

胆盐水解酶基因结构与功能研究现状

黄艳娜, 任 婧*

(光明乳业股份有限公司光明乳业研究院, 乳业生物技术国家重点实验室, 上海 200436)

摘要:胆盐水解酶是微生物生长、繁殖过程中产生的一种胞内酶, 因其可能与降低血胆固醇、预防心血管疾病有关而受到广泛关注。本文从胆盐水解酶的特性出发, 综述了胆盐水解酶的生理功能、酶学活性、微生物菌群的来源及特征, 以及胆盐水解酶的氨基酸结构等方面的研究进展, 以期为进一步深入研究胆盐水解酶的作用机理及相关制品的开发利用提供参考。

关键词:胆盐水解酶; 胆盐水解酶基因; 胆盐水解酶酶活性; 结构与功能

Current Status of Research on the Structure and Function of Bile Salt Hydrolase Gene

HUANG Yanna, REN Jing*

(State Key Laboratory of Dairy Biotechnology, Bright Dairy Research Institute, Bright Dairy and Food Co. Ltd., Shanghai 200436, China.)

Abstract: Bile salt hydrolase (BSH) is considered to be especially relevant for microbes that reside in the mammalian gastrointestinal tract, which also helps to reduce the blood cholesterol level of the host. This review focuses on the occurrence of bile salt hydrolase among different microorganisms and its physiological characterization, enzyme activity, substrate specificity and genetics involved with recent updates. The current perspective reveals a huge market potential of probiotics with bile salt hydrolase.

Key words: bile salt hydrolase; *bsh* gene; BSH enzyme activity; structure and function.

中图分类号: Q556

文献标志码: A

文章编号: 1671-5187 (2015) 02-0033-04

doi:10.7506/rykxyjs1671-5187-201502008

胆盐水解酶 (bile salt hydrolase, BSH) 是微生物生长、繁殖过程中产生的一种代谢产物。该酶是 *bsh* 基因编码的一种胞内酶, 对氧气不敏感, 适宜在微酸性环境下生长, 能水解胃肠道中的结合态胆盐 (牛磺胆酸盐和甘氨酸胆酸盐), 将其转变成氨基酸和非结合态胆酸, 从而使血清中胆固醇含量降低^[1-2]。本文将从胆盐水解酶的生理功能、酶学活性、底物特异性和蛋白的氨基酸结构等方面入手, 阐述目前不同微生物来源胆盐水解酶的研究现状。

1 胆盐水解酶的生理功能

胆盐水解酶普遍存在于哺乳动物的胃肠道菌群中, 能够催化体内结合型胆盐的去结合化。迄今, BSH 的生理功能尚未充分明确, 主要包括以下几个方面: 1) 胆盐水解酶产生菌株以其分解产物作为营养物质, 如 BSH 的产物甘氨酸代谢产生 NH_3 和 CO_2 , 牛磺酸分解产生 NH_3 、 CO_2 和硫酸盐^[3]。长双歧杆菌的 *bsh* 基因的转录与一种谷氨酰胺的同系物偶合, 编码谷氨酰胺合成酶腺嘌呤转移

酶, 形成部分氮调控级联^[3]。2) 胆盐水解酶能改变产生菌细胞膜的特性。BSH 的水解产物对细胞有一定的毒性, 能伤害哺乳动物的细胞膜, 但产 BSH 细菌体内的游离胆酸能中和去结合型胆盐的毒性。由 BSH 活性导致的细胞表面的改变能潜在地通过免疫系统为细胞提供保护, 并能防止膜的结构改变和对膜的完整性进行防御^[4]。3) 胆盐水解酶能提高产生菌在胃肠道中的存活率。胆盐水解酶能抵抗胆盐的毒性作用, 改变细胞膜的结构, 从而使膜的稳定性提高。通过细胞表面的修饰作用, 形成先天免疫系统的组成部分, 使菌株在肠胃道的存活率提高^[5]。4) 胆盐水解酶能降低胆汁对产生菌的毒害作用。人体中胆盐结合牛磺酸和甘氨酸的比为 1:3。在不同 pH 值条件下, 结合态胆盐毒性不同, 在酸性条件下, 牛磺酸结合态胆盐毒性较弱; 而甘氨酸结合态胆盐的毒性较强。因此, 在酸性条件下胆盐水解酶降解甘氨酸结合态胆盐, 对降低其毒害作用十分重要。5) 胆盐水解酶作用于宿主胆固醇代谢。目前对于胆盐水解酶降低胆固醇的作用主要有以下 2 种可能途径^[6-7]: a) 因胆固醇的溶解度取决于胆盐的溶解度, 胆盐经水解后溶解度下降, 从而

