

郭碧珊, 张梦雪, 王黎坦, 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. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021120005

GUO Bishan, ZHANG Mengxue, WANG Juntan, 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. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021120005

· 专题综述 ·

磷脂酶 D 特性及其在磷脂酰丝氨酸合成中的应用

郭碧珊¹, 张梦雪¹, 王黎坦¹, 杜 瑞¹, 朱海华^{1,2,*}, 许 君³, 王法云^{1,2}, 王 慧^{1,4}

(1. 河南省商业科学研究所有限责任公司, 河南郑州 450002;

2. 河南省食品安全控制工程技术研究中心, 河南郑州 450002;

3. 河南农业大学生命科学学院, 河南郑州 450002;

4. 上海交通大学医学院公共卫生学院, 上海 200025)

摘 要: 磷脂酰丝氨酸 (Phosphatidylserine, PS) 是一种新资源食品, 在自然界中含量稀少, 提取困难。磷脂酶 D (Phospholipase D, PLD) 是生物酶法制备磷脂酰丝氨酸的关键合成酶。本文主要介绍了 PLD 的分子结构特点、催化机理及酶活特性, 并总结了目前 PS 的制备方法, 重点对 PLD 酶催化制备磷脂酰丝氨酸的研究进展及反应体系进行了论述, 并对催化制备 PS 反应体系的选择进行了分析和展望, 以期为深化酶法技术制备 PS 的研究提供参考, 以此推动新资源食品 PS 的工业化生产和应用。

关键词: 磷脂酰丝氨酸, 磷脂酶 D, 制备方法, 酶转化, 新资源食品

中图分类号: Q939.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)12-0486-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021120005

本文网刊:



Characteristics of Phospholipase D and Application in the Synthesis of Phosphatidylserine

GUO Bishan¹, ZHANG Mengxue¹, WANG Juntan¹, DU Rui¹, ZHU Haihua^{1,2,*}, XU Jun³, WANG Fayun^{1,2}, WANG Hui^{1,4}

(1. Henan Commercial Science Research Institute Co., Ltd., Zhengzhou 450002, China;

2. Food Quality and Safety Control Engineering Technology Research Center of Henan Province, Zhengzhou 450002, China;

3. College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

4. School of Public Health, Shanghai Jiao Tong University of Medicine, Shanghai 200025, China)

Abstract: Phosphatidylserine (PS) is a new resource food, which has less content in nature and the difficulty of extraction. Phospholipase D (PLD) is the critical synthetase in enzymatic preparation of PS. This paper mainly introduces the characteristics of molecular structure of PLD and the catalytic mechanism and enzyme activity, and summarizes the current preparation methods of PS, focusing on the research progress and reaction system of enzymatic synthesis, and analyzes and prospects the selection of the reaction system for PS preparation. It is expected to provide reference for deepening the research of enzymatic preparation of PS, so as to promote the industrial production and application of new resource food PS.

Key words: phosphatidylserine; phospholipase D; preparation method; enzyme synthesis; new resource food

收稿日期: 2021-12-01

基金项目: 中央引导地方科技发展专项 (YDZX20204100004126); 河南省科学院科研开发基本科研费 (200611115, 220611032); 河南省省级特聘研究员项目 (200511003)。

作者简介: 郭碧珊 (1992-), 女, 硕士研究生, 助理工程师, 研究方向: 食品科学与工程, E-mail: bishanguo@163.com。

* 通信作者: 朱海华 (1982-), 女, 硕士, 高级工程师, 研究方向: 食品安全与营养, E-mail: haihuazhu1982@sohu.com。

磷脂酰丝氨酸(Phosphatidylserine, PS)作为构成机体神经组织细胞的基本磷脂类物质,是脑细胞信息读取,传递和记忆的重要介质^[1],被誉为“大脑维生素^[2]”。PS 具有预防老年痴呆^[3],改善大脑记忆,缓解抑郁症,提高儿童注意力^[4]等功效。因此,PS 被列为新资源食品和功能食品,在保健食品、化妆品以及制药工业中得到广泛应用^[5]。PS 的制备方法主要有化学合成法、溶剂萃取法和酶法合成。其中化学合成法和溶剂萃取法因工艺复杂、环境不友好、产率低、纯化困难等不适用于大规模工业化生产,而酶法合成因反应条件温和、环境友好、PS 产量大、成本低等优点而备受关注^[6-8]。磷脂酶 D(Phospholipase D, PLD, EC 3.1.4.4)是酶法合成 PS 的关键酶,其属于磷酸二酯酶超家族成员^[9],不仅可以将磷脂酰胆碱水解生成磷脂酸(Phosphatidic acid, PA),也可通过转磷脂酰化合成 PS 等稀有磷脂^[10-11]。PLD 在植物、动物和微生物中无处不在,其中微生物 PLD 由于较高的催化性能和简单的纯化过程成为目前 PS 生产中使用最广泛的酶^[6,12-13]。

