

第三节 超高压生物处理的生物学基础

一般认为在超高压条件下,生物体高分子立体结构中的氢键结合、疏水结合、离子结合等非共有结合发生变化,使蛋白质变性,淀粉糊化,酶失活,细胞膜破裂,菌体内成分泄漏,生命活动停止,微生物菌体破坏而死亡。蛋白质的氨基酸的缩氨结合、维生素、香气成分等低分子化合物是共有结合,在超高压下不会破坏、得以完整地保留。

根据实验结果证明,一般情况下 200-300Mpa 病毒灭活; 300-400 Mpa 霉菌、酵母菌灭活; 300-600 Mpa 细菌、致病菌灭活; 800-1000 Mpa 芽孢灭活; 低压下酶活性增强,超过 400 Mpa 酶失活; 400 Mpa 以上蛋白质三、四级结构破坏,发生不可逆变性; 400-600 Mpa 淀粉氢键断裂,并糊化。

1、超高压条件下的蛋白质变性

1) 蛋白质变性 (denaturation)

天然蛋白质的严密结构在某些物理或化学因素作用下,其特定的空间结构被破坏,从而导致理化性质改变和生物学活性的丧失,如酶失去催化活力,激素丧失活性称之为蛋白质的变性作用。蛋白质变性后,分子结构松散,不能形成结晶,溶解度降低,同时蛋白质的粘度增加,生物学活性丧失,易被蛋白酶水解。

蛋白质的变性作用主要是由于蛋白质分子内部的结构被破坏。天然蛋白质的空间结构是通过氢键等次级键维持的,而变性后次级键被破坏,蛋白质分子就从原来有序的卷曲的紧密结构变为无序的松散的伸展状结构(但一级结构并未改变)。所以,原来处于分子内部的疏水基团大量暴露在分子表面,而亲水基团在表面的分布则相对减少,至使蛋白质颗粒不能与水相溶而失去水膜,很容易引起分子间相互碰撞而聚集沉淀。

引起蛋白质变性的原因分为物理和化学因素两类。物理因素除了加热、加压之外还有紫外线照射、超声波的作用等;化学因素有强酸、强碱、尿素、重金属盐、十二烷基磺酸钠(SDS)等。

变性并非是不可逆的变化,当变性程度较轻时,如去除变性因素,有的蛋白质仍能恢复或部分恢复其原来的构象及功能,变性的可逆变化称为复性(renaturation)。许多蛋白质变性时被破坏严重,不能恢复,称为不可逆性变性。

2) 超高压对蛋白质四级结构的影响

蛋白质在高压下的变性机理一直是研究者所感兴趣的领域。蛋白质一般具有四级结构。一、二级结构决定蛋白质的功能,即它具有什么样的能力;三、四级结构决定它们的活性,即它是否能够发挥自己的能力。

