

第二节 超高压灭活微生物的机理

目前对 UHP 灭活微生物的机理有各种各样的解释，很可能这些解释都是正确的，而且更大的可能是各种因素协同作用导致微生物失活，其主次关系还难以断定。一般认为超高压导致微生物失活的原因有以下几种原因：蛋白质变性、破坏微生物细胞的形态、微生物遗传机制发生变化、细胞膜破裂、菌体内物质泄漏、酶的失活、生化反应等。

1 蛋白质变性引起微生物失活

蛋白质是微生物体内最主要的成分之一，有的可达 50%。UHP 导致蛋白质变性，破坏了菌体内组织的活性，引起微生物失活。最有力的证据之一是，微生物灭活的曲线几乎与蛋白质变性曲线一致。

2 超高压破坏微生物细胞的形态

细胞在挤压力的作用下，其形态和结构会发生改变，例如球菌在压力作用下会发生伸长变形，成为杆状。Zobell和Cobet等人发现，许多E. coli在40MPa 的压力下个体大小从1~2 μm 变成10~100 μm ；一些能运动的(尤其是原核微生物)微生物失去了运动的特性，主要是因为高压力破坏了细胞结构。同时，部分微生物还能可逆地恢复正常形态和运动的特性。Kriss等利用电镜在30~40MPa的压力下来观察假单胞菌(pseudomonas)的形态变化：细胞外形变长、细胞质壁分离、细胞壁变厚及细胞膜消失、细胞质出现一些明显的网状区域、核糖体数目减少、细胞分裂减慢、细胞内膜在45MPa的压力下较0.1MPa的压力更清晰可见。Larsen等研究高压力对细胞生长的作用，高压力阻碍细胞生长，干扰细胞内部的诸多加工过程，影响细胞的个体大小，细胞内的气泡破裂等，甚至引起细胞死亡。

在压力不够高时，这种形态结构只是发生一些变形，不会导致细胞死亡。当压力超过一定值，有些菌体细胞会发生破裂，菌体内容物完全暴露出来(图3.1)，细胞质泄漏，从而造成细胞死亡。

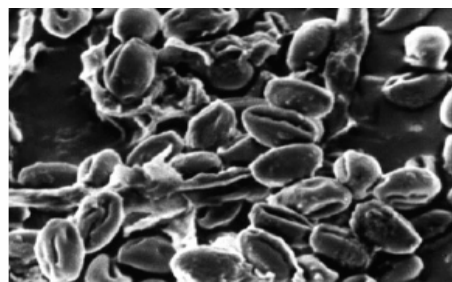
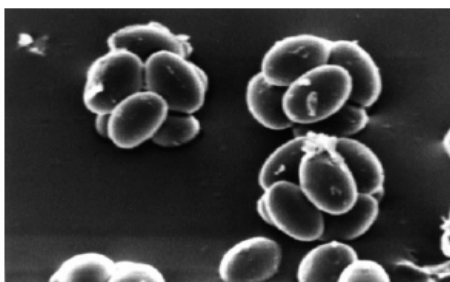


图3.1 超高压处理丝衣霉 *Byssochlamys nivea* 电镜照片

左图：未加压 右图：加压后菌体破碎（70℃，700Mpa, 60min）

Chong和Cossins 指出，在高静压条件下细胞膜磷脂分子的横切面会减小，细胞膜双层结构的体积也随之降低，细胞膜的通透性发生改变，从而使微生物死亡。许多微生物对压力反应的实验结果表明存在种间差异。例如：鱼产品中常见的细菌 *Vibrio Parahaemolyticus*，对压力非常敏感，只需 200MPa/20min处理就可以使该菌数目下降 10^6 倍；而其他革兰氏阴性菌则需要 300MPa以上的压力处理 20min才能取得相当的灭菌效果。

3 超高压对微生物遗传机制的作用

有研究认为30–50MPa之间的静压能影响基因的表达和蛋白质的合成。例如，高压能导致啤酒酵母产生四倍体，证明高压能影响DNA的复制。在100MPa压力下，酵母的核膜会受到影响，在大于400–600MPa压力时，线粒体和细胞质会发生改变，尤其在大于300MPa压力下金属离子释出。

