

doi: 103969/j. issn. 0490-6756. 2016. 01. 036

# 磷脂酶 D 产生菌株的筛选及其转磷脂化反应特性

石 创, 张 薇, 王一丁

(四川师范大学生命科学学院, 成都 610101)

**摘 要:** 采用磷脂平板筛选法, 从土壤中筛选出一株 1 株能够降解磷脂的菌株 SNUPLD-6. 经验证 SNUPLD-6 产的磷脂酶为胞外酶含有高效磷脂酶 D(PLD). 对该菌形态特及 ITS 序列进行分析, 将其鉴定为地霉属的白地霉(*Geotrichum candidum*). 对该菌的生长条件及该菌产的 PLD 的转磷脂化反应的条件进行优化, 实验结果表明: 该菌株的最适生长温度为 30℃, 最适 pH 为 6, 最适碳源为葡萄糖, 最适氮源为牛肉膏和蛋白胨各 50%. 该菌产 PLD 最适发酵周期为 3d. 该 PLD 的转磷脂化反应最适反应温度为 32℃, 最适 pH 为 5.5, 最适的反应缓冲液为 0.02M 的醋酸-醋酸钠缓冲液, 最适的金属离子激活剂为  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ .

**关键词:** 磷脂酶 D(PLD); 转磷脂化反应活性; 磷脂酰丝氨酸; 白地霉

**中图分类号:** Q93      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0490-6756(2016)01-0215-06

## Screening of a phospholipase D producing strain and its transphosphatidylation activity

SHI Chuang, ZHANG Wei, WANG Yi-Ding

(College of Life Science, Sichuan Normal University, Chengdu 610101, China)

**Abstract:** A strain which can degrade phospholipids was isolated from soil by screening. The experiments showed that the phospholipase production by SNUPLD-6 was extracellular enzyme and had efficient phospholipase D. According to its morphological characteristics and ITS sequence analysis, the strain SNUPLD-6 was identified as *Geotrichum candidum*. The growth conditions of the strain and the transphosphatidylation reaction conditions of the PLD was optimized. The results showed that the optimum conditions for the strain were: temperature at 30℃, the pH 6.0, the best carbon source was glucose, the best nitrogen source were beef extract and peptone 50% each. The optimum fermentation period of phospholipase D producing was 3 days. The optimum transphosphatidylation temperature of the phospholipase D was at 32℃, the pH was 6.0, reaction buffer was 0.02M acetic acid-sodium acetate buffer, the optimum metalions activator was  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$ .

**Key words:** Phospholipase D (PLD); Transphosphatidylation activity; Phosphatidylserine; *Geotrichum candidum*

## 1 引言

脂酰丝氨酸(PS)具有预防老年痴呆症、改善

记忆力等功能,另外对促进脑疲劳的恢复、平衡情绪、缓解抑郁也有一定的疗效.天然的PS很少,主要存在于植物种籽、动物的脑及肝脏中.目前提取

收稿日期: 2014-11-21

基金项目: 四川省高校重点实验室开放项目(SCYZ201408)

作者简介: 石创(1988-),男,湖北黄梅人,硕士,研究方向为应用与环境微生物,E-mail: scsisnu@163.com

通讯作者: 王一丁. Email: wangyiding@sicnu.edu.cn

PS是以动物组织中提取为主,提取PS大部分是以牛、羊、兔、马、驴等家畜的动物脑为原料.随着家畜致病因素的增多,用动物组织提取的PS产品安全性受到人们质疑,而生物酶法制备PS在生产时有反应条件温和和对环境无害,另外还有产品质量安全等优点,近年来受到越来越多的关注.

