

Proces liofilizacji, jego zastosowanie i wybrane mechanizmy obronne organizmów przed odwodnieniem

Olga Narbutt, Henryk Paweł Dąbrowski, Grażyna Dąbrowska

DOI: 10.24131/3247.170203

Streszczenie:

Liofilizacja jest procesem składającym się z trzech etapów: zamrażania, sublimacji i desorpcji, polegającym na usunięciu rozpuszczalnika z zamrożanego materiału na drodze sublimacji. Dzięki temu, że proces ten prowadzony jest w niskiej temperaturze, zachowywane są wszystkie właściwości chemiczne produktu. Proces liofilizacji znajduje szerokie zastosowanie w utrwalaniu materiałów biologicznych, m.in.: bakterii, grzybów, ludzkich tkanek i osocza krwi, pomimo, że jest czasochłonny i wiąże się ze stosunkowo wysokimi kosztami. Wykorzystywany jest również w produkcji probiotyków, antybiotyków, szczepionek oraz suszonej żywności. Liofilizacja znalazła zastosowanie w konserwacji zabytków archeologicznych, takich jak mokre drewno, skóra, tkanina czy papier.

Słowa kluczowe: liofilizacja, suszenie próżniowe, konserwacja zabytków archeologicznych, biopreparaty

otrzymano: 15.07.2016; przyjęto: 20.12.2016; opublikowano: 16.08.2017



mgr Olga Narbutt: Zakład Genetyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu



dr Henryk Paweł Dąbrowski: Muzeum Archeologiczne w Biskupinie



dr hab. Grażyna Dąbrowska: Zakład Genetyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Przebieg procesu

Celem pracy jest omówienie zagadnień dotyczących odwodnienia i procesu liofilizacji, jednej z najpopularniejszych metod suszenia w niskiej temperaturze, polegającej na odwadnianiu poprzez sublimację zamrożonego produktu. W celu utrwalania lub konserwacji wielu substancji stosowane jest ich suszenie. Proces liofilizacji jest obecnie szeroko stosowany zarówno w utrwalaniu materiałów biologicznych, jak i w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym oraz kosmetycznym, a także w konserwacji zabytków archeologicznych. Liofilizacja to proces, w którym rozpuszczalnik (bardzo często woda) jest usuwany z zamrożonego roztworu. Terminem tym określa się także zamrażanie produktów poprzez sublimację (Rovero i wsp., 1991). Liofilizację na dużą skalę przemysłową stosowano już podczas II wojny światowej, kiedy to istniało wysokie zapotrzebowanie na osocze ludzkiej krwi (Franks, 1998).

Proces ten przebiega w niskiej temperaturze, dzięki czemu właściwości chemiczne produktów podlegają tylko niewielkim zmianom. Ma to bardzo istotne znaczenie w przypadku materiałów wrażliwych na temperaturę (Castro i wsp., 1997). Składają się na niego trzy etapy: zamrażanie, sublimacja oraz desorpcja (Perry, 1998).

Zamrażanie jest efektywnym etapem wysuszenia, podczas którego znaczna ilość rozpuszczalnika czyli wody jest oddzielona od substancji rozpuszczonych,

w wyniku czego powstaje lód (Tang i Pikal, 2004). Wówczas z roztworu, usunięciu ulega ponad 99% wody i dochodzi do gwałtownego zagęszczenia substancji. Wzrost stężenia liofilizowanego materiału w dużym stopniu zależy od temperatury w jakiej dochodzi do zamrażania a nie od początkowego stężenia substancji (Franks, 1998). W przypadku niektórych materiałów, takich jak preparaty białkowe, zamrożenie może prowadzić do naprężeń destabilizujących strukturę białka. Można tu wymienić: wzrost stężenia białek prowadzący do ich agregacji, zmiany pH związane z krystalizacją soli buforowych, redukcję oddziaływań hydrofobowych spowodowaną „efektem odwodnienia” tworzącego się lodu, który usuwa wodę z fazy białkowej oraz duży wzrost siły jonowej (Tang i Pikal, 2004). Niepożądanym procesom wytrącania, można zapobiec wykorzystując odpowiednie substancje wypełniające, które z zamrożonego roztworu powoli krystalizują. Ponadto w odpowiednio wysokim stężeniu hamują one wytrącanie soli oraz umożliwiają przebieg procesu zagęszczania poprzez zamrażanie po przekroczeniu granicy rozpuszczalności. Lepkość roztworu gwałtownie rośnie, aż do zahamowania powiększania się kryształów lodu. Faza roztworu może nadal zawierać do 50% niezamrożonej wody. Mieszanka tworzy strukturę przypominającą szklivo. Odbywa się to przy odpowiedniej temperaturze zeszklenia (T_g) oraz zawartości wody (wg'). Roztwór taki posiada właściwości mechaniczne ciała amorficznego oraz strukturę typową dla cieczy. Całość składa się z rozproszonych w szklistej masie kryształów lodu. Wygląd mieszaniny na poziomie mikroskopowym zależy od ich rozmiaru oraz rozkładu, a to z kolei w dużym stopniu uwarunkowane jest początkowym tempem chłodzenia (Franks, 1998). Ponadto wielkość kryształów wpływa na stabilność białek. Stabilizację można uzyskać zmniejszając powierzchnię lodu poprzez zwiększenie rozmiaru tworzących się kryształków. Efekt taki osią-

ga się po obniżeniu temperatury cieczy do temperatury przechłodzenia, czyli temperatury niższej niż temperatura jej krzepnięcia (zamrażania). Silniejsze przechłodzenie sprzyja tworzeniu się większej liczby kryształów o mniejszych wymiarach oraz większej powierzchni właściwej lodu. Proces zamrażania trwa zwykle kilka godzin (Tang i Pikal, 2004).

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. Energia musi być kontrolowana tak, aby wytworzoną parę można było usunąć w jak najkrótszym czasie, co zapobiega strukturalnemu uszkodzeniu suszonego materiału. Do jej usunięcia dochodzi w trakcie dyfuzyjnej wymiany masy przy różnicy ciśnień (określanej jako gradient ciśnienia) pomiędzy próbkami a zmrożoną powierzchnią skraplacza (ryc. 1).

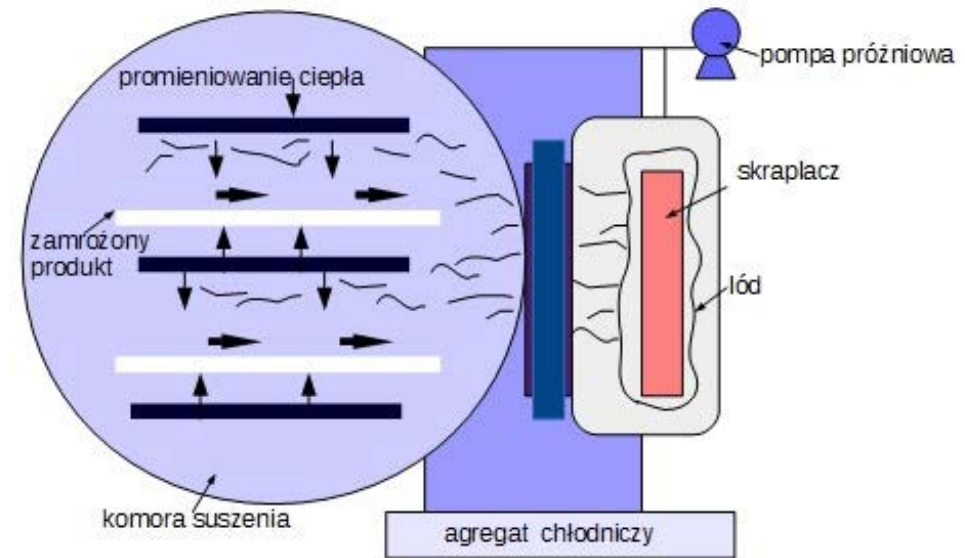
Na etapie suszenia do wychwytywania niewielkich ilości wody wykorzystuje się chemiczny środek suszący – dekatlenek tetrafosforu, jednakże lepszym rozwiązaniem jest użycie kondensatora (Perry, 1998).

