

# 4 种胆盐水解酶在发酵乳杆菌 AR497 中的异源表达

## Heterologous expression of four bile salt hydrolases in *Lactobacillus fermentum* AR497

印伯星<sup>1,2,3</sup> 石俊康<sup>4,5</sup> 孔令慧<sup>4,5</sup>

YIN Bo-xing<sup>1,2,3</sup> SHI Jun-kang<sup>4,5</sup> KONG Ling-hui<sup>4,5</sup>

杨仁琴<sup>1,2,3</sup> 艾连中<sup>4,5</sup> 熊智强<sup>4,5</sup>

YANG Ren-qing<sup>1,2,3</sup> AI Lian-zhong<sup>4,5</sup> XIONG Zhi-qiang<sup>4,5</sup>

(1. 扬州大学实验农牧场, 江苏 扬州 225009; 2. 江苏省乳业生物工程技术研究中心, 江苏 扬州 225004; 3. 扬州市扬大康源乳业有限公司, 江苏 扬州 225004;

4. 上海理工大学医疗器械与食品学院, 上海 200093; 5. 上海食品微生物工程研究中心, 上海 200093)

(1. *Experimental Farm, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China*; 2. *Jiangsu Dairy Bioengineering Technology Research Center, Yangzhou, Jiangsu 225004, China*;

3. *Yangda Kangyuan Dairy Co., Ltd., Yangzhou, Jiangsu 225004, China*; 4. *School of Medical Instrument and Food Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China*;

5. *Shanghai Research Center of Food Microbiology, Shanghai 200093, China*)

**摘要:**为提高发酵乳杆菌耐胆盐能力,将植物乳杆菌 AR113 来源的 4 种 BSH 基因(BSH1、BSH2、BSH3 和 BSH4)转化至发酵乳杆菌 AR497 中进行表达。结果表明,植物乳杆菌来源的 4 种 BSH 同功酶异源表达可提高发酵乳杆菌的耐胆盐能力。在 2.0 mg/mL 甘氨酸氧胆酸钠浓度下,表达 BSH2 的工程菌致死率最低,其他菌株生长被完全抑制;BSH 酶活测定表明,BSH2 表达菌株酶活最高,达 57.74 U/mL,比对照空质粒菌株提高了 2.88 倍。

**关键词:**发酵乳杆菌;胆盐水解酶;异源表达;酶活

**Abstract:** In order to improve bile salt tolerance in *L. fermentum*, four BSH genes (BSH1, BSH2, BSH3, and BSH4) from *L. plantarum* AR113 were transformed into *L. fermentum* AR497. The result showed that heterologous expression of these four BSHs can improve the bile salt tolerance of *L. fermentum*. At the concentration of 2.0 mg/mL sodium glycodeoxycholate, engineered *L. fermentum* with BSH2 expression had

the lowest lethality, while other strains were completely inhibited. BSH activity showed that BSH2 expressing strain had the highest enzyme activity with 57.74 U/mL, which was 2.88 times higher than that of the control strain harboring empty plasmid.

**Keywords:** *Lactobacillus fermentum*; bile salt hydrolase; heterologous expression; enzyme activity

高胆固醇被认为是引起冠心病、高血压及脑中风的重要因素<sup>[1]</sup>。胆盐水解酶(bile salt hydrolase, BSH)是一种重要的降解胆固醇酶,能够结合胆盐释放游离氨基酸和非结合态胆酸,由于游离胆酸的重吸收利用率低,从而达到降低体内胆固醇的效果<sup>[2-3]</sup>。目前,从双歧杆菌、乳杆菌和球菌等乳酸菌属中发现的 BSH 基因具有降胆固醇和耐受胆盐功能<sup>[4]</sup>。Smet 等<sup>[5-6]</sup>研究表明发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)能降低血清胆固醇的重要原因能够产生 BSH。基于基因组学研究<sup>[7-8]</sup>发现不同乳酸菌中含有 1~4 个编码胆盐水解酶的 BSH 基因,分散在基因组不同位置上,其氨基酸相似度较低,仅为 21%~39%。Lambert 等<sup>[9]</sup>通过分别敲除植物乳杆菌 WCFS1 中的 4 个 BSH 同源基因,发现仅 BSH1 基因和植物乳杆菌的 BSH 活性密切相关,而其他 3 种 BSH 在植物乳杆