磷脂酶D(PLD)是一种能作用于磷酸氧键的酶,除水解作用外,还可以催化一些含羟基的化合物结合到磷脂的酰基上,形成新的磷脂,这一特性称为PLD的转磷脂化反应,也称碱基交换反应,可以利用PLD对磷脂进行改性,尤其是PLD催化的转磷脂化反应,为制备单一磷脂和稀有磷脂提供了可靠的途径.PLD的分布很广泛,在动植物和微生物中均有分布.目前报道的产PLD的微生物主要集中在细菌、真菌中的酵母,尤其是链霉菌<sup>[1-3]</sup>.在目前众多的测定PLD活性的资料中,更多的是在测定PLD的总活性<sup>[4-6]</sup>,对PLD的转磷脂活性单独研究的较少.即使涉及到转磷脂反应,主要也是在研究磷脂酰丝氨酸的合成工艺或者反应原理<sup>[7-20]</sup>,从而提高磷脂酰丝氨酸转化率.本文从榨大豆油坊附近的土样中筛选出一株产PLD的菌株,研究不同的培养条件对该菌株生长情况的影响,以及该菌株产的PLD转磷脂反应活性的最适条件,为工业生产中改进和完善PLD转磷脂反应提供一些理论依据.

## 2 材料和方法

### 2.1 实验材料

2.1.1 菌种来源 榨大豆油坊附近的土样.

2.1.2 实验用培养基

富集培养基:蛋黄5%,氯化钠0.3%,榨大豆油坊附近的土样1%,pH自然.

分离培养基:氯化钠0.3%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, $CaCl_2$ 0.1%,琼脂2%,50%卵磷脂1%,pH为6.5~7.5.

发酵培养基:葡萄糖1%,牛肉膏0.75%,蛋白胨0.75%,氯化钠0.3%, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1%,pH为6.5~7.5.

2.1.3 实验仪器 PHS-4C+酸度计,沈阳众博铭诚科技有限公司.美国致微/GI54DW立式灭菌锅,上海旦鼎国际贸易有限公司.博医康/FD-1A-50冷冻干燥剂,北京博医康实验仪器有限公司.湘仪/HI850R高速冷冻离心机,长沙湘仪离心机有限公司.ZWYR-2102C恒温培养振荡器,上海智成

分析仪器有限公司.岛津-20A高效液相色谱仪,日本岛津仪器公司.

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 菌株的筛选

1)菌株的富集与分离 取1g土样接入50mL的富集培养基,32℃,220r/min,150min,待卵磷脂乳化后再调置180r/min下活化21.5h.将富集培养液稀释至 $1 \sim 10^{-7}$ 浓度,涂布于分离培养基上,32℃培养30h,挑取有透明圈的单菌落.

2)菌株的筛选与转磷脂化反应条件 将筛选出来的菌株在32℃,150r/min的条件下培养6d,6000r/min离心发酵液,取上清12mL加入到48mL pH=5.5的0.02M醋酸-醋酸钠缓冲液中,在其中溶解6g L-丝氨酸,与120mL溶解有1g 50%卵磷脂的乙醚混合,在32℃,200r/min反应60min.取反应后的有机相,将有机相蒸干后,得到样品,用高效液相色谱检测PS的含量.

#### 2.2.2 菌株的鉴定

1)菌株的形态和生理生化特征研究 用对数生长期菌液用来镜检,观察菌体的形态.

2)菌株生长曲线 接种量为3%(v/v)接种,测定1.5,3,4,6,8,10,12,14,16,20,24,32h的吸光度.

3)DNA的提取及PCR扩增 取发酵18h的发酵液离心5min,去上清,保留菌体.按真菌DNA提取试剂盒,来提取该菌的DNA为模板,以ITS1和ITS4为引物扩增菌株的ITS序列.PCR反应体系:Taq.PCR Master Mix25 $\mu$ L,DNA模板1 $\mu$ L,引物ITS1 2 $\mu$ L,引物ITS4 2 $\mu$ L,去离子水20 $\mu$ L.反应条件:94℃4min;94℃1min,55℃40s,72℃90s,循环35次;72℃延伸10min.由生工生物工程(上海)有限公司测序.

4)ITS序列的分析 用Blast比较ITS序列与Genbank中已登出的序列,调出与该菌株ITS序列同源并经过菌种鉴定的序列.