Suszenie jest najbardziej czasochłonnym etapem liofilizacji, zatem optymalizacja ma tutaj istotne znaczenie ekonomiczne. Nieprawidłowo dobrane warunki mogą znacznie wydłużyć czas trwania procesu oraz negatywnie wpłynąć na jakość produktu. Kluczową rolę odgrywa tutaj temperatura produktu docelowego (T_p) oraz szybkie doprowadzenie do niej materiału i utrzymanie go w niej przez cały etap suszenia. T_p powinna być zawsze o kilka stopni niższa od temperatury przy której dochodzi do zniszczenia struktury (T_c) (Tang i Pikal, 2004). T_c ma ścisły związek z temperaturą zeszklenia¹ maksymalnie zamrożonego stężonego roztworu. Po-

¹ Temperatura zeszklenia (T_g) – temperatura, w której następuje przejście ze stanu ciekłego w stan szklisty, czego objawem jest skokowy wzrost lepkości substancji

Ryc. 1. Schemat liofilizatora.

Źródło: materiał własny.



wyżej T_c matryca traci swój kształt a jakość produktu spada (Krokida i wsp., 1998). Różnica pomiędzy T_p i T_c nazywana jest marginesem bezpieczeństwa. Wysoka T_p sprzyja szybszemu przebiegowi procesu. Wzrost T_p o 1°C skraca czas suszenia o 13%. Temperatura produktu docelowego powinna być zatem jak najbardziej zbliżona do temperatury przy której dochodzi do zniszczenia struktury. Suszenie przeprowadza się pod obniżonym ciśnieniem w komorze co przyspiesza przejście lodu w parę wodną. W celu skrócenia czasu sublimacji, czyli masy sublimowanego lodu (g) w jednostce czasu (h) powinno być ono znacznie niższe od ciśnienia pary lodu w temperaturze produktu docelowego. Obniżone ciśnienie komory sprzyja szybkiemu usuwaniu wody, jednak może być przyczyną problemów takich jak zanieczyszczenie produktu lotnymi składnikami korków lub olejem z pompy oraz niejednorodnego przepływu ciepła, który powoduje nierównomierną temperaturę

pomiędzy próbkami (Tang i Pikal, 2004). Bezpośrednio po zakończeniu suszenia faza roztworu może ciągle zawierać pewną ilość silnie związanej niezamrożonej wody. Jej zawartość wynosi około 25-30 g w 100 g stałej masy a usunięcie odbywa się w trzecim i zarazem ostatnim etapie liofilizacji – desorpcji (Perry, 1998).

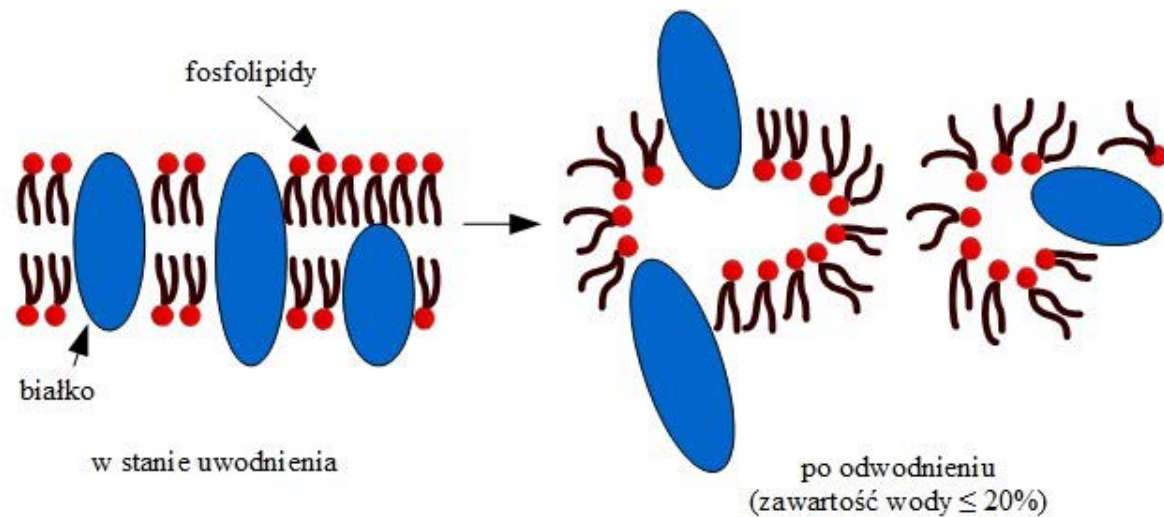
Desorpcja, zwana także drugim suszeniem lub też dosuszeniem, umożliwia zredukowanie pozostałej wilgoci do poziomu optymalnego dla produktu, który wynosi zwykle mniej niż 1%. W tym celu powoli podnosi się temperaturę materiału. Najlepszy efekt desorpcji osiąga się przeprowadzając ją krótko w wyższej temperaturze. Materiały amorficzne są znacznie trudniejsze do wysuszenia niż krystaliczne, wymagają one dłuższego czasu i wyższej temperatury do usunięcia wilgoci. Na proces dosuszenia wpływa także stężenie substancji rozpuszczonej. Przy większym stężeniu roztworu (powyżej 10% ciała stałego w roztworze) suchy produkt posiada

mniejszą powierzchnię specyficzną (m^2/g), co utrudnia usunięcie zaabsorbowanej wody. W takim wypadku ukończenie suszenia wymaga wyższej temperatury lub dłuższego czasu. Przeciętny okres dosuszenia trwa 3-6 godzin w zakresie temperatur 40-50°C. Warunki takie nie powodują denaturacji białek, które w wysuszonej formie mogą przetrwać nawet w temp. 100°C. Tempo desorpcji nie jest uzależnione od ciśnienia panującego w komorze (Tang i Pikal, 2004).

Do użytku komercyjnego najczęściej wykorzystuje się liofilizatory wirówkowe oraz półkowe. Różnią się one sposobem sprzężenia suszonej substancji z kondensatorem. Suszarki obrotowe posiadają cylindryczny zbiornik, który w trakcie suszenia obraca się, dzięki czemu próbki są równomiernie suszone (Nireesha i wsp., 2013). Liofilizatory półkowe posiadają zazwyczaj prostokątny zbiornik z półkami, na których można umieszczać materiały. Na rynku dostępne są również liofilizatory kolektorowe, które zbudowane są z krótkiej tuby łączącej kilka naczyń ze skraplaczem.

Substancje ochronne stosowane podczas liofilizacji i zaangażowane w mechanizmy obronne organizmów przed odwodnieniem

Liofilizacja jest często wykorzystywana do konserwacji materiałów biologicznych (Carvalho i wsp., 2003). Wiąże się ona jednak z niebezpieczeństwem denaturacji wrażliwych białek, co prowadzi do obniżenia przeżywalności lub aktywności komórek (Berner i Viernstein, 2006). Uszkodzenia układów biologicznych wynikają ze zmian w fizycznym stanie lipidów błonowych oraz zmian w strukturze białek. Usunięcie wody związanej wiązaniami wodorowymi z polarnymi częściami fosfolipidów (potocznie zwanymi głowami) tworzących dwuwarstwową błonę komórkową jest przyczyną zwiększenia upakowania głów oraz przybliżenia się do



Ryc. 2. Zmiana struktury błony komórkowej u roślin pod wpływem odwodnienia

Źródło: na podstawie Kopcewicz i Lewak, 2012.

siebie łańcuchów acylowych dzięki oddziaływaniom van der Waalsa (ryc. 2)..