近年来微生物 PLD 的研究主要集中在反应体系优化以及酶的重复使用上。黄琳等^[14]通过重组表达获得 PLD,优化单水相中 PS 生成条件,使其产率达 33%;Liu 等^[15]通过将 PLD 表面展示到毕赤酵母表面实现酶的重复利用,继而优化纯水体系中 PS 的生成条件,最终转化率达 53%;Zhang 等^[16]将 PLD 固定化到-C18 修饰的有序中孔二氧化硅立方体(OMSC)中,优化两相体系中 PS 的生成条件,转化率高达 91.2%。大量文献表明,无论 PLD 酶以何种形式发挥作用,反应体系的不同对 PS 产率有很大影响。因此,对 PLD 催化制备 PS 的反应体系进行研究很有必要。

本文对微生物 PLD 的特性及其在制备磷脂酰丝氨酸方面的应用进展进行了综述,并重点介绍了不同的反应体系下 PLD 催化生产 PS 的差异,为 PS 的绿色高效生产提供理论指导,从而加快 PS 在功能食品中的开发和应用,促进我国大健康产业的发展。

1 微生物 PLD 的特性

1.1 PLD 的分子结构特点

PLD 作为磷脂酶超家族成员,具有该家族的明显特征:高度一致的保守序列 HxKxxxD,该保守序列是催化水解的活性部位。Hough^[17]在 2000 年首次解析出了链霉菌 PMF-PLD 的三维结构(图 1)。该酶分子结构呈双叶型,两个 HKD 保守序列沿着对称轴彼此相邻。两个结构域单体由三十五个二级结构组成,呈 α - β - α - β - α 状排列,每个 β 链包括 8~9 个 β 折叠,两侧含有 18 个 α 螺旋。在二聚体界面上存在一个 30 Å 孔径的活性位点以方便底物进入,两个柔性环延伸到活性位点的入口上方,从而可以调节界面脂质的相互作用。

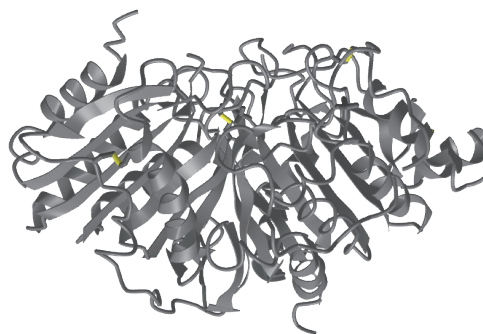


图 1 链霉菌 PMF-PLD 的三维蛋白结构

Fig.1 Tertiary structures of PMF-PLD

1.2 PLD 的催化机理

PLD 是具有特殊性质的酯键水解酶,具备水解磷酸二酯键和碱基互换的能力。一方面它能催化水解磷脂分子中的磷酸和有机碱(如胆碱、乙醇胺等)羟基成酯的键,释放原来磷脂的极性头部,生成磷脂酸和羟基化合物胆碱;另一方面,除水解作用外还能催化一些含羟基的化合物与磷脂的碱基进行碱基交换反应,生成新的磷脂。利用此特性可对磷脂进行改性,以富含磷脂酰胆碱的磷脂为底物,进行磷脂酰基转移反应,可为大量制备稀有磷脂和纯化单体磷脂提供有效的途径(图 2)^[18]。

1.3 PLD 的底物特异性

PLD 酶因其来源及结构不同,其底物特异性也不同,可作用于含有不同头部基团的磷脂。且在转酯反应中,受体醇与水分子互为竞争关系,因此,不同来源 PLD 的转酯能力取决于两个 HKD 模块的化学和空间环境。与动植物来源的 PLD 相比,微生物来源的 PLD 有更强的转酯能力以及更为广泛的底物选择谱,其中,链霉菌来源的 PLD 与其它来源 PLD 相比,由于呈现出最紧密的结构,且转酯与水解能力之比相对较高,而被广泛研究^[19]。

即使酶来源相同,同种 PLD 酶的底物特异性也不同,其水解和转酯活力受底物多种因素影响:磷脂酰基链组成、头部醇的结构尺寸以及底物聚合形态。通常脂肪酸中含有 6~8 个碳原子的酰基链比更长链具有更快的催化速率,对卷心菜和罂粟重组 PLD 同工酶的研究表明,氨基酸的少量变化也可导致水解和转酯活性的显著变化^[20]。Dippe 等^[21]通过定点饱和酪氨酸残基突变研究发现,头部醇尺寸越小越有利于酶与底物结合并发挥作用。Dawson 等^[22]对菠萝 PLD 催化多种聚合形态底物进行研究,发现底物以小聚合状态存在时,PLD 催化能力较强。

