

## **I. Biobankowanie – utrwalanie i przechowywanie mikroorganizmów**

Zadaniem kolekcji kultur jest gromadzenie i przechowywanie mikroorganizmów w celu ochrony bioróżnorodności zasobów biologicznych. Działają one jako repozytoria szczepów do badań naukowych, dydaktyki, zastosowań przemysłowych oraz depozytów patentowych. W kolekcjach kultur mikroorganizmów prowadzi się także badania mające na celu identyfikację, charakterystykę i klasyfikację oraz poprawę właściwości użytkowych przechowywanych zasobów. Podczas przechowywania ważne jest zachowanie w stanie niezmienionym morfologii, aktywności enzymatycznej i materiału genetycznego mikroorganizmów, jak również zapewnienie ich wysokiej przeżywalności. Zgodnie z zaleceniami Światowej Federacji Kolekcji Kultur (WFCC, *World Federation for Culture Collection*) ze względów bezpieczeństwa i w celu zminimalizowania ryzyka utraty szczepów powinny być one przechowywane przy użyciu co najmniej dwóch różnych procedur. Skuteczne przechowywanie oznacza, że mikroorganizm jest utrzymywany w stanie wolnym od zanieczyszczeń, jego materiał genetyczny nie ulega modyfikacjom, nie następują zmiany jego cech fizjologicznych i morfologicznych, a po ożywieniu jest zdolny do wzrostu i namnażania w odpowiednim podłożu hodowlanym.



Rysunek 1 Schemat postępowania z mikroorganizmami w kolekcjach kultur (za: Akimowicz M, Sokołowska B, Zamrażanie i liofilizacja jako techniki utrwalania i przechowywania mikroorganizmów, *ŻYWNOSĆ. Nauka. Technologia. Jakość*, 2021, 28, 1 (126), 28 – 38)

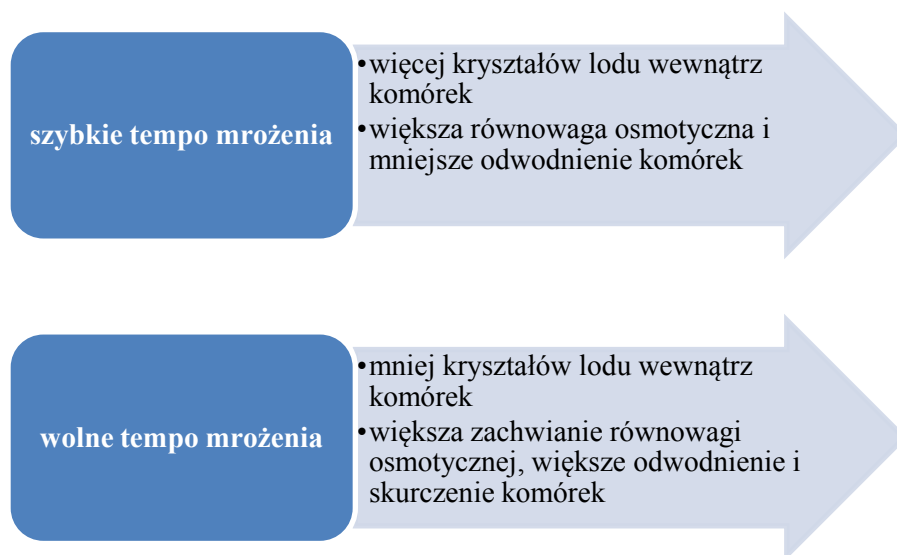
Najczęściej stosowanymi technikami utrwalania mikroorganizmów w kolekcjach kultur są zamrażanie i liofilizacja. Wybór pomiędzy tymi technikami zależy od posiadanego wyposażenia, od rodzaju mikroorganizmów, celu utrwalania i przewidywanego czasu przechowywania.

### **A) Krioprezerwacja - zamrażanie**

Woda stanowi 60-95% całkowitej masy aktywnie żyjących komórek. Przemiana wody w lód prowadzi do zahamowania dyfuzji i zatrzymania procesów metabolicznych. Tworzenie kryształów lodu może jednak prowadzić do nieodwracalnego uszkodzenia materiału biologicznego podczas procesu zamrażania lub rozmrażania:

- wewnątrzkomórkowe kryształy lodu powodują niszczenie błon komórkowych,
- pozakomórkowe kryształy lodu wpływają na uszkodzenia mechaniczne oraz chemiczne,
- zachwianie równowagi osmotycznej wewnątrz komórek prowadzi do denaturacji białek.

