

# 毕赤酵母 *PAS\_chr4\_0427* 和 *PAS\_chr2-2\_0408* 基因缺失对神经酰胺合成的比较

黄铭<sup>1</sup>, 吴佳欣<sup>1</sup>, 张目<sup>2</sup>, 胡晓清<sup>1\*</sup>

(1. 江南大学生物工程学院, 江苏无锡 214122) (2. 广州悦荟化妆品有限公司, 广东广州 510000)

**摘要:** 神经酰胺具有维护皮肤屏障、抗炎抗氧化等多种作用, 其生物合成具有重要市场前景。目前神经酰胺主要利用酿酒酵母合成, 而尚无利用重要工业宿主——巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 合成的报道, 该研究系首次通过基因改造 *P. pastoris* GS115 合成神经酰胺。通过 CRISPR-Cas9 技术依次敲除关键基因 *PAS\_chr4\_0427* 和 *PAS\_chr2-2\_0408*, 成功构建了 GS115-O 和 GS115-OC 两个突变株。与 GS115 相比, 这两个突变株的最大生物量分别下降了 17.03% 和 24.06%, 而其神经酰胺的相对含量分别提升了 3.80 倍和 4.75 倍。在 GS115-O 和 GS115-OC 中合成了 67 种神经酰胺, 包括 28 种植物神经酰胺, 相较于 GS115 增加了 5 种; 28 种神经酰胺的相对含量增幅超过了 100 倍, 最高达到了 8 533.98 倍。此外, 突变株中磷脂酸、甘油二酯、甘油三酯及特别是肌醇磷酸神经酰胺 (PI-Cer) 的含量显著增加, 尤其是 PI-Cer 的增长幅度最大, 这表明脂质代谢发生了显著变化, 促进了神经酰胺向复杂鞘脂的转化。该研究表明 GS115-O 和 GS115-OC 是极具潜力的神经酰胺生产菌株。

**关键词:** 毕赤酵母; 神经酰胺; CRISPR-Cas9 技术; 超高效合相色谱串联质谱; 脂质组

文章编号: 1673-9078(2025)02-40-51

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.2.0096

## Comparison of the Effects of *PAS\_chr4\_0427* and *PAS\_chr2-2\_0408* Gene Deletions on Ceramide Synthesis in *Pichia pastoris*

HUANG Ming<sup>1</sup>, WU Jiabin<sup>1</sup>, ZHANG Mu<sup>2</sup>, HU Xiaoqing<sup>1\*</sup>

(1. School of Bioengineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

(2. Guangzhou Yuehui Cosmetics Co. Ltd., Guangzhou 510000, China)

**Abstract:** Ceramides play critical roles in maintaining skin barrier functions and exhibit anti-inflammatory and antioxidant properties; thus, their biosynthesis has substantial market potential. Ceramide synthesis has primarily been achieved using *Saccharomyces cerevisiae*, whereas there have been no reports on ceramide synthesis using the important industrial host *Pichia pastoris*. This research represents the first instance of ceramide synthesis via genetically modified *P. pastoris* GS115. The key genes *PAS\_chr4\_0427* and *PAS\_chr2-2\_0408* were sequentially targeted for deletion

引文格式:

黄铭, 吴佳欣, 张目, 等. 毕赤酵母 *PAS\_chr4\_0427* 和 *PAS\_chr2-2\_0408* 基因缺失对神经酰胺合成的比较[J]. 现代食品科技, 2025, 41(2): 40-51.

HUANG Ming, WU Jiabin, ZHANG Mu, et al. Comparison of the effects of *PAS\_chr4\_0427* and *PAS\_chr2-2\_0408* Gene deletions on ceramide synthesis in *Pichia pastoris* [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(2): 40-51.

收稿日期: 2024-01-20

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2021YFC2100900)

作者简介: 黄铭 (1998-), 男, 硕士, 研究方向: 生物化学与分子生物学, E-mail: 2213450266@qq.com

通讯作者: 胡晓清 (1978-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 微生物代谢调控、代谢工程、发酵工程和食品安全, E-mail: xiaoqinghu@jiangnan.edu.cn

using CRISPR-Cas9 technology, leading to the construction of the mutant strains GS115-O and GS115-OC. The maximum biomasses of GS115-O and GS115-OC were reduced by 17.03% and 24.06%, respectively, compared with that of GS115, whereas the relative contents of ceramides in these mutants were increased by 3.80- and 4.75-fold, respectively. The analysis revealed the synthesis of 67 ceramide species, including 28 phytoceramides, using GS115-O and GS115-OC, marking an additional five species than that produced using GS115. Notably, the relative contents of 28 ceramide species increase by more than 100-fold, with the highest reaching 8533.98-fold. Furthermore, the contents of phosphatidic acid, diacylglycerols, triacylglycerols, and particularly inositol phosphoceramide were significantly increased in the mutants, with the inositol phosphoceramide content showing the most substantial increase. These results indicate that remarkable lipid metabolic alterations occur, accompanied by increased conversion of ceramides into complex sphingolipids. GS115-O and GS115-OC show great potential for ceramide production, including in industrial applications.

**Key words:** *Pichia pastoris*; ceramide; CRISPR-Cas9; UPC2-MS; lipidome

神经酰胺是鞘脂的重要组成部分，广泛存在于真核细胞<sup>[1]</sup>。神经酰胺由长链碱基和脂肪酸通过酰胺键连接而成，其长链碱基主要有鞘氨醇、二氢鞘氨醇和植物鞘氨醇三种类型，不同神经酰胺类别取决于不同的碳链长短、不饱和双键以及羟基加和<sup>[2,3]</sup>。作为细胞中调节信号转导的第二信使<sup>[4,5]</sup>，神经酰胺在细胞分化、迁移、炎症和凋亡中起着重要作用<sup>[3,6]</sup>。此外，作为皮肤表皮中关键脂质，神经酰胺具有保湿、皮肤屏障、调节免疫、抗过敏、抗衰等多种功能<sup>[4,7-9]</sup>，特别是植物神经酰胺（Phytoceramides）还具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤等作用<sup>[10,11]</sup>，因此近年来神经酰胺市场需求量剧增。

