

文章编号:1009-038X(2005)01-0024-05

# 解脂假丝酵母中神经酰胺合成的外部影响因素

周全, 陈国强

(清华大学 生物科学与技术系, 北京 100084)

**摘要:**为研究利用酵母发酵生产神经酰胺的可行性,利用高效液相色谱/蒸发光散射检测器作为分析手段,考察了解脂假丝酵母(*Yarrowia lipolitica*)在各种发酵条件下生产神经酰胺的能力.在各种可能的影响因素中,提高溶氧与乙醇刺激均能增加细胞内神经酰胺质量分数,在这两种条件下其占细胞干重的比例分别比对照提高2.5倍及3.3倍,最高可将其从占细胞干重的0.25%提升到0.84%.其它培养条件对神经酰胺质量分数的影响则不明显或造成一定程度的下降.

**关键词:**解脂假丝酵母;发酵;神经酰胺;高效液相色谱/蒸发光散射检测器

**中图分类号:**TQ 926

**文献标识码:**A

## The Factors Affecting the Ceramide Content in Yeast *Yarrowia lipolitica*

ZHOU Quan, CHEN Guo-qiang

(Department of Biological Sciences and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

**Abstract:** Ceramide are widely distributed lipid molecules in eukaryotic cells, and it becomes important in cosmetic industry in recent years. To study the possibility of producing ceramide from yeast, the ceramide content in yeast *Yarrowia lipolitica* was detected under different fermentation conditions. Among the factors tested, proper oxygen supply and ethanol treatment could enhance the ceramide content 2.5 to 8.4 times, while other factors have no obvious effect or have negative effect on the ceramide content. These results could be played as a valuable guidance for ceramide production from yeast sources.

**Key words:** *Yarrowia lipolitica*; ceramide; fermentation; HPLC/ELSD

神经酰胺是生物体内的一种脂类物质,广泛存在于酵母<sup>[1]</sup>、植物<sup>[2]</sup>和哺乳动物细胞<sup>[3]</sup>中.无论在低等真核生物(如酵母)还是在高等动物细胞中,游离态神经酰胺的含量都较少,它主要作为鞘脂的结构单元存在.研究表明,它与细胞的增殖、分化、凋亡、细胞周期抑制等都有关系<sup>[4~6]</sup>,但主要是抑制细胞生长,导致细胞凋亡的作用.它的合成代谢途径相对简单,见图1.但目前最关键神经酰胺合成酶

尚未鉴定,在合成与降解方面的许多相关基因与酶的调控机制尚不明确<sup>[1]</sup>.

研究发现,神经酰胺在皮肤护理中起着活性因子的作用,具有保湿、防护、修复损伤等重要功效<sup>[7,8]</sup>,因此它已成为一种重要的化妆品添加剂.以往神经酰胺主要取自牛脑,但由于可能带来的疯牛病污染,迫切需要找到一种安全经济的来源.酵母具有生长周期短、培养成本低、相关技术成熟、容

收稿日期:2004-04-19; 修回日期:2004-06-15.

作者简介:周全(1976-),男,四川江油人,微生物及分子生物学博士研究生.

易进行基因操作等优点,是生产神经酰胺的理想来源。据报道,在酿酒酵母与解脂假丝酵母中存在游离态神经酰胺<sup>[1,9]</sup>,但目前研究都集中在确定其代谢中相关基因的功能与蛋白质表达,而没有从发酵条件的优化改变等角度考察其中神经酰胺质量分数的变化。

作者采用装备有蒸发光散射检测器(Evaporative Light Scattering Detector, ELSD)的高效液相色谱方法(High Performance Liquid Chromatography, HPLC),在不同培养条件下考察了解脂假丝酵母生产神经酰胺的能力,发现解脂假丝酵母菌株 33M 在氧气充足供应,或培养基中存在大量乙醇的条件下可提高神经酰胺质量分数。

