

Zastosowanie wysokiego ciśnienia w technologii żywności i medycynie

*Agnieszka Wandel*¹

*Izabela Gensler*¹

*Sylwester Porowski*²

*Janusz Jurczak*³

Jan Barciszewski^{1,2}

¹Instytut Chemii Bioorganicznej
Polska Akademia Nauk
Poznań

²Centrum Badań Wysokociśnieniowych
Polska Akademia Nauk
Warszawa

³Instytut Chemii Organicznej
Polska Akademia Nauk
Warszawa

1. Wstęp

Pierwsze doniesienia o wykorzystaniu wysokiego ciśnienia w przemyśle spożywczym pojawiły się pod koniec XIX w., kiedy to podjęto próby ciśnieniowej sterylizacji mleka. Metodę tę jednak szerzej zaczęto stosować dopiero w latach osiemdziesiątych naszego stulecia. Potwierdzono negatywny wpływ wysokiego ciśnienia na mikroorganizmy i na tej podstawie podjęto różnorodne próby wykorzystania tej techniki do konserwacji żywności. Obecnie na rynku znajdują się pierwsze produkty sterylizowane wysokim ciśnieniem. Technika wysokociśnieniowa pozwala zachować produktom żywnościowym naturalny smak, kolor oraz niezmienną zawartość witamin, ale mechanizm działania ciśnienia nie jest znany.

W artykule tym przedstawimy niektóre zastosowania wysokiego ciśnienia w procesie utrwalania żywności i medycynie. Poprzedzone one będą krótkim omówieniem fizykochemicznych podstaw wpływu ciśnienia na podstawowe składniki komórki.

2. Wpływ ciśnienia na podstawowe składniki komórki

Ciśnieniem nazywamy wielkość fizyczną będącą ilorazem wartości siły działającej prostopadle do wycinka powierzchni ograniczającej dane ciało.

Wysokie ciśnienie jest parametrem fizycznym wpływającym na przebieg reakcji bądź też na właściwości substratów.

Wpływ ciśnienia na cząsteczki biologiczne opisują dwie prawidłowości:

1) prawo Le Chateliera wskazujące, że system będący w równowadze dąży do ograniczenia wpływu zaburzającego czynnika zewnętrznego,

2) zasada mikroskopowego uporządkowania wskazuje, że zwiększenie ciśnienia przy stałej temperaturze prowadzi do uporządkowania cząsteczek czyli obniżenia entropii układu.

Z drugiej prawidłowości wynika, że temperatura i ciśnienie działają przeciwstawnie. Zazwyczaj temperatura topnienia ciała stałego rośnie wraz ze wzrostem ciśnienia (1). Znaczącym wyjątkiem od tej zasady jest zachowanie wody, której temperatura topnienia obniża się ze wzrostem ciśnienia. W zakresie ciśnień do 200 MPa* oraz w temperaturach do -20°C woda znajduje się w stanie ciekłym. W związku z tym szybka dekompresja powoduje gwałtowne zamrażanie substancji biologicznych (1).

Wpływ ciśnienia i temperatury na cząsteczki biologiczne jest różny. Wysoka temperatura w przeciwieństwie do ciśnienia powoduje denaturację białek strukturalnych i enzymatycznych głównie na skutek dysocjacji wiązań kowalencyjnych. Ciśnieniowa denaturacja peptydów zasadniczo nie powoduje hydrolizy wiązań peptydowych (2).

3. Wpływ wysokiego ciśnienia na białka

Struktura przestrzenna białek w roztworze jest zdeterminowana przez sekwencję (struktura pierwszorzędowa) aminokwasów oraz ich oddziaływanie z rozpuszczalnikiem (3). W związku z tym występowanie określonej konformacji uzależnione jest od warunków środowiska (temperatura, ciśnienie, pH, rodzaj rozpuszczalnika) (4).

Oddziaływania hydrofobowe, odgrywające decydującą rolę w utrzymywaniu czwartorzędowej struktury białek, są wrażliwe na działanie wysokiego ciśnienia (4). Polipeptydy przy ciśnieniach poniżej 150 MPa ulegają często degradacji, której towarzyszy zmniejszenie objętości nawet do $500\text{ ml} \times \text{mol}^{-1}$ (4). Jednak wiele struktur czwartorzędowych białek jest niewrażliwych na działanie wysokiego ciśnienia albo zachodzi agregacja podjednostek po ich uprzedniej dysocjacji. Przy ciśnieniach powyżej 200 MPa, zmiany struktury trzeciorzędowej białek mogą mieć charakter odwracalny. Proces ten zależy

*Jednostką ciśnienia jest Pascal. Ciśnienie jest równe 1 Pascal (Pa), gdy na płaszczyznę o polu 1 metra kwadratowego (m^2) działa prostopadle siła 1 Newtona. Ciśnienie wyrażane jest niekiedy w innych jednostkach, które pozostają w następujących zależnościach: $1\text{ Pa} = 10^{-5}\text{ Bar} = 0,986923 \times 10^{-5}\text{ atm} = 0,101972\text{ kG/m}^2$ 1 MPa = 10^6 Pa , 1 GPa = 10^9 Pa .

od szybkości kompresji (4). Zmiany struktury drugorzędowej zachodzące przy bardzo wysokich ciśnieniach są nieodwracalne. Ich szybkość zależy od obecności koenzymów lub ligandów stabilizujących enzymy (4). Nie zawsze denaturacja ciśnieniowa powoduje wzrost objętości (5). Stwierdzono, że niekiedy ciśnienie prowadzi do spadku objętości na skutek elektrostrykcji, czyli ekspozycji większej ilości grup jonowych białka, których solwatacja powoduje skrócenie odległości międzycząsteczkowych, a w konsekwencji zmniejszenie objętości (5).