Zamrażanie może być również przyczyną szeregu innych niekorzystnych następstw, m.in. utraty żywotności, uszkodzenia błony i ściany komórkowej, zahamowania oddychania, zatrzymania transportu aktywnego, blokowania syntezy RNA, DNA, białek, hamowania złożonych reakcji enzymatycznych, uszkodzenia DNA czy zmian morfologicznych komórek.



Zamrażanie polega ona na utrwalaniu materiału biologicznego poprzez jego zamrożenie w szerokim zakresie ujemnych temperatur. Przyjmuje się, że do długotrwałego przechowywania (powyżej 5 lat) właściwa jest temperatura ciekłego azotu  $-196^{\circ}\text{C}$  lub jego par wynosząca pomiędzy  $-135$  a  $-150^{\circ}\text{C}$ , ponieważ w tej temperaturze nie zachodzą praktycznie żadne mutacje materiału genetycznego. Metoda ta jest uniwersalna i może być stosowana do każdego rodzaju materiału biologicznego. Przechowywanie w zamrażarkach (w temp.  $-20$  a  $-80^{\circ}\text{C}$ ) nie gwarantuje długoterminowego skutecznego przechowywania, nawet jeżeli początkowo daje dobre efekty, jest więc odpowiednie do przechowywania mikroorganizmów poniżej 5 lat oraz do przechowywania kultur roboczych. Zamrażanie materiału biologicznego jest także pierwszym etapem procesu liofilizacji (suszenia sublimacyjnego).

Wybór tempa zamrażania zależy od typu komórek i od przeznaczenia zamrożonego materiału. Jeżeli istotne jest zachowanie przeżywalności zamrażanego materiału biologicznego, to dla większości komórek optymalnym rozwiązaniem będzie zamrażanie z szybkością  $1-10^{\circ}\text{C}$  na minutę. Najwyższą przeżywalność komórek mikroorganizmów uzyskuje się albo przy wolnym tempie ich chłodzenia wynoszącym  $5-180^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , albo przy bardzo szybkim – w zakresie  $5000-30000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Chłodzenie komórek z szybkością pośrednią  $180-5000^{\circ}\text{C}/\text{min}$  wiąże się z niską przeżywalnością

mikroorganizmów. Optymalna szybkość chłodzenia zależy od zawartości wody w komórce, wielkości komórki, a także charakterystycznych właściwości danego mikroorganizmu. Im większa jest zawartość wody w komórce oraz im mniejszy jest rozmiar tym większa jest przeżywalność komórek podczas powolnego zamrażania. W literaturze dostępne są informacje o optymalnych szybkościach chłodzenia wybranych mikroorganizmów stosowanych na skalę przemysłową lub o dużym potencjale aplikacyjnym. Przykładowo w przypadku szczepu *Lactobacillus plantarum* jest to 10 °C/min, a *Lactobacillus casei* ATCC 393 (probiotyk) 5 °C/min. Dodatkowo użycie krioprotektantów zmniejsza niebezpieczeństwo uszkodzeń spowodowanych zachwianiem równowagi osmotycznej i formowaniem kryształów lodu.

## Krioprotektanty

Tempo procesu mrożenia ma ogromny wpływ na zmiany zachodzące w komórkach. Tworzenie kryształów lodu oraz zaburzenia równowagi osmotycznej stanowią w tym przypadku największe niebezpieczeństwo. Powolne zamrażanie prowadzi początkowo do tworzenia kryształów lodu na zewnątrz komórek, przez co zostaje zachwiana równowaga osmotyczna i następuje ich odwodnienie. Szybkie zamrażanie minimalizuje efekt zachwiania równowagi osmotycznej, ale prowadzi do tworzenia większej ilości lodu wewnątrz komórek, co wpływa na ich uszkodzenie.