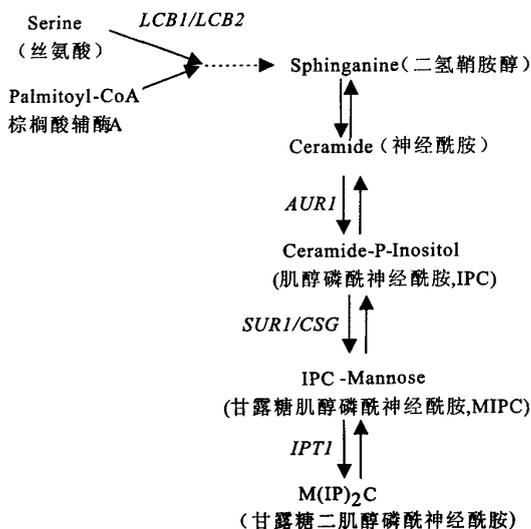


图 1 酵母中神经酰胺的合成代谢途径

Fig. 1 The metabolic pathway of ceramide in yeast

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌种、培养基

解脂假丝酵母菌株(*Yarrowia lipolitica*, 别称为 *Candida lipolitica*) 33M 来自克罗地亚 Rupic 实验室<sup>[9]</sup>。培养基为丰富营养培养基 YPD, 细胞在 30 ℃, 200 r/min 的摇床上培养 72 h, 离心冰干后待检测。

测试该种酵母在不同硫酸镁质量浓度、不同培养温度, 不同氧气供应及不同质量分数乙醇存在的条件下细胞干重与神经酰胺的质量分数。未特别指明时, 培养条件指在 500 mL 的无挡板摇瓶中装入 100 mL YPD 培养基于 30 ℃, 200 r/min 的摇床上培养 72 h。在具体的各种测试中, 培养基的添加成分与培养条件随实验设计有所变化。

### 1.2 试剂

色谱纯正己烷, 乙醇: 购自北京迪马公司; 其他试剂为分析纯。神经酰胺标样 N- $\alpha$ -羟基棕榈酰-植物神经酰胺(CerV); 荷兰 Cosmoferm 公司赠送, 其结构与酵母神经酰胺类似, 仅脂肪酸部分的碳链长度略有差异。

### 1.3 脂类提取

摇瓶中培养 72 h 的 100 mL 发酵液经离心后收集湿细胞, 冰干 24 h 除去细胞内水分。称取 0.15 g 干细胞, 加入 18 mL 氯仿/甲醇(体积比为 2:1) 后用超声破碎仪处理 15 min 以充分破坏细胞壁, 过滤后细胞残渣在 40 ℃ 下用 12 mL 氯仿/甲醇(体积比 2:1) 抽提两次。合并抽提液后加入 10.5 mL 0.9 g/dL NaCl 溶液以使氯仿/甲醇/水的体积比为 8:4:3, 剧烈振荡后离心分层。弃去含蛋白质、核酸及水溶性脂类的上层水相, 收集下层有机相即为含有神经酰胺的脂类粗提液, 待其挥发干后加入 0.5 mol/L NaOH-甲醇溶液, 室温下处理 30 min 后加入 5 mL 氯仿与少量水洗去杂质, 下层有机相真空干燥后定容于氯仿, 进行 HPLC 及 TLC 分析。

### 1.4 高效液相色谱分析(HPLC)和薄层板分析(TLC)

液相色谱仪为美国 TSP 公司的 SpectraSystem P2000。检测器为法国 Sedere 公司 Sedex 75 蒸发光散射检测器型。检测器温度设为 40 ℃, 空气压力  $3.5 \times 10^5$  Pa, 检测灵敏度为 8。色谱柱为 Alltima CN 柱(4.6 mm  $\times$  250 mm, 美国 Alltech 公司)。流动相为正己烷/乙醇(体积比 99:1), 体积流量 0.8 mL/min。定量分析时以标样浓度  $c$  和样品峰面积  $A$  为参数作双对数曲线, 对神经酰胺进行定量<sup>[10]</sup>, 测得神经酰胺质量分数(以其占细胞干重的百分比表示)。薄层板采用烟台化工研究厂生产的硅胶高效薄层色谱板。展开剂为氯仿/甲醇/冰乙酸(体积比为 19:0.9:0.1)。图 2 为 HPLC 上采用 ELSD 分析酵母的脂类谱图, 其中代表神经酰胺的谱峰已经过质谱确认。

## 2 结果与讨论

### 2.1 $Mg^{2+}$ 对神经酰胺质量分数及细胞干重的影响

神经酰胺在细胞内主要以鞘脂的组成结构单元存在。在它的代谢途径中, 若能增强降解衍生物的酶活力, 就可能释放出游离神经酰胺而在胞内达到一定程度的积累。酿酒酵母中编码相关降解酶的基因为 *ISC1*, 该基因编码的磷脂酶可降解神经酰胺的衍生物肌醇磷酸神经酰胺(IPC)。对该酶的体

外研究表明,  $Mg^{2+}$  可在一定程度上提高它的活性<sup>[11]</sup>, 促进生物降解释放出游离神经酰胺. 同时, 镁是酵母必需的起广泛调节作用的无机元素. 在培养基中添加硫酸镁可促进酵母生长与相应的衍生物降解酶活性. 在 YPD 培养基中添加 0, 1.25, 5 g/L 无水硫酸镁, 在 30 °C, 200 r/min 的摇床上培养 72 h 后考察细胞干重及神经酰胺的质量分数(见图 3).

