

研究报告

DOI:10.14188/j.ajsh.20250207001

蜡样芽胞杆菌产磷脂酶D分离提取及酶学性质研究

代书玲,刘影,范丽平,陈晶,徐莉*

(上海农林职业技术学院,上海 201699)

摘要: 微生物所产磷脂酶D(phospholipase D,PLD)作为生物催化资源,在磷脂改性及稀有磷脂制备中具有重要作用。通过盐析和柱层析对前期筛选的蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*)所产PLD进行分离提取,通过改变温度、pH等条件对该菌所产PLD的酶学性质进行研究,采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis,SDS-PAGE)测定其分子量,以磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine,PC)和L-丝氨酸为底物研究其转磷脂酰基反应特性。结果表明,盐析后的沉淀经2步层析,达到电泳纯,比酶活为40.06 U/mg;该菌所产PLD水解酶最适反应pH为8.0,pH在7.0~10.0时,酶活相对稳定;最适反应温度为50℃,50℃及以下酶活稳定;Triton X-100和脱氧胆酸钠对酶活有促进作用,乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid,EDTA)对水解酶活性完全抑制,Mg²⁺对酶活有促进作用,Mn²⁺和Co²⁺对酶活有抑制作用;分子量在32 kDa左右。转磷脂酰基反应研究表明,该PLD具有良好的转磷脂酰基酶活性,且基本没有副产物磷脂酸(phosphatidic acid,PA)生成,具有潜在的工业应用价值。

关键词: 蜡样芽胞杆菌;磷脂酶D;分离提取;酶学性质

中图分类号: Q815

文献标志码: A

文章编号: 2096-3491(2025)04-0371-08

Isolation, extraction and enzymatic properties of phospholipase D produced by *Bacillus cereus*

Dai Shuling, Liu Ying, Fan Liping, Chen Jing, Xu Li*

(Shanghai Vocational College of Agriculture and Forestry, Shanghai 201699, China)

Abstract: Phospholipase D (PLD) serves as a valuable biocatalytic resource with significant industrial potential for phospholipid modification and rare phospholipid production. In this study, PLD produced by the previously screened *Bacillus cereus* was isolated and extracted by salting-out and column chromatography. The enzymatic properties of PLD produced by this bacterium were studied by changing conditions such as temperature and pH. Its molecular weight was determined by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Using phosphatidylcholine (PC) and L-serine as substrates, the characteristics of the transphosphatidylation reaction were studied. The results showed that after salting out, the precipitate achieved electrophoretic purity after two-step chromatography, with a specific enzyme activity of 40.06 U/mg. The optimum reaction pH for the hydrolase of PLD produced by this bacterium was 8.0, and the enzyme activity was relatively stable when pH was from 7.0 to 10.0. The optimum reaction temperature was 50 °C, and the enzyme activity was stable at 50 °C and below. Triton X-100 and sodium deoxycholate promoted the enzyme activity, while ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) completely inhibited the hydrolase activity. Mg²⁺ promoted the enzyme activity, and Mn²⁺ and Co²⁺ inhibited the enzyme activity. The molecular weight was approximately 32 kDa. The

收稿日期: 2025-02-07 修回日期: 2025-03-07 接受日期: 2025-03-10

作者简介: 代书玲(1971-),女,副教授,硕士,研究方向为微生物发酵技术,E-mail: 14204@shafc.edu.cn

* 通讯联系人: 徐莉(1985-),女,副教授,主要从事微生物学方面的研究及教学工作,E-mail: 211503@shafc.edu.cn

基金项目: 上海农林职业技术学院科研课题(KY2-0000-20-12)

引用格式: 代书玲,刘影,范丽平,等. 蜡样芽胞杆菌产磷脂酶D分离提取及酶学性质研究[J]. 生物资源, 2025, 47(4): 371-378.

Dai Shuling, Liu Ying, Fan Liping, et al. Isolation, extraction and enzymatic properties of phospholipase D produced by *Bacillus cereus* [J]. Biotic Resources, 2025, 47(4): 371-378.

study on the transphosphatidylase reaction indicates that this PLD has good transphosphatidylase activity with almost no production of the by-product phosphatidic acid (PA), demonstrating potential industrial application value.