嗜热甲烷球菌、紫串状酵母属和埃希氏大肠杆菌代表了三个生命领域，它们在经过压力处理后都发现了诱导蛋白。DNA和RNA对压力非常有抗性，但有研究表明单核李斯特氏菌和伤寒沙门氏菌菌体经压力处理后发现有核物质大量凝结，分析认为在高压条件下，DNA与核酸内切酶得以充分接触，核酸内切酶打开了DNA双螺旋结构，但这一过程可回复。根据推测，这一过程与一种负责回复活性的酶有关。如果这种酶被超高压灭活，则细胞就不能再继续增殖，这对杀灭细菌非常有利，可以大大延长食品的保藏期。

再如，把大肠杆菌、埃希氏杆菌用生理盐水制成悬浊液(约 10^8 个 / ml)，加压处理后，溶液易发泡，且产生明显沉淀。薄层色谱法分析，有香芹酮和磷脂质存在；高速液相色谱定性分析，有260nm吸收物质，确认为核酸类物质，且不仅仅是染色体DNA。

利用电子显微镜观察到超高压对大肠杆菌的DNA有显著的影响。正常情况下，遗传物质和核糖体均匀地分布在细胞。但是受压后，遗传物质凝集成块，胞浆RNA 漏出，胞浆内部分区域没有核糖体，而且出现了密度斑；这是由于核糖体亚单位或胞浆蛋白质聚集而成，这些明显的变化发生在细胞静止期和对数生长期。细胞中DNA和RNA 断裂用凝胶电泳测得，而且 Paul 等还首次证实在压力达到1000MPa，24 小时对体外DNA 完全无影响。对DNA 突变体的进一步研究表明，在核酸内切酶A 缺乏的突变体中的DNA 受压并不发生链的断裂，因此可以认为超高压致死细胞是使原本分开的遗传物质和核酸内切酶结合在一起，因此核酸的破坏是

高压致死细胞的另一个原因，可以说超高压对质粒DNA 的直接影响并不显著。

核酸较蛋白质耐高压。Suzuti研究大麻哈鱼精子和小牛胸腺的DNA，25℃，100MPa作用60min，DNA的天然结构未发生任何变化。E. coli的DNA 溶液(0.002% ~0.004%，pH4.8~9.9)，在室温1000MPa的压力下未发生任何变化。事实上，高压力的作用正好抵消了DNA 的热变性，原因可能是高压力消除了热作用引起体积的增加，DNA 两条链碱基配对使DNA 形成规则的双螺旋结构，增加压力有利于氢键的形成，而氢键的形成导致了体积减少。

Suzuti认为，高压对蛋白质和核酸影响不同可能是因为分子内部氢键密度不同，DNA 双链之间氢键的密度较蛋白质多肽链内氢键的密度多。尽管在高压下DNA较稳定，但是与DNA复制和转录有关的酶在高压下易失活。

Pollard Weller研究了E. coli的 β 一半乳糖苷酶合成诱导，缬氨酸、脯氨酸合成蛋白质，尿嘧啶合成RNA，胸腺嘧啶合成DNA，发现：45MPa的压力使 β 一半乳糖苷酶的合成停止，多核糖体在90MPa压力下才受到损伤，这就表明高压对生物合成过程起作用。

Landau发现，持续高压作用E. coli的诱导、转录、翻译，27MPa作用E. coli时，诱导停止；68MPa作用E. coli时，翻译抑制，转录不受影响，解除压力诱导和翻译恢复正常。

Heremans认为，蛋白质合成过程中，核糖体的两个tRNA 的结合位点：氨酰基位点(A)和肽酰基位点(P)是高压力敏感部位，在高压下核糖体失活，结果使得结合在其上的mRNA翻译受阻。

Smith等认为，细菌核糖体的30S小亚基决定高压对核糖体的敏感程度，50S核糖体大亚基对压力不敏感。环境中离子强度影响核糖体在高压下的稳定性，Pseudomonas bathycetes在高离子强度下才能忍受高压作用，E. coli在高离子强度和低离子强度下对高压力较敏感，荧光假单胞菌Pseudomonas, zuorescenszaige在各种离子强度下都耐受高压。核糖体需要在Mg²⁺存在的条件才能保证其稳定性和活性。

Hardon和Albright发现，高压对核糖体作用主要是影响氨酰tRNA结合到核糖体上，当压力达到68MPa时，氨酰tRNA 就不能和核糖体结合，而且高压也抑制肽键的形成。

4 胞膜被破坏

细胞膜不仅是细胞结构的边界，使细胞具有一个相对稳定的内环境，同时在细胞和环境之间进行物质和能量的交换，并在信息的传递过程中起着决定性的作用。普遍认为，高压损伤微生物的主要部位是细胞膜，如果细胞膜的通透性过大，将会引起细胞死亡。细胞膜主要由磷脂和蛋白质分子组成，主要通过氢键和疏水键维持其结构，在高压的作用下，细胞

