*Saccaromyces cerevisiae*를 이용한 ceramide(III)의 HPLC분리 (Ⅳ)Ceramide의 최적 생산 조건 확립

홍승표, 김세경*, 윤현식*, 노경호
초정밀분리기술센터, 인하대학교, 화학공학과, 생물공학과*,

HPLC Separation of Ceramide(III) by *Saccaromyces cerevisiae* (Ⅳ) Optimization of Ceramide Production Condition

Seung Pyo Hong, Se Kyung Kim*, Hyun Shik Yun*, Kyung Ho Row
Dept. of Chemical Eng., *Dept. of Bio. Eng., Inha University,
Center of Advanced Bioseparation Technology
253 Yonghyun-Dong, Nam-Gu, Incheon 402-751, Korea

서론

사람의 피부 구조는 기저층으로부터 각화세포의 분화에 따라 epidermis, dermis, subcutaneous tissue로 분류된다. Epidermis의 최상층은 stratum corneum이라 불리며, 구성하고 있는 세포들 사이에는 lipid bilayer로 채워져 있다.[1] Bilayer의 40%를 차지하고 있는 ceramide는 각질층의 수분의 손실방지와 손상된 피부 보호층을 복원하는 중요한 성분으로 알려져 있으며 그 내부에 포함되어 있는 수분과 영양분을 빠른 속도로 목적지에 운반해 가는 성질이 있으며, 그 침투성도 다른 성분과 비교할 수 없을 만큼 뛰어나다고 알려져 있다.[2] 그렇기 때문에 근래에는 피부의 보습과 손상된 피부 보호층의 복원 기능을 가진 기능성 화장품 원료로서 널리 사용되고 있다.[1]

Ceramide는 모든 생물의 membrane의 막 구조를 형성하는 성분으로 중요한 역할을 하는 sphingolipid의 기본구조를 이루고 있다. 최근에는 신호전이체계의 중간 신호전달물질로서 다양한 생물학적 기능이 밝혀지고 있으면서 sphingolipid의 응용 범위는 피부재생, 항염증 치료 나아가 항암제 개발로까지 모색되기에 이르렀다.[3,4]

Ceramide는 최근에 yeast의 한 종류인 *Saccharomyces cerevisiae*에서 생산되어지는 sphingolipids에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.[3] Yeast는 상대적으로 빠른 성장, 비유독성 그리고 발생적으로 조종될 수 있는 능력 때문에 ceramide의 생산을 위해 적합한 것으로 알려져 있다. *Saccharomyces cerevisiae*내에 ceramide의 생산 그리고 그 양에 대한 정량적인 실험결과를 얻기 위해 정상 HPLC를 사용하였다. ELSD(Evaporative Light Scattering Detector)를 사용한 HPLC 분석 방법들은 검출시에 빠르고 정확한 지질의 구성을 알 수 있으므로 ceramide 분리에 계속적으로 개발되어져 왔다. ELSD는 비극성과 극성 지질 모두의 검출에 광범위하게 사용되어지고 있다. 이 HPLC/ELSD 기술은 안정적인 baseline과 결과의 재현성, 그리고 용매 peak를 제거하는데 획기적이다[5]. Wells et al.[6]은 yeast에서 추출한 lipid내의 ceramide의 양을 측정하기 위해 ELSD를 사용한 NP-HPLC 방법을 개발했다.[5]

Ceramide의 원물질인 sphingolipid를 생산하는 yeast의 한 종류인 *Saccharomyces cervisiae*를 이용하여 ceramide를 직접 생산하고 정상 HPLC와 ELSD를 사용하여 생산량과 순도를 더욱 높게 하는 것이 연구의 목적이다.

실험방법

1. 균주 및 배양

본 연구에서 사용한 균주는 sphingolipid를 생성하는 것으로 알려진 *Saccharomyces cerevisiae* (KCCM 50515)이다. 균주 배양을 위한 배지는 YEPD medium으로 그 조성은 glucose, 20 g/L; bacto peptone, 20 g/L; yeast extract, 10 g/L 이었다. 발효조 배양을 위한 전배양 단계에서는 50 mL의 YEPD가 담겨 있는 250 mL Erlenmeyer flask에 접종하여, 30℃, 200 rpm에서 24시간동안 진탕배양하였으며, 이를 전배양액으로 사용하였다. 발효조 배양에서는 2.5 L jar fermentor(CoBioTech, KF-2.5L; working volumn, 1.5 L)를 사용하였으며 배양 시간은 48시간이었다.