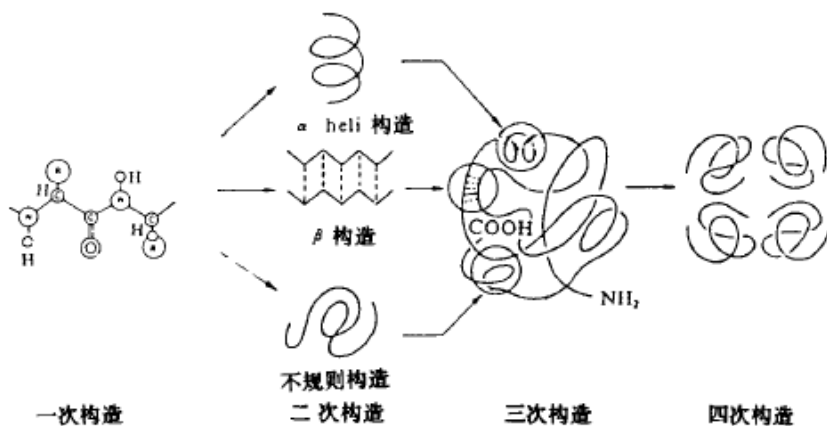


图 2-8 蛋白质的四级结构示意图

一级结构是由多肽链中的氨基酸顺序决定的，迄今为止还没有有关高压对蛋白质一级结构影响的报导，一般认为目前所达到的压力对一级结构尚无影响。

二级结构是由肽链内和肽链间的氢键等维持，高压对这一级结构的影响比较复杂，有些结构会在压力作用下更加稳定，例如二级结构的 α -螺旋，这是因为肽链与 β -结构间有较大的空隙。氢键形成通常伴随小的负体积变化，其方向与施加压力的方向一致，所以对压力不敏感，并有助于它的稳定。但是在非常高的压力下（大约高于 300–700 MPa），二级结构发生变化，导致不可逆的变性。这与升压的速率和二级结构重新排列的程度有关。

三级结构是由二级结构球形特殊巢化现象形成的，维持蛋白质三级结构的作用力主要是范德华力、氢键、静电相互作用和疏水相互作用等非共价键。由于疏水键和和离子偶的形成伴随体积的增大，施加压力时会造成分裂，并对作用于分子间的疏水和静电相互作用有影响。在 200MPa 以上的压力下，可以观察到三级结构的显著变化。然而，小蛋白分子如核酸酶 A 在更高的压力下(400–800Mpa)才发生可逆的伸展，这表明，在这种情况下，变性过程中体积和可压缩性的变化不是完全由疏水作用所决定。1976 年 Li 等的研究发现，高压下蛋白质的变性是一个复杂的过程，涉及由中间体形成的多种变性形式，例如熔球状态。

四级结构是由一些紧密结构聚集而形成的，它由非共价的相互作用保持结构稳定。1987 年 Weber 等指出主要由疏水相互作用维持的四级结构对压力非常敏感。例如，低聚肽蛋白质在中等压力(<150 MPa)很容易分裂，它低于单体的伸展时所需要的压力；高于 150–200 MPa 的压力诱使蛋白质伸展，并能使分裂的低聚体亚基再聚合。酪蛋白微团被离子和疏水力结合在一起。球状蛋白在压力作用下产生的变性，能导致聚合，最终凝胶化或凝结。

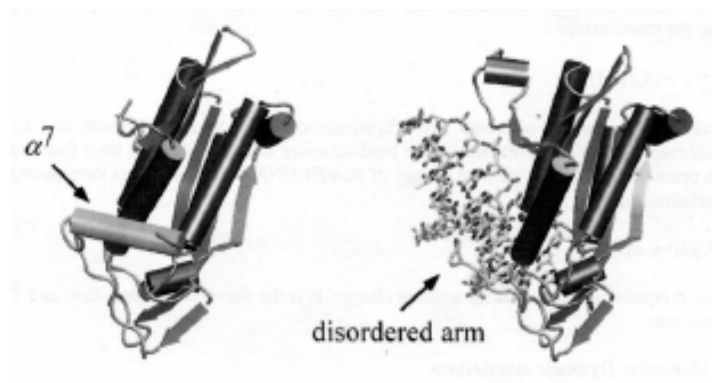


图 2-9 超高压导致蛋白质变性示意图

注：左图为天然蛋白质分子结构，右为超高压处理后结构被破坏的蛋白质分子

3) 蛋白质伸展和变性的研究方法

蛋白质变性可以利用光谱、酶活性、热分析、色谱、酶的消化、免疫学、电泳、显微镜和溶解度等方法进行研究。最近几年，一些光谱技术多被用来观察温度和压力引起蛋白质伸展的现象，包括核磁共振（NMR）、超声波（UV）、光谱、吸光、荧光、紫外线、红外线光谱与小角度 X-射线衍射技术。

超高压是分析蛋白质结构的一种新的方法。通过 X-射线结构分析可知，压力可影响蛋白质的二级、三级、四级结构。而其他某些方法也可测量出蛋白质结构的变化：振动光谱可测量出蛋白质二级结构的变化；NMR 光谱、X-射线分析、或 UV-vis、荧光光谱可测量出蛋白质三级结构的变化；NMR、荧光光谱或电泳分析可测量出蛋白质四级结构的变化。在这些测量方法中，傅立叶变换红外光谱技术可给出蛋白质二级结构变化前后的详细信息，包括结构变化特点等。

