

# 磷脂酶 D 的纯化及催化制备磷脂酰丝氨酸研究

夏禹, 张涛, 江波

(江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 江苏无锡 214122)

**摘要:**采用硫酸铵分级沉淀、离子交换层析和凝胶层析对广岛链霉菌 SK43.001-11 发酵液中的磷脂酶 D 进行纯化, 并对双液相体系中酶法制备磷脂酰丝氨酸的工艺进行研究。结果表明, 纯化后, 磷脂酶 D 比酶活提高到 49.48 U/mg, 是粗酶液的 54.37 倍, 回收率为 32.31%。磷脂酶 D 双液相催化制备磷脂酰丝氨酸的最佳条件为: 有机相为乙醚, pH 6.5, 反应温度 30℃, L-丝氨酸与磷脂酰胆碱质量比 15:1, 有机相与水相体积比 1:1, 反应时间 2.5 h。在最佳条件下, 磷脂酰丝氨酸生成率达到 74.8%。

**关键词:**磷脂酶 D; 纯化; 磷脂酰丝氨酸; 酶法; 丝氨酸; 磷脂酰胆碱

中图分类号: TQ645.9; O629.7 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2020)01-0097-05

## Purification of phospholipase D and catalytic preparation of phosphatidylserine

XIA Yu, ZHANG Tao, JIANG Bo

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

**Abstract:** The phospholipase D (PLD) in the fermentation broth of *Streptomyces hiroshimensis* SK43.001-11 was purified by ammonium sulfate fractionation, ion exchange chromatography and gel chromatography. The process of enzymatic preparation of phosphatidylserine catalyzed by PLD in two-liquid phase system was studied. The results showed that after purification, the specific enzyme activity of PLD increased to 49.48 U/mg, which was 54.37 times of the crude enzyme solution, and the recovery rate was 32.31%. The optimal conditions for the two-liquid phase catalytic reaction were obtained as follows: with diethyl ether as organic phase, pH 6.5, reaction temperature 30℃, mass ratio of L-serine to phosphatidylcholine 15:1, volume ratio of organic phase to aqueous phase 1:1 and reaction time 2.5 h. Under these conditions, the phosphatidylserine production rate reached 74.8%.

**Key words:** phospholipase D; purification; phosphatidylserine; enzymatic method; serine; phosphatidylcholine

磷脂酰丝氨酸作为一种新资源食品, 具有改善阿尔茨海默病、治疗抑郁症和缓解精神压力等作用<sup>[1-9]</sup>, 市场前景十分广阔。随着人们生活节奏的加快, 生活压力加大, 再加上我国逐渐步入老龄化社会, 未来人们对磷脂酰丝氨酸的需求也会越来越大, 实现其大规模工业化生产也变得更加重要。

目前市售的磷脂酰丝氨酸产品大多是从豆类或动物肝脏组织中提取的, 成本较高, 安全性也存在问

题<sup>[10-11]</sup>。利用磷脂酶 D 酶法制备磷脂酰丝氨酸具有条件温和、产品得率高和生产成本低等优点<sup>[12]</sup>, 具有重要的研究和生产价值。酶法合成磷脂酰丝氨酸主要取决于起催化作用的磷脂酶 D, 但目前市售的磷脂酶 D 主要是从植物中提取, 种类少、转酯活力低、价格高, 限制了磷脂酶 D 的应用。

本文通过对广岛链霉菌所产磷脂酶 D 进行纯化, 并将其用于制备磷脂酰丝氨酸, 以期对磷脂酶 D 和磷脂酰丝氨酸的工业化生产打下基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验材料

##### 1.1.1 菌株与试剂

广岛链霉菌 SK43.001-11, 由本实验室诱变筛

收稿日期: 2019-05-01; 修回日期: 2019-08-20

作者简介: 夏禹 (1995), 男, 在读硕士, 研究方向为食品生物技术 (E-mail) XY18352538566@163.com。

通信作者: 张涛, 教授, 博士 (E-mail) zhangtao@jiangnan.edu.cn。

选获得;L-丝氨酸、蛋黄卵磷脂、乙醚、乙酸乙酯、石油醚、三氯甲烷、二氯甲烷、环己烷等,购自国药化学试剂有限公司;磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰丝氨酸(PS)标准品,购自西格玛奥德里奇贸易有限公司;甲醇、异丙醇、正己烷、三乙胺均为色谱纯。

