



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20200037

数字出版日期: 2020-07-06; 数字出版网址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/12.1355.N.20200703.1741.002.html>

磷脂酶 D 在枯草芽胞杆菌中表达及酶法催化 合成磷脂酰丝氨酸的研究

毛淑红, 马晓雨, 张朝晖, 王晓蕊, 王 珊, 路福平, 刘逸寒

(工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津市工业微生物重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 磷脂酰丝氨酸(PS)因具备改善记忆、缓解精神压力等作用,常被应用于功能性食品和药物生产中. 相比于提取法,以磷脂酶 D(PLD)催化转酯反应合成 PS 具有更为环境友好、安全高效、易于操作等优点. 本研究利用枯草芽胞杆菌表达并分泌来源于郝氏链霉菌(*Streptomyces halstedii*) TCCC21102 的 PLD, 转酯酶活力达 2.53 U/mL; 经酶学性质分析表明,其最适温度为 40 °C、最适 pH 为 5.5; 利用该 PLD 在构建的单水相体系催化大豆磷脂酰胆碱(PC)合成 PS, 当反应 24 h 时 PS 产率达到最高,为 42.6%. 本研究为酶法制备新食品原料 PS, 实现其在功能性食品和制药行业中的应用奠定了基础.

关键词: 枯草芽胞杆菌; 磷脂酶 D; 异源表达; 酶学性质; 磷脂酰丝氨酸

中图分类号: Q814.4 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2020)05-0001-07

Expression of Phospholipase D in *Bacillus subtilis* and Enzymatic Synthesis of Phosphatidylserine

MAO Shuhong, MA Xiaoyu, ZHANG Zhaohui, WANG Xiaorui,
WANG Shan, LU Fuping, LIU Yihan

(Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Phosphatidylserine (PS) is often used in functional foods and medicines because of its positive effects on improving memory and relieving mental stress. Compared with the extraction method, phosphatidyl acylation catalyzed by phospholipase D (PLD) has more advantages, as the process is environment friendly, safer, more efficient, and ease to operate. In this study, *Bacillus subtilis* was used to efficiently express and secrete PLD *Streptomyces halstedii* TCCC21102, and the transphosphatidyl activity of PLD reached 2.53 U/mL. The PLD showed the highest activity at 40 °C and pH 5.5. The yield of PS was up to 42.6% after 24 h reaction catalyzed by PLD when soybean phosphatidylcholine (PC) was used as the substrate. PS production in aqueous water system has a good application prospect in functional food and pharmaceutical industry.

Key words: *Bacillus subtilis*; phospholipase D; heterologous expression; enzymatic properties; phosphatidylserine

磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS), 又称为丝氨酸磷脂、二酰甘油酰磷酸丝氨酸^[1], 是大脑细胞膜的重要组成部分之一^[2], 其在激活脑细胞的过程中起着非常重要的作用^[3]. PS 能够显著缓解压力、加速恢复用脑疲劳、平衡情绪^[4]; 还可以与 DHA 相互促

进吸收, 有助于保护中枢神经系统^[5], 从而促进胎儿智力的发育. 此外, PS 是一种有效的运动营养补充品, 可以对抗运动引起的压力, 并通过减缓运动引起的皮质醇水平升高来防止生理恶化^[6]. 因此, PS 被誉为继胆碱及“脑黄金”DHA 后, 又一大新兴的“智能

收稿日期: 2020-03-13; 修回日期: 2020-04-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21878233); 天津市自然科学基金资助项目(18JCYBJC91400)

作者简介: 毛淑红(1977—), 女, 河南新郑人, 副教授; 通信作者: 刘逸寒, 教授, lyh@tust.edu.cn

营养素”^[7],是一种相对安全、潜在有效的治疗剂^[8],可应用于功能食品和制药行业中。

但是,PS 在动植物中含量较少,制备困难.传统生产方法是从动物器官中提取(如牛脑等^[9]),但由于传染性疾病(如牛海绵状脑病)的存在使之暗含一定的安全隐患^[10].目前,主要采用以大豆为原料进行提取,但原料利用率及产率较低^[11].因此,利用磷脂酶 D(phospholipase D, PLD)催化磷脂酰胆碱(PC)与 L-丝氨酸转酯反应,实现酶法合成 PS,成为其制备的一个新思路.磷脂酶是在生物体中存在的能水解甘油磷脂的一类酶,其中 PLD 可以特异地作用于磷脂分子中的磷酸二酯键,被广泛用于甘油磷脂的改造^[12].大多数 PLD 的来源菌株为链霉菌属^[13],主要由土壤中筛选获得^[14].除此之外,棒状杆菌(*Corynebacterium*)^[15]、大肠杆菌(*Escherichia coli*)^[16]、副流感嗜血杆菌(*Haemophilus parainfluenza*)^[17]以及假单胞菌(*Pseudomonas*)^[18]等微生物中也相继发现 PLD 的存在.与动植物来源 PLD 相比,微生物尤其是链霉菌来源的 PLD 具有较强的底物耐受特性、较好的底物专一性以及较高的催化活性,因而备受关注.

