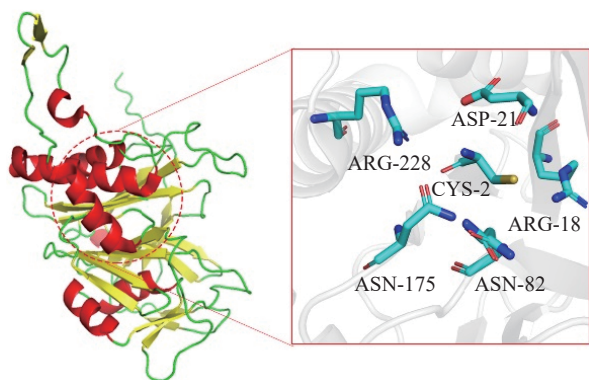


图3 六种主要催化残基在 CpBSH 活性中心的几何排列

Fig.3 Geometric arrangement of the six major catalytic residues in the active center of CpBSH

降和 BSH 蛋白产量的损失,证明了 R16 和 D19 残基在维持活性位点几何形状和过渡态稳定方面具有重要作用^[36]。

3.3 底物识别机制

BSH 的底物由胆酸盐类固醇核和氨基酸基团组成,根据氨基酸种类的不同分为甘氨酸型结合胆盐和牛磺酸型结合胆盐两大类(图4)^[37],根据之前研究中动力学数据显示,BSH 对甘氨酸型结合胆盐的水解能力普遍优于牛磺酸型结合胆盐,因而认为 BSH 优先识别氨基酸部分而不是胆酸部分,推测其主要原因是由于牛磺酸结合胆盐中硫原子引起的空间位阻(图4)^[38]。也有观点认为宿主肠道中甘氨酸型结合胆汁酸的浓度高于牛磺酸型结合胆汁酸的浓度,且甘氨酸结合胆汁酸比牛磺酸结合胆汁酸对细菌的毒性大得多,这种底物偏好的选择性压力导致 BSH 对甘氨酸型结合胆汁酸的高酶活以削弱其对细菌的毒性^[39]。最近研究者提出 BSHs 同时识别氨基酸和胆酸类固醇核上胆汁酸的假设,BSH 能通过与类固醇核上的疏水作用识别底物^[40]。通过结合位点相似性评分系统、晶体结构、动力学数据、分子对接和比较结构分析,在 BSHs 中发现了一些可能参与底物结合的关键氨基酸残基和二级结构元素,BSH 活性的重要残基存在于环区 1(20~26)、环区 2(59~68)和环区 3(131~142)中,而在环区 4(263~275)中没有发现关键残基^[23],Philem 等研究发现植物乳杆菌 B14 胆盐水解酶第三环中的 F129 和 L138 是影响其催化活性和底物特异性的关键因素^[41]。环区 3 中的残基 Leu133 可能通过浓缩底物结合口袋的入口,从而限制了空间构型^[36]。LsBSH 中的 Gln257 在丙氨酸突变时提供了不同的底物特异性,Tyr24 和 Phe65 的突变也证实了这些残基对底物特异性的贡献^[36],这种残基与口袋中的几个残基形成一个氢键网络,进而改变结合口袋的形状和亲水性,不同程度地影响甘氨酸和牛磺酸共轭底物的结合。虽然 Gln257 在 LsBSH 和 EfBSH 中保守,但在 CpBSH 和 BIBSH 中这一位置的残基却是蛋氨酸,进一步表明了该残基在底物特异性中的潜在重要性。也表明通过对活性位点和底物结合口袋进行微

小的修饰,胆盐水解酶就能获得更广泛的底物特异性^[41]。目前,关于 BSH 底物特异性决定因素的研究仍在初级阶段,未来对与特定底物反应的 BSH 的结构进行深入的分析将有助于发现底物偏好决定残基,了解底物特异性的结构基础,这对于 BSH 在益生菌或抑制剂等相关产品开发中具有重要作用。

