



## 研究报告

## 产碱性磷酸酶乳杆菌的筛选鉴定、酶的纯化及特性

段晓霞<sup>1</sup> 格日乐其木格<sup>2,3</sup> 其其日力格<sup>1</sup> 邱崇顺<sup>1</sup> 芒来<sup>2,3</sup> 乌云达来<sup>\*1,2,3</sup>

1 内蒙古农业大学食品科学与工程学院 内蒙古 呼和浩特 010018

2 内蒙古农业大学动物科学学院 内蒙古 呼和浩特 010018

3 内蒙古自治区马属动物遗传育种与繁殖学重点实验室 农业农村部马属动物遗传育种与繁殖科学观测实验站 内蒙古农业大学马属动物研究中心 内蒙古 呼和浩特 010010

**摘要:**【背景】碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)是生物体内参与磷酸代谢的调控酶,不同物种的 ALP 性质与其生理功能有关,提纯后的 ALP 常用作工具酶,广泛应用于基因工程中,但目前关于乳酸菌中 ALP 的相关研究甚少。【目的】筛选出一株产 ALP 且具有潜在益生作用的乳杆菌,对该酶进行分离纯化,并对其性质进行探究,为今后益生菌的开发利用和 ALP 的工业化生产提供新的微生物资源。【方法】采集蒙古国 4 个地区的酸马奶样品,通过显色反应初筛和酶活检测复筛对产酶菌株进行筛选,经形态学观察、生理生化鉴定及 16S rRNA 基因序列同源性比较分析进行菌种鉴定。采用超声破碎法提取 ALP,经硫酸铵沉淀、DEAE-52 离子交换层析、Sephadex G-200 凝胶过滤层析纯化该酶,SDS-PAGE 电泳法检测其纯度。【结果】从 78 株乳酸菌中分离筛选出一株产 ALP 酶活性最高的乳杆菌(编号为 Z23),16S rRNA 基因序列长度为 1 473 bp,鉴定结果表明为鼠李糖乳杆菌。纯化后的酶比活力为 180.27 U/mg,纯化倍数为 48.37,酶活回收率为 17.05%,该酶亚基相对分子质量为 46.7 kD。菌株所产 ALP 的最适温度为 37 °C,4 °C 时酶活最为稳定;最适 pH 为 9.5,在 pH 9.0–10.0 之间,酶活稳定性可达 90%以上;Mg<sup>2+</sup>和 K<sup>+</sup>对 ALP 有明显激活作用,Ba<sup>2+</sup>和 Cu<sup>2+</sup>在低浓度时对 ALP 有激活作用,高浓度时有抑制作用,Ca<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>和 EDTA 对 ALP 有强烈的抑制作用。以不同浓度的 p-NPP 为底物,测得酶的 K<sub>m</sub> 值为 3.42 mmol/L, V<sub>max</sub> 值为 1.24 mmol/(L·min)。【结论】本研究对蒙古国地区酸马奶中的益生菌资源有了更为明确的认知,为今后碱性磷酸酶产生菌的筛选和酶的应用开辟了新途径。

**关键词:** 酸马奶, 乳杆菌, 碱性磷酸酶, 筛选鉴定, 分离纯化, 酶学特性

**Foundation items:** Scientific Research Project of Higher Education of Inner Mongolia Autonomous Region (NJZY19054, NJZC16061); Key Special Projects of International Scientific and Technological Innovation Cooperation Between Governments/Scientific and Technological Innovation Cooperation Between Hong Kong, Macao and Taiwan of China (2017YFE0108700)

\*Corresponding author: Tel: 86-471-4317891; E-mail: wydlnm@126.com

Received: 15-10-2019; Accepted: 04-12-2019; Published online: 06-01-2020

基金项目: 内蒙古自治区高等学校科学技术研究项目(NJZY19054, NJZC16061); 政府间国际科技创新合作/港澳台科技创新合作重点专项项目(2017YFE0108700)

\*通信作者: Tel: 0471-431789; E-mail: wydlnm@126.com

收稿日期: 2019-10-15; 接受日期: 2019-12-04; 网络首发日期: 2020-01-06

## Screening, identification, purification and characterization of alkaline phosphatase from *Lactobacillus*

DUAN Xiao-Xia<sup>1</sup> Gerelchimeg<sup>2,3</sup> Qiqirilige<sup>1</sup> QIU Chong-Shun<sup>1</sup>  
Manglai<sup>2,3</sup> Wuyundalai<sup>\*1,2,3</sup>

1 College of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010018, China

2 College of Animal Science, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010018, China

3 Inner Mongolia Key Laboratory of Equine Genetics, Breeding and Reproduction; Scientific Observing and Experimental Station of Equine Genetics, Breeding and Reproduction, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Equine Research Center of Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010010, China

**Abstract:** **[Background]** Alkaline phosphatase (ALP) is a regulating enzyme involved in phosphorylation in living organisms. The properties of ALP in different species are related to its physiological functions, and the purified ALP is commonly used as a tool enzyme in genetic engineering, but there are few studies on ALP in lactic acid bacteria currently. **[Objective]** A strain of *Lactobacillus* producing ALP with potential probiotics was screened out, the enzyme was isolated and purified, and its properties were preliminarily investigated, which provided new microbial resources for the development and utilization of probiotics and the industrial production of ALP in the future. **[Methods]** Samples of Koumiss collected from four regions of Mongolia, and the enzyme-producing strains were screened through chromogenic reaction preliminary screening and enzyme activity detection rescreening. Strains were identified through morphological observation, physiological and biochemical identification and 16S rRNA gene sequence homology comparison. ALP was extracted by ultrasonic crushing, purified by ammonium sulfate precipitation, DEAE-52 ion exchange chromatography and Sephadex G-200 gel filtration chromatography, and the purity was determined by SDS-PAGE electrophoresis. **[Results]** A strain of *Lactobacillus* with the highest ALP-producing enzyme activity (No. Z23) was isolated and screened from 78 strains of lactic acid bacteria. The length of the 16S rRNA gene was 1 473 bp, and the identification result indicated that it was *Lactobacillus rhamnosus*. The specific activity of the purified enzyme was 180.27 U/mg, the purification ratio was 48.37, the enzyme activity recovery rate was 17.05%, and the relative molecular weight of the enzyme subunit was 46.7 kD. The optimum temperature of ALP produced by the strain was 37 °C, and the enzyme activity was most stable at 4 °C. The optimum pH was 9.5, and the enzyme activity stability could reach more than 90% between pH 9.0 and 10.0. Mg<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> had obvious activation effect on ALP, Ba<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> had activation effect on ALP at low concentration, and inhibition effect at high concentration, Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> and EDTA had strong inhibition effect on ALP. Using different concentrations of p-NPP as substrate, the K<sub>m</sub> value of the enzyme was 3.42 mmol/L and the V<sub>max</sub> was 1.24 mmol/(L·min). **[Conclusion]** This study has a clearer understanding of probiotic resources in Koumiss in Mongolia, which opened up a new way for screening ALP-producing bacteria and application of the enzyme in the future.

