

(超)高压对微生物的影响及其诱变效应探讨

王岁楼^{1,2} 吴晓宗¹ 郝莉花¹ 孙君社^{2*}

(¹ 郑州轻工业学院食品与生物工程学院 郑州 450002)

(² 中国农业大学食品科学与营养工程学院 北京 100083)

摘 要: (超)高压对微生物有多方面的影响,它不仅可使微生物细胞体积形态、细胞组分发生变化,还可使微生物的基因表达和核酸结构及其生物学功能发生改变。(超)高压的这些生物学效应,使其不仅可以应用到食品杀菌、保藏及某些加工过程,而且在微生物菌种诱变方面具有很大的应用潜力。这是因为(超)高压既然可以使核酸发生变化,那么它诱导微生物发生突变就很有可能。现从(超)高压对微生物的影响出发,并结合国内外有关实例及作者的研究工作,初步探讨其诱变育种的可行性。

关键词: (超)高压,微生物,诱变

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209 (2005) 06-0970-04

诱变育种主要有物理诱变和化学诱变两种方法,已有的物理和化学诱变因子一方面由于频繁使用,其诱导新突变的能力下降,诱变频率降低;另一方面由于它们几乎都有放射性或毒性,在很大程度上限制了它们的应用。如果要取得大的突破,必须寻找新的诱变源。为此,人们探寻各种各样的新方法,甚至将目光投向太空,利用航天搭载进行诱变育种并取得很大成绩,但该方法成本高且不易随时实现。由此可见,寻找一种新的、成本低且高效的诱变育种方法是十分重要的。

自从 1895 年 Royer 首次报道超高压(高压、超高压是相对的,一般认为 100 MPa 以上压力为超高压)可以杀死细菌及 Hite 和 Coworkers 报道了高压对牛奶具有保藏作用以来,高压在食品科技领域应用的研究报道日益增多^[1],但主要局限于在食品杀菌和加工过程中的应用,而且还多处于理论或实验室研究阶段。随着人们认识的提高,高压被逐步应用于生物学领域并逐渐形成一门新的学科——高压生物技术,主要包括对深海生物、生物物化性质、嗜极菌蛋白质和高压生物技术应用等的研究^[2]。

本文从(超)高压对微生物的影响出发,初步论述了其作为一种新的诱变育种方法的可行性。

1 (超)高压对微生物的影响

1.1 高压使微生物细胞体积形态发生变化

高压会使微生物细胞体积减小,形态发生异常,如由球状变为细杆状。Marie 等^[3]研究了 *Saccharomycopsis fibuligera* 在 250MPa、15min 下的细胞体积变化(以 30MPa/min 的速度升压,以 90MPa/min 速度卸压),结果发现在升压过程中细胞体积随压力升高而减小,最后达到初始体积的 85%~90%。在

15min 的压力保持过程中,细胞体积减小至 75% 卸压又会使细胞体积部分恢复,可回复至初始的 90%。升压和卸压过程的细胞体积发生变化,是由于细胞膜的可收缩性。在压力保持阶段,细胞体积减小不再是细胞可压缩性的表现,而是细胞内容物在压力持续作用下随着水分流失的过程。这种不可恢复的体积减小导致细胞内大量的聚合蛋白分离^[4]。

在大气压下, *Lc. lactis* 细胞是双球状,随着压力的增加,细胞逐渐整合成为链状,而且链形成的数量和频率完全依赖于压力的大小^[5]。Adriana 等^[5]用 DAPI 染色该菌 DNA,发现其 DNA 的复制、分离与高压引起的细胞体积形态的改变无直接关系。但本文作者认为,高压导致细胞体积减小,胞内物质浓缩,使得先前互不接触的各种酶、蛋白质及核酸类物质接触,这种接触必然会导致一些不可预测的反应发生,如 DNA 在高压下会与切割 DNA 的核酸内切酶接触而使得 DNA 发生变化^[6]。

1.2 高压对微生物细胞内组分的影响

1.2.1 高压对蛋白质的影响: 压力可以改变蛋白质的二、三、四级结构,通过 X-射线衍射结构分析能够获得压力引起蛋白质局部变化的清晰图谱。*Rhodotorula mucilaginosa* 在高压下培养时,其细胞内一些蛋白质的稳定态水平有一定的提高^[7]。在高压作用下,大多数微生物的细胞生长会出现一段延迟期,期间会产生一些压力诱导蛋白质(PIPs),如大肠杆菌在压力提高到 28MPa 时就出现 PIPs,通常压力越高,PIPs 量越大。大多数 PIPs 能够与蛋白质数据库中的蛋白质相关,但有一些 PIPs 是完全自生的,可以说高压改变了细胞中蛋白质生物合成的能力^[8],而且转录和翻译过程对压力高度敏感,压力可以轻易地改变蛋白质合成的类型。