Key words: *Bacillus cereus*; phospholipase D; isolation and extraction; enzymatic properties

0 引言

磷脂酶D(phospholipase D, PLD EC 3.1.4.4)是一类特殊的酯键水解酶,除能催化磷脂水解反应外,在一定条件下还能催化转磷脂酰基反应。如PLD能催化磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine, PC)水解生成磷脂酸(phosphatidic acid, PA)和胆碱,在有其他含羟基化合物(如丝氨酸、肌醇、甘油等)存在时,还能催化PA转移到丝氨酸、肌醇、甘油等生成磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)、磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol, PI)、磷脂酰甘油(phosphatidylglycerol, PG)等^[1-5]。利用PLD催化的转磷脂酰基反应,可以进行稀有磷脂制备、药物合成等,被广泛应用于食品、保健品、医药等领域。如PS有助于改善记忆和认知能力,提高大脑机能,防治老年痴呆症、抑郁症及缓解精神压力,是极具开发潜力的功能性保健原料^[6]。韩国食药局允许宣传PS有增强记忆功能,美国、日本及中国均已允许PS作为营养强化剂添加到食品中^[7]。PLD在自然界分布广泛,在病毒、细菌、酵母、丝状真菌、植物和动物中都有分布^[8-12]。其中,微生物来源的PLD因具有较低的底物特异性和更强的转磷脂酰基能力而备受关注^[13]。目前报道的产PLD的微生物已有20多个属,分子量从16 kDa到120 kDa不等^[14]。国外对微生物产的PLD研究相对成熟,国内这方面的研究基本停留在实验室水平。随着应用研究的不断深入,对微生物PLD生化特征多样性的需求也越来越迫切,微生物资源因其多样性及易于规模化培养的特点,成为PLD的重要来源。

作者前期筛选到一株产PLD的蜡样芽胞杆菌,并对其发酵条件进行了优化^[15-16],其展现出良好的产酶性能,具备发酵周期短、培养成本低的特点。本文分离提取了该菌所产的PLD,并对其酶学性质进行研究,旨在挖掘该微生物资源在磷脂改性领域的应用潜力,为拓展生物资源的工业应用范围提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

菌种:蜡样芽胞杆菌,实验室筛选保藏。

卵黄LB(Luria-Bertani)固体培养基:在LB固体培养基中添加20 g/L卵黄;硼砂卵黄固体培养

基:氯化钠6.6 g/L、硼酸10.9 g/L、硼砂1.9 g/L、琼脂粉20 g/L、卵黄20 g/L, pH值7.2~7.4。

发酵培养基:卵黄10 g/L、蛋白胨15 g/L、牛肉粉2 g/L、七水硫酸镁1 g/L、氯化钠3 g/L, pH值7.0~8.0。

PLD活性分析试剂盒(比色法):供应商Bio vision; LB固体培养基、蛋白胨、牛肉粉、琼脂粉:青岛海博生物有限公司;二乙氨基乙基(Diethylaminoethyl, DEAE)琼脂糖凝胶CL-6B和琼脂糖凝胶CL-6B购于上海源叶生物科技有限公司;卵黄取自新鲜鸡蛋,其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

恒温恒湿培养箱、恒温摇床:上海一恒科学仪器有限公司; Infinite 200 PRO多功能酶标仪:瑞士帝肯有限公司;美国PALL Microsep Advance离心浓缩管MCP010C41;超滤膜YM30, Millipore Corp. Bedford, MA, USA;电泳仪BIO-RAD 1658001 Mini-PROTEAN小型蛋白垂直电泳槽、PowerPac Basic电源,产地美国;KH-3000型薄层色谱扫描仪:上海科哲生化科技有限公司;GF254薄层层析板:烟台华阳新材料科技有限公司。

1.3 PLD分离纯化

1.3.1 发酵液获取

取活化后的斜面菌种1~2环,接种到发酵培养基中,36℃,200 r/min摇瓶培养10 h即得发酵液。

1.3.2 粗酶液制备

将发酵液在6 000 r/min条件下离心15 min,取上清液,即粗酶液。

1.3.3 PLD粗提取

将100 mL粗酶液分别加入不同饱和度硫酸铵盐析,4℃冰箱过夜,冷冻离心机10 000 r/min离心20 min,分别测定上清液中剩余酶活,确定最佳盐析浓度,每个条件做3个平行,结果表示为平均值±偏差。

1.3.4 PLD高度纯化

首先,用10 mM Tris-HCl缓冲液(pH 8.0)对盐析后的沉淀透析,并用超滤膜浓缩;然后将其加到琼脂糖CL-6B柱(60 cm×1.6 cm)上,0.5 mL/min流速洗脱,合并PLD比活性较高的组分,浓缩后加到DEAE琼脂糖CL-6B柱(80 cm×1.6 cm)上,用10 mM Tris-HCl缓冲液(pH 8.0)预平衡。用含0~

400 mmol/L 氯化钠的 10 mM Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 线性洗脱, 流速为 0.5 mL/min, 平行 3 次实验, 结果表示为平均值±偏差。

1.3.5 PLD 活力测定

采用硼砂卵黄平板牛津杯法和酶联比色法^[17]测定 PLD 水解活力, 具体如下: 无菌操作将灭过菌的牛津杯等距放置在硼砂卵黄平板上, 将不同条件处理后的酶液按一定比例稀释后, 取 100 μ L 加入牛津杯, 36 $^{\circ}$ C 温育 24 h, 测量产生的乳白色晕圈直径, 用其表示酶活力。为使结果更具可比性, 在同一个平板上对同一条件的样品进行实验测量。该方法成本低廉, 应用广泛。