膜双层结构的容积随着每一磷脂分子横切面积的缩小而收缩，通透性增大。对于脂质体，当压力超过40MPa时，细胞内K⁺外流，Na⁺随着压力的增大线性降低。高压诱导细胞膜使其吸收氨基酸功能障碍。细胞壁为细胞提供一个细胞外网架，对细胞起支持作用等，20-40MPa的高压力使细胞壁破裂，原生质体溶解，所以真核生物对高压比原核生物敏感。

处于对数生长期的细胞对压力要比处于稳定期的细胞更敏感，处于稳定期的细胞对压力具有较强的抗性。这可能是由于处理对数生长期的细胞分裂速度快、细胞膜薄，而处于稳定期的细胞分裂速度明显减慢、细胞膜厚的缘故。耐压微生物细胞膜中脂肪酸随着压力的增加而变得更加多聚不饱和。当原核生物细胞膜中含有胆固醇时，细胞对压力变得更加敏感。有研究表明，经压力处理后菌体细胞胞外的ATP浓度增加，这证明了压力对细胞膜的破坏而导致了膜渗漏。还有研究表明高压处理后，虽然有些细胞膜没有明显的损伤，但是其通透性发生变化，改变了原有的状态，对活性也有一定的影响。压力引起的细胞膜功能劣化将导致氨基酸摄取受抑制。

Osum 等利用 TEM 和 SEM 研究了在 0~400Mpa 的压力下双形热带念珠菌(*dimorphic Candida tropicalis*) 的细胞结构及骨架变化,他们发现在 200MPa 的压力下,细胞壁遭到破坏,细胞的亚显微结构也发生变化,线粒体的嵴受到不同程度的损伤,核膜孔张开且被破坏。

Isaacs 等通过测定大肠杆菌细胞质的渗透液浓度($\lambda = 260\text{nm}$) 来证明细胞膜透性的改变,他们发现压力和受压时间是影响渗透液浓度上升的主要因素,并证明细胞质渗透液中可能含有芳香氨基酸如苯丙氨酸、色氨酸及酪氨酸和核苷酸。

Paul 等也通过实验证实细菌受到压力后细胞膜破裂,他们用可与 DNA 结合的荧光染料溴乙锭处理受压的细胞,在荧光显微镜下观察到:在受压时间短的细胞内有荧光物质,说明细胞膜破裂,溴乙锭进入胞内与 DNA 结合,但是在受压时间长的细胞内却没有观察到上述现象,这是由于超高压使 DNA 断裂,不能与溴化乙锭结合。因此细胞内物质的丢失被认为是细胞死亡的原因之一。

另外通常情况下,胆盐是不能进入细胞外膜的,NaCl 也不能渗透到细胞内膜。但是细胞受到压力后,胆盐和 NaCl 都可以进入细胞内引起细胞损伤。正常细胞对盐不敏感,但高压后的细胞对盐非常敏感,压力越大,对盐的敏感性越大。

Mozhaev 等认为细胞膜破裂的原因在于超高压使细胞膜的物理结构发生变化,膜蛋白与膜脂质的结合能力降低,膜内在蛋白和膜的外在蛋白从膜上脱落,使膜破裂。

在400—600MPa的压力下,处理细菌的悬液,然后用SHS—7500原子吸收分光光度计测定其中的zn、Fe、Mg、Ca、K等金属离子。其结果表明,所有细菌的菌体内细胞成分都有渗出

现象，高压处理过的菌液矿物质的含量比没有处理的菌液高出10倍左右，其中Fe、Mg渗出现象最多，达21—27倍。对超高压处理过的菌液，用岛津W—160A型分光光度计在260nm处测定菌体的类似RNA物质，其结果和没经过高压处理的样品相比，其渗出的类似RNA的物质增大约10—20倍。这说明菌体细胞膜受到了严重的损伤。

