

嗜酸乳杆菌胆盐水解酶的分离纯化及酶学性质

赵瑞香, 李 刚, 牛生洋, 杨大光, 路四海, 段改丽, 李银娜
(河南科技学院食品学院, 河南 新乡 453003)

摘 要: 对嗜酸乳杆菌La-XH1产生的胆盐水解酶进行分离纯化, 并对其部分酶学性质进行研究。结果表明: 嗜酸乳杆菌La-XH1胆盐水解酶的粗酶液经硫酸铵沉淀、DEAE-Sephacel CL-6B柱层析后的酶比活力分别为47.82 U/mg和115.85 U/mg, 纯化倍数分别为4.46 倍和10.82 倍, 酶的回收率分别为59.89%和25.11%; 通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)电泳分析, 该酶的分子质量约为43 kD, 最适温度为40 ℃, 最适pH值为6.0, Fe^{3+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 对该酶有激活作用, 其中 Fe^{3+} 的激活作用最强, Na^+ 、 K^+ 对该酶几乎无作用, 而 Cu^{2+} 、 Ba^{2+} 对该酶有很强的抑制作用。

关键词: 嗜酸乳杆菌; 胆盐水解酶; 纯化; 酶学性质

Purification and Enzymatic Properties of Bile Salt Hydrolase Produced by *Lactobacillus acidophilus*

ZHAO Rui-xiang, LI Gang, NIU Sheng-yang, YANG Da-guang, LU Si-hai, DUAN Gai-li, LI Yin-na
(College of Food Science, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China)

Abstract: Bile salt hydrolase (BSH) produced by *Lactobacillus acidophilus* La-XH1 is able to hydrolyze conjugated bile salts into free cholic acid, which can co-precipitated with cholesterol at low pH, thus leading to the removal of cholesterol. In this study, the bile salt hydrolase was separated and purified, and some of its enzymatic properties were studied. Results showed that the specific activity of crude extract and purified enzyme by ammonium sulfate precipitation and DEAE-Sephacel CL-6B column chromatography was 47.82 and 115.85 U/mg, respectively, which corresponded to purification folds of 4.46 and 10.82 and recovery rates of 59.89% and 25.11%, respectively. The molecular weight of the purified enzyme was about 43 kD by SDS-PAGE. Its optimum temperature and pH were 40 ℃ and 6.0, respectively. Fe^{3+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} and Zn^{2+} had activation effect on the enzyme, especially Fe^{3+} . Na^+ and K^+ had no effect, but Cu^{2+} and Ba^{2+} had strong inhibitory effects on it.

Key words: *Lactobacillus acidophilus*; bile salt hydrolase; purification; enzymatic property

中图分类号: TS201.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2014) 05-0165-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201405033

嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)广泛存在于人和动物的肠道中, 是人体肠道中重要的微生物, 当达到一定数量时, 它能够改善人体肠道内有益和有害微生物菌群的平衡, 与人体健康息息相关^[1-3]。本项目组近20年对嗜酸乳杆菌功能特性进行了深入系统的研究, 发现嗜酸乳杆菌能够有效地降低血清及培养介质中的胆固醇水平^[4-5], 但是其降低胆固醇作用的机理至今尚未确定。目前国内外研究者的观点主要集中于四方面^[6-7]: 同化吸收理论; 共沉淀理论; 同化吸收与共沉淀联合作用等。

肠道内的多种乳酸菌可以产生胆盐水解酶(bile salt hydrolase, BSH), 该酶能水解结合态的牛磺胆酸盐和甘氨酸胆盐, 在 C_{24} N末端与氨基酸结合的酰胺键水解, 最终转变为游离的胆酸和氨基酸, 游离的胆酸在低pH

值条件下可与胆固醇结合形成沉淀, 进而排出体外, 具有降低血清中胆固醇的功能^[8-9]。目前产胆盐水解酶的乳酸菌有嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)、干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)、德氏乳酸杆菌保加利亚亚种(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bugaricus*)、发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantum*)和双歧杆菌(*Bifidobacterium*)等^[10]。胆盐水解酶通常为胞内酶, 该酶是乳酸菌降低胆固醇的一种重要的酶, 也是筛选降胆固醇益生菌的一个重要指标^[11]。本实验对嗜酸乳杆菌La-XH1所产胆盐水解酶进行了分离与纯化, 并研究其部分酶学性质, 为将来嗜酸乳杆菌降胆固醇功能食品的开发利用提供理论依据。