**Keywords:** Koumiss, *Lactobacillus*, Alkaline phosphatase, Screening and identification, Separation and purification, Enzymatic property

磷酸酶通常是指能够在一定条件下催化正磷酸酯化合物水解的一类水解酶, 根据作用时所需氢离子浓度值的不同可分为碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)和酸性磷酸酶(acid phosphatase, AcPase)两大类<sup>[1]</sup>。碱性磷酸酶是一类在碱性条件下具有最佳活性的非特异性磷酸单酯酶<sup>[2]</sup>, 普遍存在

于生物体内各组织器官及腺体和体液中, 如血液、唾液等。在磷的生物地球化学循环过程中, ALP起到了极为重要的作用, 在生物体内可直接参与磷酸基团的转移和代谢, 维持体内适宜的钙磷比, 且在蛋白质分泌、骨骼形成及脂质代谢中具有一定作用<sup>[3]</sup>。临床上血清 ALP 活性异常水平可作为多种疾病的诊

断指标, 如糖尿病、骨病、肝功能障碍或损失以及前列腺癌等<sup>[4-7]</sup>。提纯后的 ALP 常被用作核酸分析等研究中, 也是电化学酶免疫分析和免疫传感器中的标记酶<sup>[8]</sup>。该酶可作为除草剂提高农作物产量, 增强植物的抗逆性<sup>[9]</sup>, 也可以作为蛋白类食品中微生物的检测指标<sup>[10]</sup>, 从而保障食品安全。

早在 20 世纪 50 年代, 国外就开始对产 ALP 的微生物有过报道, 大多数分离自原核生物的酶, 如枯草芽孢杆菌和大肠杆菌, 其中关于大肠杆菌 ALP 的结构、功能及催化特性研究得最为清楚<sup>[11-12]</sup>。但我国目前对于 ALP 的研究多集中于哺乳动物、贝类、鱼类等<sup>[13-15]</sup>, 对微生物方面的研究较少。乳酸菌是一类可发酵碳水化合物并产生乳酸的革兰氏阳性细菌的总称<sup>[16-17]</sup>, 广泛存在于人体肠道内且具有重要的生理功能<sup>[18-19]</sup>。目前关于乳酸菌中 ALP 的研究鲜有报道。因此, 本文以蒙古国酸马奶样品中分离筛选的乳酸菌为研究对象, 从中筛选出一株产 ALP 且具有潜在益生作用的乳杆菌, 并对 ALP 进行分离纯化和酶学特性研究, 以期对 ALP 产生菌的研究提供新的思路, 同时也为 ALP 的工业化生产和应用提供新的实验方法和材料。

## 1 材料

### 1.1 样品的采集

酸马奶样品采集自蒙古国前杭爱省、后杭爱省、布尔干省、中央省 4 个不同地区。

### 1.2 培养基及主要试剂和仪器

脱脂乳培养基、MRS 液体培养基、MRS 固体培养基、0.75% MRS-CaCO<sub>3</sub> 培养基和 HBI 乳酸菌生化鉴定条, 青岛高科技工业园海博生物技术有限公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒、DL2000 DNA Marker, 天根生化科技(北京)有限公司; 对硝基苯酚磷酸二钠(p-NPP)、对硝基苯酚(p-NP)、预染低分子量蛋白 Marker、DEAE-52 离子交换纤维素、Sephadex G-200 葡聚糖凝胶, 北京索莱宝科技有限公司。电热恒温培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; YC-1 数控层析冷柜, 上海青浦沪西仪器厂。

## 2 方法

### 2.1 产碱性磷酸酶乳杆菌的筛选

#### 2.1.1 产酶菌株的初筛

采用稀释平板法分离乳酸菌, 吸取 1 mL 酸马奶样品, 用 0.9% (质量比) 灭菌后的生理盐水对样品梯度稀释, 选用 10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup> 这 3 个稀释度下的样品, 分别涂布于 MRS-CaCO<sub>3</sub> 培养基平板上, 37 °C 培养 24-48 h, 观察并记录菌落特征, 挑取具有乳酸菌典型特征并伴有溶钙圈的菌落反复划线纯化, 直至出现单个纯菌落。选取革兰氏染色为阳性、过氧化氢酶试验为阴性的菌株保藏备用。将纯化保藏后的单菌重新活化后于 MRS 固体培养基中划线培养, 将浸有底物溶液(2 mg/mL p-NPP、1 mol/L pH 8.5 的 Tris-HCl 溶液)的滤纸片贴于菌落上, 置于 37 °C 培养箱中 3 min, 挑选能让滤纸变黄的菌株用于复筛。

#### 2.1.2 产酶菌株的复筛

将初筛后的菌株接于 MRS 液体培养基中, 37 °C 静置培养 24 h, 重复培养 3 代, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min 后取上清液, 测定胞外酶活。

将菌体沉淀用 pH 10.5 的 10 mmol/L 碳酸缓冲液洗涤 3 次, 制成细胞悬液, 冰浴条件下 500 W 超声破碎 15 min (工作 10 s, 停止 15 s), 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min 后取上清液测定胞内酶活, 比较两种提取方法下菌株胞内和胞外酶活力大小, 确定粗酶液提取方式后, 选取酶活力最高的菌株作为供试菌株。

#### 2.1.3 酶活力及酶蛋白含量的测定

对硝基苯酚法制作酶活测定标准曲线<sup>[20]</sup>, 体系中含 1 mL 10 mmol/L 碳酸缓冲溶液(pH 10.5)、1 mL 5 mmol/L p-NPP (用含 1 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 的碳酸缓冲溶液配制)、1 mL 酶液、2 mL 蒸馏水, 混匀后于 37 °C 下反应 60 min, 后加入 3 mL 0.1 mol/L 的 NaOH (含 5 mmol/L EDTA) 终止反应。酶活力单位(U)定义为: 37 °C 下每分钟水解底物 p-NPP 生成 1 μmol p-NP 所需的量为 1 个酶活力单位。

考马斯亮蓝法<sup>[21]</sup>制作酶蛋白含量测定标准曲线, 以牛血清蛋白为对照, 测定样品中酶蛋白含量。

## 2.2 菌株鉴定

### 2.2.1 形态学及生理生化鉴定

观察目的菌株在 MRS 固体培养基上的生长状况和菌落形态,挑取单菌落进行革兰氏染色并镜检,根据乳酸菌生化鉴定条的使用说明书对实验菌株进行鉴定。鉴定结果参照《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[22]</sup>及《伯杰细菌鉴定手册》<sup>[23]</sup>。

