

Zastosowanie wysokiego ciśnienia w biologii molekularnej i biotechnologii

Andrzej Krzyżaniak¹

Janusz Jurczak²

Jan Barciszewski¹

Instytut Chemii Bioorganicznej PAN¹

Poznań

Instytut Chemii Organicznej PAN²

Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski²

Warszawa

1. Wstęp

Zainteresowanie wpływem wysokiego ciśnienia na cząsteczki biologiczne sięga początku obecnego stulecia, jednakże od kilku lat obserwuje się renesans tych badań głównie ze względu na możliwości zastosowania wysokiego ciśnienia w biotechnologii. Jednym z powodów dla których prowadzono badania związane z wysokim ciśnieniem była chęć poznania mechanizmów adaptacji organizmów do życia na dużych głębokościach (1). Wiadomo, że blisko 70% powierzchni kuli ziemskiej zajmują morza i oceany. Na ich dnie panuje ciśnienie około 380 barów czyli w przybliżeniu 375 atmosfer (1 bar = 0,987 atm. = 0,1 MPa) i znacznie różni się od ciśnienia atmosferycznego (1 atm. = 1,013 bara). Najwyższe ciśnienia spotykane na dnie Rowu Filipińskiego sięga 1200 barów.

Ostatnio duże zainteresowanie dotyczy zastosowań wysokiego ciśnienia do konserwacji żywności. W opracowaniu tym chcielibyśmy skoncentrować się na podsumowaniu obserwowanych efektów wysokociśnieniowych w biologii molekularnej i omówieniu zastosowań wysokiego ciśnienia w biotechnologii, głównie w produkcji żywności.

2. Wpływ wysokiego ciśnienia na strukturę i funkcję biologicznie aktywnych cząsteczek

Natywna struktura makrocząsteczek biologicznych (wykazująca aktywność biologiczną) w roztworze jest wynikiem delikatnej równowagi między stabilizującymi oddziaływaniami wewnątrzcząsteczkowymi, a innymi, często destabilizującymi, oddziaływaniami z rozpuszczalnikiem (2). Mają one charakter

niekowalencyjny; są funkcją temperatury i ciśnienia. Zmiany warunków środowiska, takie jak wysokie stężenie soli lub zmiana pH, mają wpływ na strukturę i stabilność danej cząsteczki. Mogą one powodować odwracalne lub nieodwracalne zmiany konformacyjne makrocząsteczek, a także agregację. W większości przypadków podwyższenie temperatury powoduje rozerwanie wiązań kowalencyjnych, hydrolizę łańcucha peptydowego lub deaminację, natomiast nieodwracalne przemiany strukturalne wywołane ciśnieniem przebiegają zwykle bez rozerwania wiązań kowalencyjnych. Przy ciśnieniach 1–2 kbarów, przejścia konformacyjne białek mają charakter odwracalny i przejawiają się głównie zmianą aktywności enzymatycznej w wyniku zmiany oddziaływań międzycząsteczkowych oraz między podjednostkami. Przy ciśnieniach powyżej 3 kbarów, zmiany strukturalne (głównie nieodwracalne) charakteryzują się najczęściej utratą aktywności enzymów. Konsekwencje wpływu ciśnienia na strukturę przestrzenną białek można śledzić przy użyciu takich technik eksperymentalnych jak: elektroforeza (3), magnetyczny rezonans jądrowy (4), spektroskopia Ramana (5) i spektroskopia w podczerwieni (6). W przypadku białek, zastosowanie tych metod pozwala nie tylko na analizę zmian konformacyjnych łańcucha polipeptydowego, ale również na śledzenie oddziaływań łańcuchów bocznych z roztworem i innymi makrocząsteczkami.

