

Jannicke Sjøvold

**NY LAVTEMPERATUR  
TØRKETEKNIKK SOM  
KONSERVERINGSMETODE  
FOR BIOBANKMATERIALER**

**NTNU** 

Program for industriell økologi  
Masteroppgave 2006



POSTADRESSE	TELEFONER	TELEFAX
NTNU INSTITUTT FOR ENERGI OG PROSESSTEKNIKK Kolbjørn Hejes vei 1A N-7491 Trondheim - NTNU	Sentralbord NTNU: 73 59 40 00 Instituttkontor: 73 59 38 60 Vannkraftlaboratoriet: 73 59 38 57	Instituttkontor: 73 59 35 80 Vannkraftlaboratoriet: 73 59 38 54

Rapportens tittel	Dato
Ny lavtemperatur tørketeknikk som konserveringsmetode for biobankmaterialer	<b>12.06.2006</b>
	Antall sider og bilag 93
Forfatter <b>Jannicke Sjøvold</b>	Ansv. sign.
Avdeling	Rapportnummer <b>EPT-M-2006-50</b>
ISBN nr.	Studieprogram <b>Energi- og prosesseteknikk / Industriell økologi</b> Fordypningsemne <b>Industriell Prosess</b>
Oppdragsgiver	Oppdragsgivers ref.

<p>Ekstrakt</p> <p>Lavtemperatur tørketeknikk er testet ut som alternativ måte å konservere biobankmaterialer. Forsøkene har blitt gjennomført med rottelever. Det er studert RNA- og DNA-kvalitet, RNA- og DNA-konsentrasjon og grad av degradering hos RNA. I tillegg er det gjennomført undersøkelser av lipidet og morfologien er sjekket vha. elektromikroskopi. Lagringstester er utført for å sjekke om kvaliteten bevares under oppbevaring. Disse er gjennomført i flytende nitrogen, i -20 °C-fryser, i kjøleskap og i romtemperatur. Det er gjennomført et litteraturstudium over anvendte tørkemetoder på biologiske komponenter i dag, hvilke materialer som tørkes og oppnådde resultater. Det er også gjort et litteraturstudium innen tørketeori og relaterte termer for å støtte oppunder de praktiske tørkeforsøkene.</p> <p>Å fjerne vann ved lavtemperatur tørking ser ikke ut til å ha negativ effekt på kvaliteten til RNA. Dette er den viktigste celledelen å bevare med tanke på genanalyser. Analyseresultatene viste at DNA ikke blir degradert ved tørking. De beste verdiene for RNA-kvalitet ble oppnådd ved tørketemperatur 5 °C. Etter 2-3 måneders lagring var fremdeles DNAet intakt. Det ble oppnådd gode verdier fra RNA-analysene etter oppbevaring ved fryse- og kjøletemperaturer, men RNA hadde noe tapt kvalitet etter å ha vært lagret i romtemperatur. Fra lipidundersøkelsene var harskning av testmaterialet kommet lenger etter lagring i kjøle- og romtemperatur enn etter lagring i frysetemperaturer. Men benyttet metode gir kun et grovt bilde av situasjonen.</p>
---

	Stikkord på norsk	Indexing Terms English
Gruppe 1	<b>Lavtemperaturtørking</b>	<b>Low temperature drying</b>
Gruppe 2	<b>RNA-kvalitet</b>	<b>RNA quality</b>
Egenvalgte stikkord	<b>Konserveringsmetode for biobanker</b>	<b>Conservation methods for biobanks</b>





## MASTEROPPGAVE

for

Stud.techn. Jannicke Sjøvold

Våren 2006

### **Ny lavtemperatur tørketeknikk som konserveringsmetode for biobankmaterialer**

#### *A new low temperature drying method for conservation of biobank materials*

#### **Bakgrunn**

En biobank kan defineres som en samling av humant biologisk materiale, eksempelvis blod, andre vevsmaterialer, cellematerialer, vev eller organer fra levende eller døde mennesker. Humant vev har vært lagret i mange tiår i vestlige land til ulike medisinske formål. Etter at det menneskelige genom ble bestemt i 1999 har behovet for lagring av humane celler, vev og væsker økt betraktelig på verdensbasis. Dette gjelder både i diagnostisk og terapeutisk sammenheng samt i forskningssammenheng. Benyttet metode har vært og er bruk av fryseteknikk slik som bl.a. flytende nitrogen. Bruk av flytende nitrogen er kostbart og kan forårsake skader på materialet som reduseres i verdi i medisinsk sammenheng. Slik skade kan oppstå bl.a. på grunn av dannelse av iskrystaller som ødelegger vevet. Også i forbindelse med opptining fra frosset tilstand kan det oppstå skade på vevsmaterialet.

Ved NTNU/SINTEF er det i senere år gjennomført tørking av ulikt biologisk materiale hvor biologisk funksjon er ivaretatt. Materialet har gjenvunnet sin biologiske aktivitet etter tilsats av vann. Dette tyder på at skade på materialet ved fjerning av vann har vært liten, avhengig av tørkebetingelsene og rehydreringsbetingelsene. Det har innledningsvis i prosjektoppgaven vært fokusert på å måle endringer i biomolekylet RNA som funksjon av tørkebetingelsene og vanninnholdet for en vevstype hos rotte. Resultatene fra disse forsøkene er gode og denne oppgavens hensikt er å gå videre med studier av ulike tørkeparametres innvirkning på biomaterialer. Oppgavens hensikt er å studere ny lavtemperatur tørketeknikk som alternativ til frysing for bevaring av vevsmaterialer.

#### **Mål**

Oppgavens mål er å identifisere forbehandlings-, tørke-, og lagringsbetingelser knyttet til en ny lavtemperatur tørkemethode som konserveringsmetode for biobankmaterialer.

#### **Oppgaven bearbeides ut fra følgende punkter:**

1. Gjennomføre et innledende litteraturstudium vedr. tørking av biologisk aktive komponenter, celler og vev.
2. Etablere metodikk for håndtering av vevsprøver før tørking. Det tenkes spesielt på metodeutvikling for bevaring av RNA-kvalitet.

3. Gjennomføre forsøk med forbehandling, tørking og lagring av aktuelt animalsk materiale. Forsøkene skal gjennomføres ved ulike tørke- og lagringsbetingelser. Gjennomføre måling av kvalitetsstørrelser, inkl. RNA-kvalitet.
4. Vurdere tørkemethodens egnethet som ny konserveringsmetode for biobankmaterialer.

- ” -

Senest 14 dager etter utlevering av oppgaven skal kandidaten levere/sende instituttet en detaljert fremdrift- og evt. forsøksplan for oppgaven til evaluering og evt. diskusjon med faglig ansvarlig/veiledere. Detaljer ved evt. utførelse av dataprogrammer skal avtales nærmere i samråd med faglig ansvarlig.

Besvarelsen redigeres mest mulig som en forskningsrapport med et sammendrag både på norsk og engelsk, konklusjon, litteraturliste, innholdsfortegnelse etc. Ved utarbeidelsen av teksten skal kandidaten legge vekt på å gjøre teksten oversiktlig og velskrevet. Med henblikk på lesning av besvarelsen er det viktig at de nødvendige henvisninger for korresponderende steder i tekst, tabeller og figurer anføres på begge steder. Ved bedømmelsen legges det stor vekt på at resultatene er grundig bearbeidet, at de oppstilles tabellarisk og/eller grafisk på en oversiktlig måte, og at de er diskutert utførlig.

Alle benyttede kilder, også muntlige opplysninger, skal oppgis på fullstendig måte. (For tidsskrifter og bøker oppgis forfatter, tittel, årgang, sidetall og evt. figurnummer.)

Det forutsettes at kandidaten tar initiativ til og holder nødvendig kontakt med faglærer og veileder(e). Kandidaten skal rette seg etter de reglementer og retningslinjer som gjelder ved alle fagmiljøer som kandidaten har kontakt med gjennom sin utførelse av oppgaven, samt etter eventuelle pålegg fra Institutt for energi- og prosessteknikk.

I henhold til ”Utfyllende regler til studieforskriften for teknologistudiet/sivilingeniørstudiet” ved NTNU § 20, forbeholder instituttet seg retten til å benytte alle resultater i undervisnings- og forskningsformål, samt til publikasjoner.

Ett -1 komplett eksemplar av originalbesvarelsen av oppgaven skal innleveres til samme adressat som den ble utlevert fra. (Det skal medfølge et konsentrert sammendrag på maks. en maskinskrevet side med dobbel linjeavstand med forfatternavn og oppgavetittel for evt. referering i tidsskrifter).

Til Instituttet innleveres to - 2 komplette, kopier av besvarelsen. Ytterligere kopier til evt. medveiledere/oppgavegivere skal avtales med, og evt. leveres direkte til, de respektive.

Til instituttet innleveres også en komplett kopi (inkl. konsentrerte sammendrag) på CD-ROM i Word-format eller tilsvarende.

Institutt for energi og prosessteknikk, 3 januar 2006

  
Johan Hustad  
Instituttleder

FAKULTET FOR  
INGENIØRVITENSKAP  
OG TEKNOLOGI  
MASTEROPPGAVEN  
Utlevert

Innleveres senest : 16.1.2006  
: 12.6.2006

  
Ingvald Strømmen  
Faglig ansvarlig/veileder

Kontaktperson(er)/medveileder(e):

Trygve Eikevik, Inst. for energi- og prosessteknikk [trygve.m.eikevik@ntnu.no](mailto:trygve.m.eikevik@ntnu.no)

Jostein Halgunset, Det medisinske fakultet [jostein.halgunset@ntnu.no](mailto:jostein.halgunset@ntnu.no)

**MASTEROPPGAVE**

vårsemesteret 2006

for

Stud.techn. ....

Oppgavetittel: .....

.....

.....

**ERKLÆRING**

Jeg erklærer herved på ære og samvittighet at jeg har utført ovennevnte masteroppgave selv og uten noen som helst ulovlig hjelp.

....., .....

.....

Den innleverte masteroppgaven med bilag kan av NTNU fritt benyttes til undervisnings- og forskningsformål. Ved bruk utover dette, som utgivelse og annen økonomisk utnyttelse, må det inngås særskilt avtale mellom NTNU og kandidaten..



## Forord

Denne masteroppgaven er et selvstendig stykke arbeid og er en videreføring av prosjektarbeidet som ble utført ved institutt for energi- og prosessteknikk høsten 2005. Forskningsarbeidet er av en ny karakter og det har vært utrolig spennende å få lov til å delta helt i startgropen på dette prosjektet. Å få jobbe med noe litt på siden av hva instituttet som regel holder på med har vært inspirerende og motiverende, for ikke å snakke om veldig lærerikt. Jeg håper prosjektet blir fulgt opp av kommende masterstudenter, for jeg unner dem en spennende oppgave slik jeg har opplevd det, og ønsker pådriverne ved institutt for energi- og prosessteknikk, professor Ingvald Strømmen og professor Trygve M. Eikevik, samt førsteamanuensis Jostein Halgunset ved institutt for laboratoriemedisin, barne- og kvinnesykdommer ved St. Olavs Hospital lykke til med videre satsning innenfor prosjektområdet biobank og lavtemperatur tørketeknikk.

Denne oppgaven hadde ikke blitt til hvis ikke det var for mine veilederes tro på prosjektet og på meg som kandidat. Jeg takker for tilliten og muligheten. Heller ikke uten Eli Helge ved institutt for laboratoriemedisin, barne- og kvinnesykdommer ved St. Olavs Hospital hadde denne oppgaven blitt en realitet. Tusen takk for alle analyser og alle kommentarer. Hjelpen har vært uvurderlig! Takk også til Gunnar Lohse for tilretteleggelse og hjelp i tørkelaboratoriet. Til slutt vil jeg takke gutta som jeg har delt kontor med dette avsluttende året for å ha gjort slitsomme stunder muntre og for å ha bidratt til å gjøre kontoret til et veldig trivelig arbeidssted. Ønsker dere alt det beste!

Trondheim, 12. juni 2006

---

Jannicke Sjøvold





## Sammendrag

Formålet med masteroppgaven var å studere lavtemperatur tørketeknikk ved atmosfæres trykk som en alternativ måte å bevare vevsmaterialer på, mot frysing som er mest utbredt i biobanker i dag. Rottelever ble benyttet som forsøksmateriale fordi det er homogent og cellerikt. Prøvene ble klemt i en fryseklemme og lagt raskt i flytende nitrogen, og tilbake dit igjen etter tørking. Slik ble selve dehydreringsprosessen isolert. Små leverbiter ble tørket ved tre ulike temperaturer; -10 °C, 5 °C og 10 °C. DNA og RNA ble valgt som parametere for å undersøke hva fjerning av vann fra vevet gjør med kvaliteten på prøvematerialet. Kvalitet, konsentrasjon og grad av degradering ble analysert ved hjelp av spektrofotometer og kapillærelektroforese ved St. Olavs Hospital. I tillegg ble sorpsjonsisotermen studert og det ble gjennomført elektronmikroskopi og undersøkelser av lipidet. For å sjekke om vevet var lagringsstabil etter dehydrering, ble prøvene oppbevart i 2-3 måneder ved fire forskjellige lagringsbetingelser; i flytende nitrogen, i -20 °C-fryser, i kjøleskap og i romtemperatur.

For å bygge oppunder de praktiske tørkeforsøkene er det gjennomført et litteraturstudium omkring tørketeknikk. Det er også gjennomført et litteraturstudium på hvilke tørkemoder som i dag blir benyttet på biologiske komponenter, celler og vev. Det viser seg at spraytørking er vanlig til tørking av melkesyrebakterier og gjærsopper. For mer skjøre materialer som røde blodceller og blodplater er det vakuum frysetørking som blir benyttet.

Analyseresultatene viste at DNA ikke blir degradert ved tørking. Også RNA tåler godt en dehydreringsprosess. De beste verdiene for RNA-kvalitet ble oppnådd ved tørketemperatur 5 °C. Etter 2-3 måneders lagring var fremdeles DNAet intakt. Det ble oppnådd gode verdier fra RNA-analysene etter oppbevaring ved fryse- og kjøletemperaturer, men RNA hadde noe tapt kvalitet etter å ha vært lagret i romtemperatur. Fra lipidundersøkelsene var harskning av testmaterialet kommet lenger etter lagring i kjøle- og romtemperatur enn etter lagring i frysetemperaturer. Men den anvendte metoden gir kun et grovt bilde av situasjonen.



## Abstract

The objective of this master thesis was to study low temperature drying technique at atmospheric pressure as an alternative way to conserve tissue materials. In biobanks today the most common method is to freeze the materials. Rat liver was chosen as test material because of its homogeneity and high density of cells. The samples were put onto a freezing clip and quickly put into liquid nitrogen. After dehydration the samples were put straight back into the cold element. This way the dehydration process itself was isolated. Small pieces of liver were dried at three different temperatures; -10 °C, 5 °C and 10 °C. To study the effect water removal from the tissue had on the quality of the test material, DNA and RNA were chosen as parameters. Quality, concentration and rate of degradation were analyzed with the aid of a spectrophotometer and capillary electrophoresis at St. Olavs Hospital. In addition, the sorption isotherm was evaluated and an electron microscopy and a lipid evaluation were carried out. To see how the tissue responded to storage, pieces of tissue were kept for 2-3 months at four different storage conditions; in liquid nitrogen, in -20 °C freezer, in a refrigerator and at room temperature.

To support the practical drying experiments, it was performed a literature study on dehydration techniques and related terms. Also a literature study on state of the art dehydration methods on biological components, cells and tissue was carried out. Spray-drying is a common way to dry lactic acid bacteria and yeast. For fragile materials like red blood cells and blood platelets, vacuum freeze-drying (lyophilization) is preferred.

Results from the analyses show that DNA is not affected by drying. Also RNA withstands the effects from the dehydration process well. The best values on the RNA quality were obtained at drying temperature 5 °C. After 2-3 months storage, the DNA was still intact. Good values were obtained from the RNA analyses after storage at freezing and cooling temperatures, but the RNA had lost some quality after storage at room temperature. From the lipid examinations, the test material had turned more rancid after storage at room and cooling temperatures than after storage at freezing temperatures. However, the method used for the lipid examination only gives a rough image of the situation.