酶联比色法: 酶联比色法是利用 PLD 水解 PC 产生胆碱, 胆碱在胆碱氧化酶和过氧化物酶的作用下形成红色显色物质, 在 500 nm 下有最大吸收峰。本研究使用市售的根据该原理制备的 PLD 活性分析试剂盒 (比色法) 测定酶液中 PLD 水解 PC 产生胆碱的水解酶活性, 根据试剂盒使用说明书进行操作。在 36 $^{\circ}$ C、pH 8.0 条件下, 以 PC 为底物, 每分钟每生成 1 μ mol 胆碱所需要的酶量为一个酶活力单位。

PLD 转脂酶活力测定^[18]: 采用 GF254 薄层板层析定性分析转化产物, 展开剂组成为氯仿: 甲醇: 乙酸=40:15:16, 采用碘蒸汽熏蒸显色, 用薄层扫描仪扫描, 进行定量分析。

1.3.6 蛋白含量的测定

用按 Lorry 法对酶液的蛋白含量进行检测。

1.4 酶学性质研究

1.4.1 pH 对 PLD 酶活及稳定性的影响

1) 最适 pH 测定。将 0.1 mL 纯化后的酶液 (含 35.8 mM PC) 与 0.9 mL 不同 pH (4.0~12.0) 的缓冲液混合, 36 $^{\circ}$ C 反应 15 min, 加热至 100 $^{\circ}$ C 10 min 灭活酶, 在 36 $^{\circ}$ C、pH 8.0 条件下测定酶活。以酶活力最高的样品为对照, 设置值为 100%, 每个条件做 3 个平行, 结果表示为平均值±偏差。

2) pH 稳定性测定。将 0.1 mL 纯化后的酶液与 0.9 mL 不同 pH 的缓冲液混合, 4 $^{\circ}$ C 下放置 7 d, 进行残余酶活的检测 (pH 8.0), 以未经任何处理的酶液为对照, 每个条件做 3 个平行, 结果表示为平均值±偏差。

1.4.2 温度对 PLD 酶活及稳定性的影响

1) 最适温度测定。将 0.1 mL 纯化后的酶液与 0.9 mL 0.1 M Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 混合, 分别取 50 μ L 在不同温度下 (30 $^{\circ}$ C、35 $^{\circ}$ C、40 $^{\circ}$ C、45 $^{\circ}$ C、50 $^{\circ}$ C、55 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C、65 $^{\circ}$ C) 测定酶活, 每个条件做 3 个平行, 结果表示为平均值±偏差。

2) 热稳定性测定。将 0.1 mL 纯化后的酶液与 0.9 mL 0.1 M Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 分别在不同温度 (30 $^{\circ}$ C、35 $^{\circ}$ C、40 $^{\circ}$ C、45 $^{\circ}$ C、50 $^{\circ}$ C、55 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C、65 $^{\circ}$ C) 下温育 30 min, 分别取 50 μ L 测定剩余酶活, 每个条件做 3 个平行, 结果表示为平均值±偏差。

1.4.3 表面活性剂及抑制剂对酶活性的影响

向酶活测定中分别加入 0.5% 表面活性剂及抑制剂 (Triton X-100、Tween-80、脱氧胆酸钠、十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS)、乙二胺四乙酸 (ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) 标准条件下测定酶活, 每个条件做 3 个平行, 结果表示为平均值±偏差。

1.4.4 金属离子对酶活性的影响

在酶活测定过程中分别加入 2 mM 不同金属离子 (无水氯化钙、七水硫酸镁、硫酸锰、氯化钴、氯化钾、硫酸锌), 标准条件下测定酶活, 每个条件做 3 个平行, 结果表示为平均值±偏差。

1.4.5 PLD 转磷脂酰基反应特性研究

以纯化后的酶液为酶源, 加入 3.6 mM PC 和 0.9 M L-丝氨酸充分振荡溶解, 36 $^{\circ}$ C 振荡反应 20 h, 采用氯仿、甲醇 (2:1) 混合液与反应液按 1:2 的比例进行萃取, 采用 GF254 薄层板层析定性分析转化产物, 展开剂组成为氯仿: 甲醇: 乙酸=40:15:16, 采用碘蒸汽熏蒸显色。

1.4.6 PLD 分子量的测定

向盐析后的沉淀加入适量 0.01 M pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液溶解, 装透析袋, 于相同缓冲液中透析过夜, 待用。