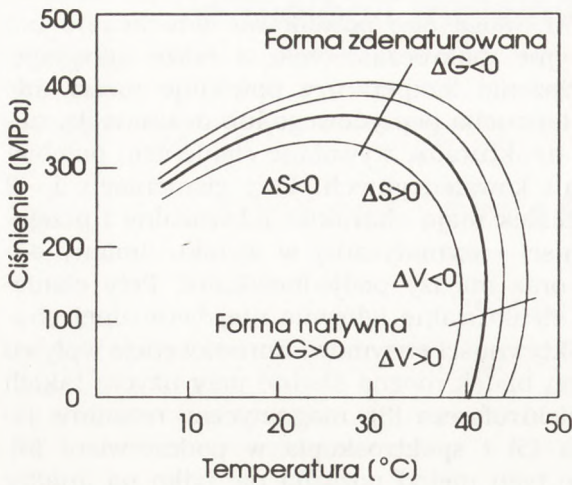
Wpływ ciśnienia na przebieg reakcji można opisać za pomocą równania:

$$\left(\frac{\delta \ln k}{\delta p}\right)_T = -\frac{\Delta V^\ddagger}{RT}$$

gdzie k oznacza stałą szybkości reakcji, ΔV^\ddagger objętość aktywacji, która stanowi różnicę objętości stanu przejściowego i stanu początkowego, R stałą gazową, a T temperaturę bezwzględną. Z równania tego wynika, że każde zwiększenie ciśnienia hydrostatycznego, którego konsekwencją będzie zmniejszenie objętości przesunie równowagę w kierunku bardziej zwartej konformacji (7). Szybkość reakcji enzymatycznej rośnie zatem wraz ze wzrostem ciśnienia, w przypadku gdy zmiana objętości reakcji jest ujemna, a maleje, gdy jest dodatnia. Zależność struktury białek monomerycznych od temperatury i ciśnienia została opisana za pomocą funkcji charakteryzującej się eliptycznym przebiegiem (rys. 1). W zakresie niskich ciśnień temperatura denaturacji rośnie wraz ze wzrostem ciśnienia, natomiast przy wyższych ciśnieniach maleje (7). Podobne zjawisko obserwuje się również dla polisacharydów i lipidów (8). Stwierdzono, że helisa α w białkach jest bardziej podatna na zmiany ciśnienia (następują większe zmiany objętości) aniżeli struktura daszkowa β (9). Wykazano również, że renaturacja helisy α przebiega szybciej aniżeli struktury β (10).

Wysokie ciśnienie powoduje większe uporządkowanie kryształu i zmniejszenie drgań termicznych atomów i cząsteczek (11). Dlatego też analiza rentgenostrukturalna kryształów białek uzyskanych w warunkach wysokociśnieniowych daje nadzieję na rozwiązanie struktury z wyższą rozdzielczością.

Białka monomeryczne nie ulegają denaturacji w ciśnieniach niższych niż



Rys.1. Krzywa charakteryzująca zmiany strukturalne chymotrypsynogenu w zależności od temperatury i ciśnienia. Od dolnej prawej do górnej lewej części rysunku widoczne są trzy różne przejścia, opisywane za pomocą równania $\Delta G = \Delta Vdp - \Delta SdT$. W wysokich temperaturach i przy niskich ciśnieniach, zarówno ΔV jak i ΔS są dodatnie i podwyższenie temperatury lub obniżenie ciśnienia prowadzi do denaturacji białka. Od momentu, gdy znak ΔV ulega zmianie, podwyższenie temperatury albo podwyższenie ciśnienia prowadzi do denaturacji. Zmiana znaku ΔS na ujemny prowadzi do zjawiska zimnej denaturacji. Ciśnienie denaturacji obniża się wraz ze spadkiem temperatury (8). ΔG — zmiana energii swobodnej, ΔV — zmiana objętości reakcji, ΔS — zmiana entropii.