收稿日期: 2013-04-08

基金项目: 河南省教育厅科学技术研究重点项目(12A550004); 河南省科技攻关项目(122102110117)

作者简介: 赵瑞香(1966—), 女, 教授, 博士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: zrx338@163.com

1 材料与方法

1.1 菌种与试剂

嗜酸乳杆菌La-XH1由河南科技学院食品研究所分离、驯化、保藏。

MD34透析袋(8 000~14 000 D) 美国联合碳化公司; 水溶性牛胆盐(分析纯) 德国Sigma公司; 硫酸铵、牛磺胆酸钠结合胆盐、牛磺酸、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺(均为分析纯) 郑州久是生物技术有限责任公司。

1.2 仪器与设备

DEAE-Sepharose CL-6B层析柱 上海锐谷生物科技有限公司; HD-4电脑核酸蛋白检测仪 上海康华生化医疗仪器制造有限公司; 7200型可见分光光度计 尤尼柯(上海)仪器有限公司; JY92-2D超声波细胞破碎机 宁波新芝生物科技股份有限公司; TGL-16C超速离心机 上海安亭科学仪器厂; TS-1型脱色摇床 海门市麒麟医用仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 牛磺酸标准曲线绘制

取2 mL的1%茚三酮-柠檬酸缓冲液(pH 5.5), 配制牛磺酸浓度为0、200、400、600、800、1 000 $\mu\text{mol/L}$ 溶液, 混合均匀, 置于沸水浴中加热15 min, 冰浴冷却放置5 min, 于570 nm波长处测其吸光度。以标准牛磺酸浓度为横坐标(x , $\mu\text{mol/L}$), 以吸光度为纵坐标(y), 绘制茚三酮法测牛磺酸浓度的标准曲线方程: $y=0.0007x-0.0401$ ($R^2=0.9853$)。

1.3.2 牛血清白蛋白标准曲线绘制

准确称取100 mg考马斯亮蓝G-250, 溶于50 mL 95%的乙醇中, 再加入0.85 g/mL的磷酸100 mL, 蒸馏水定容至1 000 mL, 配制牛血清白蛋白质量浓度分别为0、20、40、60、80、100 $\mu\text{g/mL}$ 的考马斯亮蓝G-250溶液, 充分振荡混匀, 放置2 min, 测其在595 nm波长处吸光度。以吸光度为纵坐标(y), 蛋白质质量浓度为横坐标(x , $\mu\text{g/mL}$), 绘制标准曲线方程: $y=0.0059x+0.0184$ ($R^2=0.9925$)^[12]。

1.3.3 粗酶液的制备

将嗜酸乳杆菌La-XH1按体积分数4%的接种量接种于1 000 mL含0.2 g/100 mL牛胆盐的乳酸菌培养基(*man rogosa sharpe*, MRS)液体培养基内, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养24 h后, 于4 $^{\circ}\text{C}$ 、6 000 r/min离心20 min, 沉淀菌体用0.1 mol/L (pH 7.0)磷酸缓冲液洗涤2次, 重新溶于100 mL 0.1 mol/L (pH 7.0)磷酸缓冲液中, 冰浴条件下超声波破碎, 超声条件为: 超声6 s, 间隔6 s, 总时间10 min, 功率600 W^[13-14]。超声破碎后, 离心去除细胞碎片制得粗酶液, 测定胆盐水解酶酶活力。

1.3.4 硫酸铵盐析沉淀

向粗酶液中添加固体硫酸铵, 使其饱和度为70%, 边加边搅拌, 充分混匀至硫酸铵完全溶解。然后将粗酶液置于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中24 h, 于4 $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min离心20 min, 弃去上清液, 将所得蛋白质沉淀重新溶于20 mL 50 mmol/L pH 7.0磷酸盐缓冲液中, 装入MD34透析袋内透析除盐2~3 d。测定透析后的胆盐水解酶比活力, 并计算回收率和提纯倍数。

1.3.5 阴离子交换层析纯化胆盐水解酶

阴离子交换柱子准备: 用5~6倍柱床体积的50 mmol/L pH 7.0的磷酸盐缓冲溶液对DEAE-Sepharose CL-6B (2.6 cm \times 20 cm)进行平衡洗涤, 调整平衡流速为1.0 mL/min, 直至检测曲线走平为止。