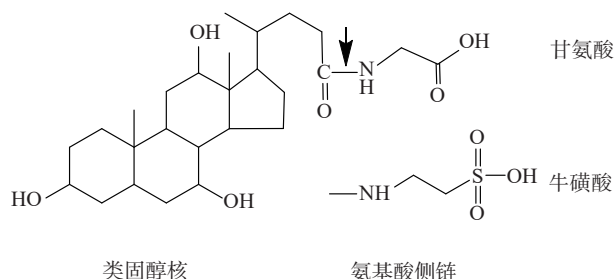


图4 胆酸的化学结构

Fig.4 Chemical structure of bile acids

4 胆盐水解酶基因

BSH 存在于与胃肠道环境相关的所有双歧杆菌菌株和乳酸杆菌菌株中,*bsh* 基因在所有测试得双歧杆菌中高度保守,其 G+C 含量反射出了整个基因组的 G+C 含量,*bsh* 基因可能是双歧杆菌基因组中的旁系同源基因,其它肠道微生物可能从这些菌株中获得 *bsh* 基因^[42]。根据 Sarah 的研究,*bsh* 基因在植物乳杆菌 WCFS1、嗜酸乳杆菌 NCFM、加色乳杆菌 ATCC 33323 和加色乳杆菌 V-V03 中均以单顺反子形式表达^[43]。嗜酸乳杆菌 PF01 中 BSH 基因的核苷酸序列分析结果显示它是一个包含 951 个核苷酸的开放阅读框,编码 316 个氨基酸。BSH 启动子位于起始密码子的上游,表达的蛋白表现出与其他宿主较高的同源性^[44]。基因组学研究发现不同乳酸菌中含有 1~4 个编码 BSH 的基因,分散在基因组不同位置上,且氨基酸相似度较低,仅为 21%~37%^[45]。在某些菌株中,BSH 基因的数量可以改变,其性质也可以改变。同时,对携带多个 BSH 基因的菌株进行分析,基因来源不同,其性质有所不同。嗜酸乳杆菌 NCFM 基因组序列中存在两个编码 BSH 的基因(BSHA 和 BSHB),两种酶的底物特异性不同,BSHA 和 BSHB 活性分别受到胆盐类固醇核和氨基酸侧链诱导^[46]。唾液乳杆菌 LMG14476 的两种 BSH 酶(BSH1 和 BSH2)在催化效率和底物选择性方面被发现具有显著不同的性质^[27]。植物乳杆菌 WCFS1 携带四个 BSH 基因(*bsh1*、*bsh2*、*bsh3*、*bsh4*),研究者通过异源过表达以及构建植物乳杆菌 WCFS1 单敲除、双敲除、三敲除和四重 *bsh* 敲除突变体,以评估单个 BSH 基因对不同底物的水解贡献。结果证实仅 *bsh1* 与植物乳杆菌 WCFS1 BSH 活性有关,*bsh2*、*bsh3* 和 *bsh4* 在植物乳杆菌菌株中高度保守,这些基因在植物乳杆菌的生理和生活方式中发挥的具体作用需要进一步研究^[47]。

5 胆盐水解酶应用

5.1 胆盐水解酶在畜禽业的应用

BSH 具有调节动物生长和代谢的能力,调节 BSH 活性可显著影响宿主的脂质代谢、体重增加等^[1],严敏等研究发现,在樱桃谷肉鸭饮水中添加具有特定 BSH 活性乳酸菌能改善樱桃谷肉鸭 42 日龄胸肌肌肉品质^[48]。抗生素生长促进剂(AGP)主要添加在动物饲料中以提高畜禽的生产性能,然而,抗生素的使用所造成的抗生素耐药菌株的出现威胁食品安全和公共健康,限制抗生素的使用已成全球趋势,寻找安全有效的替代品保证食用动物的生产力是当前研究者广泛关注的热点^[49]。常用的抗生素生长促进剂对 BSH 活性都具有抑制作用^[50],研究发现,BSH 抑制剂对肉鸡的日增重有明显促进作用^[51]。氯化铜和硫酸锌等金属离子可以有效地抑制 BSH 活性^[52],但金属离子及抗生素等的安全隐患不适应畜禽工业的发展。BSH 在非抗生素类生长添加剂的研发中具有重要作用,Dibamehr 等研究发现绿茶和甜菜根提取物对 BSH 具有相对抑制作用,可作为潜在的 AGP 替代物^[21]。益生菌、有机酸、酶和植物提取物等是目前在动物生长过程中常使用的生长促进剂^[53],其促生长的作用与肠道微生物密切相关,通过 BSH 开发和评价这些替代品的促生长效果是未来的重要的研究方向。