W rezultacie lipidy przechodzą ze stanu ciekłokrystalicznego do stanu żelu (Leslie i wsp.1995). Ponowne uwodnienie powoduje, że suche błony w temperaturze pokojowej z powrotem przybierają postać płynną (Crowe i wsp., 1987). Proces liofilizacji jest powszechnie stosowany do przygotowania zliofilizowanych mikroorganizmów. U wielu rodzajów bakterii i grzybów zaobserwowano dużą przeżywalność po przeprowadzeniu tego procesu oraz długoterminowym przechowywaniu liofilizatów. Żywność zliofilizowanych szczepów bakteryjnych może utrzymać się ponad dwadzieścia lat, aby było to możliwe liczebność bakterii przed liofilizacją powinna wynosić 10^6 – 10^{10} komórek w 1 cm^3 (Miyamoto-Shinohara i wsp., 2000).

W celu opracowania biopreparatu do fitodesalinizacji² gleb, Dąbrowska i wsp. (2016) sprawdzili jaki wpływ na przeżywalność pięciu szczepów bakteryjnych: *Bacillus* sp., *Bacteroidetes bacterium*, *Massilia* sp., *Pseudomonas fluorescens* i *Variovorax* sp. ma proces liofilizacji, czas i temperatura przechowywania liofilizatów bakteryjnych. Wykazali, że zarówno liofilizacja, wzrost temperatury, jak i czas przechowywania liofilizatów istotnie obniża przeżywalność bakterii ryzosferowych. Zaobserwowali, że przeżywalność bakterii stymulujących wzrost roślin w liofilizatach zależy od rodzaju szczepu bakteryjnego. Wszystkie liofilizowane mikroorganizmy wykazywały najwyższą przeżywalność po przechowywaniu w temperaturze 4°C. Wiadomo, że

² Fitodesalinizacja – usuwanie zanieczyszczeń z gleb, spowodowanych wysokim zasoleniem z wykorzystaniem roślin

stabilność liofilizowanego materiału zależy od temperatury; im jest niższa tym, czas przetrzymywania może być dłuższy (Carvalho i wsp. 2004). Podobnie w badaniach Janczak i wsp. (2016) dotyczących opracowania biopreparatu, który mógłby potencjalnie znaleźć zastosowanie w biodegradacji tworzyw sztucznych stwierdzono, że proces liofilizacji wpływał na spadek przeżywalności bakterii *Serratia* sp. Sugeruje się, że bakterie Gram-dodatnie są bardziej odporne na proces liofilizacji niż bakterie Gram-ujemne, co prawdopodobnie wynika z różnic w budowie powierzchni komórek bakteryjnych (Miyamoto – Shinohara i wsp., 2000). Natomiast Dąbrowska i wsp. (2016) wykazali, że bakterie Gram-dodatnie *Bacillus* sp. po liofilizacji charakteryzowały się mniejszą żywotnością niż Gram-ujemne bakterie *B. bacterium*. Autorzy sugerują, że mogło być to spowodowane brakiem obecności substancji osmoprotekcyjnych.

Powszechnym sposobem zredukowania opisanych wyżej niekorzystnych skutków jest dodawanie do próbek przed procesem liofilizacji substancji ochronnych, do których możemy zaliczyć między innymi: odtłuszczone mleko, glicerynę, dimetylosulfotlenek (Leslie i wsp., 1995), disacharydy (na przykład: sacharozę, laktozę, trehalozę), polialkohole (mannitol, sorbitol i laktitol), aminokwasy (Siaterlis i wsp., 2009), pepton oraz albuminę wołową (Pehkonen i wsp., 2008). Obecność wymienionych substancji pełni ochronną rolę przed uszkodzeniami komórek podczas liofilizacji (Leslie i wsp., 1995).

Właściwy czynnik ochronny powinien zabezpieczać materiał biologiczny przed niską temperaturą, być łatwy do wysuszenia oraz tworzyć dobrą matrycę aby zapewnić stabilność struktury i łatwe nawadnianie (Zhao i Zhang, 2005). Fizyczny mechanizm ochronny tych związków nie został jeszcze całkowicie wyjaśnio-

ny (Leslie i wsp., 1995), choć wydaje się, że większość z nich zapobiega uszkodzeniom błony komórkowej zapewniając prawidłowe funkcjonowanie białek i/lub wiązanie roztworu do białek wysuszonych zastępując tym samym wodę (Martos i wsp., 2007).

Formowanie szkliwa zwiększa lepkość w obrębie oraz wokół komórki, co powoduje zmniejszenie ruchliwości cząsteczek do minimum. Amorficzne ciało zatrzymuje również uwalniane przez komórkę przed zamrożeniem produkty odpadowe, które nie mogą się koncentrować oraz zapoczątkować nieodwracalnych zmian elektrochemicznych w błonie komórkowej podczas przechowywania. Z kolei eutektyczne³ sole po osiągnięciu punktu zamarzania pozostają substancją rozpuszczoną oraz tworzą kryształy. Formujący się lód powoduje uszkodzenia błony plazmatycznej, co może prowadzić do uszkodzenia lub rozpadu komórki oraz wypływania jej zawartości po rozmrożeniu. Po osiągnięciu punktu zamarzania następuje tworzenie kryształów a reszta soli, która pozostaje w roztworze skupia się wokoło lodu. Ten silnie stężony roztwór soli w obecności substancji uwolnionych przez komórki przed zamrożeniem również może powodować nieodwracalne uszkodzenia (Morgan i wsp., 2006).

Wiele gatunków roślin i zwierząt posiada zdolność do przeżycia w stanie prawie całkowitego odwodnienia (czyli anhydrobiozy) dzięki akumulacji disacharydów: sacharozy i trehalozy. Z tego powodu zaczęto wykorzystywać te i inne dwucukry do zwiększenia tolerancji komórek na zmiany podczas wysuszania. Dodane przed suszeniem disacharydy tworzą wiązania wodorowe, które uległy zerwaniu w trakcie tego etapu oraz tworzą szkliwo o wysokiej lepkości (Miao i wsp., 2008). Na szczególną uwagę zasługuje tutaj trehaloza, która dzie-

³ Mieszanina eutektyczna (nazwa pochodzi od greckiego eutektos, co oznacza "łatwo topliwy") mieszanina dwóch lub więcej faz o określonym składzie, która wydziela się z roztworów ciekłych w pewnej temperaturze, zwanej temperaturą eutektyczną.

ki swojej wysokiej temperaturze zeszklenia i zdolności do oddziaływania ze składnikami błon komórkowych po odwodnieniu efektywnie chroni układy biologiczne. Ponadto sprzyja ona zachowaniu struktury i funkcji białek. Podobne właściwości posiada laktoza. Niektóre substancje ochronne, stosowane pojedynczo działają znacznie słabiej niż gdy wykorzystuje się je wraz z innymi substancjami w formie mieszaniny (Pehkonen i wsp., 2008). Dzieje się tak w przypadku użycia trehalozy, która wraz z odtłuszczonym mlekiem lub sacharozą w zdecydowanie większym stopniu zwiększa przeżywalność bakterii *Lactobacillus salivarius* niż zastosowana osobno (Zayed i Ross, 2004). Do sacharydów odgrywających rolę krioprotektantów mikroorganizmów można zaliczyć także: glukozę (Suzuki i wsp., 1996), ksylozę, maltozę, rafinozę, dekstran, syntetyczny polimer sacharozy – ficoll oraz gumę arabską (Hubalek, 2003).