收稿日期: 2014-11-27

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 项目 (2011AA100901); “十二五” 国家科技支撑计划项目 (2013BAD18B01)

作者简介: 黄艳娜 (1980—), 女, 工程师, 博士, 研究方向为益生菌代谢工程及代谢调控。E-mail: huangyanna@brightdairy.com

*通信作者: 任婧 (1980—), 女, 高级工程师, 博士, 研究方向为乳品安全。E-mail: renjing@brightdairy.com

致使胆固醇也一同沉淀下来。所以，胆盐水解酶催化产生的游离胆酸是沉淀胆固醇降低其含量的直接因素。b) 在体内，胆盐水解酶作用后产生的脱结合胆酸在大肠内不被重复吸收而由粪便排出，胆酸的排出导致其在肠肝系统循环次数减少，从而增加了胆酸的生物合成。由于胆固醇是形成胆酸的前体物，部分胆固醇需要转化为胆酸以弥补被分解后排出体外的部分，这样就加速了胆固醇的分解代谢，从而导致胆固醇浓度的降低。尽管关于确实的机理尚无定论，但推测具有BSH活性微生物降胆固醇不是上述任何一种机制的单独作用，而是协同作用的结果。

2 BSH活性微生物菌种来源及特征

胆盐水解酶被认为是寄居在哺乳动物胃肠道的微生物有关^[8]，如*Bifidobacterium*和*Lactobacillus*通常寄居于人体和动物的胃肠道中。迄今为止，除了拟杆菌属的两株菌外，其余发现的产BSH菌株均为G⁺。最近的一些研究分离了12株来自小鸡胃肠的*Lactobacillus*菌株（如*L. reuteri*、*L. brevis*、*L. salivarius*、*L. gallinarum*和*L. panis*），以及3株来自人体粪便的菌株（*L. fermentum*、*Streptococcus bovis* ATCC 43143和*Enterococcus faecalis* UK873），这些微生物均可以形成非结合态甘氨酸胆酸钠和牛磺酸胆酸钠^[9]，这可能对于微生物菌群在肠道的存活是非常重要的。目前关于不同乳酸菌胆盐水解酶的活性已有较为系统的研究，涉及的微生物菌种包括*L. plantarum*、*L. buchneri*、*L. fermentum*、*L. acidophilus*、*L. sakei*、*L. amylovorus*、*L. crispatus*、*L. brevis*、*L. gallinarum*和*L. panis*等。

表1 具有胆盐水解酶活性的微生物来源及特征^[9]