#### 2.2.3 菌株生长条件的优化

1)接种量对菌体浓度的影响 按体积比为1%,2%,3%,4%,5%,6%的量来接种,在pH=7,32℃,150r/min的条件下培养18h后,照测其吸光度( $OD_{600}$ ).

2)pH值对菌体浓度的影响 接种量为3%(v/v),用pH=5,6,7,8,9发酵培养基在32℃,150r/min的条件下培养18h后,测定发酵液的 $OD_{600}$ .

3)碳源对菌体浓度的影响 分别以葡萄糖,蔗糖,乳糖和麦芽糖为碳源培养18h后测定 $OD_{600}$ .

4) 氮源对菌体浓度的影响 分别以牛肉膏, 蛋白胨, 牛肉膏和蛋白胨, 硫酸铵为氮源培养 18h 后测定  $OD_{600}$ .

5) 温度对菌体浓度的影响  $26^{\circ}\text{C}$  到  $36^{\circ}\text{C}$  等梯度设置温度梯度,  $150\text{r}/\text{min}$  的条件下培养 18h 后, 测定各温度下的发酵液的吸光度 ( $OD_{600}$ ).

#### 2.2.4 测定方法和反应条件的优化

1) 转磷脂反应活性的测定方法 仪器: 岛津-20A; 柱子: Kromasil 100-5SIL  $250 \times 4.6\text{mm}$ ; 流动相: 乙腈: 甲醇: 磷酸 = 85:15:1.5<sup>[21]</sup>; 流速:  $1.0\text{mL}/\text{min}$ , 检测波长  $205\text{nm}$ , 时间 15min. 流速:  $1.0\text{mL}/\text{min}$ , 检测波长  $205\text{nm}$ , 时间 15min. 以氯仿为溶剂 5 到  $20\text{mg}/\text{mL}$  等梯度浓度的 PS 标准溶液, 作 PS 浓度与对应的峰面积之间的标准曲线  $y = ax + b$ . 用高效液相测出该样品中 PS 含量, 算出样品中 PS 质量做转磷脂反应活性的指标. 下文文中均已 PS 质量来表示转磷脂反应活性.

2) pH 对转磷脂活性的影响  $3.5$  到  $9.5$  等梯度来设置转磷脂反应体系的 pH, 反应 1h 后测定 PS 的含量.

3) 温度对转磷脂活性的影响  $28^{\circ}\text{C}$  到  $36^{\circ}\text{C}$  等梯度来设置转磷脂反应体系的温度, 反应 1h 测定 PS 的含量.

4) 菌体发酵时间与转磷脂活性的关系 将实验菌分别发酵 1, 2~7d 后, 发酵液上清作粗酶反应 1h 后测定 PS 的含量.

5) 反应时有机相和缓冲液体系与转磷脂活性的关系

以  $0.2\text{M}$ ,  $0.02\text{M}$  的醋酸-醋酸钠和柠檬酸-柠檬酸钠为缓冲液, 有机相为乙醚, 石油醚和乙酸乙酯. 两两组合为反应体系, 反应 1h 后测定 PS 含量.

6) 不同种类和浓度金属离子对转磷脂活性的影响

向缓冲液中加  $1\text{mM}$ ,  $5\text{mM}$ ,  $25\text{mM}$  的金属离子 ( $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ), 反应 1h 后测定 PS 含量.

## 3 实验结果

### 3.1 PLD 产生菌选择

从土样中分离出 6 株菌, 发现其均有分解卵磷脂的效果. 发酵 3d 后, 编号为 SNUPLD-6 的菌株发酵上清的 PLD 转磷脂化反应活性最高, 故而本实验以 SNUPLD-6 为实验菌.