为进一步提高 PLD 的生产水平,减少纯化步骤,降低生产成本,国内外对链霉菌 PLD 的研究主要集中在 PLD 的异源表达方面.Hatanaka 等^[19]获得了来源于间隔链霉菌(*Streptomyces septatus*) TH-2 的 PLD,并分析其水解活性,发现水解活性的最适温度为 50℃,最适 pH 为 5.0; Nakazawa 等^[20]分离得到一株链霉菌 10-3,其具有较高的 PLD 水解活性,最适温度及 pH 分别为 50℃和 7.5;可见,围绕链霉菌来源 PLD 的性能分析主要体现在水解活性上.另外, Tao 等^[21]将郝氏链霉菌(*S. halstedii*)来源 PLD 在不同的宿主中进行表达,发现以变铅青链霉菌(*S. lividans*)为宿主同源表达时,PLD 活性可达 69.12 U/mL,而在大肠杆菌(*Escherichia coli*)和毕赤酵母(*Pichia pastoris*)中 PLD 表达活力较低,分别为 1.21 U/mL 和 2.36 U/mL; Hou 等^[22]利用谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)异源表达来源于链霉菌属(*Streptomyces* sp.)的 PLD,经优化表达后使 PLD 活力达到 1.90 U/mL,为初始活力的 7.6 倍.但是到目前为止,围绕 *pld* 基因在枯草芽胞杆菌中表达的报道仍相对较少.枯草芽胞杆菌作为重要的工业发酵宿主菌株之一,具有食品级安全性^[23]、无内毒素、可胞外分泌外源蛋白^[24]等优点,以其作为表达宿主实现 PLD 的分泌表达,对于 PS 的高效制备具有重

要意义.

因此,本研究利用枯草芽胞杆菌表达系统,对实验室前期筛选获得的郝氏链霉菌(*Streptomyces halstedii*) TCCC21102 来源 PLD 进行异源表达;在对其转酯活性的酶学性质研究基础上,构建单水相酶法催化合成 PS 反应体系,旨在为 PS 在食品及制药行业的应用提供基础理论依据.

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株与质粒

具有枯草芽胞杆菌密码子偏爱性的来源于郝氏链霉菌(*Streptomyces halstedii*) TCCC21102 的 *pld* 基因由苏州金维智生物科技有限公司合成.宿主枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*) WB600 和表达载体 pWB980 均保存于本实验室.

1.1.2 主要试剂

限制性内切酶 *Hind* III、限制性内切酶 *Bam* H I、T4 DNA 连接酶,宝生物工程(大连)有限公司;卡那霉素抗性,北京索莱宝科技有限公司;磷脂酰丝氨酸, Sigma-Aldrich 公司;大豆卵磷脂(PC, ≥90%)、L-丝氨酸,上海源叶生物科技有限公司;质粒小量快速提取试剂盒、细菌 DNA 提取试剂盒、切胶回收试剂盒, OMEGA Bio-Tek 公司;其他试剂均为分析纯.

1.1.3 培养基

枯草芽胞杆菌的培养使用 LB 液体培养基(g/L):蛋白胨 10,酵母提取物 5,氯化钠 10,卡那霉素抗性(终质量浓度为 100 μg/mL), pH 7.0.

1×SP 盐培养基(g/L): K₂HPO₄·3H₂O 18.34, KH₂PO₄ 6.0, (NH₄)₂SO₄ 2.0, MgSO₄·7H₂O 0.2, 柠檬酸钠 1.0.

SP I 培养基(100 mL): 1×SP 盐培养基 97.6 mL, 酪蛋白水解物(0.05 g/mL) 400 μL, 酵母汁(0.1 g/mL) 1 mL, 葡萄糖(0.5 g/mL) 1 mL.