取透析后酶液20 mL, 沿壁缓慢加到阴离子交换柱的柱面上, 然后用磷酸缓冲液冲洗柱壁数次, 待样品全部进入柱内后, 将顶部螺塞旋紧, 依次用氯化钠浓度为0.1、0.3、0.5、0.7、0.9 mol/L的50 mmol/L pH 7.0的磷酸盐缓冲溶液进行梯度洗脱, 每个盐浓度阶段洗脱至 $A_{280\text{ nm}}$ 为基线, 之后再换成另外一个阶段。调整洗脱速度为5 mL/15 min, 每15 min收集1管。洗脱过程中同时检测蛋白质质量浓度即吸光度 $A_{280\text{ nm}}$ 。以 $A_{280\text{ nm}}$ 为纵坐标, 洗脱时间为横坐标, 绘制胆盐水解酶层析谱图, 洗脱结束后, 测其酶活力, 对有酶活力部分进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分析, 将纯化部分收集, 并计算提纯倍数和回收率^[15]。

1.3.6 胆盐水解酶酶活力及分子质量测定

取上述各步骤所得酶液各0.2 mL, 加入到3.6 mL 0.1 mol/L磷酸缓冲液(pH 6.0)和0.2 mL 6 mmol/L的牛磺胆酸钠结合胆盐中, 混合均匀后置于37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温孵育30 min, 结束后立即添加1.0 mL的0.15 g/mL三氯乙酸溶液终止酶反应。8 000 r/min离心15 min取0.4 mL上清液, 加入2 mL蒸馏水和2 mL茚三酮试剂, 混合均匀, 置于沸水浴中加热15 min, 冰浴冷却后放置5 min, 于570 nm波长处测其吸光度, 根据牛磺酸标准曲线求得牛磺酸浓度, 计算出胆盐水解酶酶活力, 每分钟生成1 μmol 的牛磺酸所需酶量定义为一个酶活力单位(U)^[16]。

酶蛋白分子质量采用SDS-PAGE电泳法测定^[17]。

1.3.7 胆盐水解酶酶学性质

1.3.7.1 温度对酶活力的影响

取酶液0.2 mL, 加入到3.6 mL 0.1 mol/L磷酸缓冲液(pH 6.0)和0.2 mL 6 mmol/L牛磺胆酸钠。混合均匀后分别置于20、30、40、50、60、70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中恒温孵育30 min, 测定酶活力。

1.3.7.2 pH值对酶活力的影响

取酶液0.2 mL, 加入3.6 mL pH 3.0、4.0、5.0、6.0、

7.0、8.0的0.1 mol/L磷酸盐缓冲液和0.2 mL 6 mmol/L牛磺胆酸钠。混合均匀后分别置于37 ℃水浴中恒温孵育30 min, 测定酶活力。

1.3.7.3 金属离子对酶活力的影响

取酶液0.2 mL, 加入3.6 mL的0.1 mol/L磷酸缓冲液(pH 6.0)和0.2 mL的6 mmol/L牛磺胆酸钠, 同时向反应体系中分别添加 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ba^{2+} , 使其金属离子终浓度为50 mmol/L, 混合均匀后分别置于37 ℃水浴中恒温孵育30 min, 测其酶活力, 以不添加金属离子所测定的酶活力为对照。

2 结果与分析

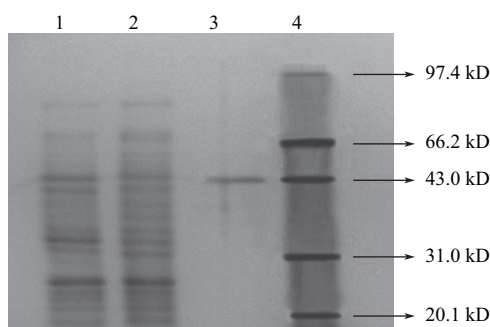
2.1 DEAE-Sepharose CL-6B柱层析及纯化效果分析

表1 胆盐水解酶纯化效果
Table 1 Summary of purification procedure of BSH

样液	总蛋白含量/(mg/mL)	总酶活力/(U/mL)	酶比活力/(U/mg)	提纯倍数	回收率/%
粗酶液	16.81	180.00	10.71	1.00	100.00
硫酸铵沉淀	2.25	107.80	47.82	4.46	59.89
DEAE-Sepharose CL-6B柱层析	0.39	45.20	115.85	10.82	25.11