据报道，早期神经酰胺制备依赖动植物提取和化学合成，但动植物生长周期长，存在安全风险<sup>[12]</sup>，化学合成存在缺乏生物活性及造价昂贵等问题<sup>[13]</sup>，因而迫切需求一种高效、安全、经济的方法生产神经酰胺，所以后期神经酰胺制备主要利用微生物（主要为酵母）合成法<sup>[14]</sup>。林会兰<sup>[15]</sup>利用酿酒酵母，通过在培养基分别添加 2 mmol/L 棕榈酸和 50 mmol/L CaCl<sub>2</sub>，分别提升神经酰胺 V 含量 3 倍和 1.8 倍；对 *LCBI* 基因增强表达后，神经酰胺合成提高 1.9 倍<sup>[16]</sup>。此外，Kim 等<sup>[17]</sup>在酿酒酵母中多拷贝表达参与鞘脂合成路径基因 *TSC10* 后，提高神经酰胺产率 4.5 倍，达 9.8 mg/g 细胞。酵母中神经酰胺合成路径也被报道，如图 1 所示<sup>[14,18]</sup>，神经酰胺合成发生于内质网，以丝氨酸和棕榈酰辅酶 A 为底物，通过一系列酶促反应合成。酵母中神经酰胺合成受到严格的调控，在 SPT 水平，*orm1* 和 *orm2* 基因编码的调控蛋白可通过与 SPT 互作负调节神经酰胺的合成<sup>[19]</sup>。此外，丝氨酸的底物丰度也影响神经酰胺的合成效率，*cha1* 编码的丝氨酸脱氨酶通过增加丝

氨酸的分解代谢转化为丙酮酸<sup>[20]</sup>，削弱流向神经酰胺代谢路径的丝氨酸。此外尚无微生物合成神经酰胺的其他报道。

目前尚无利用重要宿主菌—*Pichia pastoris* 生产神经酰胺的研究，*P. pastoris* 是近年广泛应用的工业菌株，具有多重优势，包括严谨高效的启动子、高效的分泌表达能力、易于高密度培养等特性。有基于此，本文系首次利用 *P. pastoris* 进行了神经酰胺生产，主要策略是针对其调控和旁路途径基因进行改造（图 1）。首先，通过敲除 *orm* 基因，解除神经酰胺合成的反馈抑制因子，优化 *P. pastoris* 的代谢路径；同时在此基础上敲除 *cha1* 基因切断神经酰胺前体物质的支路代谢途径，提高 *P. pastoris* 的神经酰胺合成效率，以提高神经酰胺生产效率。

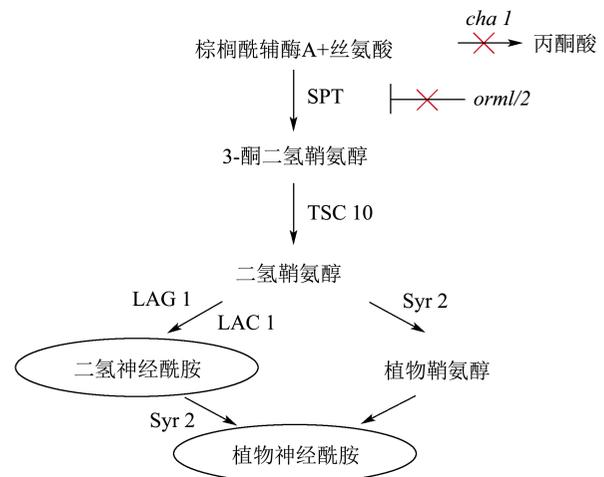


图 1 *P. pastoris* GS115 中神经酰胺合成的调控策略图

Fig.1 Strategies for regulating ceramide synthesis in *P. pastoris* GS115

多种神经酰胺分析方法被报道，其中超高效液相色谱串联质谱（UPC<sup>2</sup>-MS）优势明显<sup>[21]</sup>，UPC<sup>2</sup>

使用超临界流体 CO<sub>2</sub> 作为流动相, 其比液相色谱的流动相具有更低粘度和更高扩散性, 且不受限于气相色谱的挥发性低分子量物质, 具有更高的分离效率<sup>[22]</sup>。利用 UPC<sup>2</sup> 对样品进行广泛脂质分类分离, 对于脂质中生物标记物的鉴定具有良好的实用性, 这对于揭示细胞脂质代谢的整体变化至关重要。本论文基于 UPC<sup>2</sup>-MS 的脂质组学分析揭示基因改造后神经酰胺的变化, 获得高产神经酰胺的 *P. pastoris* 菌株, 为神经酰胺工业生产奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株与材料

#### 1.1.1 菌株及质粒

菌株和质粒如表 1 所示。

表 1 实验所用的菌株及质粒

Table 1 The strains and plasmids used in the experiment

项目	名称	来源
菌株	<i>P. pastoris</i> GS115	本实验室保藏
	<i>E. coli</i> JM109	本实验室保藏
质粒	pPpT4-pHTX1-hsCas9	本实验室保藏
	pUC57	本实验室保藏

#### 1.1.2 培养基

LB 培养基: 10 g/L 蛋白胨、10 g/L NaCl、5 g/L 酵母提取物;

YPD 培养基: 20 g/L 蛋白胨、20 g/L 葡萄糖、10 g/L 酵母提取物;

固体培养基另外添加 1.5 wt.% 琼脂。

#### 1.1.3 试剂

SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 一步克隆试剂盒, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 质粒小提试剂盒(离心柱型), 天根生化科技(北京)有限公司; 酵母粉、蛋白胨, 英国 OXOID 公司; 博来霉素, 索莱宝生物工程有限公司。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 敲除质粒的构建

原始 pPpT4-pHTX1-hsCas9 敲除质粒保存在 *E. coli* JM109, 使用质粒小提试剂盒提取质粒。以原始 pPpT4-pHTX1-hsCas9 质粒为模板构建目标基因敲除质粒。分别选取基因上 Cas9 识别位点的

20 bp 作为敲除靶点来设计上游引物。

以原始质粒为模板, 使用 Prime Star DNA 聚合酶进行反向 PCR。扩增完成后进行琼脂糖凝胶电泳, 对正确条带胶回收并测其浓度, 线性化后转至 *E. coli* JM109 环化。使用验证引物筛选阳性转化子。

### 1.2.2 同源臂的构建

以 GS115 的基因组为模板, 在敲除目的基因的上下游设计引物, 各选取约 1 000 bp 左右的片段进行上下游同源臂的扩增, 将其分别进行胶回收后, 利用重叠 PCR 将两个片段连接, 将其连接到 pUC57 质粒载体上保存。

### 1.2.3 脂质的提取

总脂质提取主要参照 Bligh-Dyer 萃取法<sup>[23,24]</sup>, 并略做改进如下: 1) 将菌株接入 50 mL 的 YPD 培养基中, 30 °C, 220 r/min 培养 24 h; 2) 取 30 mL 菌液于 50 mL 离心管中, 4 000×g, 离心 10 min, 收集菌体, 并用质量分数 0.85% KCl 溶液洗涤 3 遍; 3) 菌体于液氮中猝灭, 在 16 mL 0.85% KCl 溶液中重悬; 4) 转入玻璃瓶, 加入 20 mL 三氯甲烷和 40 mL 甲醇, 形成 I 相混合物(三氯甲烷: 甲醇: KCl 盐溶液=1:2:0.8, V/V/V); 5) 超声 10 min, 震荡 30 min, 再超声 10 min, 震荡 1 h; 6) 4 000×g 离心 10 min, 收集上清液; 加入 20 mL 三氯甲烷和 20 mL 0.85% KCl 溶液, 形成 II 相混合物(三氯甲烷: 甲醇: KCl 盐溶液=2:2:1.8, V/V/V), 充分混合; 7) 4 000×g 离心 10 min, 分离两相系统, 收集下相氯仿层, 氮吹仪蒸发溶剂, 制得样品, 检测前溶于三氯甲烷。上述离心均在 4 °C 进行。