### 3.2 菌株的形态和生长曲线

3.2.1 用齐氏石炭酸复红和乳酸石炭酸棉兰染液染色 用乳酸石炭酸棉兰染液和齐氏石炭酸复红

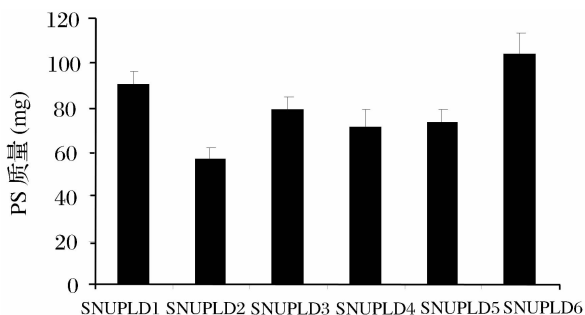


图 1 不同菌株的 PLD 转磷脂活性

Fig. 1 Different PLDs transphosphatidylase activity

染色后再显微镜下观察, 可以观察到菌体是丝状的如图 2、3, 并伴有孢子出现, 同时菌株 SNUPLD-6 在富集培养基上的单菌落形态: 菌落扁平、白色、干燥、边缘粗糙、干粉状, 初步判断该菌为真菌.

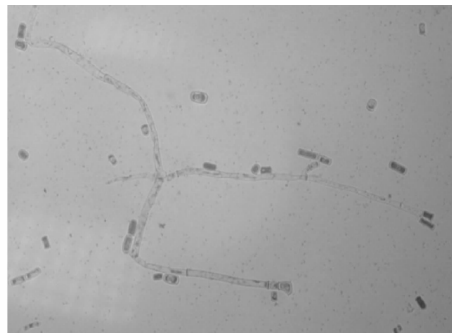


图 2 乳酸石炭酸棉兰染液染色

Fig. 2 lactic acid phenol median dye solution dyed

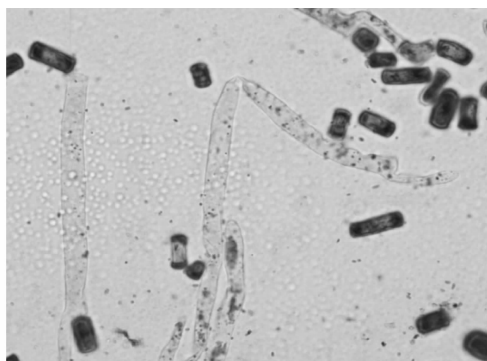


图 3 齐氏石炭酸复红染色

Fig. 3 Caesescus phenol complex red dye solution dyed

#### 3.2.2 菌株的生长曲线

由图 4 可知, 在接菌 3h 内该菌生长很缓慢处于适应期, 在接种 3 至 20h 之间为其生长最旺盛的时期, 20h 后处于稳定期. 由生长曲线可知, 接种 10h 左右的菌液适合做菌种, 以此来保证菌种的活力.

### 3.3 菌株的进化树

菌株的 ITS 序列在 NCBI 上进行 blast 比对, 该菌序列与地霉属的白地霉(*Geotrichum candidum*) 的同源性高达 99%, 将其鉴定为地霉属的白地霉. 将菌株测得的 ITS 序列, 在 NCBI 上进行 Blast 比对后选取相关序列, 用 MEGA5.10 作菌株的进化树如图 5, 其结果与鉴定的结果吻合.