由表1层析结果可以看出, 当NaCl浓度超过0.1 mol/L, 时间在1 116~1 174 min时胆盐水解酶活力最高, 将该处洗脱液合并收集, 对胆盐水解酶纯化效果进行分析。在经过硫酸铵沉淀、DEAE-Sepharose CL-6B柱层析后, 胆盐水解酶的比活力有了较大提高, 并得到较好的纯化效果。在纯化倍数方面, 硫酸铵盐沉为粗酶液的4.46倍, DEAE柱层析为10.82倍; 在回收率方面, 硫酸铵盐沉为粗酶液的59.89%, DEAE柱层析为25.11%。

2.2 胆盐水解酶分子质量



1.粗酶液; 2.硫酸铵沉淀; 3. DEAE-Sepharose CL-6B柱层析; 4.低分子质量标准蛋白。

图1 胆盐水解酶SDS-PAGE电泳分析

Fig.1 SDS-PAGE electrophoresis of BSH

将分离纯化后的胆盐水解酶进行SDS-PAGE电泳, 结果如图1所示。粗酶液和硫酸铵沉淀后蛋白质条带较多而且较杂, 经过DEAE-Sepharose CL-6B柱层析后, 蛋白条带显示为一条, 表明分离纯化的胆盐水解酶达到了电

泳纯, 结合标准蛋白可知, 本实验分离所得的胆盐水解酶分子质量约为43 kD。

2.3 胆盐水解酶酶学性质

2.3.1 最适温度

温度是对酶活力影响较大的因素, 一般来说, 温度对酶活力的影响表现在两个方面。一方面当温度升高时, 酶促反应的速率提高。另一方面, 随着温度的提高, 蛋白质逐渐变性失活。温度对嗜酸乳杆菌La-XH1胆盐水解酶酶活力的影响如图2所示。

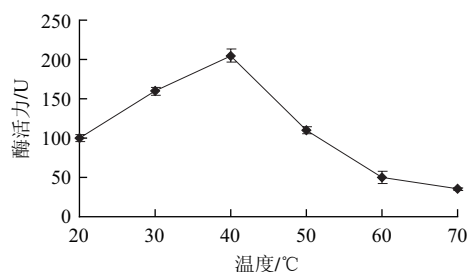


图2 温度对胆盐水解酶活力影响 (n=3)

Fig.2 Effect of temperature on BSH activity (n=3)

由图2可知, 40 ℃以下, 随着温度的升高, 酶活力也逐渐升高, 在40 ℃时达到最大值。而当温度超过40 ℃后, 酶活力又逐渐下降。这主要是过高的温度, 破坏了胆盐水解酶的三维结构, 使酶活力大幅降低^[18]。因此, 该胆盐水解酶的最适温度为40 ℃。

2.3.2 最适pH值

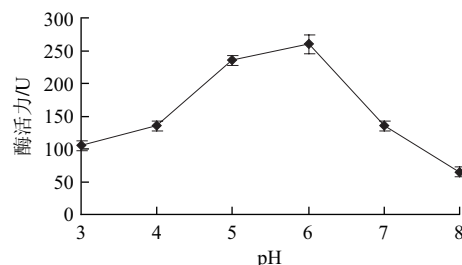


图3 pH值对胆盐水解酶活力影响 (n=3)

Fig.3 Effect of pH on BSH activity (n=3)

不同pH值条件下, 酶表现出不同酶活力, 当达到最适pH值时, 酶活力最高, 此pH值即为酶最佳pH值。由图3可知, 当pH 6.0时酶活力最高, 故pH 6.0为该酶的最适pH值, 与Maieri等^[19]所得出的结论相一致。pH值对胆盐水解酶酶活力的影响主要与酶分子上活性基团解离状态有关, 在pH 6.0时酶分子最适合与底物相结合。

2.3.3 金属离子的影响

不同金属离子对胆盐水解酶酶活力影响如图4所示, 与对照相比, Na^+ 、 K^+ 对酶活力影响几乎为零; Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 对该胆盐水解酶有激活作用, 激活作用强弱顺序依次为 $\text{Fe}^{3+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$,

激活作用最强的为 Fe^{3+} ，激活后相对酶活力为128.06%，最弱为 Zn^{2+} ，为106.05%；而 Cu^{2+} 、 Ba^{2+} 对该酶有抑制作用，抑制作用 $\text{Ba}^{2+} > \text{Cu}^{2+}$ ，这可能是 Cu^{2+} 、 Ba^{2+} 抑制了酶的某个活性基团所致^[20-21]。