### 2.2.2 分子生物学鉴定

按照 DNA 提取试剂盒中的步骤对菌株的基因组 DNA 进行提取,以乳酸菌通用引物 27f (5'-AGA GTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492r (5'-GGTTAC CTTGTTACGACTT-3')为模板进行 PCR 扩增,PCR 反应体系(50  $\mu$ L):模板 DNA 2  $\mu$ L,上、下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 2  $\mu$ L, 2 $\times$ EasyTaq SuperMix 25  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补足至 50  $\mu$ L。PCR 反应条件:97  $^{\circ}$ C 3 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 55  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 2 min,共 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。

用 1%琼脂糖凝胶电泳对 PCR 扩增产物进行检测后,送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序,将所得序列在 NCBI 上进行 BLAST 分析比对,利用 MEGA 5.0 构建系统发育树<sup>[24]</sup>。

## 2.3 酶的分离纯化

### 2.3.1 硫酸铵分级沉淀

将提取出的粗酶液采用硫酸铵分级沉淀的方法,4  $^{\circ}$ C 静置 2 h,10 000 r/min 离心 20 min 后,收集 60%饱和度下的沉淀,并将活性沉淀物用尽可能少的浓度为 50 mmol/L 的 Tris-HCl (pH 7.5)缓冲液溶解,于 4  $^{\circ}$ C 下置于相同缓冲液中透析过夜,经 Ba<sup>2+</sup>检测至透析液中无白色沉淀后,冷冻干燥,于 -20  $^{\circ}$ C 保存备用。

### 2.3.2 DEAE-52 离子交换层析

取 0.2 g 冻干后的酶粉复溶于 5 mL 缓冲液中,充分溶解后用 0.45  $\mu$ m 的滤膜过滤,上样于事先用缓冲液平衡好的 DEAE-52 离子交换层析柱(2.6 $\times$ 30 cm),用含 0-1 mol/L NaCl 的 Tris-HCl 缓冲液进行连续梯度洗脱,流速为 0.5 mL/min,每管 5 mL 将洗脱液全部回收,测定各管的酶活力和蛋白含量,合并酶

活力高的管数,4  $^{\circ}$ C 下透析除盐并冷冻干燥后,于 -20  $^{\circ}$ C 保存备用。

### 2.3.3 Sephadex G-200 凝胶过滤层析

照 2.3.2 中的方法,将样品上样于 Sephadex G-200 凝胶过滤层析柱(1.6 $\times$ 60 cm),用含 0.1 mol/L NaCl 的 Tris-HCl 缓冲液洗脱该柱,流速为 0.2 mL/min,每管收集 3 mL,合并酶活力高的管数,透析除盐并冷冻干燥后,于 -20  $^{\circ}$ C 保存备用。

### 2.3.4 酶的纯度鉴定及相对分子量测定

采用 SDS-PAGE 电泳对纯化后的酶进行纯度鉴定,将已知分子量的标准蛋白的迁移率对分子量的对数作图得标准曲线,纯化产物在相同条件下电泳,根据其相对迁移率在标准曲线上求得分子量。

## 2.4 酶学性质的研究

### 2.4.1 ALP 的适宜作用条件

依照 2.1.3 中 ALP 酶活力测定的方法,设定一系列温度(27、32、37、42、47、52、57、62、67  $^{\circ}$ C),其他条件均保持不变,测定不同温度下酶的相对活力,以酶活力最高值为 100%。

将 ALP 分别置于 50 mmol/L 不同 pH 值(pH 7.0、7.5、8.0、8.5)的 Tris-HCl 缓冲液和 10 mmol/L 不同 pH 值(pH 9.0、9.5、10.0、10.5、11.0)的碳酸缓冲液中,其他条件均保持不变,测定不同 pH 值下酶的相对活力,以酶活力最高值为 100%。

### 2.4.2 ALP 的稳定性

将酶液置于不同温度下保温 1 h,取出后迅速冷却至室温,以不保温时的酶活力为 100%,计算不同温度下酶的相对活力,以此确定该酶的热稳定性。

将酶液置于不同 pH 值下,于 4  $^{\circ}$ C 放置 1 h,以酶活力最高值为 100%,计算不同 pH 值下酶的相对活力,以此确定该酶的 pH 稳定性。

### 2.4.3 金属离子和 EDTA 对 ALP 的影响

向酶反应体系中加入不同浓度(1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mmol/L)的 6 种金属离子和 EDTA 与酶液等体积混合,测定酶活力,以不加入金属离子和 EDTA 时的酶活力为 100%,计算在不同条件下酶的相对活力。

#### 2.4.4 米氏常数 $K_m$ 和最大反应速率 $V_{max}$ 的测定

配制不同浓度(3.33、1.67、1.11、0.83、0.67、0.56 mmol/L)的 p-NPP, 在 37 °C、pH 9.5 的条件下测定不同浓度下的酶促反应速度, 采用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法, 分别以 p-NPP 和速度的倒数为横、纵坐标, 计算出 ALP 的米氏常数  $K_m$  值和最大反应速率  $V_{max}$ 。

### 3 结果与分析

#### 3.1 产碱性磷酸酶乳酸杆菌的筛选

##### 3.1.1 产酶菌株的初筛

通过平板涂布法和革兰氏染色、过氧化氢酶试验, 对样品中分离得到的菌株进行筛选, 共计 78 株乳酸菌。在 MRS 固体培养基中, 将浸有底物溶液的滤纸片分别置于这 78 株乳酸菌上, 根据显色是否明显对菌株的产酶能力进行初步判定, 共筛选出 16 株产酶菌株, 其中 B4、H2、Q7、R5、T22、Z23 显色明显, 结果见表 1。

表 1 产酶菌株的初筛

Table 1 Preliminary screening of enzyme producing strains

Strains number	Result
B4	+++
B12	++
D3	+
E8	+
H2	+++
H15	++
J20	++
P9	+
P17	+
Q7	+++
R5	+++
R14	+
T22	+++
W19	++
Z5	++
Z23	+++

注: +++: 黄色极为明显; ++: 黄色较为明显; +: 稍有黄色, 但不明显。

Note: +++: Yellow is very obvious; ++: Yellow is more obvious; +: Slightly yellow, but not obvious.