Uznaje się, że skuteczna substancja ochronna powinna chronić komórki podczas mrożenia oraz tworzyć stelaż zapewniający stabilność i łatwość rehydratacji. Substancje ochronne można klasyfikować według różnych kryteriów. Pierwsze kryterium wynika z masy cząsteczkowej – cząsteczki o wysokiej bądź niskiej masie cząsteczkowej. Bardziej tradycyjny podział związany jest z czasem wnikania do komórki, tzn. na substancje szybko wnikające (metanol, etanol, glikol etylenowy, glikol propylenowy, dimetylosulfotlenek (DMSO) oraz wnikające wolniej (glicerol). Dodatkowo wyróżnia się podział na substancje przenikające tylko ścianę komórkową (mono- i disacharydy, aminokwasy, polimery o małej masie cząsteczkowej); przenikające jednocześnie ścianę komórkową i błonę komórkową (glicerol, DMSO) oraz nieprzenikające ani ściany komórkowej, ani błony komórkowej (polimery o wysokiej masie cząsteczkowej – białka, polisacharydy).

Krioprotektanty to substancje chroniące komórki przed negatywnymi skutkami procesu mrożenia. Umożliwiają zmniejszenie tempa dyfuzji wody i minimalizację szoku osmotycznego, redukcję formowania kryształów lodu wewnątrz komórek oraz obniżenie temperatury zamarzania. Dodaje się je do pożywki hodowlanej podczas wzrostu mikroorganizmów lub do zawiesiny komórek bezpośrednio przed zamrożeniem.

W zależności od mechanizmu działania dzielimy je na:

1. Krioprotektanty przenikające do wnętrza komórek. Są to substancje o niskim ciężarze molekularnym, takie jak alkohole (metanol, sorbitol, glikol etylenowy, glikol propylenowy, glicerol), DMSO i dimetylacetamid. Znajdują zastosowanie głównie podczas powolnego zamrażania preparatów biologicznych.
2. Krioprotektanty zewnątrzkomórkowe. Są to substancje o większym ciężarze molekularnym, które nie wnikają do wnętrza komórek. Należą do nich krioprotektanty złożone (osocze krwi, mleko odtłuszczone, ekstrakt drożdżowy, ekstrakt słodowy, pepton), cukry (sacharoza, glukoza, dekstran) oraz polimery (poliwinylopirolidon). Znajdują zastosowanie głównie podczas szybkiego zamrażania preparatów biologicznych.

Idealny krioprotektant powinien być niereaktywny, dobrze rozpuszczalny w wodzie, mieć zdolność penetracji do wnętrza komórki, charakteryzować się niską toksycznością i nie wytrącać się przy wyższych stężeniach. Substancjami ochronnymi w kolekcjach, najczęściej stosowanymi w krioprezerwacji mikroorganizmów, jest glicerol (10-15%) oraz DMSO (5-10%). Krioprotektantem chętnie używanym w laboratoriach naukowych jest odtłuszczone mleko, które z powodzeniem stosuje się przy zamrażaniu w -80°C. Dla różnych grup mikroorganizmów, a często nawet dla każdego gatunku, powinno się indywidualnie dobierać odpowiedni krioprotektant.

Przed użyciem krioprotektanty muszą zostać wysterylizowane. Glicerol autoklawuje się przez 15 minut w temperaturze 121°C i następnie chroni przed działaniem światła podczas przechowywania.

DMSO filtruje się przez filtr nylonowy lub teflonowy PTFE 0.2 µm przemyty uprzednio alkoholem i DMSO. Zaleca się, aby krioprotektanty były przygotowywane do użycia w postaci jednorazowych porcji, gdyż wielokrotne korzystanie z większego pojemnika prowadzi do wprowadzania zanieczyszczeń i wilgoci.

| rodzaj materiału biologicznego | liczebność komórek                    | krioprotektant                                  | -80°C | -150°C |
|--------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------------------|-------|--------|
| bakterie                       | 10 <sup>7</sup> /ml                   | glicerol (10%)                                  | +     | +      |
| grzyby                         | 10 <sup>6</sup> /ml                   | glicerol (10%)                                  | +     | +      |
| drożdże                        | 10 <sup>7</sup> /ml                   | glicerol (10%)                                  | +     | +      |
| algi                           | 10 <sup>5</sup> - 10 <sup>7</sup> /ml | metanol (5-10%) lub DMSO (5-10%)                | +     | +      |
| komórki roślinne               | -                                     | DMSO (5-10%) + glicerol (5-10%)                 | +     | +      |
| komórki zwierzęce              | 10 <sup>6</sup> - 10 <sup>7</sup> /ml | DMSO (5-10%) lub glicerol (5-10%)               | +     | +      |
| kręgowce                       | -                                     | Glicerol                                        | +     | +      |
| surowica                       | -                                     | -                                               | +     | -      |
| wirusy zwierzęce               | 10 <sup>6</sup> /ml                   | DMSO (7%) + wołowa surowica płodowa (FBS) (10%) | +     | +      |
| białka                         | -                                     | -                                               | +     | -      |

Tabela 1 Porównanie rodzajów krioprotektantów w zależności od materiału biologicznego.