1.4 影响 PLD 活力的因素

影响 PLD 活力的因素有很多,包括温度、pH、盐类、溶剂以及反应体系等^[23]。PLD 最适温度和 pH 受其来源影响较大:大多数 PLD 的最适催化温度为 25~45 °C,部分在 55~60 °C 时活力最高^[24];来源于植物的 PLD 最适 pH 在 5~6 之间,微生物来源的范

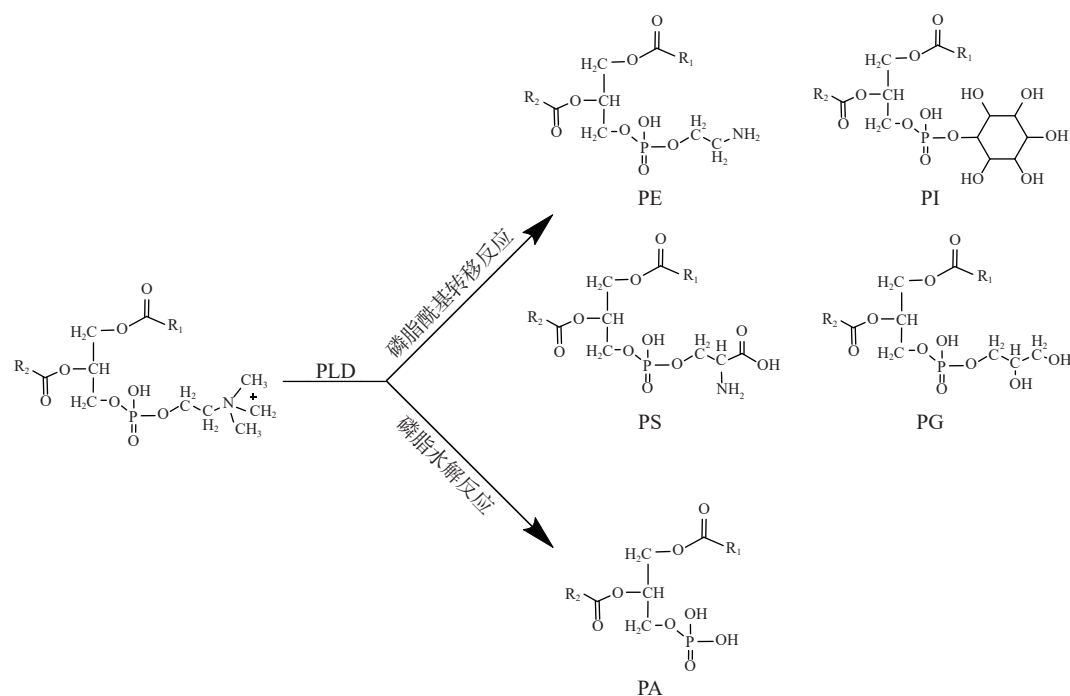


图2 磷脂酶 D 的催化反应

Fig.2 Phospholipase D-catalyzed reaction

围较宽,在 4~8 之间。盐对酶活性的影响也较显著。研究表明,对 PLD 催化反应影响最显著的为钙离子^[25],钙离子不仅能激发 PLD 的催化活力,而且能提高其热稳定性;TritonX-100 等具有乳化作用的盐也能提高 PLD 的活性^[26];除此之外,还有 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 等均影响 PLD 酶活,酶来源不同,离子对其活性作用不同。不同体系中 PLD 表现的活力也不同,PLD 对水溶性底物的作用比较缓慢,而在油-水界面上作用较好。因此,增加油-水界面条件和有利于酶吸附在界面的因素,可提高酶活力,增加催化反应速率。

2 微生物 PLD 催化制备磷脂酰丝氨酸研究

PS 是从牛脑中发现并被定性的^[27]。在 PS 的结构组成中,带有负电荷的头部为亲水性,而由脂肪酸组成的尾部为亲脂性^[28]。不同来源的 PS 其脂酰残基差别较大,因此 PS 是混合物,不是单一成分。而该性质也决定了 PS 制备方法的多样性,主要包括化学合成法、溶剂提取法和 PLD 酶转化法。

化学合成法和溶剂提取法属于非酶催化法。化学合成工艺复杂,成本较高,且合成结束会出现有机溶剂浓缩回收以及合成产品中溶剂残留问题,易使 PS 受到污染;溶剂提取法有机溶剂消耗量大,获得的 PS 纯度低,且由于“疯牛病”的流行,其安全性受到质疑,已经逐渐被淘汰^[29]。因此,这两种方法均不符合我国大健康产业的发展 and 国民绿色健康的理念。而 PLD 酶法制备磷脂酰丝氨酸既环保又安全,已经成为生产 PS 的理想方法^[30]。