# Innholdsfortegnelse

Forord	vii
Sammendrag	ix
Abstract	xi
Figurliste	xvi
Tabelliste	xvii
Symboler og definisjoner	xviii
<b>1 Innledning</b>	<b>1</b>
1.1 <i>The Human Genome Project</i>	2
1.1.1 DNA - <i>deoxyribonucleic acid</i>	3
1.1.2 RNA - <i>rebonucleic acid</i>	4
1.1.3 Genom	4
1.2 <i>Hva er en biobank?</i>	5
1.3 <i>Frysing</i>	6
1.4 <i>Tørking</i>	8
<b>2 Tørketeori</b>	<b>11</b>
2.1 <i>Frysetørking</i>	12
2.2 <i>Spraytørking</i>	14
2.3 <i>Varmepumpetørking</i>	16
2.4 <i>Tørkeforløpet</i>	18
2.5 <i>Vannaktivitet</i>	20
2.6 <i>Sorpsjon</i>	21
2.7 <i>Rehydrering</i>	24
2.8 <i>Faktorer som påvirker overlevelse ved tørking</i>	25
2.8.1 <i>Vekstforhold</i>	25
2.8.2 <i>Protektanter</i>	25
2.8.3 <i>Cellekonsentrasjon</i>	26
2.8.4 <i>Tørkegassens sammensetning</i>	26
2.8.5 <i>Tørkeraten</i>	26
2.8.6 <i>Rehydreringsmediet</i>	27
<b>3 Litteraturstudium</b>	<b>29</b>
3.1 <i>Spraytørking</i>	29
3.1.1 <i>Hva blir tørket?</i>	31
3.1.2 <i>Egnetet i biobanksammenheng</i>	32
3.2 <i>Frysetørking</i>	34
3.2.1 <i>Egnetet i biobanksammenheng</i>	37
3.3 <i>Andre tørkemetoder</i>	39

3.3.1	Mikrobølgetørring	39
3.3.2	Tørring i fluidized bed	40
3.3.3	Innkapsling	40
<b>4</b>	<b>Materialer og metoder</b>	<b>43</b>
4.1	Valg av forsøksmateriale og analyseparametere	43
4.2	Forsøksprosedyre	44
4.3	Tørkekurve	46
4.4	Vannaktivitet, $a_w$	46
4.5	Lagring	47
4.6	RNA-isolering	47
4.6.1	Spektrofotometer	48
4.6.2	Bioanalyser	49
4.7	DNA-isolering	50
4.8	Lipidundersøkelse	51
4.9	Elektronmikroskopisk undersøkelse	51
<b>5</b>	<b>Resultater</b>	<b>53</b>
5.1	Tørkekurver	53
5.2	Sorpsjonsisoterm	54
5.3	Tørring ved +10 grader – analyseresultater	54
5.3.1	Tørkekurvene	54
5.3.2	DNA-kvalitet	55
5.3.3	RNA-kvalitet	55
5.4	Tørring ved +5 grader – analyseresultater	56
5.4.1	Tørkekurvene	56
5.4.2	DNA-kvalitet	56
5.4.3	RNA-kvalitet	57
5.5	Tørring ved -10 grader – analyseresultater	57
5.5.1	Tørkekurvene	57
5.5.2	DNA-kvalitet	58
5.5.3	RNA-kvalitet	58
5.6	Sammenligning av tørketemperaturene	59
5.6.1	DNA-kvalitet	59
5.6.2	RNA-kvalitet	59
5.6.3	RIN-faktor	60
5.7	Lagrede prøver	61
5.7.1	DNA-kvalitet	62
5.7.2	RNA-kvalitet	62
5.7.3	RIN-faktor	63
5.8	Lipidundersøkelse	63
5.9	Elektronmikroskopi	65
<b>6</b>	<b>Diskusjon</b>	<b>69</b>

6.1	<i>Tørkekurvene</i>	69
6.2	<i>Sorpsjonsisotermene</i>	69
6.3	<i>DNA-kvalitet</i>	70
6.4	<i>RNA-kvalitet</i>	70
6.5	<i>Lipidundersøkelse</i>	72
6.6	<i>EM-undersøkelse</i>	73
6.7	<i>Generell diskusjon</i>	73
<b>7</b>	<b>Konklusjon</b>	<b>77</b>
<b>8</b>	<b>Videre arbeid</b>	<b>79</b>
	<b>Referanser</b>	<b>81</b>
	<b>Vedlegg A: Prosedyrer</b>	<b>85</b>
A.1	<i>Forsøksplan</i>	85
A.2	<i>Rengjøringsprosedyre</i>	86
	<b>Vedlegg B: Forsøksresultater</b>	<b>87</b>
B.1	<i>Tørkekurver</i>	87
B.2	<i>Sorpsjonsdata</i>	88
B.3	<i>DNA-data</i>	88
B.4	<i>RNA-data</i>	90
B.5	<i>DNA-data fra lagrede prøver</i>	91
B.6	<i>RNA-data fra lagrede prøver</i>	92
B.7	<i>Lipid-data</i>	93



# Figurliste

Figur 1 DNA - dobbel heliks (Gensidene, 2005) -----	3
Figur 2 RNA (Alumni, 2005) -----	4
Figur 3 Genom til protein. (Human Genome Project Information, 2005) -----	5
Figur 4 Temperatur-Tid-relasjon under frysing (Fellows, 2000). -----	7
Figur 5 Effekt av frysing ved sakte innfrysning. (Fellows, 2000) -----	8
Figur 6 Fasediagram for vann. (Fellows, 2000) -----	12
Figur 7 Prinsippskisse for en kontinuerlig spraytørke (Lievense & van't Riet, 1993). -----	15
Figur 8 Varmepumpetørke i prinsipiell skisse (Kramer et al., 1994). -----	17
Figur 9 Tørkekurve (Fellows, 2000). -----	19
Figur 10 Klassifisering av adsorpsjonsisotermer (Roos, 1995). -----	22
Figur 11 Generell sorpsjonsisoterm (Fellows, 2000). -----	22
Figur 12 Sorpsjonsisoterm med hystereseeffekt (Roos, 1995). -----	23
Figur 13 Pose, laget av biokompatibel film, med frysetørkede blodplater. Skala gitt i tommer. (Wolkers et al., 2003) -----	36
Figur 14 Bilder av en typisk rotteleverprøve. -----	44
Figur 15 Prøvene og plassering i brettørka. -----	46
Figur 16 Spektrofotometer (NanoDrop, 2005) -----	48
Figur 17 Forsiktig legges en liten dråpe av -----	49
Figur 18 Bioanalyser -----	49
Figur 19 Tørkede prøver deles i passende biter og blir lagt i rør som skal tilsettes lyseringsbuffer. -----	51
Figur 20 Tørkekurver -----	53
Figur 21 Sorpsjonsisotermer -----	54
Figur 22 Tørkekurve + 10 °C -----	54
Figur 23 DNA-kvalitet ved 10 °C -----	55
Figur 24 RNA-kvalitet ved 10 °C. -----	55
Figur 25 Tørkekurve 5 °C -----	56
Figur 26 DNA-kvalitet ved 5 °C. -----	56
Figur 27 RNA-kvalitet ved 5 °C. -----	57
Figur 28 Tørkekurve -10 °C -----	57
Figur 29 DNA-kvalitet ved -10 °C. -----	58
Figur 30 RNA-kvalitet ved -10 °C. -----	58
Figur 31 DNA – sammenligning av tørketemperaturer. -----	59
Figur 32 260/280-ratio – sammenligning av tørketemperaturer. -----	60
Figur 33 260/230-ratio – sammenligning av tørketemperaturer. -----	60
Figur 34 RIN-faktor – sammenligning av tørketemperaturer. -----	61
Figur 35 Måling av DNA fra lagrede prøver. -----	62
Figur 36 RNA fra lagrede prøver gitt ved 260/280. -----	62
Figur 37 RNA fra lagrede prøver gitt ved 260/230. -----	62
Figur 38 RIN-verdier for tørkede og lagrede prøver. -----	63
Figur 39 Blåsnitt over standard prøve (BB1; Std.). -----	65
Figur 40 Mikroskopert bilde av vevsnippet (BB1; Std.). -----	65
Figur 41 Blåfargesnitt av frosset prøve (BB2; F). -----	66
Figur 42 Forstørret bilde av frosset prøve (BB2; F). -----	66
Figur 43 Blåsnitt av prøve tørket ved +10 °C (BB3; FTF). -----	67
Figur 44 Forstørret bilde av den tørkede prøven (BB3; FTF). -----	67

# Tabelliste

Tabell 1 Materialer som frysetørkes (Adams, 1991).	14
Tabell 2 Tabellarisk oversikt fra litteraturstudiet over spraytørkede materialer.	32
Tabell 3 Tabellarisk oversikt fra litteraturstudiet over frysetørkede materialer.	38
Tabell 4 Forsøksoppsett	45
Tabell 5 Oversikt over EM-prøvene.	52
Tabell 6 Tørkede og lagrede prøver.	64
Tabell 7 Tørkede prøver.	64
Tabell 8 Tørkekurve $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ . $A_w$ fra AquaLab.	87
Tabell 9 Tørkekurve $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . $A_w$ fra AquaLab.      Tabell 10 Tørkekurve $+10\text{ }^{\circ}\text{C}$ . $A_w$ fra AquaLab.	87
Tabell 11 Tørketemp. $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ Tabell 12 Tørketemp. $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$ Tabell 13 Tørketemp. $+10\text{ }^{\circ}\text{C}$ .	88
Tabell 14 Tørket ved $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ .	88
Tabell 15 Tørket ved $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$ .	89
Tabell 16 Tørket ved $+10\text{ }^{\circ}\text{C}$ .	89
Tabell 17 Tørket ved $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ .	90
Tabell 18 Tørket ved $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$ .	90
Tabell 19 Tørket ved $+10\text{ }^{\circ}\text{C}$ .	91
Tabell 20 DNA - lagrede prøver.	91
Tabell 21 RNA - lagrede prøver.	92
Tabell 22 Tørkede prøver.	93
Tabell 23 Tørkede og lagrede prøver.	93

## Symboler og definisjoner

<b>2,3-DPG</b>	Et viktig stoffskifteprodukt som påvirker hemoglobinet til å tiltrekke seg oksygen.	
$\gamma_s$	Overflatespenning	[N/m]
$\theta$	Fuktningsvinkel	
$a_w$	Vannaktivitet	[-]
<b>ADP</b>	Adenosindifosfat	
<b>ATP</b>	Adenosintrifosfat. ATP er nødvendig for syntese av proteiner, syntese av puriner og pyrimidiner, transport gjennom membraner, muskelkontraksjon og andre energikrevende reaksjoner.	
<b>COP</b>	Coefficient of Performance, også kjent som $\epsilon$	[-]
<b>DNA</b>	Deoksyribonukleinsyre. Arvestoff.	
<b>DNase</b>	Deoxyribonuclease. Enzym som spalter DNA.	
<b>HES</b>	Hydroxyetyl-stivelse	
<b>RH</b>	Relativ fuktighet	[%]
<b>RNA</b>	Ribonukleinsyre. Biokjemiske forbindelser som styrer oppbyggingen av proteinene.	
<b>RNase</b>	Ribonuclease. Enzym som degraderer RNA.	
<b>Blodplater</b>	Ikke egne celler, men fragmenter av <i>megakaryocytter</i> . Viktig for kroppens evne til å stanse blødning. Levetid ca. 11 dager.	
<b>Genom</b>	En celles totale mengde av genetisk materiale, dvs. samtlige gener på alle kromosomer.	
<b>Kasein</b>	Ostestoff, melkens fosforholdige protein.	
<b>Katalase</b>	Enzym som katalyserer spaltingen av hydrogenperoksid til vann og oksygen.	
<b>Kollagen</b>	Fiberprotein. Proteinene som det finnes mest av i organismen – utgjør 1/3 proteinvekten hos mennesker og dyr.	
<b>Laktater</b>	Salter og estere av melkesyre.	
<b>Lameller</b>	Tynne skiver.	
<b>Liposom</b>	liten (25-100 nm), kuleformet partikkel som består av et dobbelt lag fett med en kjerne av vann. Fremstilles ved å utsette lipider emulgert i vann for høyfrekvent lyd.	
<b>Mikrotom</b>	Instrument for skjæring av tynne snitt av vev som er forbehandlet på en bestemt måte. For lysmikroskopiske eller elektronmikroskopiske undersøkelser.	
<b>Resin</b>	Syntetiske harpikser og polymerer. Her: EPON	
<b>Ristocetin</b>	Antibiotisk mikstur. Giftig, så ikke lenger til klinisk bruk, men brukes til å undersøke blodkoagulasjon og plateagglutinasjon.	
<b>Røde blodceller</b>	Erytrocytter. Rødfargen skyldes hemoglobin. Levetid ca. 110 dager.	
<b>Trombin</b>	Enzym – spiller viktig rolle ved blodkoagulasjon.	

# 1 Innledning

*“Bio specimens are the key to molecular medicine and accelerating progress in this battle. They are a critical resource for 21st century medicine that will be worth their weight in platinum.”*

Dr Anna Barker, deputy director for advanced technologies and strategic partnerships at the US National Cancer Institute (NCI).

Den generelle folkehelsen i et land eller en region gir en god pekepinn på livskvaliteten i et samfunn. Med økende kunnskap om epidemiologi og samspillet mellom miljøfaktorer, ernæring, personlig livsstil og genetisk arv, kan sykdomsforhindring bli en effektiv måte å forbedre den generelle helsen i en befolkning. Da det menneskelige genom var ferdig sekvensert i 2002, åpnet dette en verden av nye muligheter innen gen- og genomforskning. Forskerne ser for seg å kunne løse en rekke miljøspørsmål, bedre landbruket ved å gi sikrere avlinger og dermed bedre matforsyningen, og å kunne finne nye sammenhenger mellom sykdom, arv og miljø. Forskerne vil lære om hvordan genetisk forandring medfører til sykdommer, om hvordan en kan bruke et individs genetiske informasjon til å forutsi hvilke sykdommer hun eller han kan utvikle, og lære hvilken medisiner som vil virke best på en bestemt person. Dette er kjent som personlig medisinering. Forskerne vil finne sykdomsmarkører som er nyttige for å diagnostisere sykdommen tidlig og komme i gang med behandling raskt. For å finne svar på slike store spørsmål kreves kreativitet og innsats fra forskere verden over. Og for å kunne forske, trengs forsøksmateriale. I den sammenheng vil biobanker være et gode, og genomdata vil være viktig for fremtidige forskningsprosjekter. Biologiske materialer av sykt og friskt vev, fra både animalsk og vegetabilsk opprinnelse, er interessant i slik forskningsøyemed. Biobanker vil i økende grad bli sett på som en internasjonal ressurs. Et samfunnsgode til samfunnsnytte. For å få til slik sensitiv forskning på en trygg og sikker måte, er det høyst nødvendig med et gjennomarbeidet etisk grunnlag i bunnen. Ekstra viktig vil slike etiske prinsipper være når forskningen går over til å bli en bedriftsidé og en inntektskilde (Human Genome Project Information, 2005; Lindmo et al, 2004).

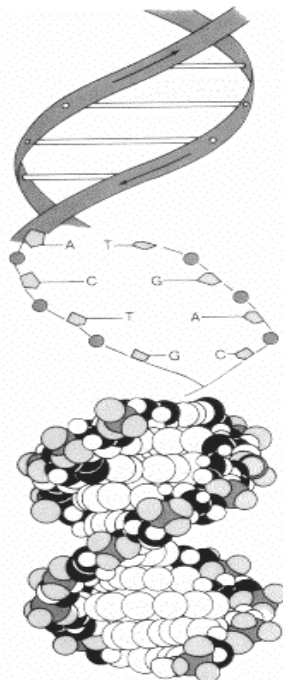
## ***1.1 The Human Genome Project***

*The Human Genome Project (HGP)*, et internasjonalt biologisk prosjekt, startet formelt opp i 1990. Prosjektet var ment å vare i 15 år, men på grunn av raske teknologiske fremskritt kunne forskerne si seg ferdig over to år før tiden. Da var over 3 milliarder kjemiske basepar, som utgjør menneskets totale DNA, ferdig sekvensert. Målet med prosjektet var å få en komplett sekvensering av DNAets baser, identifisere alle de menneskelige genene og gjøre dem tilgjengelige for videre biologiske studier. Et viktig poeng for *HGP* var at all informasjon vunnet fram gjennom forskningen skulle være tilgjengelig for offentligheten. Begrunnelsen for dette prinsippet var å oppfordre til videre forskning og utvikling, og for å maksimere den samfunnsmessige nytten prosjektet ville gi. Dette er kjent som Bermudaprinsippene. Derfor presenterte *HGP* resultater daglig. Parallelt med den humane sekvenseringen, ble det utført sekvensering på utvalgte organismer for å hjelpe til med utvikling av teknologi, og for å bedre tolke og forklare den menneskelige genfunksjonen (Human Genome Project Information, 2005).