W bankach szczepów wykorzystywanych do procesów biotechnologicznych ważna jest nie tylko przeżywalność, ale równie istotne jest zachowanie wyjściowych cech fizjologicznych szczepu produkcyjnego, wynikających z niezmienności genetycznej podczas przechowywania zamrożonego materiału. Kriobanki obejmujące kolekcje mikroorganizmów, kultur komórkowych i bioproduktów - najbardziej znane kolekcje materiału biologicznego:

- CBS - *Centraalbureau voor Schimmelcultures* - najstarsza kolekcja w Europie założona w 1904 roku w Holandii. Obejmuje grzyby, drożdże, bakterie, fagi i plazmidy.
- ATCC - *American Type Culture Collection* - linie komórkowe, hybrydomy, bakterie, fagi, drożdże, grzyby, nasiona roślin, algi, wirusy, DNA, RNA, wektory, biblioteki, komórki macierzyste, kolekcje specjalne (np. bank komórek chłoniaków nieziarniczych).
- ECACC - *European Collection of Cell Cultures* - linie komórkowe, hybrydomy, DNA, RNA, komórki macierzyste.
- ARS - *Agricultural Research Service Culture Collection* (NRRL) - bakterie, promieniowce, grzyby, drożdże.
- DSMZ - *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* - bakterie, fagi, drożdże, grzyby, plazmidy, wirusy roślinne, ludzkie, zwierzęce i roślinne kultury komórkowe.

Drożdże, z racji mało skomplikowanego metabolizmu, naturalnych przystosowań do trudnych warunków środowiska i posiadania ściany komórkowej, łatwo jest zachować przy życiu w stanie zamrożenia. Kolonie w fazie wzrostu logarytmicznego (późna faza logarytmiczna lub wczesna stacjonarna) wiruje się i zawiesza w 15% roztworze glicerolu. Tak zabezpieczone drożdże przechowuje się w niskiej temperaturze ( $\leq -20^{\circ}\text{C}$ , najczęściej  $-80^{\circ}\text{C}$  lub w ciekłym azocie). Do krótkotrwałego przechowywania (kilkudniowego) można wykorzystać schładzane w lodówce szalki lub skosy agarowe, czasami także podłoża płynne.

### Rozmrażanie

Proces rozmrażania komórek jest jeszcze bardziej znaczący niż zamrażanie. Wiele czynników, takich jak szok temperaturowy, toksyczność krioprotektantów, stres oksydacyjny oraz uszkodzenia komórki podczas rozmrażania może powodować zmiany w genotypie i fenotypie danego mikroorganizmu.

W czasie rozmrażania komórka ulega rehydratacji, uzyskuje właściwy kształt oraz skład płynu komórkowego, jednocześnie usuwając ze swojego wnętrza substancję ochronną.

Proces rozmrażania powinien odbywać się na tyle szybko, by nie doszło do uszkodzeń struktur komórkowych. Powinien trwać odpowiednio długo, by komórka uzyskała stan równowagi osmotycznej. W praktyce w laboratoriach stosuje się rozmrażanie komórek bakterii w łaźni wodnej o temperaturze 37 °C (lub innej optymalnej dla danego szczepu bakterii), delikatnie mieszając przez 2 min. Komórki drożdży i grzybów strzępkowych rozmraża się w łaźni wodnej o temp. 25-30 °C (lub innej optymalnej dla danego szczepu) mieszając przez 5 min.

## **B) Liofilizacja – suszenie sublimacyjne**

Suszenie przez wymrażanie, znane również jako liofilizacja (lub suszenie sublimacyjne), jest często stosowane do usuwania wody z wrażliwych — głównie biologicznych — produktów bez niszczenia ich. Przykładem produktów liofilizowanych są antybiotyki, bakterie, szczepionki, leki diagnostyczne, produkty zawierające białka, komórki, tkanki oraz środki chemiczne.