### 3.4 生长条件的优化

控制接种量的不同, 发现在接种量为 3% (v/v) 时菌体浓度最大, 说明 SNUPLD-6 的最适接种量为 3%. 控制发酵在不同的 pH 下进行. 可知

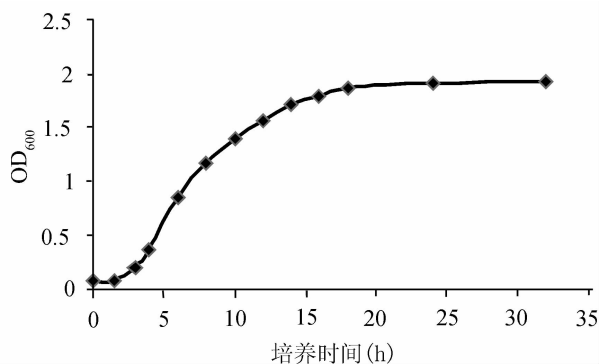


图 4 菌株生长曲线

Fig. 4 Strain growth curve

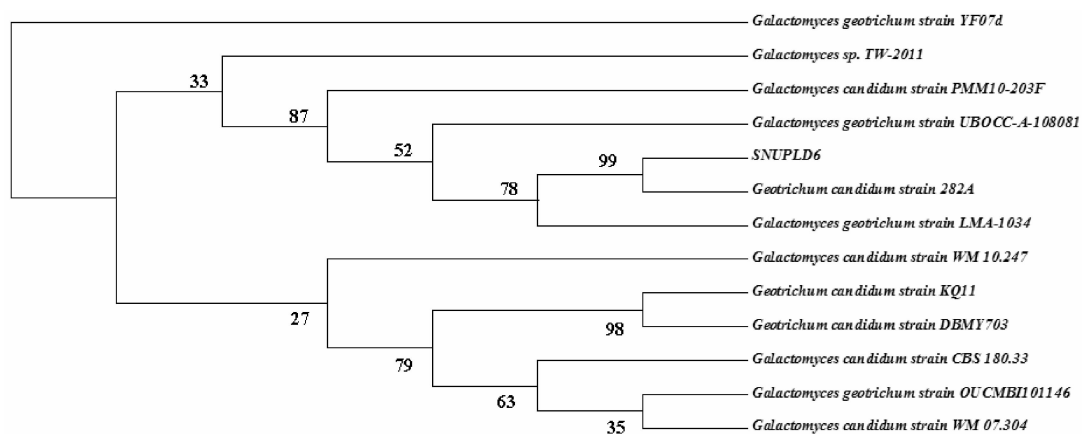


图 5 菌株的进化树

Fig5 Neighbor-joining tree of the strain

在 pH=6 时菌体的浓度最大, 说明菌株 SNUPLD-6 的最适生长 pH=6. 控制发酵在含不同碳源培养基中进行. 可知在以葡萄糖为碳源的发酵液中时菌体的浓度最大, 说明菌株 SNUPLD-6 的最适碳源是葡萄糖. 控制发酵在含不同氮源培养基中进行. 可知在以酵母浸粉、牛肉膏蛋白胨各 50% 为氮源的发酵液中时菌体的浓度最大, 说明菌株 SNUPLD-6 的最适氮源是酵母浸粉、牛肉膏蛋白胨各 50%. 控制发酵在不同温度下进行. 可见在以 30℃ 的发酵液中时菌体的浓度最大, 说明菌株 SNUPLD-6 的最适温度为 30℃ (表 1).

### 3.5 转磷脂反应条件的优化

由表 2 可知, 菌株 SNUPLD-6 的发酵液和发酵液离心后上清均有较高的转磷脂化反应活性, 而菌体的转磷脂化反应活性较低由此可见 SNUPLD-6 产的 PLD 分布于胞外发酵液中, 是胞外酶.

控制反应在不同的 pH 值下进行. 在 pH=5.5 的条件下时反应最终得到的 PS 的质量最大, 说明菌株 SNUPLD-6 产的 PLD 转磷脂反应的最适为 pH=5.5. 控制反应在不同的温度下进行. 在 32℃ 的条件下时反应最终得到的 PS 的质量最大, 说明菌株 SNUPLD-6 产的 PLD 转磷脂反应最适温度为 32℃. 控制菌株 SNUPLD-6 发酵时间. 可见在发酵 3d 后得到的菌液催化反应最终得到的 PS 的质量最大, 说明菌株 SNUPLD-6 产的 PLD 最佳发酵时间为 3d.

在反应时控制有机相和缓冲液的种类, 以及缓冲液的浓度. 由表 3 可知, 在以乙醚为有机相, 0.02M 醋酸-醋酸钠为缓冲液时反应最终得到的 PS 的质量最大. 说明该菌产的 PLD 的转磷脂化反应的最佳的体系是以乙醚为有机相, 0.02M 醋酸-醋酸钠为缓冲液的反应体系.