4 kbary. Białka oligomeryczne ulegają natomiast dysocjacji pod ciśnieniem mniejszym niż 1,5 kbary, co może być przyczyną inhibicji wzrostu mikroorganizmów (12). Zdysocjowane podjednostki mogą bowiem ulegać agregacji lub wytrącaniu na skutek zmian konformacyjnych (13). Renaturacja oligomerów może być procesem bardzo wolnym. Można zaobserwować tu zjawisko histerezy co oznacza, że krzywe dysocjacji ciśnieniowej w czasie kompresji i dekompresji nie są identyczne. Dla białek monomerycznych wyraźne zmiany strukturalne obserwowane są zwykle przy ciśnieniach wyższych niż 4 kbary. Rozplatanie struktury białka (ang. *unfolding*) pod wpływem wysokiego ciśnienia jest procesem skomplikowanym i prowadzi do denaturacji (14). Obecnie nie można jeszcze przewidywać przebiegu zmian konformacyjnych powodowanych przez ciśnienie. Zależą one bowiem od ściśliwości białka i struktury przestrzennej (15). Towarzyszą temu zmiany stopnia hydratacji i objętości. Wiąże się to z procesami dysocjacji i rozplatania cząsteczek białka (14). Chemiczna modyfikacja aminokwasów i mutacje punktowe mogą prowadzić do zmian konformacyjnych i innego zachowania się białek pod ciśnieniem (16,17).

Reakcje enzymatyczne w umiarkowanych ciśnieniach (< 1,2 kbary) zwykle ulegają przyspieszeniu. Zwiększenie szybkości reakcji pod ciśnieniem jest szczególnie widoczne w przypadku trypsyny i termolizyny (18). W pierwszym przypadku obserwuje się ok. dwukrotny wzrost szybkości reakcji przy 1000 barach, a w drugim 1,5-krotny wzrost przy ciśnieniu 400 barów. Przykłady wpływu ciśnienia na strukturę i funkcję różnych białek zilustrowano w tab.1.

TABELA 1
ZMIANY STRUKTURY I FUNKCJI RÓŻNYCH BIAŁEK POD WPLYWEM CIŚNIENIA

Enzym/białko	Ciśnienie	Obserwacje
miozyna	> 3 kbar	agregacja i utrata aktywności ATPazowej
rybonukleaza a	3,5 i 8,5 kbarów	odwracalna denaturacja, helisa α i struktura β ulegają zniszczeniu
lipooksygenaza	6 kbarów	deaktywacja po 1 min w 40°C
cytochrom c	< 11,4 kbara	brak obserwowanych zmian
insulina	9,6 kbara	zniszczenie struktury helisy α
lizozym	6,7 kbara	helisa α i struktura β nie ulegają zmianom

Wpływ ciśnienia na stabilność kompleksów nukleinowo-białkowych jest różny, np. wirus mozaiki tytoniu pod wpływem wysokiego ciśnienia ulega dezintegracji w przeciwieństwie do wirusa żółtej mozaiki rzepy, który jest stabilny w tych warunkach (7). Rybosomy bakteryjne (kompleksy RNA-białko) ulegają dysocjacji na podjednostki. Prowadzi to do inhibicji biosyntezy białka pod ciśnieniem (12). Rybosomy w obecności mRNA nie ulegają dysocjacji w zakresie ciśnień do 1000 barów i w przeciwieństwie do badanych wcześniej wolnych rybosomów są aktywne w biosyntezie białka (19). W roztworach zbliżonych do fizjologicznych nie obserwuje się rozpadu rybosomów, chociaż w niskim stężeniu magnezu następuje dysocjacja kompleksu posttranslokacyjnego (20). Przypuszcza się, że głównym czynnikiem odpowiedzialnym za inhibicję procesu biosyntezy białka jest zmniejszenie objętości molowej (kompresja) rybosomów pod ciśnieniem (20).