2. 배양 조건

*Saccharomyces cerevisiae*의 ceramide 생산에 적합한 배양조건을 알아보기 위해 온도와 pH를 변화시켜가며 실험을 수행하였다. 온도는 25℃, 30℃, 35℃고, pH는 온도별로 멸균 전에 각각 4, 5, 6, 7, 8로 조절하였다.

3. Heat shock

Ceramide의 생산시 열충격을 가하면 heat shock protein의 합성과 trehalose의 축적과 같은 반응으로 인하여 ceramide의 생산량이 증가된다.[6] 본 연구에서는 ceramide의 생산량을 증가를 위한 적합한 heat shock 조건 선택 실험을 수행하였다. 배양이 끝난 *Saccharomyces cerevisiae*를 40℃로 온도를 올려 incubation하였고, heat shock의 수행 시간은 30 min, 1 hr로 각각 수행하였다.

4. Lipid 회수

생성된 lipid는 원심분리 방법과 ultrasonification 방법을 이용하여 추출하였다. *Saccharomyces cerevisiae*를 배양한 후, 회수한 배양액을 10,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 배지성분을 제거하고, 증류수로 두 번 washing하여 균체만 채취하였다.

5. Lipid 추출

5 g (wet weight)의 yeast 균체에 20 mL chloroform-methanol (1:2, v/v) 용액을 첨가한 후 sonicator (IKA U200S)로 5분씩 세 번 sonication 하였다. sonication한 샘플은 0.2 ㎛ RC filter (Biostream)로 filtering 하였다. 여과되지 않고 남은 균체는 다시 50 mL의 chloroform-methanol (2:1, v/v) 용액을 첨가하여 상온에서 30분 동안 stirring 한 후 다시 filtering 하는 과정을 4번 반복하였다. 회수된 샘플용액은 solvent evaporation 하였다. Evaporation한 sample은 polar components와 non-lipid contaminants를 제거하기 위해 sample에 chloroform-methanol-water (8:4:3, v/v)를 첨가하여 층분리를 하였다.[4]

6. Ceramide의 분리, 정제

건조된 total lipid는 sphingolipid를 획득하기 위해 mild alkaline hydrolysis 방법을 수행하였다. 건조된 lipid sample을 methanol-carbon tetrachloride (5:1, v/v) 용액에 녹인 후 0.2M의 methanolic NaOH를 동량 첨가하여 상온에서 한시간 동안 alkaline hydrolysis를 하였다. 그 후 0.8배의 증류수를 첨가하여 교반한 후 1M의 acetic acid로 중화시켰다. unsaponified lipid를 chloroform으로 추출하였다.[2]

7. 정상 HPLC-ELSD

HPLC 시스템으로는 Waters 600s Multisolvent Delivery System이 부착된 Waters 616

liquid chromatography (Waters Associates, Milford, MA, U.S.A.), 그리고 Rheodyne injector (20 ㎕ sample loop)가 사용되었다. 데이터 저장 시스템은 Autochrowin(ver. 1.42, 영린기기)이고 PC에 설치하여 사용하였다. 검출기로는 ELSD (Alltech Associates, Inc., Deerfield, IL, U.S.A.)를 사용하였다. ELSD의 N_2 flow rate는 1.6 l/min이였다. HPLC용 column으로는 정상column인 OptimaPak Sil 100Å으로 직경5 mm, 길이 4.6 X 250 mm을 사용하였다. 이동상의 유속은 1.0 ml/min으로 고정하였고 주입 부피는 5 ㎕로 하였다.