#### 3.1.2 产酶菌株的复筛

通过对菌株 B4、H2、Q7、R5、T22、Z23 进行酶活测定, 结果见图 1, 各菌株胞内酶活均大于胞外酶活, 其中菌株 Z23 胞内酶活最高, 为 2.35 U/mL, 因此选取菌株 Z23 为本次实验的供试菌株, 用于后续研究。

### 3.2 菌株鉴定

#### 3.2.1 形态学及生理生化鉴定

菌株 Z23 在 MRS 固体培养基上生长良好, 菌落直径 1–2 mm, 菌落呈圆形, 颜色为乳白色, 表面光滑不透明(图 2), 革兰氏染色呈紫色, 为革兰氏阳性菌, 镜检为长杆或短杆状的规则杆菌(图 3), 因此可初步鉴定为乳杆菌。

菌株 Z23 经乳酸菌生化鉴定条等生理生化鉴定实验, 结果如表 2 所示, 参照《伯杰细菌鉴定手册》<sup>[23]</sup> 中对乳杆菌的鉴定结果, 初步鉴定为鼠李糖乳杆菌。

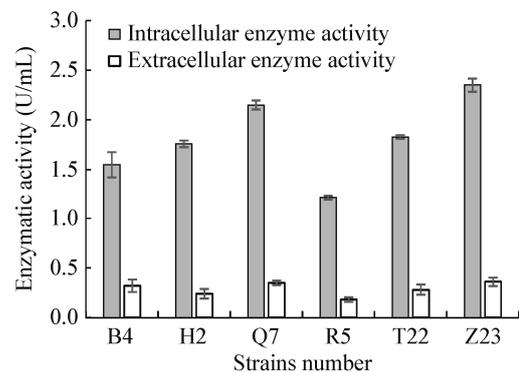


图 1 产酶菌株的复筛

Figure 1 Complex sieve of enzyme-producing strain



图 2 菌株 Z23 菌落形态

Figure 2 Colony morphology of strain Z23



图3 菌株 Z23 革兰氏染色镜检结果(100×)  
Figure 3 Gram staining microscopy results of strain Z23 (100×)

### 3.2.2 分子生物学鉴定

通过菌株 Z23 的 16S rRNA 基因序列分析得知序列长度为 1 473 bp, 经 PCR 扩增后, 在 1 500 bp 左右出现特异性条带, 这与电泳结果相一致。

利用 MEGA 5.0 构建系统发育树, 如图 4 所示, 菌株 Z23 与 *Lactobacillus rhamnosus* ATCC7469 聚类, 亲缘关系最近, 相似性达 100%, 结合菌株形态学及生理生化特征, 将菌株 Z23 鉴定为鼠李糖乳杆菌。

### 3.3 乳杆菌 ALP 的分离纯化结果

乳杆菌 ALP 粗酶液经 DEAE-52 离子交换层析

表 2 菌株 Z23 生理生化鉴定实验结果

Table 2 Physiological and biochemical identification test results of strain Z23

Biochemical reaction	Results
Aesculin	+
Maltose	+
Salicin	+
Sucrose	+
Inulin	+
Raffinose	-
Cellobiose	+
Mannitol	+
Sorbitol	+
Starch hydrolysis test	-
Catalase test	-
Arginine ammonia production test	-

注: +: 阳性; -: 阴性。

Note: +: Positive; -: Negative.

纯化后, 结果如图 5 所示, 通过含 0–1 mol/L NaCl 的 Tris-HCl 缓冲液梯度洗脱后, 得到一个活力峰, 集中在 23–27 管区域, 且在 280 nm 下测得较高的光密度值, 因此将该活力峰下的酶液收集于同一管中, 冻干浓缩后备用。

将上述 DEAE-52 纯化冻干后的样品溶解, 上样于 Sephadex G-200 凝胶层析柱, 经 0.1 mol/L NaCl 的 Tris-HCl 缓冲液洗脱后, 测定其酶活和 280 nm 下的蛋白含量, 如图 6 所示, 出现一个活力峰, 集中

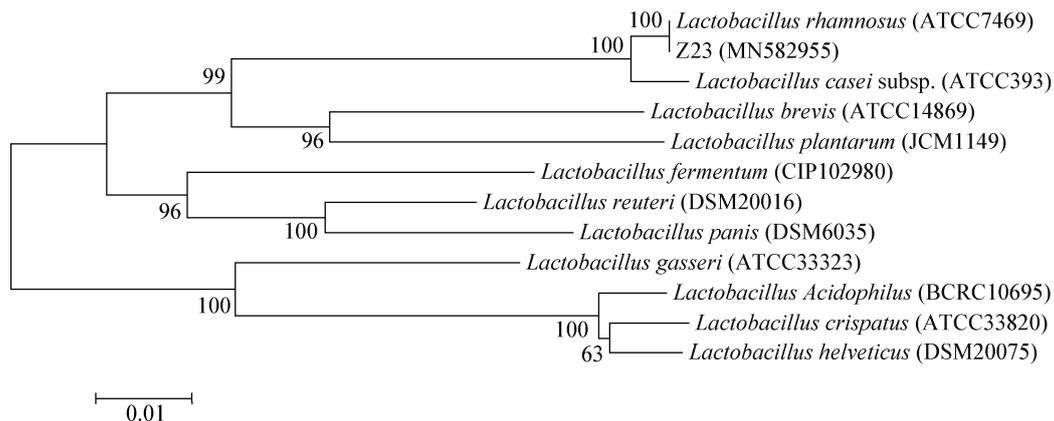


图 4 菌株 Z23 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树

Figure 4 The phylogenetic tree of strain Z23 based on 16S rRNA gene sequence

注: 分支上的数字表示构建系统发育树时 1 000 次计算形成该节点的百分比; 分支的长度代表进化距离, 系数为 0.01; 括号内的序号为已知菌株的 GenBank 登录号。

Note: Numbers at the branch nodes are bootstrap values, expressed as percentages of 1 000 replicates; The length of branch represents the evolutionary distance and the coefficient is 0.01; The number in parentheses is the GenBank accession number of a known strain.