Wpływ ciśnienia na kwasy nukleinowe jest inny niż na białka. Przy tych samych ciśnieniach polimeryzacja DNA u *E. coli* pozostaje niezakłócona natomiast synteza białka nie następuje (21). Z prowadzonych wcześniej badań ciśnieniowych kwasów nukleinowych wynika, że nie ulegają one żadnym zmianom w wysokich ciśnieniach. Struktura DNA ze spermy łososia pod ciśnieniem 10 kbarów w temp. 60°C w ciągu 1 godz. nie zmienia się (22). Również DNA z *Bacillus subtilis* przy takim samym ciśnieniu i pH 4,8 – 9,9 (23) nie ulega zmianom. W ciągu kilku ostatnich lat zmiany strukturalne kwasów nukleinowych (24 – 27) oraz modyfikacja oddziaływania białko:kwas nukleinowy (28 – 30) pod wpływem wysokiego ciśnienia stały się tematem badawczym autorów tego opracowania. Zastosowanie ciśnienia 6 kbarów w ciągu 18 godz. powoduje przejście konformacyjne polimeru poli (dGdC) · poli (dGdC) z prawoskrętnej formy B do lewoskrętnej formy Z charakteryzujące się wyraźną zmianą widma dichroizmu kołowego (24). Obserwuje się ujemny efekt Cottona przy 295 nm, charakterystyczny dla Z-DNA o sekwencji następujących po sobie puryn i pirymidyn. Z kolei poli (dA) · poli (dT) pod wpływem wysokiego ciśnienia (100–2000 barów) ulega denaturacji przy wyższej temperaturze aniżeli przy normalnym ciśnieniu (27). Obniżenie specyficzności trawienia DNA przez endonukleazę Eco RI wywołane wysokim ciśnieniem, jak się wydaje, spowodowane jest zmianą konformacji DNA (29,30). Kwasy rybo-

nukleinowe (RNA) ulegają zmianom konformacyjnym w warunkach nieco innych niż DNA. Oprócz wysokiego ciśnienia konieczne jest tu zastosowanie 5M roztworu NaCl (25,26). W widmie dichroizmu kołowego obserwuje się wówczas charakterystyczny dla Z-RNA dodatni efekt Cottona przy 280 nm (31). Cząsteczki tRNA i 5S rRNA reagują na podwyższenie ciśnienia zmianami konformacji przejawiającymi się niewielkimi różnicami w widmach dichroizmu kołowego (25,26,28).

tRNA poddany działaniu wysokiego ciśnienia (6 kbarów) w obecności aminokwasu ulega reakcji aminoacylacji bez udziału syntetazy aminoacylo-tRNA. Wydaje się, że za przebieg tej reakcji odpowiedzialna jest zmiana konformacji tRNA. Można przypuszczać, że wysokie ciśnienie powoduje obniżenie bariery energetycznej i w ten sposób katalizuje reakcję aminoacylacji bez udziału ATP jako źródła energii (28). Zależność zmian temperatury topnienia od ciśnienia wykorzystano w badaniach stabilności oligonukleotydów i stwierdzono, że molowa zmiana objętości reakcji zależy także od promienia jonowego kationu obecnego w roztworze (32).

Mechanizm przemian konformacyjnych kwasów nukleinowych pod wpływem wysokiego ciśnienia nie jest dotychczas znany. Można przypuszczać, że głównym czynnikiem powodującym przejście konformacyjne zarówno kwasów nukleinowych jak i białek są oddziaływania z rozpuszczalnikiem przede wszystkim wodą, a także zmiana hydratacji tych makrocząsteczek. Dalsza analiza tego mechanizmu jest utrudniona ponieważ obecnie brak jest precyzyjnej informacji na temat struktury samej wody pod wpływem ciśnienia. Ścisłość wody wynosi 4% przy ciśnieniu 1 kbara i 15% przy 6 kbarach (33). Prawdopodobnie, w warunkach wysokiego ciśnienia oddziaływania cząsteczek wody pomiędzy sobą dominują nad oddziaływaniami z makrocząsteczką (34).

3. Możliwości zastosowania wysokiego ciśnienia w biotechnologii

Zmiany struktury oraz inaktywacja białek i enzymów pod wpływem ciśnienia wskazują na możliwości praktycznego wykorzystania tego procesu. Badania wpływu wysokiego ciśnienia na żywność (mleko, mięso i ich mikroflorę) prowadzono już pod koniec XIX w. Stwierdzono wówczas, że pod ciśnieniem rzędu 7 kbarów przez 10 min w mleku następuje obniżenie liczby bakterii z 10^7 do 10^2 komórek w jednym mililitrze (deaktywacja mikroorganizmów). Mięso poddane działaniu wysokiego ciśnienia pozostawało wolne od „zanieczyszczeń mikroorganizmami” przez trzy tygodnie. Stwierdzono również, że ciśnienie rzędu sześciu kbarów powoduje całkowitą koagulację albuminy jajka kurzego spowodowaną jego denaturacją. Owoce zachowywały sterylność przez 5 lat po potraktowaniu wysokim ciśnieniem. Na podstawie tych obserwacji przyjęto, że działanie ciśnienia wywołuje skutki podobne do efektów powodowanych przez wysoką temperaturę (35).

