

解脂假丝酵母中神经酰胺的鉴别和定量分析

周 全 陈国强*

(清华大学生物科学与技术系 北京 100084)

摘 要 采用制备型薄层板分离解脂假丝酵母(*Yarrowia lipolytica*)中与神经酰胺标样近似的脂类成分,将其用于二级质谱分析,确认了其结构为脂肪酸碳链长度为 24 的神经酰胺。结合高效液相色谱/蒸发光散射检测器(HPLC/ELSD)的检测方法,首次定量报道了解脂假丝酵母中神经酰胺的含量为 2.5‰。

关键词 解脂假丝酵母,神经酰胺,高效液相色谱,二级质谱,蒸发光散射检测器

中图分类号 Q936 **文献标识码** A **文章编号** 1001-6209(2004)05-0692-03

神经酰胺是一种广泛存在于真核生物细胞中的信号传导物质,作为一种脂质分子以细胞膜的结构组成成份或胞内自由分子形式存在^[1,2]。它与细胞的增殖、分化、凋亡,细胞周期抑制等都有关系^[3-6]。近年相关研究发现神经酰胺在皮肤护理中起着活性因子的作用,具有皮肤保湿、防护、修复损伤等重要功效^[7,8]。因此它已成为一种重要的化妆品添加组分。神经酰胺曾经主要提取自牛脑组织,但由于疯牛病可能带来的污染,目前迫切需要找到一种安全和经济的方法获得神经酰胺。

酵母生长周期短,培养成本低,相关技术成熟,容易进行基因操作,是生产神经酰胺的理想来源。现今在酿酒酵母与解脂假丝酵母等中报道过自由态神经酰胺的存在^[9,10]。但解脂假丝酵母中神经酰胺的研究相对很少,目前仅有一家实验室初步报道过其中神经酰胺的存在,并且无法定量测得其中含量^[10]。本文采用薄层板(TLC)分离的方法得到神经酰胺,通过二级质谱证实并分析了结构,采用高效液相色谱(HPLC)结合蒸发光散射检测器(ELSD)分析^[11]等手段,首次定量分析了酵母中神经酰胺的含量及结构。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和培养基 解脂假丝酵母(*Yarrowia lipolytica*)33M 来自克罗地亚 Rupcic 实验室^[10]。培养基为丰富营养培养基 YPD,细胞在 30℃,200r/min 的摇床上培养 72h 后离心冰干后待检测。

1.1.2 试剂和仪器 色谱纯正己烷,乙醇,购自迪马公司(北京)。其他试剂为分析纯。神经酰胺标样 N- α 羟基棕榈酰-植物神经酰胺(CerV)由 Cosmoferm(荷兰)公司赠送,其结构与酵母神经酰胺类似,仅脂肪酸的碳链长度有差异。液相色谱仪为 TSP(Thermo Separation Products)公司的 SpectraSystem P2000

(美国)。检测器为蒸发光散射检测器(Evaporative Light Scattering Detector, ELSD)Sedex75 型(Sedere, 法国)。色谱柱为 Alltima CN 柱(5 μ , 4.6 mm $\times$ 250 mm, Alltech, 美国)。薄层板采用烟台化工研究厂生产的硅胶高效薄层色谱板。质谱仪为 API 3000 质谱仪(PE 公司,美国)。

1.2 脂类提取

摇瓶中培养 72h 的 100mL 发酵液经离心后收集湿细胞,冰干 24h 除去细胞内水分。用 1mol/L NaOH 碱液处理细胞后,采用 Bligh-Dyer 方法^[12]提取胞内脂肪,得到酵母脂类粗提物后,定容于适量氯仿,以脂类粗提物用于 HPLC 及 TLC 分析。

1.3 高效液相色谱(HPLC)分析和薄层板(TLC)分析

HPLC 分析所用流动相为正己烷/乙醇(99/1),流速 0.8mL/min,色谱柱为 Alltima CN 柱。蒸发光散射检测器温度设为 40℃,空气压力 3.5 bar,检测灵敏度为 8。定量分析时以标样浓度 C 和样品峰面积 A 为参数作出双对数曲线,对神经酰胺进行定量。薄层板分析时展开剂为氯仿/甲醇/冰乙酸(19:0.9:0.1),显色时将薄层板浸在 10%硫酸铜溶液(8%的磷酸)后在 170℃烘干 30min。