### 1.2.4 脂质组学分析

色谱条件: 采用 Waters ACQUITY UPC<sup>2</sup> 系统, Waters Torus Diol 色谱柱(3.0×100 mm, 1.7 μm), UPC<sup>2</sup> 配有二元溶剂输送泵、自动取样器、柱温箱和背压调节器。流动相 A 是 CO<sub>2</sub>, 流动相 B 是含有 20 mmol/L 甲酸铵的甲醇: 乙腈(1:1, V/V)。梯度洗脱: 0~1 min φ=2% B, 1~11 min 2%~50% B, 11~18 min 50% B, 18~19 min 50%~2% B, 19~20 min 2% B, 总运行时长 20 min。流量 1.5 mL/min, 背压保持在 1 800 psi, 自动进样器保持在 5 °C, 所有样品都使用 1 μL 进样。

质谱条件: 质谱系统为 Waters SELECT SERIES Cyclic IMS, 在正离子(ESI+)和负离子(ESI-)

模式下运行。毛细管电压 3.0 kV (+) 和 2.5 kV (-), 采样锥电压 40 V (+/-)。去溶剂气体为流速 900 L/h 氮气, 去溶剂温度为恒定 350 °C, 离子源温度 120 °C。数据在 50~2 000 u 质量数范围内采集。质谱仪以 MSE/HDMSE 模式运行, 具有交替的低碰撞能量和高碰撞能量。扫描设置在高碰撞能量, 从 20~50 eV 倾斜, 用于产生产物离子谱。

收集原始数据, 使用 Progenesis QI v3.0 版进行 UPC<sup>2</sup>-MS 脂质数据处理和分析。将原始数据导入, 进行保留时间校准、峰对齐、峰识别、加和物去卷积、峰强度比较、多元化统计分析以及差异化化合物的鉴定。根据色谱柱化学物质的保留时间的从头分析、MSE 高碰撞能量扫描相关性、正离子和负离子串联质谱解释分析以及选择 LipidMaps、LipidBlast、Waters Lipidomic Profiling CCS DB 等脂质相关数据库进行检索鉴定。统计分析涉及每组使用三个生物重复 ( $n=3$ )。

### 1.3 统计分析

每组实验在相同条件下重复 3 次, 用 SPSS 22.0 统计学软件进行分析, 组内比较采用方差分析, 组间比较采用单因素方差分析, 数据用 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。

## 2 结果与讨论

### 2.1 *PAS\_chr4\_0427*和*PAS\_chr2-2\_0408*基因缺失对生长影响

酿酒酵母 *orm1* 和 *orm2* 基因是鞘脂生物合成途径的关键调控因子<sup>[18,19]</sup>。利用 TBLASTN 算法进行同源性搜索, 在 *P. pastoris* GS115 基因组中检索到与 *orm1* 和 *orm2* 同源的基因 *PAS\_chr4\_0427*, 并通过 CRISPR-Cas9 技术敲除 *PAS\_chr4\_0427*, 获得 *P. pastoris* GS115  $\Delta$ *PAS\_chr4\_0427* (命名为 GS115-O)。此外, 酿酒酵母 *chal* 在神经酰胺合成中也扮演至关重要的角色<sup>[20]</sup>, 其编码蛋白调节 L-丝氨酸 (神经酰胺合成前体) 代谢。在 GS115 基因组进行同源性搜索, 检索出与酿酒酵母 S288C 来源 *chal* 高度同源的 *PAS\_chr2-2\_0408*, 并在 GS115-O 敲除, 获得了双基因缺失 *P. pastoris* GS115 $\Delta$ *PAS\_chr4\_0427* $\Delta$ *PAS\_chr2-2\_0408*, 命名为 GS115-OC。

首先进行生长性能分析, 如图 2 所示, 在 YPD 培养基中, 相比 GS115, GS115-O 生长速度略有降低, 而 GS115-OC 则进一步降低。在延滞期 (0~12 h), 3 株酵母菌生长缓慢, 在 12 h, GS115、GS115-O

和 GS115-OC 的 OD<sub>600</sub> 分别为 4.64、4.39、2.33; 之后进入快速生长阶段, 3 株酵母最大 OD<sub>600</sub> 分别为 29.13、24.17 和 22.12。GS115-O 和 GS115-OC 最大生物量相较 GS115 分别降低 17.03% 和 24.06%, 这表明 *PAS\_chr4\_0427* 和 *PAS\_chr2-2\_0408* 基因的缺失对酵母的生长有一定影响, 基因缺失后可能导致鞘脂失衡及丙酮酸合成受限<sup>[25]</sup>, 从而影响代谢及生长; 但 2 株缺失株生物量降幅在 25% 以内, 仍具有生物合成神经酰胺的潜力。

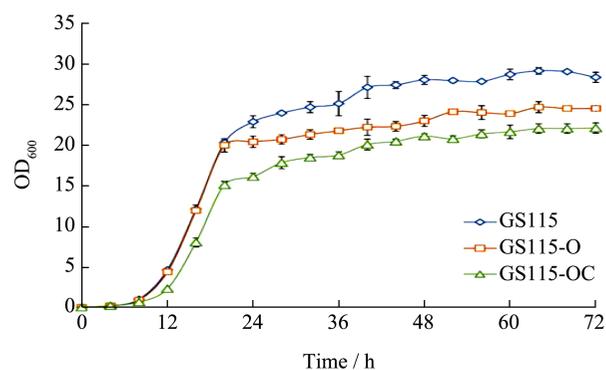


图 2 GS115,GS115-O 和 GS115-OC 的生长曲线

Fig.2 Growth curves of GS115, GS115-O and GS115-OC

### 2.2 *PAS\_chr4\_0427*和*PAS\_chr2-2\_0408*基因缺失对神经酰胺合成的影响

#### 2.2.1 可靠性分析

超临界流体在脂质组学分析已有良好的应用, 其与质谱串联对于血浆、牛奶、器官组织、猪脑等脂质分离有独特优势, 可将相同类别脂质集中于同一时间段分离鉴定。本研究结合前人经验, 利用 ACQUITY UPC<sup>2</sup>/Cyclic IMS 系统对 *P. pastoris* GS115 及其突变株 GS115-O 和 GS115-OC 中的脂质进行高效分离。此外, 通过使用 HDMSE 全信息质谱数据采集模式, 获得了一级和二级质谱数据及高度数据, 为脂质组分析提供了全面信息。