W temperaturze pokojowej (lub niższej) wysokie ciśnienie nie powoduje zmian smaku i zapachu, a barwa żywności może ulegać modyfikacji. Ze względu na dużą wrażliwość mioglobiny na działanie ciśnienia surowe mięso może np. tracić jasnoczerwony kolor przy ciśnieniu wyższym niż 3 kbar (33). Aktywacja polifenylooksydazy w niektórych owocach pod ciśnieniem powoduje ich łatwe brązowienie (36). Karoteny, chlorofil i antocyjany nie są wrażliwe na zmiany ciśnienia.

Surowe ryby, mięso, świeże owoce i soki oraz różne ekstrakty zapachowe można konserwować za pomocą wysokiego ciśnienia bez zmian ich smaku i zapachu (33).

W przypadku krojonych sardynek, zastosowanie ciśnienia 1 – 4 kbarów przez 30 min powoduje deaktywację lipazy, co chroni je przed akumulacją kwasów tłuszczowych. Jednakże następuje wzmożone utlenianie lipidów.

Produkty żywnościowe zawierające dużo gazów, np. owoce w całości, na skutek dużej ściśliwości gazów podlegają nieodwracalnym zmianom pod ciśnieniem (33). Obserwowane są również zmiany morfologiczne, np. kompresje wakuoli gazowych, oddzielanie błony komórkowej od ściany komórkowej, modyfikacje jądra i organelli wewnątrzkomórkowych, wypływ materiału wewnątrzkomórkowego na zewnątrz komórki, niszczenie komórek i tkanek oraz zwiększanie wydajności niektórych reakcji enzymatycznych. Kawalki owoców są jednak znacznie mniej podatne na zmiany ciśnienia. Mimo drobnych pęknięć skorupki, jajko nie ulega implozji pod działaniem ciśnienia. Jest to spowodowane równomiernym rozkładem ciśnienia między porami skorupki i membrany jajka (33). Wykorzystując traktowanie jajek wysokim ciśnieniem można uniknąć zakażenia *Salmonella typhimurium*. Traktowanie tych bakterii ciśnieniem 2,5 kbara przez 10 minut w medium redukuje liczbę zdolnych do życia bakterii 10 milionów razy. Nie ma to jednak wpływu na żywotność *Listeria monocytogenes*. Jednak podwyższenie ciśnienia do 5 kbarów redukuje ilość bakterii w medium do niewykrywalnego poziomu. Należy jednak pamiętać, że istnieje możliwość zaadaptowania się niektórych mikroorganizmów do warunków ciśnieniowych w przemysłowej sterylizacji żywności (33).

Zawiesiny i roztwory białka podlegają żelowaniu na skutek działania wysokiego ciśnienia. Powstałe żele często wykazują większą elastyczność, ale mniejszą trwałość w porównaniu do żeli indukowanych przez temperaturę (37).

Odwracalna denaturacja wywołana ciśnieniem w zakresie 1000 – 4000 atm. spowodowana zmianami konformacyjnymi oraz procesem dysocjacji i asocjacji podjednostek może mieć praktyczne zastosowanie w kontroli niektórych reakcji enzymatycznych. Na przykład pod wpływem wysokiego ciśnienia termolizyna preferencyjnie hydrolizuje β -laktoglobulinę w mleku; główny czynnik alergizujący (38).