Niektóre białka, na przykład cholinoesteraza, przy ciśnieniach poniżej 150 MPa tworzą formę przejściową (ang. *molten globule state*), w której zniszczone zostały oddziaływania hydrofobowe, ale nie wiązania jonowe (6). Po odjęciu ciśnienia, struktura białka może powrócić do formy natywnej (6).

W proteolizie, która zaszła pod ciśnieniem 200 MPa wykazano, że rozpad białek zależy od ich budowy. Kazeina i białka soi ulegały proteolizie niezależnie od wielkości zastosowanego ciśnienia. Natomiast białka tetrameryczne, takie jak dehydrogenaza alkoholowa, hemoglobina, a także monomeryczne białko β -laktoglobulina, przy takim ciśnieniu ulegały rozpadowi. Białka globularne zawierające wiązania dwusiarczkowe (rybonukleaza A, lizozym, α -laktoglobulina) ulegały denaturacji dopiero przy ciśnieniu 700-800 MPa (7).

4. Wpływ wysokiego ciśnienia na kwasy nukleinowe

Znane są trzy główne formy strukturalne kwasów nukleinowych: A, B i Z. DNA najczęściej występuje w konformacji B, natomiast RNA w konformacji A (8). Lewoskrętną formę Z tworzą sekwencje składające się z kolejno po sobie następujących puryn i pirymidyn, znajdujące się w wysokim stężeniu soli (4 M NaCl) lub etanolu (70%) (9).

Przy ciśnieniu 600 MPa w ciągu 18 godzin, indukowane jest przejście konformacyjne polimeru poli- (dGdC) \times poli (dGdC) z prawoskrętnej formy B do lewoskrętnej formy Z (10). Metodą pomiaru przejść konformacyjnych była spektroskopia dichroizmu kołowego (CD). Obserwowano ujemny efekt Cottona przy 295 nm charakterystyczny dla konformacji Z-DNA. Efekt ten jest całkowicie odwracalny po 5 godzinach w temperaturze pokojowej przy ciśnieniu atmosferycznym (10). W przypadku RNA, do wywołania przejścia konformacyjnego A \rightarrow Z oprócz ciśnienia (600 MPa) konieczna jest obecność wysokiego stężenia soli (5M NaCl). W widmie dichroizmu kołowego obserwuje się wówczas dodatni efekt Cottona przy 295 nm, charakterystyczny dla Z-RNA (11). Kompleksy RNA-DNA nie tworzą konformacji Z pod wpływem ciśnienia (12).

Cząsteczka tRNA poddana działaniu ciśnienia (600 MPa) w obecności aminokwasu (fenyloalaniny) ulega reakcji aminoacylacji bez udziału syntetazy aminoacylo-tRNA i ATP (13). Mechanizm tej reakcji nie jest znany. Reakcja aminoacylacji może przebiegać bez udziału ATP (13). Prawdopodobnie podczas tej reakcji zmienia się konformacja ramienia aminokwasowego tRNA, co pozwala na związanie specyficznego aminokwasu przy końcowej adeno-

zynie (13). Wykorzystując test biosyntezy białka *in vitro* pokazano, że produkt ciśnieniowej aminoacylacji jest biologicznie aktywny (14).

Zaproponowano hipotezę wskazującą, że głównym czynnikiem powodującym przejście konformacyjne kwasów nukleinowych jest zmiana hydratacji. W przeprowadzonej analizie struktury krystalograficznej oligodeoksyrybonukleotydów wykazano, że w formie B każda grupa fosforanowa w łańcuchu fosfocukrowym jest hydratowana przez cząsteczki wody, podczas gdy w formach A i Z odległości między atomami tlenu grup fosforanowych są krótsze i cząsteczki wody tworzą mostek między dwoma sąsiednimi grupami fosforanowymi (8). Grupa 2'-hydroksylowa rybozy zaangażowana jest w tworzenie sieci wiązań wodorowych, co dodatkowo stabilizuje strukturę RNA. Wysokie ciśnienie zmienia zarówno objętość molową kwasu nukleinowego, jak i otaczającej go wody. Ostatnio przedstawiono model struktury wody, według którego cząsteczki występują w formie tetrameru lub oktameru (15). Jeden mol wody w formie tetramerycznej zajmuje objętość 17 cm^3 , podczas gdy w formie oktamerycznej $16,6 \text{ cm}^3$ (15). Różnica między tymi dwoma strukturami pod ciśnieniem atmosferycznym wynosi około 8%, a pod ciśnieniem 100 MPa około 20% (16). Przypuszcza się, że wysokie ciśnienie powoduje zmniejszenie objętości cząsteczek wody na skutek skracania wiązań wodorowych (17), oraz indukuje obniżenie objętości molowej wody poprzez przejście z formy tetramerycznej do oktamerycznej. Ostatnio model ten jest popierany poprzez stwierdzenie, że wysokie ciśnienie i wysokie stężenie soli wywołują podobną zmianę struktury wody (18).