Produkt przeznaczony do suszenia jest mrożony w ciśnieniu atmosferycznym. Następnie, w początkowej fazie suszenia — definiowanej jako suszenie podstawowe — woda (pod postacią lodu) jest usuwana w procesie sublimacji, a w drugiej fazie — suszenia wtórnego — usuwana w procesie desorpcji. Liofilizacja przebiega z podciśnieniem. Warunki w których przebiega proces determinują jakość liofilizowanego produktu.

Liofilizacja jest procesem składającym się z trzech etapów: zamrażania, sublimacji i desorpcji.

### **Zamrażanie**

Gdy roztwór wodny jest chłodzony, tworzone są zarodki krystalizacji. Wokół miejsc nukleacji gromadzi się woda, co powoduje powstawanie kryształków o różnych rodzajach i kształtach. Tempo liofilizacji, skład podstawowego produktu, zawartość wody, lepkość płynu oraz obecność substancji niekrystalicznej, to kluczowe czynniki decydujące o kształcie i rozmiarze kryształków oraz wpływające na późniejszy proces sublimacji. Temperatura zamrażania czystej wody wynosi 0°C. Jeżeli w wodzie rozpuszczane są inne substancje, temperatura zamrażania spada. Jeśli obecne są sole nieorganiczne, może być znacznie niższa. Jeżeli zamrażany jest słaby roztwór, czysty lód zostanie początkowo oddzielony, co zwiększy gęstość rozpuszczonej substancji w roztworze resztkowym (i dodatkowo zmniejszy punkt zamrażania).

Przed suszeniem sublimacyjnym należy ustalić najodpowiedniejszą technikę zamrażania dla konkretnego produktu oraz jego parametry. W wypadku produktów farmaceutycznych stosowane są dwie różne metody zamrażania: zamrażanie przez styczność ze schłodzoną substancją lub zamrażanie rotacyjne/dynamiczne w chłodziwie.

Pierwszą metodą jest technika zamrażania statycznego, w której wszechstronny liofilizator musi dostosować prędkość zamrażania do konkretnego produktu oraz sterować prędkością zamrażania. W większości przypadków wymogi te pozwoli spełnić końcowa temperatura -50°C. Druga metoda jest stosowana, gdy większe ilości produktu płynnego są zamrażane i suszone w kolbach lub dużych butelkach. Odpowiednia technika zamrażania pozwala otrzymać zamrożony produkt nadający się do sublimacji, to znaczy jednolity i tak cienki jak to możliwe, a wszystko to w krótkim czasie suszenia.

### **Sublimacja**

Kolejny etap liofilizacji polega na usunięciu z produktu wody w postaci lodu poprzez bezpośrednie jego przejście w parę wodną (postać gazową), czyli sublimację. Niezbędna do tego jest energia w postaci ciepła.

Na początku podstawowej fazy suszenia na powierzchni produktu przebiega sublimacja lodu. Na etapie suszenia do wychwytywania niewielkich ilości wody wykorzystuje się chemiczny środek suszący – dekahtlenek tetrafosforu, lepszym rozwiązaniem jest jednak użycie kondensatora (tzw. kondensator lodu). Na dalszym etapie procesu powierzchnia sublimująca cofa się do produktu, a powstała para przechodzi przez wysuszone wcześniej powłoki zewnętrzne. Ciepło wymagane do sublimacji jest dostarczane poprzez konwekcję i przewodnictwo cieplne oraz w mniejszym stopniu przez promieniowanie termiczne. Podstawowa faza suszenia trwa do momentu, w którym produkt zostanie poddany sublimacji. Suszenie jest najbardziej czasochłonnym etapem liofilizacji.