5 细胞内容物的泄漏

细胞膜破裂后导致的直接结果就是细胞内容物的泄漏。

把鱼粉中存在的同种菌制成悬浊液高压处理后，测定其向体外泄漏的无机盐，发现所有菌株均产生泄漏，特别是Fe⁺⁺、Mg⁺⁺泄漏严重。如金黄色葡萄球菌属700MPa处理后，Fe⁺⁺和Mg⁺⁺泄漏量分别增大21和14.4倍，假单胞杆菌属和粪链球菌属处理后，Mg⁺⁺的泄漏量分别增大11.5和20倍。棒状杆菌处理后，Fe⁺⁺的泄漏量高达27倍。且从营养细胞中泄漏的Zn⁺⁺、Ca⁺⁺和K⁺等离子与没有处理相比，也增大1.1—5.8倍。而核酸类物质和糖的泄漏量均约增大10—20倍，特别是金黄色葡萄球菌属和棒状菌属较高，由此可推测细胞膜受到严重的损伤，甚至破裂成许多个碎片。

试验认为芽孢的泄漏量很小，这是芽孢耐高压的一个重要原因。所以用600MPa的压力虽可以杀死水产品及肉类中的大部分微生物(包括葡萄球菌)，但达不到商业无菌状态(肉毒杆菌也会残留)。当然适当提高温度，可大大提高杀菌效果，甚至达到完全无菌的目的。

6 酶失活导致微生物失活

Jaenieke认为，高压对微生物的影响可能是由于微生物的关键酶失活。高压使酶失活主要是引起酶分子结构的改变或活力中心构象的改变，同时高压诱导酶的失活与pH、酶的浓度、酶亚基的结构、温度等因素有关。

到目前，高压引起酶失活机理尚未研究清楚，原因：同一细胞内高压对其不同的酶影响不同，如：在68MPa的高压下，E. coli的天冬氨酸酶活性被提高，在100MPa的压力下其失去活性；E. coli琥珀酸脱氢酶经20MPa的压力作用就失去活性；蚁酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶、琥珀酸脱氢酶对高压的反应也不同。Aspergillus oryzae的高峰淀粉酶在940MPa的作用下失活，当降压后该酶的活性又恢复到相当高的程度。

7 生化反应

微生物在高压下影响生化反应，是导致失活的原因之一。

高压会改变某些生化反应的速度和平衡：据化学反应热力学和动力学原理知道，压力对

反应速度的影响是由压力对反应物系浓度影响所致；对液相反应而言，只因高压下液体密度会有明显增大，故高压有助反应加速。对体积变小的可逆反应，高压将使反应更趋完全。

高压能加快体积减小的化学反应速度，减小体积增大的反应速度。许多生化反应体积发生变化，因而要受到高压的影响。绝对速率反应理论认为，一个化学反应进行的前提条件是反应物首先经过活化，活化百分数达到一定值时，化学反应才能进行。

一个恒温恒压的化学反应过程其热力学关系遵循下列关系式：

$$F=H-TS+PV$$

这里F为自由能，H为热焓，T为绝对温度，S为熵，P为压力，V为体积。表达式F包含体积项V，表明活化态涉及体积的变化，因而高压影响化学反应速度。

高压从两个方面影响生物反应体系：a. 减少分子间空隙；b. 增加分子间的链式反应。高压通过作用反应物和产物来影响反应速度，因为反应物和产物通常带有可离子化的基团，如果这些基团的电荷数未发生变化，该化学反应就不受高压的影响。在某一液相反应体系中，可电离基团数目增加的解离反应导致液相体积的减小，这种反应一般是由于离子附近水的电致伸缩应变引起的。Hills认为，高压打破离子间的静电作用，大量的离子裸露于水中。

例如：0.1MPa，25℃ 纯水的pH=7.0，而25℃，100MPa纯水的pH=6.27，而且引起纯水体积减少。维持生物大分子天然状态的化学副键受高压的影响极大。超高压使蛋白质变性，可是在适度的压力下(100MPa)，蛋白质的变形随着压力的增高而降低。小于100MPa的压力有利于促进氢键的形成，从而对维持肽链的螺旋结构有稳定作用。蛋白质的疏水交互作用也受高压的影响，在低于100MPa的压力下，这种疏水交互作用引起液相体积的增加，所以其受到破坏。在高于100MPa的压力时，疏水交互作用引起液相体积的减少，该压力有利于稳定疏水交互作用，因此，高压下。蛋白质的疏水性和亲水性程度决定了蛋白质的变形程度。

Bridgman报告，卵清蛋白在高于300MPa的压力下变性不可逆，而且随着压力的增大和时间的延长变性增加。

有人解释高压引起蛋白质变性，由于高压使之从天然规则的紧密结构变为开链的无规则线团结构，因此导致体积的增加。可是，Suzuki认为蛋白质分子多肽链的展开未必导致体积的增加，因电致伸缩应变，反应体系的体积会降低，高压力破坏分子内部的离子键，致使大量的离子基团的暴露。