微生物	来源	特征
<i>L. plantarum</i> LP09、 <i>L. plantarum</i> LP45	开菲尔颗粒	低pH值和高胆盐浓度耐受，具有胆盐水解酶活性、胆盐去结合活性和胆固醇共沉淀性能
<i>L. acidophilus</i> LA15、 <i>L. plantarum</i> B23、 <i>L. kefir</i> D17	西藏开菲尔颗粒	具有胆盐水解酶活性、胆固醇同化和共沉淀性能
<i>L. plantarum</i> ST-III	中国咸菜	包含4种胆盐水解酶，对甘氨酸去结合胆酸具有较高的水解活性
<i>L. plantarum</i> WCFS1	人体唾液	在生长对数期表达4种 <i>bsh</i> 基因
<i>L. johnsoni</i> PF01 (<i>L. acidophilus</i>)	小猪粪便	体外对牛磺胆盐具有胆盐水解活性和较高的胆酸抗性
<i>L. brevis</i> BCCM 18022	Zabady(酸乳)	具有牛磺胆酸钠水解酶和牛磺脱氧胆酸钠水解酶活性
<i>L. fermentum</i> ATCC 11976	婴儿肠道	具有牛磺胆酸钠水解酶和牛磺脱氧胆酸钠水解酶活性
<i>L. amylovorus</i> JCM2125	分离于人体	具有牛磺胆酸钠水解酶和牛磺脱氧胆酸钠水解酶活性
<i>L. crispatus</i> JCM 8778	粪便	具有牛磺胆酸钠水解酶和牛磺脱氧胆酸钠水解酶活性
<i>Brevibacillus</i> spp.	温泉、印度	胞内酶，分子质量28 kD，对甘氨酸结合胆酸的K _m 和k _{cat} 值分别为3.08 μmol/L和6.32 × 10 ³ s ⁻¹
<i>Streptococcus bovis</i> ATCC 43143	分离于人体	对牛磺胆酸和甘氨酸胆酸的水解酶活性分别为(30.9 ± 1.0)、(3.5 ± 1.3) (μmol · min) / (10 ¹⁰ CFU)
<i>Enterococcus faecalis</i> UK873	分离于人体	对牛磺胆酸和甘氨酸胆酸的水解酶活性分别为(9.5 ± 6.6)、(23.9 ± 5.2) (μmol · min) / (10 ¹⁰ CFU)。

然而，BSH活性不仅局限于来自肠道系统的细菌，一些分离于蔬菜的微生物同样也具有该酶的活性。表1列举了部分分离于人体和蔬菜等具有BSH活性的微生物来源及其特征^[9]。

3 胆盐水解酶的酶学活性

BSH活性主要存在于那些从哺乳动物胃肠道分离出来的菌种中。有研究表明双歧杆菌作为健康人体肠道内的优势菌群，比其他细菌拥有更高的BSH活性。Schillinger等^[10]在*L. acidophilus*和*L. johnsonii*的若干菌株中都检测到BSH的活性，但在*L. casei*组中未检测到。*Lactobacilli*是肠道微生物的主要菌群，研究者通过去除小鼠肠道中乳酸杆菌证实其具有最高的BSH活性^[11]。

对不同胆盐的BSH活性依赖于很多因素，如pH值和pKa值。牛磺酸结合物在水溶液中的pKa值为1.9，而脱结合物pKa值大约为5.0。甘氨酸结合胆酸pKa值约为3.9，并且可以在发酵pH值条件下部分沉淀。这样，在酸性发酵代谢的pH值，非结合态胆酸质子化并沉淀，而牛磺酸结合态完全电离在溶液中^[12]。这个信息对于测定BSH酶活非常重要。Rossocha等^[13]的研究表明在还原条件下添加二硫苏糖醇可维持BSH活性位点Cys2的巯基从而保证蛋白的天然构型。Bi Jie等^[14]在大肠杆菌中表达*L. salivarius* LMG14476的两种胆盐水解酶基因*bsh1*和*bsh2*，研究结果显示表达*bsh1*和*bsh2*的重组大肠杆菌在添加牛磺胆酸钠和甘氨酸脱氧胆酸钠平板上显示不同的菌落特征（图1），这与胆盐水解酶作用于底物而产生的非结合态胆酸水溶性降低有关。