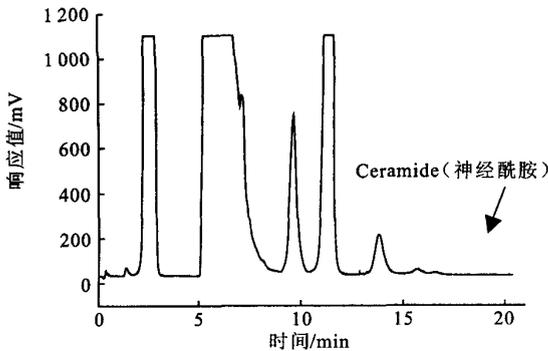


图2 解脂假丝酵母 33M 的脂类提取物的 HPLC/ELSD 谱图

Fig. 2 The lipids extracts profile of *Yarrowia lipolitica* 33M on HPLC/ELSD

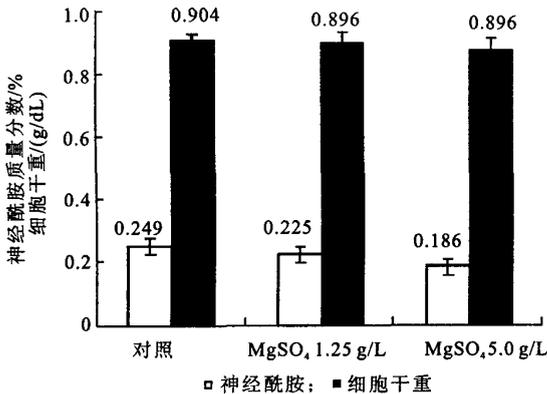


图3 培养基中添加硫酸镁后的细胞干重与神经酰胺质量分数

Fig. 3 CDW and ceramide content under different  $MgSO_4$  concentration

培养基中添加 1.25 g/L 硫酸镁后细胞干重与对照相比没有变化, 神经酰胺质量分数也没有明显改变, 保持在占细胞干重 0.25% 的水平. 在多次实验中发现这也是解脂假丝酵母 33M 在常规培养条件下(500 mL 的无挡板摇瓶中装入 100 mL YPD 培养基于 30 °C, 200 r/min 的摇床上培养 72 h)胞内神经酰胺的质量分数. 而当培养基内添加硫酸镁质量浓度达到 5 g/L 时, 细胞干重与对照相比略有降低, 神经酰胺质量分数下降 25%. 镁是真菌生长所必需的无机元素, 当环境中  $Mg^{2+}$  质量浓度增加

时, 胞内的  $Mg^{2+}$  质量浓度却表现出一定的稳定性. 例如当外界  $Mg^{2+}$  质量浓度增加到 1 400 倍时, 细胞内的  $Mg^{2+}$  质量浓度则只增加 1.5~3.3 倍<sup>[12]</sup>. 因此在一般培养条件下, 酵母将维持胞内  $Mg^{2+}$  质量浓度在一个固定水平, 降解酶的活力仍保持在对照的状态而不能促进神经酰胺衍生物的降解. 同时, 神经酰胺作为一种信号分子, 在培养条件没有突变的情况下, 其代谢路径保持常态, 因此其无法积累. 而当  $Mg^{2+}$  质量浓度较高时, 酵母的生长已开始受到抑制, 细胞干重下降, 导致神经酰胺的质量分数也受到影响.

## 2.2 培养温度对神经酰胺质量分数的影响

神经酰胺在细胞内主要作为二级信使分子行使功能. 研究表明, 在酿酒酵母受到热刺激(30~37 °C)后的 30 min 内神经酰胺质量分数会有 2~3 倍的增加, 维持约 2 h 后恢复到初始水平<sup>[13]</sup>, 因此改变培养温度可能会影响胞内神经酰胺的质量分数. 将 YPD 培养基中的酵母分别在 30, 35, 37 °C 摇床上培养 72 h, 离心收集细胞, 冰干后测定细胞干重与神经酰胺质量分数, 细胞干重与神经酰胺质量分数见图 4.