Det finnes et stort potensial til å utvikle mer kunnskap nå som DNAet er sekvensert. Dette blir en enorm oppgave i kommende tiår, og vil kreve ekspertise og kreativitet fra mange tusen forskere over hele verden. Allerede nå er mange gener blitt knyttet til brystkreft, muskelsykdommer, døvhets og blindhet. Forskerne knyttet til *HGP* ser for seg mange områder hvor genomforskning vil være aktuelt og kan bidra stort. Noen av disse områdene er innenfor molekylærmedisin, energikilder og miljøvennlige applikasjoner, og landbruk og bioprosessering. Bruk av mikrobiell genomforskning kan blant annet benyttes til å utvikle nye energikilder som biobrensler og til å utvikle overvåkningsteknikker for å holde oppsyn på og forutse miljøforandringer grunnet forurensning. Ved å forstå plante- og dyregenom vil det være mulig å utvikle sterkere og mer sykdomsresistente planter og dyr. Dette vil kunne senke kostnadene ved landbruket fordi avlingene vil ha lavere svinnprosent, og forbrukerne vil kunne bli tilbudt mer næringsrik og sprøytemiddelfri mat. Målet innen medisin er å oppdage sykdommer tidligere med raskere diagnostisering og dermed få muligheten til å starte behandling på et tidligere stadium. Forskerne søker etter å oppnå personlig medisinerings. De vil også tidligere kunne oppdage genetisk anlegg for spesielle sykdommer og slik kunne følge pasienten fra barnsben av. Dette kan for eksempel testes på navlestrengsblod, og stamceller herfra kan også lagres (Human Genome Project Information, 2005).

### 1.1.1 DNA - *deoxyribonucleic acid*

Cellekjernen er kommandosentralen som styrer cellens forskjellige funksjoner. Det skjer ved at kjernen regulerer produksjonen av de proteinene som kontrollerer cellens ulike aktiviteter. DNA finnes i cellekjernen og er det molekylet som er bærer av det genetiske materialet. DNA-molekylet er bygget opp av tre ulike bestanddeler; en sukkerart (deoksyribose), en fosfatgruppe og én av fire forskjellige baser. Til sammen kalles disse bestanddelene et nukleotid, og DNA er en veldig lang polymer bestående av millioner av nukleotider. De fire basene som inngår er adenin, guanin, cytosin og thymin, forkortet A, G, C og T.

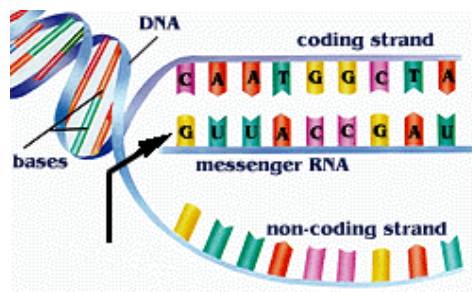


**Figur 1** DNA - dobbel heliks (Gensidene, 2005)

Hvert DNA-molekyl består av to nukleotidkjeder tvunnet om hverandre til en karakteristisk spiral kalt en dobbel heliks, se Figur 1. Nukleotidkjedene knyttes sammen ved at svake hydrogenbindinger dannes mellom basene i hver kjede. Baseregelen er slik at A alltid står ovenfor en T likesom G alltid står ovenfor en C. Kjeden blir altså komplementære til hverandre, og antall A tilsvarer antall T på samme måte som antall G tilsvarer antall C. Når DNA blir kopiert fra en celle til en ny, er det mulig at baseparene blir plassert feil slik at for eksempel en C står ovenfor en A. Slike feil er en årsak til spontane mutasjoner, den største kilden til genetisk variasjon (Bjålie et al, 2004; Gensidene, 2005).

### 1.1.2 RNA - *rebonucleic acid*

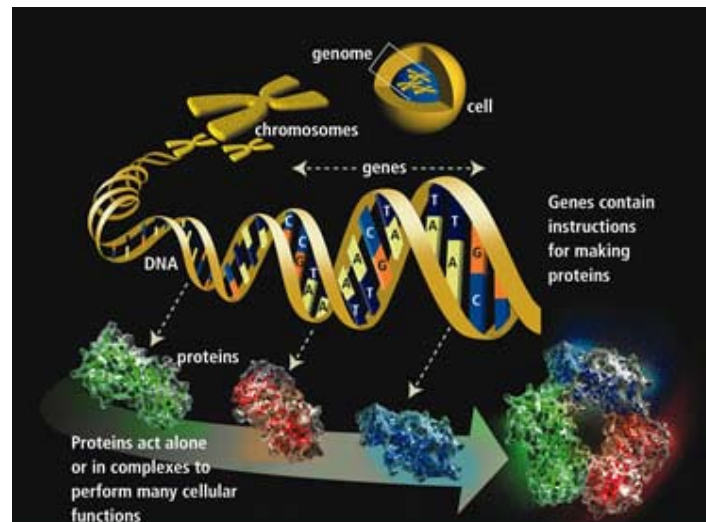
RNA ligner på DNA i sammensetning, men har basen uracil (U) i stedet for thymin (T) og sukkerarten riobose, og ikke deoksyribose som i DNA. Det finnes flere typer RNA, men de viktigste er mRNA (*messenger RNA*), rRNA (*ribosomal RNA*) og tRNA (*transfer RNA*). Disse tre klassene RNA er alle med i dekodning av genene. DNA blir transkribert til RNA av enzymet RNA-polymerase. I kjernen overføres den genetiske informasjonen fra DNA til RNA. Informasjonen transporteres med mRNA fra kjernen ut til cytoplasmaet. I cytoplasmaet kontrollerer RNA syntesen av proteinene, som så formidler den biologiske virkningen i cellen (Bjålie et al, 2004, Gensidene, 2005).



Figur 2 RNA (Alumni, 2005)

### 1.1.3 Genom

Genom er betegnelsen for en arts fullstendige arvemateriale – den totale genetiske informasjon. Termen er kjent fra 1920-tallet. Ut fra hvilken organisme det er snakk om, så varierer genomet i størrelse. En bakterie kan bestå av 600 000 DNA basepar, mens mennesket har 3 milliarder. Alle menneskelige celler inneholder et komplett genom, bortsett fra utviklede røde blodceller. DNA i det menneskelige genom er fordelt i 24 forskjellige kromosomer som er fysisk separate molekyler med lengde på 50-250 millioner basepar. Hvert kromosom inneholder en mengde gener. Gener er spesifikke sekvenser av baser som koder instruksjoner for proteinene. Det er proteinene som utfører de fleste av livsfunksjonene i cellene. Proteinenes viktigste oppgave er å virke som katalysator for kjemiske reaksjoner, som byggemateriale i cellene, til forsvar mot infeksjoner og som transportmolekyler for viktige stoffer (Bjålie et al, 2004; HGP, 2005).



Figur 3 Genom til protein. (Human Genome Project Information, 2005)

## 1.2 Hva er en biobank?

Betegnelsen biobank har en bred forståelse, men tradisjonelt defineres det som en systematisk samling av celler, vev eller blod som er lagret for senere å kunne bruke prøvene til analyser (Lindmo et al, 2004). Spesielt etter at det menneskelige genom ble sekvensert, har biobanker fått en ny aktualitet. Det har blitt en ressurs som politikere og ledere ønsker å utnytte maksimalt. For eksempel har Estland som mål å kartlegge hele befolkningen, og Island, med den kommersielle bedriften deCode, er allerede på god vei til å gjøre nettopp dette (Sjøvold, 2005). Bedrifter og organisasjoner ser muligheten til å ta patenter og skaffe gode penger, og ønsker å bli store innen bioteknologi og legemiddelindustri. Slik utvikling kan føre til en viktig industri for mange land, og derfor ønsker de å være med fra første avspark.

En biobank kan defineres i NOU 2001:19, "Biobanker", som en *samling av humant biologisk materiale*. Biologisk materiale kan være bestanddeler av blod, andre vevsvæsker, deler av celler, intakte celler, vev eller organer hentet fra levende eller døde mennesker. Biobankloven fra 21. februar 2003 deler biobanker inn i tre kategorier:

- Diagnostisk biobank
- Behandlingsbiobank
- Forskningsbiobank



Både diagnostisk biobank og behandlingsbiobank forstås i biobankloven som *en samling humant biologisk materiale som er avgitt for medisinsk undersøkelse, diagnostikk og behandling*. Eksempler på disse er henholdsvis patologiske avdelinger og blodbanker. Loven definerer videre en forskningsbiobank til å være *en samling humant biologisk materiale og opplysninger som direkte fremkommer av analyse av dette materialet, og som anvendes eller skal anvendes til forskning*. Her vil det være nærliggende å nevne blodprøvesamlinger knyttet til befolkningsundersøkelser som eksempel. Det kan også finnes biobanker som ikke faller innenfor disse tre kategoriene. I NOU 2001:19 opereres det derfor med en fjerde kategori som kalles *andre typer biobanker*. Slike biobanker er typisk biobanker innen rettsmedisin.

Selv om materialsamlingen i de ulike typer biobanker som regel benyttes til ett hovedformål, kan likevel materialet noen ganger brukes til andre formål ved en senere anledning. Prøver som har blitt tatt for å stille en diagnose kan senere bli brukt til forskning, dersom størrelsen og omfanget på prøvematerialet tillater det. Samspill mellom populasjonsbaserte og sykdomsbaserte biobanker vil være viktig da mulige linker mellom genetisk disposisjon og sykdom kan identifiseres. Det kan også være slik at en samling materiale vil få ny verdi etter hvert som medisin og teknologi utvikles. Et eksempel er der vevsprøver tatt før oppdagelsen av DNA fikk ny aktualitet i forskningssammenheng (NOU 2001:19).

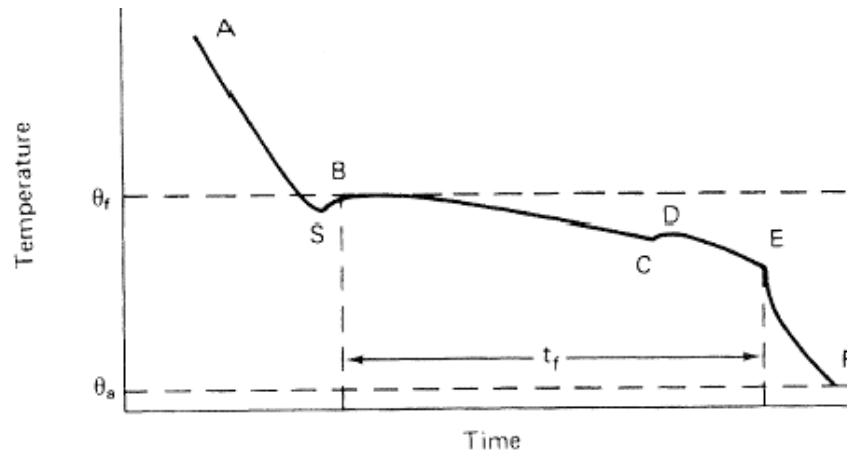
Biobanker kan være i offentlig eller privat regi, og det opereres med flere ulike finansieringsmodeller. Disse er hel eller delvis offentlig finansiering, eller fullstendig privat finansiering.

### ***1.3 Frysing***

I forprosjektet (2005) til denne masteroppgaven ble det utført en undersøkelse for å kartlegge logistikk-løsninger og kapasiteter ved nasjonale og internasjonale bioanker. For nærmere beskrivelse av de kartlagte forskningsbaserte biobankene henvises det til forprosjektet. En av de tingene som kom fram i den undersøkelsen var at vanlig bevaringsmetode for biobankmaterialer i dag er frysing. Det er i hovedsak flytende nitrogen og -80 °C-frysere som er vanlig i bruk, men noen steder opererer de også med -20 °C-frysere.

Frysing er en enhetsoperasjon hvor temperaturen i et materiale er redusert under dets frysepunkt og en del av vannet i materialet gjennomgår en tilstandsendring og danner

iskrystaller. Innkapsling av vann i is og konsentrasjonen av løsninger i gjenværende ufrosset vann gjør at vannaktiviteten,  $a_w$ , blir redusert. Bevaring av materiale ved frysing er mulig takket være kombinasjon av lav temperatur og redusert vannaktivitet (Fellows, 2000).



**Figur 4** Temperatur-Tid-relasjon under frysing (Fellows, 2000).

Ovenfor er det gitt en figur av en karakteristisk frysekurve gitt av senteret i et produkt, altså det stedet som fryser saktest. Fryseprosessen går som følger (Fellows, 2000):

**A-S:** Materialet er kjølt ned under frysepunktet  $\theta_f$ , som foruten for rent vann, alltid er under  $0^\circ\text{C}$ . Ved punktet S er fremdeles vannet flytende selv om temperaturen er under frysepunktet. Fenomenet er kjent som underkjøling og kan være så stort som ti grader under aktuelt frysepunkt.

**S-B:** Temperaturen stiger raskt til frysepunktet idet iskrystaller begynner å ta form og den latente varmen fra krystalliseringsprosessen frigjøres.

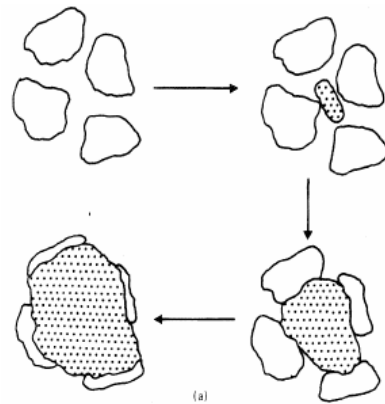
**B-C:** Varme blir fjernet fra produktet med samme rate som før, men det er latent varme som fjernes mens iskrystallene danner seg og dermed er temperaturen nesten konstant i denne fasen. Frysepunktet blir hele tiden presset nedover da konsentrasjonen av løsninger i det ufrosne vannet øker, og temperaturen synker derfor bare litt. Det er i denne fasen det meste av isen blir til.

**C-D:** En av de tilstedeværende løsningene blir overmettet og krystalliserer ut. Latent varme fra krystalliseringen frigjøres og temperaturen stiger til eutektisk temperatur for løsningen.

**D-E:** Krystallisering av vann og andre løsninger fortsetter. Den totale tiden  $t_f$  er bestemt av raten som varmen blir fjernet med.

**E-F:** Temperaturen av materialet faller til temperaturen i fryseren. En del av vannet fortsetter å være ufrosset, men mengde ufrosset vann er forskjellig fra type produkt og lagringstemperatur.

Skader som oppstår ved frysing er i hovedsak forårsaket av krystallvekst i cellene. Ved sakte innfrysning vil iskrystallene vokse mellom cellene og kan deformere og ødelegge tilstøtende cellevegger. Iskrystallene har et lavere vanndampstrykk enn det som er inne i cellene, og vann vil derfor bevege seg fra cellene og ut til de voksende krystallene. Cellene blir dehydrert og ofte permanent skadet på grunn av økende løsningskonsentrasjonen i cellene, og en kollapset og deformert cellestruktur. Cellene vil sjelden eller aldri få tilbake sin originale form og svulstighet ved tining. Vevet har etter frysing blitt mykt og celleorganeller kan lekke ut. Dette fenomenet kalles *drip loss*. Dersom innfrysningen skjer raskt vil is danne seg i mindre krystaller både intracellulært og mellom cellene. Den fysiske skaden på cellene blir liten og det blir ikke dannet noe vanndampstrykk, som betyr at dehydrering av cellene blir minimal. Vevets originale struktur beholdes derfor



**Figur 5** Effekt av frysing ved sakte innfrysning. (Fellows, 2000)

mye bedre, med mindre frysehastigheten er så rask at vevet blir påført sprekker og brudd. Generelt er det slik at jo lavere temperatur materialet er lagret ved, jo lavere er mikrobiologiske og mikrokjemiske forandringer. Likevel vil ikke frysing og fryselagring inaktivere enzymer og har en varierende effekt på mikroorganismer (Fellows, 2000).

## 1.4 Tørrking

Når frysing og for eksempel frysetørrking utføres på mikroorganismer vil cellefunksjonene midlertidig innstilles. Dette skjer fordi metabolske aktiviteter trenger vannmolekyler for å få ting til å skje. Resultatet er at organismen er preservert for en periode. På grunn av redusert vannaktivitet vil det være mulig å oppbevare det tørkede produktet i romtemperatur dersom det er beskyttet mot oksygen, fuktighet og lys. Takket være den porøse strukturen i det tørkede produktet kan materialet enkelt absorbere vannmolekyler og igjen få tilbake opprinnelig struktur. Men både frysing og tørrking er kritiske prosesser som kan påføre organismene skade, og i verste fall død. Derfor blir det viktig å forstå mekanismene som fører

til celleskader/-død for å gjenkjenne effekten av fryse- og tineprosesser samt tørking/rehydrering med tanke på tap av levedyktighet ved ulike betingelser (Souzu, 1999).