## Desorpcja

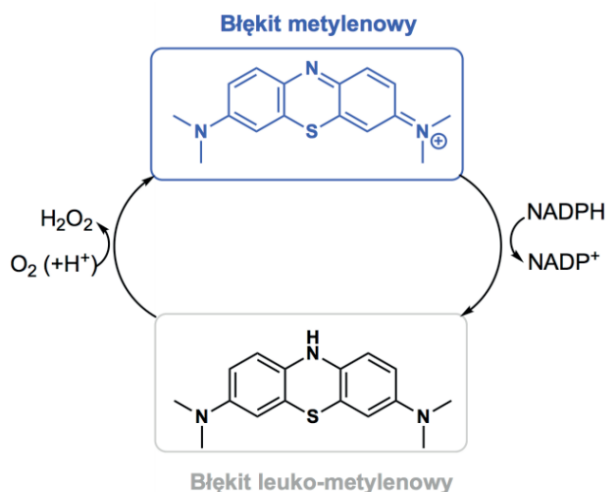
Na etapie suszenia wtórnego lub ostatecznego resztkowa zawartość wilgoci jest redukowana do możliwie niskiego poziomu, aby umożliwić trwale przechowywanie produktu. Woda związana przez adsorpcję na wewnętrznej powierzchni produktu musi zostać usunięta. Aby to osiągnąć, często należy pokonać siły kapilarne wody. W tym celu powoli podnosi się temperaturę materiału. Najlepszy efekt desorpcji osiąga się przeprowadzając ją krótko w wyższej temperaturze. Proces suszenia wtórnego należy precyzyjnie kontrolować, aby zapobiec nadmiernemu wysuszeniu produktu.

## II. Ocena żywotności i stanu odżywienia drożdży

### Barwienie drożdży błękitem metylenowym

Błękit metylenowy (ang. *methylene blue*) jest barwnikiem, wskaźnikiem pH oraz farmaceutykiem. Błękit metylenowy został zsyntetyzowany po raz pierwszy w 1883 r. Odkryto, że błękitem metylenowym można specyficznie wybarwić zarodźca malarii (*Plasmodium malariae*) w krwi pacjentów chorych na malarię. Podczas barwienia różnych tkanek zaobserwowano zmienną, odwracalną redukcję błękitu metylenowego do bezbarwnej formy błękitu leukometylenowego. Po ekspozycji na tlen, niebieski kolor utlenionego błękitu metylenowego powracał.

Błękit metylenowy jest kationowym barwnikiem, który nadaje niebieski kolor ujemnie naładowanym polifosforanowym częściom komórek (takim jak kwas rybonukleinowy). W przypadku drożdży zabarwieniu ulegają komórki martwe, w których zniszczona została błona komórkowa, warunkująca barierę półprzepuszczalności. Błękit metylenowy w środowisku wzrostu, w wyniku działania dehydrogenaz drożdży, przechodzi w form zredukowaną, bezbarwny leukobłękit.



za: Fajkis N, Kołaczkowski M, Marcinkowska M; Strategia repozycjonowania, czyli nowe zastosowanie dla starych leków. Wiadomości Chemiczne. 2018;72, 11-12

### Barwienie drożdży płynem Lugola

Glikogen jest silnie rozgałęzionym polisacharydem, homopolimerem zbudowanym z reszt  $\alpha$ -D glukozy połączonych ze sobą wiązaniami  $\alpha$ -1,4-glikozydowymi, a w miejscach rozgałęzień  $\alpha$ -1,6-glikozydowymi. Glikogen ma budowę zbliżoną do składnika skrobi – amylopektyny. Masa cząsteczkowa glikogenu jest różna i waha się w granicach od kilkuset tysięcy do kilku milionów Da.

Glikogen z jodem tworzy kompleks o barwie czerwonobrunatnej. Pozwala to na odróżnienie niektórych polisacharydów (glikogen, skrobia) od innych, gdyż kompleksy takie mogą być wytwarzane tylko przez cząsteczki o odpowiednio dużych wymiarach i uporządkowanej strukturze. Boczne łańcuchy rozgałęzionej cząsteczki glikogenu tworzą układy spiralne, w których środku występują wolne przestrzenie umożliwiające pomieszczenie cząsteczek jodu. Barwny efekt jest tym silniejszy, im większe są cząsteczki polisacharydu, a więc im większa jest liczba cząsteczek jodu związanego w kompleksie.

W warunkach obfitości substancji pokarmowych, np. na początku fermentacji, komórki drożdżowe wzbogacają się w substancje zapasowe, takie jak glikogen – rezerwowy węglowodan, którego zawartość może osiągnąć do 30% suchej substancji drożdży. Gromadzone są także dwucukier – trehaloza, fosforany i lipidy.

Ocena stanu odżywienia drożdży polega ona na określeniu zawartości glikogenu. Drożdże zawierające glikogen po dodaniu płynu Lugola będą barwiły się na kolor ciemnobrunatny, a nieposiadające glikogenu na jasnożółto. Obecność glikogenu świadczy o dobrym odżywieniu drożdży.