**基金项目:**国家自然科学基金(编号:31871776,31771956);上海市自然科学基金(编号:18ZR1426800)

**作者简介:**印伯星,男,扬州大学高级工程师,博士。

**通信作者:**熊智强(1981—),男,上海理工大学副研究员,博士生导师,博士。E-mail: xiongzq@hotmail.com

**收稿日期:**2019-11-19

菌不同菌株之间十分保守;Xiong 等<sup>[10]</sup>从耐胆盐能力强的植物乳杆菌 AR113 中克隆 4 个 *BSH* 基因,在干酪乳杆菌中异源表达,证明 4 种 *BSH* 均有水解结合甘氨酸胆盐的能力。

发酵乳杆菌作为一种异型发酵乳酸菌,在食品工业中广泛应用。作为益生菌,发酵乳杆菌能减少由致病细菌引起的胃肠道疾病发病率、调节免疫系统和降低患膀胱癌的风险<sup>[11-12]</sup>。由于胃肠道在运输过程中面临胆汁酸压力,因此迫切需要提升发酵乳杆菌的耐受性。尽管发酵乳杆菌中含有一个 *BSH* 基因,但发酵乳杆菌对胆盐的胁迫仍比较敏感。课题组前期<sup>[13]</sup>分离出一株具有优良生

物学特性的发酵乳杆菌 AR497,能有效改善小鼠肠炎。为提高该菌株耐胆汁和降胆固醇的益生功能,试验拟以 AR497 为宿主,表达来自植物乳杆菌 AR113 的 4 种 *BSH* 基因,从胆盐胁迫下菌株的生长状况、致死率和 *BSH* 酶活角度分析 *BSH* 基因异源表达的作用,为开发耐胆盐和降解胆固醇的乳酸菌基因工程菌提供依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株和质粒

所用菌株与质粒如表 1 所示。

表 1 菌株与质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids

类别	菌株特性或质粒特征	来源/参考
菌株	Top10	大肠杆菌( <i>Escherichia coli</i> )
	AR497	发酵乳杆菌( <i>Lactobacillus fermentum</i> )
	pMG36e	乳酸菌表达质粒,红霉素抗性( $Em^R$ )
	pMG-BSH1	pMG36e 插入 <i>BSH1</i> 基因, $Em^R$
质粒	pMG-BSH2	pMG36e 插入 <i>BSH2</i> 基因, $Em^R$
	pMG-BSH3	pMG36e 插入 <i>BSH3</i> 基因, $Em^R$
	pMG-BSH4	pMG36e 插入 <i>BSH4</i> 基因, $Em^R$
	pMG-BSH1-3	pMG-BSH1 插入 <i>BSH3</i> 基因, $Em^R$

#### 1.1.2 试剂

质粒提取试剂盒:美国 Axygen 公司;

MRS 培养基(牛肉膏 5 g/L、酪蛋白胨 10 g/L、酵母膏 5 g/L、葡萄糖 20 g/L、乙酸钠 8.3 g/L、柠檬酸氢二胺 2 g/L、 $K_2 HPO_4$  2 g/L、 $MgSO_4$  0.58 g/L、 $MnSO_4$  0.25 g/L、吐温 80 1 mL/L、固体培养基另加琼脂粉 15 g/L);分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

MRSMC 复苏培养基(0.8 mol/L 山梨醇、20 mmol/L  $MgCl_2$ 、2 mmol/L  $CaCl_2$ 、MRS 培养基);分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

#### 1.1.3 仪器与设备

分光光度计:DM-800 型,德国 Beckman 公司;

电转化杯:2.0 mm 型,美国 BTX 公司;

微量核算蛋白测定仪:Nanodrop 2000 型,赛默飞世尔科技公司;

厌氧培养箱:DG250 型,英国 Ruskinn 公司;

电泳仪:Powerpacbasic 型,美国 Bio-Rad 公司;