对总脂质提取物进行 UPC<sup>2</sup>-MS 分析, 如图 3 所示, 从约 1 min 开始, 脂质成分被洗脱出来, 大部分组分在 2~12 min 出峰, 不同保留时间的脂质峰均表现出良好的分散性, 其中神经酰胺的出峰时间集中在 3.20~6.35 min, 且植物神经酰胺和非植物神经酰胺也有良好的分离度, 说明了该方法分离度高 (图 3a)。另外, 利用 Progenesis QI 组学分析软件对脂质分子进行了统计分析。在脂质组分析的数据质量控制和模型验证阶段, 采取了多种措施以确保数据的稳定性和重现性。通过在序列的首尾以及中

间部分穿插质控样本 (QC), 并对负总离子流图进行叠加分析 (图 3b), 显示出系统的稳定性和良好的重现性, 为获取有效数据提供了可靠保障。这与前期报道<sup>[22]</sup>相一致, 其与高分辨率质谱联用对广泛脂质分类分离优势显著, 能够有效覆盖脂质的多样性。

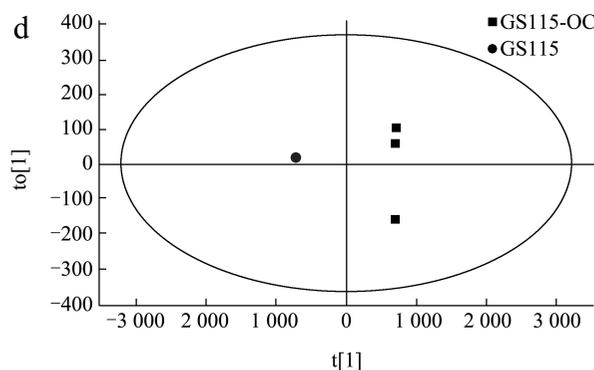
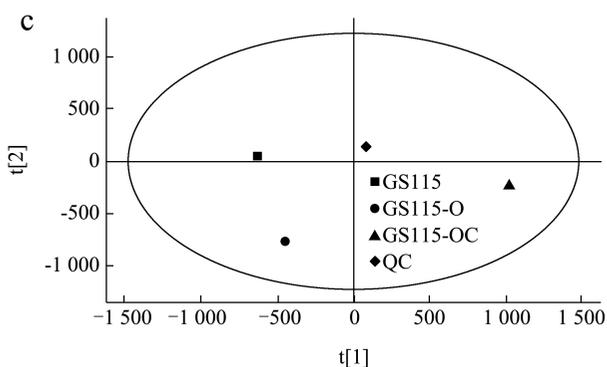
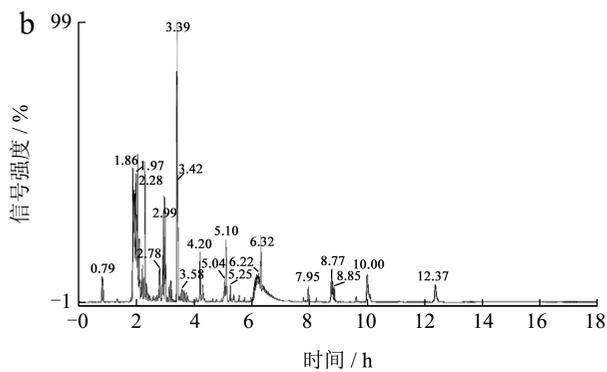
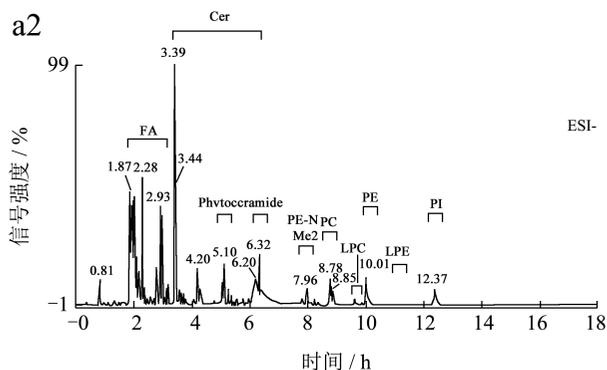
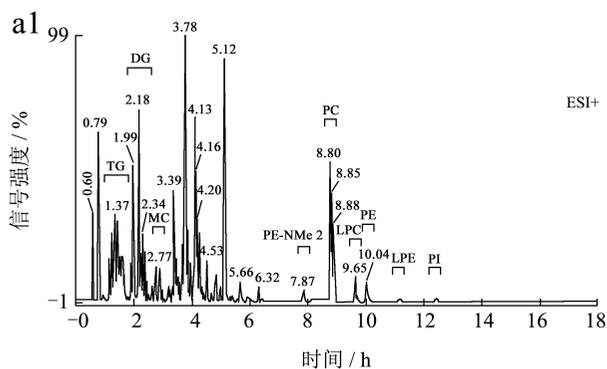


图 3 样品方法评估

Fig.3 Sample method evaluation

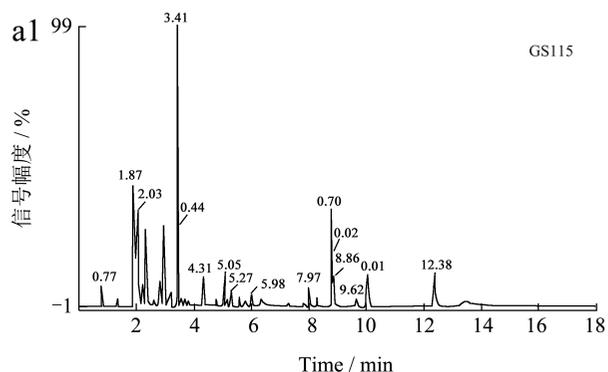
注: a: 样品总离子流图; b: 总离子流叠图; c: PCA 图; d: OPLS-DA 图。

为评价突变株和出发株间的脂质代谢差异, 进行了主成分分析 (PCA), 由图 3c 可知, QC 样本 (黄色) 紧密聚集在一起, QC 聚集程度好, 说明数据质控有效、模型合理; QC 与不同样品之间的离散程度显著, 各样品分离明显, 说明对照与突变株的脂质存在明显差异, 且不同样品组内的分散程度小, 样品的聚集度良好, 显示出模型的高稳定性和可靠性。

随后选择差异最显著的两组样本, 即 GS115 与其突变株 GS115-OC, 进行了正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA)。结果如图 3d 所示, 其在脂质化合物上有良好的分散程度, 可更精准地预测和鉴定导致样品间差异的关键脂质分子, 寻找潜在差异脂质化合物。