高压不仅可以诱导产生压力诱导蛋白(PIPs),而且它还

基金项目 河南省自然科学基金项目 (0411021900)

* 通讯作者。Tel: 86-10-62329648 E-mail: sunjunshe@126.com

作者简介 王岁楼(1961-),男,硕士,教授,中国农业大学在职博士研究生,主要从事工业微生物和发酵工程技术研究。Tel: 86-371-63556064; E-mail: wangsuilou@zzuli.edu.cn

收稿日期: 2005-04-01, 修回日期: 2005-06-07

对细胞膜上的蛋白质有着巨大的影响。耐压深海菌 *Photobacterium* SS9 在高压下自适应调整了几种细胞膜蛋白的含量,膜蛋白 OmpH 在 SS9 菌种最适生长压力 28MPa 下,其含量比在一个大气压下高出 10~100 倍,而膜蛋白 OmpL 在此高压下的生成被抑制,膜蛋白 OmpI 生成量最大的诱导压力在 40MPa,超过了该菌最适生长压力 28MPa^[9]。

高压对蛋白质的影响十分重要,从蛋白质结构的分析到蛋白质纯化、结晶化、溶球态动力学模型的初步建立再到蛋白质刚性与结构之间的关系分析等,都要求我们从宏观上理解高压,从微观的角度去应用高压。

1.2.2 高压对细胞内其它成分的影响 在微生物细胞中, rRNA 保证核糖体蛋白质维持它们特定的二级和三级结构,使核糖体能够在蛋白质合成中履行它的功能。Grossetal^[10] 发现,在 40~60MPa 压力下核糖体就开始分离,这很有可能与高压下二价阳离子(如 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Fe^{2+}) 的活性增强有关。把 *M. thermolithotrophicus* 放置在 50MPa 培养时,细胞内氨基酸成分及含量发生了巨大变化^[11],大部分氨基酸出现了流失。压力还能够影响细胞膜的功能和渗透性,使膜脂质双分子层成分发生变化,不饱和脂肪酸的含量随着压力的增加大幅度提高^[12]。

2 (超)高压诱导微生物变异的探讨

目前,人们在高压对细胞遗传物质的改变造成的变异方面研究较少,针对高压诱变的规律进行研究的则更少。高压不仅对细胞形态、细胞膜壁、细胞生物化学反应而且对微生物基因机制均会产生很大影响。选用适当的压力,可以改变微生物的某些生物组织,诱发微生物的酶或本身发生不可逆转的变化。如果这个变化是定向的,则更为有效。

2.1 高压对微生物遗传物质的影响

由于一切生物的遗传物质基础都是核酸,所以,任何能改变核酸结构的因素都可导致其生物学功能的改变,凡能引起核酸其他功能改变的因素,一般也能引起突变。这是“生物化学统一性”法则的一个具体例证。

核酸尤其是 DNA,对压力有一定的抗性,但是在适当的压力下核物质会发生浓缩^[13,14]。高压下 DNA 会与切割 DNA 的核酸内切酶接触^[6],核酸内切酶打开了 DNA 双螺旋结构,使 DNA 发生变化,但此过程可回复,这可能与一种负责回复活性的酶有关。有研究认为 30~50MPa 之间的静压能影响基因的表达式和蛋白质的合成,如高压可导致啤酒酵母产生四倍体,证明高压能影响 DNA 的复制^[15]。在高压下,酵母和大肠杆菌的 DNA 含量都大幅度减少^[4],研究 *E. coli* DNA 在高压下的合成发现,在较短时间内,其 DNA 合成对压力不敏感,而在长时间处理下, DNA 合成可以说是一个对压力最为敏感的细胞内活动过程^[16]。在 DNA 复制初始阶段,压力最重要的作用位点在细胞膜,压力使膜上不饱和脂肪酸含量增多,膜流动性增强,这可能也是高压下 DNA 复制所要求的^[17]。

高压影响到 DNA 的超螺旋结构,包括抑制 DNA 旋转酶

(Gyrase)或 Muk 蛋白的活性,甚至影响 DNA 父链的解旋^[18]。不仅是合成上的影响,高压还使得 DNA 失去其紧急修复的应急反应(SOS)机制^[19]。