Zamyatnin测定蛋白质分子在高压力条件下体积降低2%，蛋白质分子肽链的展开使得大量的非极性片段裸露于水中，由于这些非极性片段和水偶极子的接触，分子间距变短引起体积减少，另外，对展开的多肽链其氨基酸也不是紧密地排列在一起，因为链内存在的键角

和键距的限制。

总的来讲，压力对生物系统化学平衡的影响遵循Le Chatelier法则，即在一个平衡体系中，若改变平衡的一个条件，平衡总是要向能够减弱这种改变的方向移动。对于一个基本的平衡过程 $A+B \rightleftharpoons C$ 来说，系统自由能(ΔG)、热(ΔE)、熵(ΔS)和体积(ΔV)的变化可以表示成温度(T)与压力(P)的函数，即：

$$\Delta G = \Delta E + P\Delta V - T\Delta S。$$

这里 ΔV 是系统平衡态前后摩尔体积的变化，由于压力通常引起体积的改变，依据上式，在温度恒定时， ΔV 随压力的变化关系是：

$$\Delta V = V_{\text{平}} - V_{\text{始}} = (\partial \Delta G / \partial P)_T = -RT(\partial \ln K / \partial P)_T$$

(式中 R 是气体常数， K 是平衡常数)。压力对基本的A—B型反应的体积变化率的影响存在以下关系：

$$\Delta V^* = V^* - V_A = (\partial \Delta G^* / \partial P)_T = -RT(\partial \ln k / \partial P)_T,$$

ΔV 和 ΔG 分别代表任意过度态与起始态间的体积和自由能的变化， k 表示反应速率。由此看来，系统在没有热交换的条件下，压力的变化，可能改变了维持生物分子结构的各种化学键，引起系统体积的缩小或增大，推动了化学反应平衡的移动。

压力对生物分子的影响遵循两条主要原则：一是Le Chatelier原理；二是微观有序原理，即系统温度恒定时，压力升高会导致分子有序，降低系统的熵。

压力和温度对生物化学反应的影响是不同的，这在一些基本的反应过程中表现得较为清楚，如惰性基团的电离，Tris缓冲溶液的 pK （电离常数）对温度非常敏感，但几乎与压力无关。这种不同也表现在化学反应速率上，通常情况下，降低温度，化学反应速度下降(Δ)，但是压力升高，化学反应速度的升降，取决于反应体积(Δ)的变化。当研究蛋白质变性时，要将压力和温度同时考虑，因为蛋白质的天然构象只在压力-温度的一个相当有限的范围内存在。温度对蛋白质的影响是可逆或不可逆的，但压力则不然，压力引起的蛋白质变性并不改变蛋白质的共价键，这就是温度与压力处理改变蛋白质结构的本质差别。

在大多数研究中生物材料的溶解是必须的，高压处理也不例外。蛋白质溶解时的体积变化包括多个方面，其中最主要的是肽键和氨基酸侧链的溶剂化，这会导致总体积减少。高压处理，蛋白质溶剂化的外壳会变得更加有序，蛋白质-水间相互作用得到加强，这就是压力引起蛋白质变性的重要特征，例如高静压钝化烯醇化酶时水发挥了作用，在这个二聚体解离的过渡态，原来包埋的亚基界面因压力而发生水化，蛋白质-水间相互作用加强，使烯醇化

酶变性而钝化。

在高压条件下，水还有一个重要的物理性质。根据水的相位图，压力大于200MPa，温度在-20℃以上的区域，水为液态。应用这样的低温、高压条件可以对生物材料实施快速冷冻，通过改进高压生物技术的装备和方法，可在这种液态水相中对生物材料进行实验操作，但目前还不完全知道生物材料在此条件下的热力学规律和生物特性的变化。

改变渗透压的强弱是研究蛋白质溶解性变化和探明蛋白质松散束缚水作用的重要手段。在限制性核酸内切酶专一性酶切过程中，渗透压升高，会引起酶分子间束缚水的显著减少，压力可以减弱渗透压的影响，保持酶对固有识别系列的选择性。

过去很长一段时期内，运用静压力和渗透压技术研究生物材料没有受到重视，实际上，这两种技术结合可以研究许多生物化学过程中水的作用，如底物结合、蛋白质间的相互作用、变构效应和构象变化、催化过程、蛋白质稳定性、离子通道的形成等。