### 2.2.2 神经酰胺差异

如图 4 所示, GS115、GS115-O 和 GS115-OC 脂质在负离子模式下的总离子流图揭示了脂质组成的差异。负离子模式有效分离了各脂质组分, 各样品的离子流峰分离度良好, 其中神经酰胺所在的 3.20~6.35 min 时间段有良好的信号强度响应, 常见的植物神经酰胺 Cer (t18:0/18:0) 和非植物神经酰胺 Cer (d18:1/18:0) 二级质谱范例见图 4b 和 4c。





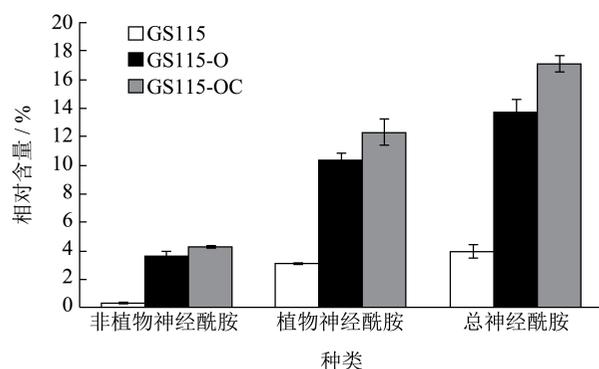


图6 不同菌株中神经酰胺的相对含量

Fig.6 The relative content of ceramide in different strains

为进一步分析神经酰胺种类的变化,根据OPLS-DA结果进行了QI分析,旨在探讨基因敲除对脂质代谢特征的具体影响,包括神经酰胺的种类多样性及其在菌株内的丰度变化。共筛选并鉴定出236个差异化合物,其中67个属于神经酰胺类(差异化合物详见表2和表3),进一步确认28个为植物神经酰胺。Ternes等<sup>[26]</sup>报道在*P. pastoris*中,鞘脂的碱基超过95%为C<sub>18</sub>长链碱基,而本研究鉴定的神经酰胺差异物除少数的C<sub>16</sub>及C<sub>20</sub>种类外,其余均为C<sub>18</sub>的长链碱基。

与GS115相比,GS115-O和GS115-OC的绝大多数神经酰胺相对含量都显著提高,尤其是GS115-OC提升幅度更高。在鉴定出的67种神经酰胺中,66种相较于原始菌株都显著提高,其中28种神经酰胺增幅在100倍之上,最高提升幅度为8533.98倍,详见表2和表3。非植物神经酰胺如表2所示,其中鉴别出的Cer(d18:0/14:0(2OH))和Cer(d18:0/15:0(2OH))为2株突变菌株的新出现的非植物神经酰胺,除Cer(d18:1/24:0)外,其余非植物神经酰胺突变菌株在原始菌株上均有显著提高,相较于GS115,其提高幅度均在6倍以上,其中35.90%的非植物神经酰胺增幅在100倍之上,分别为1-O-stearoyl-Cer(d18:1/18:0)、Cer(d18:0/14:0)、Cer(d18:0/15:0)、Cer(d16:0/16:0)、Cer(d16:0/17:0)、Cer(d18:0/20:0)、Cer(t18:1(6OH)/19:0)、Cer(d18:0/16:0(2OH))、Cer(d18:0/17:0(2OH))、Cer(d18:0/20:0(2OH))、Cer(d18:1(4E)/17:0(2OH))、Cer(d18:0/22:0(2OH))、Cer(d18:2/17:0(2OH))、Cer(d18:2/24:0(2OH)),其中1-O-stearoyl-Cer(d18:1/18:0)提升幅度最高,与GS115相比GS115-OC提升了8533.98倍;且Cer(d18:0/17:0(2OH))、Cer(d18:2/17:0(2OH))的增

幅超过1000倍,分别达到了1435.08及1271.94倍。这表明GS115-O和GS115-OC中不同神经酰胺类别比较均衡,是极具潜力的神经酰胺生产菌。

植物神经酰胺见表3,相对于GS115,2株突变菌株的各种类植物神经酰胺水平均上调。其中Cer(t18:0/14:0(2OH))、Cer(t18:0/17:0(2OH))及Cer(t18:0/19:0(2OH))为改造后新产生的神经酰胺。50.00%的植物神经酰胺增幅度在100倍以上,包括Cer(t18:0/14:0)、Cer(t18:0/15:0)、Cer(t18:0/17:0)、Cer(t18:0/18:0)、Cer(t18:0/19:0)、Cer(t20:0/18:0)、Cer(t18:0/21:0)、Cer(t18:0/22:0)、Cer(t18:0/24:0(2OH))、Cer(t18:0/16:0(2OH))、Cer(t18:0/18:0(2OH))、Cer(t18:0/20:0(2OH))、Cer(t18:0/21:0(2OH))以及Cer(t18:0/22:0(2OH))。在这之中,Cer(t18:0/21:0(2OH))展现出最大增幅,在GS115-OC中变化与GS115相比增加了3071.38倍。除此之外,Cer(t18:0/15:0)、Cer(t18:0/16:0(2OH))、Cer(t18:0/18:0(2OH))以及Cer(t18:0/20:0(2OH)),增幅也在1000倍以上,分别达到了1170.45、2044.96、1325.20以及1864.91倍。这进一步证实了在*P. pastoris* GS115中*PAS\_chr4\_0427*的缺失可削弱神经酰胺合成的反馈抑制,*PAS\_chr2-2\_0408*的缺失可改变神经酰胺前体代谢强度,对提高神经酰胺生产效率具有显著效果。

另外,根据表2和表3进一步分析发现,13种神经酰胺仅在GS115-O菌株中含量有所提高。这13种神经酰胺包括6种非植物神经酰胺Cer(d18:0/15:0)、Cer(d18:0/15:0(2OH))、Cer(d18:0/17:0(2OH))、Cer(d18:1(4E)/16:0(2OH))、Cer(d18:1(4E)/17:0(2OH))和Cer(d18:2/17:0(2OH));以及7种植物神经酰胺Cer(t18:0/25:0)、Cer(t18:0/27:0)、Cer(t20:0/26:0)、Cer(t18:0/17:0(2OH))、Cer(t18:0/25:0(2OH))、Cer(t18:0/26:0(2OH))和Cer(t18:0/27:0(2OH))。

由此可以发现,当在GS115-O突变株中进一步敲除*PAS\_chr2-2\_0408*基因后,这些特定神经酰胺的含量却意外地下降。这一发现指出,虽然GS115-OC整体上促进了神经酰胺的合成,但对于特定种类的神经酰胺,双基因敲除的影响可能是复杂和非线性的,可能涉及到脂质代谢中更细微的调控机制。表明*PAS\_chr4\_0427*和*PAS\_chr2-2\_0408*基因在脂质代谢中,其相互作用影响了少数特定神经酰胺类别的合成。

