

磷脂酶研究进展

梁丽,常明,刘睿杰,刘元法,王兴国,金青哲*
(江南大学食品学院,江苏无锡 214122)

摘要:磷脂酶是在生物体内存在的可以水解甘油磷脂的一类酶,其中主要包括磷脂酶A₁、A₂、B、C和D,它们特异地作用于磷脂分子内部的各个酯键,形成不同的产物,被广泛用于甘油磷脂的改造。依靠传统手段从动物脏器中提取的磷脂酶已经不能满足目前生产的需求,而微生物来源磷脂酶的筛选及其基因工程发展迅速,显著拓宽了磷脂酶的来源,同时又有效地改善了磷脂酶的性质。本文综述了近年磷脂酶高产微生物菌株的选育、磷脂酶的分子改造以及修饰方面取得的进展。

关键词:磷脂酶,菌种筛选,固定化酶,化学修饰,基因工程

Research progress in phospholipase

LIANG Li, CHANG Ming, LIU Rui-jie, LIU Yuan-fa, WANG Xing-guo, JIN Qing-zhe*

(The School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122)

Abstract: The phospholipases, including phospholipase A₁, A₂, B, C and D, that are a complex and crucially important group of enzymes that exist in organism and can specifically hydrolyze the intramolecular ester bond of p-hosphoglycerides releasing different products. Thus, phospholipases are widely used in phosphoglycerides transformation. The extraction of phospholipases from animal organs by the traditional means cannot meet the current industry requirements, however, the study of microbial source phospholipases and the rapid development of gene engineering not only broaden the sources of them but also improve their properties effectively. The paper reviewed the progress in the screening of the high yield strain and phospholipases molecular modification and transformation.

Key words: phospholipase; strains screening; immobilized enzyme; chemical modification; genetic engineering

中图分类号: TS221

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2013)04-0393-04

磷脂酶是生物体内负责磷脂的代谢和生物合成的一类酶,能催化甘油磷脂各种水解反应,根据其水解磷脂位置的不同可分为5类:磷脂酶A₁、A₂、B、C、D。其生物功能可归纳为三类:细胞膜结构的维护和修复;细胞内代谢机制和信号传导的调节及体内磷脂的消化^[1]。如磷脂酶A₂(PLA₂)大量存在于蛇毒、蜂毒、蝎毒、动物胰脏及植物组织中,可介导产生具有磷脂转运、膜修复、胞外水解及神经元转移因子等功能的脂质介质。而磷脂酶C(PLC)在生物的生命活动中起着第二信使的作用,其广泛存在于各种原核、真核生物之中,只是在分子结构上略有差异。磷脂酶不仅在生物体内具有很重要的生理功能,而且具有很高的应用价值,可广泛地用在科学研究、医药、饲料改良和食品工业等诸多方面。例如在医药方面PLA₂被应用于抗炎药物的生产,PLC被应用于抗肿瘤药物的研制等;在饲料改良方面,磷脂酶被添加于饲料中水解甘油磷脂,可改善饲料的利用效率和促进动物生长;

在食品工业方面,PLA₁、PLA₂和PLC可被广泛应用于油脂脱胶,同时由于磷脂酶可使面团形成胶状复合物,可以减少淀粉回生,因此在烘焙行业应用也非常广泛。此外磷脂酶D(PLD)还广泛应用于甘油磷脂改性。磷脂酶普遍存在于动物、植物和微生物中。由于微生物来源的磷脂酶具有种类繁多、多为外泌表达、单亚基蛋白、容易大量快速制备和成本低等特点,已经成为当前食品工业应用的最重要途径。但是野生菌株的磷脂酶生产能力往往很有限,无法满足工业生产的要求。此外,为了适应工业生产过程中高温、高压、高酸度、高离子浓度以及重金属离子超标的极端环境,就需要对现有的磷脂酶进行改造,以适应生产的需要。通常包括两个方面:磷脂酶高产微生物的选育及磷脂酶蛋白的修饰和分子生物学改造。

1 磷脂酶高产微生物的选育和分子生物学改造

磷脂酶广泛分布于动植物和微生物中,工业化的磷脂酶主要有动物磷脂酶和微生物磷脂酶。上世纪发现的微生物磷脂酶*Fusarium oxysporum* PLA₁,随后经Novozymes研制为酶制剂Lecitase® Novo,于2000年成功应用于一家德国公司的植物油脱胶。Lecitase® Novo具备比动物磷脂酶更广泛的温度、pH应用范围,且便于工业化生产而得到了广泛的应用研究^[2]。自然界中能产生磷脂酶的微生物很多,如产