采用不变性十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)^[19]对透析后的酶液进行电泳, 分离胶浓度 12%, 浓缩胶浓度 5%, 电泳后取下凝胶, 放在含 0.2% PC 的 1.5% 琼脂糖平板上, 36 $^{\circ}$ C 温育, 直至有清晰沉淀条带出现, 切下条带对应的聚丙烯酰胺凝胶, 加入 200 μ L 0.05 M pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液浸提并测定酶活。

浸提后的酶液经 MCP010C41 离心浓缩管离心浓缩, 采用变性 SDS-PAGE 测定分子量, 分离胶浓度 12%, 浓缩胶浓度 5%, 采用考马斯亮蓝染色和已知分子量的 Marker 对照确定 PLD 分子量。

2 结果与分析

2.1 PLD 分离纯化

2.1.1 盐析用盐浓度的选择

图 1 展示了不同盐浓度下 PLD 的沉淀效果, 可

以看出,随着硫酸铵浓度的增加,PLD被盐析沉淀出来,离心后的清液中酶活逐渐下降,饱和度达70%时,离心后的清液中测不到酶活,说明PLD全部被沉淀出来。

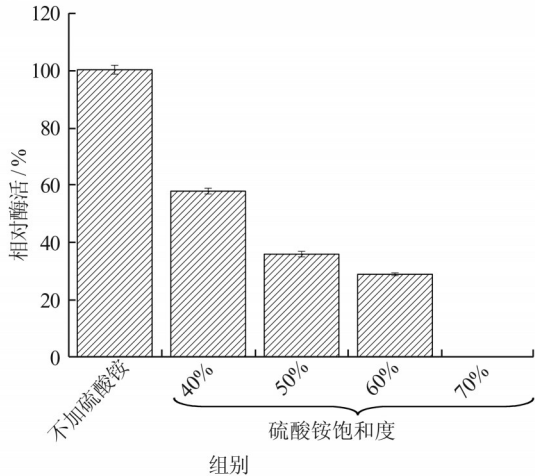


图1 不同盐浓度下的PLD沉淀效果
Figure 1 PLD precipitation effect under different salt concentrations

2.1.2 PLD高度纯化

盐析后的沉淀经两步柱层析,得到的PLD纯化结果见表1,粗酶液经硫酸铵分级沉淀初步纯化后,比酶活提高到2.55 U/mg,被纯化2.89倍;琼脂糖凝胶CL-6B层析除去了溶液中的部分杂蛋白和盐,比酶活达到28.76 U/mg,将PLD纯化了32.64倍;最后经DEAE-琼脂糖阴离子交换层析纯化后,得到了纯化倍数为45.47、回收率为25.60%、比酶活为40.06 U/mg的PLD。

2.2 酶学性质研究

2.2.1 pH值对PLD酶活及稳定性的影响

pH值主要通过影响酶蛋白分子的构象以及活性中心的电荷状态来影响PLD的活性。在适宜的pH值下,酶分子的构象处于最佳状态,活性中心的氨基酸残基能够与底物正确结合和催化,酶活性最高。pH值过高或过低都会导致酶活性下降,甚至使酶失去活性。本文通过改变pH值,对蜡样芽胞杆菌产的PLD最适反应pH值以及在不同pH值下的酶

活稳定性进行了研究,实验结果见图2。蜡样芽胞杆菌所产PLD水解酶活性在pH值为8.0时最高,pH值在7.0~11.0范围时,相对酶活在90%以上,酸性条件下酶活相对较低,其中pH值为4.0时,没有水解酶活性。在pH值7.0~10.0条件下,4℃冰箱贮存酶液7d,残余酶活在80%以上,其中,pH值为9.0时,残余酶活最高,约有95%,说明该蜡样芽胞杆菌所产PLD在碱性条件下酶活性及稳定性较好,pH值低于5.0时,酶活性及稳定性均较差,该菌所产的PLD耐碱不耐酸,与文献[20]报道的链霉菌CS628产的热不稳定碱性PLD的pH值性质相近。

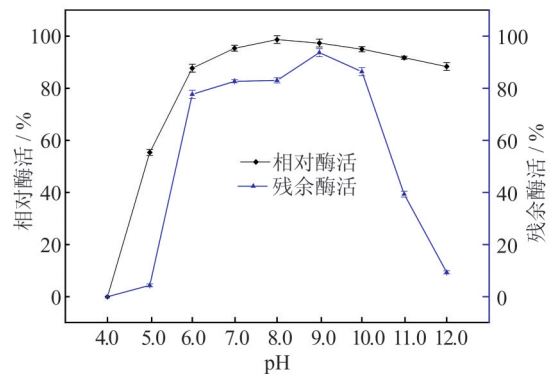


图2 pH值对PLD酶活及稳定性的影响
Figure 2 Effect of pH on enzyme activity and stability of PLD