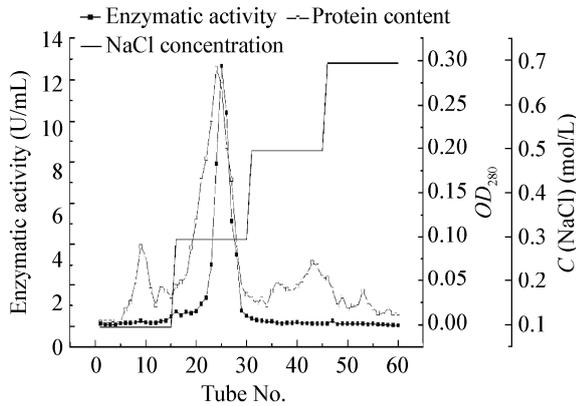


图5 DEAE-52 离子交换层析  
Figure 5 DEAE-52 ion-exchange chromatography

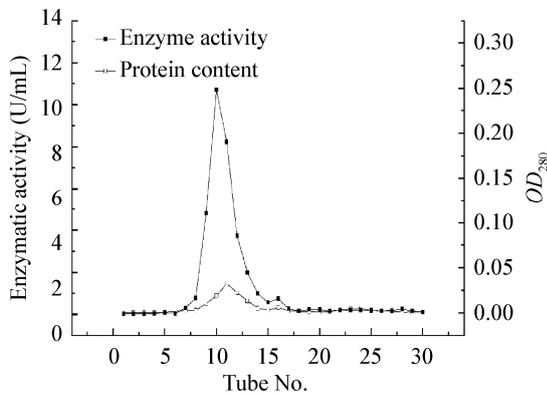


图6 Sephadex G-200 凝胶过滤层析  
Figure 6 Sephadex G-200 chromatography

在 9-12 管区域, 因此将该活力峰下的酶液收集于同一管中, 冻干浓缩后备用。

将菌株超声破碎后, 提取出的粗酶液经硫酸铵分级沉淀、DEAE-52 离子交换层析、Sephadex G-200 凝胶过滤层析纯化后, 结果如表 3 所示, 最终得到的乳杆菌 ALP 纯化产物比活力为 180.27 U/mg, 纯化倍数为 48.37, 酶活回收率为 17.05%。

表 3 乳杆菌 ALP 的纯化结果  
Table 3 Purification of ALP from *Lactobacillus*

Purification steps	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purification (fold)	Recovery (%)
Crude extract	998.40	3 721.42	3.73	1	100.00
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> precipitation	338.06	2 454.84	7.26	1.95	65.97
DEAE-52	32.04	1 036.25	34.60	9.28	29.76
Sephadex G-200	3.52	634.56	180.27	48.37	17.05

### 3.4 ALP 的纯度鉴定及分子量测定

纯化后的 ALP 经 SDS-PAGE 检测显示为单一条带, 结果如图 7 所示, 表明纯化后的 ALP 达到了电泳纯, 蛋白标准曲线  $y = -1.577 1x + 2.582 5$  ( $R^2 = 0.977 6$ ), 可得出 ALP 的亚基相对分子质量为 46.7 kD。

### 3.5 酶学特性分析

#### 3.5.1 ALP 的最适温度及 pH

由图 8A 可知, 在温度为 37 °C 时, 酶活力数值最大; 在温度为 32-47 °C 时, 酶的相对活力可达 80% 以上; 当温度超过 47 °C 时, 酶相对活力急剧下降; 当温度超过 62 °C, 酶相对活力仅有 30% 左右。因此, ALP 的最适作用温度在 32-47 °C 之间, 其中 37 °C 为最佳作用温度。

由图 8B 可知, 在 pH 7.0-9.5 之间, 酶的相对活力逐渐增大; 当 pH 为 9.5 时, 酶活力数值最大, 且当 pH 在 9.0-10.0 之间时, 酶的相对活力可达 90% 以上。因此, ALP 的最适作用 pH 在 9.0-10.0 之间, 其中 pH 9.5 为最佳作用 pH。

#### 3.5.2 ALP 的热稳定性及 pH 稳定性

经不同温度保温后的酶液, 结果如图 9A 所示, 以 4 °C 下保存的酶活力最高值为 100%, 其余条件下测得的酶活力换算成酶相对活力。随着温度升高, 酶相对活力逐渐降低; 当温度超过 47 °C 时, 酶相对活力急剧下降; 当温度超过 62 °C 时, 酶相对活力小于 20%, 且逐渐趋于平稳, 由此可见酶在低温情况下有较好的稳定性, 高温条件下稳定性差且易失活。

经不同 pH 放置后的酶液, 结果如图 9B 所示, 在 pH 为 7.0-11.0 之间时, 酶相对活力呈现先增

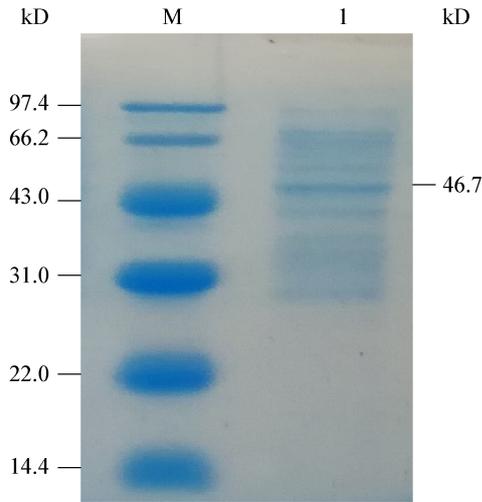


图7 ALP的SDS-PAGE电泳图

Figure 7 SDS-PAGE electrophoresis of ALP

注: M: 蛋白质 Marker; 1: Sephadex G-200 层析后的酶液.

Note: M: Protein Marker; 1: The enzyme liquid after Sephadex G-200 chromatography.