收稿日期:2012-09-13 * 通讯联系人

作者简介:梁丽(1989-),女,硕士研究生,主要从事食品生物技术方面的研究。

基金项目:十二五国家科技支撑计划项目(2011BAD02B02);2012年基本科研-青年基金(常明)(1022050205124000)。

碱假单胞菌 (*Pseudomonas alcaligenes*)、哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*)、粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*)、链霉菌 (*Streptomyces*) 和米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 等。不同微生物所产磷脂酶的类型和催化特性有所不同。

1.1 诱变育种

国内外的研究者对产磷脂酶微生物的菌种选育进行了广泛而深入的研究。

国内方面,谈重芳等^[9]从土壤中筛选得到1株具有磷脂酶活性的菌株,并通过离子束诱变的方法筛选到1株磷脂酶活性比野生菌株高50%的突变菌。王常高^[4-5]利用从湖北、湖南、江苏、山东和广东等地采集的1268份土样筛选出15株磷脂酶高产菌株,并对其中四株菌进行分类鉴定,为进一步研究磷脂酶奠定了基础。陈涛等^[6]在上述研究基础上,对选育出的高产磷脂酶菌株 *B. cereus* ShenZhen754-1 进行了紫外线和Co60- γ 射线诱变处理,最终获得了3株高产突变菌株,磷脂酶活性较出发菌株分别提高了2.88、3.24和3.23倍。

国外方面,Yozo Nakazawa等^[7]利用卵磷脂作为唯一碳源的初筛培养基,从土壤中筛选出80株具有PLD活性的细菌,并且发现PLD具有水解和转酰基的双重活性,连续培养筛选出8株菌可稳定产PLD,能将磷脂酰胆碱高效的转化合成成为磷脂酰甘油、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰乙醇胺。

1.2 异源表达

随着生物技术的迅速发展,近年来已经有许多不同来源的磷脂酶基因在大肠杆菌、毕赤酵母和昆虫细胞杆状病毒中实现了胞内或分泌表达。这些表达系统所使用的启动子和分泌信号肽大部分是载体自带的,也有部分使用磷脂酶本身自有的信号肽。李维琳^[8]从紫红链霉菌 (*Streptomyces violaceoruber*) 中筛选克隆得到PLA₂基因,并将其在变铅青链霉菌 LEE2261 (*Streptomyces lividans* LEE2261) 中进行表达,表达量提高了10倍。Brian J. Shiell等^[9]将Moraxella bovi磷脂酶B (PLB) 基因在大肠杆菌中实现分泌型融合表达,获得了125U/mg的重组PLB蛋白。任龙等^[10]将蜡样芽胞杆菌深圳株754-1的PLC基因在大肠杆菌 DH5 α 和BL21 (DE3) 中表达,获得了分子量为38ku的PLC重组蛋白。Cristina A. Tan^[11]将*B. cereus*中非特异性的PLC基因重组到*E. coli*中,大大提高了重组PLC表达的稳定性,经过4~7℃贮藏8个月未见其活性下降,活性显著优于野生型的PLC。

在大肠杆菌表达系统中,真核生物来源的磷脂酶基因大部分都以包涵体的形式表达,需要复性等处理后才具有生物活性,如人血浆PLA₂。而在毕赤酵母表达系统中,许多磷脂酶基因得以正常表达,例如人血浆磷脂酶基因的表达量可以达到638U/mg^[12],*Serratia sp.* xjF1PLA1的表达量为41.8U/mL^[13]。此外,人血浆磷脂酶基因在昆虫杆状病毒表达系统中也可以顺利表达,能够达到5403U/mg。

1.3 分子生物学改造

1.3.1 定点突变 (site-directed mutation) 定点突变是指通过PCR等方法向目的DNA片段中引入所需变化,包括碱基的添加、删除、点突变等。定点突变能迅速、

高效的提高DNA所表达的目的蛋白的性状及表征,是基因研究工作中一种非常有效的手段。与使用化学因素和自然因素导致突变的方法相比,具有突变率高、简单易行、重复性好等特点。定点突变已成为研究酶结构和功能的常规手段,并被广泛用于改善酶的性能。

早在1996年Sigrid H. W. Beiboer等就利用定点突变研究猪胰腺PLA₂,以扩大pH适用范围。将活性位点His48突变为ALA₄₈,得到突变酶TAA-PLA₂。与野生型相比,TAA-PLA₂的最适pH由pH6转移到pH3。可能是由于His₄₈在酸性pH下发生了质子化,酶活显著下降,而TAA-PLA₂不受质子化影响^[14]。在利用磷脂酰胆碱和肌醇通过转酰基反应合成磷脂酰肌醇 (PI) 时,可以通过提高温度增加肌醇的溶解度来提高PI产量。为获得耐热型PLD,2012年Jasmina Damjanovic等尝试了定点突变组合突变体的高通量筛选方法。通过在链霉菌属PLD特定的氨基酸位点引入随机突变,筛选获得热稳定性最好的D40H/T291Y突变体,使得65℃条件下酶活的半衰期较野生型延长了8.7min^[15]。