通过高解析度NMR与高压结合技术可以确定蛋白质结构变化以及压力引起的变性。J. Jonas 等人分析了这种方法的潜在性和技术先进性。他们特别指出，NMR设计的某些特点对这种方法在生物化学领域的应用十分必要，如：高清晰度、高敏感度、较广泛的压力或温度范围、大取样量、可靠的RF导体、超导磁体的适宜性等。应用这种方法的一个例子是通过相位灵敏的二维COSY (correlated spectroscopy) 和NOESY (nuclear Overhauser effect enhancement spectroscopy) 对二聚Arc(丙烯酰胺)抑压蛋白质分裂的研究。神户大学的一组工作人员使用¹H NMR方法，在 400MHz/7.5-40℃的条件下研究了核糖核酸酶A的展开现象。这种系统高压NMR研究已应用于典型脂质膜的研究。与液晶态相比，这种脂质膜具有高度规则的凝胶态。

同时使用这种循环二色性光谱还需要特别的注意，这种可详细阐述蛋白质构相研究的技术对高压实验却不适用。目前，典型分子数据的压力可达到 200Mpa。

为了更好地理解蛋白质结构特性之间关系，需在分子水平上描述所产生的现象，模型系统可以帮助我们了解聚合形成的分子机制。

利用这些手段对蛋白质的超高压处理进行了一系列的研究，并取得了成果。表2-5显示此前在一个大气压条件下研究蛋白质结构和功能的主要生物物理方法。最近一些方法在研究酶或蛋白质结构中得以应用和发展，并且在已经发表的论文中被描述。

表2-5 研究蛋白质结构和功能的主要方法

蛋白质结构和功能	主要方法	压力应用的上限 (MPa)
----------	------	---------------

一级结构		压力无影响
二级结构	振动光谱	2000
三级结构	核磁共振光谱	700
	X- 射线分析	100
	UV/Vis荧光光谱	1000
	压力阶跃	700
四级结构	电泳	500
	超速离心法	100
	荧光光谱	1000
	NMR光谱	700
配合基粘合物	闪光光解	500
	亲和电泳	200
酶活性	差分光谱	1000
	止流法	200
	快速取样法	200

第四代蛋白质衍生物吸收光谱表明，在紫外线区域由光学光谱进行了最新的改进，在物理条件的约束下得到了蛋白质构象变化的信息。当然，在压力下用吸收光谱很容易显现蛋白质构象状态，它们在明显的区域吸收所包含载体，但是它在紫外线区域比较困难。为了帮助分析压力对蛋白质结构的影响，第四代衍生物光谱在实验室得以发展，由于苯基丙氨酸、酪氨酸、色氨酸的吸收，它提高了蛋白质紫外线光谱区域的光谱变化的选择性。在研究中，因为第四代衍生物光谱段的振幅、位置和形状受溶剂极性的影响，应该评估这些变化正确描述压力对蛋白质的影响。

荧光光谱成功地用于高压蛋白质结构变化的研究。在此情况下主要的反应来自蛋白质中色氨酸残余物，选择295nm的励磁可以展示出来，光谱聚集N_M的中心能分析荧光光谱，Weber等人确定并发展了这一规律。

最近红外线光谱促进了高压对蛋白质结构影响的分析，特别是付立叶变换红外线光谱(FTIR)。在红外线光谱中，氢键与C=O键和与C=O连接的振动是确定蛋白质氨基化合物I键特征的主要因素。详细的二色性分析成功地适合高压条件。最近，其中一些方法在实验室里得到应用和发展，用于研究酶动力学或蛋白质结构并在当前的论文里进行过描述。

FTIR 能给出蛋白质二级结构屈服于高压的直接信息，两个其它的分光镜技术允许用芳香氨基酸当作固定探针来观察构象的变化。用第四代衍生物蛋白质吸光光谱的分析研究芳香氨基酸环境的极性的变化。

用紫外线吸收和荧光光谱技术，曾调查高压和温度下小麦 γ -46麸朊在水溶液中的伸展。经观测麸质的流变特性依赖于蛋白质的相互作用，并保留原有的麸朊二级结构基础，它与称作“熔球”的通用特性共价，在蛋白质折叠中与水结合成中间状态。