2.2.2 温度对PLD酶活及稳定性的影响

温度对酶活性及稳定性有着重要影响,在适宜温度范围内,随着温度升高,酶活性通常会增强。这是因为适当升温能增加酶分子与底物分子的碰撞频率,使反应更容易进行。但超过最适温度后,酶活性会迅速下降。这是由于高温会破坏酶的空间结构,使酶蛋白变性,其活性中心的结构发生改变,从而失去催化能力。本文通过改变温度,对蜡样芽胞杆菌产的PLD最适反应温度及其在不同温度下的酶活稳定性进行了研究,结果见图3。随着温度升高,PLD水解酶活性升高,50℃时酶活达到最大,超过50℃,酶活性及酶稳定性快速下降,65℃时酶活全部丧失。与链霉菌*S. hachijoensis*^[21]产的PLD最适

表1 蜡样芽胞杆菌产PLD纯化结果

Table 1 Purification results of PLD produced by *Bacillus cereus*

纯化步骤	总蛋白量/mg	总活力/U	比酶活/(U·mg ⁻¹)	纯化倍数	回收率/%
粗酶液	572.00	504.00	0.88	1.00	100.00
硫酸铵沉淀	165.00	420.00	2.55	2.89	83.33
琼脂糖凝胶CL-6B层析	7.65	220.00	28.76	32.64	43.65
DEAE-琼脂糖离子交换层析	3.22	129.00	40.06	45.47	25.60

温度和酶稳定温度类似。

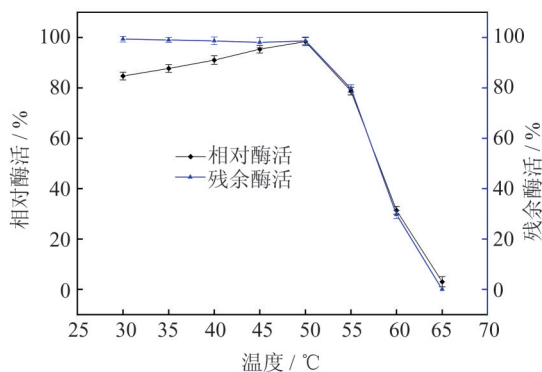


图3 温度对PLD酶活及稳定性的影响

Figure 3 Effect of temperature on the activity and stability of PLD

2.2.3 表面活性剂及螯合剂对酶活性的影响

通过向反应液中添加一定浓度的不同表面活性剂及螯合剂,研究其对蜡样芽胞杆菌产的PLD酶活性的影响,实验结果见图4。结果表明,Triton X-100和脱氧胆酸钠对酶活有促进作用,SDS有抑制作用,而EDTA对水解酶活性完全抑制,但在转磷脂酰基反应中,EDTA却没有抑制作用,甚至还略有促进作用(相关数据将在后续发表)。EDTA是一种强螯合剂,能与金属离子形成稳定的螯合物。许多酶的活性中心需要金属离子作为辅因子来维持其结构和功能的完整性,该蜡样芽胞杆菌所产PLD可能也属于这类酶,具体机理还需进一步研究。

从目前已有的文献报道来看,EDTA对不同微生物来源的PLD作用不尽相同。相关研究报道,

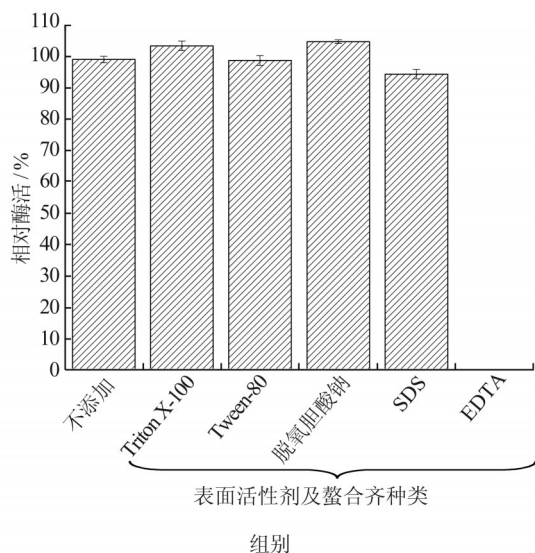


图4 表面活性剂及螯合剂对PLD活性的影响

Figure 4 Effects of surfactants and chelating agents on PLD activity

EDTA对其研究的来自链霉菌的PLD₅₂₈、PLD_{st}、PLD₆₂₈水解酶活性基本完全抑制,但对PLD₅₇却有促进作用^[20,22-24];也有研究报道,EDTA对其研究的来自链霉菌YU100等的PLD水解酶活性没有明显作用^[25-26];还有研究报道,向以含有PLD的放线菌培养上清液为催化剂,PC和乙醇胺为底物,通过转磷脂酰基反应生成磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine,PE)的反应液中添加EDTA,能显著提高PLD的选择性^[27]。