1.3.2 定向进化 (directed evolution) 酶的体外定向进化是指在人工模拟自然进化过程的条件下,通过易错PCR、DNA重组 (Shuffling)、交错延伸、随机引物引导重组、递增截短、过渡模板随机嵌合生长、易错滚环扩增法、复合自组装基因组工程等方法对酶基因进行突变和体外重组,经过定向高通量筛选的方法获得性能更加优异或全新的酶^[16]。定向进化与自然进化不同,由于随机突变是人为引发的,而筛选虽相当于环境,但只作用于突变后的分子群,起着选择某一方向进化的作用,整个进化过程是在设计与控制下实现的。在定向进化策略中,获取能适用于工业生产需求的高效酶制剂,首先要保证突变库的多样性,其次是合适的筛选压力,同时还需要有高灵敏度的高通量筛选检测技术。

Joon Shick Rhee^[17]利用定向进化手段改造了*Serratia sp.* MK1的PLA₁,经过连续易错PCR和DNA Shuffling,得到了3株突变株,使其半衰期增加了四倍。与野生型相比,三株突变体在有机溶剂中的稳定性显著提高。Kim等^[18]经过易错PCR和交错延伸重组技术对*Pseudomonas fluorescens* KCTC 1767酯酶分子进行定向进化,经活力染色法筛选后,得到带有3个突变位点的良性突变株,使其在50℃保温2h后仍保持30%的活力,而野生型完全失活,大大提高了酯酶分子的耐热性。

2 磷脂酶的修饰

磷脂酶作为一种生物催化剂,其高效性与专一性是其其他化学催化剂无法比拟的。但由于其较差的体外稳定性,极大地限制了其在工业生产中的应用。因此,对酶分子进行适当的修饰以改善其性能是提高其使用范围和应用价值的关键。

2.1 固定化酶

固定化酶是近十余年发展起来的酶应用技术,在工业生产、化学分析和医药等方面有诱人的应用前景。用物理的或化学的方法使酶与水不溶性大分子载体结合或把酶包埋在其中,使酶在水中形成溶性凝胶或半透膜的微囊体,从而导致流动性降低。酶固定化后,一般稳定性会增加,易从反应系统中分

离,且易于控制,能反复多次使用。同时便于运输和贮存,有利于自动化生产。值得注意的是酶经过固定化后,对温度及pH变化的耐受性显著提高,最适pH往往稍有移位,但对底物专一性没有任何改变。固定化酶的制备方法有物理法和化学法两大类。

固定化磷脂酶成功应用的研究很多。例如卞清德^[19]将磷脂酶用海藻酸钠壳聚糖固定化,用于水化大豆油脱胶,脱胶效果明显。张智等^[20]分别采用海藻酸钠、海藻酸钠-壳聚糖和海藻酸钠-明胶固定化磷脂酶。结果提高了最适反应温度,拓宽了反应适宜pH范围。陶明等^[21]以有机硅烷偶联剂KH550改性凹凸棒土作为载体,研究固定PLA₁,使固定化酶活性达到了5100~5330U/g。同时固定PLA₁拥有更广温度范围、更宽pH应用范围和较高的稳定性。付敏^[22]对大孔吸附树脂固定磷脂酶Lecitase Ultra进行了系统研究,结果表明极性树脂DA201为该酶的最适固定化载体,固定化酶活力为1250~1300U/g。综上可以看出,固定化的磷脂酶在热稳定性、酸碱耐受性和操作稳定性上都可得到一定程度的改善。

此外,磷脂酶的固定化还可以改变磷脂酶原有的酶学性质,例如Haresh T^[23]的研究就发现利用疏水性树脂甲醛系树脂HP-20固定PLA₂,可以将辛酸高效的引入卵磷脂中。Ning Liu^[24]利用大孔树脂D201固定化Lecitase Ultra,在保证酶活的条件下可以增加酶的热稳定性和金属离子耐受性。并且经过六次使用后仍能够保持70%的活性。

2.2 化学修饰

酶的化学修饰是通过化学基团的引入或去除,使蛋白质共价结构发生改变,即利用化学手段将大分子或某些功能基团结合到酶分子上,从而改变酶的理化性质,最终达到改变酶的催化性质的目的。