采用NMR研究对核糖核酸酶A的数据进行分析，并且证明了热、冷、压力伸展的结构变化是不同的。

很多蛋白质的傅立叶变换红外研究得出这样的结论，蛋白质加热后伸展形成的网状物是不可逆的过程，压力伸展的可逆性要比温度伸展的可逆的可能性要大的多。

高压技术已经发展为可借助在线仪器观察加压、卸压过程中生物高分子的相变。同时，我们还可借助于诸如震动光谱仪、钻石砧等多样技术。加拿大国家研究委员会的P.T.T.Wong博士首先提出了这种技术。借助这种技术，我们可以很轻松的获得 10kbar、或高于 10kbar 强度的压力。这种技术也可简单与傅里叶变换红外光谱仪、拉曼光谱仪结合使用。

拉曼光谱仪的优势为：它可在含水试样中直接工作，无需其他辅助设备。但某些生物样品显示出的荧光性要强于拉曼效应，这点为拉曼光谱仪的不足。某些有色样品具有共振拉曼效应的特性。相反，红外技术为一项吸收技术。荧光性并不受到影响，而水的强烈吸收区域发生在蛋白质中重水填充的区域。科研人员以蛋白质胰凝乳蛋白酶原变性、脂氧化酶变性为例来阐述上面提到的红外技术。胰凝乳蛋白酶原变性开始于 6kbar 的压力强度下，当压力上升到 7kbar 时，胰凝乳蛋白酶原完全变性。而胰凝乳蛋白酶原却显示出极强的稳定性，此稳定性是否与胰凝乳蛋白酶的二级结构相关，这点引起了科研人员的兴趣。氨基化合物 I⁺ 结合蛋白质的详细分析需要对分子的结构进一步研究。研究过程中，可把自重叠法（self-deconvolution）与协同装配法（band-fitting）结合使用。

4) 超高压与温度引起的蛋白质变性

高压处理对蛋白质稳定性的影响符合Le Chatelier 规律,即随着压力的升高,蛋白质会缩小其体积以适应这种变化。与此同时,由于蛋白质分子间的疏水作用、离子键、氢键被打断或重组,而发生可逆或不可逆的结构变化。高压导致的蛋白质变性是一种复杂的现象,它和蛋白质的结构、压力、温度、pH 值以及溶剂的成分密切相关。在低蛋白浓度(0.05%~0.2%)时,压力导致的变性通常可以部分或全部的恢复。对高浓度蛋白(10%),会发生较强烈的分子间作用和不可逆的沉聚现象。

超高压能产生不同于热处理蛋白质的凝固物或凝胶。蛋白质经过超高压处理,无论在色泽、光泽、风味、透明度、硬度、弹性都具有很好的特性。超高压可用于蛋白质的化学修饰产生新的功能。如蛋白质食品结构组织化和起泡性。

美国物理学家、诺贝尔奖获得者 Bridgman (1914) 观察到: 7kbar/30-min 的处理条件可使蛋白凝结。另外,他还发现,低温、低压处理可获得相同的处理效果。Suzuki(1960)绘制了 P、T、k 图表述他的成果,在给出压力 P 和温度 T 的条件下用相同的变性比率常数 k 连接了一些点,得到一个类似椭圆形的相图。他注意到一个特征,在高温低压向高压低温转变时,活化能 (E_a) 和体积 (V_a) 从正向负变化,如表 2-6 所示。在低温时压力诱使变性的比率要快。

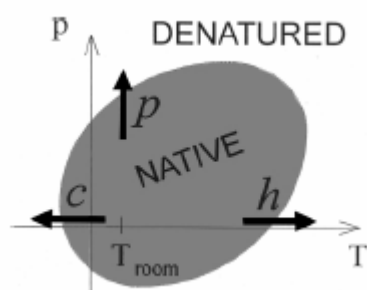


图2-10 蛋白质变性示意相图

注：图中椭圆形阴影为天然蛋白质区域，阴影外为变性区域，h:热变性、p:压力变性、c:冷变性

表 2-6 蛋白质变性中压力和温度对活化能及体积的影响

参数	压力 MPa	温度℃	活化能 E _a	体积 V _a
高压/低温	>400	<30	-	-
高压/高温	>300	>40	+	-

低压/高温	<300	>60	+	+
-------	------	-----	---	---

Hawley(1971)观察结果表明：蛋白质变性的相图很清楚地解释压力处理的效应。例如高压和温度同时作用于胰凝乳蛋白酶原溶液时，蛋白质的变性情况如图 2-11。常压 45℃条件下，可产生 80% 以上的热变性；而常温(20℃)下，加压到 400MPa，才有 80% 的蛋白质产生压力变性。