表 2 非植物神经酰胺差异化化合物

Table 2 List of dihydroceramide differential compounds

脂质种类	保留时间/min	产率最高菌株	产率最低菌株	相对增幅/倍
1-O-stearoyl-Cer(d18:1/18:0)	3.22	GS115-OC	GS115	8 533.98
Cer(d18:0/14:0)	4.13	GS115-OC	GS115	890.58
Cer(d18:0/15:0)	4.16	GS115-O	GS115	136.68
Cer(d18:0/16:0)	4.17	GS115-OC	GS115	55.17
Cer(d16:0/15:0)	4.18	GS115-OC	GS115	94.78
Cer(d18:0/17:0)	4.19	GS115-OC	GS115	71.87
Cer(d16:0/16:0)	4.20	GS115-OC	GS115	169.45
Cer(d18:0/18:0)	4.20	GS115-OC	GS115	18.90
Cer(d16:0/17:0)	4.23	GS115-OC	GS115	165.02
Cer(d18:0/19:0)	4.23	GS115-OC	GS115	57.29
Cer(d18:0/20:0)	4.24	GS115-OC	GS115	175.99
Cer(d18:0/21:0)	4.25	GS115-OC	GS115	28.48
Cer(d18:0/22:0)	4.27	GS115-OC	GS115	58.74
Cer(d18:0/23:0)	4.28	GS115-OC	GS115	14.16
Cer(d18:0/24:0)	4.30	GS115-OC	GS115	71.50
Cer(d18:2/16:0)	4.32	GS115-OC	GS115	38.93
Cer(d18:1/16:0)	4.32	GS115-OC	GS115	19.79
Cer(d18:1/17:0)	4.33	GS115-OC	GS115	51.12
Cer(d18:0/26:0)	4.33	GS115-OC	GS115	15.39
Cer(d18:2/18:0)	4.35	GS115-OC	GS115	82.96
Cer(d18:1/18:0)	4.35	GS115-OC	GS115	78.97
Cer(d18:1/20:0)	4.38	GS115-OC	GS115	15.20
Cer(t18:1(6OH)/24:0)	5.17	GS115-OC	GS115	79.99
Cer(t18:1(6OH)/19:0)	5.23	GS115-OC	GS115	874.18
Cer(d18:0/14:0(2OH))	5.32	GS115-OC	GS115	*
Cer(d18:0/15:0(2OH))	5.33	GS115-O	GS115	*
Cer(d18:0/16:0(2OH))	5.35	GS115-OC	GS115	565.56
Cer(d18:0/17:0(2OH))	5.36	GS115-O	GS115	1 435.08
Cer(d18:0/18:0(2OH))	5.37	GS115-OC	GS115	96.41
Cer(d18:0/20:0(2OH))	5.39	GS115-OC	GS115	239.46
Cer(d18:1(4E)/16:0(2OH))	5.42	GS115-O	GS115	10.04
Cer(d18:1(4E)/17:0(2OH))	5.42	GS115-O	GS115	101.27
Cer(d18:0/22:0(2OH))	5.42	GS115-OC	GS115	526.18
Cer(d18:2/17:0(2OH))	5.44	GS115-O	GS115	1 271.94
Cer(d18:1(4E)/18:0(2OH))	5.44	GS115-OC	GS115	24.40
Cer(d18:2/18:0(2OH))	5.45	GS115-OC	GS115	23.62
Cer(d18:1(4E)/24:0(2OH))	5.49	GS115-OC	GS115	8.77
Cer(d18:2/24:0(2OH))	5.50	GS115-OC	GS115	203.55
Cer(d18:1/24:0)	4.44	GS115-OC	GS115-O	6.19

注: \* 表示相较于含量最低的菌株新出现的神经酰胺。

表 3 植物神经酰胺差异化合物列表  
Table 3 List of phytoceramide differential compounds

脂质种类	保留时间/min	产率最高菌株	产率最低菌株	相对增幅/倍
Cer(t18:0/14:0)	5.00	GS115-OC	GS115	470.66
Cer(t18:0/15:0)	5.01	GS115-OC	GS115	1 170.45
Cer(t18:0/16:0)	5.02	GS115-OC	GS115	89.64
Cer(t18:0/17:0)	5.03	GS115-OC	GS115	232.47
Cer(t18:0/18:0)	5.05	GS115-OC	GS115	277.44
Cer(t18:0/19:0)	5.07	GS115-OC	GS115	217.12
Cer(t20:0/18:0)	5.08	GS115-OC	GS115	702.29
Cer(t18:0/21:0)	5.08	GS115-OC	GS115	247.00
Cer(t18:0/22:0)	5.09	GS115-OC	GS115	391.89
Cer(t18:0/23:0)	5.10	GS115-OC	GS115	57.72
Cer(t18:0/24:0)	5.12	GS115-OC	GS115	39.46
Cer(t18:0/25:0)	5.13	GS115-O	GS115	10.96
Cer(t20:0/24:0)	5.14	GS115-OC	GS115	14.00
Cer(t18:0/27:0)	5.15	GS115-O	GS115	18.14
Cer(t20:0/26:0)	5.16	GS115-O	GS115	7.29
Cer(t18:0/24:0(2OH))	6.14	GS115-OC	GS115	418.93
Cer(t18:0/14:0(2OH))	6.27	GS115-OC	GS115	*
Cer(t18:0/16:0(2OH))	6.28	GS115-OC	GS115	2 044.96
Cer(t18:0/17:0(2OH))	6.29	GS115-O	GS115	*
Cer(t18:0/18:0(2OH))	6.29	GS115-OC	GS115	1 325.20
Cer(t18:0/19:0(2OH))	6.29	GS115-OC	GS115	*
Cer(t18:0/20:0(2OH))	6.30	GS115-OC	GS115	1 864.91
Cer(t18:0/21:0(2OH))	6.30	GS115-OC	GS115	3 071.38
Cer(t18:0/22:0(2OH))	6.32	GS115-OC	GS115	348.53
Cer(t18:0/23:0(2OH))	6.32	GS115-OC	GS115	71.78
Cer(t18:0/25:0(2OH))	6.32	GS115-O	GS115	6.32
Cer(t18:0/26:0(2OH))	6.33	GS115-O	GS115	4.83
Cer(t18:0/27:0(2OH))	6.34	GS115-O	GS115	11.82

注: \* 表示相较于含量最低的菌株新出现的神经酰胺。

### 2.3 *PAS\_chr4\_0427*和*PAS\_chr2-2\_0408*基因缺失对其它脂质的影响

在负离子模式下,经 Progenesis QI 分析鉴定出的 236 种差异化合物中,除了 67 种神经酰胺外,剩余的 169 种化合物涵盖了广泛的脂质种类,包括 43 种脂肪酸 (FA)、5 种磷脂酸 (PA)、25 种磷脂酰胆碱 (PC)、21 种磷脂酰乙醇胺 (PE)、11 种磷脂酰肌醇 (PI)、1 种磷脂酰甘油 (PG)、1 种磷脂酰丝氨酸 (PS)、6 种肌醇磷酸神经酰胺 (PI-Cer)、