Tørking er en utbredt teknikk som brukes innen en rekke typer industri som foredlingsindustri, næringsmiddelindustri og farmasøytisk industri. Tørking har evne til å stabilisere et produkt og gjøre det lagringsdyktig. På noen områder kan tørking sidestilles med frysing, men tørkede produkter kan enklere pakkes, fraktes, lagres og administreres. Det er et bredt utvalg av tørkeprosesser og teknologiske løsninger. utfordringene rundt tørkeprosessene er knyttet til produktkvalitet, energibruk, utslipp til miljø og tørkekostnader. Ved tørking av biologiske materialer vil kvaliteten i stor grad avhenge av tørkeforholdene. Forandringene kan være kjemiske/biokjemiske, fysiske eller ernæringsmessige (Strømmen & Magnussen, 1994).

Men hva har tørking med biobanker å gjøre? Det er nettopp prinsippene om at tørking gir lagringsstabilitet, enklere oppbevaring og lavere lagringskostnader som gjør det til en interessant teknikk å teste ut på biobankmaterialer. Dersom aktuelt materiale lar seg tørke og samtidig være av en slik kvalitet at nødvendige analyser kan gjennomføres på materialet i etterkant, ja, da kan biobankene blant annet spare inn kostnader på flytende nitrogen og alarmutstyr til frysere. En slipper redsel for strømbrudd og behov for back-up-frysere. Og enda viktigere enn alt dette slipper biobankmaterialet å gjennomgå fryse/tine-prosesser som fører til slitasje på materialet. Materialet kan tørkes og så kan en passe bit tas fra originalen og analyseres. Det blir ikke nødvendig å tine et helt cryorør for å få tak i den lille biten forskeren er ute etter.

Som i forprosjektet (2005) tar hele forskningsoppgaven utgangspunkt i en hypotese om at fjerning av vann fra vev ikke vil skade materialet. Resultatene fra forprosjektet ga håp om at dette stemmer, men flere tester er nødvendig for å kunne konkludere noe sikkert. Selve målet med oppgaven er å utvikle en ny metode for konservering av biobankmaterialer. For å undersøke om tørking fører til degradering og skade av forsøksmaterialet er det valgt ut flere analyseparametere. Disse er RNA, DNA, lipider og morfologisk struktur. For å kunne si noe nøyaktig om selve tørkeprosessen, blir denne isolert ved at prøvene er oppbevart i flytende nitrogen både før og etter tørking. Slik er det mulig å studere om vannfjerningen påvirker vevet og de utvalgte parametere. I biobanksammenheng er ofte lagring en viktig faktor. Derfor er forsøkene i denne omgangen også utvidet til å omfatte lagringstester. Testmaterialet er fremdeles rottelever, som er en homogen og cellerik vevstype.

For å få en bedre forståelse av hva tørking går ut på, omhandler hele neste kapittel tørketeori. Tørkingen som er utført på testmaterialet rottelever er atmosfærisk tørking, både ved minusgrader og plussgrader. Videre er det gjennomført et litteraturstudium for å se hvilke biologiske materialer som tørkes i dag. Det er da valgt å se på materialer som kan høre hjemme i biobanker, eller som er tilnærmet like. Tørking er blant annet veldig stort innen næringsmiddelindustri, men dette er i denne sammenheng i stor grad valgt bort. I kapittel 4 presenteres metoder og analyseparametere som er benyttet gjennom forsøkene i denne masteroppgaven. Resultatene presenteres i kapittel 5 hvorpå de blir kommentert og diskutert i kapittel 6. Til slutt i rapporten blir det å finne konklusjon og forslag til videre arbeid.

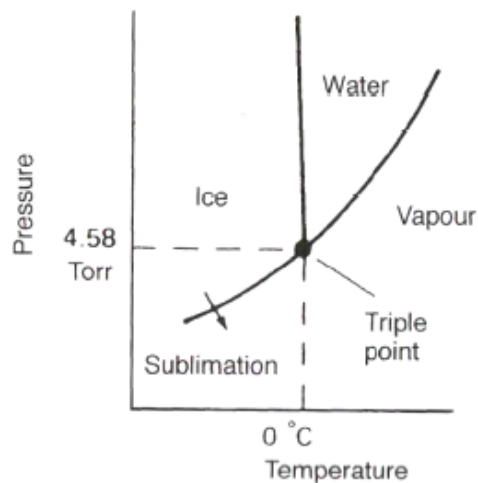
## 2 Tørketeori

Tørking er en metode som får vann eller annen væske til å fordampe fra et produkt. Fordampningen av væske skjer på grunn av samtidig varme- og massetransport. Væsken som fordamper må tas opp i et tredje medium, tørkemediet, som for eksempel er luft (Strømmen, 1994). For å transportere fukten finnes ulike mekanismer. Fuktighet i et materiale som tørkes kan transporteres både i gass- og væskefase. Ved væskediffusjon vil fuktigheten i væsketilstand transporteres proporsjonalt med konsentrasjonsgradienten til fuktigheten i materialet. Gassdiffusjon er hovedmekanismen for transport av fuktighet i gassform (damp) i et materiale som skal tørkes. Denne mekanismen forekommer når porediameteren er større enn  $10^{-7}$  m, hvor det er molekylkollisjoner som dominerer. Effusjon, kapillærkrefter og trykkgradienter er alle mekanismer som er med på å forme transporten av fukt ut av et tørkende materiale (Bolland, 1994). Hovedhensikten med tørking er å forlenge levetiden til et produkt ved å redusere vannaktiviteten. Når vannaktiviteten går ned vil mikrobiell vekst og enzymaktivitet hemmes, noe som bedrer lagringsstabiliteten til produktet. En økning i vanninnhold under lagring bør derfor unngås for å beholde stabiliteten i produktet, ellers vil produktet raskt ødelegges (Fellows, 2000). Ved tørking av biotekniske, medisinske og farmasøytiske produkter er det biologisk aktivitet i form av enzymatisk, bakteriell og soppaktivitet i etterkant av tørkeprosessen som er avgjørende parametere for å bestemme om tørkingen var vellykket. Tørkebetingelsene er med på å påvirke biologisk aktivitet gjennom skader på cellene, denaturering av proteiner etc. Fysiske egenskaper som bulk tetthet, rehydreringsevne, løselighet og struktur preges av de ulike tørkebetingelsene (Strømmen & Magnussen, 1994).

Ved tørking av biomaterialer er kvaliteten på det tørkede produktet det vesentlige. Utfordringen ved tørking av slike produkter er å oppnå ønsket kvalitet til lavest mulig kostnad. Tørkebetingelsene vil til en stor grad påvirke kvalitetsparameterne. Derfor blir valg av tørkemetode avgjørende med tanke på kvalitet, investeringskostnader, energi- og vedlikeholdskostnader, samt miljøkonsekvenser. Dette kapitlet vil presentere et utvalg av benyttede tørkemetoder for biomaterialer, og presentere noen begreper som er viktig å kjenne til rundt tørkeprosessen.

## 2.1 Frysetørking

Frysetørking er en utbredt dehydreringsteknikk og går ut på å fjerne vann fra frosset produkt via sublimasjon. Det vil si at vannet går fra frosset tilstand til dampform uten å først smelte. Tradisjonelt har frysetørking foregått under vakuum for å holde vannets damptrykk og temperatur i tørkekammeret godt under trippelpunktet, se Figur 6. Den største ulempen knyttet til vakuum frysetørking er høye energikostnader under drift, og dyrere og mer komplisert prosessutstyr. Derfor har denne metoden begrenset seg til høyt verdsette produkttyper hvor markedet er villig til å betale ekstrakostnadene. Årsaken til at produkter blir frysetørket er at kvaliteten på produktet blir betydelig høyere enn ved varmluftstørking. Siden frysetørking foregår ved lav temperatur, vil degradering på grunn av varme unngås (Di Matteo, Donsi & Ferrari, 2003).



Figur 6 Fasediagram for vann. (Fellows, 2000)

Frysetørking behøver ikke bare foregå under vakuum, men kan også foregå ved atmosfæres trykk. Vakuum er ingen uunnværlig forutsetning for at sublimering skal inntreffe. Det eneste kravet er at partialtrykket til vanndampen i tørkemediet er lavt nok slik at massetransport av vanndamp fra den frosne prøven kan forekomme. De største fordelene med atmosfærisk frysetørking er at apparaturen blir enklere og energibehovet betydelig lavere i forhold til vakuum frysetørking. Potensialet for atmosfærisk frysetørking ble først demonstrert av Meryman i 1959. Han viste at tørkeraten for et materiale som blir frysetørket er en funksjon av temperaturen og damptrykksgradienten mellom vanndampformasjonen i produktet og tørkemediet, og ikke det totale trykket i tørkekammeret. Forskerne Heldman og Hohner analyserte kinetikken knyttet til selve frysetørkeoperasjonen ved hjelp av matematiske

modeller. De bestemte hva slags innvirkning ulike operasjonsvariabler har å si for sublimasjonsraten. Ut fra de eksperimentelle resultatene konkluderte Heldman og Hohner med at reduksjon av prøvestørrelse og en økning av overflatens massetransportkoeffisient viste seg å være den mest effektive måten å øke atmosfærisk frysetørkingsrate (Mumenthaler & Leuenberger, 1991).

Frysetørring, eller *lyophilisation*, består av to steg. Det første steget er å fryse ned materialet som skal tørkes i tradisjonelt fryseutstyr. Små biter av produktet blir frosset raskt ned (Fellows, 2000). Når biologiske materialer fryser, blir det meste av vannet fjernet fra løsningen og isolert i iskrystaller. Størrelsen på de dannede iskrystallene avhenger av frysehastigheten. Det neste steget er å fjerne vann gjennom påfølgende tørking, og slik oppnå tørre produkter. Hensikten med tørkingen er å fjerne vannet fra iskrystallene uten at det skjer andre endringer i materialet. Hastigheten vannmolekylene fjerner seg fra krystallene med er kun avhengig av temperaturen. Andelen vann som returnerer til iskrystallene avhenger av vandampkonsentrasjonen i omgivelsene. Netto vannfjerning fra krystallene avhenger av hvor effektivt det unngås at vandamp returnerer tilbake til krystallene. En hindring for å fjerne vannmolekyler er det etter hvert tørkede ytre av materialet, som gir motstand mot vannoverføringen. Faktorene som bestemmer diffusjonsraten av vandamp ut fra materialet er:

- produksjonsraten for damp (temperaturen på materialet)
- motstanden i det tørkede laget, og
- vandamptrykket på materialets overflate

Siden temperaturen og størrelsen på produktet avgjøres av andre betraktninger, vil det primære målet ved frysetørring være effektiv fjerning av vandamp fra materialets overflate (Meryman, 1959)

Frysetørring er en ideell metode for tørking av matvarer, og medisinske og farmasøytiske produkter. Medikamenters holdbarhet har fått en betydelig økning takket være frysetørring. Bakterievekst og enzymatiske reaksjoner i vannholdige farmasøytiske preparater kan bli kraftig redusert, og i beste fall eliminert, ved hjelp av frysetørring. Frysetørring kan også hemme oksidasjon av biologiske substanser. Proteiner blir ikke denaturert under frysetørring og varmesensitive materialer har mulighet til å beholde sin levedyktighet etter å ha blitt frysetørket (Celiker, 1984).



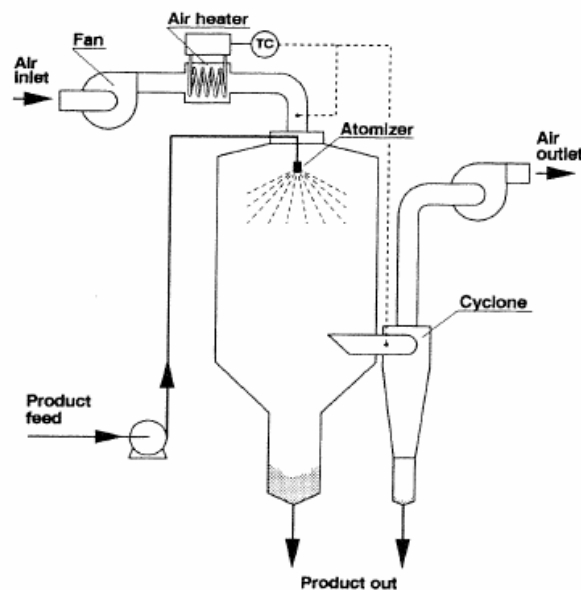
**Tabell 1** Materialer som frysetørkes (Adams, 1991).

Materialtype	Eksempler
Ikke-biologisk materiale	Dehydrering eller konsentrering av reaktive eller ustabile kjemikalier.
Ikke-levende biologiske produkter (majoriteten av hva som blir frysetørket)	Enzymer, hormoner, antistoffer, vitaminer, antibiotika etc. Gruppen inneholder farmasøytiske midler som kan ble brukt i diagnostisk eller terapeutisk sammenheng. Bein og annet kroppsvev for kirurgisk eller medisinsk bruk. Matvarer, hvor organoleptiske egenskaper er viktige. Biologiske produkter til industrielt bruk.
Levende organismer – hvor organismen etter tørking må kunne vokse og formere seg.	Bakterier og sopp
Diverse	Museumsartikler, vannskadde bøker etc.

## 2.2 *Spraytørking*

Spraytørking er definert som omvandling av føde fra en væsketilstand til tørkede partikler ved å spraye føden inn i et varmt tørkemedium. Det er en operasjon som foregår i ett trinn med en kontinuerlig materialstrøm. Produktet er i form av pulver, granuler eller agglomerater. Kontakt mellom fødespray og luft foregår enten medstrøms eller motstrøms, eller i kombinasjon av de to. Prosessen i spraytørking kan deles inn i fire deler: Forstøving av føden, kontakt mellom spray og tørkemedium, tørking, og atskillelse av tørket produkt og luft. For å spre føden i tørkekammeret benyttes enten en dyse eller en roterende forstøver. Inne i dysen settes føden i rotasjon, noe som forårsaker en kon-formet spray ut av dysen. Dråpestørrelsen er direkte proporsjonal med massestrømmen av føde og viskositet, mens den er omvendt proporsjonal med trykket. I roterende forstøvere kommer føden inn på en roterende skive eller hjul og blir akselerert mot ytterkanten hvor den brytes opp i en spray. En fordel med å bruke denne forstøvningsmetoden er at partikkelstørrelsen kan kontrolleres med hastigheten på skiven eller hjulet. Med en gang dråpene i sprayen kommer i kontakt med tørkeluften starter fordampningen fra dråpenes overflate (Bolland, 1994). Forstøvingen fører til at kontaktarealet mellom tørkemedium og materiale blir stort. På den måten tørker materialet raskt, gjerne på 1-

10 sekunder. Føderaten kontrolleres slik at luftens utløpstemperatur holder 90-100 °C. Dette tilsvarer en temperatur på produktet rundt 40-50 °C (Fellows, 2000). Selv om spraytørkere opererer ved høye temperaturer blir altså ikke produkttemperaturen i realiteten like høy, og sammen med den raske tørketiden fører spraytørring til lite skade på materialet. I spraytørker kan materialet tørkes til fuktigheter under kritisk fuktighetsinnhold avhengig av oppholdstid. Det er karakteristisk at materialet som går ut av tørken har en lavere temperatur enn luften ut. Det er vanlig at dråpene under tørkeforløpet endrer form og størrelse, eksempelvis gjennom utvidelse, krymping, sprekkdannelse eller poredannelse. Disse endringene avhenger av hvilken forstøvingsmetode som er benyttet for føden i tørkekammeret samt angitte tørkebetingelser (Bolland, 1994).



Figur 7 Prinsippskisse for en kontinuerlig spraytørke (Lievensse & van't Riet, 1993).

Etter tørkingen er ferdig skal tørt produkt og tørkemedium skilles. I hovedsak gjøres dette ut fra to prinsipper. Det ene prinsippet går ut på at mesteparten av produktet faller ned i bunnen av kammeret og tas ut der, mens en mindre andel av produktet følger med luften. Lufta går videre til en syklon hvor separasjon av luft og resterende produkt skjer. Det andre prinsippet går ut på at både tørkemedium og materiale sammen går ut i bunnen på kammeret. Dette setter store krav til den påfølgende separasjonen med hensyn til virkningsgrad. Dette systemet er vanlig i bruk da det ikke er behov for eget transportsystem for produktet (Bolland, 1994). Noen ganger kan det tørkede produktet bli av en meget støvaktig kvalitet. Da kan det være en idé å gjøre nok et tørkesteg i en vibrerende fluidized bed for å agglomerere det spray-tørkede produktet (Lievensse & van't Riet, 1993).