2.1 PLD 酶催化法制备磷脂酰丝氨酸

酶催化法是指底物 PC 和 L-丝氨酸在 PLD 的作用下生成 PS。酶催化法具有反应条件温和、反应

易控、高效简单等优势,逐渐得到广泛的研究及应用。由于底物 PC 和产物 PS 易溶于有机相,而 PLD 和 L-丝氨酸易溶于水相,造就了 PS 制备体系的多样性,这些体系主要包括单相反应体系、两相反应体系和新型环保溶剂反应体系。因此,该研究进展对 PS 生产的反应体系进行了总结。

2.1.1 单相反应体系

2.1.1.1 传统单相反应体系 传统单相反应体系即反应只在水相中进行,全程没有有机溶剂的使用。由于卵磷脂的双亲性,反应液多为均质胶或悬浊液状态。一般是先将底物卵磷脂利用均质设备打散,然后在丝氨酸和酶的作用下共同反应。黄琳等^[14]利用重组 PLD 在单水相体系中催化大豆卵磷脂进行转酯酰反应,6 h 后 PS 产率可达 33%;黄婷婷^[31]优化纯水相中生产 PS 工艺,以 PC60 为底物,反应 6 h 后,PS 转化率可达到 96.7%,副产物 PA 仅生成 0.2%,实现了底物向产物高效转化。但不可否认,单水相中水的存在会导致 PLD 的水解活性增强,因此需要进一步优化条件以降低 PC 的水解率及提高 PS 的生成率。

一方面是调整 PC 与水的比例和丝氨酸的浓度等条件,一方面是利用硫酸钙和硅胶作为吸附载体吸附底物 PC 进行酶转化。Zhang 等^[32]研究了两种 PC 吸附模型: TritonX-100 与二氧化硅共价结合模型和二氧化硅吸附 PC 模型。两种模型被成功用于纯水相中 PLD 介导的转磷脂酰反应,PC 装载量达到 98.9%,PS 收益率达到 99.0%,为 PS 的连续生物合成提供了一种很有前景的方法。

2.1.1.2 固定化酶单相反应体系 到目前为止,固定化 PLD 已在多种有机溶剂(如乙醚、氯仿、甲苯)中

进行转磷脂酰化反应, 以达到 PS 的最大产率^[33]。但是有机溶剂具有易燃性、挥发性和毒性, 使其生产的 PS 难以应用在功能食品和医药制品中, 因此提高单水相中转酯反应的效率势在必行。Mao 等^[34] 将 PLD 固定在环氧基载体上, 在纯水溶液中采用固定化 PLD 合成 PS, 转化率 65%, 整个过程避免了有机溶剂的影响, 由于其具有安全性, 且产品回收过程简单, 因此在 PS 的工业生产中具有广阔的前景。

2.1.2 两相反应体系

2.1.2.1 传统两相反应体系 传统的两相反应体系为水-有机溶剂体系。在两相体系中, 转酯反应和水解反应同时进行, 且水解反应会影响目的产物 PS 的生成。一方面有机溶剂会与水化层发生作用, 影响酶的活力, 另一方面水的存在会导致水解副产物 PA 大量生成, 降低 PS 生成率。因此, Chen 等^[6] 首次利用含水量为 6.25%(V/V)的微水相-有机溶剂两相体系, 通过减少水的存在来抑制水解反应; 冯小娜等^[35] 则是利用蛋白质工程改造策略扩大底物 PC 催化通道, 降低位阻效应, 同时提高活性位点与丝氨酸的亲合力, 降低水解反应的同时提高了 PS 生成率。

两相反应体系的酶转化研究集中在有机相种类选择、两相体积比、PC 与丝氨酸质量比、反应温度、pH 等方面。表 1 总结了目前一些具有代表性的研究结果。

2.1.2.2 固定化酶两相反应体系 Wu 等^[40] 制备了一种新型的固定化 PLD 的环氧树脂基纳米复合材料。固定化酶在正庚烷为有机相, 磷酸盐缓冲液为水相的反应体系中, 实现了底物 PC 的高转化, 转化率达 96.2%; Liu 等^[7] 利用基因工程和分子生物技术将 PLD 成功展示在毕赤酵母表面, 在乙醚为有机相, 乙酸钠缓冲液为水相的反应体系中, PC 转化率为 67.5%。固定化酶可增强 PLD 的稳定性和可重复使用性, 表面展示系统还避免了酶的分离纯化, 具有极大的工业化生产潜力。