在低于 10℃ 条件下高压(100—500MPa、10—30min)有利于凝胶的形成，并能增强凝胶强度。很多研究报告指出，单纯高压处理形成的凝胶比热诱导凝胶柔软，但在热加工前进行高压(20—500 MPa)处理可促进热凝胶的形成，增强热凝胶的强度和保水性。

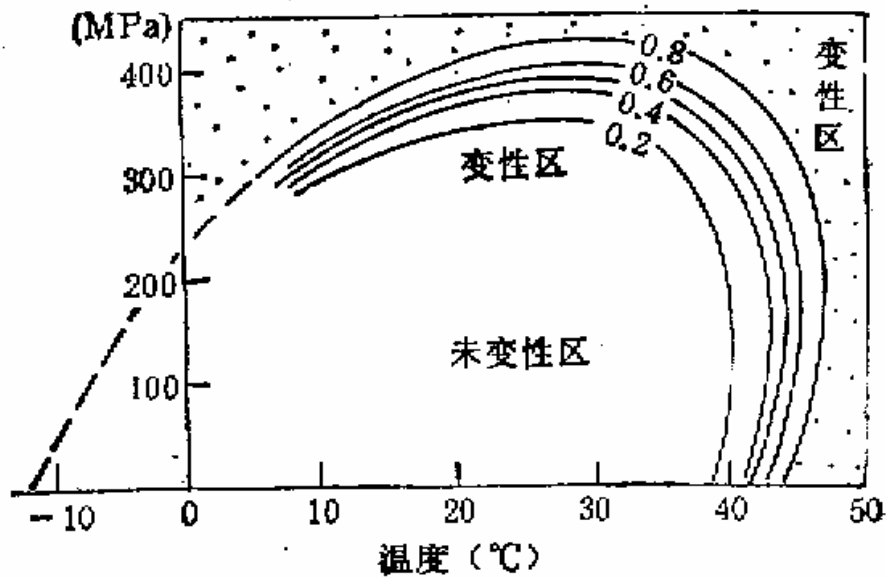


图 2-11 超高压和温度对胰凝乳蛋白酶原溶液中蛋白质变性的影响

如图 2-11 所示，在温度提高到某一区段下，压力可增强蛋白质稳定性，即温度抑制了压力变性。室温可提高蛋白质稳定性，而欲使蛋白质变性必须提高压力。高压处理多糖，可以观察到相似的现象，例如，淀粉的凝胶作用、特定磷脂、抗菌素 T4 等。

比较蛋白质压力变性与温度变性。如表 2.7 所示。依据处理条件的不同，蛋白质变性具有可逆性或非可逆性。除硫醇基氧化以外，分子间的共价键没有任何改变。这点对压力处理形成凝胶体的颜色、气味十分重要。

表 2-7 温度与压力引起的不可逆蛋白质变性（化学变化）对比

温度	压力
肽键的断裂	无效应
脱酰胺	无效应
二硫酸桥的断裂	无效应
-SH 的氧化	-SH 的氧化
凝胶、沉淀	凝胶、沉淀

pH、盐溶液或糖溶液的参与都可影响蛋白质的压力变性(Zipp, Kauzmann, 1973)。另外，一些学者还研究了有机溶剂在维持蛋白质稳定性方面的作用(Kornblatt, Hui Bon Hoa,

1990)。脂质可使某些特定多肽稳定 (Carier, Mantsch, Wong, 1900b)。另外, 在高压促使蛋白质聚合时, SH组参加反应, 二硫化物键起到重要的作用。