Prawie każdy proces przebiegający w komórkach roślinnych ulega zmianom pod wpływem deficytu wody. Odporność na suszę może zależeć od zdolności rośliny do unikania odwodnienia organizmu lub od tolerowania dehydratacji protoplastu. Rośliny zdolne do tolerowania desykcji⁴ (organizmy pojkilohydryczne) występują w środowiskach, w których okresy suszy przeplatają się z okresami zwiększonej wilgotności (Kopcewicz i Lewak, 2012). U organizmów pojkilohydrycznych szybko dochodzi do wyrównania zawartości wody między komórkami a ich środowiskiem, co jest spowodowane brakiem centralnej wakuoli w komórkach. Komórki bakterii, sinic, zielenic, grzybów, porostów kurczą się równomiernie w trakcie wysychania, lecz nie dochodzi do zniszczenia ich ultrastruktury.

⁴ Stan desykcacji, tzn. utraty 90% (i więcej) wody komórkowej następuje wskutek wyrównania się potencjałów wody komórki i otaczającego powietrza. Dla większości roślin taka utrata wody oznacza śmierć, natomiast rośliny pojkilohydryczne lub zmarłychwstanki uruchamiają szereg mechanizmów komórkowych pozwalających tolerować okresy suszy (Woźny i Przybył, 2004).

Rośliny zdolne do tolerowania desykcji przeżywiają okresy silnego odwodnienia dzięki przejściu w stan anabiozy charakteryzujący się prawie całkowitym ustaniem aktywności metabolicznej. W czasie postępującego odwodnienia syntetyzują specyficzne białka dehydryny, a do błon włączają niektóre cukry stabilizujące fosfolipidy (rafinoza, trehaloza). Dzięki tym procesom ultrastruktura silnie odwodnionych komórek ulega stosunkowo małym zmianom.

Gdy zwiększa się dostępność wody organizm pojkilohydryczny szybko się uwadnia, procesy metaboliczne ulegają uaktywnieniu, zdolność do wzrostu zostaje przywrócona. Niektórym roślinom podczas odwodnienia towarzyszy jednak intensywna degradacja organelli, których odbudowa może trwać 1-2 dni. Protisty i niektóre gatunki roślin naczyniowych zdolne do tolerowania odwodnienia, występują w gorących i suchych rejonach Afryki Płd. (*Camaegigas intrepidus*, *Myrothamnus flabellifolia*, *Talbotia elegans*) i Australii (*Borya nitida*, kilka gatunków traw). Do form pojkilohydrycznych należą też ziarna pyłku i nasiona. Dla większości gatunków podstawową przyczyną spoczynku nasion jest odwodnienie, które prowadzi do zmniejszenia zawartości wody do kilku procent suchej masy. Stanowi to jedną z przyczyn uniemożliwiających kiełkowanie dojrzałych nasion w owocu, jak i niesprzyjającym, ubogim w wodę środowisku. Hamowanie kiełkowania przez brak wody jest najczęściej wspomagane przez inne mechanizmy warunkujące spoczynek nasion. Kiełkowanie rozpoczyna się, gdy nasiono znajdzie się w warunkach umożliwiających pęcznienie poprzez uwodnienie, odpowiednią temperaturę i warunki świetlne oraz substancje występujące w atmosferze i w podłożu (Kopcewicz i Lewak, 2012).

U wieloletnich roślin klimatu umiarkowanego i arktycznego zdolność pędów i liści do tolerowania odwodnienia wykazuje regularne zmiany sezonowe. Naj-

wieksza jest w zimie, najmniejsza – w okresie szybkiego wzrostu tkanek na wiosnę. Wiele roślin może się zahartować w warunkach deficytu wody w środowisku, jeśli w trakcie wzrostu zostaną narażone na umiarkowany stres wodny trwający przez parę dni. W regulacji tego procesu uczestniczy m.in. kwas abscysynowy, od którego zależy indukcja ekspresji niektórych genów (Kopcewicz i Lewak, 2012).

Zdolność tolerowania skutków pozakomórkowej krystalizacji wody przez protoplast jest podstawowym warunkiem przeżycia okresów mrozu przez rośliny. Łód powstaje najczęściej poza protoplastem: w przestworach międzykomórkowych oraz między ścianą komórkową i protoplastem. Dochodzi do odwodnienia i skurczu komórki. Do organizmów tolerujących zamarzanie należą niektóre słodkowodne protisty, mchy wszystkich stref klimatycznych oraz dwu- i wieloletnie rośliny lądowe, zasiedlające tereny, na których występują mroźne zimy. Ochrona przed dehydratacją polega głównie na zwiększeniu sił utrzymujących wodę w komórce, a więc na obniżeniu potencjału wody w komórce. Przyczynia się do tego akumulacja w wakuoli związków osmotycznie czynnych, takich jak węglowodany, poliole, małowcząsteczkowe związki azotowe oraz białka hydrofilowe w obszarze cytoplazmy. Ochrona struktur komórkowych przed skutkami silnej dehydratacji polega na wzbogaceniu błony w niektóre bardziej stabilne lipidy i nagromadzeniu w cytoplazmie substancji ochronnych – krioprotektantów (niektóre cukry, małowcząsteczkowe związki azotu: aminokwasy, np. prolina). Substancje te stabilizują strukturę błon i zapobiegają zmianom konformacyjnym białek (Kopcewicz i Lewak, 2012). Mechanizmy odpowiedzialne za tolerowanie dehydratacji wywołanej przez mróz są podobne lub takie same jak mechanizmy odporności komórek na odwodnienie spowodowane niedoborem wody w środowisku.

Zwierzęta żyjące w strefie klimatu umiarkowanego i chłodnego często są narażone na długotrwałe działanie silnego mrozu w zimie. Zwierzę może rozwinąć tolerancję na zamarzanie, co oznacza zdolność przeżycia w warunkach głębokiego zamrożenia i pomimo powstawania lodu w organizmie. Substancją obniżającą punkt zamarzania czyli substancją krioprotekcyjną odkryto po raz pierwszy u antarktycznej ryby *Trematomus borchgrevinki*, której krew zawiera glikoproteinę zapobiegającą przyłączaniu wody do sieci krystalicznej lodu, którego kryształy nie mogą dzięki temu rosnąć. Umożliwia to tej rybie życie w wodzie o temperaturze $-1,8^{\circ}\text{C}$ (Schmidt-Nielsen, 2008).

Substancją szczególnie skutecznie obniżającą punkt zamarzania, a jeszcze bardziej punkt przechłodzenia, jest glicerol. Występuje on często w dużym stężeniu w organizmie zimujących owadów, zwiększając ich tolerancję na zamarzanie. Na przykład u galasówki wierzbowej (*Rhabdophaga strobiloides*) organizm zawiera 50% glicerolu i stan przechłodzenia utrzymuje się aż do temperatury -60°C . Wiele owadów m.in. *Cephus cinctus*, *Eurosta solidaginis*, *Bracon cephi*, w płynach ustrojowych zawiera silnie stężony glicerol i inne alkohole wielowodorotlenowe, jak sorbitol. Stężenie tych substancji zwiększa się przed rozpoczęciem zimy w odpowiedzi na spadek temperatury otoczenia. U żaby leśnej (*Rana sylvatica*), w odpowiedzi na rozpoczęcie powstawania lodu szybko wzrasta stężenie glukozy we krwi, co prawdopodobnie zwiększa jej odporność na mróz (Schmidt-Nielsen, 2008).

Obecnie wiadomo, że w przemieszczaniu się wody przez błony w komórce bakterii, grzybów, roślin i zwierząt biorą udział białka akwaporyny (Chrispeels i Murel, 1994; Kirch i wsp. 2000; Tyerman i wsp. 2002). Obecność akwaporyn znacznie zwiększa przeżywalność mikroorganizmów podczas stresu związanego z zamrażaniem. Może to mieć duże znaczenie na przy-

kład dla bakterii patogennych, które są roznoszone drogą kropelkową. Zimą komórki posiadające bardzo małą objętość zamarzają na mroźnym powietrzu szybko i równie szybko odmarzają po zetknięciu się z ciałami o wyższej temperaturze.