2.2.4 金属离子对酶活性的影响

金属离子对酶活性的影响具有复杂性和多样性,主要通过作为酶的组成成分、参与酶与底物的结合、调节酶的构象等方式来实现。本研究向反应液中添加一定浓度的不同金属离子,研究其对蜡样芽胞杆菌产的PLD酶活性的影响,实验结果见图5,可以看出,Mg²⁺对酶活有一定的促进作用;Mn²⁺、Co²⁺对酶活有一定的抑制作用;Ca²⁺、Zn²⁺、K⁺对酶活基本没有影响。

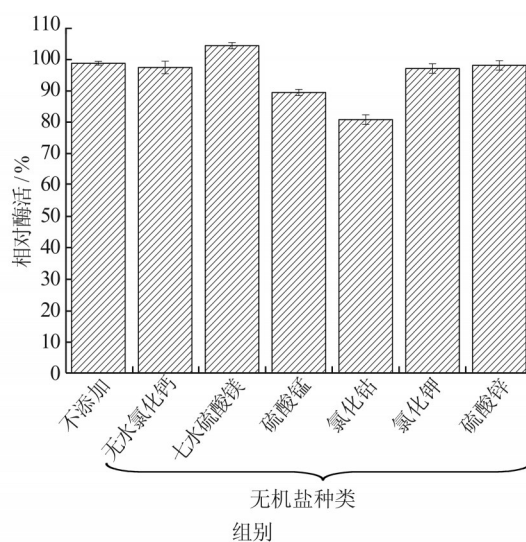


图5 金属离子对PLD活性的影响

Figure 5 Effects of metal ions on PLD activity

2.2.5 PLD分子量的测定

图6(a)是透析后的酶液经不变性SDS-PAGE电泳后,把凝胶放在含0.2% PC的1.5%琼脂糖平板上产生的沉淀条带,切下条带对应的聚丙烯酰胺凝胶,加入200 μL 0.05 M pH 8.0 Tris-HCl缓冲液浸提,浸提液经酶活测定,确定有PLD活性。图6(b)为沉淀条带对应的聚丙烯酰胺凝胶切割浸提后,经变性SDS-PAGE电泳,考马斯亮蓝显色后的条带,结果表明,浸提后的PLD酶液达到电泳纯,为单一条带,也说明蜡样芽胞杆菌所产PLD由一条肽链组成,通过和标准蛋白比对,其分子量在

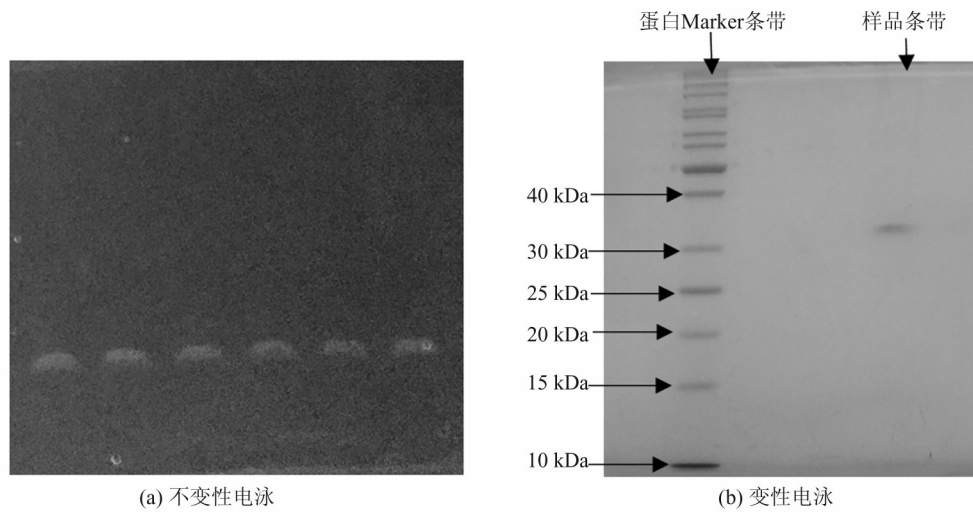


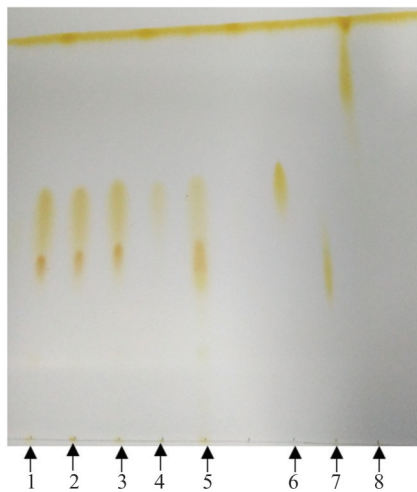
图6 采用SDS-PAGE测定分子量

Figure 6 Molecular weight determination by SDS-PAGE

32 kDa左右。

2.2.6 PLD转磷脂酰基反应特性

转磷脂酰基反应后,采用薄层层析法进行定性分析,结果如图7所示。该蜡样芽胞杆菌所产的PLD具有催化转磷脂酰基反应酶活性,以PC和L-丝氨酸为底物,有PS生成,且基本没有水解产物PA生成。这一特性相较于多数微生物来源的PLD具有显著优势,体现了该生物资源在催化反应中的高选择性。