### 1.1.2 仪器与设备

HYL-B型恒温摇床,AKTA avant 25、AKTA purifier 10 蛋白纯化系统,Waters1525 型高效液相色谱仪,ELSD3300 蒸发光散射检测器。

### 1.1.3 培养基

斜面培养基:葡萄糖 15 g/L,麦芽糖 10 g/L,酵母提取物 2 g/L,琼脂 20 g/L,pH 7.0~7.4,115℃ 灭菌 30 min。

种子培养基:葡萄糖 10 g/L,酵母提取物 20 g/L,蛋白胨 5 g/L, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  2 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5 g/L,pH 7.0~7.4,115℃ 灭菌 30 min。

发酵培养基:葡萄糖 10 g/L,牛肉浸膏 5 g/L,蛋白胨 5 g/L, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  2 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5 g/L,pH 7.0~7.4,115℃ 灭菌 30 min。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 粗酶液制备

(1)斜面制备:将广岛链霉菌 SK43.001-11 接种于试管斜面,28℃ 培养 7 d。

(2)种子液制备:从斜面上用接种环挑取 1 环单菌落接入种子培养基中,装液量 50 mL/250 mL,在 28℃、200 r/min 的摇床中培养 1.5 d。

(3)发酵培养:按 4% 的接种量将种子液接种于发酵培养基中,装液量 50 mL/250 mL,在 28℃、200 r/min 的摇床中发酵培养 7 d。

(4)粗酶液制备:将发酵液于 4℃、6 000 r/min 离心 20 min,弃去沉淀,取上清液经 0.45 μm 滤膜过滤,滤液即为粗酶液。

### 1.2.2 粗酶液的纯化

向粗酶液中加入硫酸铵至体系饱和度为 40%,4℃ 静置 2 h 后,离心除去沉淀,再向上清中加入硫酸铵至体系饱和度达到 60%,4℃ 静置 2 h 后,离心收集沉淀,复溶于柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(50 mmol/L,pH 5.0)中,4℃ 透析脱盐。将透析液上样于 Hitrap SP HP 阳离子交换柱,用含 1 mol/L NaCl 的同种缓冲液进行梯度洗脱,测定各洗脱峰的酶活,收集有磷脂酶 D 活力的洗脱峰,用超滤离心管浓缩。再将浓缩液上样于 Superdex 200 10/300 GL 凝胶层析柱,用含 0.5 mol/L NaCl 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(50 mmol/L,pH 5.0)洗脱,测定各洗脱峰的酶活,收集有磷脂酶 D 活力的洗脱峰。

### 1.2.3 酶活测定

取 0.5 g 蛋黄卵磷脂溶于 1 mL 乙醚中,加入 10 mL 去离子水振荡形成乳液。依次向离心管中加入 100 μL 乳液、100 μL 柠檬酸缓冲液(0.1 mol/L,pH 6.0)、150 μL 7.5% 曲拉通 X-100、50 μL 0.1 mol/L  $CaCl_2$  和 100 μL 酶液,充分混匀后,37℃ 水浴 10 min。加入 200 μL 含有 50 mol/L EDTA 的 Tris-HCl 缓冲液(0.1 mol/L,pH 8.0),沸水浴 5 min 终止反应<sup>[13-14]</sup>。室温冷却后,加入 2 mL 由 Tris-HCl 缓冲液(0.1 mol/L,pH 8.0)配制的显色剂(含 2 mg/mL 4-氨基安替比林、0.5 mg/mL 苯酚和 10 mg/mL 曲拉通 X-100),再加入 20 μL 100 U/mL 胆碱氧化酶和 10 μL 200 U/mL 过氧化酶,混匀后置于 37℃ 水浴中反应 20 min,于 500 nm 处测定吸光度。空白组采用去离子水代替酶液,同样操作下测定。酶活定义:将 37℃、1 min 内生成 1 μmol 胆碱所需要的酶量定义为 1 个酶活力单位(U)。