电泳槽:170-4486 型,美国 Bio-Rad 公司;

凝胶成像仪:GelDocXR 型,美国 Bio-Rad 公司;

PCR 仪:S1000 型,美国 Bio-Rad 公司;

冷冻离心机:3K30 型,德国 Sigma 公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 发酵乳杆菌 AR497 感受态制备和重组质粒转化

将-80℃冰箱保存的 AR497 菌株进行活化培养,然后接种至含 20 g/L 甘氨酸的 MRS 培养基中培养至  $OD_{600\text{nm}}$  为 0.3~0.4。收集菌体用 10%甘油(体积分数)洗涤两次并重悬分装,-80℃冰藏,电转化备用。从大肠杆菌中提取 pMG36e(空质粒,对照)和含有不同 *BSH* 基因的重组质粒 pMG-BSH1、pMG-BSH2、pMG-BSH3、pMG-BSH4 和 pMG-BSH1-3,将这些质粒分别与感受态细胞混匀,电击后加入 MRSMC 复苏培养基,37℃下培养 4 h,收集菌体涂布于红霉素抗性平板,37℃厌氧培养 48 h。挑取转化子进行菌落 PCR 鉴定,采用 Em-F(5'-CGAAAAACAAGTTAAGGGATGCA-3')/Em-R(5'-TCAGCACAGTTCATTATCAACCAAA-3')引物,扩增条件为 95℃预变性 3 min,98℃变性 10 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 45 s,30 个循环;72℃ 10 min。PCR 产物通过琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.2 平板  $Ca^{2+}$  沉淀法检测 配制含有 0.37 g/L  $CaCl_2$  的 MRS 固体培养基平板,加入终浓度 5 mmol/L 胆盐和 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  红霉素。取  $OD_{600\text{nm}} \approx 1.0$  的重组菌株菌液 10  $\mu\text{L}$  点涂于上述固体培养基平板上,每株菌 3 个平行。37℃厌氧培养 48 h,观察培养基底部或菌落周围是否有白色沉淀圈产生。

1.2.3 重组菌株在胆盐胁迫下的生长 将重组菌株培养至  $OD_{600\text{nm}} \approx 1.0$ ,3%接种量接种至含有 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  红霉

素和 0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/mL 甘氨酸脱氧胆酸钠盐的 MRS 培养基中, 检测 20 h 内菌株生长状况<sup>[14]</sup>。

1.2.4 重组菌株耐胆盐能力的测定 将重组菌株接种至含有 100 μg/mL 红霉素和 0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/mL 甘氨酸脱氧胆酸钠盐的 MRS 培养基中, 培养 12 h 进行活菌计数。按式(1)计算致死率。

$$c = \frac{m_2 - m_1}{m_2} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

$c$ ——致死率, %;

$m_1$ ——相应胆盐浓度下活菌数;

$m_2$ ——普通 MRS 培养下活菌数。

1.2.5 BSH 酶活的测定 通过水解结合胆盐释放的氨基酸来衡量, 即酶活力与氨基酸生成量成正比。采用茚三酮显色法测定氨基酸含量<sup>[15-16]</sup>。样品超声破碎 (200 W 破碎 20 min, 工作 5 s, 间隔 10 s) 后加入溶菌酶, 使细胞壁裂解完全, 参照文献<sup>[17]</sup>的方法测定上清液 BSH 活力。BSH 酶活定义为每毫升菌体裂解上清液水解胆盐生成 1 mmol 氨基酸为一个活力单位。

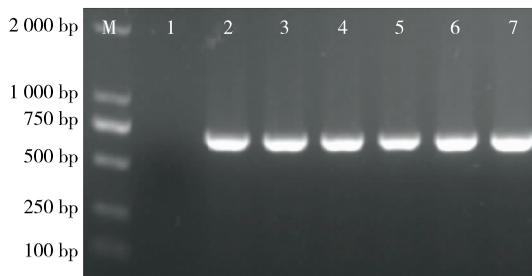
### 1.3 数据分析

采用 Origin 8.0 和 GraphPad 5.0 软件进行统计分析和作图。

## 2 结果与讨论

### 2.1 发酵乳杆菌 BSH 基因工程菌的鉴定

转化子菌落 PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分析 (图 1) 表明, 含有重组质粒的菌株都有 734 bp 的特异性条带, 且与预期大小一致, 而不含重组质粒的 AR497 没有条带, 说明重组质粒均已成功转化至 AR497 中。