5. Wpływ wysokiego ciśnienia na rybosomy

Jednym z procesów, który jest bardzo wrażliwy na zmiany ciśnienia jest biosynteza białka. Wykazano, że pod odpowiednim ciśnieniem hydrostatycznym następuje dysocjacja wolnych rybosomów na podjednostki. Stwierdzono, że proces ten jest odpowiedzialny za inhibicję biosyntezy białka i w następstwie tego wzrostu komórki (19). Jednak rybosomy charakteryzujące się związanymi podjednostkami (ang. *tight couple*) nie ulegają żadnym zmianom do ciśnienia wielkości 100 MPa. Ich odporność na działanie ciśnienia jest zależna od stężenia jonów magnezu. Obniżenie stężenia Mg^{2+} do wielkości 1-3 mM prowadzi do inhibicji biosyntezy białka przy około 70 MPa (20). Szczegółowy mechanizm dezaktywacji rybosomów nie jest znany. Jednak najbardziej wrażliwy na ciśnienie jest kompleks posttranslokacyjny (21). Funkcjonalne stany pre- i posttranslokacyjny różnią się wyraźnie w specyficzności wiązania tRNA (21). Przejście ze stanu pre- do posttranslokacyjnego wymaga luźnego „upakowania” elementów strukturalnych w sąsiedztwie aktywnych składników. Wysokie ciśnienie może zatem zmniejszać zdolność rybosomów do przejścia stanu pre- do posttranslokacyjnego (22).

6. Wpływ wysokiego ciśnienia na biomembrany i komórki

Przy ciśnieniu 100 MPa zachodzą zmiany w biomembranach: tranzycja podwójnej warstwy lipidowej, zaburzenia funkcji fizjologicznych, na przykład zaburzenia transportu jonów, interakcje pomiędzy biomembranami i anestetykami (23).

Działając odpowiednio ciśnieniem równym 50, 100, 300 i 500 MPa na tkanki jelitowe, komórki wątroby, komórki mięśni gładkich, mięśnia sercowego i mięśni szkieletowych myszy, białka uległy degradacji, natomiast lipidy i glikogen pozostały nie naruszone. Dopiero przy ciśnieniu rzędu 600 MPa cząsteczki glikogenu ulegały rozerwaniu (24). Zauważono też, że komórki wątroby, nerek, zwłaszcza kapatocytów i tubulin, które wcześniej uległy zniszczeniu pod wpływem wysokiego ciśnienia, można za pomocą tego samego ciśnienia utrwalać z dodatkiem 30% sacharozy lub buforu fosforanowego i sacharozy (25). Wysokie ciśnienie powoduje też degradację innych organelli komórkowych. Przy ciśnieniu 50 MPa dezorganizacji ulegają mikrotubule i aparat mitotyczny. Pod tym samym ciśnieniem, degradacji ulega aparat Golgiego. Przy 100 MPa zaczynają pęcznieć mitochondria, a degradacji ulegają granule glikogenowe. Przy 150 MPa degradacji ulega natomiast retikulum sarkoplazmatyczne, a przy 200 MPa zmiany zachodzą w membranie jądrowej (26).

Pod wpływem wysokiego ciśnienia zmienia się podatność niektórych związków na działanie enzymów. Na przykład skrobia poddana ciśnieniu 100-600 MPa przez 1 godzinę w temperaturze 45°C staje się bardziej wrażliwa na α , β i glukozylazy (27).

7. Zastosowanie wysokiego ciśnienia w technologii żywności

Do utrwalania produktów spożywczych stosowane są różne metody fizyczne, chemiczne i biologiczne, połączone z nadaniem im swoistych cech żywieniowych i sensorycznych (28). Jednym z rzadko obecnie stosowanych czynników fizycznych jest ciśnienie hydrostatyczne. Jego wpływ na organizmy żywe i białka znany jest od ponad 100 lat. W 1895 r. pokazano, że bakterie *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus* ulegają inaktywacji przy ciśnieniu 290 MPa (28). Już w 1899 r. wykazano, że mikroflora mleka przy ciśnieniu 680 MPa w ciągu 10 minut uległa redukcji z $10^7/\text{cm}^3$ do $10^1-10^2/\text{cm}^3$ (28). Mięso sterylizowane pod ciśnieniem rzędu 550 MPa w ciągu 1 godziny i temperaturze 52°C nie ulegało zakażeniu mikrobiologicznemu podczas trzytygodniowego przechowywania (28).

Pod względem wrażliwości na wysokie ciśnienie mikroorganizmy podzielono na trzy grupy: 1) wrażliwe na ciśnienie — bakterie Gram (-), które ulegają inaktywacji przy ciśnieniu 300 MPa i wyższym, 2) grzyby, które ulegają inaktywacji przy ciśnieniu 400 MPa i wyższym, 3) organizmy odporne na ciśnienie — bakterie Gram (+), które ulegają inaktywacji pod ciśnieniem 600 MPa i wyższym (29). Dotychczasowe badania warunków inaktywacji ciśnieniowej niektórych mikroorganizmów przedstawiono w tabeli 1.

TABELA 1
WARUNKI INAKTYWACJI NIEKTÓRYCH MIKROORGANIZMÓW

Mikroorganizm	Warunki sterylizacji			Literatura
	ciśnienie (MPa)	czas (min)	temperatura (°C)	
bakterie Gram (-)				
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	400	10	45	(30)
<i>Escherichia coli</i>	400	20	-20	(31)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	400	20	-20	(31)
<i>Salmonella bareilly</i>	200	20	-20	(31)
<i>Acetobacter aceti</i>	200	20	-20	(31)
<i>Vibrio parahaemoliticus</i>	200	5	0	(32)
	150	15	0	
<i>Campylobacter jejuni</i>	≥300			(29)
<i>Xanthomonas campestris</i>	300	5	5	(33)
Bakterie Gram (+)				
<i>Bacillus subtilis-sporý</i>	400	20	-20	(31)
<i>Bacillus cereus-sporý</i>	900	10	20	(34)
<i>Bacillus coagulans-sporý</i>	900	5	70	(34)
<i>Bacillus licheniformis-sporý</i>	800	3	60	(34)
<i>Bacillus stearothermophilus-sporý</i>	800	3	70	(34)
<i>Clostridium sporogenes</i>	800	10	80	(34)
<i>Staphylococcus aureus</i>	400	20	-20	(31)
<i>Streptococcus faecalis</i>	≥600			(29)
<i>Streptococcus Cp22B</i>	400	10	45	(30)
<i>Streptococcus lactis</i>	200	20	-20	(31)
Grzyby				
<i>Penicillium verrucosum</i>	400	10	45	(30)
<i>Rhizopus oryzae</i>	400	10	45	(35)
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	400	10	45	(35)
<i>Fusarium oxysporum</i>	400	10	45	(35)
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	500	30	25	(24)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	400	20	-20	(30)
<i>Candida utilis</i>	≥400			(36)