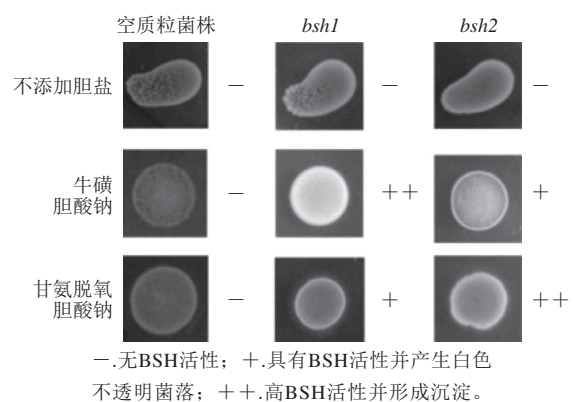


图1 表达BSH的重组大肠杆菌的菌落形态^[14]

Fig.1 Colonial morphology of recombinant *E. coli* overexpressing BSH^[14]

4 胆盐水解酶的底物特异性

研究发现BSH酶可以同时识别胆酸的类固醇核心或氨基酸基团（甘氨酸/牛磺酸），还有文献报道BSH

酶能识别胆酸酯基团。不同来源的BSH酶具有不同的底物谱,大多数来自乳酸发酵的益生菌如*Lactobacilli*和*Bifidobacteria*对于水解甘氨酸结合胆盐(glyco-conjugated bile salts, G-CBAs)较磺酸基团结合胆盐(tauro-conjugated bile salts, T-CBAs)具有更高的催化活性^[15]。Bi Jie等^[14]对*L. salivarius*中胆盐水解酶的研究表明BSH1具有对T-CBAs较G-CBAs更强的催化能力和底物特异性,BSH2较BSH1具有对所有CBAs更高的催化能力和特异性。Moser等^[16]对布氏乳杆菌*L. buchneri* JCM1069进行了验证,该酶具有牛磺酸脱氧胆酸盐(taurodeoxycholic, TDC)水解酶活性,不具有牛磺酸胆酸盐(taurocholic, TC)水解酶活性。TDC和TC的氨基酸侧链都是牛磺酸,然而它们各自所合成的类固醇部分的位置不同,TC上有一个羟基,而TDC的7位已经去羟基化。嗜酸乳酸杆菌*L. acidophilus* NCFM的胆盐水解酶**bshA**基因失活降低了其水解如牛磺鹅脱氧胆酸盐(taurochenodeoxycholic, TCDCA)和甘氨酸脱氧胆酸盐(glycochenodeoxycholic, GCDCA)以鹅去氧胆酸为类固醇核心的胆盐的能力^[17]。但也有文献根据胆盐水解酶的动力学数据分析,揭示占底物识别主导地位的是氨基酸部分,大多数胆盐水解酶对甘氨酸胆酸有比牛磺胆酸高的降解活性^[18-19]。因此,Begley等^[20]推测,细菌的胆盐水解酶可以识别胆盐的固醇侧链和氨基酸侧链。Huijghebaert^[21]、van Eldere^[22]等均发现梭菌属产生的胆盐水解酶的最适底物为牛磺胆酸盐,并能提高菌体的生长速率。由此可知,BSH的底物识别残基并非绝对保守。

由于BSHs具有底物特异性,添加胆汁有时可以诱导或抑制胆盐水解酶的作用。有研究显示胆汁可以使得**bsh1**表达提高6倍,而**bsh3**表达降低约5倍^[6]。同样,胆汁的不同部分激活不同BSHs,BSHA活性由胆盐的甾核激活,而BSHB的活性由氨基酸侧链诱导。

不同来源的胆盐水解酶对不同的底物显示不同的 K_m 值,这与酶与底物的亲和力有关。在适温*Brevibacillus* sp.中产生的BSH(56 kD,同源二聚体),该酶可以水解6种人体中主要的胆盐。该酶最适底物为甘氨酸结合的底物,其中对甘氨酸脱氧胆酸的 K_m 为3.08 $\mu\text{mol/L}$, k_{cat} 为 $6.32 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$ ^[23]。*L. plantarum* CK102 BSH分子质量较低,为37 kD,水解甘氨酸胆酸盐的 K_m 为0.5 mmol/L, V_{max} 为94 (nmol·mg)/min, pH 5.8~6.3,该酶的活性受到碘醋酸酯和过碘酸的抑制^[24]。