二十二碳六烯酸(DHA)和二十碳五烯酸(EPA)是长链多不饱和脂肪酸, 主要存在于海洋微生物、动物和浮游植物体内, 具有极好的营养保健功能。Zhou 等^[41] 从鲱鱼卵中提取富含 DHA 的磷脂酰胆碱(DHA-PC), 合成 DHA-PS; 于刚等^[42] 以鲑鱼卵磷

脂为原料, 利用 PLD 酶法合成富含 EPA 和 DHA 的 PS。然而酶法合成用到的有机溶剂具有一定的毒性, 浓缩回收过程中加热时间过长也会导致热敏性 PS 的过氧化值过高。因此两相反应体系生产的 PS 不适合添加到食品、医药中, 所以生物安全型、环境友好型试剂被逐渐研发用于 PS 的合成。

2.1.3 绿色环保溶剂反应体系 水单相反应体系会使反应向有利于水解反应的方向进行, 造成副产物 PA 的大量生成; 传统两相反应体系所用有机溶剂有毒, 生成的 PS 不适合添加到食品、医药中。因此, 各种绿色生物质溶剂应运而生。如 γ -戊内酯^[43-44]、脂肪酸甲酯^[45]、柠檬烯^[46]、离子液体^[47]、深共晶溶剂^[48-49] 和 2-甲基四氢呋喃^[44] 等, 在实现对环境无污染无毒的同时, 也保证了 PLD 催化的转磷脂酰反应具有 70%~95% 的转化率。因此随着人们健康理念的深入, 绿色生物质溶剂将具有极大的市场前景。

综上, PLD 酶催化法制备 PS 的反应体系可细分为五类, 表 2 对这几种反应体系的特点进行了总结。总体而言, 目前对单水相和有机相/水相双相系统的研究较多, 其 PS 产率整体上可达到较高的水平。绿色生物质溶剂虽有其独特的优势, 但是因为其属于新型溶剂, 目前对这类化合物的研究应用还不是很多, 和传统的有机溶剂相比究竟哪个具有更高的人体安全性尚无定论, 因此未来仍要着重探索 PLD 酶在新型溶剂中的催化机理。

3 总结与展望

随着我国大健康产业的发展以及“健康中国”、“绿色产业”的理念倡导, 国民营养健康的需求会越来越多。磷脂酰丝氨酸作为一种新型食品资源, 在改善老年人记忆力、治疗抑郁症和儿童多动症等方面具有重要作用, 因此高纯度的 PS 在功能食品和保健食品中市场潜力巨大。本文主要对微生物 PLD 酶法制备 PS 的不同反应体系进行了综述。总体而言, 虽然在单相体系纯水溶液中 PS 的生成率一般低于水-有机溶剂两相体系中的生成率, 但是要实现 PS 在功能食品和医药制品中的安全应用, 在纯水溶液中生产 PS 是大势所趋, 未来仍是研究方向的重点。建议一方面在 PS 生成过程中, 选择合适的载体, 吸附底物 PC 或将 PLD 酶固定化, 提高酶的利用率, 实现 PS 的连续生物合成, 降低 PS 生产成本。另一方面

表 1 传统两相体系不同反应条件
Table 1 Different reaction conditions of traditional two-phase systems

菌株	有机相	两相体积比 ^A	丝氨酸: PC	pH	温度(℃)	PS生成率(%)
广岛链霉菌	乙醚	1:1	15:1 ^a	6.5	30	74.80 ^[12]
链霉菌	乙醚	2:1	15:1 ^a	6	30	92 ^[36]
穗色链霉菌	二氯甲烷	1:1	20:1 ^b	5.5	35	94 ^[37]
链霉菌	氯仿	NA	5:1 ^b	6	45	100 ^[38]
链霉菌	乙酸乙酯	2:1	5:2 ^a	NA	40	28 ^[39]
链霉菌	乙酸丁酯	微水相6.25%	20:1 ^b	5.5	30	88 ^[6]