5.2 胆盐水解酶在食品工业的应用

结合胆汁酸对细菌有毒性,由 BSH 水解引起的胆汁酸谱的改变可能会改变与代谢疾病相关的胃肠道微生物群,如糖尿病和高胆固醇血症以及人类炎症性肠病^[38]。益生菌是重要的功能性食品原料,BSH 活性与益生菌降低胆固醇能力相关,BSH 可以提高益生菌在肠道中的定殖能力并赋予其胆盐抗性使其在肠道中最大程度发挥作用,能产生胆盐水解酶的益生菌能干预胆汁酸肝肠循环,连接宿主肠道和肝脏提供了治疗相关疾病可能性^[54]。因此,BSH 是将食品补充剂的调节与肠道微生物群联系起来的关键中介,通过膳食补充剂-肠道微生物群通路来合理化人类健康的饮食管理^[55]。目前,具有 BSH 活性的益生菌已应用在保健品开发,蛋乳发酵饮料的研制方面,相对于可能会带来多种副作用的药物治疗,若能高效利用益生菌降低胆固醇的作用,对于解决高胆固醇及肝胆相关疾病具有重要意义^[56]。

5.3 胆盐水解酶在医药方面应用

胆汁酸类成分通常作为医药被应用于临床,如鹅去氧胆酸和熊去氧胆酸均可作为临床常用药物,用于治疗胆囊结石或胆管结石等胆道系统结石性疾病,市场需求量较大。BSH 将胆盐脱结合以后会生产游离胆盐和氨基酸,如图 3 所示,根据 BSH 的这种水解作用替代传统的强碱皂化方法将动物胆汁中结合型胆汁酸制备为游离型胆汁酸,提高胆汁酸在制药工

业中的利用,满足市场需求^[57-58]。此外,Jia 等^[59]通过宏基因组分析,将肠道菌群 BSH 重新分为不同簇,发现不同簇 BSH 与人类疾病之间存在一定相关性,推测 BSH 在未来疾病无创诊断和潜在治疗中可作为重要标志物从而发挥作用。Khodakivsky 等^[60]设计了一种荧光素探针,可以实现在体内体外不同情景及多不同生物学样本 BSH 活性测定,可用于活体动物的实时无创成像,评估小鼠和人胃肠道中的 BSH 活性,在临床诊断方面具有应用前景。

6 结语与展望

目前关于 BSH 的分布、结构、酶学性质及底物特异性已经有了比较成熟的研究,关于 BSH 认识越来越全面,BSH 活性与肠道菌群及许多肝胆疾病息息相关,BSH 是治疗代谢性疾病的潜在靶点,是评价新的抗生素生长促进剂替代品和筛选特定功能益生菌的有效指标,同时,BSH 在一定程度上可以作为评价益生菌功效的指标,但是 BSH 在胃肠道菌群中的确切作用及具体机制尚不明确,益生菌中不同 BSH 基因、蛋白结构和基因调控还有待深入探究。彻底阐明 BSH 结构和功能对于其应用于未来的疾病预防和工业应用等至关重要。未来,需要更多关于 BSH 功能、微生物组和代谢组的研究,更加明确 BSH 的天然功能,更深入地了解 BSH 底物偏好的结构基础,合理开发低成本、安全可持续的 BSH 抑制剂,设计合理定制的膳食补充剂,增强动物生长性能;更好地实现以胆盐水解酶为指标快速高效有针对性的筛选益生菌株;进一步揭示 BSH 降胆固醇机理,通过调节宿主代谢来控制胆固醇,缓解炎症性肠病等症状。

参考文献

- [1] JOYCE S A, MACSHARRY J, CASEY P G, 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: 7421-7426.
- [2] DONG Z, LEE B H. Bile salt hydrolases: Structure and function, substrate preference, and inhibitor development[J]. *Protein Science*, 2018, 27(10): 1742-1754.
- [3] KIM G B, LEE B H. Biochemical and molecular insights into bile salt hydrolase in the gastrointestinal microflora-a review[J]. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 2005, 18(10): 1505-1512.
- [4] KORPELA K, SALONEN A, VIRTALA L J, et al. Intestinal microbiome is related to lifetime antibiotic use in Finnish pre-school children[J]. *Nature Communications*, 2016(7): 10410.
- [5] SHIN D J, WANG L. Bile acid-activated receptors: A review on fxr and other nuclear receptors[J]. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 2019, 256: 51-72.
- [6] JONES B, 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.