Komórki *Escherichia coli* rosnące pod ciśnieniem 10-30 MPa ulegają elongacji, przy czym ich maksymalne wydłużanie zachodzi pod ciśnieniem 20 MPa, przy jednoczesnej inkubacji w 4% roztworze etanolu (37). Wysokie ciśnienie powoduje też zmianę hydrofobowości powierzchni ścian komórkowych. Zaobserwowano to umieszczając komórki w dwóch fazach: wodnej i olejowej (n-heksadekan). W zależności od stosowanego ciśnienia komórki albo pozo-

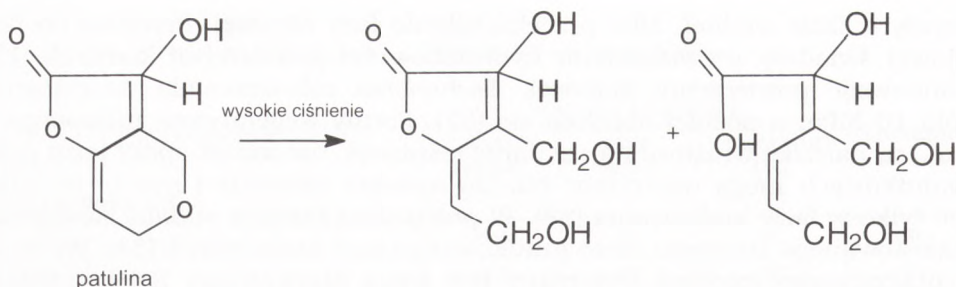
stawały w fazie wodnej, albo przechodziły do fazy olejowej. Przejście do fazy olejowej świadczy o zwiększeniu hydrofobowości powierzchni komórek. Hydrofobowość powierzchni komórek *Escherichia coli* wzrastała do ciśnienia około 10 MPa, a później obniżała się (37). Formy wegetatywne mikroorganizmów są bardziej wrażliwe na działanie ciśnienia, natomiast spory form przetrwalnikowych mogą wytrzymać bardzo wysokie ciśnienie i można je zniszczyć tylko w fazie kiełkowania (38). W przypadku *Bacillus subtilis* stosowanie umiarkowanego ciśnienia może indukować proces kiełkowania (38). Wówczas do otaczającego medium uwalniany jest kwas dipikolinowy (DPA), związek charakterystyczny dla spor oraz aminokwasy, takie jak glutamina, glicyna, walina i leucyna. Uwalnianie kwasu dipikolinowego zachodzi pod ciśnieniem 50 MPa i jest maksymalne przy 110 MPa, natomiast uwalnianie aminokwasów jest najintensywniejsze pod ciśnieniem 100 MPa (38).

Zaobserwowano, że inaktywacja drożdży pod ciśnieniem zachodzi wyłącznie w czystej wodzie, a dodatek NaCl lub glukozy wywołuje skutek odwrotny do wywołanego ciśnieniem (39). Inaktywacja ta spowodowana jest degradacją membrany jądrowej (40). Wpływ ciśnienia na strukturę jądra zaobserwowano w 14, 60, 80, i 92% komórek przy ciśnieniu odpowiednio 100, 200, 300 i 400 MPa w temperaturze pokojowej, a przy 500 MPa jądro uległo całkowitej degradacji we wszystkich komórkach (41).

Przemysłowe szczepy *Saccharomyces cerevisiae* wykazują różną wrażliwość na wysokie ciśnienie, która zależy od fazy wzrostu kultury, jej jakości oraz wielkości komórek (42). Komórki drożdży znajdujące się w fazie stacjonarnej wzrostu są bardziej odporne na ciśnienie, aniżeli komórki drożdży znajdujące się w fazie logarytmicznej (42). Ponadto komórki małe są bardziej odporne niż komórki duże (42).

Obecnie znanych jest zaledwie kilka gatunków drożdży odpornych na bardzo wysokie ciśnienie, na przykład *Candida tropicalis*. Innym gatunkiem również umiarkowanie ciśnienioodpornym jest *Candida parapsilosis* (43). Inaktywacja tego szczepu jest skuteczna dopiero pod ciśnieniem 500 MPa w ciągu 25 minut lub pod ciśnieniem 425 MPa w ciągu 100 minut w temperaturze 34-54°C (43). Najbardziej efektywna jest sterylizacja poprzez działanie wysokim ciśnieniem i równoczesne ogrzewanie, co pozwala między innymi na skrócenie czasu tego procesu (44). Pod ciśnieniem 400 MPa i w temperaturze 50°C uzyskujemy 10³ razy większy efekt sterylizacji niż w tym samym ciśnieniu i temperaturze 20°C (45).