注: A表示有机相与水相的体积比; a表示丝氨酸与磷脂酰胆碱的质量比; b表示丝氨酸与磷脂酰胆碱的摩尔比。

表2 不同反应体系的特点

Table 2 Characteristics of different reaction systems

反应体系	相数	溶剂	优点	缺点	改进方法
传统单相反应体系	1	水	无有毒有机溶剂,生成的PS产品适合于食品行业及规模生产	水解作用增强,副产物PA含量增多; PS产率相对较低	添加表面活性剂;使用硫酸钙、二氧化硅和硅藻土等吸附剂
固定化酶单相反应体系	1	水	酶稳定性增强、可连续加工、回收简单、成本低	操作复杂、能耗大、成本高	尝试更多载体;完善PLD固定化策略,提高转酯效率
传统两相反应体系	2	水/有机溶剂	产率高,操作简单	有机溶剂的使用及残留使其产品难以应用于食品、保健品及医药制品中	研发生物安全型,环境友好型替代试剂
固定化酶两相反应体系	2	水/有机溶剂	载体循环利用,酶稳定性增强	聚合物对有机溶剂和微生物的耐受性差,应用范围小	提高载体对酶的加载量;提高聚合物对有机溶剂和微生物的耐受性
绿色环保溶剂反应体系	1	绿色生物质溶剂	绿色环保,生成的PS不易降解,更为稳定	对设备要求高,成本高	探究酶在绿色生物质溶剂中的催化机理

筛选出高转磷脂活性酶的微生物,降低 PLD 的生产成本,并利用生物技术手段从分子层面出发,提高 PLD 的转酯效率,并继续验证新型绿色环保溶剂的毒理学评价。相信在研究人员的共同努力下,PLD 的相关研究能够为加快 PS 在功能食品新产品中的开发和应用奠定基础,为国民健康保驾护航。

参考文献

- [1] NAIR S, TRAINI M, DAWES I W, et al. Genome-wide analysis of *Saccharomyces cerevisiae* identifies cellular processes affecting intracellular aggregation of Alzheimer's amyloid- β 42: Importance of lipid homeostasis[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2014, 25(15): 2235–2249.
- [2] ZHANG Y Y, YANG L Q, GUO L M. Effect of phosphatidylserine on memory in patients and rats with Alzheimer's disease[J]. *Genetics and Molecular Research*, 2015, 14(3): 9325–9333.
- [3] SUZUKI S, YAMATOYA H, SAKAI M, et al. Oral administration of soybean lecithin transphosphatidylated phosphatidylserine improves memory impairment in aged rats[J]. *The Journal of Nutrition*, 2001, 131(11): 2951–2956.
- [4] 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 and Dietetics*, 2014, 27(s2): 284–291.
- [5] VANCE J E, STEENBERGEN R. Metabolism and functions of phosphatidylserine[J]. *Progress in Lipid Research*, 2005, 44(4): 207–234.
- [6] CHEN S, XU L, LI Y, et al. Bioconversion of phosphatidylserine by phospholipase D from *Streptomyces racemochromogenes* in a microaqueous water-immiscible organic solvent[J]. *Bioscience, Biotechnology & Biochemistry*, 2013, 77(9): 1939–1941.
- [7] LIU Y, 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.
- [8] 杨学利, 马沁沁, 袁向华, 等. 磷脂酶 D 及其催化机制的研究进展[J]. *中国油脂*, 2016, 41(3): 80–84. [YANG X L, MA Q Q, YUAN X H, et al. Progress of phospholipase D and its catalytic mechanism[J]. *China Oils and Fats*, 2016, 41(3): 80–84.]
- [9] MORRIS A J, ENGBRECHT J, FROHMAN M A. Structure and regulation of phospholipase D[J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 1996, 17(5): 182.
- [10] MAO X, LIU Q, QIU Y, et al. Identification of a novel phospholipase D with high transphosphatidylase activity and its application in synthesis of phosphatidylserine and DHA-phosphatidylserine[J]. *Journal of Biotechnology*, 2017, 249: 51–58.
- [11] CASADO V, REGLERO G, TORRES C F. Production and scale-up of phosphatidyl-tyrosol catalyzed by a food grade phospholipase D[J]. *Food Bioprocess Technology*, 2013, 91(4): 599–608.
- [12] 夏禹, 张涛, 江波. 磷脂酶 D 的纯化及催化制备磷脂酰丝氨酸研究[J]. *中国油脂*, 2020, 45(1): 97–101. [XIA Y, ZHANG T, JIANG B, et al. Purification of phospholipase D and catalytic preparation of phosphatidylserine[J]. *China Oils and Fats*, 2020, 45(1): 97–101.]
- [13] 毛淑红, 马晓雨, 张朝晖, 等. 磷脂酶 D 在枯草芽孢杆菌中表达及酶法催化合成磷脂酰丝氨酸的研究[J]. *天津科技大学学报*, 2020, 35(5): 7. [MAO S H, MA X Y, ZHANG Z H, et al. Expression of phospholipase D in *Bacillus subtilis* and enzymatic synthesis of phosphatidylserine[J]. *Journal of Tianjin University of Science & Technology*, 2020, 35(5): 7.]
- [14] 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]. *食品科学*, 2020, 41(8): 100–107. [HUANG L, MA J Y, WANG S, et al. Recombinant expression of phospholipase D from *Streptomyces septatus* in *Pichia pastoris* and analysis of its enzymatic properties[J]. *Food Science*, 2020, 41(8): 100–107.]
- [15] LIU Y, HUANG L, FU Y, et al. A novel process for phosphatidylserine production using a *Pichia pastoris* whole-cell biocatalysis

