超高压调节酶催化功能及其作用机制

江　波，李赟高，缪　铭，冯　骉
（江南大学 食品科学与技术国家重点实验室，江苏 无锡 214122）

摘要：在酶学领域中，超高压和温度类似，作为一种物理学方法，可以用来调节酶催化功能，促使酶的构象发生变化。对超高压调节酶催化功能的原理、影响酶构象的作用机制，以及一些新型研究方法等进行了综述。展望了此项新技术的发展前景。

关键词：超高压；酶催化；酶构象；分子机制；原位分析
中图分类号：Q67　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1673—1689(2015)06—0561—08

Effects of High Hydrostatic Pressure on Activity of Enzymes and the Mechanisms

JIANG Bo，LI Yungao，MIAO Ming，FENG Biao
(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The mechanisms of the catalytic activity regulations and the conformation changes of enzyme under high hydrostatic pressure were summarized in this paper. Different characterization of the behaviour of enzyme under high pressure was also reviewed. In enzymology, high hydrostatic pressure could be used to modulate the enzymatic activities and explore the conformational changes, which has attracted more and more attention. This review also discussed the future developments of this technique.

Keywords: high hydrostatic pressure, catalysis, conformation, mechanism, in-situ analysis

酶生物催化反应具有催化反应条件温和、高效专一等特点，在食品、医药等行业的应用越来越广泛[1]。按传统方法，一般可通过调节温度、pH、水分活度等来改善或者抑制酶催化反应过程。而随着生物技术的发展，现有大量文献报道了可直接在基因(DNA)水平上调控酶学性质。例如，Huang[2]等学者利用结晶的方法得到β-甘露糖聚酶晶体结构，并利用定点突变的方法，将216位上的酪氨酸突变成色氨酸，使其催化效率提高近18%。而Kundu等[3]将羰酸酯酶置于温度为300，343，373，473 K和500 K的条件下进行分子动力学模拟，研究发现，D232—K211，E105—K82，E54—K134，E238—R12以及E147—K134这5对离子键对其热稳定性起了至关重要的作用。这为今后利用突变的方法提高此酶

收稿日期：2014-11-03
基金项目：教育部高等学校博士学科点专项科研基金项目(2013博导类)
作者简介：江波(1962-)，男，江苏无锡人，工学博士，教授，博士研究生导师，主要从事酶学研究。E-mail: bjiang@jiangnan.edu.cn

的热稳定性指明了思路。Jun等[4]根据分子动力学模拟的结果，将谷氨酸脱羧酶B第5位的谷氨酰胺突变为天冬酰胺，使其变性温度提高了7.9 ℃，从而提高了其热稳定性，使其更有利于工业化生产。Trevizano等[5]利用定向进化的方法，使β-1,4木聚糖酶在60 ℃时半衰期从7.92 min提高至401 min。

然而，随着研究的深入，发现原本主要用于杀灭微生物的超高压技术亦可以用来调节酶催化反应，并具有洁净绿色、简单安全等特点，具有深远的研究前景和应用前景[6-7]。在较高的压力下，压力作用可以导致酶空间结构丧失或者亚基重新缔合聚集，使酶的活性丧失。例如，Riahi等[8]利用超高压技术使果汁中α-淀粉酶完全失活。除了钝化酶外，适中的压力处理却可以使酶活有所增大。Mozhaev等学者发现[7]，对于胰凝乳蛋白酶，在360 MPa时，其酶活可以提高将近30倍。和其他调节方法相比，高压处理不会影响酶的结合性质以及能量的变化，它仅仅使酶的体积发生了改变，影响因素比较单一，因此利用高压更有利于对酶催化机制进行研究和应用[9]。本文就超高压对酶催化功能及酶构象的影响及相关机制进行了介绍，并对这种新方法的应用和发展作了展望。

1 超高压对酶催化功能的调节

1.1 超高压对酶催化平衡常数及反应体积的影响

一般来说，压力对酶催化影响遵循Le Chatelier原则[10]。该理论认为，加压处理总是使反应朝着向体系总体积减少的方向移动。这个过程可以用方程(1)表示：

$$\left(\frac{\partial \ln K}{\partial p}\right)_T = -\frac{\Delta V}{RT} \quad (1)$$