W procesie sterylizacji żywności podjęto nie tylko próby inaktywacji mikroorganizmów wysokim ciśnieniem, ale także wykorzystanie tego czynnika do degradacji toksycznych składników zawartych w produktach żywnościowych. Jednym z nich jest patulina (46). Jest to toksyczny metabolit produkowany przez różne gatunki grzybów, między innymi z rodzajów: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Byssoschlamys*. Patulina w dużych ilościach występuje w produktach owocowych, a zwłaszcza w soku i koncentracie jabłkowym. Duży i ciągle nie rozwiązany problem stanowi utrzymanie jabłek w procesie ich przetwarzania w stanie wolnym od zanieczyszczeń i grzybów. W wielu krajach Europy minimalna dawka patuliny w świeżych sokach wynosi 50 µg/kg (46).

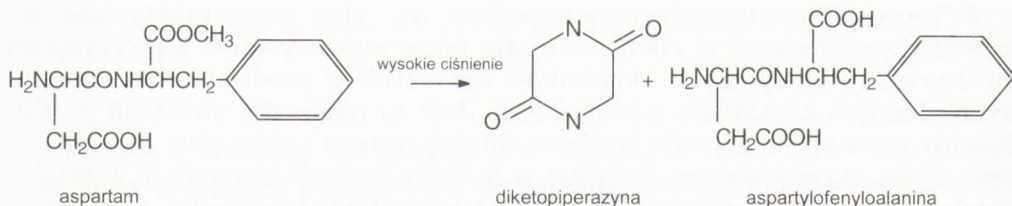


Rys. 1. Schemat rozpadu patuliny pod wysokim ciśnieniem.

Dotychczas stosowana tradycyjna metoda obróbki tego surowca za pomocą wysokiej temperatury nie daje pożądanych efektów. Redukcja tego związku przebiega bardzo wolno i jest mało efektywna. Bardziej przydatną metodą w procesie degradacji patuliny, jest wykorzystanie wysokiego ciśnienia. Doświadczenia prowadzone były w temperaturze pokojowej i stosowano ciśnienia rzędu 300, 500 i 800 MPa przez 1 godzinę. W takich warunkach zmniejszyła się zawartość patuliny w badanych produktach o 16, 20 i 23% w soku jabłkowym oraz o 62% w koncentracie z początkowej liczby 155 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (46). Prawdopodobnie następuje hydroliza układu laktamowego, w wyniku czego powstają dwa produkty przedstawione na rysunku 1.

Innym związkiem niskocząsteczkowym, którego zachowanie badano pod wpływem wysokiego ciśnienia jest aspartam — substytut cukru w produktach spożywczych dla diabetyków. Pod wpływem ciśnienia 600 MPa w temperaturze 60°C aspartam rozpada się m. in. na aspartylofenyloalaninę i diketopiperazynę. Ta ostatnia jest związkiem toksycznym dla człowieka. Z tego wynika, że produktów słodzonych aspartamem nie należy sterylizować wysokim ciśnieniem (47) (rys. 2).

Wysokie ciśnienie wpływa również na aktywność enzymów w produktach żywnościowych. Ciśnienie powyżej 200 MPa powoduje wzrost aktywności poli-fenylooksydazy m. in. w gruszkach. Efektem działania tego enzymu jest ich



Rys. 2. Schemat rozpadu aspartamu pod wysokim ciśnieniem.

brązowienie przy dostępie powietrza. Maksymalny wzrost aktywności enzymu obserwowano pod ciśnieniem 600 MPa (48). W przypadku krojonych sardynek zastosowanie ciśnienia 100-400 MPa przez 30 minut powoduje deaktywację lipazy, co chroni je przed akumulacją kwasów tłuszczowych. Jednakże występuje wzmożone utlenianie lipidów (49). Ciśnienia 100-600 MPa stosowane przez 10 i 30 minut w temperaturze 23 lub 45°C częściowo inaktywują peroksydazę i esterazę pektynową w świeżych sokach cytrusowych (40). Przy ciśnieniu 600 MPa stosowanym przez 10 minut w temperaturze 23°C pozostaje tylko 10-20% aktywności wyjściowej esterazy pektynowej (40).

Wysokie ciśnienie może również być wykorzystane w celu poprawienia pewnych właściwości produktów żywnościowych. Przykładem może być wspomniana już deaktywacja β -laktoglobuliny w mleku pod ciśnieniem 200 MPa w temperaturze 30°C przez 3 godziny. β -laktoglobulina stanowi około 50% białek serwatkowych mleka krowiego. Wywołuje ona bardzo często reakcję alergiczną u niemowląt karmionych mlekiem humanizowanym, dlatego właśnie zaleca się eliminację tego peptydu z koncentratu białek serwatkowych stosowanych do produkcji mleka humanizowanego (50).

W latach dziewięćdziesiątych na rynek japoński wprowadzono pierwsze produkty spożywcze sterylizowane przy użyciu wysokiego ciśnienia. Są to trzy rodzaje dżemów: truskawkowy, jabłkowy i kiwi oraz soki owocowe, m. in. grejpfrutowy, cytrynowy, pomarańczowy, jabłkowy i mandarynkowy. Zachowywały one naturalny smak, zapach i kolor. W związku z tym metodę tę próbuje się wykorzystywać do konserwacji innych produktów żywnościowych (tab. 2).

Produkty żywnościowe poddane działaniu wysokiego ciśnienia można przechowywać w niskich temperaturach bez ich zamrażania. Związane jest to z tym, że punkt zamarzania wody pod wpływem ciśnienia obniża się do -5°C przy 70 MPa, -10°C przy 125 MPa i -20°C przy 200 MPa (54). Na przykład pomidory, truskawki, surową wieprzowinę i surową wołowinę można w takich warunkach przechowywać po potraktowaniu ciśnieniem 50-200 MPa, co powoduje małe ryzyko szkodliwego efektu mrożenia oraz skażenia mikrobiologicznego, ponieważ następuje inaktywacja drobnoustrojów (54).