SP II 培养基(100 mL): 由 1×SP 盐培养基 99 mL, CaCl₂·7H₂O(0.014 7 g/mL) 500 μL, MgCl₂·6H₂O(0.101 7 g/mL) 500 μL, 用于枯草芽胞杆菌 WB600 菌株感受态的制备以及转化.

1.2 方 法

1.2.1 重组质粒的构建

将合成的 *pld* 基因及载体 pWB980 均采用限制性内切酶 *Hind* III、*Bam* H I 进行双酶切,利用

Solution I Kit 进行连接,得到重组质粒 pWB980-*pld* 并测序比对成功。

1.2.2 重组质粒转化枯草芽胞杆菌

枯草芽胞杆菌 WB600 接种单菌落于 LB 液体培养基,培养过夜后转入 SP I 培养基,培养至对数生长末期转入 SP II 培养基,37 °C、100 r/min 摇床培养 1.5 h; 10 mmol/L EGTA 20 μL 加入至上述 SP II 培养基的菌体中,37 °C、100 r/min 摇床培养 10 min; 加入上述连接好的重组质粒 pWB980-*pld*, 100 r/min 培养 30 min, 调节转速至 220 r/min, 继续培养 1.5 h; 离心去上清液后涂布于含有 100 μg/mL 卡那霉素(Kan)的 LB 筛选平板, 筛选阳性转化子进行验证, 获得枯草芽胞杆菌重组菌株 WB600/pWB980-*pld*。

1.2.3 重组 PLD 的表达

将构建完成的枯草芽胞杆菌 WB600/pWB980-*pld* 在含有卡那霉素抗性的液体 LB 培养基中 37 °C、220 r/min 进行发酵培养, 每 12 h 进行取样, 4 °C、4 000 r/min 离心后收集上清液, 进行重组 PLD (rPLD) 活力检测, 每组 3 个平行, 将最高活力设为 100%。同时, 选取发酵 24 h 的上清液进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测。

1.2.4 转酯酶活力检测

含有 1.3 mmol/L PC、3.9 mmol/L L-丝氨酸和 10 mmol/L CaCl₂ 的 1 mL 0.2 mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 5.5)于 40 °C 保温 10 min, 加入稀释的发酵上清液(1 mL), 在 40 °C 下反应 30 min。

样品检测采用高效液相色谱进行检测, 色谱条件: 色谱柱为硅胶柱(5 μm, 2.1 mm × 150 mm), 流动相为 V(乙腈): V(甲醇): V(磷酸) = 475: 25: 4, 流量 0.30 mL/min, 紫外检测器检测波长 205 nm, 柱温箱温度 25 °C。

转酯酶活力定义: 在 1 min 内可催化 PC 生成 1 μmol PS 所需的酶量。PLD 活力(U/mL)按照式(1)计算。

$$\text{PLD活力} = \frac{m_{\text{ps}} \cdot n}{M_{\text{ps}} \cdot t} \quad (1)$$

式中: m_{ps} 为 PS 的产量, μg; n 为稀释倍数; M_{ps} 为 PS 的摩尔质量, 792.081 g/mol; t 为反应时间, min。

1.2.5 重组 PLD 酶学性质分析

rPLD 经纯化后(纯化方法参考文献[25]), 分别进行转酯酶活力的最适温度和最适 pH 测定。

rPLD 最适温度测定: 在 20、30、40、50、60 °C 下进行酶活力测定。

rPLD 最适 pH 测定: 在 pH 为 4.0、5.0、5.5、6.0、7.0、8.0 下进行酶活力测定。

每组实验分别进行 3 个平行, 酶活力最高活性设定为 100%, 测定相对酶活力。

1.2.6 PS 合成条件优化

PS 合成体系为 6 mL, 所用缓冲液为 0.2 mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 5.5), 其中分别含有不同物质的量比的 PC 和 L-丝氨酸(1:1、1:2、1:3、1:4、1:5), 即 PC 浓度为 1.3 mmol/L, L-丝氨酸浓度分别为 1.3、2.6、3.9、5.2、6.5 mmol/L, 10 mmol/L CaCl₂, 4 U/mL 的 rPLD, 经 40 °C 反应 12 h 后, 通过测定 PS 产率以确定最佳底物物质的量比; 在最佳底物物质的量比条件下, 于 6 mL 0.2 mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 5.5)中分别加入不同酶量(1、2、3、4、5、6 U/mL)的 rPLD, 在 40 °C 下反应 12 h, 通过测定 PS 产率以确定最佳 rPLD 用量; 在最佳底物物质的量比和 rPLD 用量条件、6 mL 0.2 mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 5.5)的催化体系中, 分别在 40 °C 下反应 6、12、24、36、48、60 h, 通过测定 PS 产率以确定最佳反应时间。