在此方程中，K为此反应的平衡常数，ΔV为反应底物和产物之间的体积差。显而易见，如果压力处理使ΔV为负，即产物体系的总体积小于反应物体系的总体积，此时压力将迫使反应加速进行，K值增大；而如果ΔV为正，压力将阻止反应的进行和产物的生成，K值减少；而如果ΔV为零，压力对此反应无影响。M. E. Bruins等学者[11]详细研究了在0.1～500 MPa范围内，葡萄糖利用β-糖苷酶合成低聚糖的反应。研究发现，随着压力的升高，低聚糖合成量逐渐减少。当压力为500 MPa时，反应体系的ΔV为2.4 cm^3/mol，此时，整个已达到平衡的催化反应向反方向移动，即合成的低聚糖开始逐渐水解成葡萄糖。

对于酶催化反应体系来说，在高压下酶分子处于多个平衡状态之中。例如，亚基之间解离和缔合的平衡；结合底物和释放产物之间的平衡，以及酶分子之间的电离平衡、水合平衡等[12]。因此，在高压下测得的平衡常数不是由单一因素决定的，而是由一系列因素共同决定。所以在实验测ΔV时，必须要考虑这些共同因素的作用。一般来说，体系的总体积可由方程(2)表示[12]，即

$$V_i = \sum_i n_i V_i \quad (2)$$

式(2)中，V_i表示体系总体积，n_i表示分子数，V_i表示每部分偏摩尔体积。1959年，Kauzmann等学者[13]认为，溶于水中的蛋白质偏摩尔体积是由蛋白质中所有原子的范德华体积、蛋白质中存在的空洞的体积以及水合层的体积共同组成的。在一般情况下，压力处理时所有原子的范德华体积基本可以忽略不计，而空洞的体积在压力的作用下会减少，水合层的体积在压力的作用下会增大[12]。

1.2 超高压对酶催化动力学常数及活化体积的影响

根据过渡态理论，压力对反应速率的影响可以用Eyring方程表示[10]。式(3)中，R为理想气体常数，k为速率常数；ΔV^*为活化体积，它定义为反应物与处于过渡态物质的体积差。

$$\left(\frac{\partial \ln k}{\partial p}\right)_T = -\frac{\Delta V^*}{RT} \quad (3)$$

如果活化体积为负值，压力升高有利于提高酶催化反应速度；而如果活化体积大于零，压力增大将降低酶催化反应速度。在一个已达到反应平衡的酶催化反应过程中，包含着一系列的步骤，包括底物的结合、产物的释放、酶构象的变化等。其中，最慢的反应步骤决定了整个酶催化的反应速率，而超高压处理却能改变其关键的限速步骤，这导致压力和酶反应速率之间产生了某种关联[10]。在一般情况下，酶催化速率的改变主要因超高压处理导致酶构象变化引起，此时反应速率和压力呈非线性相关[10]。在高压下，活化体积并不是一个固定的常数，而大体在-70～60 cm^3/mol之间[14]。Mozhaev等[7]报道了α-胰凝乳蛋白酶在0.1～150 MPa范围内，50 ℃的活化体积为-25 cm^3/mol，此时酶活可提高近3倍；对于甘油醛-3-P-脱氢酶，其活化体积可达-56 cm^3/mol，

磷酸核酮糖激酶活化体积-36 cm^3/mol。此时，这两种酶酶活均有所增加。然而，对于核酮糖-1,5-二磷酸-羧酶，其活化体积为34 cm^3/mol，此时酶经过高压处理后，活性显著降低[15-17]。

1.3 超高压对酶失活及其动力学的影响

由大量实验可知，较高的压力可以使酶丧失活性。例如，Balogh等[18]将胡萝卜中果胶甲酯酶在10 ℃，800 MPa条件下处理36 min，可以使其活性减少90%。Riahi等[8]使用400 MPa的压力处理α-淀粉酶60 min，可以使其完全失活。压力处理使酶失活过程中存在3种状态，可由如下表达式表示，即天然状态(N)，中间状态(I)以及失活状态(D)。

$$N \xrightarrow{k_{rev}} I \xrightarrow{k_{ire}} D$$

由于在较高压力下，酶不可逆失活速率常数(k_{rev})远大于可逆失活速率常数(k_{ire})，故酶在高压下失活存在的中间态可以忽略不计，因此以上表达式可简写为

$$N \xrightarrow{k} D$$

此时，酶失活遵循一级动力学方程，酶活随着时间变化可由公式(4)描述，式(4)中A表示高压处理时间t后的酶活，A_0表示初始酶活。

$$A = A_0 \exp(-k \cdot t) \tag{4}$$

然而，在研究超高压钝酶动力学过程中发现，超高压处理使酶失活不仅与压力本身大小相关，且还与温度相关。酶失活速率、压力和温度的关系可以用p—T二元相图来表示，如图1所示。