8. Medyczne wykorzystanie wysokiego ciśnienia

W ostatnich latach coraz większą uwagę zwraca się na wykorzystanie wysokiego ciśnienia w medycynie i możliwość jego zastosowania do inaktywacji wirusów, pasożytów oraz bakterii wywołujących często groźne w skutkach choroby (55).

AIDS wywołany jest przez retrowirus zwany HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) z grupy ludzkich wirusów T-limfocytotropowych (56). Stosowanie w profilaktyce medycznej szczepionek, przeciwciał monoklonalnych, inhibitorów odwrotnej transkryptazy (AZT, DDI) oraz proteaz, a także antysensowego DNA nie wywołały pożądaných skutków (57). Dlatego też zainteresowano się możliwością wykorzystania wysokiego ciśnienia do inaktywacji HIV.

TABELA 2
WPLYW CIŚNIENIA NA NIEKTÓRE PRODUKTY ŻYWNOŚCIOWE

Material	Warunki konserwacji	Charakterystyka produktu	Literatura
dżem truskawkowy	400-600 MPa, 10-30 min	trwałość produktu przez 2-3 miesiące w 5°C, 5% utrata witaminy C	(51)
wino ryżowe	400 MPa, 25°C, 30 min	trwałość przez 30 dni w temperaturze 30°C, zachowany smak i klarowność	(52)
jaja kurze	400 MPa, 25°C, 30 min	nie powoduje zniszczenia skorupki	(49)
mleko	680 MPa, temperatura pokojowa, 10 min lub 400 MPa, 1 godzina	redukuje zawartość mikroflory 10 ⁵ -10 ⁶ razy, opóźnia kwaśnienie mleka o około 24 godziny	(49)
mięso	150 MPa, 60 min, 60°C	zmiękczenie oraz niewielka utrata koloru	(49)
gruszki, brzoskwinie	410 MPa, 30 min	trwałość produktu przez 5 lat	(40)
pomidory	680 MPa, 60 min, temperatura pokojowa 190-306 MPa, 50-70°C, 30 min do 24 godzin	sterylizacja każda próba zepsuta	(40)
groch, fasola, buraki	nie specyficzne	każda próbka zepsuta	(5)
kapusta	300 MPa, 10°C, 6 dni	całkowita sterylizacja	(53)
soki: cytrynowy, pomarańczowy, mandarynkowy	400 MPa, 40°C 10-30 min	trwałość produktu do 3 miesięcy, brak utraty witaminy C	(40)
sok winogronowy			
a) częściowo sfermentowany	510 MPa, 30 min	brak sterylizacji, zatrzymana fermentacja	(40)
b) świeży	170 MPa, 16 godzin	brak sterylizacji	
sok jabłkowy	408-544 MPa, 30 min 612-817 MPa, 120-130 min	brak fermentacji cukrów świeżość produktu przez 5 lat	(40)

Wirus ten (szczep IIIB) został zawieszony w 10% roztworze surowicy płodu cielęcego (FCS) i traktowany w warunkach temperatury pokojowej ciśnieniami różnej wielkości przez 10 min (57). Z licznych obserwacji wynika, że przy ciśnieniu około 350 MPa drastycznie maleje liczba zainfekowanych komórek MT-4 (56).

Badano wpływ wysokiego ciśnienia na HSV-1 (*herpes simplex virus*) i ludzki cytomegalowirus (HCMV) (57). Pod ciśnieniem powyżej 300 MPa przez 10 minut w temperaturze 25°C zaobserwowano ograniczoną infekcję w zain-

fekowanych komórkach (57). W obserwacjach prowadzonych pod mikroskopem elektronowym wykazano, że wysokie ciśnienie uszkadza otoczkę wirusa i uniemożliwia jego wiązanie do komórki (57).

Ostatnio dość powszechnie występującą chorobą u ludzi i ssaków jest włośnica (*trichinellosis*). Wywoływana jest przez pasożytniczego nicienia — *Trichinella spiralis*. Włośnicą zarazić się można spożywając surowe mięso świni, w którym znajdują się otorbione larwy. U człowieka obecność około miliona larw prowadzi do śmierci (59). Komórki mięśniowe myszy zakażone tym pasożytem poddano działaniu wysokiego ciśnienia i zauważono, że 89% larw poddanych sterylizacji pod ciśnieniem poniżej 125 MPa zachowało swoją aktywność. Ich inaktywacja zachodziła dopiero pod ciśnieniem powyżej 200 MPa (59).

9. Perspektywy

Obecnie, jak się wydaje, dalsze badania nad wysokim ciśnieniem będą prowadzone w dwóch zasadniczych kierunkach. Jednym z nich będą badania podstawowe, mające na celu lepsze zrozumienie efektów i mechanizmów działania wysokiego ciśnienia na strukturę biologicznych makrocząsteczek oraz niskocząsteczkowych składników komórki. Drugi ze wspomnianych kierunków będzie dotyczył budowy technologii (aparatury) wysokociśnieniowej oraz projektowania pilotowych instalacji produkcyjnych.

Warto podkreślić, że podstawową zaletą stosowania wysokiego ciśnienia zarówno do sterylizacji żywności, jak i w medycynie jest jej technologiczna czystość. To sprawia, że metoda ta nabiera coraz większego znaczenia i cieszy się dużym zainteresowaniem.