### 1.2.4 蛋白含量的测定

按 Lorry 法对酶液的蛋白含量进行检测。

### 1.2.5 PS 的初始制备反应体系

20 mg 磷脂酰胆碱溶于 10 mL 乙醚中,0.35 g L-丝氨酸溶于 4 mL 乙酸-乙酸钠缓冲液中(20 mmol/L,pH 5.5),加入 1 mL 酶液(4 U),混合后置于具塞锥形瓶中,28℃ 恒温振荡反应 2 h 后停止反应。

### 1.2.6 磷脂酰胆碱和 PS 的检测

取 0.5 mL 1.2.5 反应结束后有机相,通风橱室温挥发,用同等体积甲醇-三氯甲烷(体积比 2:1)复溶后,经 0.22 μm 有机系滤膜过滤,用高效液相-蒸发光散射检测器检测磷脂酰胆碱和 PS 的含量。

色谱分析条件:Sepax HP-Silica 色谱柱(5 μm,250 mm×4.6 mm),流动相 A 为甲醇-水-醋酸-三乙胺(体积比 85:15:0.5:0.05),流动相 B 为异丙醇-流动相 A-正己烷(体积比 20:32:48)。色谱柱温 40℃,流速 1.0 mL/min,检测器漂移管温度 70℃,气体流速 1.5 mL/min,进样量 10 μL,洗脱程序如表 1 所示。

表 1 HPLC-ELSD 梯度洗脱程序

时间/min	A 相/%	B 相/%
0	0	100
5	0	100
15	22	78
27	90	10
28	0	100
32	0	100

### 1.2.7 PS生成率的计算

PS生成率 = PS产量/磷脂酰胆碱初始添加量 × 100%

## 2 结果与讨论

### 2.1 磷脂酶D的纯化

磷脂酶D的分步纯化结果如表2所示。

由表2可知:粗酶液经硫酸铵分级沉淀初步纯

化后,比酶活提高到2.58 U/mg,被纯化了2.84倍;Hitrap SP HP 阳离子交换层析除去了溶液中的大量杂蛋白,比酶活达到40.67 U/mg,将磷脂酶D纯化了44.69倍;最后经Superdex 200 10/300 GL凝胶层析纯化后,得到了纯化倍数为54.37、回收率为32.31%、比酶活为49.48 U/mg的电泳纯的磷脂酶D。

表2 广岛链霉菌产磷脂酶D的纯化结果

纯化步骤	总蛋白量/mg	总活力/U	比酶活/(U/mg)	纯化倍数	回收率/%
粗酶液	574.03	524.02	0.91	1.00	100.00
硫酸铵沉淀	167.90	432.91	2.58	2.84	82.61
Hitrap SP HP 阳离子交换层析	7.95	323.34	40.67	44.69	61.70
Superdex 200 10/300 GL凝胶层析	3.42	169.32	49.48	54.37	32.31

### 2.2 PS的酶法合成工艺

#### 2.2.1 有机溶剂的影响

由于磷脂酶D是亲水性的,而其作用的磷脂底物却是亲油性的,因此这类反应大多在由水相和有机相组成的双液相体系中进行。在这样的反应体系中,有机溶剂不可避免会对磷脂酶D的催化反应有所影响。有机溶剂对酶的催化反应的影响体现在以下几个方面:①由于极性的差异,有机溶剂会影响两相中底物和产物的分配和扩散,使反应的平衡常数和速率常数发生变化;②有机溶剂直接与酶必需的水化层发生作用,间接影响酶的活力;③有机溶剂直接作用于酶分子,改变维持蛋白质构型的氢键和疏水作用等,导致酶活性的降低甚至失活<sup>[15]</sup>。