1980年 Schade 等的研究发现, 中等压力 (<150Mpa) 有利于低聚体蛋白的解离, 而且通常伴随着体积减少的现象 (有时体积变化比较大, 如乳酸脱氢酶: $\Delta V = -500\text{mL/mol}$)。Masson 等于 1990 年发现解离伴随着亚基的聚合或沉淀作用。通常, 低聚物解离发生的压力比起观察到的单体伸展的压力 (<150 -200Mpa) 要低。高于 150-200Mpa 的压力将导致蛋白质的伸展和来自解离低聚体亚基的重新组合。例如, 压力低于 150Mpa 时, β -酪蛋白发生可逆的解聚, 而在更高的压力下, 观察到可逆的重新聚合, 这也取决于温度的影响。Weber 于 1986 年的研究表明压力离解的亚基随着时间的变化构象发生变化。压力释放后单体的变性复原作用非常缓慢。详细地研究压力和温度诱导的蛋白质变性的变化, 有助于开发它们在食品工业中的新应用, 这也是蛋白质独特行为的结果。当压力增高到 100Mpa 时, 蛋白质的变性温度增高, 而更高的压力下, 变性温度通常降低。

在多数情况下蛋白质变性是通过分子间的网状结构稳定的凝胶化, 它防止原有状态出现再折叠。图 2-10 显示了蛋白质变性的三种最普通的方法: 热变性、压力变性和冷变性。

凝胶体形成的过程为蛋白质变性 (分子水平) 或其他诸如多聚糖等生物高分子变性的宏观结果。变性改变了蛋白质、生物高分子的固有结构。这种变性可形成凝胶体或沉淀物。这种变性过程比较复杂。这里列举两种不同类型的蛋白质凝胶体的变性机制。

第一类为牛血清白蛋白、 β -乳球蛋白等球状蛋白形成的凝胶体。这种凝胶体的结构与胶质、乳状液的凝结对有着共同的相似性。凝胶体的形成具有两种可能性: 变性之后发生聚合:

固有结构 \rightarrow 变性 \rightarrow 聚合

或者为, 聚合之后发生变性:

固有结构 \rightarrow 聚合 \rightarrow 变性

第二类为白明胶形成的凝胶体。此时, 凝胶体形成机制与合成聚合物的形成机制相似。这种凝胶体是由非组织蛋白质形成的。 β -结构在温度引起的凝胶体形成过程中十分重要。温度形成凝胶体与压力形成凝胶体间存在不同的机制特性。日本研究指出: 食品蛋白质 (诸如蛋白、非纯净肌球蛋白、大豆蛋白) 的高压凝胶体较柔软、同时具有较佳的弹性和延展性。与高温凝胶体相比, 高压形成凝胶体的颜色和香味得到了较好的保存。

5) 水和助溶剂的作用

在生物分子的重入现象中, 水是必不可少的条件。例如干蛋白质、干淀粉和干细菌孢子 在金刚石砧腔中施加很高的压力, 不会有任何不可逆变化。而在 300-700MPa 等静压和水 (或其它介质) 的作用下, 就能发生不可逆变性。

在蛋白质变性的过程中, 溶剂特别是水活度的作用应被充分理解, 溶液中的蛋白质结构是聚合物链中分子内部的相互作用的精确的平衡的结果。

水的活度对高压技术的生物技术应用和蛋白质变性的稳定有重要的影响。Suzuki 解释了在 I 区负活化能遵循如下机制:



上式表示, 首先水受压进入蛋白质, 然后伸展, 并且同一瞬间伸展的蛋白质发生聚合, 完成了变性的过程。

Isao Havakawa 认为蛋白质高压变性可能受到高压下水的相变影响。高于 400MPa 的压力很容易使水相和疏水性改变, 此时水的结合能比 0.1MPa 时大, 但这一较大差异是因为芳香族碳氢化合物在水中的溶解度也随压力增加而改变。因此, 0.1MPa 时水的结构与 400MPa 以上时不同, 这一现象导致蛋白质变性。