表 1 菌株生长条件的优化

Tab1 The growth conditions of the strain was optimized

| 条件     | OD <sub>600</sub> |      |      |               |      |      |      |      |      |      |
|--------|-------------------|------|------|---------------|------|------|------|------|------|------|
|        | 1                 | 2    | 3    | 4             | 5    | 6    | 7    |      |      |      |
| 接种量(%) | 1.26              | 1.54 | 1.82 | 1.75          | 1.67 | 1.61 | 1.51 |      |      |      |
| 培养时 pH | 5                 | 6    | 7    | 8             | 9    |      |      |      |      |      |
| 碳源     | 葡萄糖               | 蔗糖   | 乳糖   | 麦芽糖           |      |      |      |      |      |      |
|        | 1.8               | 0.6  | 0.9  | 1.1           |      |      |      |      |      |      |
| 氮源     | 酵母浸粉              | 牛肉膏  | 蛋白胨  | 50%牛肉膏+50%蛋白胨 |      |      | 硫酸铵  |      |      |      |
|        | 1.95              | 1.4  | 1.35 |               | 1.86 |      | 0.45 |      |      |      |
| 温度(°C) | 26                | 27   | 28   | 29            | 30   | 31   | 32   | 33   | 34   | 35   |
|        | 0.93              | 1.25 | 1.54 | 1.78          | 1.95 | 1.84 | 1.82 | 1.73 | 1.58 | 1.49 |

表 2 转磷脂化反应条件的优化

Tab2 the transphosphatidylolation reaction conditions of the PLD was optimized

| 条件          | 产 PS 质量(mg) |     |     |     |     |     |     |  |
|-------------|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
|             | 菌体          | 上清液 | 全菌液 |     |     |     |     |  |
| PLD 分布 (mg) | 11          | 135 | 143 |     |     |     |     |  |
| 反应 pH       | 3.5         | 4.5 | 5.5 | 6.5 | 7.5 | 8.5 | 9.5 |  |
|             | 45          | 88  | 127 | 115 | 106 | 84  | 47  |  |
| 反应温度(°C)    | 28          | 30  | 32  | 34  | 36  |     |     |  |
|             | 117         | 130 | 150 | 143 | 115 |     |     |  |
| 发酵时间(d)     | 1           | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   |  |
|             | 77          | 83  | 101 | 97  | 86  | 85  | 80  |  |

表 3 反应时有机相与缓冲液与转磷脂活性的关系

Tab1 the relationship of reaction system and PLDs transphosphatidylolation activity

| 有机溶剂 | 转磷脂活性(mg)   |              |               |                |
|------|-------------|--------------|---------------|----------------|
|      | 缓冲液         |              |               |                |
|      | 0.2M 醋酸-醋酸钠 | 0.02M 醋酸-醋酸钠 | 0.2M 柠檬酸-柠檬酸钠 | 0.02M 柠檬酸-柠檬酸钠 |
| 乙醚   | 161         | 184          | 165           | 161            |
| 石油醚  | 129         | 139          | 135           | 107            |

在反应时控制金属离子的种类和浓度. 由表 4 可知, 在反应体系中加 5mmol Ca<sup>2+</sup> 和 25mmol Zn<sup>2+</sup> 时反应最终得到的 PS 的质量最大, 说明 5mmol Ca<sup>2+</sup> 和 25mmol Zn<sup>2+</sup> 对菌株 SNUPLD-6 产的 PLD 转磷脂活性有较大的激活作用. 而重金属离子 Co<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup> 对 SNUPLD-6 产的 PLD 转磷脂活性有抑制作用, 因而在反应过程中可以引入适当浓度的 Ca<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>, 而要避免而重金属离子如 Co<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup> 的引入.