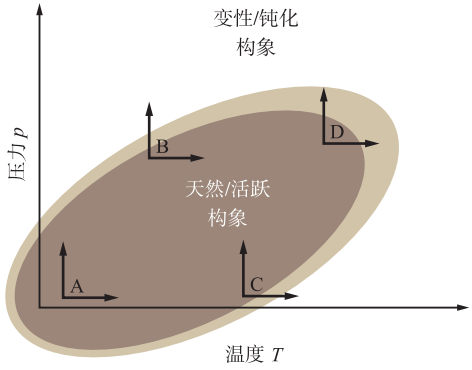


图1 p—T二元相图

Fig.1 p—T phase diagram

从图1可以看出，此二元相图呈椭圆形，当温度和压力数值都处于椭圆内部时，酶仍保持天然状态。而当压力和温度都超过临界值时，就会使酶失活(区域D)。而在区域C，当压力升高时，如要使酶失活，需要升高温度，这意味着在此区域，压力和温度存在着拮抗效应，即提升压力使酶热稳定性大幅度提高。Degraeve等研究发现[19]，在0.1 MPa，55 ℃处理30 min后，β-半乳糖苷酶酶活损失了35%，而在250 MPa，其他条件不变的情况下，酶活仅损失10%；但是当压力升至350 MPa时，此时较高的压力对酶热失活已无保护作用。

2 超高压对酶构象的影响

一般认为，经超高压处理后，酶分子内肽键并不会发生断裂，即酶一级结构不会发生变化，但是酶分子的二级、三级及四级结构都会受到压力的影响。研究发现，在较低压力下，α螺旋和β折叠不会被压缩，甚至更加稳定；但是在较高压力下，如500 MPa以上时，二级结构会发生不可逆变化[20-21]。经高压处理后，二级结构的基本类型还可能发生转换。Liu等[22]发现多酚氧化酶经高压处理后其α螺旋含量大幅度降低，而β折叠含量显著增长，并且随着压力的增长此现象更加明显。不仅如此，二级结构的变化并不是一步完成的。以溶菌酶为例，紫外荧光实验可以揭示此不可逆变化分为两个过程，这种现象被解释为压力变性形式的多元性。然而，Samarasinghe等人[23]认为，溶菌酶在压力诱导过程中，由于水作为溶剂存在，蛋白质和水之间的相互作用代替了原先蛋白氨基酸残基之间的弱的非共价键，导致了蛋白质三级结构失稳，并且这才是酶失活的主要原因，而二级结构之间的氢键没有发生变化。此时，压力诱导失稳的蛋白质更加类似于球状[24]。而高压对于酶的四级结构的影响要复杂得多。在高压下，单体既可以趋向于聚集，也可以趋向于解离。Sliver等人发现[25]，在较低的压力下，蛋白质会解离成亚基。但如果压力增加到140 MPa以上，这些亚基又可以形成无定形的聚集体，但是某些功能性质却丧失了。他们解释这种现象为“构象漂移原理”。在展开到再折叠的过程中，亚基还可以不断地组装，最后形成很稳定的纤维聚集体。压力对整个蛋白质构象变化的影响可以用图2描述[25-26]。

经高压处理后，并非只有一种构象发生变化，可能会有几种构象同时发生变化。例如三级结构和四级结构同时改变，甚至二级、三级、四级结构同

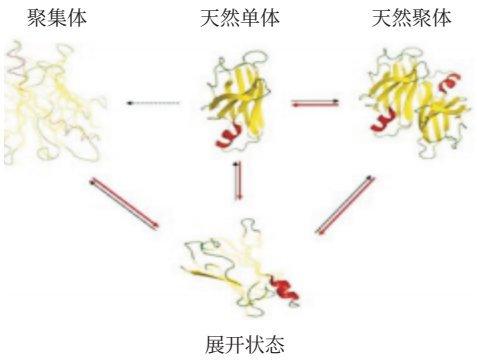


图2　高压对酶蛋白质构象的影响

Fig.2　Effects of high pressure on the conformation of the protein

时发生改变。不仅如此，Ohmae等研究发现[27]，在高压条件下，酶的辅助因子与酶的结合也会发生改变，辅助因子非常容易游离出来，从而导致酶失活。

3 超高压作用分子机制

压力同温度相似，都是影响体系自由能的一个参数。高压并不能使肽键断裂，即如同前文所述，它并不能使酶的一级结构破坏，也不能改变活性部位氨基酸种类、顺序及数量。但是压力却对于氨基酸之间、氨基酸和溶剂之间的氢键、静电相互作用和疏水相互作用有着重要的影响。