5 胆盐水解酶基因及氨基酸结构特征

目前已经报道了植物乳杆菌、约氏乳杆菌、单增李斯特菌和两歧双歧杆菌中存在单顺反子的**bsh**基因^[25]。从不同产气荚膜杆菌中克隆的胆盐水解酶基因的碱基以及

其翻译的氨基酸序列存在较大的差异。很多研究表明,具有活性的编码胆盐水解酶的基因都以同源四聚体的形式存在^[14]。

BSH属于甘氨酸胆酸水解酶家族,能识别胆汁酸的类固醇核心以及氨基酸基团,同族酶中包括青霉素V酰基转移酶。该家族都为氨基末端亲核(N-terminal nucleophilic, Ntn)水解酶类,N末端是一个半胱氨酸残基。通过蛋白自身酶解过程中去除初始的甲硫氨酸后,Cys-1形成一个催化中心,这是Ntn水解酶超家族的特性^[11,26]。Cys-1的巯基(-SH)已经被证实是BSH酶催化的必需结构。其他对BSH酶催化有作用的氨基酸包括Asp-20、Tyr-82、Asn-175和Arg-228,这几个位点在BSH是高度保守的^[13]。有研究表明青霉素酰胺酶的Tyr-82与BSH Asn-82的保守性很可能与它们各自底物所需求的空间不同有关^[6]。值得注意的例外是Leu142,它是严格保守的,但它的重要性至今还未明确。

很多学者已经开展了具有细微BSHs结构差异的研究。对*Bifidobacterium longum*的BSH晶体结构研究表明其具有 $\alpha\beta\alpha$ 3级结构。N末端半胱氨酸的巯基负责*B. bifidum* BSH的活性,这就是BSH被硫醇酶抑制剂抑制的原因。当Ser或Thr替代Cys时导致酶失活,这体现了半胱氨酸存在的重要性^[6]。而且BSH中这个半胱氨酸(Cys-1)的位点十分保守,能够氧化硫醇基的试剂(碘乙酰胺、PMB、 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 和 Cd^{2+})能够强烈抑制荚膜梭菌、路氏乳杆菌和长双歧杆菌的BSHs活性。Rossocha等^[13]将*Clostridium perfringens*的BSH与Ntn水解酶家族的其他成员的结构比较,研究发现活性位点的几何结构非常保守。*L. acidophilus* PF01 BSH基因的核苷酸序列分析结果显示它是一条包含951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。4个氨基酸基序FGRNXD、AGLNF、VLTNXP和GXGXGXGXP GD高度保守,位于活性位点的四周^[27]。

Lambert等^[8]通过在**bsh**缺失的*L. lactis*中分别过量表达4种不同的**bsh**基因**bsh1**、**bsh2**、**bsh3**、**bsh4**,另外还构建了*L. plantarum* WCFS1的**bsh**基因单敲除、双敲除、三敲除和四敲除突变株,研究表明,**bsh2**、**bsh3**和**bsh4**为高度保守区域,可能与编码青霉素V酰化酶有关,而**bsh1**与胆盐水解酶活性有关。Ren Jing等^[7]在大肠杆菌中克隆表达了来自*L. plantarum* ST-III的4种胆盐水解酶基因(**bsh1**、**bsh2**、**bsh3**、**bsh4**),结果表明,这4种BSH蛋白对甘氨酸-或牛磺酸-结合胆盐均有活性,其中BSH1对甘氨酸脱氧胆酸具有较高的水解作用。有研究表明*L. acidophilus* NCFM中包含的**bshA**和**bshB**编码蛋白的相似性远远低于其他乳酸菌的BSH,推测这两个基因的来源是不同的。除了组成型BSH的合成,在*L. acidophilus*、*L. plantarum*、*L. brevis*