Odkrycie faktu, że obecność akwaporyn zwiększa komórkową tolerancję na szybkie zamarzanie, potwierdziło teoretyczne przypuszczenia, że transport wody cytoplazmatycznej przez błonę komórkową ma wpływ na tolerancję na zamrażanie. Podczas zamarzania komórek, wodne otoczenie zamarza szybciej niż wnętrze komórki, ponieważ posiada ono mniejszą osmolarność w stosunku do cytoplazmy (Mordaka i Dąbrowska, 2007). Zamarzanie pożywki i przechłodzenie się wnętrza komórki powoduje utworzenie się gradientu wody poprzez błonę komórkową. Ta sytuacja może być rozwiązana poprzez odpływ wody z komórki, bądź jej zamarznięcie (Tanghe i wsp., 2006). Zarówno dane doświadczalne jak i teoretyczne modele transportu wody wykazują wypływ wody z komórek w temperaturze poniżej zera. Wypływ ten jest znacznie większy podczas powolnego zamrażania komórek. Dane te wskazują, że proces transportu wody z komórki w warunkach chłodzenia komórek w temperaturze poniżej zera jest limitowany transportem wody przez błonę komórkową (Tanghe i wsp., 2006).

Jeżeli komórki zamarzają szybko, równie szybko wzrasta przechłodzenie cytoplazmy. Jednocześnie niewielka ilość wody zdąży wypłynąć z komórki poprzez błonę komórkową. Niska temperatura powoduje tworzenie się kryształów lodu, które niszczą błony komórkowe i degradują organelle komórkowe. W tych warunkach podwyższona ekspresja genów akwaporyn zwiększa przepuszczalność błony komórkowej dla wody i dzięki temu następuje usunięcie większej ilości wody z komórki. Większy odpływ wody spowoduje tworzenie się mniejszej ilości kryształów w błonie plazmatycznej,

a w rezultacie mniejsze uszkodzenie komórki. Dla zamrażania w tempie $30-35^{\circ}\text{C min}^{-1}$ występuje znaczne zmniejszenie wrażliwości na stres związany z zamrażaniem w komórkach, transformowanych, zdolnych do podwyższonej aktywacji akwaporyn. (Tanghe i wsp., 2006).

Badano między innymi wpływ akwaporyn na zamrażanie u *Candida albicans* i zauważono, że szczep nieposiadający akwaporyn miał znacznie gorszą przeżywalność w stosunku do szczepu posiadającego funkcjonalne białko (Tanghe i wsp., 2005).

Na odporność *Saccharomyces cerevisiae* na stres związany z zamrażaniem i rozmrażaniem ma również wpływ glicerol. Wewnątrzkomórkowy glicerol znacznie zwiększa tolerancję na zamrażanie i odmrażanie komórek drożdży (Izawa i wsp., 2004).

Skutecznymi substancjami ochronnymi są również alkohole polihydroksylowe, takie jak sorbitol, mannitol (Carvalho i wsp., 2003) oraz galaktikol (Hubalek, 2003). Ich mechanizm nie został jeszcze w pełni poznany, jednak stawiane są hipotezy próbujące wyjaśnić sposób ich działania (Carvalho i wsp., 2003). Według nich polialkohole utrzymują odpowiedni turgor komórek w wyniku magazynowania mannitolu przy niskiej aktywności wody, stabilizują strukturę lipidów błonowych bądź też chronią przed uszkodzeniami oksydacyjnymi wychwytyjąc reaktywne wolne rodniki tlenu (Carvalho i wsp., 2003). Znacznie rzadziej stosowane są alkohole monowodorotlenowe, przede wszystkim ze względu na ich toksyczny wpływ na wiele układów biologicznych. Spośród tej grupy czynników ochronnych w przypadku komórek eukariotycznych i prokariotycznych skutecznie oddziałują metanol i etanol. Jako krioprotektanty mogą służyć ponadto: glikol etylenowy, propylenowy (Hubalek, 2003) oraz dietylenowy (Postgate i Hunter, 1961), politlenek etylenu (PEG) a także glicerol (Hollander i Nell, 1954) choć jest on nieskuteczny w przy-

padku niektórych mikroorganizmów: gronkowców (*Staphylococcus*), pakietowców (*Morococcus*), paciorkowców (*Streptococcus*), bakterii z rodzaju *Lactococcus*, *Pseudomonas*, maczugowca błonnicy (*Corynebacterium diphtheriae*) oraz pałeczki okrężnicy (*Escherichia coli*). Kolejną grupą związków używanymi do ochrony materiałów biologicznych podczas liofilizacji są sulfotlenki – rozpuszczalne w wodzie tioetery zawierające w cząsteczce jeden atom tlenu. Najczęściej stosowanym sulfotlenkiem jest bardzo efektywny dimetylosulfotlenek, którego zaletą jest szybkość przedostawania się do komórek (Hubalek, 2003).

Zdolność do zachowania żywotności komórek podczas liofilizacji posiadają także niektóre związki o niskiej masie cząsteczkowej, takie jak glutaminian sodu oraz asparaginian sodu. Ich skuteczność związana jest z obecnością w cząsteczkach tych związków, grupy aminowej, drugorzędowej grupy hydroksylowej lub obu grup jednocześnie (de Valdez i wsp., 1983). Glutaminian sodu zapewnia stabilność strukturalną dzięki interakcjom pomiędzy swoją grupą aminową a grupą karboksylową białek mikroorganizmów. Posiada on także zdolność do zatrzymywania większej ilości wilgoci powstałej podczas liofilizacji (Carvalho i wsp., 2003). Podobne właściwości wykazuje prolina (Martos i wsp., 2007).

Do krioprotektantów można zaliczyć również amidy: acetamid (Gibson i wsp., 1966), dimetyloacetamid oraz dimetyloformamid a także związki heterocykliczne: N-metylopirolidon i poliwinylpirolidon (Hubalek, 2003).

Zastosowanie procesu liofilizacji

Liofilizacja jest powszechnie wykorzystywana w przemyśle farmaceutycznym do poprawy trwałości i stabilności nietrwałych leków, zwłaszcza tych białko-

wych podczas długotrwałego przechowywania (Tang i Pikal, 2004). Ponadto preparaty liofilizowane są łatwiejsze w transporcie oraz składowaniu (Wang, 2000). Metoda ta służy również do produkcji tabletek ulegających szybkiemu rozpadowi w jamie ustnej (ang. orally disintegrating tablets – ODTs). Zaletą liofilizacji jest możliwość tworzenia leków zawierających termolabilne⁵ substancje lecznicze, jednak tabletki takie są podatne na uszkodzenia mechaniczne i wymagają zabezpieczeń przed wilgocią (Jachowicz i Krupa, 2010). Do preparatów w postaci tabletek ODTs należą m.in. paracetamol i ibuprofen. Ponadto liofilizacja znajduje zastosowanie przy wytwarzaniu antybiotyków i szczepionek. Przykładem może być szczepionka przeciwko gruźlicy (*Bacillus Calmette-Guérin* – BCG) (Ungar i wsp., 1962) i grypie (Amorij i wsp., 2008). Procesowi liofilizacji poddaje się także bakterie wykorzystywane w produkcji probiotyków. Uzyskane preparaty są trwałe oraz odznaczają się wysokim poziomem żywotności podczas przechowywania (Jach i wsp., 2013). Bakterie mlekowe (ang. lactic acid bacteria – LAB) odgrywają kluczową rolę w produkcji żywności fermentowanej, w tym produktów mlecznych i wina a także warzyw i mięsa. Przemysłowe wykorzystanie LAB jako kultury starterowej i/lub probiotycznej opiera się na zagęszczeniu bakterii oraz zapewnieniu długoterminowej dostawy żywych i funkcjonalnych kultur, co osiąga się poprzez liofilizację (Carvalho i wsp., 2003).