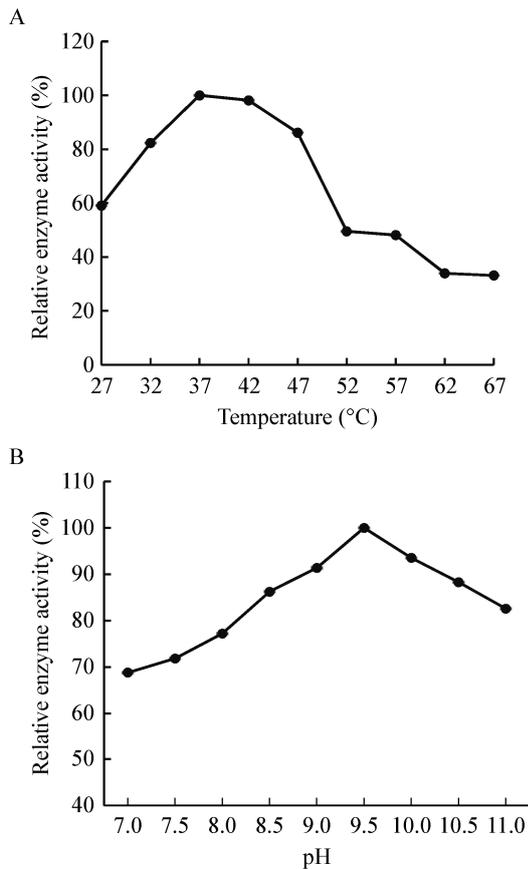


图8 ALP的最适温度及pH

Figure 8 Optimum temperature and pH of ALP

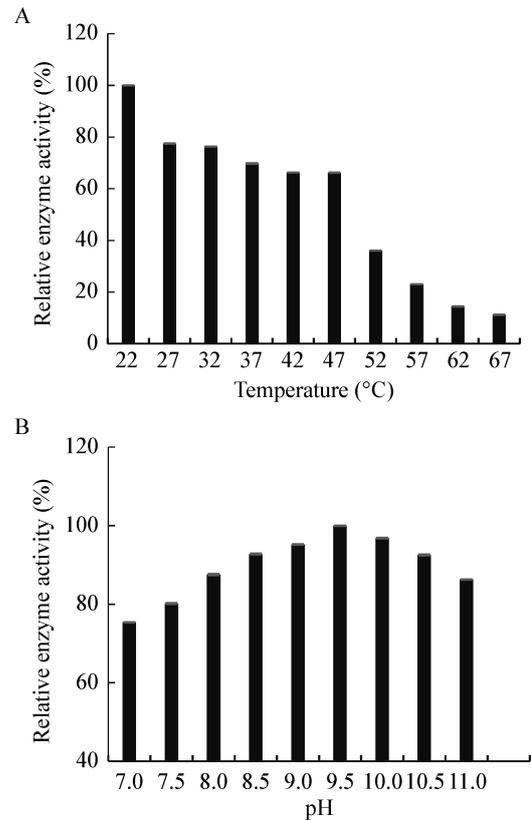


图9 温度及pH对ALP稳定性的影响

Figure 9 Effects of temperature and pH on ALP stability

大后减小的趋势,当pH为9.5时,酶活力数值最大,酶活最为稳定,且pH在9.0-10.0之间时,酶的相对活力均在95%以上,因此,ALP的稳定性在pH9.0-10.0之间,其中pH为9.5时稳定性最佳。

### 3.5.3 金属离子和EDTA对ALP的影响

向体系中加入不同浓度的金属离子和EDTA,结果如表4所示,随着浓度的增大, $Mg^{2+}$ 和 $K^+$ 对ALP有明显的激活作用, $Ba^{2+}$ 和 $Cu^{2+}$ 在低浓度时对ALP有激活作用,当浓度超过3 mmol/L时有抑制作用, $Ca^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 和EDTA对ALP有明显的抑制作用,其中EDTA对ALP的抑制作用最为明显。

### 3.5.4 ALP的动力学常数 $K_m$ 和 $V_{max}$ 的测定

以不同浓度的p-NPP为底物,与ALP反应的Lineweaver-Burk双倒数曲线结果见图10,拟合曲线的线性回归方程为 $y=2.7634x+0.8089$  ( $R^2=0.9962$ ),其中 $-1/K_m$ 为横轴截距, $1/V_{max}$ 为纵轴截距,计算得 $K_m$ 值为3.42 mmol/L, $V_{max}$ 值为1.24 mmol/(L·min)。

表 4 不同浓度金属离子和 EDTA 对 ALP 酶活力的影响(相对活力, %)

Table 4 Effects of different concentration of metal ions and EDTA on ALP enzyme activity (relative activity, %)

Metal ion and EDTA	Concentration (mmol/L)				
	1	2	3	4	5
Mg <sup>2+</sup>	148.03±0.002	154.21±0.023	162.50±0.004	170.22±0.012	176.03±0.005
K <sup>+</sup>	135.96±0.004	137.5±0.005	142.84±0.002	144.26±0.016	154.49±0.013
Ba <sup>2+</sup>	121.21±0.005	111.38±0.002	106.43±0.011	99.96±0.003	90.28±0.004
Cu <sup>2+</sup>	121.40±0.022	118.65±0.034	102.53±0.007	83.29±0.059	72.75±0.006
Ca <sup>2+</sup>	76.97±0.018	60.91±0.024	57.22±0.005	55.06±0.021	50.14±0.003
Zn <sup>2+</sup>	38.20±0.001	31.32±0.012	30.90±0.004	29.07±0.015	27.93±0.028
EDTA	35.57±0.006	21.49±0.011	16.67±0.008	11.25±0.014	6.49±0.055

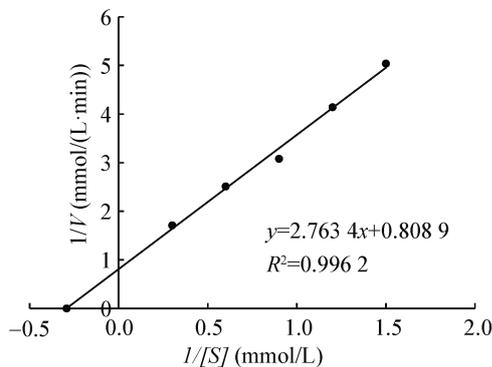


图 10 ALP 的 Lineweaver-Burk 双倒数曲线图

Figure 10 Lineweaver-Burk double reciprocal graph of ALP

#### 4 讨论

本文以蒙古国酸马奶样品中筛选的 78 株乳酸菌为研究对象, 以对硝基苯酚磷酸二钠为底物的平板筛选法筛选出 6 株产 ALP 活力较强的乳酸菌, 通过测定酶活力大小对菌株复筛, 最终得到一株酶活力最高(2.35 U/mL)的菌株 Z23。通过菌株形态观察、生理生化鉴定及 16S rRNA 基因序列比对分析, 最终将其鉴定为鼠李糖乳杆菌, 大于已报道文献中鼠李糖乳杆菌 ALP 的酶活。王政<sup>[25]</sup>对接种 5 种乳酸菌的脱脂乳中磷酸酶活性大小测定表明, 活性最高的为保加利亚乳杆菌、嗜热链球菌及鼠李糖乳杆菌, 依次为 0.081、0.0150、0.097 U/mL。高俊乾等<sup>[26]</sup>利用选择性平板初筛和酶活测定复筛, 从土壤中筛选到一株高产 ALP 的菌株 S377, 利用传统鉴定方法最终鉴定为醋杆菌奥尔兰亚种(*A. orleanensis*)。Zhou 等<sup>[27]</sup>利用有机磷培养基, 结合平板计数法和活性鉴定法, 筛选出 6 株产 ALP 的细菌, 并研究了

ALP 与太湖沉积物中丰度的关系。因此, 利用传统鉴定方法, 将细菌选择性分离培养与活性测定相结合的方法, 有利于人们对环境中产 ALP 细菌种类及功能特性的认识。