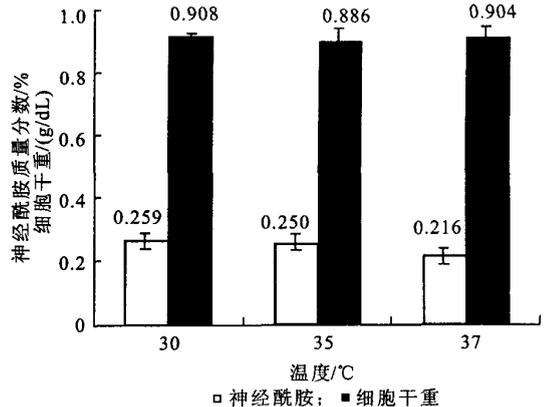


图4 不同温度下细胞干重与神经酰胺质量分数

Fig. 4 CDW and ceramide content under different cultivation temperature

在不同培养温度下, 解脂假丝酵母的干重与神经酰胺质量分数没有显著变化. 酵母可在很宽的温度范围内(0~47 °C)生长, 但大多数酵母的最适生长温度为 28~32 °C. 神经酰胺作为一种二级信号传导分子, 在细胞经受热刺激的情况下可诱导海藻糖表达从而保护细胞在温度突然升高时不受伤害<sup>[13]</sup>. 但在恒定温度培养下没有施加突变的刺激, 神经酰胺作为信号分子的功能得不到发挥, 同时细胞在以上设定的温度下没有感受到明显生长压力, 生理状况没有较大变化, 因此细胞干重与神经酰胺

质量分数没有改变。

### 2.3 溶氧对神经酰胺质量分数的影响

在研究神经酰胺诱导细胞凋亡的机理中发现神经酰胺与活性氧关系密切。在神经酰胺诱导的凋亡细胞内可检测到活性氧浓度的变化<sup>[14]</sup>;反之,在活性氧诱导的细胞凋亡中也观察到了神经酰胺质量分数的改变<sup>[15]</sup>,暗示其中可能存在尚未阐明的机制影响着神经酰胺的质量分数。线粒体是活性氧的主要产生部位,在不同的氧气供应条件下线粒体发育情况不同,因此可能间接导致神经酰胺质量分数的变化。为观察溶氧对神经酰胺质量分数的影响,在 500 mL 的有挡板、无挡板的摇瓶中分别装 100 mL YPD 培养基,在 30 ℃,200 r/min 的摇床上培养 72 h,同时在 150 mL 的摇瓶中装 100 mL YPD 培养基于 30 ℃培养箱中静置培养 72 h,分别模拟充足供氧、常规供氧及限制供氧的环境,细胞干重与神经酰胺质量分数见图 5。

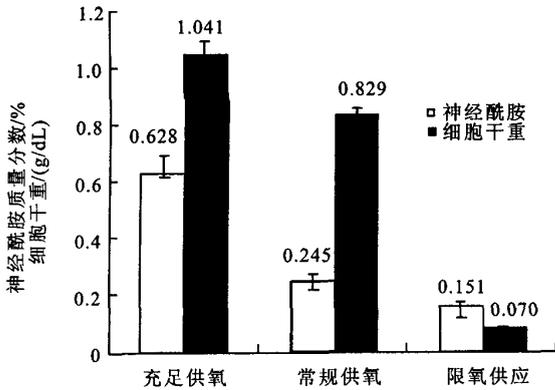


图 5 不同供氧条件下细胞干重与神经酰胺质量分数

Fig. 5 CDW and ceramide content under different oxygen supply

在不同供氧条件下,细胞干重与神经酰胺质量分数均有明显差别。在限氧供应条件下,酵母细胞生长缓慢,细胞干重极低,导致线粒体发育不成熟,量少,严重影响细胞代谢活力及体内活性氧的产生。在此环境下神经酰胺质量分数仅为正常供氧时的 60%。充足供应氧气时细胞生长良好,干重可达 1 g/dL,线粒体发育充分,数目较多。此时胞内神经酰胺质量分数为常规供氧条件下的 2.5 倍,是限氧条件下的 4.2 倍。在神经酰胺的代谢途径中虽然没有明确与氧直接相关的反应步骤,但细胞在氧气供应充足或过量时线粒体易发生电子泄漏,造成胞内活性氧浓度改变,同时氧供应量增加也导致细胞代谢加快,从而可能导致神经酰胺质量分数提高。