1、2、3、5:PC作底物,反应液萃取上层点样;4:反应液萃取下层点样;6:PS标准对照;7:PC标准对照;8:PA标准对照

图7 采用薄层层析定性分析转磷脂酰基反应产物

Figure 7 Qualitative analysis of transphospholipid acyl reaction products by thin-layer chromatography

3 结论

本研究从生物资源开发角度,对蜡样芽胞杆菌所产PLD分离纯化进行了研究,发现硫酸铵饱和度

为70%时,可以使离心后上清液中PLD完全沉淀析出,盐析后的沉淀经两步柱层析后,得到比酶活为40.06 U/mg的PLD,纯化了45.47倍;同时,对蜡样芽胞杆菌所产PLD的酶学性质进行了研究,发现该菌所产PLD水解酶最适反应pH为8.0,pH在7.0~10.0范围时,酶活相对稳定;最适反应温度为50℃,50℃及以下酶活稳定;TritonX-100和脱氧胆酸钠对酶活有促进作用,EDTA对水解酶活完全抑制,Mg²⁺对酶活有促进作用,Mn²⁺、Co²⁺对酶活有抑制作用;采用SDS-PAGE测定分子量,在32 kDa左右;转磷脂酰基反应研究表明,该菌所产PLD具有良好的转磷脂酰基活性,并且基本没有水解产物PA产生,与国外学者普遍采用的链霉菌等产PLD微生物相比,蜡样芽胞杆菌具有生长速度快、发酵周期短的特点^[16],可显著降低生物资源开发的时间成本。

综上所述,蜡样芽胞杆菌所产PLD的稳定性和高选择性使其成为一种具有潜在工业应用价值的生物催化剂,为稀有磷脂的绿色合成奠定资源基础。后续将对该PLD催化制备稀有磷脂的工艺进行进一步研究。

参考文献

[1] Zhang Z X, Chen M, Xu W, et al. Microbial phospholipase D: identification, modification and application[J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 96: 145-156.

[2] Mao S H, Zhang Z H, Ma X Y, et al. Efficient secretion expression of phospholipase D in *Bacillus subtilis* and its application in synthesis of phosphatidylserine by enzyme immobilization[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 169: 282-289.