Ciśnienie przyspiesza temperaturą pasteryzację żywności. Niektóre rodzaje termofilnych bakterii, np. *Salmonella serfstenberg* 775 W są znacznie mniej odporne na działanie ciśnienia aniżeli temperatury (39). Wysokie ciśnienie może również być wykorzystane w celu poprawienia pewnych właściwości żywności, jak np. wspomniane usuwanie β -laktoglobuliny z mleka,

zmianę barwy hemoglobiny, usuwanie zapachu niektórych białek, rozpuszczanie lub modyfikację niektórych białek rybich przy użyciu specyficznych proteaz. Wpływ ciśnienia na niektóre rodzaje żywności przedstawiono w tab. 2.

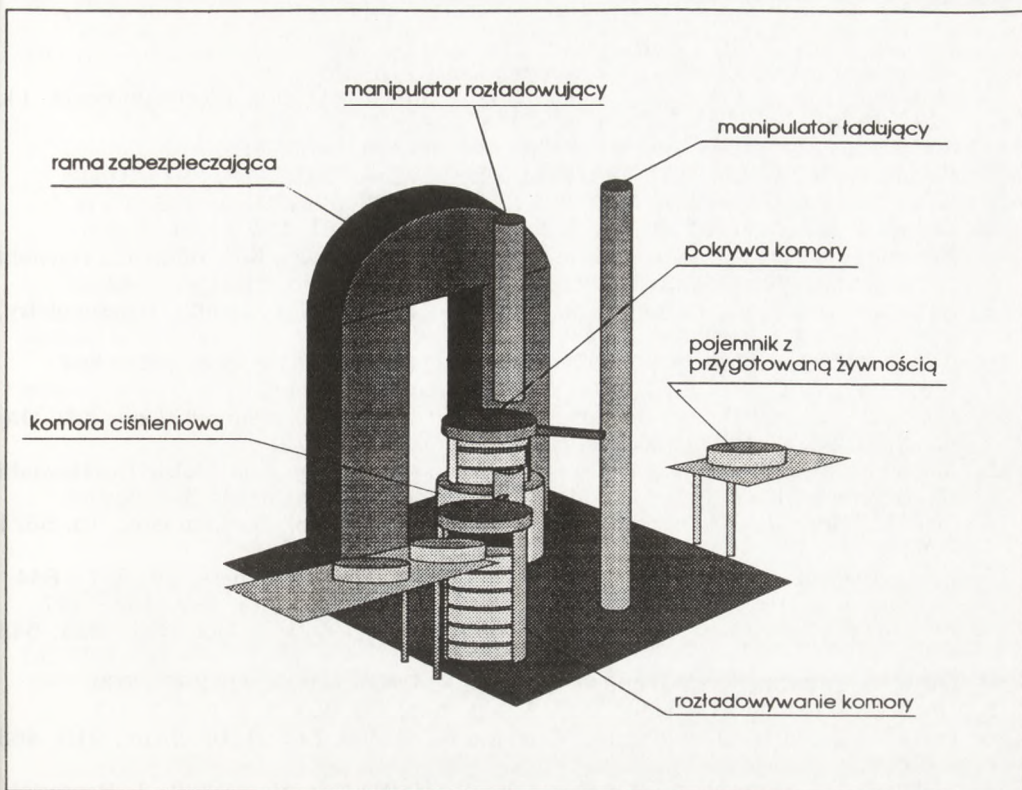
TABELA 2
PRZYKŁADY ZASTOSOWAŃ WYSOKIEGO CIŚNIENIA W BIOTECHNOLOGII ŻYWNOSCI

Material	Warunki	Uwagi o wpływie ciśnienia
jaja kurze	4000 atm., 30 min, 25°C	nie powoduje zniszczenia skorupki
sok: cytrynowy pomarańczowy mandarynkowy	6000 atm., 10 min, 47°C	nie powoduje utraty witaminy C, trwałość produktu przez co najmniej 5 miesięcy
mleko	6800 atm., 10 min, temp. pokojowa 4000 atm., 1 godz.	redukuje zawartość mikroflory $10^5 - 10^6$ raza opóźnia kwaśnienie mleka o ok. 24 godz.
mięso	1000 - 1500 atm. 60 min	powoduje zmiękczenie oraz niewielką utratę koloru

Zaobserwowano, że punkt zamarzania wody pod wpływem ciśnienia obniża się do -5°C przy 700 barach, -10°C przy 1,25 kbara i -20°C przy 2 kbarach. Może to mieć istotne znaczenie przy przechowywaniu żywności w temperaturach ujemnych bez jej zamrażania (32). Również rozmrażanie pod ciśnieniem trwa znacznie krócej i jest korzystniejsze ze względu na smak i zapach żywności.