5 种甘油三酯 (TG)、12 种甘油二酯 (DG) 以及 39 种其他脂质衍生物。

在负离子模式下的其他脂质差异化合物类别含量差异变化最大的两组间的变化幅度如图 7 所示,包括三组比较:(a) GS115-OC 与 GS115、(b) GS115-O 与 GS115 以及 (c) GS115-OC 与 GS115-O 之间差异化合物含量比较。因为神经酰胺与磷脂及甘油酯的关系密切,在这些对比中,我们特别关注了磷脂及甘油酯等变化幅度较大的脂质分子。

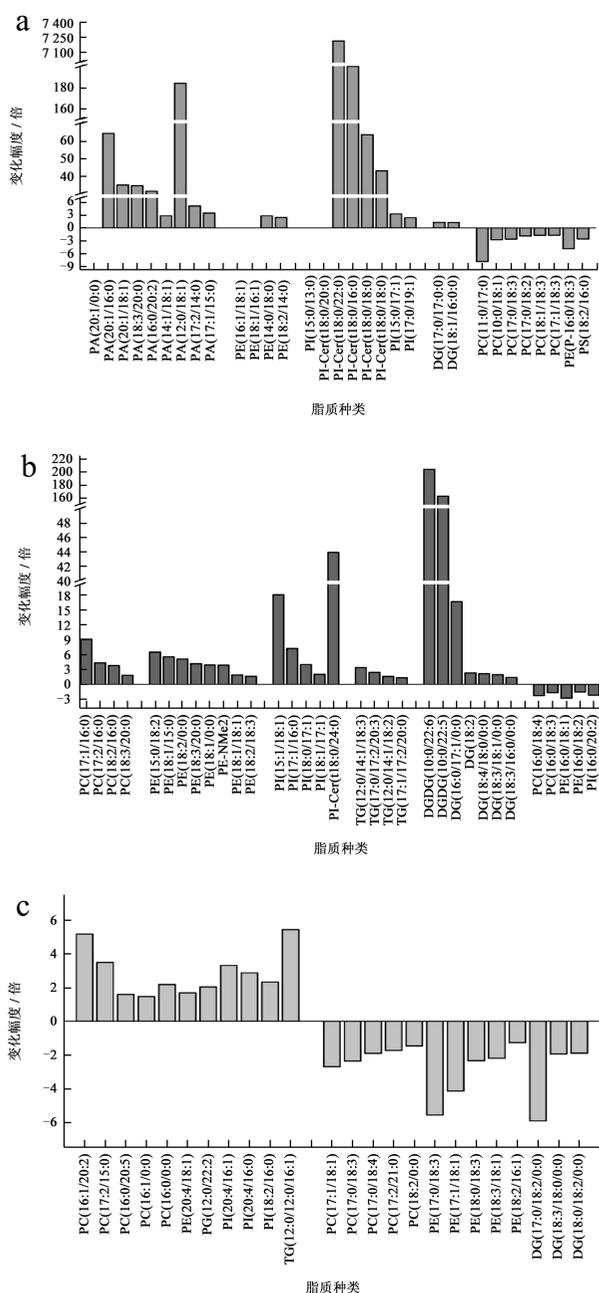


图7 负离子模式下突变菌株的其它脂质差异化合物含量变化

Fig.7 Changes of other lipid differential compounds in mutant strains under negative ion mode

注: a: GS115-OC vs GS115; b: GS115-O vs GS115; c: GS115-OC vs GS115-O.

在图 7a 中, 先对比了差异最大的 (a) 组, 相比于 GS115、GS115-OC 中 PA、PI、部分 PE 和 PC 磷脂以及 PI-Cer 和 DG 呈现显著上调, 而部分 PC、PE 及 PS 呈现小幅度下调, 且 PA (20:1/0:0)、PE (16:1/18:0)、PE (18:1/16:1)、PI (15:0/13:0)、PI-Cer (t18:0/20:0) 5 个为新出现的脂质类别 (见图 7a, 红色标注)。其中, 改变幅度最大的为 PI-Cer, 其中 PI-Cer (t18:0/22:0) 展现了最大增幅, 变化幅度

最高达到了 7 213.45 倍, 此外 PI-Cer (t18:0/16:0)、PI-Cer (d18:0/18:0)、PI-Cer (t18:0/18:0) 变化幅度分别为 341.85、63.75、43.19 倍; PI-Cer 是神经酰胺和磷酸肌醇头基结合生成肌醇磷酸神经酰胺, 是神经酰胺向复杂鞘脂转化的方式之一。细胞为降低神经酰胺过度积累造成的毒害作用, 可能会增加神经酰胺的下游转化, 而其中较为关键的就是 PI 头基<sup>[27]</sup>, 从上述脂质变化中, 神经酰胺的含量提升可能是导致细胞内 PI 同步提升的关键原因, 促进神经酰胺合成复杂鞘脂到质膜中, PI-Cer 的含量显著提升为这一点提供依据; 同时, 还发现 PS (18:2/16:0) 下调, 表明继缺失 *PAS\_chr4\_0427* 后进一步缺失 *PAS\_chr2-2\_0408* 减少了丝氨酸流向丙酮酸的路径, 可能使得更多的丝氨酸更多的流向神经酰胺的合成, 降低了丝氨酸的体内含量水平, 减少了 PS 的合成。

图 7b 和 7c 中 GS115-O 与 GS115、GS115-OC 与 GS115-O 之间的差异最大的重要脂质变化与图 7a 呈现相似的趋势。有趣的是, GS115-O 和 GS115-OC 的甘油酯 DG、TG 显著上升, 推测神经酰胺水平升高情况下, DG、TG 可能和上述磷脂一起参与膜脂质稳态<sup>[28,29]</sup>, 且 DG 是一种关键的信号分子, 在神经酰胺的刺激下, DG 增加参与细胞信号传导网络的激活和调节, 同时, 神经酰胺的多种生理功能可能诱发细胞的氧化应激, DG、TG 的含量上升可能是响应应激<sup>[30]</sup>, 保护细胞免受培养过程中的氧化胁迫。

以上结果表明, 在敲除 *PAS\_chr4\_0427* 和 *PAS\_chr2-2\_0408* 基因后, 脂质组发生显著变化, 神经酰胺显著增加, 磷脂种类增多, 含量显著上升, 此外其他脂质也有较大变化。这反映了脂质代谢网络的复杂性, 脂质代谢是一个高度复杂的网络, 单一基因的敲除可能会导致代谢调整和代谢流的改变。未来研究将揭示神经酰胺合成的调控机制, 为进一步改造 *P. pastoris* 生产神经酰胺奠定基础。