M, 2 000 Marker 1. 阴性对照 2. AR497/pMG36e 3. AR497/pMG-BSH1 4. AR497/pMG-BSH2 5. AR497/pMG-BSH3 6. AR497/pMG-BSH4 7. AR497/pMG-BSH1-3

图 1 转化子菌落 PCR 电泳

Figure 1 Electrophoretogram of colony PCR

### 2.2 平板 Ca<sup>2+</sup> 沉淀法检测发酵乳杆菌 BSH 基因工程菌

由图 2 可知, 除表达 BSH2 的重组菌外, 其他工程菌均无法在添加 5 mmol/L 甘氨酸脱氧胆酸钠盐的 MRS 培养基上生长; 表达 BSH2 的重组菌周围产生不透明白色沉

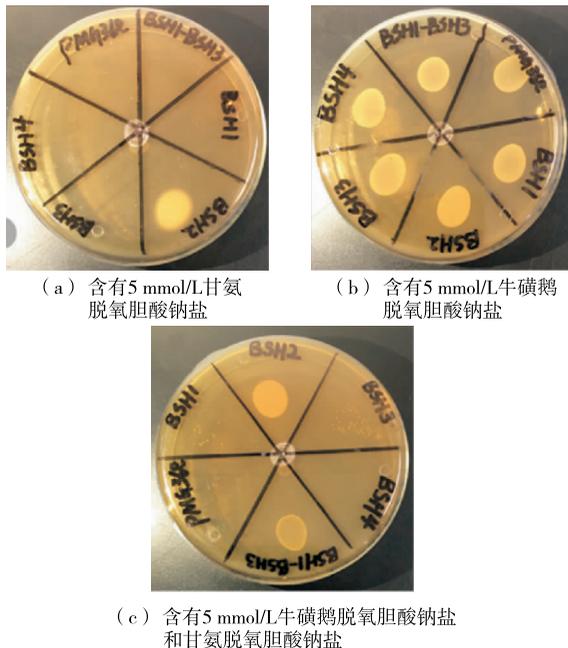


图 2 Ca<sup>2+</sup> 沉淀法检测重组菌的耐胆盐能力

Figure 2 Bile salt resistance of recombinant bacteria by calcium ion precipitation method

淀圈, 说明该重组菌株具有降解甘氨酸脱氧胆酸钠盐的能力<sup>[10]</sup>。空载体菌株与重组菌株都可以在含有 5 mmol/L 牛磺鹅脱氧胆酸钠盐的 MRS 固体培养基上生长, 说明 AR497 具有良好的牛磺鹅脱氧胆酸钠盐耐受能力。在含有 5 mmol/L 牛磺鹅脱氧胆酸钠盐和甘氨酸脱氧胆酸钠盐的 MRS 固体培养基上, 除空载体与 BSH4 表达菌株生长受到完全抑制外, 其他菌株在该平板上均有生长, 但表达 BSH2 或同时表达 BSH1 和 BSH3 菌株其耐受性明显优于表达 BSH1 或 BSH3 菌株。此外, 含牛磺鹅脱氧胆酸钠盐的平板无明显白色沉淀圈形成, 说明其 BSH 酶活偏低或不具有水解牛磺鹅脱氧胆酸钠盐的能力。