- [7] REYESNAVA L A, RIVERAESPIÑOZA Y. Isolation sources of bile salt hydrolase microorganisms[J]. Herald Journal of Agriculture and Food Science Research, 2014(3): 49–54.
- [8] HERNÁNDEZ-GÓMEZ J G, LÓPEZ-BONILLA A, TREJO-TAPIA G, et al. *In vitro* bile salt hydrolase (BSH) activity screening of different probiotic microorganisms[J]. Foods, 2021, 10(3): 674.
- [9] TANAKA H, DOESBURG T, IWASAKI T, et al. Screening of lactic acid bacteria for bile salt hydrolase activity[J]. Journal of Dairy Science, 1999, 82: 2530–2535.
- [10] 玛丽娜·库尔曼, 包怡红. 传统酵素源高效降胆固醇菌株的筛选、鉴定及胆盐水解酶活性分析[J]. 中国食品学报, 2021, 21(1): 266–275. [MALINA K E M, BAO Y H. Screening, identification and analysis of efficient cholesterol-lowering strains of traditional enzyme sources and bile salt hydrolase activity[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(1): 266–275.]
- [11] LEE N K, SON S H, JEON E B, et al. The prophylactic effect of probiotic *Bacillus polyfermenticus* KU3 against cancer cells[J]. Journal of Functional Foods, 2015(14): 513–518.
- [12] DÉJEAN G, TUDELA H, BRUNO L, et al. Identifying a novel bile salt hydrolase from the keystone gut bacterium *Christensenella minuta*[J]. Microorganisms, 2021, 9(6): 1252.
- [13] OLIVEIRA T, RAMALHOSA E, NUNES L, et al. Probiotic potential of indigenous yeasts isolated during the fermentation of table olives from northeast of Portugal[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2017, 44: 167–172.
- [14] GARCÍA-RUIZ A, LLANO D, ESTEBAN-FERNÁNDEZ A, et al. Assessment of probiotic properties in lactic acid bacteria isolated from wine[J]. Food Microbiology, 2014, 44: 220–225.
- [15] BUSTOS A Y, SAAVEDRA L, GRACIELA F V, et al. Relationship between bile salt hydrolase activity, changes in the internal pH and tolerance to bile acids in lactic acid bacteria[J]. Biotechnology letters, 2012, 34(8): 1511–1518.
- [16] 夏永军, 王光强, 王巧惠, 等. HPLC 分析植物乳杆菌胆盐水解酶降解特性[J]. 工业微生物, 2015, 45(6): 16–20. [XIA Y J, WANG G Q, WANG Q H, et al. Characterization of bile salt hydrolase degradation in *Lactobacillus plantarum* by HPLC[J]. Industrial Microorganisms, 2015, 45(6): 16–20.]
- [17] HA C G, CHO J K, CHAI Y G, et al. Purification and characterization of bile salt hydrolase from *Lactobacillus plantarum* CK 102[J]. Journal of Microbiology & Biotechnology, 2006, 16(7): 1047–1052.
- [18] RUIZ L, SÁNCHEZ B, MARGOLLES A. Determination of bile salt hydrolase activity in bifidobacteria[J]. Methods in molecular biology (Clifton, N J), 2021, 2278: 149–155.
- [19] MOSER S A, SAVAGE D C. Bile salt hydrolase activity and resistance to toxicity of conjugated bile salts are unrelated properties in lactobacilli[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(8): 3476–3480.
- [20] ROHAWI N S, RAMASAMY K, AGATONOVIC K S, et al. A new high-performance thin-layer chromatographic method for determining bile salt hydrolase activity[J]. Journal of Chromatography, 2018, 1092: 145–151.