表1 PLA₂的常用化学修饰方法

Table 1 Commonly used chemical modification methods of PLA₂

氨基酸残基	试剂	反应
组氨酸	对溴基溴化苯乙酮	烷基化
	对硝基甲基苯	甲基化
	氰酸钾	氨基酰化
赖氨酸	无水醋酸	乙酰化
	三硝基苯磺酸	三硝基苯化
酪氨酸	硝基苯磺酰氟	磺化
	硝基苯磺酰氟	磺化
色氨酸	2-羟基-5-硝基苄基溴	烷基化
	氯胺T	氧化
甲硫氨酸	碘乙酸	羧甲基化

为了解蛇毒PLA₂结构中的毒性决定因子,科研工作者采用多种方法进行了深入研究,化学修饰是其中的一种方法。如表1所示。

通过对特定位点上氨基酸的化学修饰,研究该氨基酸在PLA₂的催化活性和药理学性质方面的作用。对天冬氨酸和谷氨酸的修饰观测到催化功能降低而药理学的活性几乎不受影响,而修饰赖氨酸和

精氨酸后,则得到了相反的结果。通过这种特定位点的氨基酸化学修饰,观测到了药理学性质和酶活特性的变化相反,证实了蛇毒PLA₂的催化中心和药理学位点不同,但仍需进一步研究相关蛋白质,为深入理解结构与功能的关系,改善酶的性质奠定基础^[25]。

3 展望

目前,磷脂酶已经得到了广泛应用,但由于磷脂酶在天然材料中的含量低以及理化性质上的缺陷无法完全满足生产的要求。基因工程的发展为问题的解决提供了有效途径,一方面通过基因定点突变及定向进化有目的的改造磷脂酶基因,从而改善其稳定性和活性,增强其底物特异性。另一方面融合蛋白技术的发展也为问题解决带来了新思路,例如将PLA和PLC融合组成双功能蛋白用于油脂脱胶,可以拓宽PLC脱胶时底物应用范围。

基因工程为磷脂酶的研究提供了有效途径,但仍存在一系列问题有待解决。例如:新发现菌株的磷脂酶基因克隆,传统方法如构建DNA文库和cDNA文库,虽能够获得物种及其基因组较全面的信息,但存在工作量大的缺点;合适表达系统的构建,大肠杆菌作为基因克隆载体宿主菌的相关研究已很成熟,但当作为表达载体时大肠杆菌很少外泌酶蛋白,不利于产品的分离纯化。

磷脂酶分子水平上的研究受到广泛的关注,随着基因工程发展的日新月异和对磷脂酶研究的继续,研究者将寻找到一种可以快速生产磷脂酶的方法,为其工业化应用奠定良好的基础。

参考文献

- [1] Víctor C, Diana M, Carlos T, et al. Phospholipases in Food Industry: A Review [J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 861: 495-523.
- [2] Kim C. Enzymatic oil-degumming by a novel microbial phospholipase [J]. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2001, 103: 333-340.
- [3] 谈重芳,王燕萍,秦广雅,等. 酯酶活性酵母菌的离子束诱变选育和酶学性质初步研究 [J]. *河南农业科学*, 2005(3): 27-29.
- [4] 王常高,陈明镨,高林,等. 高产磷脂酶C菌株筛选及其抗血小板功能的研究 [J]. *天然产物研究与开发*, 2003, 15(4): 345-348.
- [5] 王常高,高林,宋冬林,等. 四株高产磷脂酶C新菌株的鉴定和分类 [J]. *天然产物研究与开发*, 2004, 16(3): 189-193.
- [6] 陈涛,王常高,刘晓辉,等. 高产磷脂酶C菌株的诱变选育 [J]. *天然产物研究与开发*, 2005, 17(6): 712-716.
- [7] Yozo N, Masataka U, Yoshimasa S, et al. Isolation and characterization of actinomycetes strains that produce phospholipase D having high transphosphatidylase activity [J]. *Microbiological Research*, 2009, 164: 43-48.
- [8] 李维琳. 紫红链霉菌2917磷脂酶A₂基因的克隆及序列分析 [J]. *武汉大学学报*, 2002, 18(1): 500-506.
- [9] Brian J S, Mary T, Kerri B, et al. Expression, purification and characterization of recombinant phospholipase B from *Moraxella bovis* with anomalous electrophoretic behavior [J]. *Protein Expression and Purification*, 2007, 55: 262-272.
- [10] 任龙,杨宁,陈福生,等. 蜡样芽胞杆菌深圳株7541PLC基