为了找出有利于转酯反应的有机相,仅改变有机溶剂的种类,其他条件见1.2.5,考察有机溶剂对PS生成率的影响,结果如图1所示,各有机溶剂的极性如表3所示。

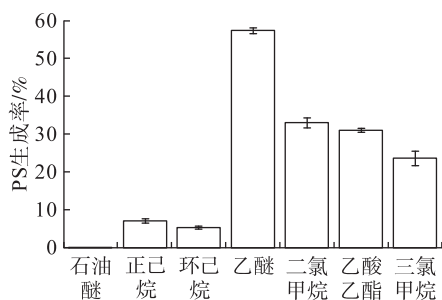


图1 不同有机溶剂对PS生成率的影响

表3 不同有机溶剂的极性

石油醚	正己烷	环己烷	乙醚	二氯甲烷	乙酸乙酯	三氯甲烷
0.01	0.06	0.1	2.9	3.4	4.3	4.4

由图1可看出,有机相为石油醚时,基本无PS生成,正己烷和环己烷为有机相时,PS生成率在6%左右,二氯甲烷、三氯甲烷和乙酸乙酯为有机相时,

PS生成率在30%左右,乙醚为有机相时,PS生成率最高,达57.2%。结合表3可以看出,PS的生成率随着有机相溶剂的极性增大呈现出先升高后降低的趋势,因此选择乙醚作为后续实验的有机相,这与张忆雪<sup>[16]</sup>的选择一致。

#### 2.2.2 pH的影响

酶的催化反应需要一定的pH条件,否则导致反应不发生或有副反应发生,不利于目的反应进行。每种酶都有其最适pH,偏离最适pH时,酶分子的极性基团发生不同程度的解离,酶活性降低。当pH偏离较大时,酶的三级结构也会发生变化,引起酶的变性。为探究pH对PS生成率的影响,调节缓冲液pH分别为4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5和8.0,其他条件见1.2.5,结果如图2所示。

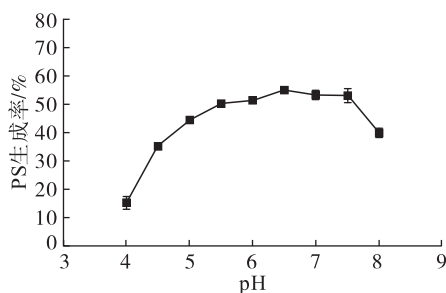


图2 pH对PS生成率的影响

从图2可以看出,随着pH的增大,PS生成率先升高后降低,反应适宜在偏酸性条件下进行。pH低于5.5时,PS生成率随pH变化明显,pH高于7.5时,PS生成率随pH升高而出现下降趋势,在pH 5.5~7.5范围内,pH对PS生成率的影响不大,PS生成率在55%左右,pH 6.5时PS生成率最高,达58.1%。因此,选择pH 6.5进行后续反应优化。

#### 2.2.3 反应温度的影响

反应温度对酶催化反应的影响比较复杂,反应

温度既可以影响酶的催化反应速率,也对酶蛋白的稳定性有所影响。随着反应温度的升高,反应物的能量被提高,底物与酶的碰撞加剧,反应速度加快。当反应温度高于酶催化反应最适温度后,部分酶蛋白会发生变性,降低了酶催化反应效率。不仅如此,随着反应温度的升高,酶的活性中心结构会发生一定变化,影响底物和酶的结合,从而影响酶催化反应速度及选择性。

由于选用乙醚作为有机相,考虑到乙醚的沸点(35℃)较低,实验选择了5个不同的反应温度进行PS生成率考察。调节缓冲液pH为6.5,其他条件见1.2.5,结果如图3所示。

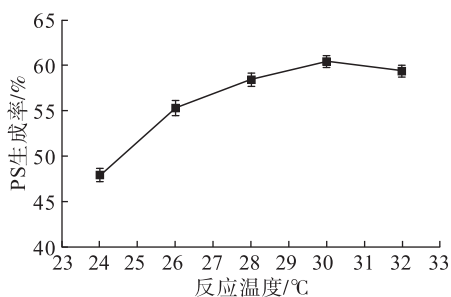


图3 反应温度对PS生成率的影响

从图3可以看出,随着反应温度的升高,PS生成率增大,当反应温度为30℃时,PS生成率最高,当反应温度继续升高后,PS生成率则出现下降趋势。由此可以判定,30℃为此体系催化合成PS的最适反应温度。

#### 2.2.4 底物质量比的影响

有机相选用乙醚,缓冲液pH为6.5,反应温度为30℃,固定有机相中磷脂酰胆碱的浓度,改变水相中L-丝氨酸用量,其他条件见1.2.5,底物质量比对PS生成率的影响如图4所示。