3.1　静电相互作用

静电相互作用最明显的特征在于它可以反映整个反应体系的体积变化，并且绝大多数溶液体积的变化来自于离子键被破坏。当溶液中存在离子时，附近的水偶极子由于静电作用将会被高度压缩，使得整个溶液体积减少，这种现象被称为电致伸缩性。并且在非极性溶液中，这种现象更为明显[28]。一个典型的例子是胰凝乳蛋白酶[29]。在超高压作用下，其活性部位的离子键消失，但是这种变化是可逆的，一旦撤去压力，这些离子键会得到部分恢复。

静电相互作用在保持蛋白质结构稳定性上起着重要的作用。在常压条件下，调节 pH 值可以使活性部位的离子键遭到破坏，从而使酶的构象发生变化，导致酶失活。因此，可以利用超高压技术，使得活性部位的氨基酸在没有发生离子化的情况下，它们之间的离子键被压力破坏，从而改变酶活。在超高压处理过程中，选用合适的缓冲体系显得至关重要，因为在相同的 pH 下，不同的缓冲盐种类影响着酶活性部位的电离平衡。不仅如此，在高压条件下，不同的缓冲盐种类还会影响溶液体积。例如，磷酸盐具有高离子化体积，而Tris-HCl溶液离子化体积却为零[30]。

3.2　氢键

经研究发现，高压能够稳定氢键，这是由于高压压缩了酶分子的空间结构，使得各原子之间间距减少。同时，在形成氢键或者使氢键稳定时，溶液体积变化为负值，但是这个值很小，接近于可以忽略的水平。但是在压力处理过程中，高压是否会使溶剂和溶质之间的氢键发生交换，目前尚有争论[30-31]。

3.3　疏水相互作用

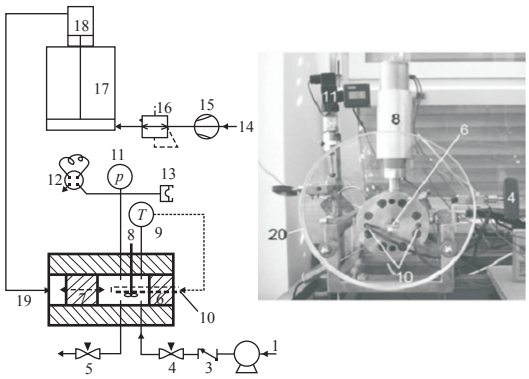
在亲水介质中，蛋白质总是倾向于把疏水残基埋藏在分子内部，亲水残基暴露在蛋白质表面，这一现象在稳定蛋白质结构中起了重要作用。经研究发现，较高压力处理可以使疏水相互作用减弱。然而，另一方面，对于芳香族基团，经高压处理后，这些基团之间的疏水相互作用却增强了，整个结构趋向于稳定[30]。

现在还没有明确的证据证明在高压处理过程中，哪一种非共价键变化占主要地位。总之，高压处理是一个复杂的物理化学变化，可能上述非共价键变化兼而有之；也有可能是其中一种占主导地位，其余变化影响可以忽略不计。这可能是酶本身氨基酸构成、排列方式、空间构象与环境介质种类，以及浓度综合作用的结果。

4 用于超高压处理及分析结果的新方法

4.1　快速动力学方法

在大多数情况下，酶反应速率很快，通常在微秒级别酶分子催化反应就已经完成。为了更好地研究酶分子催化机制，减少反应时间，可以降低反应温度，使中间态更加稳定，从而能够“捕获”中间态过程。在此过程中还需要加入抗冻剂，如甘油、蔗糖等。另外一种方法是快速混合技术，这种方法需要特殊的停留装置（图3）[32]。这种装置主要配有一个样品传输高压泵（部件2），它能够使反应物直接在高压状态下传送至反应容器中和另一个反应物快速混合，5 ms之内就可以使反应物在200 MPa压力下进行反应，从而减少了由于实验操作而带来的固有时间[33]。