Liofilizacja umożliwia także przechowywanie ludzkich tkanek do przeszczepów nawet w temperaturze pokojowej (Gresham, 1964). Ma ona jednak pewną wadę, a mianowicie pozbawia tkankę kostną białek wzrostowych kości (ang. bone morphogenetic protein – BMP), co negatywnie wpływa na proces osteogenezy (Łobacz,

5 Związek termolabilny – związek chemiczny wrażliwy na wysoką temperaturę. Po poddaniu go wysokiej temperaturze ulega rozpadowi lub traci aktywność biologiczną. Do związków termolabilnych zaliczamy m.in. białka, kwasy nukleinowe.

2004). Procesowi można poddawać tętnice (Marrangoni i Cecchini, 1951) a także więzadła i łąkotki dzięki czemu mogą być one przechowywane do pięciu lat, choć ich barwa, wygląd oraz struktura zostają nieco osłabione. Uwodnienie zliofilizowanych więzadeł musi być przeprowadzone minimum 30 minut przed transplantacją (Vangsness i wsp., 2003). Liofilizacja umożliwia również konserwowanie enzymów, przeciwciał monoklonalnych (Fissore i Barresi, 2011) oraz osocza krwi. Osocze takie zachowuje stabilność nawet w ciągu dwóch lat przechowywania w temperaturze otoczenia oraz jest łatwe do uwodnienia (Daban i wsp., 2010).

Kolejną gałęzią przemysłu wykorzystującą liofilizację jest kosmetologia. Suszeniu sublimacyjnemu poddaje się algi wchodzące w skład: kremów, mleczek, toników, maseczek, szamponów, odżywek do włosów, żeli do mycia oraz mydeł, dzięki czemu zachowują one niemal wszystkie swoje właściwości (Schroeder, 2010).

Liofilizacja ma również zastosowanie w przemyśle spożywczym.

Liofilizowana żywność charakteryzuje się niską gęstością usypową, dużą porowatością, właściwym smakiem i aromatem oraz lepszymi właściwościami nawadniającymi w porównaniu do alternatywnych metod suszenia, takich jak suszenie próżniowe czy osmotyczne z wykorzystaniem wysokich stężeń soli (Krokida i wsp., 1998). Ponadto dzięki temu, że produkty są suszone w niskiej temperaturze ich najważniejsze składniki odżywcze, takie jak witaminy i białka nie ulegają degradacji (Serownik, 2012). Liofilizację wykorzystuje się do produkcji: suszonych owoców, warzyw i ziół, czy kawy rozpuszczalnej (Piotrowski i wsp., 2008), przypraw (Sujka i wsp., 2013) oraz składników do gotowych dań (Pan i wsp., 2008), w tym suszu mięsnego (Hęś i wsp., 2011). Porowata struktura w przypadku liofilizowanego mięsa stanowi problem, ponieważ podczas przechowywania do porów dostaje się tlen. Następnie dyfunduje on do

wnętrza struktury i prowadzi do oksydacji tłuszczów, czyli ich jęlczenia. W związku z tym oprócz wykorzystywania opakowań nieprzepuszczających powietrza konieczne jest także stosowanie środków przeciwutleniających, najlepiej naturalnych, takich jak witamina C i E czy polifenoli ekstrahowanych z roślin (Hęś i wsp., 2011). Głównymi przeszkodami rozpowszechnienia metody liofilizacji są stosunkowo duże koszty oraz długi czas trwania procesu (Sujka i wsp., 2013). Na skalę laboratoryjną liofilizacja wykorzystywana była do suszenia niektórych owoców i warzyw, np.: truskawek (Ciużyńska i Lenart, 2009), borówek (Paślawska, 2005), owoców dzikiej róży (Rutkowska i wsp., 2012), awokado (Souza i wsp., 2011), pomidorów (George i wsp., 2011), korzeni marchwi (Gawalek, 2005), selera (Sujka i wsp., 2013); grzybów: pieczarek (Serownik, 2012) i drożdży (Kamińska-Dwórznicza i Skoniecka, 2013) oraz liści herbaty (Jaiprakash i wsp., 2003). Żywność liofilizowana początkowo wykorzystywana była jedynie przez wojsko i podczas wypraw kosmicznych. Obecnie wraz ze zwiększeniem dostępności liofilizowanych produktów spożywczych i obniżeniem ich cen na rynku, żywność ta jest coraz częściej wykorzystywana przez osoby prowadzące aktywny tryb życia, np. uprawiające sporty ekstremalne lub turystykę.

Liofilizacja ma swoje zastosowanie również w konserwacji zabytków archeologicznych (Morris i Seifert, 1978). Umożliwia ona konserwowanie materiałów pochodzenia organicznego, takich jak mokre drewno (Babiński, 2007), skóra i tkaniny (Jakes i Mitchell, 1992).

Liofilizacja pozwala na usunięcie wody bez deformacji i uszkodzenia struktury suszonego drewna tak aby zabytek po konserwacji zachował swój pierwotny kształt. Częścią metody liofilizacji jest dobór rodzaju i stężenia impregnatu (np. glikole polietylenowe, cukry). Metoda suszenia próżniowego pozwala na mniejsze wchłonięcie środków modyfikujących do konserwo-

wanego drewna aniżeli suszenie drewna na powietrzu. Przykładami zastosowania liofilizacji w konserwacji drewnianych obiektów wydobywanych z mokrych stanowisk archeologicznych są: drewno dębu z elementów konstrukcyjnych budynku z XIII wieku odkrytego w Szczecinie (Babiński, 2007), drewno sosny zwyczajnej pobrane z elementu konstrukcyjnego budynku z XVII wieku odkrytego w Gdańsku (Babiński, 2007a). Metodę freeze-drying zastosowano do osuszania drewna jesionu i leszczyny pochodzących z nawarstwień wczesnośredniowiecznych z Jeziora Żarańsko (Grupa i wsp., 2012). W 2015 roku w Oslo, na międzynarodowych warsztatach konserwatorskich, zorganizowanych przez Norweskie Muzeum Morskie w Oslo i Narodowe Muzeum Morskie w Gdańsku, omawiano konserwację i rekonstrukcję drewnianych wraków podnoszonych z dna morskiego z zastosowaniem najnowocześniejszej metody konserwacji wraków – freeze-drying mającej na celu ratowanie bezcennych dla kultury norweskiej łodzi z IX wieku.

Suszenie próżniowe jest stosowane na całym świecie również w konserwacji zabytków skórzanych wydobywanych z mokrego środowiska. W wyniku długotrwałego zalegania w ziemi skóra traci swoje pierwotne właściwości oraz narażona jest na biodegradacyjne działanie drobnoustrojów. Dlatego też należy wymienić wodę, która jest przesączona na impregnat zapewniający zachowanie niezmięnionej struktury zabytku skórzanego. Suszenie sublimacyjne zastosowano w badaniach prowadzonych na skórze bydlęcej butów pochodzących z XIV/XV wieku znalezionych w Gdańsku (Drażkowska i wsp., 2011).

Proces liofilizacji to obecnie jedna z najskuteczniejszych metod suszenia papieru, pochodzącego z zalanych zbiorów bibliotecznych czy archiwalnych. Zaletą liofilizacji jest możliwość stabilizacji mokrego papieru poprzez jego zamrażanie a to pozwala na zahamowa-

nie procesów niszczących papier m.in. rozwój grzybów pleśniowych. Metoda ta daje dobre rezultaty: utrwalenie atramentu i barwników, wysuszone kartki nie ulegają większym odkształceniom i łatwo rozdzielają się (Stachowska-Musiał i Zemło, 1999). Ponadto metoda ta nie naraża pracowników na długotrwały kontakt z potencjalnie niebezpiecznym materiałem biologicznym. W 1997 roku podczas wielkiej powodzi, po raz pierwszy w Polsce, zastosowano liofilizację jako metodę suszenia zalanych księgozbiorów z Biblioteki Uniwersyteckiej we Wrocławiu.