利用 PS 标准曲线按照式(2)计算 PS 产率。

$$\text{PS产率} = \frac{\text{反应后PS的量(mol)}}{\text{反应前PC的量(mol)}} \times 100\% \quad (2)$$

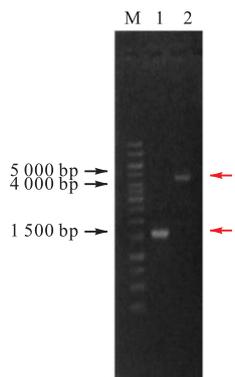
2 结果与分析

2.1 重组质粒的构建

根据枯草芽胞杆菌密码子的偏爱性, 经密码子优化后的 *S. halstedii* TCCC21102 来源的 *pld* 基因全长为 1 542 bp, 与优化前的原始基因相比, 序列有 464 个碱基发生改变, 并且 GC 含量由 71.3% 下降到 44.3%; 载体 pWB980 全长为 4 735 bp。如图 1 所示, *pld* 基因及 pWB980 质粒经 *Hind* III 和 *Bam* H I 酶切后, 条带大小在 1 500 bp(泳道 1)和 4 700 bp(泳道 2)左右。

2.2 重组菌株的构建

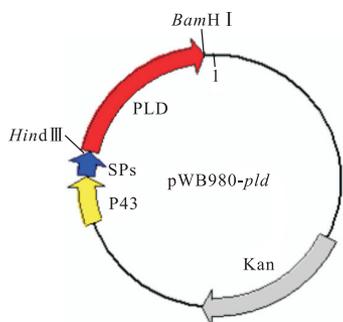
pld 基因与 pWB980 经酶切连接后构建获得 pWB980-*pld*, 其质粒图谱如图 2(a) 所示。经化学转化法转化入枯草芽胞杆菌 WB600 中, 经过卡那霉素抗性筛选, 提取重组质粒 pWB980-*pld*(图 2(b), 泳道 1), 经 *Hind* III 和 *Bam* H I 双酶切后获得大小约为 1 500 bp 和 4 700 bp 的两条片段(图 2(b), 泳道 2), 说明重组菌株 WB600/pWB980-*pld* 构建成功。



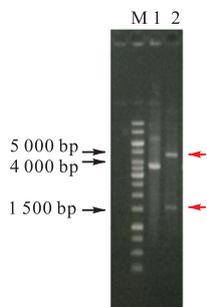
M. DNA marker; 1. *pld* 基因; 2. pWB980

图1 *pld* 基因及 pWB980 载体酶切图

Fig. 1 Restriction analysis of *pld* gene and pWB980 vector



(a) 重组质粒 pWB980-*pld*



M. DNA marker; 1. pWB980-*pld* 质粒; 2. pWB980-*pld* 双酶切产物

(b) 酶切鉴定

图2 重组质粒 pWB980-*pld* 的质粒图谱以及酶切鉴定

Fig. 2 DNA map and restriction analysis of the recombinant plasmid pWB980-*pld*

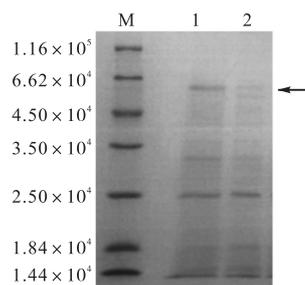
2.3 重组 PLD 的表达

2.3.1 重组 PLD 的表达与纯化及其酶活力测定

收集重组菌株 WB600/pWB980-*pld* 的 24 h 发酵上清液,以原始菌株 WB600 作为对照,进行 SDS-PAGE 检测,如图 3 所示. rPLD 相对分子质量约为 5.50×10^4 (泳道 1),而对照菌株未见相应条带(泳道 2),表明 rPLD 成功在枯草芽胞杆菌中分泌表达.

2.3.2 重组 PLD 最佳表达时间的确定

不同发酵时间的 rPLD 活力如图 4 所示.