Literatura

1. Heremans K., (1992), in: *High Pressure and Biotechnology*, Eds. Balny C., Hayashi R., Heremans K., Masson P., John Libbey Inc., London, Paris, 37-44.
2. Gross M., Jaenicke R., (1994), *Eur. J. Biochem.*, 221, 617-630.
3. Jaenicke R., (1991), *Eur. J. Biochem.*, 202, 715-728.
4. Masson P., (1992), in: *High Pressure and Biotechnology*, Eds. Balny C., Hayashi R., Heremans K., Masson P., Colloques INSERM/John Libbey Eurotext Ltd, London, Paris, 89-99.
5. Hoover D. G., Metrick C., Papineau A. M., Farkas D. F., Knorr D., (1989), *Food Technology*, 99-107.
6. Masson P., Cléry C., (1996), in: *High Pressure Bioscience and Biotechnology*, Eds. Balny C., Hayashi R., Elsevier Science B. V., Amsterdam, 117-126.
7. Hayashi R., (1989), in: *Use of High Pressure in Food*, Ed. Hayashi R., San-Ei Publ. Co., Kyoto, 1-30.
8. Saenger W., Hunter W. N., Kennard O., (1986), *Nature*, 324, 385.
9. Rich A., Nordheim A., Wang A. H.-J., (1984), *Annu Rev. Biochem.*, 53, 791-846.
10. Krzyżaniak A., Szałański P., Jurczak J., Barciszewski J., (1991), *FEBS Lett.*, 279, 1-4.
11. Krzyżaniak A., Szałański P., Jurczak J., Barciszewski J., (1994), *Int. J. Biol. Macromol.*, 16, 159-162.
12. Krzyżaniak A., Jurczak J., Barciszewski J., (1996), in: *High Pressure Science and Technology*, Ed. Trzeciakowski W. A., World Scientific Publishing Co. Ltd, Singapore, 855-859.

13. Krzyżaniak A., Szałański P., Jurczak J., Barciszewski J., (1994), *Int. J. Biol. Macromol.*, 16, 153-158.
14. Krzyżaniak A., (w przygotowaniu).
15. Benson S. W., Siebert E., (1992), *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 4269-4276.
16. Chalikian T. V., Sarvazyan A. P., Plum E., Breslauer K. J., (1994), *Biochemistry*, 33, 2394.
17. Kitchen D. B., Reed L. H., Levy R. M., (1992), *Biochemistry*, 31, 10083-10090.
18. Leberman R., Soper A. K., (1995), *Nature*, 378, 364-366.
19. Jaenicke R., (1987), in: *Current perspectives in high pressure biology*, Eds. Janasch H. W., et al., Academic Press, London, 257-272.
20. Gross M., Jaenicke R., (1990), *FEBS Lett.*, 267, 239-241.
21. Gross M., Auerbach G., Jaenicke R., (1993), *FEBS Lett.*, 321, 256-260.
22. Gross M., Lehle K., Jaenicke R., Nierhaus K., (1993), *Eur. J. Biochem.*, 218, 463-468.
23. Tamura K., (1991), in: *High Pressure Science for Food*, Eds. Hayashi R., Copyright by San-Ei Publ. Co, Kyoto, 166-175.
24. Yamamoto T., Mizutani A., Deguchi M., (1994), in: *High Pressure Bioscience*, Eds. Hayashi R., Kunugi S., Shimada S., Suzuki A., San-Ei Suppan Co, Kyoto, 104-111.
25. Ogawa J., Fujiwara H., Takemura G., Fujiwara T., Sasayama S., (1994), in: *High Pressure Bioscience*, Eds. Hayashi R., Kunugi S., Shimada S., Suzuki A., San-Ei Suppan Co., Kyoto, 48-52.
26. Ohmori T., Hayashi R., (1991), in: *High Pressure Science for Food*, Eds. Hayashi R., Copyright by San-Ei Publ. Co, Kyoto, 247-257.
27. Hayashida A., Hayashi R., (1993), in: *High Pressure Bioscience and Food Science*, Eds. Hayashi R. San-Ei Publ. Co., Kyoto, 105-109.
28. Lewicki P., (1992), *Przemysł spożywczy*, Wyd. Amarowicz R., Berdowski J. B., Chyłek D., Dąbrowski K., Kijowski J., Krajewski K., Lenart A., Sadowski J., Sikora T., Szybga K., Urban R., Wyd. Sigma Not, t. XLVI, 280-282.
29. Ohmori T., Shigehisa A., (1990), in: *Pressure Processed Food-Research and Development*, Eds. Hayashi R., San-Ei Publ. Co., Kyoto, 131-139.
30. Yamazaki A., Sasagawa A., Kinefuchi M., Yamada A., (1994), *iw.*, 331.
31. Takahashi K., Ishii H., Ishikawa H., (1991), in: *High Pressure Science for Food*, Eds. Hayashi R., Copyright by San-Ei Publ. Co, Kyoto, 225-232.
32. Yukizaki Ch., Kawano M., Jo N., Kawano K., (1994), *iw.*, 248-255.
33. Honma K., Ogura M., Higaki J., (1994), in: *High Pressure Bioscience*, Eds. Hayashi R., Kunugi S., Shimada S., Suzuki A., San-Ei Suppan Co., Kyoto, 210-217.
34. Gola S., Foman C., Maggi A., Cassara A., Rovere P., (1996), in: *High Pressure Bioscience and Biotechnology*, Eds. Balny C., Hayashi R. Elsevier Science B. V., Amsterdam, 253-259.
35. Wada S., Ide S., (1991), in: *High Pressure Science for Food*, Eds. Hayashi R., San-Ei Publ. Co., Kyoto, 293-299.
36. Ooide A., Kameyama Y., Iwata N., Uchio R., Karino S., Kanyama N., (1994), *iw.*, 344-351.
37. Tamura K., Muramoto Y., Miyashita M., Kourai H., (1996), in: *High Pressure Bioscience and Biotechnology*, Eds. Balny C., Hayashi R., Elsevier Science B. V., 261-266.
38. Ludwig H., van Almsick G., Sojka B., (1996), in: *High Pressure Bioscience and Biotechnology*, Eds. Balny C., Hayashi R., Elsevier Science B. V., Amsterdam, 237-244.
39. Nisimura T., Mori H., Hashimoto Y., (1991), in: *High Pressure Science for Food*, Ed. Hayashi R., San-Ei Publ. Co., Kyoto, 84-89.
40. Ogawa H., Fukuhisa K., Fukumoto H., (1989), in: *Use of High Pressure in Food*, Ed. Hayashi R., San-Ei Publ. Co., Kyoto, 62.
41. Osumi M., (1990), in: *Pressure Processed Food-Research and Development*, Ed. Hayashi R., San-Ei Publ. Co., Kyoto, 157-164.
42. Hamada K., Shimada S., (1991), in: *High Pressure Science for Food*, Ed. Hayashi R., San-Ei Publ. Co., Kyoto, 181-188.
43. Horie Y., Kimura K., Ida M., Yosida Y., Ohki K., (1993), in: *High Pressure Bioscience and Food Science*, Ed. Hayashi R. San-Ei Publ. Co., Kyoto, 229-236.