针对不同物种的特定组织部位, 提取和纯化 ALP 的方法也有所差异。据研究报道, Asencio 等<sup>[28]</sup>利用 Triton X-114 溶解细胞组分, 进而释放螺旋藻膜中的 ALP, 并可除去粗提物中的色素。李红卫等<sup>[29]</sup>利用正丁醇抽提、硫酸铵沉淀、DEAE-52 离子交换柱层析、Sephacryl S-200 凝胶过滤层析法, 从猪肌肉组织中提取并纯化 ALP, 最终纯化倍数可达 57.34。本实验经一系列纯化过程后, 成功分离纯化 ALP, 比活力为 180.27 U/mg, 纯化倍数为 48.37, 酶活回收率为 17.05%。本研究在实验操作中以往纯化过程中超滤浓缩步骤去掉, 采用真空冷冻干燥后的酶粉上样纯化, 有效减少了酶活损失, 但在操作过程中由于温度控制较为严格, 纯化收集时为保证纯度, 只收集了活力峰的部分, 因而仍有一部分酶活损失, 纯化后的酶经 SDS-PAGE 电泳检测为单一条带, 亚基相对分子质量为 46.7 kD。舒彦芳等<sup>[30]</sup>从嗜盐古菌中纯化的 ALP 分子量大小为 45 kD, 与本文分析结果较为一致, 但低于节肢动物<sup>[31]</sup>、昆虫<sup>[32]</sup>以及哺乳动物中的 ALP<sup>[14,29]</sup>。因此通过与实验数据对比, 细菌中 ALP 的分子量低于动物中 ALP 的分子量。

由于生物体进化和基因选择性表达, 不同来源的 ALP 在酶学性质上有着很大差异。本文实验结果表明, ALP 的最适温度为 37 °C, 在低温下稳定性

高,随着温度升高,酶的相对活力逐渐降低,最适 pH 值为 9.5,在 pH 值为 9.0–10.0 之间时,酶的相对活力可达 90%以上,其原因可能是高温条件和过酸或过碱的条件均会使酶的构象发生变化,导致酶本身变性,影响酶与底物的结合能力,从而丧失催化功能<sup>[33]</sup>。ALP 为金属酶,金属离子对维持其分子构相和活性有着密切关系,本实验研究表明  $Mg^{2+}$  和  $K^+$  对 ALP 有明显激活作用,  $Ba^{2+}$  和  $Cu^{2+}$  在低浓度时对 ALP 有激活作用,当浓度超过 3 mmol/L 时有抑制作用,此外  $Ca^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$  和 EDTA 对 ALP 均有强烈的抑制作用,这与 Chu 等<sup>[34]</sup> 研究结果不同。此外,在酶促反应过程中,  $K_m$  值作为酶的特征性物理量,值大小与酶的性质有关,  $K_m$  值越小,底物与酶的亲和力越大,以不同浓度的 p-NPP 为底物,测得酶的  $K_m$  值为 3.42 mmol/L,  $V_{max}$  值为 1.24 mmol/(L·min),说明底物与 ALP 有较强的亲和力。

## 5 结论

酶可以调节代谢、控制生物体内各项生理活动,细菌的新陈代谢也在酶的催化作用下进行。本实验从蒙古国酸马奶样品中分离筛选出一株产碱性磷酸的乳杆菌,经生理生化鉴定及分子生物学鉴定为鼠李糖乳杆菌,酶活力达 2.35 U/mL。通过硫酸铵分级沉淀、DEAE-52 离子交换层析、Sephadex G-200 凝胶过滤层析,从中成功分离纯化 ALP,比活力为 180.27 U/mg,纯化倍数为 48.37,酶活回收率为 17.05%,SDS-PAGE 电泳检测为单一条带,其亚基相对分子质量为 46.7 kD。该酶的最适温度为 37 °C,最适 pH 为 9.5,在低温情况下和 pH 9.0–10.0 之间稳定性高。 $Mg^{2+}$  和  $K^+$  对 ALP 有明显激活作用,  $Ba^{2+}$  和  $Cu^{2+}$  在低浓度时对 ALP 有激活作用,高浓度时有抑制作用,  $Ca^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$  和 EDTA 对 ALP 有强烈的抑制作用,以不同浓度的 p-NPP 为底物,测得酶的  $K_m$  值为 3.42 mmol/L,  $V_{max}$  值为 1.24 mmol/(L·min)。本实验结果为蒙古国酸马奶中益生菌的开发利用提供了新的微生物资源,同时也为今后碱性磷酸酶的工业化生产提供了切实可行的理论依据。

## REFERENCES

- [1] Liu Y, Tan YF, Li H. Screening, cloning and enzymatic characterization of phosphohydrolase from soil[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2014, 43(3): 70-74 (in Chinese)  
刘悦, 覃炎峰, 李荷. 土壤磷酸酯酶基因的筛选、克隆及酶学性质分析[J]. 河南农业科学, 2014, 43(3): 70-74
- [2] Simopoulos TT, Jencks WP. Alkaline phosphatase is an almost perfect enzyme[J]. Biochemistry, 1994, 33(34): 10375-10380
- [3] Moss AK, Hamarneh SR, Mohamed MMR, et al. Intestinal alkaline phosphatase inhibits the proinflammatory nucleotide uridine diphosphate[J]. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 2013, 304(6): G597-G604
- [4] Mukaiyama K, Kamimura M, Uchiyama S, et al. Elevation of serum alkaline phosphatase (ALP) level in postmenopausal women is caused by high bone turnover[J]. Aging Clinical and Experimental Research, 2015, 27(4): 413-418
- [5] Ooi K, Shiraki K, Morishita Y, et al. High-molecular intestinal alkaline phosphatase in chronic liver diseases[J]. Journal of Clinical Laboratory Analysis, 2007, 21(3): 133-139
- [6] Sardiwal S, Magnusson P, Goldsmith DJA, et al. Bone alkaline phosphatase in CKD-mineral bone disorder[J]. American Journal of Kidney Diseases, 2013, 62(4): 810-822
- [7] Shi Y, Yang M, Liu L, et al. GTP as a peroxidase-mimic to mediate enzymatic cascade reaction for alkaline phosphatase detection and alkaline phosphatase-linked immunoassay[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2018, 275: 43-49
- [8] Ma CB. Highly sensitive detection of alkaline phosphatase using molecular beacon probes based on enzymatic polymerization[J]. Molecular and Cellular Probes, 2012, 26(3): 113-115
- [9] Ram B, Fartyal D, Sheri V, et al. Characterization of *phoA*, a bacterial alkaline phosphatase for phi use efficiency in rice plant[J]. Frontiers in Plant Science, 2019, 10: 37
- [10] Zhang H. Evaluation and application of methods in detecting the activity of alkaline phosphatase and lactoperoxidase in dairy products[D]. Lanzhou: Master's Thesis of Lanzhou University, 2019 (in Chinese)  
张昊. 乳及乳制品中碱性磷酸酶和乳过氧化物酶活性检测方法的评估及应用[D]. 兰州: 兰州大学硕士学位论文, 2019
- [11] Kim EE, Wyckoff HW. Reaction mechanism of alkaline phosphatase based on crystal structures. Two-metal ion catalysis[J]. Journal of Molecular Biology, 1994, 218(2): 449-464
- [12] Gao MC, Li XM, Zhang RX, et al. Study on prokaryotic expression, purification and enzymatic activity of alkaline phosphatase from *Escherichia coli* ATCC 25922[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2010, 41(8): 48-53 (in Chinese)  
高明春, 李雪萌, 张润祥, 等. 大肠杆菌菌株 ATCC 25922 碱性磷酸酶的原核表达、纯化及其活性研究[J]. 东北农业大学学报, 2010, 41(8): 48-53
- [13] Chen JB, Liu WC. Isolation and characterization of alkaline phosphatase from liver of muscovite duck[J]. Fujian Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2013, 35(3): 15-17 (in Chinese)  
陈建斌, 刘伟昌. 番鸭肝脏碱性磷酸酶的分离及部分性质