和*L. fermentum*中同样也检测到质粒介导的BSH活性^[28]。Bi Jie等^[14]异源表达和纯化了来自*L. salivarius*的2种BSH酶(BSH1和BSH2)。其中BSH1显示出较广的pH值(5.5~7.0);而BSH2最适pH值范围为5.5~6.0。BSH1和BSH2酶动力学结果表明该菌二者为变构酶。

除了乳酸菌以外,双歧杆菌同样也拥有不同的BSH类型:A、B和C。*B. bifidum* ATCC 11863的B型BSH等电点(PI)是4.45;其他BSH(A和C)PI大约为4.65。A和C型胆盐水解酶N末端氨基酸测序揭示20种氨基酸残基中有6种高度保守^[18]。

6 结 语

为获得更准确的BSH在不同物种的进化信息,微生物遗传学目前的研究还远远不够。很多研究已经报道了利用分子方法对*Lactobacillus*、*Bifidobacterium*和其他物种BSH的同源性。但是关于其组成型或诱导型保守,以及基因转移的模式信息很少。宏基因组学方法已经尝试去识别所有主要与肠道相关的细菌分裂和古细菌种类,研究表明,BSHs富集在人类肠道菌群中。系统发育研究解释说这种以结合胆盐形式的选择压力促使Ntn_CGH-like蛋白家族成员向BSH活性方向进化^[26]。通过晶体化、定点突变和蛋白次级结构分析的可以深入研究胆酸的生物转化,而对编码胆盐生物转化的酶基因的克隆则有助于进一步了解相关途径的遗传相关性和检测胆盐修饰细菌探针的开发。