注：1 样品；2 高压泵；3 单向阀；4，5 针阀；6 蓝宝石窗（固定）；7 可移动蓝宝石窗；8 机械搅拌；9 温度指示剂调节控制器；10 加热丝；11 压力指示表；12 进样器；13 安全膜；14 空气；15 压缩机；16 压缩空气调节器；17 液压油系统；18 液压油；19 压力调节器；20 安全模块

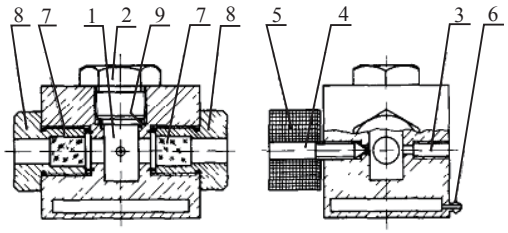
图3　高压停留装置

Fig.3　High pressure stopped-flow apparatus

这种装置现已普遍用于研究高压下酶催化反应[34-35]，例如，Kornblatt 等[34]利用此装置获得了酵母烯醇酶在高压下的失活动力学参数；而 Balny 等[35]利用此装置更方便、更精确地得到了在极高压力和低温等极端条件下酶催化反应的参数。

4.2　原位在线检测

目前，很多研究采用紫外吸收光谱、荧光光谱以及红外光谱等来表征超高压下酶或者蛋白质的构象变化。但是由于压力处理酶蛋白质，有时可能会存在可逆性回复等情况，因此现在大多使用原位在线检测光谱技术，来实现实时观测高压状态下酶蛋白质构象的变化。这种原位检测装置最大的特点是，直接在高压反应釜上装有光学视窗，然后和光谱仪偶联，以实现直接观测的目的。示意装置如图4所示[36]。



注：1 反应容器；2 盖子；3 连接高压部件；4 磁芯；5 可移动螺纹管；6 温控装置；7 石英窗；8 窗体紧固装置；9 聚四氟乙烯密封垫片

图4　可与光谱偶联的高压装置示意图

Fig.4　High pressure optical bomb

目前，高压-紫外光谱、高压-荧光光谱、高压-红外光谱在表征酶蛋白质构象在高压下的变化方面应用较多。John 等学者[37]利用高压-紫外光谱研究了溶菌酶在高压下聚合的情况。他们分析了高压下其二阶导数吸收光谱，发现溶菌酶中的酪氨酸在高压的作用下更趋向于疏水环境，从而能更直观地分析其在高压下聚合的原因。而四阶导数紫外吸收光谱则被认为可以用来分析高压处理过程中酶蛋白质色氨酸微环境的变化，从而推测高压对其三级结构的影响[33]。此外，Ruan 等[38-39]利用高压-荧光光谱技术分析了胰蛋白酶、磷脂酶等在高压下构象的变化，亦取得了良好的效果。Degraeve 等[40]利用高压-红外光谱技术分析了β-半乳糖苷酶在高温高压下构象的变化后发现，高压处理能够阻止酶构象被高温破坏，温度和压力具有拮抗作用。利用高压-红外技术分析溶菌酶聚合现象也已有报道[37]。除此之外，也有一些文献报道了利用高压和动态光散射、高压和核磁共振偶联，分析高压下酶构象变化并取得了较好的结果[41-42]。

4.3　分子动力学模拟

分子动力学方法具有快速、简便、精确等特点，目前已经是研究生物分子的主要手段和工具之一，也是对实验手段的有力补充[43]。使用分子动力学模拟可以从理论方面探索酶分子在各种条件如温度、pH、压力等条件下构象及功能的变化，并且这类方法不需要任何的高精密仪器，从而突破了某些实验条件的限制。一个典型的例子是 McCarthy 等[44]使用分子动力学模拟的方法，对比了溶菌酶在天然状态及在 100 MPa 和 300 MPa 下构象的变化。模拟结果表明，在高压状态下，溶菌酶空间结构受到压力作用而收缩，整个结构更加致密，并且在此状态下随着压力的升高疏水相互作用减弱。整个模拟结果和实验结果十分吻合[44]。此外，高压对氨基酸残基的迁移、压缩、水合等作用及其机制，也是研究的重点和热点[45-47]。

5　展　望

超高压技术发展十分迅速，除了能够使用它研究酶的催化功能以及构象的变化外，还可以用它进行酶结晶[48]。研究发现，在高压条件下，溶菌酶在饱和溶液中其溶解性下降，这有利于晶种的析出和晶体的形成。因此，在此条件下结晶所花费的时间可