### 2.3 发酵乳杆菌 BSH 基因工程菌在胆盐胁迫下的生长

由图 3 可知, 在没有胆盐压力下, 与对照菌株 AR479/pMG36e 相比, 表达 BSH 基因重组菌株可显著提高发酵乳杆菌 AR497 的胆盐耐受性, BSH2 和 BSH4 基因的表达对菌株生长具有一定的抑制作用, BSH1 和 BSH3 基因的表达对菌株生长有促进作用。重组菌株在 0.5 mg/mL 胆盐的 MRS 培养基中培养时, 与不加胆盐相比, 重组菌株生长受到一定程度的抑制。重组菌株的生长随甘氨酸脱氧胆酸钠盐浓度的提高受到明显抑制, 但 BSH2 基因的表达对菌株表现出优良的耐胆盐特性; 当胆盐浓度提高到 1.5 mg/mL 时, 在液体 MRS 培养基中, 除表达 BSH2 重组菌株外, 其他重组菌株均无法生长。综上, 异源表达植物乳杆菌来源的 BSH 能够提高发酵乳杆菌的耐胆盐能力。

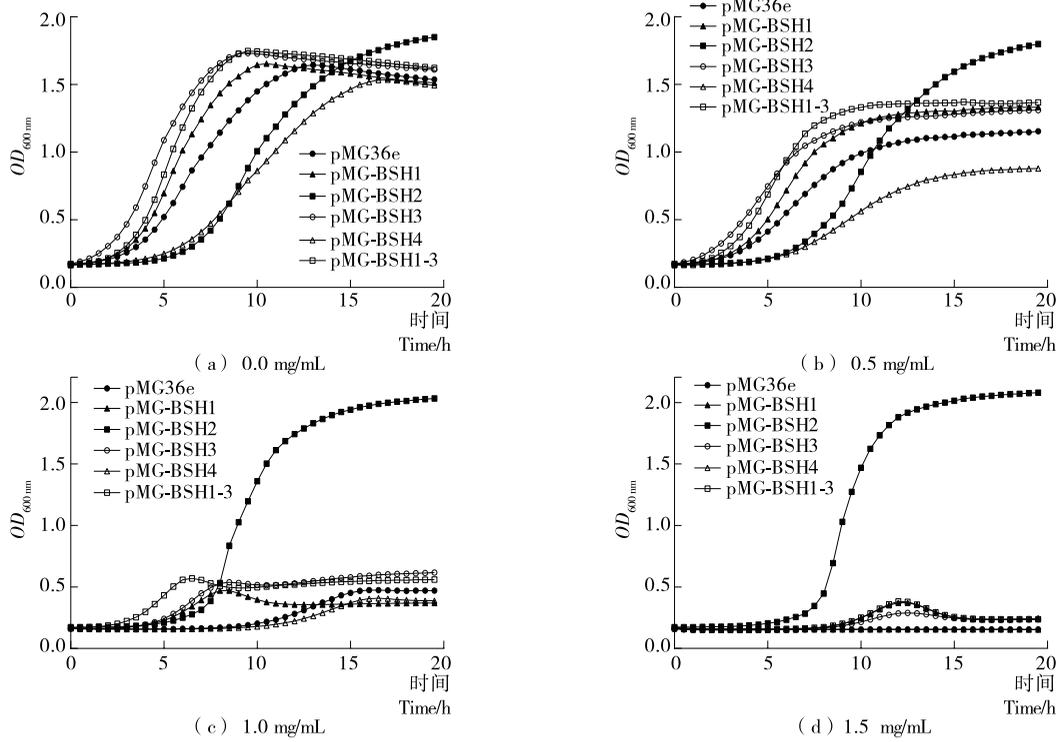


图3 重组菌株在不同甘氨酸胆酸钠盐浓度下的生长曲线

Figure 3 Growth curve of recombinant strains under different glycodeoxycholic acid sodium salt

2.4 发酵乳杆菌 BSH 基因工程菌的耐胆盐能力

由图4可知,随着甘氨酸胆酸钠盐浓度的增加,表达 BSH2 重组菌活菌总数并未减少,表明 BSH2 基因的表达可提高 AR497 的耐受胆盐能力;表达 BSH1、BSH3、BSH4 及同时表达 BSH1 和 BSH3 基因的重组菌株致死率逐渐升高,BSH 基因对发酵乳杆菌提高胆盐耐受效果依次为 BSH2 > BSH1 和 BSH3 > BSH1 > BSH3 > BSH4,其中过表达 BSH4 基因与对照相比,效果不显著(P>0.05)。