2.2 高压对微生物基因表达的影响

高压影响基因的表达是通过乳糖操纵子(Lac promoter)进行的。研究发现高压可代替异丙基- β -D 硫代半乳糖苷(IPTG)作为诱导物来打开 Lac 操纵子表达基因的开关^[20]。IPTG 是通过与 Lac I 阻遏蛋白结合使之失活,不再与操纵基因结合,而使得结构基因得以表达,据推测高压是通过使乳糖阻遏蛋白失活达到该目的^[21]。事实上,高压使得 Lac I 阻遏蛋白从四聚物分解为二聚物而失去活性^[22]。

2.3 高压诱变实例

目前国内外极少有高压诱变育种的研究报道。美国地球物理所发现了一种耐高压的大肠杆菌和一种耐高压的海洋细菌,它们能耐受超过 10000MPa 的压力,相当于海平面大气压力的 1.6 万倍^[23]。我国高翔等^[24]用 220MPa 高压处理大肠杆菌 TG1、DH5 α 和 HB101 得到了耐压的突变菌株 TG1P、DH5 α P 和 HB101P,其在 220MPa 高压下的存活率提高了 2~3 个数量级,分别从 1.06×10^{-6} 、 2.98×10^{-4} 、 3.65×10^{-3} 提高到 8.31×10^{-3} 、 3.40×10^{-1} 、 1.69×10^{-1} ,通过双向电泳比较发现, TG1 和 DH5 α 两种菌株耐压突变菌的部分蛋白质组与原始菌的有所不同,有 3 种蛋白质的含量明显增加。Silva 等^[25]在研究中首次观察到在高压下发生亚基解离和聚合而失活的病毒(vsv)但仍保持高免疫原性,这预示着高压技术有可能成为制备病毒疫苗的一种新方法。另外,李桂双等^[26]利用 75MPa 高压处理水稻种子,发现其叶片中类胡萝卜素含量明显提高。

本文作者分别利用紫外线和 150MPa 压力诱变漆酶产生菌灵芝(*G. lucidum* Karst),发现超高压的诱变幅度较大(另文发表),无论是突变株的菌丝形态(高压诱变株与出发菌株菌丝形态完全不同,而紫外诱变株菌丝及菌落形态与出发菌株相似),还是发酵结果(酶活提高的倍数、发酵时间缩短的天数)都证明了这一点(图 1),现正进行深入研究。

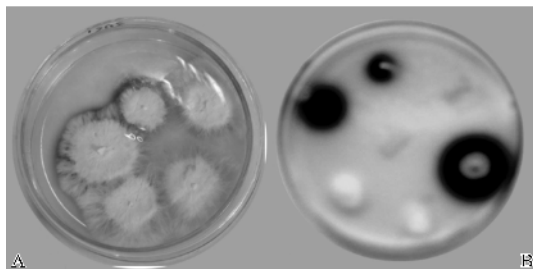


图 1 (A)灵芝紫外诱变株转接后的显色情况;(B)灵芝超高压诱变株转接后的显色情况

Fig.1 (A) The appearing color result of mutant strains of *G. lucidum* Karst treated with UV radiation;(B) The appearing color result of mutant strains of *G. lucidum* Karst treated with ultra high pressure

可见,在传统的诱变剂反复使用、诱变产量提高到极限量易发生退化的情况下,超高压可望作为一种新型的物理诱变育种手段,而且具有操作简便、无污染等优点,但对其诱变机

理有待进行深入研究。

2.4 讨论

影响微生物高压诱变的因素主要有压力、加压时间、温度、pH、种株差异、菌龄、培养基成分及其它辅助影响因子等, 这些都需要研究和优化。我们的实验证明, 处于对数生长期的微生物比稳定期和衰亡期的微生物对高压敏感, 因此应选取对数生长期的菌株进行高压诱变。培养基营养成分丰富可保护微生物免于高压损伤或有利于损伤后修复, 使存活率提高。与食品微生物灭菌不同, 高压诱变育种不是为了杀死全部微生物, 应把微生物置于营养较为丰富的培养基中, 在最佳的生长温度和 pH 附近进行高压处理。此外, 建立起拟合性高的存活率(失活率)与压力之间的关系式也是十分必要的, 图 2 为我们拟采用的一种研究微生物失活动力学过程的受控实验系统。