M. marker; 1. 重组菌株; 2. 野生型菌株

图3 重组菌株分泌表达 rPLD 电泳分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of extracellular rPLD of the recombinant strain

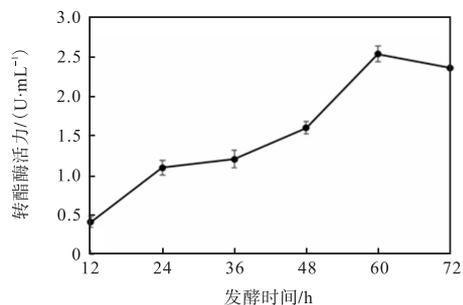


图4 不同发酵时间的 rPLD 活力

Fig. 4 rPLD activity at different fermentation time

由图 4 可知:在 12 ~ 60 h,随着发酵时间的延长,rPLD 活力逐渐增加;当超过 60 h 后,rPLD 活力有所下降.因此,选择重组菌株 WB600/pWB980-*pld* 发酵 60 h,以实现 rPLD 的高效表达分泌,此时酶活力达到 2.53 U/mL.已报道的以 *Escherichia coli*、*Pichia pastoris*^[21]以及 *Corynebacterium glutamicum*^[22]作为宿主细胞的 PLD 表达水平分别为 1.21 U/mL、2.36 U/mL 以及 1.90 U/mL,上述活性主要是水解活性,直接测定转酯活性的报道相对较少,但转酯活性直接体现 PLD 催化生产 PS 的能力.有研究报道以 *Pichia pastoris*^[26]为宿主细胞获得 PLD 的转酯酶活力可达 2.37 U/mL.本研究利用枯草芽胞杆菌作为宿主细胞,其表达链霉菌来源 PLD 的转酯活性有一定提高,且其对于 PS 的安全生产具有非常重要的意义.因此进一步开发与研究基于枯草芽胞杆菌表达与调控工具,将有助于提高 PLD 的生产水平.

2.4 pH 与温度对重组 PLD 活性的影响

温度与 pH 对转酯酶活力的影响如图 5 所示.由图 5 可知:rPLD 在 pH 和温度分别为 5.5 和 40 °C 时其转酯活性最高.与之相近的是 Moon 等^[27]从土壤中分离得到菌株 *Streptomyces* sp. p821,其所产 PLD 的转酯活性的最适温度为 30 °C,最适 pH 为 5.0;而

Simkhada 等^[28]对 *S. olivochromogenes* 中 PLD 进行酶学性质研究,发现其转酯活性的最适温度高达 75 °C,最适 pH 为 8.0. 由此可见,不同来源的链霉菌 PLD 之间的性质存在一定差异,且相同来源的链霉菌 PLD,其转酯活性和水解活性的最适作用条件也

并不相同,如 Simkhada 等^[28]发现来源于 *S. olivochromogenes* 中 PLD 在 55 °C、pH 为 6.0 时水解活性最高. 因此,对 rPLD 的转酯活性条件进行测定,有助于进行其催化 PC 和 L-丝氨酸转酯合成 PS 的研究.

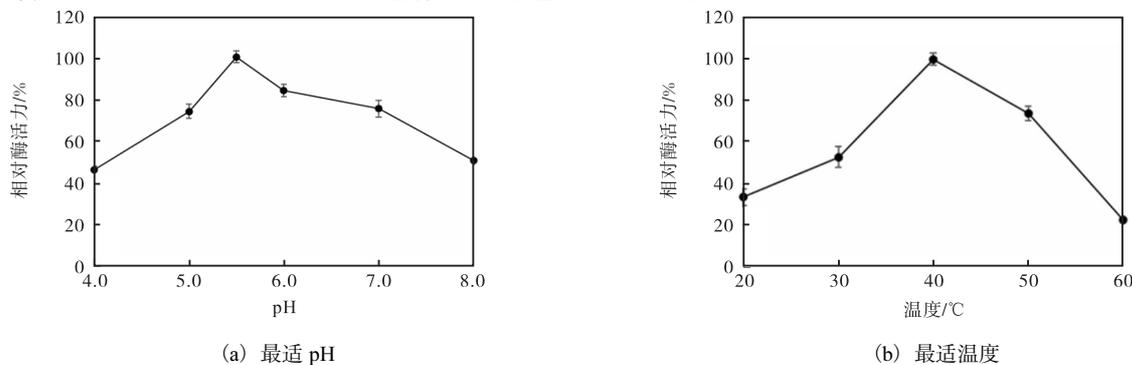


图 5 温度与 pH 对转酯酶活力的影响

Fig. 5 Effects of temperature and pH on transphosphatidyl enzyme activity

2.5 rPLD 催化合成 PS 的工艺优化

底物的物质的量比是可逆反应中使反应平衡向所需产物移动的重要变量^[29-30]. 在 PLD 催化合成 PS 的转酯反应过程中,水在作为反应介质的同时还会作为 L-丝氨酸的竞争性底物,生成水解产物磷脂酸. 因此,可通过过量的 L-丝氨酸使反应平衡向转酯方向转移,以达到提高转酯率和降低水解率的目的,从而提升 PS 产率. rPLD 单水相催化合成 PS 的条件优化结果如图 6 所示.