以大大缩短，并且此方法还有方便、简单等特点[48-50]。

然而，目前在国内，利用超高压技术对酶的研究起步较晚、相对滞后，且仅集中于在高压钝酶方面的应用。因此，需要进一步拓展和加深超高压技术的研究和应用，尤其是在超高压改善酶催化速率、高压下酶分子结构-功能关系模型建立、高压下酶结晶等方面。随着对此项技术研究的深入，将会进一步推动酶学及其相关领域的研究和发展。

参考文献：

[1] Adamczak M, Krishna S H.Strategies for improving enzymes for efficient biocatalysis [J]. **Food Technology and Biotechnology**, 2004, 42(4): 251-264.

[2] Huang J W, Chen C C, Huang C H, et al.Improving the specific activity of β-mannanase from Aspergillusniger BK01 by structure-based rational design [J].**BiochimicaetBiophysicaActa (BBA) - Proteins and Proteomics**, 2014, 1844 (3):663-669.

[3] Sangeeta K, Debjani R. Structural study of carboxylesterase from hyperthermophilic bacteria Geobacillusstearothermophilus by molecular dynamics simulation [J]. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, 2010,28 (8):820-827.

[4] Jun C, Joo J C, Lee J H, et al.Thermostabilization of glutamate decarboxylase B from Escherichia coli by structure-guided design of its pH-responsive N-terminal interdomain [J]. **Journal of Biotechnology**, 2014, 174 (20): 22-28.

[5] Trevizano L M, Ventorim R Z, Rezende S T, et al. Thermostability improvement of Orpinomyces sp xylanase by directed evolution [J]. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2012, 81: 12-18.

[6] Hayman M M, Kouassi G K, Anantheswaran R C, et al. Effect of water activity on inactivation of Listeria monocytogenes and lactate dehydrogenase during high pressure processing[J]. **International Journal of Food Microbiology**, 2008, 124(1):21-26.

[7] Mozhaev V V, Lange R, Kudryashova E V, et al. Application of high hydrostatic pressure for increasing activity and stability of enzymes[J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 1996, 52:320-332.

[8] Riahi E, Ramaswamy H S. High pressure inactivation kinetics of amylase in apple juice[J]. **Journal of Food Engineering**, 2004, 64 (2):151-160.

[9] Silva J L, Fogue l D, Royer C A. Pressure provides new insights into protein folding, dynamics and structure[J]. **Trends in Biochemical Sciences**, 2001, 26(10): 612-618.

[10] Eisenmenger M J, Reyes- De- Corcuera J I. High pressure enhancement of enzymes: A review[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2009, 45 (5): 331-347.

[11] Bruins M E, Janssen A E M, Boom R M. Equilibrium shifts in enzyme reactions at high pressure[J]. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, 2006, 39: 124-127.

[12] Ohmae E, Murakami C, Gekko K, et al. Pressure effects on enzyme functions[J]. **J Biol Macromol**,2007(7): 23-29.

[13] Kauzmann W. Some factors in the interpretation of protein denaturation [J]. **Adv Protein Chem**, 1959, 14: 61-63.

[14] Michels P C, Clark D S. Pressure-dependence of enzyme catalysis [J]. **ACS Symp Ser**, 1992, 498:108 - 121.

[15] PratGay G, Paladini A, Stein J M, et al. The effect of high hydrostatic pressure on the modulation of regulatory enzymes from Spinach Chloroplast[J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 1991, 266 (5): 9.

[16] Jaenicke R, Schmid D, Knof S. Monodispersity and quaternary structure of glyceraldehyde 3- phosphate dehydrogenase[J]. **Biochemistry**, 1968, 7(3): 919-926.

[17] Miziorko H M, Lorimer G H. Ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase-oxygenase[J]. **Annual Review of Biochemistry**, 1983, 52 (1): 507-535.

[18] Balogh T, Smout C, Nguyen B L, et al.Thermal and high-pressure inactivation kinetics of carrot pectinmethylesterase: from model system to real foods[J]. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**,2004, 5 (4): 429-436.

[19] Degraeve P, Lemay P. High pressure-induced modulation of the activity and stability of Escherichia coli (lac Z) β-galactosidase-Potential applications[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 1997, 20: 550-558.