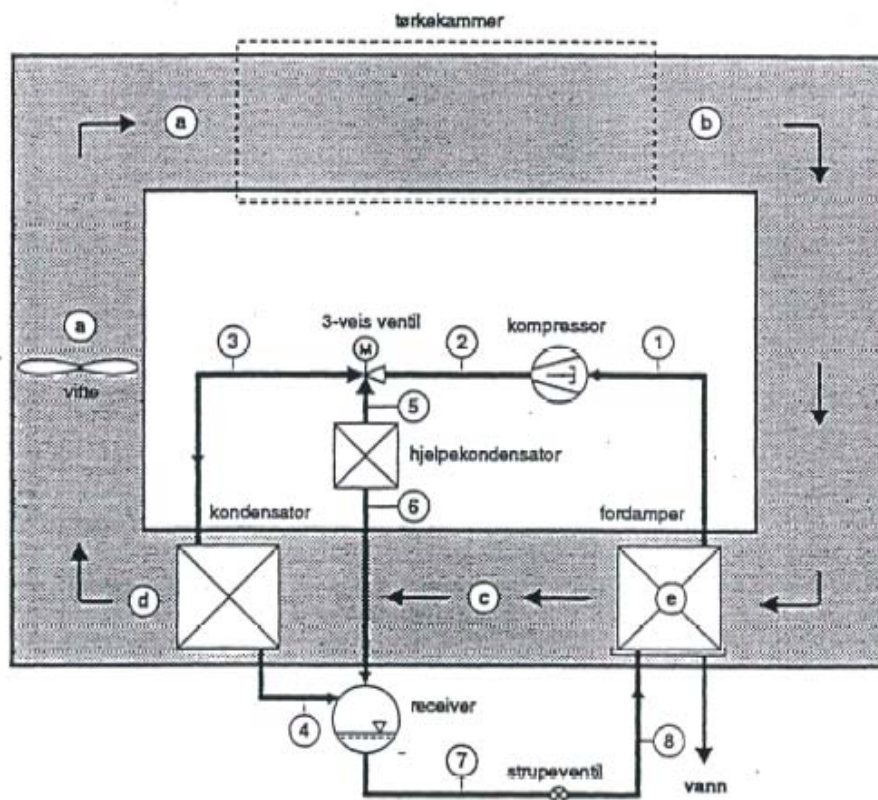
Å finne rett prosessdesign er vanskelig og gjøres ofte ved prøving og feiling. Spesielt for mikrobiologiske produkter hvor en skal unngå inaktivering og termiske skader er prosessdesignet vanskelig og viktig. Alle valg knyttet til designprosessen kan påvirke produktet. Strømningsraten skal bestemmes, det samme med inn- og utløpstemperatur, partikkelstørrelse og partikkelfordeling. Elementer som komplisert modellering og optimalisering, og prøving og feiling er både tidkrevende og ressurskrevende, noe som kan være en bakdel med spraytørring (Lievense & van't Riet, 1993).

Spraytørkere varierer i størrelse fra små pilotskala-modeller for små volum og høyverdi produkter, til store kommersielle anlegg med mulighet til for eksempel å produsere 10 000 kg tørrmelk i timen. Hovedfordelene med denne tørkemethoden er at tørkingen skjer raskt, det er mulighet for kontinuerlig produksjon, arbeidskostnadene er lave, og apparaturen er relativ enkel å operere og vedlikeholde. De største bakdelene er i følge Fellows (2000) de store kapitalkostnadene knyttet til spraytørkere og kravene om at føden må inneholde en relativt høy grad av fuktighet for å sikre at føden kan bli pumpet ut av forstøveren.

### ***2.3 Varmepumpetørring***

En varmpumpetørke består typisk av en kondensator, en kompressor, en fordamper og en vifte som skaper luftbevegelse. Tørr, varm luft føres over produktet som skal tørkes, tar opp fuktighet og resirkuleres. Avfuktningsprinsippet ved varmpumpetørring er at den varme, fuktige luften først føres forbi varmpumpens fordamper hvor den avkjøles. Ettersom luftens evne til å holde på fuktighet avtar med temperaturen, felles det ut vann på fordamperoverflaten. Luftens absolutte fuktighet avtar. Den tørre, avkjølte luften blåses til slutt over kondensatoren hvor den varmes opp til ønsket temperaturnivå før den på ny blåses inn i tørkekammeret. Den varmen som blir hentet ut av luften i fordamperen ved nedkjøling og avfuktning, følbart og latent varme, blir levert tilbake til luften i kondensatoren. Ved å fjerne vannet i væskefase i stedet for i dampfase tillates den latente varmen å fanges opp. Altså er det oppnådd en resirkulering av energien. Dette gjør varmpumpetørring til en energisparende tørkemethode. Varme og tørkemedium resirkuleres i et lukket system. Eneste netto energimengde som blir tilført systemet er energien som trengs til å drive varmpumpens kompressor og vifte. Overskuddsvarmen i systemet blir fjernet ved hjelp av en hjelpekondensator. Denne varmen kan for eksempel benyttes til vann- eller romoppvarming.

En typisk effektfaktor for en varmpumpetørke er  $COP=3-5$ . Effektfaktoren angir hvor stor kuldeytelse som leveres for hver enhet energi kompressoren bruker ved de gitte driftsforhold, og er et mål på hvor effektivt anlegget er. Med en varmpumpe i tørkesystemet er det mulig å regulere lufttilstanden i tørken til ønskede verdier, og dermed oppnå optimale tørkeforhold for forskjellige produkter under hele tørkeperioden. Ved å regulere forholdet mellom ytelsene på hoved- og hjelpekondensatoren, kan tørkeluftens temperatur reguleres. Det er for eksempel mulig å oppnå tørketemperaturer under frysepunktet og slik få atmosfærisk frysetørring. Fordamperytelsen kan reguleres slik at mengde vann som felles ut, og dermed luftfuktigheten, reguleres (Kramer, Song, Stene & Strømmen, 1994; Perera, 2004).



Figur 8 Varmepumpetørke i prinsipiell skisse (Kramer et al., 1994).

Tørkeluftens syklus i tørkeprosessen illustreres godt i Figur 8, og er som følger:

- a-b:** Tørkelufta tar opp fuktighet fra produktet ettersom vann fordampes fra overflaten. Varmen som trengs for å fordampes vannet hentes fra tørkelufta og lufttemperaturen synker.
- b-c:** Lufta strømmes gjennom varmpumpens fordampere. Lufta blir avkjølt og vann blir felt ut på fordampereoverflaten ved at vanddampen kondenserer, eventuelt fester seg som rim.

**c-d:** Den tørre, kalde lufta blåses over kondensatoren der den på ny blir varmet opp til tilnærmet ønsket temperatur. Den siste delen av oppvarmingen skjer ved tilførsel av varme fra vifta. I den prosessen er luftas absolutte fuktighet konstant.

**d-a:** Varme fra vifta medfører en entalpiøkning i lufta tilnærmet vifteeffekten. Også her er absolutt fuktighet konstant.

**e:** Relativ fuktighet antas å være 100 % på dette punktet siden fordamperoverflaten er fuktig.

Varmepumper kan kombineres med for eksempel tunneltørker og fluidized bed. De kan operere innenfor et stort område av relativ fuktighet og temperaturen på tørkemediet kan justeres innenfor en sprang på -20 °C til 100 °C (Alves-Filho & Strømmen, 1995). Den viktigste fordelen med en varmpumpetørke er at mulighetene for å regulere tørkebetingelsene er gode. For noen materialer er det ikke lønnsomt å holde konstante tørkeforhold under hele tørkeperioden. Det kan lønne seg, både kvalitetsmessig og energiøkonomisk, å benytte såkalte temperaturprogram. Ved å forandre tørkebetingelsene underveis i tørkingen kan både kvalitetsmessige og energimessige krav bli ivaretatt (Kramer et al., 1994).

## ***2.4 Tørkeforløpet***

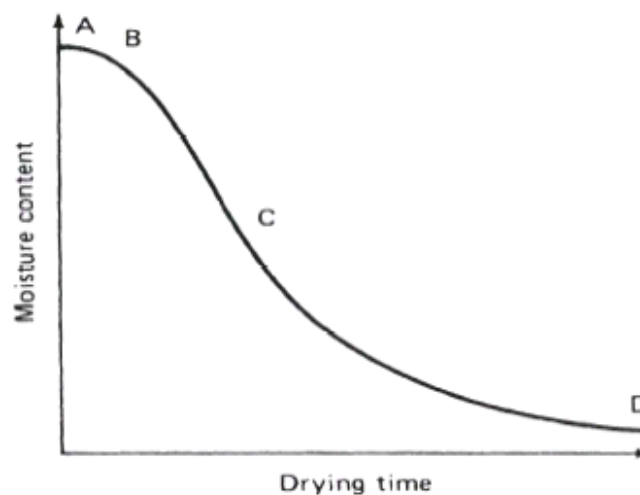
Det er tre avhengige faktorer som bestemmer luftens kapasitet til å fjerne fuktighet fra et materiale. Den første faktoren er mengde vanndamp som allerede er til stede i luften, altså luftens vanninnhold. Denne størrelsen uttrykkes enten som absolutt fuktighet, mange vanndamp per masseenheter av tørr luft, eller som relativ fuktighet, RH, forholdet mellom partialtrykket til vanndampen i luften og metningstrykket til vanndamp ved samme temperatur (Fellows, 2000).

Den andre faktoren er luftens temperatur og mengde luft som passerer materialet. Luftens temperatur målt med et termometer kalles tørrkuletemperaturen. Men dersom enden av termometeret dekkes av et vått klede, blir varme fjernet ved fordampning av vannet i kledet og temperaturen vil synke. Denne senkede temperaturen kalles våtkuletemperaturen. En økning av lufttemperaturen, eller en reduksjon av relativ fuktighet, får væsken til å fordampe raskere fra en våt overflate og temperaturen synker ytterligere. Duggpunktet blir da den temperaturen hvor luften, ved gitt trykk og fuktighetsinnhold, blir mettet med vanndamp (100

% RH). Vann vil kondensere fra den fuktige luften om temperaturen reduseres under duggpunktet (Fellows, 2000).

Den tredje avgjørende faktoren som bestemmer tørkehastigheten, i tillegg til lufttemperatur og fuktighet, er lufthastigheten over produktet. Når varm luft blir blåst over vått materiale, diffunderer vanndamp gjennom en grensefilm av luft og fjernes av luft som er i bevegelse. Det blir dannet en trykkgradient av vanndampen fra det fuktige indre av materialet til den tørre luften. Det er denne gradienten som er den drivende kraften for fjerning av vann. Luftfilmen fungerer som en hindring for både varmeoverføring og fjerning av vanndamp under tørking. Tykkelsen av filmen blir hovedsakelig bestemt av lufthastigheten. Dersom lufthastigheten er lav blir filmen tykkere og dette er med på å redusere både varmeoverføringskoeffisienten og hastigheten for fjerning av vanndamp. Vanndamp forlater overflaten av materialet og øker fuktigheten i luften som omgir det, noe som medfører en reduksjon i trykkgradienten fra vanndampen og dermed også tørkehastigheten (Ibid).

Ulike tørkekarakteristikkene benyttes for å beskrive et materiale med hensyn til tørkeegenskaper. Disse blir fremstilt grafisk og er kurver som viser hvordan fuktighetsinnhold, tørkehastighet og temperatur forandrer seg gjennom tørkeforløpet. Kurvene blir framstilt gjennom eksperimenter og er strengt tatt gyldige kun ved de forsøksbetingelsene de ble fremskaffet ved. Det er verdt å merke seg at i de diagrammer hvor materialfuktigheten  $X$  er benyttet, så er verdien på  $X$  i origo ikke null, men lik likevektsfuktigheten for materialet for de aktuelle lufttilstander som kurvene er fremkommet ved (Bolland, 1994).



Figur 9 Tørkekurve (Fellows, 2000).

Et tørkeforløp kan deles inn i forskjellige faser. I den første initiale perioden, fra A til B (se Figur 9), varmes/kjøles materialet av tørkeluften. Dette er en innsettingsperiode hvor materialets overflate varmes opp, eller kjøles ned, til våtkuletemperaturen til luften. Tørkingen vil så starte. Vann beveger seg fra det indre av materialet med lik hastighet som fordampning skjer fra overflaten slik at overflaten forblir våt. Denne fasen av tørkeforløpet kalles *konstant hastighetsperiode*, og finnes markert i tørkekurven som perioden fra B til C. Fasen foregår fram til kritisk vanninnhold,  $X_c$ , er nådd. Tørkingen styres av hvor god fordampningen fra materialets overflate er. I praksis vil forskjellige områder på materialet tørke med ulik tørkehastighet, og tørkeraten vil gradvis avta gjennom konstant hastighetsperiode. Når vanninnholdet i det tørkede materialet kommer under kritisk vanninnhold, vil tørkehastigheten sakte, men sikkert avta fram til den når likevekstfuktigheten,  $X^*$ . Denne fasen betegnes for den *fallende hastighetsperioden*, og finner sted mellom C og D i Figur 9. Det er som regel ikke så stor mengde vann som fjernes i denne perioden, men på grunn av at tørkehastigheten går ned mot null så blir tørketiden for denne fasen ofte lang. Vann fordamper fra overflaten av produktet raskere enn vann beveger seg fra det indre av materialet til overflaten. Produktoverflaten vil derfor tørkes ut. Videre fordampning skjer i sin helhet inne i materialet. Vanndampen diffunderer ut gjennom materialet og tørkehastigheten går til slutt mot null (Bolland, 1994; Fellows, 2000).

## 2.5 Vannaktivitet

Vanninnholdet i et materiale er den viktigste enkeltfaktoren som bestemmer nedbrytingsprosessen for materialet. Imidlertid er det ikke vanninnholdet alene som bestemmer stabiliteten til produktet, men også faktorer relatert til tilgjengeligheten av vann for nedbrytingsreaksjoner. Det er ikke én enkelt parameter som kan brukes som guide for å forutsi nedbrytingen, eller for å bestemme tørkingens sluttvanninnhold for å oppnå et lagringsstabil produkt (Strømmen, 1994). Tilgjengeligheten av vann for mikrobielle, kjemiske og enzymatiske prosesser er med på å bestemme lagringstiden for ulike materialer, og dette måles ut fra vannaktiviteten  $a_w$ , gitt i likning (2.1), til materialet. Ved å endre tilgjengeligheten til vannet, kan også stabiliteten til produktet varieres. Tilgjengeligheten kan reduseres ved å utføre ulike prosesser. Vannet kan for eksempel fjernes ved hjelp av avvanningsteknikker som dehydrering, fordampning eller frysetørking, eller vannet kan bindes til materialet i form av iskrystaller gjennom frysing. Vannet i produktet utøver et

damptrykk hvis størrelse avhenger av mengde vann representert i produktet, temperaturen og konsentrasjonen av løsninger, eksempelvis salter, i vannet (Fellows, 2000).