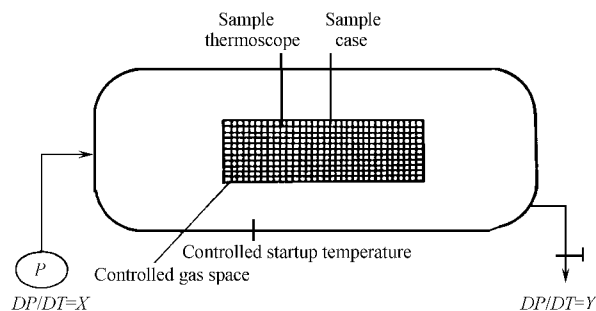


图 2 一种微生物失活动力学研究系统

Fig.2 A system for studying microbe's inactive kinetics

选择适合高压育种的微生物载体(介质)及材料包装方式、选择有效的施压方式(连续式、半连续式、间歇式)、寻找高效实用的培养和检出突变微生物的方法等, 也都是高压诱变需要解决的关键问题。例如, 高压诱变微生物需要把包装材料灭菌再进行菌液分装, 以免包装袋上的杂菌对菌液造成污染。但用于食品高压加工的软包装材料多为聚乙烯塑料, 而聚乙烯不能进行高温(100kPa)灭菌, 若把它进行超高压灭菌又需寻找杀死包装材料上所有微生物的压力、温度和时间等参数。我们的实验表明, 采用聚丙烯作为包装材料, 可进行高温灭菌, 菌液分装后, 也易于封口, 是进行微生物高压育种的理想包装材料。

另外, 在目前所发表的每一份文献中都没有单独地研究高压, 而是把高压和温度结合起来。高温可以促进压力灭菌, 而低温可以帮助微生物抵抗压力, 这也是嗜、耐压菌生活温度低的部分原因。压力和温度作为两个重要的物理参数, 在某些热力学特性上非常相似。那么我们就有可能在不方便测定压力的条件下, 让压力套用温度模型, 再反过来验证确定压力模型。

3 结束语

综上所述, 高压对细胞形态、细胞膜壁、细胞内组分及微生物基因机制等均会产生影响, 这使其不仅可以应用到食品杀菌、保藏及某些加工过程, 而且在微生物菌种诱变方面具

有很大的应用潜力。虽然对食品进行高压处理具有低能量输入及保护小分子稳定性和最大限度保持食品原有生鲜风味与营养成分等优势, 但由于成本高且不易实现工业化, 相比之下高压诱变则更具应用价值。随着高压生物技术的不断发展, 相信高压作为一种新的诱变育种方法一定会具有广阔的应用前景。

参 考 文 献

- [1] Rikimaru H. High pressure in bioscience and biotechnology: pure science encompassed in pursuit of value. *Biochemical et Biophysical Acta*, 2002, **1595**: 397 – 399.
- [2] Bartlett D H. Pressure effects on in vivo microbial processes. *Biochemical et Biophysical Acta*, 2002, **1995**: 367 – 381.
- [3] Marie J, Corne P, Gervais P, et al. A new design intended to relate high pressure treatment to yeast cell mass transfer. *Journal of Biotechnology*, 1995, **41**: 95 – 98.
- [4] Abe F, Horikoshi K. Tryptophan permeates gene TAT2 confers high-pressure growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 2000, **20**: 8098 – 8102.
- [5] Adriana M H, Takako S, Chiaki K, et al. Effects of pressure on cell morphology and cell division of lactic acid bacteria. *Extremophiles*, 2003, **7**: 511 – 516.
- [6] Chilton P, Isaacs N S, Mackey B M. The effects of high hydrostatic pressure on bacteria. In: Heremans K. High Pressure Research in the Biosciences. Leuven: Leuven Univ Press, 1997, 225 – 228.
- [7] Gross M, Lehle K, Jaenicke R, et al. Pressure-induced dissociation of ribosomes and elongation cycle intermediates. Stabilizing conditions and identification of the most sensitive functional state. *Eur Biochem*, 1993, **218**: 463 – 468.
- [8] VanBogelen R A, Neidhardt F C. Ribosomes as sensors of heat and cold shock in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**: 5589 – 5593.
- [9] Chi E, Bartlett D H. Use of a reporter gene to follow high pressure signal transduction in the deep sea bacterium *Photobacterium* SS9. *Bacteriol*, 1993, **175**: 7533 – 7540.
- [10] Spilimbergo S, Elvassore N, Bertuccio A, et al. Microbial inactivation by high-pressure. *Journal of Supercritical Fluids*, 2002, **22**: 55 – 63.
- [11] Jaenicke R, Bernhardt G, Ludemann H D, et al. Pressure-induced alterations in the protein pattern of the thermophilic arches bacterium *Methanococcus thermolithotrophicus*. *Appl Environ Microbiol*, 1988, **54**: 2375 – 2380.
- [12] Allen E E, Facciotti D, Bartlett D H, et al. Monounsaturated but not polyunsaturated fatty acids are required for growth at high pressure and low temperature in the deep-sea bacterium *Photobacterium profundum* strain SS9. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**: 1710 – 1720.
- [13] Mackey B M, Forestiere K, Isaacs N S, et al. The effect of high hydrostatic pressure on *Salmonella thompson* and *Listeria monocytogenes* examined by electron microscopy. *Lett Appl Bacteriol*, 1994, **19**: 429 – 432.