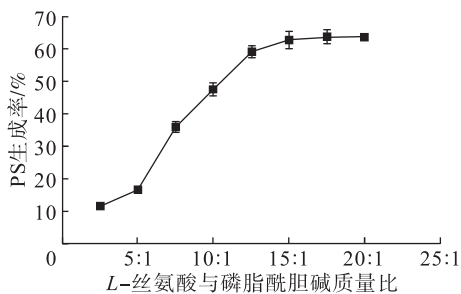


图4 底物质量比对PS生成率的影响

从图4可以看出,当L-丝氨酸与磷脂酰胆碱质量比较低时,PS生成率较低,随着质量比的增大,PS生成率增大,这是由于L-丝氨酸作为反应的底物之一,其用量增大,可促进PS的生成。继续提高底物质量比,PS生成率变化不大。考虑原料成本,控制反应体系中L-丝氨酸与磷脂酰胆碱质量比为

15:1。

#### 2.2.5 有机相与水相体积比的影响

有机相选用乙醚,缓冲液pH为6.5,反应温度为30℃,L-丝氨酸添加量为0.3g,仅改变有机相的体积,其他条件见1.2.5,有机相与水相体积比对PS生成率的影响如图5所示。

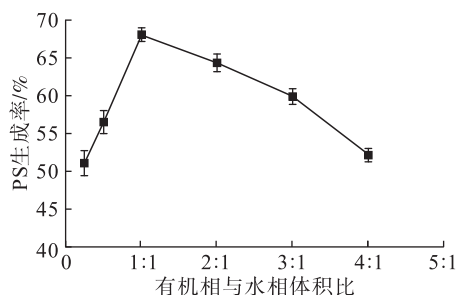


图5 有机相与水相体积比对PS生成率的影响

从图5可以看出,当有机相与水相体积比小于1:1时,PS生成率随两相体积比的增大而增大,这是因为随着两相体积比的增大,两相界面面积增大,水相中的酶与有机相中底物的接触概率增大,从而提高了PS生成率。两相体积比继续增大时,虽然底物和磷脂酶D的接触概率提高,但酶更容易与有机溶剂接触,酶的活性降低,因此PS生成率逐渐下降。所以调整反应体系中有有机相与水相体积比为1:1。

#### 2.2.6 PS的合成反应进程

对双液相体系酶法制备PS工艺进行优化后,得到最优反应条件:有机相为乙醚,pH6.5,反应温度30℃,L-丝氨酸与磷脂酰胆碱质量比15:1,有机相与水相体积比1:1。在最优条件下进行PS合成,定时取样检测各磷脂组分含量,结果如图6所示。

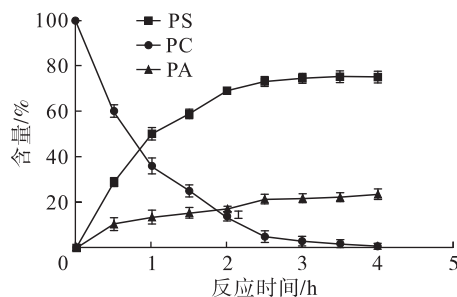


图6 磷脂酰丝氨酸合成反应进程

由图6可以看出:底物在2.5h后几乎被完全消耗;在合成PS的过程中,有副产物磷脂酸(PA)产生,这表明转酯反应过程中有水解反应发生;产物PS含量在反应2.5h后变化不大,即最佳反应时间为2.5h,此时PS生成率为74.8%。本实验广岛链霉菌所产磷脂酶D的PS生成率略低于严明等<sup>[17]</sup>的固定化磷脂酶D 78.6%的生成率,但与张忆雪<sup>[16]</sup>、Hosokawa<sup>[18]</sup>等相比,PS生成率提高了约40%,高于

已报道的大多数磷脂酶 D<sup>[19-21]</sup>,说明可以应用于 PS 的酶法合成。

### 3 结论

胞外粗酶液通过硫酸铵沉淀、Hitrap SP HP 阳离子交换层析和 Superdex 200 10/300 GL 凝胶层析纯化后,磷脂酶 D 比酶活由 0.91 U/mg 提高到 49.48 U/mg,是粗酶液的 54.37 倍,回收率为 32.31%。双液相体系酶法制备磷脂酰丝氨酸工艺研究表明,在以乙醚为有机相、pH 6.5、反应温度 30℃、L-丝氨酸与磷脂酰胆碱质量比 15:1、有机相与水相体积比 1:1 条件下反应 2.5 h,底物基本被消耗完,此时磷脂酰丝氨酸生成率达到 74.8%。