Vannaktiviteten er definert som forholdet mellom damptrykket til vann i materialet og det mettede damptrykket til vann ved samme temperatur:

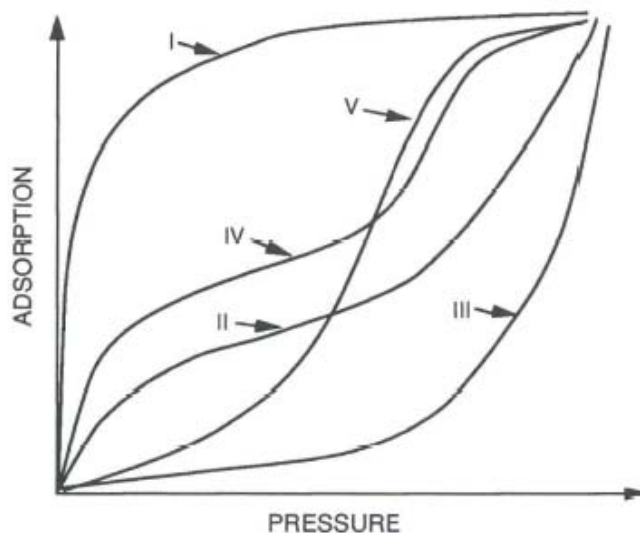
$$a_w = \frac{P}{P_0} = \frac{ERH}{100} \quad (2.1)$$

hvor            P [Pa] = damptrykket i materialet  
                   P<sub>0</sub> [Pa] = mettet damptrykk for rent vann ved samme temperatur  
                   ERH = likevekts relativ fuktighet

## 2.6 Sorpsjon

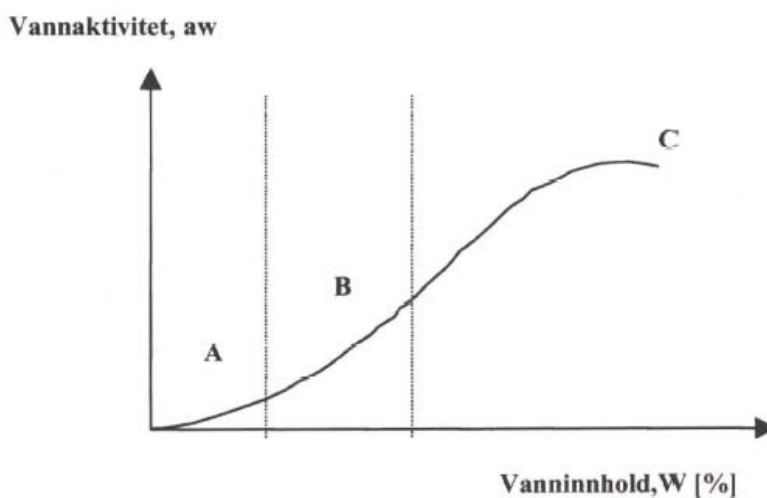
Sammenhengen mellom vannaktivitet og vanninnhold i et materiale er kjent som sorpsjonsisotermen. Når et materiale er i en omgivelse med lavere relativ fuktighet enn vannaktiviteten for produktet, vil produktet avgi fukt og dermed tørke inntil likevektsfuktighet er oppnådd. Dersom luftens relative fuktighet er større enn vannaktiviteten, vil derimot produktet ta opp fukt og absorberer vann helt til likevekt med omgivelsene er innstilt (Strømmen, 1994). Ved konstant temperatur vil vanninnholdet i produktet endres til det oppnår likevekt med luften rundt. Når ulike verdier av relativ fuktighet plottes mot likevekts vanninnhold, fås en sorpsjonsisoterm. Sorpsjonsisotermen, eller likevektsfuktigheten, varierer mye mellom ulike typer materialer. Ved en bestemt temperatur vil produktet ha en bestemt sorpsjonsisoterm. Produktets likevektsfuktighet vil da være i likevekt med den relative fuktigheten i omgivelsene. Endres den relative fuktigheten, endres også vannaktiviteten i produktet. Den spesielle formen på sorpsjonsisotermen er gitt av forskjeller i fysisk struktur, kjemisk sammensetning og hvordan vannet er bundet til materialet (Fellows, 2000). I følge klassifisering gitt av Brunauer finnes adsorpsjonsisotermen som fem ulike basisformer (Roos, 1995):





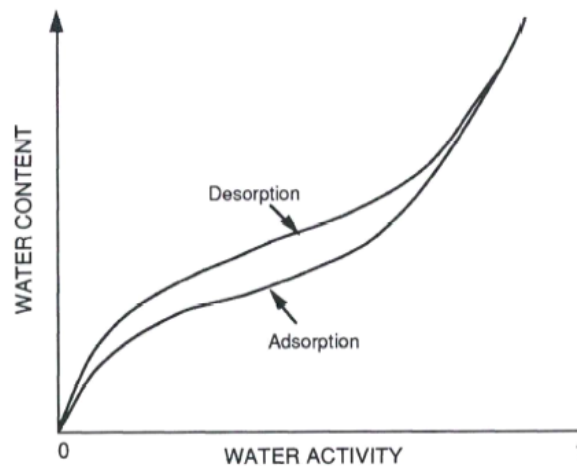
**Figur 10** Klassifisering av adsorpsjonsisotermer (Roos, 1995).

Vannadsorpsjon i biologiske materialer har ofte en S-form, som i type II angitt på Figur 10. I den første delen av kurven, til punkt A, vises monolag av vann (se Figur 11). Dette laget med vann er svært stabilt, kan ikke fryse og heller ikke bli fjernet ved tørking. Den relativt rette kurven fra A til B representerer vann som er adsorbent i multilag inne i produktet og som løsninger i det løste stoffet. Den tredje delen av kurven, over punkt B, viser fritt vann som er kondensert inne i kapillærstrukturen eller inne i cellene til materialet. Vannet er holdt på plass med svake bindingskrefter, og kan derfor enkelt fjernes ved tørking og lar seg lett fryse. Fritt vann er tilgjengelig for mikrobiell vekst og enzymaktivitet, og materialer med vanninnhold over punkt B blir sannsynligvis angrepet og ødelagt (Fellows, 2000).



**Figur 11** Generell sorpsjonsisoterm (Fellows, 2000).

Sorpsjonsisotermen sier ved hvilken vannaktivitet produktet er stabilt og viser effekten vanninnholdet har på vannaktiviteten, som igjen sier noe om lagringsstabiliteten. Den brukes til å bestemme hastigheten og utviklingen til tørkingen, den optimale frysetemperaturen for lagring, og fuktproblemer i forbindelse med pakking. Sorpsjonsisotermen består både av adsorpsjon og desorpsjon. Vannaktiviteten i en sorpsjonsisoterm kan være forskjellig om det er snakk om opptak eller avgivelse av fukt i produktet, selv ved likt trykk, og kurvene vil avvike noe fra hverandre. Dette fenomenet kalles hystereseseffekt (Roos, 1995). Hystereseeffekten viser typisk at mer vann bindes ved samme  $a_w$  for desorpsjonskurven enn for adsorpsjonskurven, se Figur 12.



**Figur 12** Sorpsjonsisoterm med hystereseseffekt (Roos, 1995).

Det er ulike grunner til at hystereseseffekt oppstår. En mulig forklaring på denne effekten er at fordampning og kondensasjon ikke er reversible prosesser (Strømmen, 1994). En av grunnene til hystereseseffekt er vannets oppførsel inne i porene eller kapillærene. Ved adsorpsjon trekkes vannet lett inn i kapillærene, men ved desorpsjon vil kapillæreffekten føre til at vannet vanskeligere trekkes ut av porene igjen, som fører til hystereseseffekt. Ved adsorpsjon og desorpsjon vil også overflatespenningen,  $\gamma_s$ , og fuktningsvinkelen,  $\theta$ , være ulike. Under adsorpsjonen vil det rene vannet løse opp stoffer som er tilstede i materialet og dette kan føre til en økning av  $\gamma_s$ . Ved desorpsjon vil en lavere vannaktivitet oppnås ved et gitt fuktighetsforhold. Svelling av materialet er også en årsak til hystereseseffekt. Når materialet sveller vil polare punkter som tidligere var utilgjengelige, bli tilgjengelige for vannmolekyler slik at de kan bindes på disse. Dette er aktuelt for proteiner. Overgang mellom glasstilstand og gummiaktig tilstand kan også føre til hystereseseffekt. Adsorpsjon i glasstilstand vil være langsom på grunn av den rigide strukturen i

materialet. Ved gummiaktig tilstand er bindingene fleksible og materialet vil kunne binde til seg vann på flere steder (Bell & Labuza, 2000).

## 2.7 Rehydrering

Rehydrering er en prosess der tørket materiale blir fuktet opp igjen. I praksis vil forandringene som skjer i materialet som følge av tørkingen være irreversible, og det er derfor ikke så enkelt som å karakterisere rehydrering som en reversibel prosess til dehydrering (Femina, Bestard, Sanjuan, Rosselló & Mule, 2000; Fellows, 2000). Rehydrering er en kompleks prosess hvor målet er å restituere tørket materiale i kontakt med vann, eventuelt annen væske. Det er et mål på hvor stor endring tørkingen har påført stoffet (Lewicki, 1998). Mange faktorer har innvirkning på rehydreringsprosessen. Blant annet spiller temperatur en stor rolle for adsorpsjonskapasiteten. Vanligvis vil økt temperatur på rehydreringsvæsken føre til at maksimal sorpsjonskapasitet nås raskere. Sorpsjonshastigheten vil også være raskest i de første fasene under rehydreringen og gradvis avta etter hvert som fuktet produkt når likevekt (Famina et al, 2000). En annen viktig faktor er forskjellen i pH i rehydreringsmediet sammenlignet med den originale suspensjonen. Det er viktig å være oppmerksom på at materiallekkasje fra døde eller skadede celler vil påvirke pH på det rekonstituerte materialet. I slike tilfeller kan materialet rehydreres i et medium med ulik sammensetning enn hva som opprinnelig eksisterte, for eksempel ved å forandre pH eller tilsette enzymhemmere for å unngå ødeleggende enzymatiske reaksjoner. I de fleste tilfeller vil rehydrering skje ved at samme mengde vandig fase, som tidligere ble fjernet fra systemet, igjen blir tilsatt. Når det tørkede produktet er svært porøst, skjer rehydreringen raskt og fullstendig. Fordelen med rask rehydrering er at prøvene slipper å bli eksponert for rehydreringsløsningen så lenge (Souzu, 1999).

Rehydrering av tørket produkt vil typisk utgjøre tre simultane prosesser; absorpsjon av vann, svelling av produkt og tap av materiale (Lee, Farid & Nguang 2006). Rehydreringsindeksen i likning (2.2) er et mål på hvor godt produktet absorberer vann etter tørking.

$$R = \frac{W_f}{W_p * T} \quad (2.2)$$

$W_f$  er vekt av våt prøve etter rehydrering,  $W_p$  er vekt av tørt produkt og T er prosent tørrvekt i tørket produkt.

## ***2.8 Faktorer som påvirker overlevelse ved tørking***

Cellenes overlevelse under tørking er avhengig av en rekke faktorer som vekstforhold, tilsats av protektanter, cellekonsentrasjon og pH. Spesielt gjelder dette for biologisk aktive komponenter. For eksempel har bakteriestammer ulik følsomhet for tørking. Gram-positive celler er generelt mindre sensitive enn Gram-negative (Lievansé & van't Reit, 1994).

### **2.8.1 Vekstforhold**

Overlevelse under tørking er avhengig av vekstfasen cellen er i. Sammensetningen av cellemembranen forandres med vekstforholdene og det vil påvirke membranfaseovergangen. Generelt er det funnet høyest rehydreringsmotstand for bakterier høstet i stasjonær vekstfase. For melkesyrebakterier er overlevelse størst når de blir høstet i tidlig, stasjonær vekstfase. En mulig årsak til høyere overlevelse ved innhøsting i stasjonærfasen, er at cellene under stress/sult produserer protektanter. Det er funnet at trehalose, syntetisert fram av gjærceller i vekst, øker overlevelsen etter tørking. Denne observasjonen kan igjen relateres til membranfaseovergangen. Med ekstern tilsats av trehalose kan overlevelsen av for eksempel gjærceller i stasjonær vekstfase øke ytterligere (Lievansé & van't Reit, 1994).

### **2.8.2 Protektanter**

En enkel og god måte å øke overlevelse under tørking på, er å tilsette protektanter. Kjente protektanter med positiv effekt er sukkerarter, alkoholer, karboksylsyre, glyserol, melk, kulturmedier, polymerer, proteiner, aminosyrer og salter. En teori om hvordan protektanten virker med cellen er framsatt av Orndorff & MacKenzie. De mente det ikke var noen samhandling i det hele tatt, men at protektanter danner en amorf matriks som dispergerer skadelige komponenter, som for eksempel syrer, som lekker ut av cellen. I kontrast til dette er det framsatt teorier som går på samhandling mellom additiv og celle. En hypotese er at den beskyttende effekten er basert på spesifikk interaksjon, gjennom hydrogenbindinger, mellom protektanten og de hydrofile gruppene på cellemembranen og proteinene. Slike interaksjoner (hydrogenbindingsdannelse) stabiliserer strukturen ved at additivet opptre i rollen som det bundne vannet (Lievansé & van't Reit, 1994).

### 2.8.3 Cellekonsentrasjon

Det er rapportert om at jo høyere cellekonsentrasjon det er i suspensjonen som skal frysetørkes, jo høyere er overlevelsen av cellene. En anbefaling er å benytte seg av konsentrasjoner høyere enn  $10^{10}$  celler per ml. En mulig forklaring på denne effekten er at intracellulære komponenter, som frigis fra skadede og ødelagte celler, er med på å beskytte de andre cellene. Det er sannsynlig at disse komponentene fungerer som antioksidanter, og dermed blir høy cellekonsentrasjon enda viktigere for overlevelse dersom ingen protektanter er tilsatt. De døde cellene kan også ha en fysisk skjermingseffekt for de levende cellene, dvs. at de blir beskyttet mot harde forhold som eksempelvis økende saltkonsentrasjon i mediet. Dette skjer ved at grensflatearealet mellom de levende cellene og det eksterne mediet reduseres (Lievansé & van't Reit, 1994).

### 2.8.4 Tørkegassens sammensetning

Sammensetningen av tørkegassen kan også påvirke overlevelsen. For eksempel kan nitrogen være å foretrekke dersom oksidasjon av cellulære komponenter har stor innvirkning. For flere arter bakterier ga nitrogen som tørkemedium lik eller bedre overlevelse enn luft, i følge Freeman et al. Fordi tørkegassen brukes i store mengder, har utskiftning av luft til fordel for nitrogen stort sett vært utført i laboratoriesammenheng (Lievansé & van't Reit, 1994). Eksperimenter gjort på tørkegassens sammensetning ved SINTEF Industriell Bioteknologi viser at tørking i nitrogengass fremfor luft ikke har noen effekt på tørking av *S. thermophilus* og *L. bulgaricus* (Indergård, 1998).

### 2.8.5 Tørkeraten

Det er usikkert hvorvidt tørkehastigheten påvirker overlevelse av biologisk aktive komponenter som bakterier. En kan se for seg celler som blir utsatt for ugunstige forhold som høye temperaturer eller skadelige reaksjoner som oksidasjon og syreproduksjon, at her vil høye tørkerater som forkorter tørketiden være å foretrekke. En sideeffekt av kjappe tørkehastigheter kan være at det dannes en tørr hinne på overflaten av det tørkende produktet som totalt vil være med på å øke den samlede tørketiden for å få produktet tilstrekkelig tørt. I noen forsøk kan det se ut som lav vannfjerningshastighet er mest gunstig, mens det i andre tilfeller ikke påvirker overlevelsen i det hele tatt, men at det kun er sluttvanninnholdet som teller (Lievansé & van't Reit, 1994).

### 2.8.6 Rehydreringsmediet

Rehydreringsforholdene, som mediesammensetning, osmolaritet, temperatur, pH og rehydreringstid vil også påvirke overlevelse av tørt produkt. Noen forfattere anser dette steget som det aller viktigste. Skader som er påført cellen under tørking trenger ikke nødvendigvis å føre til celledød. Celler som har blitt skadet under tørking kan lettere repareres og overleve hvis rehydreringsmediet er gunstig. Under rehydrering vil det være mindre sannsynlighet for membranfaseovergang ved høye temperaturer enn ved lave. Gunstig temperatur vil gjøre at cellemembranen er i flytende krystallfase, hvilket vil hindre lekkasje av intracellulære komponenter (Lievanse & van't Reit, 1994). Det er vanlig at tørkede mikroorganismer blir rehydrert med destillert vann i romtemperatur. Rask reabsorpsjon av vannmolekyler kan føre til brå ekspansjon av tørkede materialer og dette kan føre til forstyrrelser i membranstrukturen. I noen tilfeller bør heller mikroorganismene rehydreres ved lave temperaturer for å redusere de ødeleggende kjemiske og/eller enzymatiske reaksjonene som vil oppstå etter rehydrering. Dette prinsippet kan dog ikke benyttes på materialer som er sensitive for kjøleskader (Souzo, 1999).



### 3 Litteraturstudium

Hva er *state of the art* innen tørking av biologiske materialer i dag? Hvilke typer materialer er aktuelle å tørke? Og er valgte tørkemetoder vellykkede?

Det er gjennomført et litteraturstudium over hva som er gjort av tørking av biologisk aktive komponenter, celler og vev de senere årene for å forsøke å svare på ovennevnte spørsmål. Funnene fra litteraturstudiet er redegjort for i denne delen av oppgaven.

#### 3.1 *Spraytørking*

Spraytørking er den mest vanlige formen for tørking i en nedstrøms prosesslinje for å konvertere en pumpevillig væske til tørt pulver. Spraytørking er anvendelig for dehydrering av materialer som har tendens til termisk degradering under prosessering og/eller lagring. Metoden er vanlig til dehydrering av biologiske og biologisk aktive materialer, både i liten og stor skala. Dette inkluderer enzymer, proteiner, vitaminer, levende celler, legemidler og diverse matprodukter. Prosessen er rask og kan gjennomføres ved moderate til høye temperaturer for å oppnå tørking innen rimelig tidsbruk (Adamiec & Strumillo, 1998).