- [14] Wouters P C, Glaasker E, Smelt J P P M, *et al.* Effects of high pressure on inactivation kinetics and events related to proton efflux in *Lactobacillus plantarum*. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**:509 – 514.
- [15] Bartlett D H, Kato C, Horikoshi K, *et al.* High pressure influences on gene and protein expression. *Res Microbiol*, 1995, **146**:697 – 706.
- [16] Jan P P M, Johan C, Patrick C, *et al.* Physiological and mathematical aspects in setting criteria for decontamination of foods by physical means. *International Journal of Food Microbiology*, 2002, **78**:57 – 77.
- [17] Węrzyn A, Wróbel B. Altered biological properties of cell membranes in *Escherichia coli* dnaA and seqA mutants. *Mol Gen Genet*, 1999, **261**:762 – 769.
- [18] Holmes V F, Cozzarelli N R. Closing the ring: links between SMC proteins and chromosome partitioning, condensation, and supercoiling. *Proc Natl Acad*, 2000, **156**:1322 – 1324.
- [19] Walker G C. The SOS response of *Escherichia coli*, In: Neidhardt F C, Curtiss R, Ingraham J L. *Escherichia coli*. and Salmonellacellular and molecular biology. 2nd ed. Washington D C: ASM Press. 1996, 1400-1416.
- [20] Kato C, Sato T, Smorawinska M, *et al.* High pressure conditions stimulate expression of chloramphenicol acetyltransferase regulated by the lac promoter in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*, 1994, **122**:91 – 96.
- [21] Sato T, Kato C. The effect on high pressure for gene expression by the lac and tac promoters in *Escherichia coli*. *Biotechnol*, 1995, **135**: 111 – 116.
- [22] Royer C A, Chakerian A E. Macromolecular binding equilibria in the lac repressot system: studies using high-pressure fluorescence spectroscopy. *Biochemistry*, 1990, **29**:4959 – 4966.
- [23] 柯 为.嗜极生物中的嗜高压生物. *生物工程学报*, 2002, **18** (4):515.
- [24] 高 翔,李 炯,阮康成.高压诱变的耐压大肠杆菌. *生物化学与生物物理学报*, 2001, **33**(1):77 – 81.
- [25] Silva J L, Luan P, Glaser M, *et al.* Effects of hydrostatic pressure on a membrane-enveloped virus: High immunogenic of the pressure-induced virus. *J Virol*, 1992, **66**:2111 – 2117.
- [26] 李桂双,白成科,段 俊等.静水高压处理对水稻植株生理特性的影响. *高压物理学报*, 2003, **17**(2):122 – 128.

Mutation effect of ultra high pressure on microbe

WANG Sui-lou^{1,2} WU Xiao-zong¹ HAO Li-hua¹ SUN Jun-she^{2*}

(¹ College of Food and Biology Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450002, China)

(² College of Food Science & Nutritional Engineering, China Agriculture University, Beijing 100083, China)

Abstract: (Ultra) high pressure had many influences on microbe. It could regulate the expression of gene and protein, influence DNA's structure and function as well as change cell morphology and cell component. These effects not only make (ultra) high pressure to be applied into food sterilization, conserving and some processing, but also indicate it would play an important role in mutagenic breeding of microbe. Pressure can change the structure and function of microbe, yet it is possible that (ultra) high pressure could induce mutation of microbe. Now the feasibility of (ultra) high pressure's mutation effect was discussed according to the effects of it on microbe, some examples and author's studying.

Key words: (Ultra) High pressure, Microbe, Mutation

Foundation item: National Natural Science Foundation of Henan Province (0411021900)

* Corresponding author. Tel 36-10-62329648 E-mail: sunjunshe@126.com

First author. Tel 36-371-63556064 E-mail: wangsuilou@zzuli.edu.cn

Received date 04-01-2005