研究表明超高压会导致乳蛋白质表面暴露的疏水性基团增加。Gaucheron F 等用ANS荧光探针测定了在不同压力和温度联合作用下脱脂乳蛋白质疏水区域的暴露情况,结果显示疏水性区域增多,并且显示在不同的压力和温度下乳蛋白质发生了部分(或全部)变性,从而使其疏水性区域不同程度地暴露出来。但Hayakawa I 等在研究牛血清白蛋白(BSA)在高压作用下的疏水性区域外露情况时发现,其用ANS 荧光探针测定的荧光强度随压力的升高而降低,作者认为这并不表示BSA在高压处理下稳定性提高,而是由于高压处理后BSA 蛋白之间发生了交联作用,从而使蛋白表面的疏水性区域被掩盖而相对减少。

使用第四代衍生物光谱显示,在正温或负温时增加压力,向多极性的环境暴露了蛋白质的芳香残基,它符合疏水区向溶媒的暴露。无论如何,在低温或零下温度蛋白质结构在压力作用下比 β -乳球蛋白结构在正温下表现出更多的与水结合的状态。此结果显示了蛋白质与溶剂之间的关系,它既涉及压力又涉及温度,建议低温加压最大限度地减少结构变化和因此损失蛋白质的功能。

另外高压处理脱脂乳会使超离心沉淀物水化度增大,分析其原因是由于高压处理使蛋白质的空间结构发生改变,一些化学键被打断,分子表面的氨基酸残基和肽键也发生了改变,并出现离子化;而且疏水性区域的外露,使一些水分容易扩散到其空穴中,并在其中定位,从而也使水化度有所增加。Anena S G和Creamer L K认为小的蛋白颗粒具有更好的溶解性,说明高压处理的蛋白质水化度的增加与其蛋白质颗粒直径的减小也有一定的关系。

用ANS荧光法可测定暴露的蛋白质疏水基团。胶束小片化产生的新表面和个别蛋白质链的打开都能引起蛋白质疏水基团的暴露,而这与蛋白质的许多功能特性(如溶解性、乳化性、起泡性及凝胶性)相关。压力和其处理时间都能增加乳中疏水基团暴露的数量。200MPa时,随作用时间逐渐延长至2h时,暴露基团数可稳定增加并达最大值;当增加压力使疏水基团暴露数在15min时达最大,若再延长数量不再提高。

6) 熔球状态 (the molten globule states)

介于未折叠和已折叠之间的中间状态被研究人员称为熔球(molten globule)状态。当我们研究蛋白质部分展开状态下蛋白质的温和变性时,熔球状态是非常重要的。压力引起的水合作用的变化主要涉及折叠中间体、伸展中间体的形成。

另一个比较有趣的实验就是在压力条件下,研究压力对人类丁酰基胆碱酯化酶变性效应。当压力达到150MPa时,酶的水合体积开始膨胀;当压力在50-150MPa间变化时,限制染色(ANS)荧光强度增强。这些观察结果表明:蛋白质的压力变性为多步骤过程,同时所观察到的过渡性压力变性状态具有“高度有序性”的熔球状态特点。这些都将有助于更好的理解蛋白质变性过程。

此外,压力可降低疏水键的稳定性,疏水键会引起蛋白质寡聚结构的离解。这种情况通常发生在压力低于200MPa时,卸压后,这种逆变速度减缓,同时表现出滞后现象。由于亚稳态媒介态的存在,此时的滞后现象被称为构相漂移。

7) 压力对玻璃转化温度的影响

在食品科学中玻璃转化温度是一个重要的概念。对于纯流体来说,玻璃转化不是平衡状态之间的转化,而是两个亚稳态之间——超冷流体和无序固体之间的转化。玻璃转化是一个动力学概念,而不是平衡的概念。非常清楚,水的活度在玻璃转化中扮演着重要的角色。干燥状态的蛋白质,顽强地抵抗着温度和压力导致的伸展。一些实验强调了在生物大分子中,水作为增塑剂能降低玻璃-塑性转化温度。

根据聚合体压力对玻璃转化温度的影响的有限的研究,认为非氢键系统有近似于22K/100 MPa的变化。压力对山梨糖醇氢键系统的影响,显示出4K/100 MPa更弱的依赖性。

大量类似目的物可以期待在蛋白质中玻璃转化而成。