I en spraytørkeprosess er høy innløpstemperatur nødvendig nettopp fordi spesifikk varme til fordampning må være tilgjengelig på veldig kort tid (Boza, Barbin & Scamparini, 2004). På grunn av fordampningskjølingen i første del av tørkeprosessen, vil overlevelse av mikroorganismer samsvare med den valgte utløpstemperaturen i tørka, og ikke innløpstemperaturen (Boza, Barbin & Scamparini, 2004; Adamiec & Strumillo, 1998; Labuza, Le Roux, Fan & Tennenbaum, 1970). De høyeste overlevelsesratene er funnet der hvor utløpstemperaturen er lavest. I første steg av tørkeprosessen forblir partikkeloverflaten våt (konstant hastighetsperiode), og på grunn av fordampningen av vann vil ikke temperaturen overstige våtkuletemperaturen. I denne fasen vil termisk inaktivering bli begrenset fordi høy fordampningsrate og den resulterende våkuletemperaturen beskytter cellene fra den høye temperaturen som er i tørka. I den neste fasen i tørkeprosessen vil nå partikkeloverflaten være tørr og temperaturen på materialet stiger maksimalt til innløpstemperaturen tørka opererer ved. Nå er ikke lenger fordampningskjøling tilgjengelig og termisk inaktivering vil øke, men på grunn av lavt vanninnhold i partikkelen, vil cellene nå ha en forhøyet resistens mot varme (Boza, Barbin & Scamparini, 2004). Ved tørking av melkesyre bakterier og gjær bør ikke



innløpstemperaturen i tørkekammeret overstige 140-150 °C på grunn av minkende celleaktivitet og dermed redusert mikrobiologisk kvalitet og anvendelighet av det tørre produktet (Adamiec & Strumillo, 1998).

Hovedfordelen med spraytørking er altså den raske tørkingen, som vanligvis skjer på sekunder. På grunn av rask tørkehastighet og kort oppholdstid i tørkekammeret, blir den termiske skaden på materialet liten, selv om tørketemperaturen er forholdsvis høy (Labuza et al., 1970). Fordi produkttemperaturen forholder seg relativt lav gjennom tørkeprosessen, blir spraytørking ofte foretrukket for tørking av varmesensitive materialer (Okello, Brennan, Lewis & Gilmour, 1998). Spraytørking kan gi høye produksjonsrater til lave operasjonskostnader. Resultatet blir pulver som er tørt, stabilt, tar opp liten plass og er lett å transportere (Simpson, Stanton, Fitzgerald & Ross, 2005). Likevel er spraytørkere noe ufordelaktige med tanke på deres store volum som krever stor plass og høy kapitalkostnad ved investering (Adamiec & Strumillo, 1998).

En ulempe med tørking framfor frysing av biologisk aktivt materiale er tap i aktivitet/levedyktighet under lagring, spesielt om materialet blir lagret i romtemperatur øker sjansen for deaktivering. For å minske tapet kan ulike protektanter bli tilsatt i vekstmediet til mikroorganismen, eller i tørkemediet. I tørkeprosesser blir cellene utsatt for lave  $a_w$ -forhold. Akkumulering av protektanter, som sukkerarter og alkoholer, vil forbedre overlevelsen til mikroorganismene utsatt for lav vannaktivitet. Siden det er liten sannsynlighet for mikroorganismer å oppta slike løsninger under den korte tørkeprosessen som forekommer under spraytørking, må løsningene opptas før tørkeprosessen starter, dvs. under vekstfasen av cellene. Ikke bare blir mikroorganismene utsatt for osmotisk stress, men kan også utsettes for kritiske temperaturer under spraytørking. Det er vist at opptak av protektanter øker termotoleransen til ulike organismer (Ferreira, 2005).

Tap i levedyktighet viser seg i høy grad å skyldes skade på cellemembranen selv om celleveggen, ribosomene og DNA også blir påvirket ved høye temperaturer (Simpson et al., 2005). Skader på celler og inaktivering skjer ikke bare under prosessering, men også under lagring av tørkede produkter. Den relative fuktigheten i omgivelsene vil her være av betydning. Vannaktiviteten av probiotisk pulver synker ved økende lagringstemperatur. Spraytørkede kulturer bevarer derfor levedyktigheten lenger ved lave lagringstemperaturer, som for eksempel ved kjøletemperatur (Desmond, Ross, O'Callaghan, Fitzgerald & Stanton,

2002). Det er å foretrekke at vanninnhold etter tørking er lavere enn 7 % for probiotisk melkepulver. Dette for å minimere risikoen for lagringsrelaterte defekter som krystallisering av lactose (Anante, Volkert & Knorr, 2005).

### 3.1.1 Hva blir tørket?

Innenfor spraytørking av biologisk aktive materialer er det ulike varianter av melkesyrebakterier, gjærsopp og bifidobakterier som vanligvis blir tørket på denne måten. Målet er å oppnå størst mulig grad av levedyktighet etter tørking, og også etter en viss lagringsperiode.

Bifidobakterier er Gram-positive bakterier som naturlig finnes i tarmsystemet hos mennesker og varmblodige dyr. Det er vist at bakteriene har en positiv effekt på microfloraen i magen ved at de forhindrer kolonisering av patogene, sykdomsfremmede bakterier, forbedrer diaré og forstoppelse, aktiverer immunforsvaret og øker proteinfordøyelsen. På grunn av disse fordelaktige effektene blir bifidobakterier stadig oftere å finne i produkter som ost, yoghurt og andre melkeprodukter. I tillegg finnes tørkede bifidobakterier i diverse helseprodukter og farmasøytiske preparater til behandling av mage-/tarmforstyrrelser (Lian, Hsiao & Chou, 2002; Desmond et al., 2002). Anbefalt daglig inntak er et minimum av  $10^8$  celler for å sikre probiotisk effekt hos konsumenten (Ananta, Volkert & Knorr, 2005).

Melkesyrebakterier er Gram-positive, ikke-sporedannende bakterier som produserer melkesyre som hovedprodukt ved fermentering (gjæring). Bakteriene brukes som startkulturer for fermentering av en rekke produkter som melk, ost, yoghurt, og kjøtt- og fiskeprodukter. Bakterienes hovedrolle er å fermentere sukker i råmaterialet til melkesyre og eventuelt andre biprodukter for å beskytte produktet mot mikrobiell ødeleggelse, samt for å gi ønsket smak og aroma (Indergård, 1998). Når bakteriene vokser, dannes melkesyre som gir et pH-fall til 5 eller lavere. Melkesyren virker da som et konserveringsmiddel (Store Norske Leksikon, 2006). En undersøkelse gjennomført av Linders, Kets, de Bont og van't Riet (1998) om konvektiv tørking av melkesyrebakterien *Lactobacillus plantarum* viser at det lønner seg å tørke melkesyrebakterier med høy initial cellekonsentrasjon. Det er både økonomisk ut fra et energimessig synspunkt samtidig som det forbedrer aktiviteten av gjenværende bakterier etter tørking. Bakteriene bør høstes i begynnelsen på stasjonær vekstfase, jf. del 2.8.1. Dessuten fant de at bakterievekst under vanlige betingelser er å foretrekke framfor vekst av bakterier under osmotisk stress.

Gjærsopper er typisk encellede sopper som lever i sukkerholdige væsker og formerer seg ved knoppkytning. I dagens industrielle gjæringsprosesser brukes renkulturer av gjærsopper. Gjærsoppenes fysiologiske egenskaper benyttes ved atskillige former for gjæring. Best kjent er alkoholgjæring, hvor sukker spaltes til alkohol og karbondioksid. *S. cerevisiae*, ølgjær, brukes til ølbrygging og baking (pressgjær). Vingjæren, *S. ellipsoideus*, forekommer i atskillige viltvoksende raser som er med på å gi vin dens lokale preg (Store Norske Leksikon, 2006). Et problem med gjær er lagringen. Pressgjær med et vanninnhold på 70 % kan bare oppbevares i romtemperatur i noen timer, mens den under kjøling, ved 2-7 °C, kan holdes aktiv i 4-5 uker. Tørrgjær kan under de samme omstendighetene holdes aktive en seks måneders tid (Luna-Solano, Sakgado-Cervantes, Garcí-Alvarado & Rodríguez-Jimenes, 1998).

### 3.1.2 Egnethet i biobanksammenheng

For å benytte spraytørke som tørkemethode må materialet være av en væskeaktig karakter slik at det lar seg spraye inn i tørka. I biobanksammenheng blir da de materialene som ikke er flyktige utelukket. Spraytørrking egner seg best for bulkprosesser og resultatet etter tørrking blir et pulveraktig material som samles opp i en syklon. I biobanker kan materiale som eventuelt skal tørkes være av begrenset omfang, og materialet kan stamme fra flere pasienter slik at hver prøve må tørkes for seg. Spraytørrking har derfor en begrenset egnethet til bruk i biobanker.

**Tabell 2** Tabellarisk oversikt fra litteraturstudiet over spraytørkede materialer.

Spraytørrking				
Hva er tørket?	Tørkebetingelser	Er prøvene rehydrert?	Resultat	Forfatter(e)
Miks av tre ulike melkesyre bakterier og bakegjær.	Medstrøms spraytørke (SR-16). Innløpstem. 110-160 °C, føderate 60-150 ml/min, utløpstem. i snitt 52 °C.	Ja, for å sjekke vekstforholdene etter tørrking.	Vanninnhold på 7 % ved utløpstem. på 52 °C. Etter 16 h vekst var konsentrasjon av bakterier og gjærceller lik utgangspunktet, som betyr at biomassen er bevart. Tørketemp. over 150 °C anbefales ikke.	Adamiec, J. & Strumillo, C. (1998) <i>Drying</i>
Bakterien <i>Beijerinckia</i> sp, innkapslet i maltstivelse.	LabPlant SD-04 spraytørke. Innløpstem: 135, 155 og 175 °C. Utløpstem: 80, 90 og 100 °C. Dysediameter 1 mm, peristaltisk pumpe 10 ml/min.	Blir benyttet til fermentering.	Vanninnhold: 3-4 %. Prøvene ble lagret ved 4 °C i 2 mnd. Etter tørrking og lagring mistet bakterien mye av sin levedyktighet og kapasitet til biopolymer-produksjon. Valg av innkapslingsforhold blir viktig.	Boza, Y., Barbin, D. & Scamparini, A.R.P. (2004), <i>Process Biochemistry</i>

Spraytørring				
Hva er tørket?	Tørkebetingelser	Er prøvene rehydrert?	Resultat	Forfatter(e)
Enzymet <i>Polyfenoloksidase</i>	Anhydro Laboratory medstrøms spraytørke med roterende forstøver. Innløpstem: 160, 176, 200, 224 og 240 °C. Utløpstem: 80, 88, 100, 112 og 120 °C.	Enzymaktivitet ble målt i en løsningsmik.	Enzymaktivitet varierte fra 0 % til 86,5 % for laveste utløpstem. Utløpstem. den viktigste faktoren som påvirker enzymaktivitet. Aktiviteten ikke sensitiv for innløpstem.	Okello, H.O., Brennan, J.G., Lewis, M.J. & Gilmour, S. (1998) <i>Drying</i>
Ni ulike bifidobakterier. Skummet melk ble brukt som bærer av bakteriene.	- Lab.skala: Innløpstem: konst. 170 °C, utløpstem: 85-90 °C. -Storskala fluidizes bed spraytørke: To eksterne fluidezed bed med lufttemp 55 og 25 °C. Tre dyser automatiserte føden. Innløpstem 175 °C og utløpstem 68 °C.	Nei	Melkepulveret lagret i polyetylenposer og oppbevart i aluminiumstrukne papirposer ved 4, 15 og 25 °C. Bruk av fluidized bed forbedret levedyktigheten, også ved lagring i romtemp. En gruppe av nært relaterte arter tolerant mot varme og oksygen hadde høy overlevelse etter spraytørring. Levedyktighet beholdt etter lagring ved 4 °C.	Simpson, P.J., Stanton, C., Fitzgerald, D.F., Ross, R.P. (2005) <i>Journal of Applied Microbiology</i>
Melkesyrebakterien <i>Lactobacillus sakei</i> CTC 494. Bakterien har vokst i nærvær av sakkarose og glutamat.	Spraytørring og vakuumpfrysing (50 mTorr i 48 h), ellers ingen spesifikke tørkebet. gjengitt. Tørkede celler lagret ved 20 °C.	Nei	Bedre overlevelse etter frysetørring enn spraytørring. Bakterien overlevde 60 % lenger etter spraytørring etter å ha vokst med sakkarose eller glutamat, men ingen signifikant endring ble observert ved frysetørring.	Ferreira, V., Soares, V., Santos, C., Silva, J., Gibbs, P.A., Teixeira, P. (2005) <i>Biotechnology Letters</i>
Probiotisk bakterie: <i>L. paracasei</i> NFBC 338. Bakterien ble utsatt for varme (15 min ved 52 °C) eller salt (0,3 M NaCl i 30 min).	Laboratorieskala spraytørker. Innløpstem: konst. 170 °C. Utløpstem: 95-105 °C.	Ja, ved 4 °C i en AM-buffert og en AM-buffert som inneholdt sakkarose i 1-72 h.	Ved å utsette bakterien for varme eller salt ble varmetoleransen forbedret under spraytørring sammenlignet med ktr. Forbedringen var 18 ganger for varme og 16 ganger for salt.	Desmond, C., Stanton, C., Fitzgerald, G.F., Collins, K., Ross, R.P (2002) <i>International Dairy Journal</i>
Bifidobakterier: ulike <i>B. infantis</i> og <i>B. longum</i> . Ble tørket med ulike bærere: skummet melk, gelatin, "gum arabic" og stivelse.	Filtrert innløpsluft med temp 100±1 °C. Utløpstem: 50-60 °C. Prøvene lagret i sterile flasker ved 4 °C.	Nei	Overlevelse etter tørring preges mye av hvilken bakteriebærer som velges, og også utløpstem. <i>B. longum</i> B6 klarte seg uansett best, og aller best med skummet melk som bærer; 82,6 % overlevelse. Lavest overlevelse ga stivelse når denne var bærer.	Lian, W., Hsiao, H., Chou, C. (2002) <i>International Journal of Food Microbiology</i>
Melkesyrebakterien <i>L. rhamnosus</i> GG. Skummet melk som bærer.	Medstrøms spraytørke (Büchi B-191). Konst. fødestrøm: 5ml/min. Utløpstem: 70-100 °C	Nei	Overlevelse på 60 % ble oppnådd ved 80 °C som utløpstem. Membranen identifisert som hovedstedet for skade under spraytørring.	Anante, E., Volkert, M., Knorr, D. (2005) <i>International Dairy Journal</i>

### 3.2 Frysetørring

Frysetørring har blitt en av de viktigste prosessene for å bevare varmesensitive biologiske materialer. I denne sammenheng forstås frysetørring som vakuum frysetørring da dette er den mest utbredte metoden. Det er kjent at frysetørring har flere fordeler; stabilitet av tørt produkt i romtemperatur, produkt kan lett bli rekonstituert ved tilsats av vann, produktet oppnår en porøs struktur, vektreduksjon og mulighet for enkel steril håndtering (Rindler, Lüneberger, Schwindke, Hescel & Rau, 1999)

Av biologiske materialer som er aktuelle å relatere til biobanker, er det blant annet funnet at humane, røde blodceller og blodplater er forsøkt tørket ved frysetørring. Gjennomgående er at det er ønskelig å frysetørke prøvene slik at normale metabolske, reologiske og cellulære egenskaper blir vedlikeholdt etter rehydrering og påfølgende lagring i standard biobank konserveringsløsninger. Skal tørring være en effektiv måte å bevare blodceller på, må mellomledd som adenosintrifosfat (ATP), 2,3 DPG<sup>1</sup> og laktat være intakt. Både ATP og 2,3-DPG er med på å regulere binding av oksygen til hemoglobinet. Tap av disse fører til tap i cellefunksjonen og oksygentransport. Resultat fra Sowemimo-Coker, Goodrich, Zerez og Tanaka (1993) viste at rekonstituerte, frysetørkede røde blodceller opprettholder verdier av adenosintrifosfat (ATP), 2,3 DPG og laktat som er likeverdige eller bedre enn kontrollprøvene. Konklusjonen fra deres forsøk var at røde blodceller med suksess kan frysetørkes og videre lagres ved 4 °C, og at frysetørketeknologi kan utvides til å oppnå langtidslagring for humane røde blodceller.

En av de mest kritiske komponentene under frysetørring er cellemembranen. På en side er den en barriere for vanntransporten fra intracellulært til ekstracellulært medium. Dette kompliserer forståelsen og modelleringen av kinetikken rundt tørkeprosessen. På den andre siden er membranen i seg selv meget sensitiv for dehydrering og rehydrering. Derfor er ofte skade på cellemembranen en sannsynlig årsak til ødeleggelse av cellen ved tørring. For å unngå mest mulig skade på cellemembranen er det gjennomført ulike forsøk med tilsats av protektanter. Rindler et al. (1999) så på optimal frysetørketemperatur og problemer tilknyttet hemolyse<sup>2</sup> av humane røde blodceller. Protektanten som ble brukt var en kombinasjon av en polymer og et disakkarid, nærmere bestemt frysetørket hydroxyetyl-stivelse (HES) og maltose

---

<sup>1</sup> 2,3-DPG – et viktig stoffskifteprodukt som påvirker hemoglobinet til å tiltrekke seg oksygen.