1.4 质谱(MS)分析

1.4.1 质谱分析样品制备 将溶于氯仿的细胞脂类提取物经制备型薄层板分离展开,刮取与标样 R_f 值近似的条带,经氯仿:甲醇(1:1)反复提取数次回收后挥发干,溶于适量氯仿待质谱分析。

1.4.2 质谱分析 采用 API 3000 质谱仪。一级质谱条件为:正离子模式,雾化气流为 3L/min;气帘气压为 11 PSI;离子源电压为 5000V。二级质谱条件为:正离子模式,雾化气流为 3L/min;气帘气压为 11 PSI;雾化气流为 3L/min;气帘气压为 11 PSI;碰撞气压为 4 PSI;离子源电压为 5000V;碰撞电压为 -42 V。

* 通讯作者。Tel:86-10-62783844; Fax:86-10-62788784; E-mail:chengq@mail.tsinghua.edu.cn

作者简介 周 全(1976-),男,四川江油市人,博士研究生,从事微生物及分子生物学研究。E-mail:zhouquan99@mails.tsinghua.edu.cn

收稿日期 2003-12-29, 修回日期 2004-03-15

2 结果

2.1 *Yarrowia lipolitica* 33M 中脂类在 TLC 板上的分离

将菌株 33M 提取后的脂类粗提物在 TLC 板上分析,结果如图 1-A 所示。谱带 1~5, 7~8 为 33M 脂类提取物,谱带 6 为神经酰胺标样。薄层板前端斑点主要是极性较低的长链脂肪酸及甾醇。神经酰胺含数个羟基而呈中等极性, R_f 约为 0.2。经制备型薄层板分离酵母脂类中对应条带,在分析型薄层板上验证其纯度,如图 1-B 所示。谱带 9 为神经酰胺标样,谱带 10 为分离后的脂类样品。

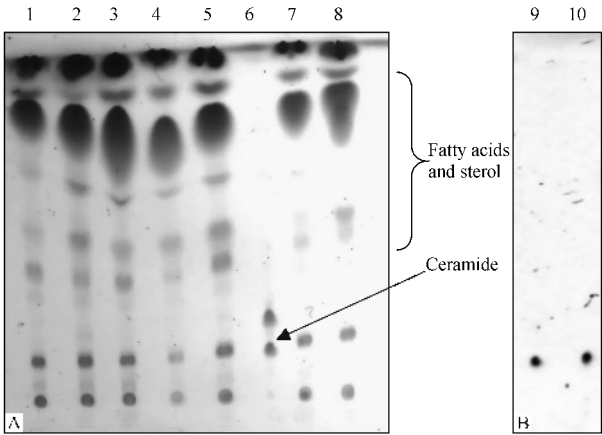


图 1 解脂假丝酵母 33M 中脂类提取物的薄层板谱图

Fig.1 Lipids profile of *Yarrowia lipolitica* 33M on TLC
A: 33M lipids profile; B: Verification of the purified ceramide spots.
1~5, 7~8: Lipids extracted from different amount of dry cells; 6: Ceramide standards; 9: Ceramide standard after purification on preparative TLC; 10: Suspected ceramide spot purified from yeast 33M; TLC plates developed with Chloroform/Methanol/Acetic acid (19:0.9:0.1).