表 4 不同金属离子对 PLD 转磷脂活性的影响

Tab.2 the relationship of metalion and PLDs transphosphatidylolation activity

| 金属离子             | 转磷脂活性(mg)  |     |     |
|------------------|------------|-----|-----|
|                  | 浓度(mmol/L) |     |     |
|                  | 1          | 5   | 25  |
| CK               | 85         | 85  | 85  |
| Zn <sup>2+</sup> | 118        | 134 | 178 |
| Cu <sup>2+</sup> | 82         | 73  | 65  |
| Mn <sup>2+</sup> | 83         | 79  | 73  |
| Co <sup>2+</sup> | 86         | 75  | 25  |
| Fe <sup>2+</sup> | 92         | 89  | 65  |
| Ca <sup>2+</sup> | 135        | 176 | 127 |
| Al <sup>3+</sup> | 134        | 133 | 127 |

## 4 讨论

从土样筛选出的 PLD 产生菌, 经形态及 ITS 序列比对分析, 将该菌株鉴定为地霉属的白地霉 (*Geotrichum candidum*), 其产的 PLD 为胞外酶. 生长条件的优化实验以及转磷脂化反应活性条件优化实验结果表明: 以葡萄糖为碳源, 牛肉膏和蛋白胨各 50% 或酵母浸粉为氮源, pH=6, 温度为 30°C, 产 PLD 的最适培养时间为 3 天. 该菌株产的 PLD 最适反应条件: 在以乙醚为有机相, 0.02M 醋酸-醋酸钠为缓冲液, 温度为 32°C, pH=5.5, 5mmol Ca<sup>2+</sup> 或 25mmol Zn<sup>2+</sup> 为 PLD 激活剂时该菌产的 PLD 转磷脂活性最高.

与其他的研究相比, 在方法上本研究利用了一种新的产磷脂酶 D 的菌株, 以及在测定磷脂酶 D 转磷脂反应的活性上, 采用了直接测定其在一定条件下反应终产物的量的来表示其活性, 避免了测定转磷脂反应活性时水解活性对它的影响. 测定酶活

性时,用高效液相色谱对其定量,更直观的反映出了在该条件下的酶活.在效果上,1L 实验菌株发酵液上清,加硫酸铵沉降下来的粗酶,催化反应 4h 后,对卵磷脂的转化率为 37%. 多次更换含初酶的无机相后其对卵磷脂的转化率为 65%. 而前人在用不同的反应体系,不同的 PLD,其转化率在 46% 到 80% 之间波动. 实验菌产的磷脂酶 D 与其他来源的磷脂酶 D 的差异主要体现这几点:一,在对 pH 的耐受上实验菌产的磷脂酶 D 催化转磷脂反应的最适 pH 为 5.5 比其他来源 6.5 左右的要低;二,在金属离子的耐受性上,文章中的磷脂酶 D 对  $Zn^{2+}$  的耐受性比其他来源的磷脂酶耐受性要高很多;三,文章中的磷脂酶 D 发酵周期很短只有 3 天,而其他来源的酶多以链霉菌为实验菌,发酵周期为 7 天甚至更长. 本文中所得到的磷脂酶 D 与其他来源的磷脂酶 D 在性质上都属于蛋白质,影响活性的因素基本相同.

菌株在应用时,菌株在实验室摇瓶中发酵 3 天后菌液 pH 稳定在 4.2,而在 50L 的发酵罐中,在发酵 42h 后 pH 稳定在 9.5. 不同发酵液得到的磷脂酶 D 的效果差异很大,造成实验菌在实验室和发酵罐中培养出现不同的结果的原因可能有多种. 通过分析各种可能的原因,并解决相应的问题,这对实验菌的大规模发酵应用有积极的指导意义,可以避免了在发酵过程中对酶活影响. 同时,为提高实验菌产的 PLD 的活性,我们也可以通过基因工程手段来改良菌种,以期获得高效菌株. 另外,探寻绿色高效的反应体系,提高反应效率和环保性,对促进生物酶法产业化生产磷脂酰丝氨酸也具有非常重要的意义.