### 2.4 乙醇对神经酰胺质量分数的影响

乙醇是酵母在厌氧条件下发酵时产生的代谢产物,在一定体积分数下对细胞没有影响,但高于酵母的乙醇耐受体积分数的则会改变细胞生理状况,阻碍细胞生长,对细胞膜造成损伤,改变膜上脂类成分。另外,乙醇可能损伤酵母线粒体外膜<sup>[16]</sup>,从而间接改变细胞内氧自由基的状态。在过量乙醇存在的条件下,神经酰胺质量分数是否改变目前尚不清楚。为观察乙醇对神经酰胺的影响,在 YPD 培养基中添加体积分数为 0, 5%, 10%, 15% 的乙醇,在 30 ℃、200 r/min 的摇床上培养 72 h 后离心冰干测量相应指标。图 6 为不同体积分数乙醇对神经酰胺的质量分数与细胞干重的影响。

副产物,在一定体积分数下对细胞没有影响,但高于酵母的乙醇耐受体积分数的则会改变细胞生理状况,阻碍细胞生长,对细胞膜造成损伤,改变膜上脂类成分。另外,乙醇可能损伤酵母线粒体外膜<sup>[16]</sup>,从而间接改变细胞内氧自由基的状态。在过量乙醇存在的条件下,神经酰胺质量分数是否改变目前尚不清楚。为观察乙醇对神经酰胺的影响,在 YPD 培养基中添加体积分数为 0, 5%, 10%, 15% 的乙醇,在 30 ℃、200 r/min 的摇床上培养 72 h 后离心冰干测量相应指标。图 6 为不同体积分数乙醇对神经酰胺的质量分数与细胞干重的影响。

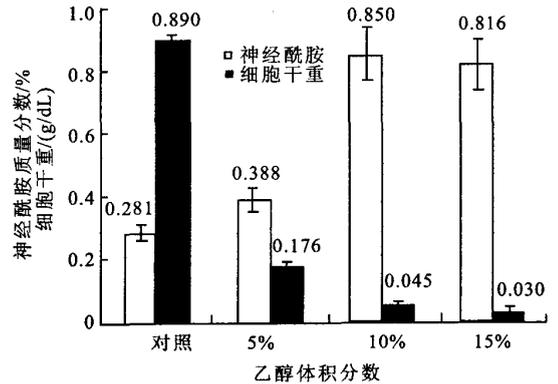


图 6 不同体积分数乙醇对细胞干重与神经酰胺质量分数的影响

Fig. 6 CDW and ceramide content under different ethanol concentration

在体积分数 5% 的乙醇时,细胞生长已受到抑制,干重从对照的 0.89 g/dL 降至 0.176 g/dL,但神经酰胺质量分数从 0.281% 增加至 0.388%,当继续提高乙醇体积分数至 10% 时,细胞干重急剧下降至 0.045 g/dL,但神经酰胺质量分数继续升高至 0.851%,是对照的 3 倍。升高乙醇体积分数至 15%,细胞干重与神经酰胺质量分数不再变化。过量乙醇作用于细胞膜时常引起膜上脂类成分的改变,细胞倾向于积累麦角甾醇以改变膜的刚性及流动性,适应乙醇产生的压力<sup>[16]</sup>。近来有报道指出麦角甾醇常常与神经酰胺及鞘脂共同分布在膜上,形成有序的结构区域<sup>[17]</sup>,因此在受到乙醇胁迫的环境下,神经酰胺的质量分数也有可能提高,以帮助细胞抵抗乙醇的毒害作用。但在此条件下细胞几乎无法生长,即使神经酰胺的质量分数较对照提高约 3 倍也没有工业应用上的意义。