由图 6(a)可知:随着 PC 与 L-丝氨酸物质的量比的增加,PS 的产率逐渐增加;当物质的量比为 1 : 3 时,PS 的产率达到最高,为 30%;随着底物物质的量比的继续增加,转化率并没有显著提高. 因此,选择 PC 与 L-丝氨酸底物物质的量比为 1 : 3,用于催

化反应的进一步优化.

由图 6(b)可知,PS 产率与酶的添加量显著相关:当酶量由 1 U/mL 逐渐增加至 5 U/mL 时,PS 产率随之增加至 35.1%;在酶添加量为 6 U/mL 时,几乎保持不变. 因此,考虑到反应效率和酶的成本,选择 5 U/mL 为最佳添加量.

在 PC 与 L-丝氨酸物质的量比为 1 : 3、rPLD 为 5 U/mL、温度为 40 °C、pH 为 5.5、0.2 mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液 6 mL 的反应体系中,分析随着时间进程的 PS 产量变化. 由图 6(c)可知:0 ~ 24 h,随着时间的增加,PS 的产率有所增长,最高可达 42.6%;24 h 后,PS 产率下降. 分析其原因可能是由于转酯反应过程中存在着产物被水解及逆向转酯的情况^[31].

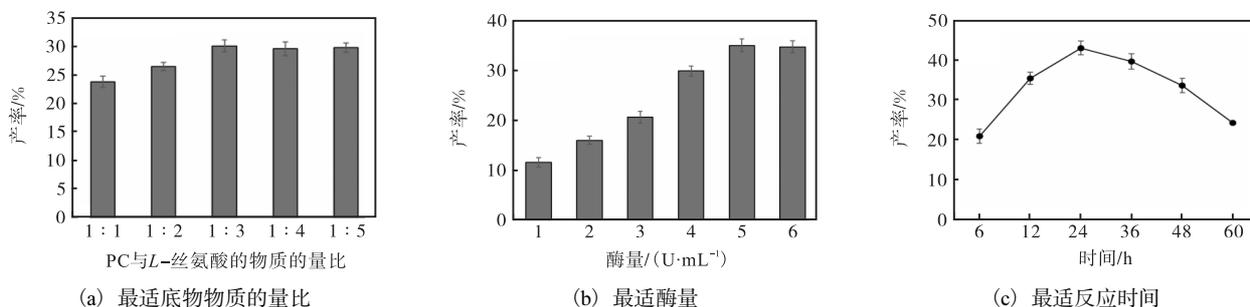


图 6 rPLD 单水相催化合成 PS 的条件优化

Fig. 6 Optimization of the transphosphatidyl reaction system

目前,转酯合成 PS 的反应体系介质较多,如有机溶剂氯仿^[16]、 γ -戊内酯^[29]、二甲基四氢呋喃^[32]、乙醚^[33]、正己烷^[34]、乙酸乙酯^[35]等,在有机相-水相双相催化体系中进行转酯反应后,PS 产率基本可达到

90% 以上,但是由于有机溶剂存在毒性,因此不利于 PS 的规模制备及其在食品工业中的应用;利用 Triton X-100 等表面活性剂^[36]催化转酯反应,虽然 PS 的产率能够达到 94.7%,但造成其分离困难. 因

此,利用单水相进行酶法催化合成 PS, 尽管产率与使用上述介质相比较低,但该工艺操作简单安全,进一步利用酶的固定化技术^[37],提高酶的利用效率,将有利于降低生产成本,实现 PS 的规模制备. 此外,改变催化介质,如加入绿色无毒的新兴溶剂——低共熔溶剂^[38]等也可有助于提高产率.