2.5 发酵乳杆菌 BSH 基因工程菌 BSH 酶活

由图5可知,表达 BSH2 基因重组菌株酶活最高,达

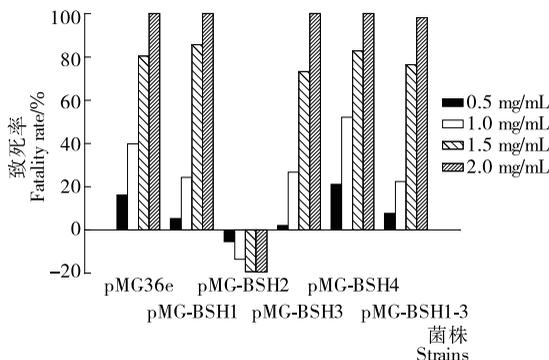
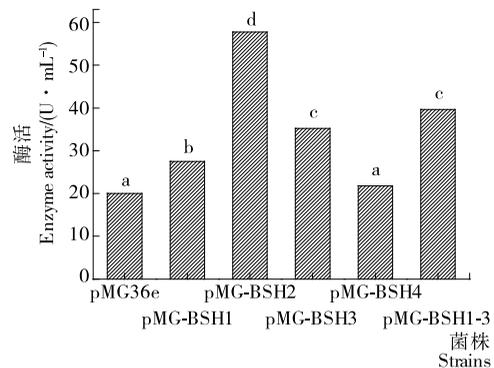


图4 重组菌株的胆盐致死率

Figure 4 Lethality of recombinant strains by bile salt

57.74 U/mL,为对照菌株酶活的 2.88 倍,推测 BSH2 基因可能在水解结合型甘氨酸类胆盐为非结合型胆盐过程中效果更强,与前述试验结果相符;而表达 BSH1 和 BSH3、BSH1、BSH3 及 BSH4 基因重组菌株的酶活依次降低。Ren 等<sup>[18-19]</sup>在大肠杆菌中表达植物乳杆菌 ST-III 的 4 种 BSH 基因,其酶活数据与试验结果类似。Lambert 等<sup>[9]</sup>在乳酸乳球菌中表达植物乳杆菌 WCSF1 的 4 种 BSH 基因,其中 BSH1 基因的活性最高,与试验结果不同,可能与宿主或酶活测定方法(如反应条件和胆



小写字母不同表示差异显著(P<0.05)

图5 不同重组菌株的 BSH 酶活

Figure 5 The activity of bile salt hydrolase of different recombinant bacteria

盐底物)不同有关<sup>[20]</sup>。

### 3 结论

将具有强耐胆盐能力的植物乳杆菌 AR113 中 4 种 BSH 同功酶基因通过基因工程技术,在发酵乳杆菌 AR497 中异源表达。通过测定不同 BSH 基因表达菌株的生长、胆盐耐受性和酶活,发现重组菌株均能在 0.5 mg/mL 甘氨酸脱氧胆酸钠盐的胁迫下生长,仅 AR497/pMG-BSH2 能够将结合态甘氨酸脱氧胆酸钠盐转化为游离态;BSH2 重组菌株的 BSH 酶活最高,达 57.74 U/mL,表明 BSH2 可能具有较其他 3 种 BSH 更高的水解甘氨酸脱氧胆酸钠盐的能力。后续可进一步研究 4 种 BSH 同功酶的动力学和蛋白结构特征,解析 BSH2 对甘氨酸脱氧胆酸钠盐的水解机制。