## 3 结 论

作者采用简便实用的 HPLC/ELSD 方法,研究了了几种可能影响神经酰胺在胞内积累的情况。在常

规的培养条件下,神经酰胺在胞内通常维持在0.25%的水平;当改变温度及外源添加硫酸镁时效果不明显,细胞干重及神经酰胺质量分数均没有改变;当添加过量硫酸镁时酵母细胞干重下降,神经酰胺质量分数有明显下降;而在提高供氧的条件下,神经酰胺质量分数上升至0.65%,是常规供氧的2.5倍,细胞干重也有所提高;在乙醇存在的情况下,细胞干重随乙醇体积分数的增加而剧烈下降,神经酰胺的质量分数则可提高至0.8%,但与对照相比只增加了约3倍.神经酰胺在细胞内主要起信号因子的作用,当其质量分数增高时通常导致细胞衰老或凋亡,因此在发酵条件下细胞不会大量积

累神经酰胺,而是尽可能将其转化为衍生物鞘脂,从而作为细胞膜结构成分存在.在溶氧提高的情况下,细胞内线粒体发育充分,改变了胞内活性氧环境,从而间接影响神经酰胺质量分数.在乙醇胁迫的条件下,分布在细胞膜上的神经酰胺质量分数也有所变化,以抵抗毒害作用.综合以上条件,说明可在发酵水平上通过调节细胞的生长条件影响胞内神经酰胺的质量分数.

致谢 感谢克罗地亚 Rupcic 教授 (University of Rijeka) 提供酵母菌株 33M. 同时感谢荷兰 Cosmoferm 公司提供神经酰胺标样.

## 参考文献:

- [1] Dickson R C. Sphingolipid functions in *Saccharomyces cerevisiae*: comparison to mammals[J]. *Annu Rev Biochem*, 1998, 67: 27-48.
- [2] Nakayama M, Kojima M, Ohnishi M, *et al*. Enzymatic formation of plant cerebroside: properties of UDP-glucose: ceramide glucosyltransferase in radish seedlings[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1995, 59(10): 1882-1886.
- [3] Hannun Y A, Bell R M. Functions of sphingolipids and sphingolipid breakdown products in cellular regulation[J]. *Science*, 1989, 243: 500-507.
- [4] Hannun Y A. The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide[J]. *J Biol Chem*, 1994, 269: 3125-3128.
- [5] Hannun Y A. Function of ceramide in coordinating cellular responses to stress[J]. *Science*, 1996, 274: 1855-1859.
- [6] Dyatlovitskaya E V. Sphingolipids and malignant growth[J]. *Biokhimiya (RUS)*, 1995, 60: 629-633.
- [7] Imokawa G, Abe A, Jin K, *et al*. Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis: an etiologic factor in atopic dry skin[J]. *J Invest Dermatol*, 1991, 96:523-526.
- [8] Yamamoto A, Serizawa S, Ito M, *et al*. Stratum corneum lipid abnormalities in atopic dermatitis[J]. *Arch Dermatol Res*, 1991, 283:219-223.
- [9] Rupcic J, Maric V. Isolation and chemical composition of the ceramide of the *Candida lipolytica* yeast[J]. *Chem Phys Lipids*, 1998, 91:153-161.
- [10] Zhou Q, Zhang L, Chen GQ. Quantitation of yeast ceramides using high-performance liquid chromatography-evaporative light-scattering detection[J]. *J Chrom B*, 2002, 780: 161-169.
- [11] Sawai H, Okamoto Y, Luberto C, *et al*. Identification of ISC1 (YER019w) as inositol phosphosphingolipid phospholipase C in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(50): 39793-39798.
- [12] 刑来君,李明春. 普通真菌学[M]. 北京:高等教育出版社, 1999. 65.
- [13] Wells G B, Dickson R C, Lester R L. Heat-induced elevation of ceramide in *Saccharomyces cerevisiae* via de novo synthesis[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(13): 7235-7243.
- [14] Fleury C, Mignotte B, Vayssiere J L. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling[J]. *Biochimie*, 2002, 84(2-3): 131-141.
- [15] Andrieu-Abadie N, Gouaze V, Salvayre R, *et al*. Ceramide in apoptosis signaling: relationship with oxidative stress[J]. *Free Radical Bio Med*, 2001, 31(6): 717-728.
- [16] Chi Z, Arneborg N. Relationship between lipid composition, frequency of ethanol-induced respiratory deficient mutants, and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *J Appl Microbiol*, 1999, 86(6): 1047-1052.
- [17] Xu X L, Bittman R, Duportail G, *et al*. Effect of the structure of natural sterols and sphingolipids on the formation of ordered sphingolipid/sterol domains (rafts) [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276 (36): 33540-33546.

(责任编辑:李春丽)