3 结 论

利用枯草芽胞杆菌的表达分泌系统,实现 *S. halstedii* TCCC21102 来源 PLD 的分泌表达,在摇瓶发酵水平转酯酶活力可达 2.53 U/mL;进一步对其 PLD 的转酯活性酶学性质进行分析,其最适反应温度为 40 °C,最适反应 pH 为 5.5;经单水相催化反应体系优化,在 40 °C、pH 5.5 的条件下,Ca²⁺ 浓度 10 mmol/L,大豆 PC 与 L-丝氨酸的物质的量比 1 : 3, rPLD 添加量 5 U/mL,反应 24 h, PS 产率可以达到 42.6%. 本研究为 PLD 的异源表达及其酶法合成新资源食品 PS 提供了技术支撑,为 PS 在我国食品及医药工业中的应用提供了基础依据.

参考文献:

- [1] Delwaide P J, Gyselynck A M, Hurllet A, et al. Double-blind randomized controlled study of phosphatidylserine in senile demented patients[J]. *Acta Neurologica Scandinavica*, 1986, 73 (2) : 136–140.
- [2] Sakai M, Yamatoya H, Kudo S. Pharmacological effects of phosphatidylserine enzymatically synthesized from soybean lecithin on brain functions in rodents[J]. *Journal of Nutritional Science & Vitaminology*, 1996, 42(1) : 47–54.
- [3] 饶雪娥, 林伟铃. 磷脂酰丝氨酸的应用研究进展[J]. *海峡药学*, 2015, 9(11) : 9–11.
- [4] Liu B, Hassler D F, Smith G K, et al. Purification and characterization of a membrane bound neutral pH optimum magnesium-dependent and phosphatidylserine-stimulated sphingomyelinase from rat brain[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273 : 34472–34479.
- [5] Hirayama S, Terasawa K, Rabeler R, et al. The effect of phosphatidylserine administration on memory and symptoms of attention-deficit hyperactivity disorder: A randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial [J]. *Journal of Human Nutrition & Dietetics*, 2013, 27(s2) : 284–291.
- [6] Starks M A, Starks S L, Kingsley M, et al. The effects of phosphatidylserine on endocrine response to moderate intensity exercise[J]. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 2008, 5 (1) : 11–16.
- [7] Lin D, Zhang T, Che H, et al. DHA-enriched phosphatidylcholine and DHA-enriched phosphatidylserine improve age-related lipid metabolic disorder through different metabolism in the senescence accelerated mouse[J]. *European Journal of Lipid Science & Technology*, 2018, 120(6) : 1700490–1700511.
- [8] Casado V, Mart N D, Torres C, et al. Phospholipases in food industry: A review[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2012, 861 : 495–523.
- [9] Choi H D, Han J J, Yang J H. Effect of soy phosphatidylserine supplemented diet on skin wrinkle and moisture in vivo and clinical trial[J]. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 2013, 56(2) : 227–235.
- [10] Duan Z Q, Hu F. Efficient synthesis of phosphatidylserine in 2-methyltetrahydrofuran[J]. *Journal of Biotechnology*, 2013, 163 (1) : 45–49.
- [11] Liu Y H, Zhang T, Qiao J, et al. High-yield phosphatidylserine production via yeast surface display of phospholipase D from *Streptomyces chromofuscus* on *Pichia pastoris*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(23) : 5354–5360.
- [12] 梁丽, 常明, 刘睿杰, 等. 磷脂酶研究进展[J]. *食品工业科技*, 2013, 34(4) : 393–396.
- [13] Yamaguchi T, Gocho S. Production and properties of alkaline dextranase from a newly isolated *Brevibacterium*[J]. *Agricultural & Biological Chemistry*, 1973, 37(11) : 2527–2533.
- [14] Sun Y Y, Zhang J Q, Wang S J. Screening, identification and optimization of fermentation conditions of a high-yield chitosanase-producing strain of *Bacillus*[J]. *Food Science*, 2009, 30(15) : 164–168.
- [15] Haynes J A, Tkalcevic J, Nisbet I T. Production of an enzymatically inactive analog of phospholipase D from *Corynebacterium pseudotuberculosis*[J]. *Gene*, 1992, 119(1) : 119–121.
- [16] Zhang Y N, Lu F P, Chen G Q, et al. Expression, purification, and characterization of phosphatidylserine synthase from *Escherichia coli* K-12 in *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,