2.2 质谱分析确定神经酰胺结构

将图 1-B 中分离到的 R_f 近似于神经酰胺标样的样品用于质谱分析。在一级质谱下解析确认其 $m/z = 684$,如图 2-A

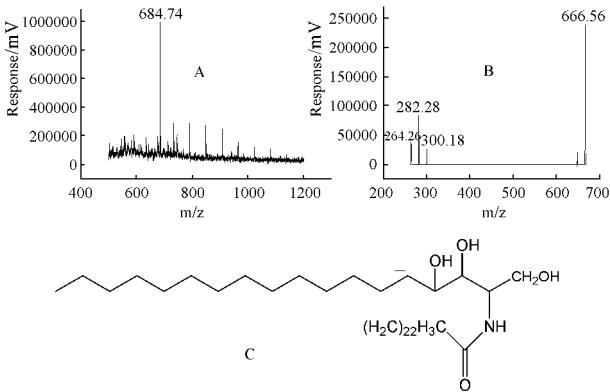


图 2 解脂假丝酵母 33M 中脂类提取物的质谱谱图

Fig.2 The MS profile of lipids of yeast *Yarrowia lipolitica* 33M
A: The MS profile of the purified ceramide spot of yeast 33M; B: The MS/MS fragments of the suspected ceramide ($m/z = 684.7$) for further confirmation; C: The deduced structure of the ceramide isolated in yeast *Yarrowia lipolitica* 33M.

所示。其对应的结构可能为脂肪酸链长为 24 的神经酰胺。为确认其结构,将该分子在二级质谱条件下打碎观察断裂模式,该分子首先脱水形成 $m/z = 666$ 的片段,继而断裂得到 $m/z = 264$, $m/z = 284$ 与 $m/z = 300$ 的碎片,这是神经酰胺特异的断裂方式(图 2-B),与标样在二级质谱下谱图吻合,也与文献报道的神经酰胺的断裂模式一致^[13]。根据二级质谱所推测的神经酰胺结构如图 2-C 所示。

2.3 HPLC/ELSD 分析解脂假丝酵母 33M 中神经酰胺含量

配制不同浓度 C(mg/L) 的神经酰胺标样,用 HPLC 进行分析。以峰面积 A 和神经酰胺浓度 C 为参数,作双对数曲线,从而得到神经酰胺的定量标准曲线(图 3-A)。在此基础上,定量测得解脂假丝酵母 33M 中脂肪酸碳链长度为 24 的神经酰胺 V 含量占细胞干重为 2.5%。酵母 33M 脂类提取物在 HPLC 下的谱图如图 3-B 所示。

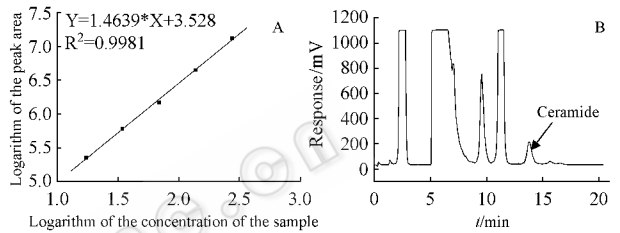


图 3 (A) 神经酰胺标样在 HPLC/ELSD 上的双对数标准曲线; (B) 解脂假丝酵母 33M 的脂类粗提取物的 HPLC/ELSD 谱图

Fig.3 (A) The double log plot of the ceramide standard on HPLC/ELSD; (B) The lipids crude extracts of yeast *Yarrowia lipolitica* 33M on HPLC/ELSD.

Column: Alltima CN (4.6mm $\times$ 250mm); Mobile phase: Hexane: Ethanol (99:1); Speed: 0.8mL/min; ELSD temperature: 40 $^{\circ}$ C; Gain: 8; Air pressure: 3.5 bar.

3 讨论

神经酰胺在细胞内主要以鞘脂的一个基本结构单元存在^[9],自由态的神经酰胺含量很少。它没有紫外或荧光生色团,很难被衍生,因此其检测非常困难^[14]。常规的放射性同位素测量法要求苛刻,步骤繁琐,因此对神经酰胺的研究相当局限,目前只有一个实验室曾研究过解脂假丝酵母(*Yarrowia lipolitica*, 别称为 *Candida lipolitica*)能否产生神经酰胺^[10],但至今仍只有间接证据推测,而没有明确的质谱数据或谱图确认其存在。本论文首次采用 TLC 分离方法,结合二级质谱确认了其中神经酰胺的存在与结构。同时采用近年发展起来的 HPLC/ELSD 方法对神经酰胺进行了定量分析,明确证实了解脂假丝酵母中含有神经酰胺。

TLC 板上化学合成来源的神经酰胺标样表现为两个斑点,将其分离后进行质谱检测,确认二者均为分子量为 600 的神经酰胺,互为对应消旋体。但在酵母细胞中仅存在结构类似于 R_f 值较小的那一类型,因此在定量分析中以它作标准曲线。蒸发光散射检测器的峰面积响应与进样量并不呈线性关系,但其双对数曲线却具有良好的线性,如图 3-A 所示,在此基础上即可测定神经酰胺的含量。