- [3] Samantha A, Damjanović J, Iwasaki Y, et al. Structures of an engineered phospholipase D with specificity for secondary alcohol transphosphatidylation: insights into plasticity of substrate binding and activation[J]. *Biochemical Journal*, 2021, 478(9): 1749-1767.
- [4] Zhang P, Gong J S, Xie Z H, et al. Efficient secretory expression of phospholipase D for the high-yield production of phosphatidylserine and phospholipid derivatives from soybean lecithin[J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2023, 8(2): 273-280.
- [5] 贺晨曦, 陈曦, 刁汝静, 等. 重组磷脂酶D Sp-TL1146的发掘及其在DHA 磷脂酰单甘油酯的合成中的应用[J]. *食品研究与开发*, 2024, 45(21): 187-194, 216.
- He C X, Chen X, Diao R J, et al. Discovery of recombinant phospholipase D sp-TL1146 and its application in synthesis of DHA phosphatidyl monoglycerides [J]. *Food Research and Development*, 2024, 45(21): 187-194, 216.
- [6] Zhang P, Gong J S, Qin J F, et al. Phospholipids (PLs) know-how: exploring and exploiting phospholipase D for its industrial dissemination[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2021, 41(8): 1257-1278.
- [7] 郭碧珊, 张梦雪, 王鋈坦, 等. 磷脂酶D特性及其在磷脂酰丝氨酸合成中的应用[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(12): 486-492.
- Guo B S, Zhang M X, Wang J T, et al. Characteristics of phospholipase D and application in the synthesis of phosphatidylserine [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(12): 486-492.
- [8] Wang Y, Wakelam M J O, Bankaitis V A, et al. The wide world of non-mammalian phospholipase D enzymes [J]. *Advances in Biological Regulation*, 2024, 91: 101000.
- [9] 吴思怡, 吴林秀, 王凡, 等. 不动杆菌磷脂酶D基因的表达、生物信息学及底物选择性分析[J]. *食品工业科技*, 2024, 45(13): 132-139.
- Wu S Y, Wu L X, Wang F, et al. Gene expression, bioinformatics and substrate selectivity of phospholipase D from *Acinetobacter* sp [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2024, 45(13): 132-139.
- [10] Wang F H, Mao X J, Deng F L, et al. A new phospholipase D from *Moritella* sp. JT01: biochemical characterization, crystallization and application in the synthesis of phosphatidic acid[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(19): 11633.
- [11] Pacheco R, Quinto C. Phospholipase Ds in plants: their role in pathogenic and symbiotic interactions[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2022, 173: 76-86.
- [12] Silva-Magalhães R, Silva-Araújo A L, Peres-Damásio P, et al. *Loxosceles amazonica* brown spider venom: insights into enzymatic activities, immunorecognition, and novel phospholipase D isoforms [J]. *Biochimie*, 2024, 227: 86-98.
- [13] Li M L, Zhou Y F, Duan X L, et al. Characterization of a phospholipase D from *Streptomyces cinnamoneum* SK_{43.003} suitable for phosphatidylserine synthesis [J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2022, 69(5): 1917-1928.
- [14] 陈景, 陈建华, 刘凯, 等. 磷脂酶D特性及其在功能性磷脂生产中的应用[J]. *天津农学院学报*, 2021, 28(02): 79-84.
- Chen J, Chen J H, Liu K, et al. Characteristics of phospholipase D and its application in the production of functional phospholipids[J]. *Journal of Tianjin Agricultural University*, 2021, 28(2): 79-84.
- [15] 代书玲, 张江, 商军. 磷脂酶D 高效产生菌的筛选及鉴定[J]. *江苏农业科学*, 2013, 41(3): 309-311.
- Dai S L, Zhang J, Shang J. Screening and identification of high-yielding phospholipase D producing strains[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2013, 41(3): 309-311.
- [16] 代书玲, 陈国, 宗琪. 蜡状芽孢杆菌产磷脂酶D 发酵条件优化[J]. *中国酿造*, 2019, 38(11): 140-144.
- Dai S L, Chen G, Zong Q. Optimization of fermentation conditions of phospholipase D from *Bacillus cereus* [J]. *China Brewing*, 2019, 38(11): 140-144.
- [17] 刘菲菲, 张梁, 顾正华, 等. 蜡状芽孢杆菌磷脂酶C 基因在大肠杆菌中的异源表达[J]. *食品科学*, 2013, 34(11): 182-187.
- Liu F F, Zhang L, Gu Z H, et al. Cloning and heterologous expression in *E. coli* of phospholipase C gene from *Bacillus cereus* [J]. *Food Science*, 2013, 34(11): 182-187.
- [18] Kato S, Kokusho Y, Machida H, et al. Isolation and identification of phospholipase D producing actinomycetes[J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1984, 48(9): 2181-2188.
- [19] 刘洋, 陈爱萍, 朱小顺, 等. 一株蜡状芽孢杆菌 α -淀粉酶产生菌株的分离鉴定及酶学性质研究[J]. *中国酿造*, 2010, 29(8): 68-71.
- Liu Y, Chen A P, Zhu X S, et al. Isolation and identification of an α -amylase-producing *Bacillus cereus* strain and enzymatic characteristics of the α -amylase[J]. *China Brewing*, 2010, 29(8): 68-71.
- [20] Simkhada J R, Cho S S, Choi H S, et al. A new thermolabile alkaline phospholipase D from *Streptomyces* sp. CS628 [J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2010, 15(4): 595-602.
- [21] Okawa Y, Yamaguchi T. Studies on phospholipases

- from *Streptomyces*. II. Purification and properties of *Streptomyces hachijoensis* phospholipase D [J]. *Journal of Biochemistry*, 1975, 78(2): 363-372.
- [22] 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.
- [23] Mander P, Simkhada J R, Cho S S, et al. A novel Ca^{2+} -dependent phospholipase D from *Streptomyces tendae*, possessing only hydrolytic activity [J]. *Archives of Pharmacal Research*, 2009, 32(10): 1461-1467.
- [24] Simkhada J R, Cho S S, Lee H J, et al. Purification and biochemical properties of phospholipase d (PLD57) produced by *Streptomyces* sp. CS-57 [J]. *Archives of Pharmacal Research*, 2007, 30(10): 1302-1308.
- [25] Kyu L S, Woong C J, Ho C M, et al. Production and characterization of extracellular phospholipase D from *Streptomyces* sp. YU100 [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2002, 12(2): 189-195.
- [26] Shimbo K, Yano H, Miyamoto Y. Purification and properties of phospholipase D from *Streptomyces lydicus* [J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1990, 54(5): 1189-1193.
- [27] Nakajima J, Nakashima T, Yu S M, et al. A facile transphosphatidylolation reaction using a culture supernatant of actinomycetes directly as a phospholipase D catalyst with a chelating agent [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1994, 44(10): 1193-1198.