- lyst with overexpression of phospholipase D from *Streptomyces halstedii* in a purely aqueous system[J]. *Food Chemistry*, 2019, 274: 535–542.
- [16] ZHANG Y, ZHU L, WU G, et al. A novel immobilized enzyme enhances the conversion of phosphatidylserine in two-phase system[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2021, 172: 108035.
- [17] HOUGH E. The first crystal structure of a phospholipase D[J]. *Comparative Study*, 2000, 8(6): 655–667.
- [18] 李冰麟. 磷脂酶 D 催化磷脂酰基转移反应生产稀有及非天然磷脂的研究[D]. 西安: 西北大学, 2019. [LI B L. Phospholipase D-catalyzed transphosphatidyltransfer for production of naturally rare and non-natural phospholipids[D]. Xi'an: Northwest University, 2019.]
- [19] MATSUMOTO Y, KASHIWABARA N, OYAMA T, et al. Molecular cloning, heterologous expression, and enzymatic characterization of lysoplasmalogen-specific phospholipase D from *Thermococcus* sp[J]. *FEBS Open Bio*, 2016, 6(11): 1113–1130.
- [20] ULBRICH-HOFMANN R, LERCHNER A, OBLOZINSKY M, et al. Phospholipase D and its application in biocatalysis[J]. *Biotechnology Letters*, 2005, 27(8): 535–544.
- [21] DIPPE M, MRESTANI-KLAUS C, SCHIERHORN A, et al. Phospholipase D-catalyzed synthesis of new phospholipids with polar head groups[J]. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2008, 152(2): 71–77.
- [22] DAWSON R M. The formation of phosphatidylglycerol and other phospholipids by the transferase activity of phospholipase D[J]. *Biochemical Journal*, 1967, 102(1): 205–210.
- [23] D'ARRIGO P, CERIOLO L, CHIAPPE C, et al. Improvements in the enzymatic synthesis of phosphatidylserine employing ionic liquids[J]. *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic*, 2012, 84(1): 132–135.
- [24] MENDONSA R, ENGEBRECHT J. Phospholipase D function in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2009, 1791(9): 970–974.
- [25] BLATT M R. Cellular signaling and volume control in stomatal movements in plants[J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2000, 16: 221–241.
- [26] SIMKHADA J R, CHO S S, HONG S C, et al. A new thermostable alkaline phospholipase D from *Streptomyces* sp. CS628[J]. *Biotechnology Bioengineering*, 2010, 15(4): 595–602.
- [27] WEBER E J. Compositions of commercial corn and soybean lecithins[J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1981, 58(10): 898–901.
- [28] 杨伟东, 马亚宁. 磷脂酰丝氨酸的制备与研究进展[J]. *北方农业学报*, 2009(4): 83–84. [YANG W D, MA Y N. Preparation and research advance of phosphatidylserine[J]. *Journal of Northern Agriculture*, 2009(4): 83–84.]
- [29] 张业尼, 路福平, 李玉, 等. 磷脂酰丝氨酸合成酶基因的克隆及在枯草芽孢杆菌中的表达[J]. *中国生物工程杂志*, 2008, 28(9): 56–60. [ZHANG Y N, LU F P, LI Y, et al. Cloning of the phosphatidylserine synthase gene and its secretive expression in *Bacillus subtilis*[J]. *China Biotechnology*, 2008, 28(9): 56–60.]
- [30] 周彦峰, 张涛, 江波, 等. 磷脂酰丝氨酸的酶法制备与分离研究进展[J]. *中国油脂*, 2018, 43(10): 5. [ZHOU Y F, ZHANG T, JIANG B, et al. Advance in enzymatic preparation and separation of phosphatidylserine[J]. *China Oils and Fats*, 2018, 43(10): 5.]
- [31] 黄婷婷. 磷脂酶 D 的重组优化表达及生物转化制备磷脂酰丝氨酸[D]. 无锡: 江南大学, 2019. [HUANG T T. Recombinant expression of phospholipase D and biosynthesis of phosphatidylserine[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2019.]
- [32] ZHANG X, LI B, WANG J, et al. High-yield and sustainable production of phosphatidylserine 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.
- [33] DUAN Z Q. Efficient synthesis of phosphatidylserine in 2-methyltetrahydrofuran[J]. *J Biotechnol*, 2013, 163(1): 45–49.
- [34] MAO S, ZHANG Z, MA X, 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.
- [35] 冯小娜, 齐娜, 宋伟, 等. 蛋白质工程改造磷脂酶 D 提高磷脂酰丝氨酸产量[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(17): 7. [FENG X N, QI N, SONG W, et al. Protein engineering of phospholipase D to improve the production of phosphatidylserine[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(17): 7.]
- [36] LI M, ZHOU Y, DUAN X, et al. Characterization of a phospholipase D from *Streptomyces cinnamomeum* SK43.003 suitable for phosphatidylserine synthesis[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2021.
- [37] 钱娟, 庞洋, 王昕. 磷脂酶 D 的制备及催化磷脂酰胆碱合成磷脂酰丝氨酸[J]. *中国油脂*, 2017, 42(9): 6. [QIAN J, PANG Y, WANG X, et al. Preparation of phospholipase D and catalytic synthesis of phosphatidylserine from phosphatidylcholine[J]. *China Oils and Fats*, 2017, 42(9): 6.]
- [38] CHOOJIT S, BORNSCHEUER U T, UPAICHIT A, et al. Efficient phosphatidylserine synthesis by a phospholipase D from *Streptomyces* sp. SC734 isolated from soil-contaminated palm oil[J]. *European Journal of Lipid Science*, 2016, 118(5): 803–813.
- [39] 侯海娟. 磷脂酶 D 的重组表达及其在磷脂酰丝氨酸合成中的应用[D]. 无锡: 江南大学, 2019. [HOU H J. Recombinant expression of phospholipase D and its application in synthesizing phosphatidylserine[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2019.]
- [40] WU J Q, XU X M, WANG D L, et al. Immobilization of phospholipase D on macroporous SiO₂/cationic polymer nano-composited support for the highly efficient synthesis of phosphatidylserine[J]. *Enzyme Microb Technol*, 2020, 142: 109696.
- [41] ZHOU Y, TIAN S, QIAN L, et al. DHA-enriched phosphatidylserine ameliorates non-alcoholic fatty liver disease and intestinal dysbacteriosis in mice induced by a high-fat diet[J]. *Food & Function*, 2021, 12(9): 4021–4033.
- [42] 于刚, 张慧, 王玉明, 等. 酶催化制备富含多不饱和脂肪酸的磷脂酰丝氨酸及其抗肿瘤活性研究[J]. *广东农业科学*, 2011, 38(12): 1–4. [YU G, ZHANG H, WANG Y M, et al. Study on enzymatic preparation of n-3 polyunsaturated fatty acid phosphatidylserine with anti-tumor activity[J]. *Guangdong Agricultural Sci-*