[20] 江波, 缪铭.高静压加工优化食品酶催化体系现状与趋势[J]. 中国食品学报, 2011, 9 (11): 93-97.
JIANG Bo, MIAO Ming. Catalytic system of food enzyme under hydrostatic high pressure: Status and trends [J]. **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology**, 2011, 9 (11):93-97.(in Chinese)

[21] Li T M, Hook J M, Drickamer H G, et al.Plurality of pressure-denatured forms in chymotrypsinogen and lysozyme[J]. **Biochemistry**, 1976, 15: 5571-5580.

[22] Liu W, Liu J H, Liu C M, et al. Activation and conformational changes of mushroom polyphenoloxidase by high pressure microfluidization treatment [J]. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 2009(10):142-147.

[23] Samarasinghe S, Cambell D M, Jonas A, et al. High-resolution NMR study of the pressure-induced unfolding of lysozyme [J]. **Biochemistry**, 1992, 31:7773-7778.

[24] Silva J L, Weber G. Pressure stability of proteins [J]. **Annual Review of Physical Chemistry**, 1993, 44:89-113.

[25] Sliver J L, Weber G. Pressure induced dissociation of brome mosaic virus[J]. **Journal of Molecular Biology**, 1988, 199:149-159.

[26] Aertsen A, Meersman F, Hendrickx M, et al.Biotechnology under high pressure: applications and implications [J]. **Trends in Biotechnology**, 2009,27(7):434-441.

[27] Ohmae E, Tatsuta M, Abe F, et al. Effects of pressure on enzyme function of Escherichia coli dihydrofolate reductase[J]. **Biochimicaet Biophysica Acta**, 2008:1115-2001.

[28] 张守勤.超高压生物技术及其应用[M].北京:科学出版社, 2012:1-128.

[29] Bang W, Chung H. Effect of high hydrostatic pressure on the enzyme activities in Saccharomycescerevisiae and Escherichia coli [J]. **New Biotechnology**, 2010, 27(4):440-444.

[30] Mozhaev V V, Heremans K, Frank J, et al. High pressure effects on protein structure[J]. **Proteins: Structure, Function, and Genetics**, 1996, 24: 81-92.

[31] Melinda M Hayman, Gilles K Kouassi. Effect of water activity on inactivation of Listeria monocytogenes and lactate dehydrogenase during high pressure processing [J]. **International Journal of Food Microbiology**, 2008, 124:21-26.

[32] Thorey P, Knez Ž, Habulin M. Alcohol dehydrogenase in non-aqueous media using high-pressure technologies: Reaction set-up and deactivation determination[J]. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 2010, 85 (7): 1011-1016.

[33] Lullien-Pellerin V, Balny C. High-pressure as a tool to study some proteins' properties_conformational modification, activity and oligomeric dissociation[J]. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 2002(3): 209-221.

[34] Kornblatt M J, Lange, R, Balny C. Can monomers ofyeast enolase have enzymatic activity [J]. **European Journal of Biochemistry**, 1998, 251:775 - 780.

[35] Taniguchi Y, Stanley H E, Ludwig H. Biological systems under extreme conditions [M]. Berlin: Springer, 2001: 167 - 186.

[36] Chernyak V Y, Drachev V A, Nikolaeva N G, et al.High-pressure enzyme kinetics Lactate dehydrogenase in an optical cell that allows a reaction to be started under high pressure[J]. **Febs Journal**, 1984, 169 (1): 4-6.

[37] John R J S, Carpenter J F, Randolph T W. High- pressure refolding of disulfide- cross- linked lysozyme aggregates: Thermodynamics and optimization[J]. **Biotechnology Progress**, 2008, 18 (3): 565-571.

[38] Ruan K, Lange R, Zhou Y, et al. Unusual effect of high hydrostatic pressure on basic phospholipase A2 from Venom of Agkistrodon Halys Pallas [J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 1998, 249:844-848.

[39] Ruan K, Lange R, Bec N, et al. A stable partly denatured state of trypsin induced by high hydrostatic pressure[J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 1997,239: 150-154.

[40] Degraeve P, Rubens P, Lemay P, et al. In situ observation of pressure-induced increased thermostability of two β-galactosidases with FT-IR spectroscopy in the diamond anvil cell[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2002, 31 (5): 673-684.

[41] Kirsch C, Dahms J, Kostko A F, et al. Pressure assisted stabilization of biocatalysts at elevated temperatures: Characterization by dynamic light scattering[J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 2013, 110(6): 1674-1680.

[42] Jonas J, Jonas A. High- pressure NMR spectroscopy of proteins and membranes[J]. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, 1994, 23(1): 287-318.