44. Okazaki T., Yoneda T., Suzuki K., (1994), in: *High Pressure Bioscience*, Eds. Hayashi R., Kunugi S., Shimada S., Suzuki A., San-Ei Suppan Co., Kyoto, 242-247.
45. Patterson M. F., Quinn M., Simpson R., Gilmour A., (1996), in: *High Pressure Bioscience and Biotechnology*, Eds. Balny C., Hayashi R., Elsevier Science B. V., Amsterdam, 267-272.
46. Brūna D., Voldrich M., Marek M., Kamarad J., (1997), in: *High pressure research in the biosciences and biotechnology*, Ed. Heremans K., Leuven University Press, Belgium, 335-338.
47. Butz P., Fernandez A., Fister H., Tauscher B., (1997), *J. Agric. Food Chem.*, 45, 302-303.
48. Asaka M., Nakanishi R., Aoyama Y., Hayashi R., (1994), in: *High Pressure Bioscience*, Eds. Hayashi R., Kunugi S., Shimada S., Suzuki A., San-Ei Suppan Co., Kyoto, 94-101.
49. Cheftel J. C., (1992), in: *High Pressure and Biotechnology*, Eds. Balny C., Hayashi R., Heremans K., Masson P., John Libbey Inc., London, Paris, 195-209.
50. Reps A., Kołakowski P., Babuchowski A., (1994), *Przegląd Mleczarski*, red. Tomaszewska D., Szymański J., Wangin J., Wyd. sp. z o. o. Lapol, 165-168.
51. Horie Y., Kimura K., Ida M., Yoshida Y., Ohki K., (1991), in: *High Pressure Science for Food*, Ed. Hayashi R., Copyright by San-Ei Publ. Co., Kyoto, 336-343.
52. Hara A., Nagahama G., Ohbayashi A., Hayashi R., (1990), in: *Pressure Processed Food-Research and Development*, Ed. Hayashi R., San-Ei Publ. Co., Kyoto, 225-234.
53. Kuribayashi T., Miyashita T., (1994), in: *High Pressure Bioscience*, Eds. Hayashi R., Kunugi S., Shimada S., Suzuki A., San-Ei Suppan Co., Kyoto, 314-319.
54. Deuchi T., Hayashi R., (1990), in: *Pressure Processed Food-Research and Development*, Ed. Hayashi R., San-Ei Publ. Co., Kyoto, 37-51.
55. Jura Cz., Krzanowska H., (1992), w: *Leksykon biologiczny*, Wyd.: Jasiński A., Sarnecka-Keller M., Jura Cz., Kilarski W., Krzanowska H., Krzanowski A., Poganowa E., Rudnicka W., Sokołowska S., WP, Warszawa, 747.
56. Mackiewicz S., Wiktorowicz K., (1990), w: *Immunologia w zarysie*, PZWL, 91-93.
57. Hayashi R., Balny C., (1996), w: *High Pressure Bioscience and Biotechnology*. Eds. Balny C., Hayashi R., Elsevier Science B. V, Amsterdam, 273-278.
58. Nakagami T., Shigehisa T., Ohmori T., (1994), in: *High Pressure Bioscience*, Eds. Hayashi R., Kunugi S., Shimada S., Suzuki A., San-Ei Suppan Co., Kyoto, 164-171.
59. Ohnishi Y., Ono T., Shigehisa T., Ohmori T., (1993), in: *High Pressure Bioscience and Food Science*, Ed. Hayashi R., San-Ei Publ. Co., Kyoto, 139-146.

Application of high pressure in food technology and medicine

Summary

For the first time, high pressure was used for milk sterilization at the beginning of this century. However, only recently attention has been paid to this method and its possible applications in food preservation and inactivation of some viruses.

In this review, we summarize high pressure effects on biological macromolecules such as proteins, nucleic acids, ribosomes and other cell components. We also show examples of practical application of high pressure in food conservation and medicine.

Key words:

high pressure, nucleic acids, ribosomes, biomolecules, high pressure sterilization.

Adres do korespondencji:

Jan Barciszewski, Instytut Chemii Bioorganicznej, PAN, ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań, e-mail: jbarcisz@ibch.poznan.pl