### 3 结论

本研究首次利用 *P. pastoris* GS115 高效合成神经酰胺, 通过 CRISPR-Cas9 技术先后敲除 *PAS\_chr4\_0427* 和 *PAS\_chr2-2\_0408*, 神经酰胺的相对含量提升了 3.80 倍和 4.75 倍。鉴定出 67 种神经酰胺, 其中 28 个为植物神经酰胺, 还出现 2 种新的非植物神经酰胺和 3 种植物神经酰胺。此外神经酰胺相对含量增加明显, 其中 28 种增幅在 100 倍之上, 35.90% 的非植物神经酰胺增幅在 100 倍之上,

50.00%的植物神经酰胺增幅在100倍以上,最高提升幅度为8 533.98倍,表明在*P. pastoris* GS115中对*PAS\_chr4\_0427*和*ΔPAS\_chr2-2\_0408*基因敲除,可有效提高神经酰胺合成。

### 参考文献

- [1] YUKIKO M, SUSUMU M, KIYOMI T, et al. Ceramide biosynthesis in keratinocyte and its role in skin function [J]. *Biochimie*, 2009, 91(6): 784-790.
- [2] JIA Z X, ZHANG J L, SHEN C P, et al. Profile and quantification of human stratum corneum ceramides by normal-phase liquid chromatography coupled with dynamic multiple reaction monitoring of mass spectrometry: development of targeted lipidomic method and application to human stratum corneum of different age groups [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2016, 408(24): 6623-6636.
- [3] RUZICA JT, IVONE J, SUZANA LH, et al. Altered levels of sphingosine, sphinganine and their ceramides in atopic dermatitis are related to skin barrier function, disease severity and local cytokine milieu [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(6): 1958.
- [4] LINDA S, ANNARITA D L. Sphingolipid metabolism and signaling in endothelial cell functions [J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2022, 1372: 87-117.
- [5] HIROSHI T, TOMOHIRO H, ASAMI M, et al. Long chain ceramides raise the main phase transition of monounsaturated phospholipids to physiological temperature [J]. *Scientific Reports*, 2022, 12(1): 20803.
- [6] MAZEN E A, BILL X W, LINA M O, et al. Bioactive sphingolipids in the modulation of the inflammatory response [J]. *Pharmacology Therapeutics*, 2006, 112(1): 171-183.
- [7] 赖彦云,陶思睿,杨莉,等.含神经酰胺的保湿剂改善皮肤干燥的功效和安全性研究[J].*中国美容医学*,2022,31(2): 62-66.
- [8] BERNADETTE B, KONRAD S. The role of sphingolipid metabolism in cutaneous permeability barrier formation [J]. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2014, 1841(3): 441-452.
- [9] ANDREA H. Topical collection: new insights on sphingolipids in health and disease [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(11): 9528.
- [10] ONYOU H, GUNCHEOL K, YEON J J, et al. Synthetic phytoceramides induce apoptosis with higher potency than ceramides [J]. *Molecular Pharmacology*, 2001, 59(5): 1249-1255.
- [11] BARBORA Š, ANDREJ K, ONDŘEJ T, et al. Phytosphingosine, sphingosine and dihydrosphingosine ceramides in model skin lipid membranes: permeability and biophysics [J]. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, 2017, 1859(5): 824-834.
- [12] 魏静.魔芋飞粉中神经酰胺的提取与分离鉴定[D].重庆:西南大学,2008.
- [13] 孙美娜.生物酶催化制备神经酰胺类物质的工艺研究[D].北京:北京化工大学,2021.
- [14] CHRISTOPH S, ECKHARD B, STEFFEN S. Biotechnological production of sphingoid bases and their applications [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(10): 4301-4308.
- [15] 林会兰.酵母神经酰胺的提取、分析和表达[D].北京:清华大学,2002.
- [16] 林会兰,周全,陈国强.*LCBI*基因表达对酵母神经酰胺合成的影响[J].*微生物学报*,2003,43(2):189-193.
- [17] SE K K, YONG H N, RYONGJ K, et al. Effect of expression of genes in the sphingolipid synthesis pathway on the biosynthesis of ceramide in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2010, 20(2): 356-362.
- [18] ZHU X M, LI L, BAO J D, et al. The biological functions of sphingolipids in plant pathogenic fungi [J]. *Plos Pathog*, 2023, 19(11): e1011733.
- [19] CHARULATHA G, ROSS S F, AMY C. Orm proteins integrate multiple signals to maintain sphingolipid homeostasis [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(28): 20453-20463.
- [20] ARISA K, AYANA I, MOMOKA S, et al. Serine metabolism contributes to cell survival by regulating extracellular pH and providing an energy source in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Yeast*, 2023, 40(2): 59-67.
- [21] HARALD S, EVELYN R, GERRIT H, et al. Preparative supercritical fluid chromatography for lipid class fractionation-a novel strategy in high-resolution mass spectrometry based lipidomics [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2020, 412(10): 2365-2374.
- [22] JACE W J, CLAIRE L C, LI F, et al. Ultrapformance convergence chromatography-high resolution tandem mass spectrometry for lipid biomarker profiling and identification [J]. *Biomedical Chromatography*, 2017, 31(3): e3822.
- [23] BLIGH E G, DYER W J. A rapid method of total lipid extraction and purification [J]. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 1959, 37(8): 911-917.
- [24] CASSANDRA B, MARYLINE A V, THOMAS Z, et al. "Bligh and Dyer" and folch methods for solid-liquid-liquid extraction of lipids from microorganisms. comprehension of solvation mechanisms and towards substitution with

- alternative solvents [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(4): 708.
- [25] CHRISTOPH S, TIM K, HEIKO A, et al. High-level production of tetraacetyl phytosphingosine (TAPS) by combined genetic engineering of sphingoid base biosynthesis and L-serine availability in the non-conventional yeast *Pichia ciferrii* [J]. *Metabolic Engineering*, 2012, 14(2): 172-184.
- [26] PHILIPP T, TOBIAS W, MARNIE S, et al. Two pathways of sphingolipid biosynthesis are separated in the yeast *Pichia pastoris* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(13): 11401-11414.
- [27] WANG W, XIN J, YANG X, et al. Lipid-gene regulatory network reveals coregulations of triacylglycerol with phosphatidylinositol/lysophosphatidylinositol and with hexosyl-ceramide [J]. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2019, 1864(2): 168-180.
- [28] GERRIT VAN M, DENNIS R V, GERALD W F. Membrane lipids: where they are and how they behave [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2008, 9(2): 112-124.
- [29] MAHMOOD H, JIN W, JIANG X C. Mechanisms involved in cellular ceramide homeostasis [J]. *Nutrition Metabolism*, 2012, 9(1): 71.
- [30] SHAILEE J, DANIEL D E, ISHVINDER H, et al. Distinct mechanisms involving diacylglycerol, ceramides, and inflammation underlie insulin resistance in oxidative and glycolytic muscles from high fat-fed rats [J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 19160.