ences, 2011, 38(12): 1-4.]

[43] 魏珺楠, 唐兴, 孙勇, 等. 新型生物质基平台分子 γ -戊内酯的应用[J]. 化学进展, 2016(11): 1672-1681. [WEI J N, TANG X, SUN Y, et al. Applications of novel biomass-derived platform molecule γ -valerolactone[J]. Progress in Chemistry, 2016(11): 1672-1681.]

[44] 胡飞. 磷脂酶 D 制备及其催化合成磷脂酰丝氨酸研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2013. [HU F. Study on the preparation of phospholipase D and its application to the synthesis of phosphatidylserine[D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2013.]

[45] 赵云. 脂肪酸甲酯的合成及其作为绿色溶剂在水乳剂中的应用[D]. 长春: 吉林大学, 2014. [ZHAO Y. The preparation of fatty acid methyl ester and application as green solvent in oil-water emulsion formation[D]. Changchun: Jilin University, 2014.]

[46] BI Y H, DUAN Z Q, DU W Y, et al. Improved synthesis of pho-

sphatidylserine using bio-based solvents, limonene and p-cymene[J]. *Biotechnology Letters*, 2015, 37(1): 115-119.

[47] 师维, 李煜惠, 锁显, 等. 离子液体选择性萃取分离磷脂酰丝氨酸和磷脂酰胆碱[J]. 化工学报, 2017, 68(9): 3442-3450.

[SHI W, LI Y H, SUO X, et al. Selective separation of phosphatidylserine and phosphatidylcholine with ionic liquids as extractants[J]. *Journal of Chemical Industry and Engineering*, 2017, 68(9): 3442-3450.]

[48] YANG S L, DUAN Z Q. Insight into enzymatic synthesis of phosphatidylserine in deep eutectic solvents[J]. *Catalysis Communications*, 2016, 86: 16-19.

[49] MBOUS Y P, HAYYAN M, HAYYAN A, et al. Applications of deep eutectic solvents in biotechnology and bioengineering—Promises and challenges[J]. *Biotechnology Advances*, 2017, 35(2): 105-134.