- 研究[J]. 福建畜牧兽医, 2013, 35(3): 15-17
- [14] Ma JH, Xue FL, Wang YF, et al. Purification and some characterization of phosphatase from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. Fisheries Science, 2014, 33(8): 498-502 (in Chinese)  
马金虎, 薛福来, 王一帆, 等. 草鱼肝脏碱性磷酸酶的分离纯化及性质的研究[J]. 水产科学, 2014, 33(8): 498-502
- [15] Sui JQ. Purification and characterization of alkaline phosphatase from *Ruditapes philippinarum*[D]. Qingdao: Master's Thesis of Ocean University of China, 2012 (in Chinese)  
随建强. 菲律宾蛤仔碱性磷酸酶的分离纯化和性质研究[D]. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 2012
- [16] Wu CJ, Dai CW, Li S, et al. Isolation and identification of a bacteriocin-producing lactic acid bacterium from Anhui local pickled vegetable[J]. China Food Additives, 2019, 30(7): 112-120 (in Chinese)  
武昌俊, 戴陈伟, 李舜, 等. 一株安徽本地泡菜中产细菌素乳酸菌的筛选与鉴定[J]. 中国食品添加剂, 2019, 30(7): 112-120
- [17] Ghosh T, Beniwal A, Semwal A, et al. Mechanistic insights into probiotic properties of lactic acid bacteria associated with ethnic fermented dairy products[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 502
- [18] Liu L, Li PL. Complete genome sequence of *Lactobacillus paraplantarum* L-ZS9, a probiotic starter producing class II bacteriocins[J]. Journal of Biotechnology, 2016, 222: 15-16
- [19] Widyastuti Y, Rohmatussolihat, Febrisiantosa A. The role of lactic acid bacteria in milk fermentation[J]. Food and Nutrition Sciences, 2014, 5(4): 42817
- [20] Zhou XW. A study on microbial degradation of organophosphorus pesticides in some fermented foods[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Agricultural University, 2014 (in Chinese)  
周欣伟. 发酵食品中有机磷农药的微生物降解作用的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学硕士学位论文, 2014
- [21] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1/2): 248-254
- [22] Dong XZ, Cai MY. Manual of Determinate Bacteriology[M]. Beijing: Science Press, 2001: 370-410 (in Chinese)  
东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 370-410
- [23] Buchanan RE, Gibbons NE. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology[M]. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, trans. 8th ed. Beijing: Science Press, 1984: 797-823 (in Chinese)  
布坎南 RE, 吉本斯 NE. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 中国科学院微生物研究所, 译. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984: 797-823
- [24] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2731-2739
- [25] Wang Z. Microbial degradation of organophosphorus pesticides in fermented foods[D]. Wuhan: Master's Thesis of Hubei University of Technology, 2017 (in Chinese)  
王政. 发酵食品中有机磷农药的微生物降解研究[D]. 武汉: 湖北工业大学硕士学位论文, 2017
- [26] Gao JQ, Huang JY, Zhang JQ, et al. Isolation and identification of a high-yield *Alkaline phosphatase* strain and its optimization of medium formula[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(12): 124-131 (in Chinese)  
高俊乾, 黄俊元, 张君奇, 等. 一株高产碱性磷酸酶菌株的分离鉴定及其培养基配方优化[J]. 食品工业科技, 2018, 39(12): 124-131
- [27] Zhou C, Song CL, Huang DZ, et al. Isolation and characterization of organic phosphorus-mineralizing bacteria in sediment of a Chinese large shallow eutrophic lake (Lake Taihu)[J]. Geomicrobiology Journal, 2011, 28(8): 660-666
- [28] Asencio AD, Morte A, García-Carmona F, et al. Partial purification and characterization of a calcium-dependent alkaline phosphatase from the cyanobacterium *Arthrospira platensis*[J]. Journal of Phycology, 2012, 48(2): 347-354
- [29] Li HW, Wang KP, Wu Y, et al. Purification and properties of alkaline phosphatase from pig muscle tissue[J]. Journal of Hefei University of Technology (Natural Science), 2016, 39(4): 560-565 (in Chinese)  
李红卫, 王开萍, 吴娱, 等. 猪肌肉组织中碱性磷酸酶的纯化及特性研究[J]. 合肥工业大学学报: 自然科学版, 2016, 39(4): 560-565
- [30] Shu YF, Ma XH, Du SY, et al. Isolation, identification of a alkaline phosphatase-producing *Archaea*[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2015, 43(12): 6-9 (in Chinese)  
舒彦芳, 马小花, 杜诗熠, 等. 一株产碱性磷酸酶菌株的鉴定及酶的纯化[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(12): 6-9
- [31] Homaei A. Purification and biochemical properties of highly efficient alkaline phosphatase from *Fenneropenaeus merguensis* brain[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2015, 118: 16-22
- [32] Da Silva G, Ramos LFC, dos Santos Seckler H, et al. Biochemical characterization of digestive membrane-associated alkaline phosphatase from the velvet bean caterpillar *Anticarsia gemmatilis*[J]. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 2019, 102(1): e21591
- [33] Han W, Xu XQ, Ye XY, et al. Purification and characterization of the alginate lyase isolated from marine[J]. Journal of Fuzhou University (Natural Science Edition), 2018, 46(1): 136-142 (in Chinese)  
韩伟, 许鑫琦, 叶秀云, 等. 海洋来源褐藻胶裂解酶分离纯化及酶学性质研究[J]. 福州大学学报: 自然科学版, 2018, 46(1): 136-142
- [34] Chu YH, Yu XX, Jin X, et al. Purification and characterization of alkaline phosphatase from lactic acid bacteria[J]. RSC Advances, 2019, 9(1): 354-360