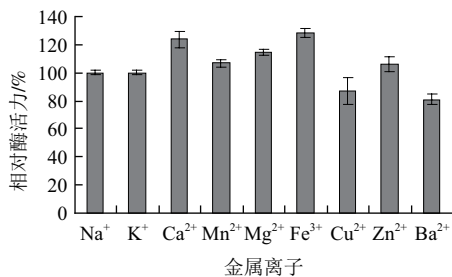


图4 金属离子对胆盐水解酶活力影响 ($n=3$)

Fig.4 Effect of metal ions on BSH activity ($n=3$)

3 结论

嗜酸乳杆菌La-XH1胆盐水解酶的粗酶液经硫酸铵沉淀、DEAE-Sephacrose CL-6B柱层析后酶比活力分别为47.82 U/mg和115.85 U/mg，纯化倍数分别为4.46倍和10.82倍；通过SDS-PAGE电泳分析，该酶的分子质量约为43 kD，最适温度为40℃，最适pH值为6.0； Fe^{3+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 对该酶具有激活作用，其中 Fe^{3+} 的激活作用最强， Na^+ 、 K^+ 几乎无作用，而 Cu^{2+} 、 Ba^{2+} 对该酶有很强的抑制作用。

参考文献：

[1] ZHAO Ruixiang, SUN Junliang, MO Haizhen, et al. Analysis of functional properties of *Lactobacillus acidophilus*[J]. World Journal of Microbiol and Biotechnol, 2007, 23(2): 195-200.
 [2] TANNOCK G. Probiotics and prebiotics: where are we going? [M]. Wymondham: Caister Academic Press, 2002: 22-28.
 [3] 赵瑞香. 嗜酸乳杆菌及其应用研究[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 11-18.

[4] 赵瑞香, 孙俊良, 李明静, 等. 嗜酸乳杆菌同化MRS培养基中胆固醇能力的研究[J]. 中国微生态学杂志, 2005, 17(4): 36-39.
 [5] 路四海, 赵瑞香, 祁婷婷. 两株嗜酸乳杆菌体外降低胆固醇的研究[J]. 食品与机械, 2011, 27(6): 60-63.
 [6] OOI L, LIONG M. Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: a review of *in vivo* and *in vitro* findings[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2010, 11(6): 2499-2522.
 [7] 路四海, 赵瑞香, 牛生洋, 等. 乳酸菌降低胆固醇作用及其机理的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(2): 163-166.
 [8] LIONG M, SHAH N. Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strains[J]. Journal of Dairy Science, 2005, 88: 55-66.
 [9] KLAVER E, MEER R. The assumed assimilation of cholesterol by lactobacilli and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt deconjugation activity[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59: 1120-1124.
 [10] 王丹, 刘景圣, 刘回民, 等. 乳酸菌中胆盐水解酶的研究进展[J]. 农产品加工, 2011(4): 33-37.
 [11] LYE H S, RUSUL G, LIONG M T. Removal of cholesterol by lactobacilli via incorporation and conversion to coprostanol[J]. Journal of Dairy Science, 2010, 93(4): 1383-1392.
 [12] COLIGAN J E. 精编蛋白质科学实验指南[M]. 李慎涛, 译. 北京: 科学出版社, 2007: 297-298.
 [13] 刘晓艳, 丘泰球, 刘石生. 超声波对细胞膜通透性的影响及应用[J]. 应用声学, 2002, 21(2): 26-30.
 [14] 卢群, 刘晓艳, 丘泰球, 等. 超声对酵母细胞膜通透性的影响[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(9): 14-17.
 [15] 陆泉, 施波, 李瑞胜, 等. 离子交换色谱在细菌素分离纯化中的应用[J]. 中国微生态学杂志, 2010, 22(6): 570-572.
 [16] 刘娟, 王荫榆, 吴正钧, 等. 植物乳杆菌ST-III产降胆固醇相关酶的研究[J]. 食品工业科技, 2008, 29(11): 137-139.
 [17] 谭天伟. 生物分离技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 223-229.
 [18] 王璋. 食品酶学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1996: 86-92.
 [19] MAIERE B, COLIN H, CORMAC G. Bile salt hydrolase activity in probiotics [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(3): 1729-1738.
 [20] TARANTO M, FONT D, VALDEZ G. Localization and primary characterization of bile salt hydrolase from *Lactobacillus reuteri*[J]. Biotechnology Letters, 1999, 21: 935-938.
 [21] GRILL J P, SCHNEIDER F, CROCIANI J, et al. Purification and characterization of conjugated bile salt hydrolase from *Bifidobacterium longum* BB536[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61: 2577-2582.