尽管近期在不同BSH酶中取得显著进展,但对于细菌自身的BSH酶的天然功能仍不清楚。一种假设是具有BSH活性的乳杆菌可以耐受肠道的胆酸,然而,有关肠道细菌耐受胆酸与BSH活性的关系的研究很多是相互矛盾的^[20],例如在*L. salivarius*(存在于鸡肠道中的*Lactobacillus*优势菌种)中,BSH的产生并不决定其抗胆酸的水平。不管细菌中BSH的天然功能如何,研究者越来越意识到肠道的BSH在宿主脂代谢和能力存储中起着非常重要的作用^[20,26]。近期关于益生菌的研究表明口服产BSH的乳酸菌会影响脂代谢,并最终降低宿主,如人体、鼠和猪等的胆固醇水平,这似乎与BSH的活性调节有关。虽然有越来越多BSH的相关研究报道,但其降胆固醇机理及对宿主的影响还未确定。未来,需要更多的有关功能、基因组、微生物学等的研究来进一步深入了解肠道菌群与宿主的共生关系,以提高微生物菌群在肠道中的存活率,生产高效降胆固醇菌株。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] LI G J. Intestinal probiotics: Interactions with bile salts and reduction of cholesterol[J]. Procedia Environmental Sciences, 2012, 12: 1180-1186.
- [3] GOPAL-SRIVASTAVA R, HYLEMON P B. Purification and characterization of bile salt hydrolase from *Clostridium perfringens*[J]. Journal of Lipid Research, 1988, 29: 1079-1085.
- [4] KUMAR M, NAGPAL R, KUMAR R, et al. Cholesterol-lowering probiotics as potential biotherapeutics for metabolic diseases[J]. Experimental Diabetes Research, 2012: 902917. doi: 10.1155/2012/902917.
- [5] SANYAL A, SHIFFMAN M L, HIRSCH J I, et al. Premicellar taurocholate enhances ferrous iron uptake from all regions of rat small intestine[J]. Gastroenterology, 1991, 101: 382-388.
- [6] PATEL A K, SINGHANIA R R, PANDEY A, et al. Probiotic bile salt hydrolase: current developments and perspectives[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2010, 162: 166-180.
- [7] REN Jing, SUN Kejie, WU Zhengjun, 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: 622-628.
- [8] LAMBERT J M, BONGERS R S, de Vos W M, et al. Functional analysis of four bile salt hydrolase and penicillin v acylase family members in *Lactobacillus plantarum* WCFS1[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74: 4719-4726.
- [9] REYES-NAVA L A, RIVERA-ESPINOZA Y. Isolation sources of bile salt hydrolase-microorganisms[J]. Herald Journal of Agriculture and Food Science Research, 2014, 3: 49-54.
- [10] SCHILLINGER U, GUIGAS C, HOLZAPFEL W H. *in vitro* adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products[J]. International Dairy Journal, 2005, 15: 1289-1297.
- [11] TANNOCK G W, DASHKEVICZ M P, FEIGHNER S D. Lactobacilli and bile salt hydrolase in the murine intestinal tract[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1989, 55: 1848-1851.
- [12] de SMET I, van HOORDE L, WOESTYNE M V, et al. Significance of bile salt hydrolytic activities of lactobacilli[J]. Journal of Applied Bacteriology, 1995, 79: 292-301.
- [13] ROSSOCHA M, SCHULTZ-HEIENBROK R, von MOELLER H, et al. Conjugated bile acid hydrolase is a tetrameric N-terminal thiol hydrolase with specific recognition of its choly but not of its tauryl product[J]. Biochemistry, 2005, 44: 5739-5748.
- [14] BI Jie, FANG Fang, LU Siyi, et al. New insight into the catalytic properties of bile salt hydrolase[J]. Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2013, 96: 46-51.
- [15] LIN Jun. Antibiotic growth promoters enhance animal production by targeting intestinal bile salt hydrolase and its producers[J]. Frontiers in Microbiology, 2014, 5: 1-4.
- [16] 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: 3476-3480.
- [17] McAULIFFE O, CANO R J, KLAENHAMMER T R. Genetic analysis of two bile salt hydrolase activities in *Lactobacillus acidophilus* NCFM[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71: 4925-4929.
- [18] KIM G B, YI S H, LEE B H. Purification and characterization of three different types of bile salt hydrolase from *Bifidobacterium* strains[J]. Journal of Dairy Science, 2004, 87: 258-266.
- [19] TANAKA H, HASHIBA H, KOK J. Bile salt hydrolase of *Bifidobacterium longum*: biochemical and genetic characterization[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66: 2502-2512.
- [20] BEGLEY M, HILL C, GAHAN C G M. Bile salt hydrolase activity in probiotics[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72: 1729-1738.
- [21] HUIJGHEBAERT S M, MERTENS J A, EYSSEN H J. Isolation of a bile salt sulfatase-producing *Clostridium* strain from rat intestinal[J]. Microflora, 1982, 43: 185-192.
- [22] van ELDERE J, CELIS P, de PAUW G, et al. Tanroconjugation of cholic acid stimulates 7-dehydroxylation by fecal bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 2: 656-661.
- [23] SRIDEVI N, SRIVASTAVA S, KHAN B M, et al. Characterization of the smallest dimeric bile salt hydrolase from a thermophile *Brevibacillus* sp.[J]. Extremophiles, 2009, 13: 363-370.
- [24] HA C G, CHO J K, CHAI Y G, et al. Purification and characterization of bile salt hydrolase from *Lactobacillus plantarum* CK102[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2006, 16: 1047-1052.
- [25] TANAKA H, DOESBURG K, IWASAKI T, et al. Screening of lactic acid bacteria for bile salt hydrolase activity[J]. Journal of Dairy Science, 1999, 82: 2530-2535.
- [26] JONES B V, BEGLEY M, HILL C, et al. Functional and comparative metagenomic analysis of bile salt hydrolase activity in the human gut microbiome[J]. PNAS, 2008, 105: 13580-13585.
- [27] 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.
- [28] 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: 11-16.