Liofilizacja, proces złożony pozwalający na znaczne zachowanie właściwości fizycznych, chemicznych i biologicznych produktu. Umożliwia to konserwowanie, stabilność oraz długotrwałe przechowywanie m.in. produktów spożywczych, nietrwałych leków, probiotyków, osocza krwi i produktów spożywczych. Usunięcie wody z materiału przy niskiej temperaturze, powoduje zahamowanie większości reakcji chemicznych i mikrobiologicznych dzięki czemu uzyskuje się produkt o bardzo wysokiej jakości. W warunkach naturalnych bardzo istotny jest proces odwodnienia, który warunkuje przetrwanie organizmów w niekorzystnych warunkach środowiskowych. Jest niezbędny podczas wytwarzania nasion, zapewnia więc ciągłość gatunków. Z kolei proces odwodnienia osmotycznego jest stosowany do uzyskiwania żywności o małym stopniu przetworzenia, co pozwala na zachowanie większej wartości odżywczej i walorów sensorycznych produktów. Metoda suszenia liofilizacyjnego stosowana w konserwacji mokrych zabytków drewnianych ma istotne znaczenie dla zachowania stabilizacji drewna oraz uniknięcia nieodwracalnych zmian w jego strukturze drewna. Nadal głównym ograniczeniem liofilizacji są jej wysokie koszty. Z uwagi na możliwość wszechstronnego zastosowania, w zakresie omawianego tematu możemy w przyszłości spodziewać się kolejnych interesujących rozwiązań. Za-

interesowanie procesami liofilizacji i odwodnienia u organizmów prawdopodobnie będzie wciąż wzrastało.

Literatura

- Amorij JP, Huckriede A, Wilschut J, Frijlink HW, Hinrichs WL (2008). Development of stable influenza vaccine powder formulations: challenges and possibilities. *Pharmaceutical Research*, 25:1256-1273.
- Babiński L (2007). Influence of pre-treatment on shrinkage of freeze-dried archaeological oak-wood. *Acta Scientiarum Polonorum*, 6 (4):89-99.
- Babiński L (2007a). Influence of pre-treatment on shrinkage of freeze-dried archaeological pine-wood. *Folia Forestalia Polonica, Seria B*, 38:3-12.
- Berner D, Viernstein H (2006). Effect of protective agents on the viability of *Lactococcus lactis* subjected to freeze-thawing and freeze-drying. *Scientia Pharmaceutica*, 74:137-149.
- Carvalho AS, Silva J, Ho P, Teixeira P, Malcata FX, Gibbs P (2003). Protective effect of sorbitol and monosodium glutamate during storage of freeze-dried lactic acid bacteria. *Lait*, 83:203-210.
- Carvalho AS, Silva J, Ho P, Teixeira P, Malcata FX, Gibbs P (2004). Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 14:835-847.
- Castro HP, Teixeira PM, Kirby R (1997). Evidence of membrane damage in *Lactobacillus bulgaricus* following freeze drying. *Journal of Applied Microbiology*, 82:87-94.
- Chrispeels MJ, Maurel C (1994). Aquaporins: the molecular basis of facilitated water movement. *Plant Physiology*, 105: 9-13.
- Ciurzyńska A, Lenart A (2009). The influence of temperature on rehydration and sorption properties of freeze-dried strawberries. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 1:15-23.
- Crowe JH, Crowe LM, Carpenter JF, Aurell Wistorm C (1987). Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochemical Journal*, 242:1-10.
- Daban JL, Clapson P, Ausset S, Deshayes AV, Sailliol A (2010). Freeze dried plasma: a french army speciality. *Critical Care*, 14:412.
- Dąbrowska G, Zdziechowska E, Hryniewicz K (2016). Ocena potencjalnej przydatności bakterii ryzosferowych w procesie fitodesalinizacji gleb. *Ochrona Środowiska*, 38:9-14.
- de Valdez GF, de Giori GS, de Ruiz Holgado AAP, Oliver G (1983). Protective effect of adonitol on Lactic Acid Bacteria subjected to freeze-drying. *Applied and Environmental Microbiology*, 45:302-304.
- Drażkowska A, Grupa, Płóciennik P, Rybka K, Szatkowski J, Zawadzka A (2011). Using vacuum freeze-drying for waterlogged ar-