- 2009, 57(1): 122–126.
- [17] Ono Y, White D C. Cardiolipin-specific phospholipase D of *Haemophilus parainfluenzae* II characteristics and possible significance[J]. *Journal of Bacteriology*, 1970, 104(2): 712–718.
- [18] Spencer C T, Brown H A. Biochemical characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* phospholipase D[J]. *Biochemistry*, 2015, 54(5): 1208–1218.
- [19] Hatanaka T, Negishi T, Kubota-Akizawa M, et al. Purification, characterization, cloning and sequencing of phospholipase D from *Streptomyces septatus* TH-2[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2002, 31(3): 233–241.
- [20] Nakazawa Y, Sagane Y, Kikuchi T, et al. Purification, biochemical characterization, and cloning of phospholipase D from *Streptomyces racemochromogenes* strain 10-3[J]. *Protein Journal*, 2010, 29(8): 598–608.
- [21] Tao X, Zhao M, Zhang Y, et al. Comparison of the expression of phospholipase D from *Streptomyces halstedii* in different hosts and its over-expression in *Streptomyces lividans*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2019, 366(5): 51–68.
- [22] Hou H J, Gong J S, Dong Y X, et al. Phospholipase D engineering for improving the biocatalytic synthesis of phosphatidylserine[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2019, 42(7): 1185–1194.
- [23] Caspers M, Brockmeier U, Degering C, et al. Improvement of Sec-dependent secretion of a heterologous model protein in *Bacillus subtilis* by saturation mutagenesis of the N-domain of the AmyE signal peptide[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 86(6): 1877–1885.
- [24] Juturu V, Wu J C. Microbial xylanases: Engineering, production and industrial applications[J]. *Biotechnology Advances*, 2012, 30(6): 1219–1227.
- [25] Liu Y, Huang L, Fu Y, et al. A novel process for phosphatidylserine production using a *Pichia pastoris* whole-cell biocatalyst with overexpression of phospholipase D from *Streptomyces halstedii* in a purely aqueous system[J]. *Food Chemistry*, 2019, 274: 535–542.
- [26] 黄琳, 马杰莹, 王爽, 等. *Streptomyces septatus* 磷脂酶 D 在毕赤酵母中的重组表达及酶学性质分析[J/OL]. *食品科学*: 1–12[2020–04–10]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20191212.1157.052.html>.
- [27] Moon M W, Lee J K, Oh T K, et al. Gene cloning of *Streptomyces* phospholipase D P821 suitable for synthesis of phosphatidylserine[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2006, 16(3): 408–413.
- [28] Simkhada J R, Lee H J, Jang S Y, et al. A novel alkaline and thermostable phospholipase D from *Streptomyces olivochromogenes*[J]. *Biotechnology Letters*, 2009, 31(3): 429–435.
- [29] Duan Z Q, Hu F. Highly efficient synthesis of phosphatidylserine in the eco-friendly solvent gamma-valerolactone[J]. *Green Chemistry*, 2012, 14(6): 1581–1583.
- [30] Shuang S, Cheong L Z, Zheng G, et al. Phospholipase D(PLD) catalyzed synthesis of phosphatidyl-glucose in biphasic reaction system[J]. *Food Chemistry*, 2012, 135(2): 373–379.
- [31] 苏一兰, 文国松, 李唯奇. 重要生化反应“转移磷脂酰反应”的研究进展[J]. *植物分类与资源学报*, 2010, 32(5): 409–419.
- [32] Duan Z Q, Hu F. Efficient synthesis of phosphatidylserine in 2-methyltetrahydrofuran[J]. *Journal of Biotechnology*, 2013, 163(1): 45–49.
- [33] Lim S K, Choi J W, Chung M H, et al. Production and characterization of extracellular phospholipase D from *Streptomyces* sp. YU100[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2002, 12(2): 189–195.
- [34] Hirche F, Koch M H J, Stephan K, et al. The influence of organic solvents on phospholipid transformations by phospholipase D in emulsion systems[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1997, 20(6): 453–461.
- [35] 韩海霞. 磷脂酶 D 的制备及其在磷脂酰丝氨酸合成中的应用[D]. 无锡: 江南大学, 2014.
- [36] Zhang X, Li B, Wang J, et al. High-yield and sustainable production of phosphatidyl-serine in purely aqueous solutions via adsorption of phosphatidylcholine on Triton X-100-modified silica[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(49): 10767–10774.
- [37] Dittrich N, Ulbrich-Hofmann R. Transphosphatidylation by immobilized phospholipase D in aqueous media[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2001, 34(3): 189–194.
- [38] Yang S L, Duan Z Q. Insight into enzymatic synthesis of phosphatidylserine in deep eutectic solvents[J]. *Catalysis Communications*, 2016, 82: 16–19.