- [21] DIBAMEHR A, DANESHYAR M, TUKMECHI A, et al. The effects of different plant extracts on bile salt hydrolase activity of *Lactobacillus* strains isolated from the gastrointestinal tract of poultry[J]. Veterinarski Arhiv, 2021, 91(1): 89–99.
- [22] 陈仪婷, 张红星, 谢远红, 等. 降胆固醇乳酸菌的筛选鉴定及其耐酸耐胆盐性能研究[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(5): 29–33. [CHEN Y T, ZHANG H X, XIE Y H, et al. Selection of cholesterol-lowering lactic acid bacteria *in vitro* and study on its tolerance of acid and bile salts[J]. Food and Fermentation Industries, 2018, 44(5): 29–33.]
- [23] KUMAR R S, BRANNIGAN J A, PRABHUNE, A A, et al. Structural and functional analysis of a conjugated bile salt hydrolase from *Bifidobacterium longum* reveals an evolutionary relationship with penicillin V acylase[J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281: 32516–32525.
- [24] ROSSOCHA M, SCHULTZ-HEIENBROK R, VON MOELER H, et al. Conjugated bile acid hydrolase is a tetrameric N-terminal thiol hydrolase with specific recognition of its cholyl but not of its tauryl product[J]. Biochemistry, 2005, 44: 5739–5748.
- [25] CHAND D, PANIGRAHI P, VARSHNEY N, et al. Structure and function of a highly active Bile Salt Hydrolase (BSH) from *Enterococcus faecalis* and post-translational processing of BSH enzymes[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins & Proteomics, 2018, 1866: 507–518.
- [26] XU F, HU X J, SINGH W, et al. The complex structure of bile salt hydrolase from *Lactobacillus salivarius* reveals the structural basis of substrate specificity[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 1–11.
- [27] AVINASH V S, PANIGRAHI P, CHAND D, et al. Structural analysis of a penicillin V acylase from *Pectobacterium atrosepticum* confirms the importance of two Trp residues for activity and specificity[J]. Journal of Structural Biology, 2016, 193(2): 85–94.
- [28] STELLWAG E J, HYLEMON P B. Purification and characterization of bile salt hydrolase from *Bacteroides fragilis* subsp[J]. Biochimica Et Biophysica Acta, 1976, 452(1): 165–176.
- [29] 雷霜江, 吕青遥, 王文杰, 等. 屎肠球菌 R40 产胆盐水解酶发酵动力学及底物特异性分析[J]. 中国酿造, 2021, 40(11): 144–148. [LEI S J, LV Q Y, WANG W J, et al. Fermentation kinetic and substrate specificity of bile saline hydrolase produced by *Enterococcus faecium* R40[J]. China Brewing, 2021, 40(11): 144–148.]
- [30] 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]. Journal of Applied Microbiology, 2013, 114(1): 121–133.
- [31] 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.
- [32] OZTURK M, ONAL C. Asparagine 79 is an important amino acid for catalytic activity and substrate specificity of bile salt hydrolase (BSH)[J]. Molecular Biology Reports, 2019, 46(4): 4361–4368.
- [33] 周晓玲, 张娟, 陈坚, 等. 双歧杆菌胆盐水解酶基因的重组表达、纯化与酶学性质[J]. 食品与生物技术学报, 2016, 35(8): 9. [ZHOU X L, ZHANG J, CHEN J, et al. Expression, purification and enzymatic properties study of the bile salt hydrolase from bifidobacterium in *Escherichia coli*[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2016, 35(8): 9.]