- chaological leather conservation. Sprawozdania Archeologiczne, 63:357–385.
- Fissore D, Barresi AA (2011). Scale-up and process transfer of freeze-drying recipes. *Drying Technology*, 29:1673-1684.
- Franks F (1998). Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 45:221–229.
- Gawałek J (2005). Wpływ warunków konwekcyjnego i sublimacyjnego suszenia korzeni marchwi na jakość suszu. *Inżynieria Rolnicza*, 11:119-127.
- George S, Tourniaire F, Gautier H, Goupy P, Rock E, Caris-Veyrat C (2011). Changes in the contents of carotenoids, phenolic compounds and vitamin C during technical processing and lyophilisation of red and yellow tomatoes. *Food Chemistry*, 124:1603-1611.
- Gibson CA, Landerkin GB, Morse PM (1966). Effects of additives on the survival of Lactic *Streptococci* in frozen storage. *Applied Microbiology*, 14:665-669.
- Gresham RB (1964). Freeze-drying of human tissue for clinical use. *Cryobiology*, 1:150-156.
- Grupa M, Kaźmierczak R, Rybka K, Płociennik P, Zawadzka A (2012). Ash wood and european hazel conservation with polyethylene glycol 400 using vacuum freeze drying. *Sprawozdanie Archeologiczne*, 64:411-430.
- Heś M, Jeżewska M, Szymandera-Buszka K, Gramza-Michałowska A (2011). Wpływ dodatków przeciwdziałających na wybrane wskaźniki wartości odżywczej mięsa suszonego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 5:94-106.
- Hollander DH, Nell EE (1954). Improved preservation of *Treponema pallidum* and other bacteria by freezing with glycerol. *Applied Microbiology*, 2:164-170.
- Hubalek Z (2003). Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*, 46:205–229
- Izawa S, Kieda K, Maeta K, Inoue Y (2004) Deficiency in the glycerol channel Fps1p confers increased freeze tolerance to yeast cells: application of the fps1_mutant to frozen dough technology. *Appl Microbiol Biotechnol*. 66: 303–305.
- Jach M, Łoś R, Maj M, Malm A (2013). Probiotyki- aspekty funkcjonalne i technologiczne. *Postępy Mikrobiologii*, 52:161-170.
- Jachowicz R, Krupa A (2010). Tabletki ulegające rozpadowi w jamie ustnej. *Kierunki badań, technologie. Część I. Farmacja Polska*, 66:443-447.
- Janczak K, Znajewska Z, Narbutt O, Raszowska-Kaczor A, Dąbrowska G (2016) *Serratia* sp. jako składnik preparatów wspomagających degradację PLA i PCL. *Przemysł Chemiczny*, 95:943-947.
- Jaiprakash MR, Pillai B, Venkatesh P, Subramanian N, Sinkar VP, Sadhale PP (2003). RNA isolation from high-phenolic freeze-dried tea (*Camellia sinensis*) leaves. *Plant Molecular Biology Reporter*, 21:465-466.
- Jakes KA, Mitchell JC (1992). The recovery and drying of textiles from a deep ocean historic shipwreck. *Journal of American Institute for Conservation*, 31:343-353.
- Kamińska-Dwórznińska A, Skoniecka A (2013). Wpływ metody i warunków suszenia na aktywność drożdży piekarskich. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 573:35-42.
- Kirch HH, Vera-Estrella R, Goldack D, Quigley F, Michalowski CB, Barkla BJ, Bohnert HJ (2000). Expression of water channel proteins in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiology*, 123: 111-124
- Kopcewicz J., Lewak S. (pod red.) (2012). *Fizjologia roślin*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Krokida MK, Karathanos VT, Maroulis ZB (1998). Effect of freeze-drying conditions on shrinkage and porosity of dehydrated agricultural products. *Journal of Food Engineering*, 35:369-380.
- Leslie SB, Israeli E, Lighthart B, Crowe JH, Crowe LM (1995). Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Applied and Environmental Microbiology*, 61:3592-3597.
- Łobacz M (2004). Rys historyczny, przegląd i klasyfikacja materiałów kościozastępczych oraz przeszczepów tkanki kostnej. Dostępny na: http://www.rsi2004.lubelskie.pl/doc/sty7/art/Lobacz_Michael_art.pdf
- Marrangoni AG, Cecchini LP (1951). Homotransplantation of arterial segments preserved by the freeze-drying method. *Annals of Surgery*, 134:977-983.
- Martos GI, Minahk CJ, de Valdez GF, Morero R (2007). Effects of protective agents on membrane fluidity of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Letters in Applied Microbiology*, 45:282-288.
- Miao S, Mills S, Stanton C, Fitzgerald GF, Ross Y, Ross RP (2008). Effect of disaccharides on survival during storage of freeze dried probiotics. *Dairy Science and Technology*, 88:19-30.
- Miyamoto-Shinohara Y, Imaizumi T, Suke-Nobe J, Murakami Y, Kawamura S, Komatsu Y (2000) Survival rate of microbes after freeze-drying and long-term storage. *Cryobiology* 41:251–255.
- Mordaka P, Dąbrowska G (2007). Różnorodność i regulacja kanałów wodnych w świecie roślin. *Postępy Biochemii*, 53: 84-90.
- Morgan CA, Herman N, White PA, Vesey G (2006). Preservation of micro-organisms by drying. *Journal of Microbiological Methods*, 66:183–193.
- Morris K, Seifert BL (1978). Conservation of leather and textiles from the defence. *Journal of American Institute for Conservation*, 18:33-43.
- Stachowska-Musiał E i Zemło L (1999). Ratujmy nasze dziedzictwo. *Liofilizacja jako metoda ratowania zalanych zbiorów i jej zastosowanie w Polsce, Seria: Notes Konserwatorski*, 3:175-186.
- Nireesha GR, Divya L, Sowmya C, Venkateshan N, Babu MN, Lavakumar V (2013). Lyophilisation/freeze drying – an review. *International Journal of Novel Trends in Pharmaceutical Sciences*, 3:87-98.
- Pan Z, Shih C, McHugh TH, Hirschberg E (2008). Study of banana dehydration using sequential infrared radiation heating and freeze-drying. *LWT – Food Science and Technology*, 41:1944-1951.
- Pasławska M (2005). Zmiany barwy suszonych borówek i malin zachodzące podczas przechowywania. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2:86-92.
- Pehkonen KS, Roos YH, Miao S, Ross RP, Stanton C (2008). State transitions and physicochemical aspects of cryoprotection and stabilization in freeze-drying of *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG). *Journal of Applied Microbiology*, 104:1732-1743.
- Perry SF (1998). Freeze-drying and cryopreservation of bacteria. *Molecular Biotechnology*, 9:59-64.
- Piotrowski D, Bironet J, Lenart A (2008). Barwa i właściwości fizyczne odwadnianych osmotycznie i suszonych sublimacyjnie truskawek. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 4:216-226.
- Postgate JR, Hunter JR (1961). On the survival of frozen bacteria. *Journal of General Microbiology*, 26:367-378.
- Rovero G, Baldi G, Brutini R (1991). Experimentation and modeling of pharmaceutical lyophilization using a pilot plant. *Chemical Engineering Journal*, 45:B67-B77.
- Rutkowska J, Adamska A, Pielat M, Białek M (2012). Porównanie składu i właściwości owoców dzikiej róży (*Rosa rugosa*) utrwalonych metodami liofilizacji i suszenia konwencjonalnego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 4:32-43.
- Schroeder G (red.) (2010). *Nanotechnologia, kosmetyki, chemia supramolekularna*. Wydanie I, Cursiva, str. 146-147.
- Serownik M (2012). Procesowa charakterystyka liofilizacji pieczarek wykonana z wykorzystaniem różnicowej kalorymetrii skaningowej. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 570:79-85.
- Schmidt-Nielsen K. (2008). *Fizjologia zwierząt. Adaptacja do środowiska*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Siaterlis A, Deepika G, Charalampopoulos D (2009). Effect of culture medium and cryoprotectants on the growth and survival of probiotic lactobacilli during freeze drying. *Letters in Applied Microbiology*, 48:295-301.
- Souza DS, Pimentel JDR, Prado MM, Marques LG, Narain N (2011). Rehydration characteristics of freeze-dried avocado (*Persea americana*). Dostępny na: <http://www.icef11.org/content/papers/aft/AFT1155.pdf>
- Sujka K, Koczoń P, Górska A, Wirkowska M, Reder M (2013). Sensoryczne i spektralne cechy wybranych wyrobów spirytusowych poddanych procesowi liofilizacji. *Żywność. Nauka. Technologia.*

- Jakość, 4:184-194.
- Suzuki T, Komatsu H, Miyajima K (1996). Effects of glucose and its oligomers on the stability of freeze-dried liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1278:176-182.
- Tang X, Pikal MJ (2004). Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice. *Pharmaceutical Research*, 21:191-200.
- Tanghe A, van Dijck P, Dumortier F, Teunissen A., Hohmann S, Thevelein JM (2005). Aquaporin expression correlates with freeze tolerance in baker's yeast, and overexpression improves freeze tolerance in industrial strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 5981-5989.
- Tanghe A, van Dijck P, Thevelein JM (2006). Why do microorganisms have aquaporins? *Trends in Microbiology*, 14: 78-85.
- Tyerman SD, Niemietz CM, Bramley H (2002). Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant Cell Environment*, 25: 173-194. .
- Ungar J, Muggleton PW, Dudley JAR, Griffiths MI (1962). Preparation and properties of a freeze-dried B.C.G. vaccine of increased stability. *British Medical Journal*, 2:1068-1089.
- Vangsness CT Jr., Garcia IA, Mills CR, Kainer MA, Roberts MR, Moore TM (2003). Allograft transplantation in the knee: tissue regulation, procurement, processing, and sterilization. *The American Journal of Sports Medicine*, 31:474-81.
- Wang W (2000). Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics*, 203:1-60.
- Woźny A, Przybył K (pod red.) (2004). *Komórki roślinne w warunkach stresu. T. I. Komórki in vivo*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa
- Zayed G, Roos YH (2004). Influence of trehalose and moisture content on survival of *Lactobacillus salivarius* subjected to freeze-drying and storage. *Process Biochemistry*, 39:1081-1086.
- Zhao G, Zhang G (2005). Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying. *Journal of Applied Microbiology*, 99:333-338.

The process of freeze-drying, its wide applications and defense mechanisms against dehydration

Grażyna Dąbrowska, Henryk Paweł Dąbrowski, Olga Narbutt

Freeze-drying is a process consisting of three stages: freezing, sublimation and desorption. During the process a solvent is removed from the frozen material by sublimation. Thanks to the fact that the process takes place in low temperature, all the chemical properties of the product are preserved. Despite the fact that the process of freeze-drying is time-consuming and relatively expensive, it is widely used in preserving biological material, e.g. bacteria, fungi, human tissue and plasma. Furthermore, it is also used in producing probiotics, antibiotics, vaccines and dried food. Freeze-drying has been successfully used in conservation of archaeological relics such as water-logged wood, leather, fabric or paper.

key words: freeze-drying, vacuum drying, conservation of archaeological relics, biopreparations