将纯化的酵母神经酰胺进行质谱分析,在 $m/z = 684$ 处得到一个较强响应。在二级质谱条件下,该物质脱水形成 $m/z = 666$ 的片段,继而断裂得到 $m/z = 300, 282, 264$ 的碎片。这是该类型神经酰胺典型的碎片模式,结合薄层板上的斑点及高效液相色谱上的谱峰,可确认解脂假丝酵母中含有神经酰胺。它的脂肪酸碳链长度为 24。

神经酰胺在解脂假丝酵母细胞中的含量极低,仅占细胞干重的 2.5‰ 左右。因此若要以酵母作为神经酰胺工业用的原料,则需要进行细胞高密度发酵,或通过基因工程的方法高效表达神经酰胺合成酶的基因 (*LCB1* 与 *LCB2*),提高它在细胞内的初始含量,在此基础上结合发酵工艺的改进以提高其生产水平。

致谢 感谢 Rupcic 教授 (University of Rijeka, Croatia) 提供酵母菌株 33M。同时感谢 Cosmoferm 公司 (荷兰) 提供神经酰胺标样。

参 考 文 献

- [1] Hakomori S. Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation and oncogenesis. *Annu Rev Biochem*, 1981, **50**: 733–764.
- [2] Merrill A H, Hannun Y A, Bell R M. Sphingolipids and their metabolites in cell regulation. *Adv Lipid Res*, 1993, **25**: 1–24.
- [3] Hannun Y A, Bell R M. Functions of sphingolipids and sphingolipid breakdown products in cellular regulation. *Science*, 1989, **243**: 500–507.
- [4] Hannun Y A. The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide. *J Biol Chem*, 1994, **269**: 3125–3128.
- [5] Hannun Y A. Function of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science*, 1996, **274**: 1855–1859.
- [6] Dyatlovitskaya E V. Sphingolipids and malignant growth. *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 Invest Dermatol*, 1991, **96**: 523–526.
- [8] Yamamoto A, Serizawa S, Ito M, *et al.* Stratum corneum lipid abnormalities in atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res*, 1991, **283**: 219–223.
- [9] Dickson R C, Lester R L. Yeast sphingolipids. *BBA*, 1999, **1426**: 347–357.
- [10] Rupcic J, Maric V. Isolation and chemical composition of the ceramide of the *Candida lipolytica* yeast. *Chem Phys Lipids*, 1998, **91**: 153–161.
- [11] Zhou Q, Zhang L, Chen G Q. Quantitation of yeast ceramides using high-performance liquid chromatography-evaporative light-scattering detection. *J Chrom B*, 2002, **780**: 161–169.
- [12] Bligh E G, Dyer W J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*, 1959, **37**: 911–917.
- [13] Klaus R, Reinhard H H Neubert. Liquid chromatography-electrospray mass spectrometry and tandem mass spectrometry of ceramides. *Anal Chimica Acta*, 2000, **403**: 292–303.
- [14] Crèmeti A E, Fischl A S. Current methods for the identification and quantitation of ceramides: an overview. *Lipids*, 2000, **35**(9): 937–945.

Identification and Quantitation of Ceramides in Yeast *Yarrowia lipolitica*

ZHOU Quan CHEN Guo-Qiang*

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

Abstract: Lipids in yeast *Yarrowia lipolitica* was separated by preparative Thin Layer Chromatography (TLC) to obtain ceramide. Mass Spectrum (MS) and tandem-MS were applied to confirm the existence of the ceramide in *Y. lipolitica* and to reveal its structure. Combined with High Performance Liquid Chromatography and Evaporative Light Scattering Detector (HPLC/ELSD), for the first time, the ceramide content with 24 carbons in Fatty Acid (FA) side chain was determined in *Y. lipolitica*.

Key words: *Yarrowia lipolitica*, Ceramide, HPLC, ELSD tandem-MS

* Corresponding author. Tel: 86-10-62783844; Fax: 86-10-6278784; E-mail: chengq@mail.tsinghua.edu.cn

Received date: 12-29-2003