- [34] 周晓玲. 双歧杆菌胆盐水解酶基因的重组表达、纯化与酶学性质研究[D]. 江南大学, 2015. [ZHOU X L. Expression, purification and enzymatic analysis of bile salt hydrolase from *Bifidobacterium* in *Escherichia coli*[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2015.]
- [35] XU F ZH, GUO F F, HU X J, et al. Crystal structure of bile salt hydrolase from *Lactobacillus salivarius*[J]. *Acta Crystallographica Section F*, 2016, 72: 376–381.
- [36] ÖZTÜRK M, HACIBEYOĞLU, K, ÖNAL C, et al. Construction of R16F and D19L mutations in the loop I of bile salt hydrolase (BSH) enzyme from *Lactobacillus plantarum* B14 and structural and functional analysis of the mutant BSHs[J]. *Food Biotechnology*, 2019, 33(2): 125–141.
- [37] CHAND D, AVINASH V S, YADAV Y, et al. Molecular features of bile salt hydrolases and relevance in human health[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2017, 1861(1): 2981–2991.
- [38] KIM G B, YI S H, LEE B H. Purification and characterization of three different types of bile salt hydrolases from *Bifidobacterium* strains[J]. *Journal of Dairy Science*, 2004, 87(2): 258–266.
- [39] 王建琴. 麦芽糊精促进 *Lactobacillus plantarum* Lp-115 胆盐耐受性及相关酶学性质的研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2018. [WANG J J. Maltodextrin improves bile salt tolerance of *Lactobacillus plantarum* Lp-115 and related enzymatic studies[D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2018.]
- [40] ÖZTÜRK M, ÖNAL C, BA N M. Critical F129 and L138 in loop III of bile salt hydrolase (BSH) in *Lactobacillus plantarum* B14 are essential for the catalytic activity and substrate specificity[J]. *Food Biotechnology*, 2019, 33(4): 325–337.
- [41] PHILEM P D, YADAV Y, SUNDER A V, et al. Structural and enzymatic analysis of a dimeric cholyglycine hydrolase like acylase active on N-acyl homoserine lactones[J]. *Biochimie*, 2020, 177: 108–116.
- [42] BEGLEY M, HILL C, GAHAN C. Bile salt hydrolase activity in probiotics[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(3): 1729–1738.
- [43] SARAH O, ALEXANDRA B C, THERIOT C M, et al. The *Lactobacillus* bile salt hydrolase repertoire reveals niche-specific adaptation[J]. *MSphere*, 2018, 3(3): e00140–18.
- [44] 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: 449–456.
- [45] 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): 47–50, 53. [REN J, WU ZH J, WANG Y Y. Research progress on mechanism of bile salt hydrolase in probiotics[J]. *China Dairy Industry*, 2010, 38(2): 47–50, 53.]
- [46] MCAULIFFE O, CANO R J, KLAENHAMMER T R. Genetic analysis of two bile salt hydrolase activities in *Lactobacillus acidophilus* NCFM[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2005, 71(8): 4925–4929.
- [47] LAMBERT J M, BONGERS R S, DEVOS W M, et al. Functional analysis of four bile salt hydrolase and penicillin acylase family members in *Lactobacillus plantarum* WCFS1[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2008, 74(15): 4719–4726.
- [48] 严敏, 林勇, 张文, 等. 不同植物乳杆菌对樱桃谷肉鸭生长性能、血浆生化指标、屠宰性能与肌肉品质的影响[J]. *中国家禽*, 2021, 43(5): 49–54. [YAN M, LIN Y, ZHANG W, et al. Effects of different *Lactobacillus plantarum* on growth performance, plasma biochemical indexes, slaughter performance and meat quality of cherry valley ducks[J]. *China Poultry*, 2021, 43(5): 49–54.]
- [49] MARON D, SMITH T J, NACHMAN K E. Restrictions on antimicrobial use in food animal production: An international regulatory and economic survey[J]. *Globalization and Health*, 2013, 9(1): 48.
- [50] 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.
- [51] GENG W, LONG S L, CHANG Y J, et al. Evaluation of bile salt hydrolase inhibitor efficacy for modulating host bile profile and physiology using a chicken model system[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 4941.
- [52] WANG Z, ZENG X, MO Y, 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.
- [53] HUYGHEBAERT G, DUCATELLE R, IMMERSEEL F V. An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers[J]. *The Veterinary Journal*, 2011, 187(2): 182–188.
- [54] 唐洪玉, 宋馨, 夏永军, 等. 益生菌中胆盐水解酶作用机制研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(13): 286–292. [TANG H Y, SONG X, XIA Y J, et al. Research progress on the mechanism of bile salt hydrolase in probiotics[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(13): 286–292.]
- [55] YANG Y A, WU C M. Targeting gut microbial bile salt hydrolase (BSH) by diet supplements: new insights into dietary modulation of human health[J]. *Food & Function*, 2022. doi: 10.1039/D2FO01252A.
- [56] 牟志勇, 杨映津, 王光强, 等. 酵母菌的益生功能及在食品中的应用[J]. *食品科学*, 2021, 42(15): 309–318. [MOU Z Y, YANG Y J, WAGN G Q, et al. Beneficial effects of yeasts and applications in foods[J]. *Food Science*, 2021, 42(15): 309–318.]
- [57] 刘雁红, 胡祥正. 鸭胆膏中鹅去氧胆酸的提取工艺[J]. *天津科技大学学报*, 2009, 24(3): 43–45. [LIU Y H, HU X Z. Extraction technique of chenodeoxycholic acid from duck bile paste[J]. *Journal of Tianjin University of Science & Technology*, 2009, 24(3): 43–45.]
- [58] NOVOZYMES A. Method for producing bile acids: WO 2017/089408 A1 [P]. 2017-01-06.
- [59] JIA B L, PARK D, HAHN Y, et al. Metagenomic analysis of the human microbiome reveals the association between the abundance of gut bile salt hydrolases and host health[J]. *Gut Microbes*, 2020(5): 1300–1313.
- [60] KHODAKIVSKYI P V, LAUBER C L, YEVTODIYENKO A, et al. Noninvasive imaging and quantification of bile salt hydrolase activity: From bacteria to humans[J]. *Science Advances*, 2021, 7(6): eaaz9857.