4. Perspektywy

W 1990 r. na rynek japoński wprowadzono pierwsze produkty spożywcze sterylizowane przy użyciu wysokiego ciśnienia. Dotyczy to trzech rodzajów dżemów (truskawkowego, jabłkowego i kiwi). Mają one naturalny zapach, smak i kolor. Pojawiły się także na rynku pierwsze soki pasteryzowane przy użyciu wysokiego ciśnienia. W przypadku soku grejpfrutowego, zastosowanie ciśnienia pozbawiło go gorzkiego smaku (40). Ograniczeniem metody jest brak odpowiednich urządzeń. Dostępne obecnie (schematycznie przedstawione na rys. 2) pozwalają na poddanie działaniu ciśnienia jedynie niewielkich objętości materiału. Ze względu na niewielką wydajność maszyn technologia ta jest jak dotychczas dość kosztowna.



Rys. 2. Schemat urządzenia do pasteryzacji żywności pod ciśnieniem. Zapakowane produkty umieszczane są na transporterze, a następnie automatycznie ładowane do komory ciśnieniowej wypełnionej wodą. Wszelkie materiały termoplastyczne używane w przemyśle spożywczym mogą być zastosowane w komorze ciśnieniowej. Komora jest zamykana, a właściwe ciśnienie uzyskiwane jest za pomocą ruchomego tłoka. Typowa objętość komory wynosi od 100 do 500 litrów. Po wymaganym czasie ciśnienie jest redukowane, a komora automatycznie rozładowywana.

Wydaje się, że sterylizacja ciśnieniowa ma przynajmniej jedną przewagę nad innymi metodami, a mianowicie czystość. Ta właściwość będzie w przyszłości decydowała o jej rozwoju w ocenie społeczeństwa z punktu widzenia ekologicznego.