### 参考文献:

- [1] CROOK T, PETRIE W, WELLS C, et al. Effects of phosphatidylserine in Alzheimer's disease[J]. Ann New York Acad Sci, 1991, 640(1): 245-249.
- [2] HASHIOKA S, HAN Y H, FUJII S, et al. Phosphatidylserine and phosphatidylcholine - containing liposomes inhibit amyloid  $\beta$  and interferon -  $\gamma$  - induced microglial activation[J]. Free Radic Biol Med, 2007, 42(7): 945-954.
- [3] ENGEL R R, SATZGER W, GÜNTHER W, et al. Double-blind cross-over study of phosphatidylserine vs. placebo in patients with early dementia of the Alzheimer type[J]. Eur Neuropsychopharm, 1992, 2(2): 149-155.
- [4] SUZUKI S, YAMATOYA H, SAKAI M, et al. Administration of soybean lecithin transphosphatidylated phosphatidylserine improves memory impairment in aged rats[J]. J Nutr, 2001, 131(11): 2951-2956.
- [5] CLARO F T, PATTI C L, ABILIO V C, et al. Bovine brain phosphatidylserine attenuates scopolamine induced amnesia in mice[J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psych, 2006, 30(5): 881-886.
- [6] BLOKLAND A, HONIG W, BROWNS F, et al. Cognition-enhancing properties of subchronic phosphatidylserine (PS) treatment in middle-aged rats: comparison of bovine cortex PS with egg PS and soybean PS[J]. Nutrition, 1999, 15(10): 778-783.
- [7] CASTILHO J C, PERRY J C, ANDREATINI R, et al. Phosphatidylserine: an antidepressive or a cognitive enhancer[J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psych, 2004, 28(4): 731-738.
- [8] MAGGIONI M. Effects of phosphatidylserine therapy in geriatric patients with depressive disorders[J]. Acta Psych Scand, 2010, 81(3): 265-270.
- [9] HELLHAMMER J, FRIES E, BUSS C, et al. Effects of soy lecithin phosphatidic acid and phosphatidylserine complex (PAS) on the endocrine and psychological responses to mental stress[J]. Int J Biol Stress, 2004, 7(2): 119-126.
- [10] 毕艳兰. 油脂化学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 179-183.
- [11] 胡飞, 段章群, 王淮, 等. 生物酶法制备磷脂酰丝氨酸的研究进展[J]. 中国油脂, 2012, 37(6): 54-58.
- [12] 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): 53-57.
- [13] 梁丽敏, 刘春风, 杜阳吉. 产磷脂酶 D 链霉菌发酵条件优化[J]. 粮食与油脂, 2015, 25(2): 55-58.
- [14] MAD'YAROV S R. Isolation, purification, stabilization and characterization of phospholipase d preparations from *Raphanus sativus longipinnatus* [J]. Chem Nat Compd, 2012, 48(4): 552-554.
- [15] 王兴国, 裘爱泳. 磷脂酶 D 催化反应中的有机溶剂效应[J]. 无锡轻工大学学报(食品与生物技术), 1995, 11(3): 212-220.
- [16] 张忆雪. 酶法制磷脂酰丝氨酸[D]. 北京: 北京化工大学, 2013.
- [17] 严明, 高璐, 魏森, 等. 一种固定化磷脂酶 D 催化制备磷脂酰丝氨酸的方法: CN 103966277A [P]. 2014-08-06.
- [18] HOSOKAWA M, SHIMATANI T, KANADA T, et al. Conversion to docosahexaenoic acid - containing phosphatidylserine from squid skin lecithin by phospholipase D-mediated transphosphatidylation[J]. J Agric Food Chem, 2000, 48(10): 4550-4554.
- [19] 宋晚平, 任静, 王磊, 等. 一种粉末磷脂酰丝氨酸的制备方法: CN 101230365 [P]. 2008-07-30.
- [20] 姚娜. 磷脂酶 D 转化大豆磷脂合成磷脂酰丝氨酸工艺开发[D]. 西安: 西北大学, 2012.
- [21] 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]. 江苏 无锡: 江南大学, 2014.