[43] Hansson T, Oostenbrink C, Gunsteren W F V. Molecular dynamics simulations[J]. **Current Opinion in Structural Biology**, 2002 (12):190-196.

[44] Mc Carthy A N, Grigera J R. Effect of pressure on the conformation of proteins. A molecular dynamics simulation of lysozyme[J]. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, 2006, 24 (4): 254-261.

[45] Wroblowski B, Diaz J F, Heremans K, et al. Molecular mechanisms of pressure induced conformational changes in BPTI[J]. **Proteins: Structure, Function, and Genetics**, 1996, 25: 446-455.

[46] Canalia M, Malliavin T E, Kremer W, et al. Molecular dynamics simulations of HPr under hydrostatic pressure[J]. **Biopolymers**, 2004, 74(5): 377-388.

[47] Kitchen D B, Reed L H, Levy R M. Molecular dynamics simulation of solvated protein at high pressure[J]. **Biochemistry**, 1992, 31: 10083-10093.

[48] Suzuki Y, Sazaki G, Miyashita S, et al. Protein crystallization under high pressure[J]. **Biochimicaet Biophysica Acta**, 2002, 1595: 12-14

[49] Sazaki G, Nagatoshi Y, Suzuki Y, et al. Solubility of tetragonal and orthorhombic lysozyme crystals under high pressure[J]. **Journal of Crystal Growth**, 1999, 196(2): 204-209.

[50] Suzuki Y, Miyashita S, Sazaki G, et al. Effects of pressure on growth kinetics of tetragonal lysozyme crystals[J]. **Journal of Crystal Growth**, 2000, 208(1): 638-644.

会　议　信　息

会议名称(中文): 第十七届中国农业生态与生态农业研讨会

开始日期: 2015-07-24　　结束日期: 2015-07-27

所在城市: 云南省　昆明市　　具体地点:昆明市云安会都

主办单位:中国生态学学会农业生态专业委员会　　承办单位:云南农业大学

联系人:李成云　　联系电话: 13708705575

E-MAIL: licheng_yun@163.com

会议网站: http://www.esc.org.cn/n12785215/n12785472/16345492.html

会议背景介绍: 第十七届中国农业生态与生态农业研讨会定于2015年7月24日至7月27日在云南省昆明市云安会都召开。大会将邀请长期从事农业生态研究与实践工作的中国工程院院士、国内外知名专家、学者、农业企业、农业部领导和基层农民等对近年来国内外农业生态学领域的最新研究成果进行交流,了解农业生态学科研究最新动态,探讨全球变化下农业生态学面临的新问题与最新研究方法,促进国内外农业生态学专家、学者交流与合作,为提高我国农业生态学研究水平及学科建设服务。本次大会由中国生态学学会农业生态专业委员会主办,云南农业大学承办。

会议名称(中文):第七届高等学校实验动物科学技术交流论坛

会议名称(英文):

所属学科: 生物物理学、生物化学及分子生物学,细胞生物学,遗传与发育生物学

开始日期: 2015-07-20　　结束日期: 2015-07-23

所在国家: 中华人民共和国　　所在城市: 黑龙江省　齐齐哈尔市

主办单位: 辽宁省实验动物学会、吉林省实验动物学会、黑龙江省实验动物学会、黑龙江省科学技术协会

承办单位: 齐齐哈尔医学院、中国农业科学院哈尔滨兽医研究所

联系人: 何宝国 15663167685 司昌德 13936673508

E-MAIL: dgb2018@163.com　　会议网站: http://www.lascn.net/Item/13516.aspx

会议背景介绍: 为加强高等学校、科研院所间实验动物科技工作的交流,第七届高等学校实验动物科学技术交流论坛定于2015年7月20-23日在黑龙江省齐齐哈尔市召开。会议由辽宁省实验动物学会、吉林省实验动物学会、黑龙江省实验动物学会、黑龙江省科学技术协会主办,齐齐哈尔医学院、中国农业科学院哈尔滨兽医研究所承办。

会议内容

1、研讨实验动物科学发展的现状、进展及前景,高等学校、科研院所间实验动物科学技术研究与交流。

2、围绕在实验动物法制化管理、实验动物和动物实验质量控制、模式动物研究、实验动物支撑体系建设等工作中取得的新技术、新方法、新成果、新经验展开交流与讨论。

3、围绕“十三五”实验动物发展战略展开研讨。