결과 및 고찰

Heat stress에 의한 ceramide의 변화는 25℃에서 배양한 cell을 ceramide의 원물질인 sphingolipid를 생산하는 yeast의 한 종류인 *Saccharomyces cerevisiae*를 이용하여 ceramide를 직접 생산하고 정상 HPLC-ELSD를 사용하여 ceramide의 함량정도를 확인하였다. *Saccharomyces cerevisiae*가 생산하는 ceramide의 생산량을 늘리기 위해 cell 배양시 온도와 pH 조건을 변화시켜 배양 후 추출하여 분석하였고, 배양후 heat shock을 주어 heat stress에 의한 ceramide 생산량 변화를 알아보았다. Ceramide의 cell 배양시 온도 변화는 25, 30, 35℃로 하였고, pH는 4, 5, 6, 7, 8로 실험을 수행하였다. Heat stress에 의한 ceramide의 변화는 각 온도에서 배양한 cell을 배양이 끝난 후에 40℃로 incubation 하면서 온도변화를 주었다. 배양한 cell은 chloroform과 methanol을 이용하여 lipid를 추출하였고, 추출한 lipid 용액을 evaporation을 한 후 chloroform methanol water mixture로 층분리를 수행하여 lipid 용액에 들어있는 불순물을 제거하였다. 불순물을 제거한 lipid 용액에서 순도 높은 sphingolipid만을 분리하기 위해 mild alkaline hydrolysis 방법을 수행하였다. Lipid 추출물을 mild alkaline hydrolysis하면 neutral lipid와 glycerophospholipids는 hydrolysis되고 sphingolipid는 안정하므로 보다 높은 순도의 sphingolipid를 회수할 수 있다. 추출, 회수한 sphingolipid는 RC filter(0.2㎛, Biostream)로 filtering 한 후 HPLC로 분석하였다. 정상 HPLC의 분석에서 n-Hexane/ethanol의 이동상 조성을 분석 시작시 95/5vol.%로 하여 4분에서 78/22vol.%로 변화시키는 계단식 구배용매 조성법을 수행하였다. 각각의 온도와 pH조건을 변화시킨 *Saccharomyces cerevisiae*를 분석하여 ceramide의 생산량을 피크의 면적을 통해 비교해 보았을 때 온도는 25℃, pH는 4의 조건에서 배양된 *Saccharomyces cerevisiae*에서 8.158%의 ceramide가 존재함을 알 수 있었다.

참고문헌

1. Bouwstra, J. A., Gooris, G. S., Dubbelaar, F. E. R., Weerheim, A. M., Ijzerman, A. P. and Ponec, M.: *J. Lipid Res*., **39**, 186 (1998)
2. Rupeic, J., Mesaric, M., and Maric, V.: *Appl. Microbiol. Biotechnol*., **50**, 583 (1998)
3. Dickson, R. C., and Lester, R. L.: *Biochimica et Biophysica Acta*., **1426**, 347 (1999)
4. Dickson, R. C., and Lester, R. L.: *Biochimica et Biophysica Acta*., **1238**, 305 (1999)
5. Thomas, J. M., Aida, E., C., Phyllis, R., B., and Anthony, S. F.: *Analytical Biochemistry*, **276**, 242 (1999)
6. Wells, G., Dickson, R. C., and Lester, R.: *J. Biol. Chem*., **273**, 7235 (1998)

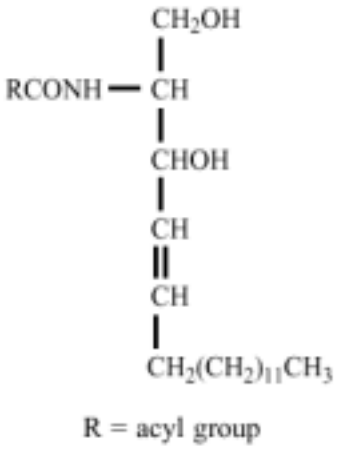

Fig. 1. Chemical Structure of Ceramide(III)

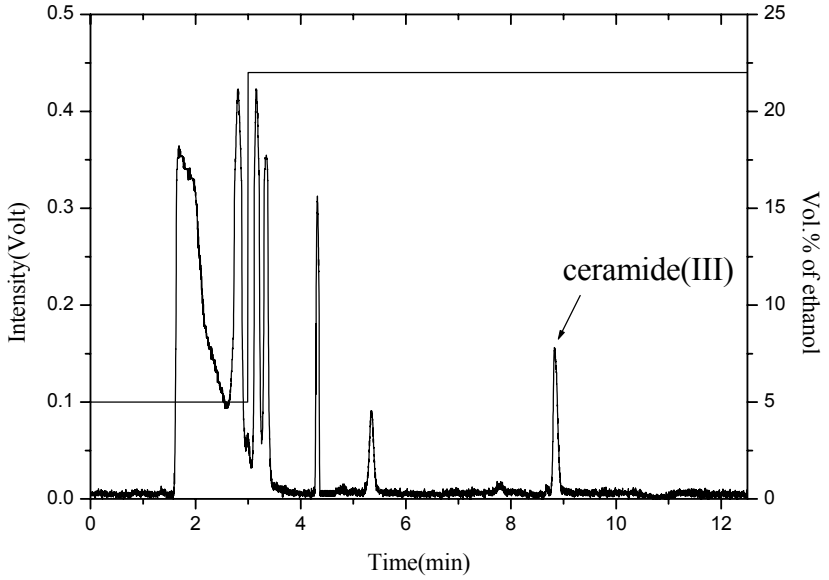

Fig. 2. Chromatogram of ceramide(III) obtained from *Saccharomyces cerevisiae* (25℃, pH4) using NP-HPLC with ELSD eluted in gradient method