#### 参考文献:

- [1] 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.
- [2] 姜芳燕, 王金梅, 戴大章, 等. 产磷脂酶菌株的筛选鉴定及其应用[J]. 化工学报, 2012, 63(3): 887.
- [3] Nakazawa Y, Uchno M, Sagane Y, *et al.* Isolation and characterization of actinomycetes strains that produce phospholipase D having high transphosphatidyltransferase activity [J]. Microbiological Research, 2009, 164: 43.
- [4] 胡飞, 段章群, 王淮, 等. 生物酶法制备磷脂酰丝氨酸的研究进[J]. 中国油脂, 2012, 37(6): 54.
- [5] 赵紫薇, 杨天奎, 牟英. 磷脂酶 D 制备及应用的进展[J]. 技术·食品工程, 2007, 7: 108.
- [6] 占剑峰, 姜绍通, 潘丽军. 磷脂酶活力测定条件的优化[J]. 食品科学, 2012, 33(17): 174.
- [7] 杨伟东. 磷脂酶 D 催化合成磷脂酰丝氨酸的工艺研究[J]. 现代食品科技, 2010, 26(9): 994.
- [8] 姚娜, 张小里, 赵彬侠, 等. 磷脂酶 D 催化合成大豆磷脂合成磷脂酰丝氨酸的工艺[J]. 化工进展, 2011, 30: 281.
- [9] 胡飞, 姚日生, 王淮, 等. 全国第 18 届有机和精细化工中间体学术交流会论文集[C]. 2012: 82.
- [10] 杨天奎, 赵紫薇, 牟英. 利用物理、化学诱变产生一株稳定高产磷脂酶 D 的菌株: 中国, 201010161582.3[P]. 2010-11-03.
- [11] Damjanovic J, Iwasaki Y. Phospholipase D as a catalyst: Application in phospholipids synthesis, molecular structure and protein engineering[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2013, 116(3): 271.
- [12] 刘媛媛, 张小里, 姚娜, 等. 磷脂酶 D 的紫外诱变选育及发酵条件的优化[J]. 化工进展, 2012, 31: 2036.
- [13] Yanagita T, Nagao K. Functional lipids and the prevention of the metabolic syndrome[J]. Asia Pac J. Clin Nutr, 2008, 17: 189.
- [14] Iwasaki Y, Masayama A, Mori A, *et al.* Composition analysis of positional isomers of phosphatidylinositol by highperformance liquid chromatography [J]. Chromatogr. A, 2009, 1216: 6077.
- [15] Ozaki A, Masayama A, Nakano H, *et al.* Synthesis of phosphatidylinositols having various inositol stereoisomers by engineered phospholipase D[J]. J Biosci Bioeng, 2010, 109: 337.
- [16] Uesugi Y, Arima J, Iwabuchi M, *et al.* C-terminal loop of Streptomyces phospholipase D has multiple functional roles [J]. Protein science, 2007, 16: 197-207.
- [17] Damjanovic J, Takahashi R, Suzuki A, *et al.* Improving thermostability of phosphatidylinositol-synthesizing Streptomyces phospholipase D[J]. Protein Eng Des sel, 2012, 25: 415.
- [18] Nishimasu H, Ishizu H, Saito K, *et al.* Structure and function of Zucchini endoribonuclease in piRNA biogenesis[J]. Nature, 2012, 491: 284.
- [19] Peng X, Frohman M A. Mammalian phospholipase D physiological and pathological roles [J]. Acta Physiol, 2012, 204: 219.
- [20] Hidaka N, Takami M, Suzuki Y. Enzymatic phosphatidyltransferase of thiamin, pantothenic acid, and their derivatives [J]. J Nutr Sci Vitaminol, 2008, 54: 255.
- [21] 韩丽, 毕阳, 魏晋梅, 等. 应用荧光高效液相测定麦芽根中磷脂酶 D 的活性[J]. 天然产物研究与开发, 2009, 21: 343.