Literatura

1. Somero G. N., (1992), *Ann. Rev. of Physiol.*, 54, 557 – 577.
2. Jaenicke R., (1991), *Eur. J. Biochem.*, 202, 715-728.
3. Masson P., Arciero D. M., Hooper A. B., Balny C., (1990), *Electrophoresis*, 11, 128 – 133.
4. Jonas J., (1990), *Ber. Bunseng. Phys. Chem.*, 94, 307 – 315.
5. Heremans K., Wong P. T. T., (1985), *Chem. Phys. Lett.*, 118, 307 – 315.
6. Wong P. T. T., Heremans K., (1988), *Biochem. Biophys. Acta*, 956, 1 – 9.
7. Gross M., Jaenicke R., (1994), *Eur. J. Biochem.*, 221, 617 – 630.
8. Heremans K., (1992), in: *High Pressure and Biotechnology*, Eds. Balny C., Hayashi R., Heremans K., Masson P., John Libbey Inc., London, Paris, 37 – 44.
9. Sanarasinghe S. D., Campbell D. M., Jonas A., Jonas J., (1992), *Biochemistry*, 31, 7773 – 7778.
10. Radford S. E., Dobson C. M., Evans P. A., (1992), *Nature*, 358, 302 – 307.
11. Katrusiak A., Dauter Z., (1994), praca wysłana do druku.
12. Jaenicke R., (1987), in: *Current perspectives in high pressure biology*, Eds. Janasch H. W., et al., Academic Press, London, 257 – 272.
13. Masson P., (1992), in: *High Pressure and Biotechnology*, Eds. Balny C., Hayashi R., Heremans K., Masson P., John Libbey Inc., London, Paris 37 – 44.
14. Li T. M., Hook J. W., Drickamer H. G., Weber G., (1976), *Biochemistry*, 15, 5571 – 5580.
15. Carrier D., Mantsch H. H., Wong P. T. T., (1990), *Biopolymers*, 29, 837 – 844.
16. Heremans L., Heremans K., (1989), *Biochim. Biophys. Acta*, 999, 192 – 197.
17. Silva J. L., Silveira C. F., Correia A., Pontes L., (1992), *J. Mol. Biol.*, 223, 545 – 555.
18. Gros M., Auerbach G., Jaenicke R., (1993), *FEBS Lett.*, 321, 256 – 260.
19. Gros M., Jaenicke R., (1990), *FEBS Lett.*, 284, 87-90.
20. Gros M., Lehle K., Jaenicke R., Nierhaus K., (1993), *Eur. J. Biochem.*, 218, 463 – 468.
21. Welch T. J., Farewell A., Neidhardt F. C., Bartlett D. H., (1993), *J. Bacteriol.*, 175, 7170 – 7177.
22. Suzuki K., Taniguchi Y., Miyasawa Y., (1972), *J. Biochem.*, 72, 1087.
23. Heden G. C., (1964), *Bacteriol. Rev.*, 28, 14.
24. Krzyżaniak A., Szałański P., Jurczak J., Barciszewski J., (1991), *FEBS Lett.*, 279, 1 – 4.
25. Krzyżaniak A., Fürste J. P., Szałański P., Jurczak J., Erdmann V. A., Barciszewski J., (1993), *Acta Biochim. Pol.*, 40, 66 – 68.
26. Krzyżaniak A., Fürste J. P., Bald R., Szałański P., Jurczak J., Erdmann V.A., Barciszewski J., (1994), *Int. J. Biol. Macromol.*, 16, 159 – 162.
27. Wu J. Q., Macgregor R. B. Jr., (1993), *Biochemistry*, 32, 12 531 – 12 537.
28. Krzyżaniak A., Szałański P., Jurczak J., Barciszewski J., (1994), *Int. J. Biol. Macromol.*, 16, 153 – 158.
29. Macgregor R. B. Jr., (1990), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 170, 775 – 778.
30. Robinson C. R., Sligar S. G., (1994), *Biochemistry*, 33, 3787 – 3793.
31. Saenger W., Hunter N. N., Kennard O., (1986), 324, 385 – 388.
32. Wu J. Q., Najaf-Zadeh R., Macgregor R. B. Jr., (1994), *23rd Steenbock Symposium on High Pressure Effects in Molecular Biophysics and Enzymology*.
33. Cheftel J.-C., (1992), in: *High Pressure and Biotechnology*, Eds. Balny C., Hayashi R., Heremans K., Masson P., John Libbey Inc., London, Paris, 37 – 44.
34. Benson S. W., Siebert E., (1992), *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 4269 – 4276.
35. Farr D., (1990), *Trends in Food Science and Technology*, 7, 14 – 16.
36. Asaka M., Hayashi R., (1991), *Agric. Biol. Chem.*, 55, 2439 – 2440.
37. Okamoto M., Kawamura Y., Hayashi R., (1990), *Agric. Biol. Chem.*, 54, 183 – 189.
38. Okamoto M., Hayashi R., Enomoto A., Kuminogawa S., Yamauchi K., (1991), *Agric. Biol. Chem.*, 55, 1253 – 1257.

39. Hoover D. G., Metric C., Papineau A. M., Farkas D. F., Knorr D., (1989), *Food Technology*, 43, 99 – 107.
40. Hayashi R., (1992), in: *High Pressure and Biotechnology*, Eds. Balny C., Hayashi R., Heremans K., Masson P., John Libbey Inc., London, Paris, 37 – 44.

Application of high pressure in molecular biology and biotechnology

Summary

The application of high pressure for biological macromolecules investigations was an object of interest already in the beginning of this century. Recently, attention has been paid to this method because of its possible applications in biotechnology.

In this paper, we summarized the data existing in the literature on the mechanism of high pressure effects on proteins and nucleic acids. We also reviewed various practical applications of high pressure, especially in food industry.

Key words:

high pressure, conformational changes, proteins, nucleic acids.

Adres dla korespondencji:

Jan Barciszewski, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN,
ul. Noskowskiego 12, 61-704 Poznań.