### 参考文献

- [1] 岳婷婷,侯红漫.胆盐水解酶的研究现状[J].中国乳品工业,2010,38(2):33-37.
- [2] 于长青,战媛媛,王长远.胆盐水解酶基因在毕赤酵母中的表达[J].中国生物制品学杂志,2010,23(9):949-952.
- [3] 刘慧,熊利霞,易欣欣,等.藏灵菇中高产胞外多糖乳酸菌的筛选及其发酵性能的研究[J].食品科学,2007,28(5):211-215.
- [4] 毕洁.胆盐水解酶提高乳酸菌胆盐耐受能力的酶学与生理学机制研究[D].无锡:江南大学,2016:15-21.
- [5] SMET I D, HOORDE L V, SAEYER N D, et al. In vitro study of bile salt hydrolase (BSH) activity of BSH isogenic *Lactobacillus plantarum* 80 strains and estimation of cholesterol lowering through enhanced BSH activity[J]. Microbial Ecology in Health and Disease, 1994, 7(6): 315-329.
- [6] ZENG Xiao-qun, PAN Dao-dong, ZHOU Pei-dong. Functional characteristics of *Lactobacillus fermentum* F1[J]. Current Microbiology, 2011, 62(1):27-31.
- [7] 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.
- [8] RUIZ L, MARGOLLE S A, SÁNCHEZ B. Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*[J]. Frontiers in Microbiology, 2013, 4: 396.
- [9] LAMBERT J M, BONGERS R S, VOS W M, et al. Functional analysis of four bile salt hydrolase and penicillin acylase family members in *Lactobacillus plantarum* WCFS1[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(15): 4719-4726.
- [10] Xiong Zhi-qiang, Wang Qiao-hui, Kong Ling-hui, et al. Short communication: Improving the activity of bile salt hydrolases in *Lactobacillus casei* based on in silico molecular docking and heterologous expression[J]. Journal of Dairy Science, 2017, 100(2): 975-980.
- [11] MIKELSAAR M, ZILMER M. *Lactobacillus fermentum* ME-3: An antimicrobial and antioxidative probiotic[J]. Microbial Ecology in Health and Disease, 2009, 21(1): 1-27.
- [12] JIMENEZ E, MARTIN R, MALDONADO A, et al. Complete genome sequence of *Lactobacillus salivarius* CECT 5713, a probiotic strain isolated from human milk and infant feces[J]. Journal of Bacteriology, 2010, 192(19): 5266-5267.
- [13] 陈燕,林祥娜,王光强,等.发酵乳杆菌 AR497 改善 DSS 诱导的小鼠炎症性肠病[J].工业微生物,2019,49(2):41-46.
- [14] 陈大卫,顾瑞霞,鲁茂林,等.人源乳酸菌耐胆盐能力及降胆固醇作用研究[J].食品与机械,2017,33(10):1-5.
- [15] 刘慧,杜薇,张红星.乳酸乳球菌乳酸亚种高产胆盐水解酶发酵条件的优化研究[J].食品科学,2006,27(11):322-326.
- [16] 黄茜.发酵乳杆菌 DF-4 胆盐水解酶 BSH 基因的克隆、异源重组表达及产物的研究[D].南京:南京师范大学,2012:8-10.
- [17] 刘慧,熊利霞,李金锭,等.藏灵菇源干酪乳杆菌 KL1 高产胆盐水解酶发酵条件的优化研究[J].中国农学通报,2008,24(12):114-118.
- [18] 任婧,姚晶.植物乳杆菌 ST-III 胆盐水解酶的表达及其酶活力分析[J].食品科学,2012,33(17):165-168.
- [19] REN Jing, SUN Ke-jie, WU Zheng-jun, 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-M628.
- [20] 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.

(上接第 23 页)

- [8] 国家卫生计生委疾病预防控制局.中国居民营养与慢性病状况报告:2015年[R].北京:人民卫生出版社,2015.
- [9] 赵佳,杨月欣.营养素度量法在食品包装正面营养标签中的应用[J].营养学报,2015,37(2):131-136.
- [10] Health Promotion Board. Healthier choice symbol [EB/OL]. [2019-10-15]. <https://www.hpb.gov.sg/food-beverage/healthier-choice-symbol>,2019.
- [11] Health Promotion Board. Healthier choice symbol [EB/OL]. [2019-10-16]. [http://www.hpb.gov.sg/hpb/default.asp?pg\\_id=1559,1998](http://www.hpb.gov.sg/hpb/default.asp?pg_id=1559,1998).
- [12] HUANG Li-yan, MEHTA K, WONG M L. Television food advertising in Singapore: The nature and extent of children's exposure [J]. Health Promotion International, 2012, 27(2): 187-196.