<sup>2</sup> Hemolyse – ødeleggelse av celleveggen i røde blodceller slik at hemoglobinet lekker ut.

(maltsukker). Temperaturoptimum ble nådd på  $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ . En mulig forklaring kan være at optimum blir på  $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$  av to motsatt ødeleggende effekter. Dersom tørketemperaturen er for høy, er det mer sannsynlig at temperaturen på prøven overstiger kritisk skadetemperatur. Dette kan føre til glassovergang, devitrifisering, rekrystallisering eller kollaps. Dersom prøvetemperaturen er for lav, vil ikke drivkreftene for vanntransport være store nok for tilstrekkelig intracellulær dehydrering. Dette påvirker også celleoverlevelsen etter tørking.

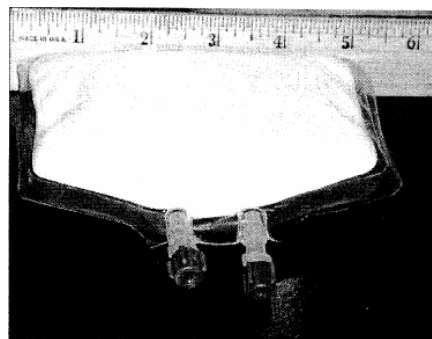
Det er fra før kjent at små karbohydrater som trehalose, sakkarose og maltsukker har en god evne til å stabilisere celler under frysing, frysetørking og lufttørking. Trehalose er spesielt effektiv til å stabilisere tørkede celler. Dette disakkaridet finnes nemlig naturlig i høye konsentrasjoner i en rekke organismer som er i stand til å overleve nesten total dehydrering (Wolkers, Walker, Tablin & Crowe, 2001). Den største utfordringen med å benytte disakkarider som cryoprotektanter er å overvinne ugjennomtrengeligheten til cellemembranen og få innført disakkaridet i høye nok konsentrasjoner intracellulært (Ibid). En logisk grunn for å benytte trehalose som cryoprotektant er at sukkerarten danner en glasstruktur som forhindrer sammenbrudd av celleorganeller ved effektivt å holde dem på plass. Glasstrukturen bevares selv ved høye temperaturer og fuktighetsforhold. Trehalosefylte, røde blodlegemer har blitt frysetørket i en formulering av HES, albumin (egghevitestoff) og trehalose. Å benytte HES og albumin alene eller sammen er ikke nok for å beskytte blodlegemene fordi deres store størrelser forhindrer hydrogenbindinger til tørkede lipid- og proteinmembraner. Trehalose på den annen side kan erstatte hydrogenbindingene og former en amorf tilstand med høy glassovergangstemperatur i tørt materiale (Török et al., 2005). De tørkede prøvene, som ble tørket ned til et vanninnhold på mellom 2 og 4 %, ble oppbevart mørkt ved  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  helt til de ble rehydrert igjen. Etter rehydrering ved  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  hadde de røde blodlegemene en overlevelsesprosent på 55. Forskerne baserte overlevelsen på cellenes evne til å holde på hemoglobinet. De rehydrerte cellene klarte å syntetisere ATP, 2,3-DPG og de hadde lavt nivå av methemoglobin<sup>3</sup>. Ut fra elektronmikroskopi viste det seg at morfologien var bevart. Biokjemiske analyser viste at aktivitetene for enzymene *superoxid dismutase* og *katalase*, sammenlignet med de i ferske røde blodceller, var meget like. Ved rehydrering av frysetørkede, røde blodceller ved lavere temperatur enn der lipidfaseovergangen inntreffer, resulterte i ødelagt membran og nesten 100 % hemolyse. I motsatt fall, ved rehydrering i

---

<sup>3</sup> Methemoglobin – spesiell form for forgiftning. Methemoglobinet kan ikke transportere oksygen. Gir anledning til cyanose (=blåfarging av hud og slimhinner).

temperaturområdet over lipidfaseovergangen, førte dette til økt overlevelse av frysetørkede blodceller (Török et al., 2005).

Også blodplater er forsøkt frysetørket etter at de er tilsatt trehalose. Blodplater blir lagret ved 22 °C i blodbanker i fem dagers tid hvorpå de blir forkastet dersom de ikke er benyttet innen dette tidsrommet (Wolkers et al., 2001). En slik kort levetid har gjort at blodplatemangel har blitt et problem. Resultatet er at det er kronisk knapphet på høykvalitets blodplater i enkelte blodbanker. Ved å håndtere blodplater ved tørking slik at lagringstiden kan forlenges, vil være positivt for tilgangen av blodplater i blodbankene og ikke minst for alle som behøver blodtransplantasjon. Det er vist at blodplater effektivt tar opp trehalose ved 37 °C (Ibid). Etter at trehalosefylte blodplater har blitt tørket ned til et vanninnhold på 3-5 %, viser det seg at de har en nesten identisk optisk tetthet, termotropisk reaksjon av membranen og generell proteinstruktur sammenlignet med kontrollene etter rehydrering i dampfase. Overlevelseshraten er på 85 % (Ibid). Videre viser forsøkene at frysetørkede blodplater har evne til å respondere med trombin, kollagen, ADP og ristocetin ved standard agonist<sup>4</sup>-konsentrasjoner (Ibid). Fra studier på laboratorieskala til forsøk i stor skala, viser det seg at metoden lar seg gjennomføre også her. Spesialdesignede poser, se Figur 13, med blodplater er frysetørket, og det er gjort slik at en pose frysetørkede blodplater fungerer som én bruksenhet (Wolkers, Walker, Tamari, Tablin & Crowe, 2003). Viktig her er at cellekonsentrasjonen er stor nok, som nevnt i del 2.8.3. Frysetørking av  $4 \cdot 10^9$  celler/ml fører til  $1 \cdot 10^9$  celler/ml etter rehydrering (Ibid). Blodplatene viser seg å være utrolig stabile i frysetørket tilstand.



**Figur 13** Pose, laget av biokompatibel film, med frysetørkede blodplater. Skala gitt i tommer. (Wolkers et al., 2003)

Etter 22 måneders lagring i romtemperatur er antall celler etter rehydrering lik antallet celler av rehydrerte, tørkede blodplater uten lagringstid (Ibid). Dette kan være med å løse problematikken om knapphet av blodplater i enkelte biobanker. I tillegg viser de frysetørkede blodplatene seg å være mindre sensitive for temperatursvingninger, noe som ofte kan inntreffe blant annet under transport.

Ved i tillegg å tilsette fosfolipidblærer, liposomer, i frysetørkingsbufferen, kan overlevelsen forbedres ytterligere. Et liposom er en sfærisk blære/hulrom med en membran laget av et bilag

<sup>4</sup> Agonist – fysiologisk aktivt stoff. Starter eller forsterker en cellefysiologisk prosess.

av fosfolipider. Liposomene lages ved å sende lydbølger mot lipider emulgert i vann (Store Norske Leksikon, 2006). Ved å tilsette liposomer i bufferen før tørkingen, blir hemolysen av tørkede, røde blodceller redusert betraktelig. Fremdeles viser rehydrerte prøver gode egenskaper. De syntetiserer enda med 2,3-DPG, har lavt methemoglobinnivå og har bevart morfologisk struktur. Tilsats av liposomer har en positiv effekt på cellemembranen ved at mer av helheten på den ble bevart, og slik slipper en unna med mindre lekkasje av celleorganeller. Overlevelsesprosenten etter frysetørking økte fra 50 % til over 70 % etter tilsats av fosfolipidblærer, og hemolysen ble redusert med 30 % (Kheirloom et al., 2005). Monolamellerte liposomer med en gjennomsnittsdiameter på 300 nm var mest effektivt til å hindre hemolyse. Små blærer har større krumningsevne noe som gjør at de lettere kan smelte sammen med membranen og hjelpe til med å forhindre lekkasje av celleorganellene. EPC-liposomer forhindret hemoglobinlekkasje under rehydreringen av de tørkede røde blodcellene best (Ibid).

Hvordan påvirkes cellen under frysing, tining og frysetørking? Rindler, Heschel & Rau (1999) har undersøkt kjøleratens innflytelse på cellen etter cryopreservering og frysetørking. Til undersøkelsene ble det valgt røde blodceller. Prøvene ble frosset ned ved fem utvalgte kjølerater. Etter nedfrysning ble prøvene enten tint eller vakuum frysetørket med påfølgende rehydrering. Ved tineforsøket viste det seg at en kjølerate på 220 K/min ga størst overlevelse av cellene, som ble målt til ca. 80 %. Ved samme kjølerate var resultatet meget dårlig etter frysetørking og rehydrering. Bare 10 % overlevelse var å finne her. Det beste resultatet for eksperimentet med frysetørking og rehydrering var ved høyere kjølehastighet, nemlig 4200 K/min. Overlevelsen av røde blodceller var da på 48 % etter frysetørking, mens den lå så lavt som 4 % ved kun cryopreservering. Skade på cellene kommer av intracellulær frysning, glassyke og rekrystallisering. Forskerne konkluderte med at høye kjølerater,  $\geq 1250$  K/min, øker sannsynligheten for ødeleggende devitrifikasjon og rekrystallisering i tineprosessen, mens den fine matriksstrukturen og det amorf intracellulære volumet på den andre siden er med på å beskytte cellen under vakuum-frysetørking.

### 3.2.1 Egnethet i biobanksammenheng

Frysetørking er en meget skånsom tørkeprosess og derfor egner den seg bra for sensitive materialer slik som biobankmaterialer må sies å være. Metoden gjør det mulig å tørke flere prøver av ulikt slag på en gang ved for eksempel å ha prøvene i forskjellige separate beholdere under tørkingen. Tørkeprosessen er både energikrevende og tidkrevende som betyr



at metoden blir noe kostbar. Dette er stort sett bakdelene med vakuumpfrysing. Likevel kan det være verd å betale ekstrakostnaden da resultatet blir godt i form av et lagringsstabil prøvemateriale som opprettholder ønskede funksjoner. Vakuumpfrysing må sies å være godt egnet til bruk i biobanksammenheng, men kostnadsrammen kan bli uønsket høy.

**Tabell 3** Tabellarisk oversikt fra litteraturstudiet over frysede materialer.

Frysing				
Hva er tørket?	Tørkebetingelser	Er prøvene rehydrert?	Resultat	Forfatter(e)
Røde blodceller (med cryoprotektant-løsning med HES og NaCl)	Noen frysas ved ulike kjølehast., noen vakuumpfrysas med en gitt tid ved -35 °C, deretter v/ 20 °C. Konst. kondensertemp: -196 °C, konst. trykk: 2 Pa. Vanninnhold: ca 5 %	Frosne prøver ble tint, tørkede prøver ble rehydrert med 30 ml isotonisk fosfatbuffer saltløsning	Kunne ikke konkludere med optimal kjølehast. For frosne prøver var 220 K/min best, mens de tørkede prøvene klarte seg best etter kjølehast. på 4200 K/min.	Rindler, V., Heschel, I., Rau, G. (1999) <i>Cryobiology</i>
Røde blodceller (med cryoprotektant-løsning med HES og D-maltose)	Prøvene ble tørket mellom -5 og -65 °C i 10-gradersintervaller. Konst. kondensertemp. og trykk; -190 °C og 2 Pa.	Ja, i 7,5 ml isotonisk fosfatbuffer saltløsning (pH 7,2; 37 °C).	Best oppnådd stabilitet ved tørking ved -35 °C.	Rindler, V., Lüneberger, S., Schwindke, P., Heschel, I., Rau, G. (1999) <i>Cryobiology</i>
Røde blodceller	Plate-frysingstørker, tørket til 25-30 % vanninnhold	Ja, etter 7 dager lagring v/ -20 °C.	Celleinnhold godt bevart etter rehydrering. Gode ATP og 2,3-DPG-nivå samt reologiske egenskaper.	Sowemimo-Coker, S.O., Goodrich, R.P., Zerez, C.R., Tanaka, K.R. (1993) <i>Transfusion</i>
Røde blodceller m/Trehalose (Frysingstørket m/ HES, humant serum albumin og trehalose. Senere også med liposomer.)	Vakuumpfrysingstørket ned til vanninnhold mellom 2-4 %. Tørket i 7 h v/ -30 °C ved 30 mTorr, deretter steg temp til 20 °C og 50 mTorr.	Ja, rehydrert med rehydreringsbuffer ved 4, 23, 30, 37 og 40 °C, men flest prøver ved 37 °C.	55 % overlevelse basert på prosent hemolyse; med liposomer over 70 %. Kan syntetisere ATP, 2,3-DPG, bevart morfologi, lavt nivå av methemoglobin. Liposomstr ca 300 nm mest effektivt.	-Török, Z. et al. (2005) <i>Cell Preservation Technology</i>  -Kheiroloom, A. (2005) <i>Cryobiology</i>
Humane blodplater	Blodplatene ble lagt sammen med trehalose i 4 h, deretter laget til små kuler før de ble lagt i en frysingstørkingsbuffer. Tørket i en lab.skala frysingstørker med konst kondensertemp. -45 °C. Også mulig å gjennomføre i stor skala.	Ja. Noen prøver ble for-rehydrert i mettet luft ved 37 °C fra 0-3 h. Rehydrering i enten 1ml PBS/vann (1:1) buffer eller plasma/vann (1:1).	Blodplatene tok opp trehalose ved 37 °C med 50 % eller mer. Tørkingen gikk bra med intakte blodplater, overlevelseshastighet på 85 %, og platene responderte til trombin, kollagen, ADP og ristotecin.	-Wolkers, W.F. et al. (2001) <i>Cryobiology</i>  -Wolkers, W.F. et al. (2003) <i>Cell Preservation Technology</i>

### **3.3 Andre tørkemetoder**

Selv om spesielt frysetørring, men også spraytørring, viser seg å være metoder som er vanligst i bruk innen tørring av biologiske, aktive komponenter, er det klart at disse ikke er utelukkende benyttet. I denne delen her blir det kort beskrevet noen metoder og noen funn som er gjort i forbindelse med litteraturstudiet.

#### **3.3.1 Mikrobølgetørring**

Mikrobølgetørring har i det senere blitt anerkjent som en metode som har potensielle økonomiske og ingeniørmessige fordeler. Mikrobølger har en penetrerende effekt på materialet som fører til volumetrisk oppvarming. Materialer som er absorberende og transmittører av mikrobølger kalles dielektriske, og når de blir utsatt for mikrobølger fordeler varmen seg i hele materialet (Beaudry, Raghavan & Rennie, 2003). Ved mikrobølgetørring blir varme konvertert fra energi i mikrobølgene til termisk energi inne i det fuktige materialet. Rask dehydrering skjer som et resultat av fordelaktige damptrykk og temperaturgradienter som oppstår. Generelt kan en si at en tørkeprosess med mikrobølger består av tre faser. Først er det en varmeperiode hvor mikrobølgeenergi konverteres til termisk energi og temperaturen til produktet øker med tiden. Idet damptrykket i materialet blir høyere enn det som er i omgivelsene, vil produktet sakte, men sikkert tape fuktighet. Når stabil temperaturprofil er etablert, kommer rask tørkeperiode. Nesten all den konverterte energien blir brukt til å fordampe fukten. Til slutt kommer redusert tørkeperiode. Den lokale fukten er redusert til et punkt hvor energien som trengs til fordampning er lavere enn den termiske energien som blir konvertert fra mikrobølgene, og lokal temperatur kan stige over kokepunktstemperaturen for vann (Lu, Tang & Liang, 1998).

I farmasøytisk industri kan en ikke kompromisse kvaliteten på produktene, og produktforringelse må unngås for enhver pris. Alle produkter som ikke skal være i flytende form, slik som tabletter og kapsler, gjennomgår en tørkefase. Mikrobølgetørring under vakuum har tiltrukket seg stor interesse da det kombinerer fordelene med høyhastighets fjerning av fukt med lavt kokepunkt av løsningen på grunn av redusert trykk. En annen fordel med å tørke under vakuum er at varmetransport til den faste fasen blir kraftig redusert da det ikke forekommer noen konveksjon, hvilket igjen reduserer faren for skade grunnet overheting. Å operere innenfor et trykkintervall på 1-25 kPa passer best til mikrobølge vakuomtørring, spesielt ved tørring av varmesensitive materialer som farmasøytiske produkter og andre fine

kjemikalier. I slike tilfeller bør tørkingen utføres ved så lave temperaturer som 40-60 °C for å unngå varmeskader (McLoughlin, McMinn & Magee, 2003).

### 3.3.2 Tørking i fluidized bed

Ofte er melkesyre bakterier tørket ved hjelp av spraytørking eller frysetørking. Sistnevnte metode er både tidkrevende og kostbar, og begge tørkealternativ kan gjøre fysisk skade på cellene. Siden melkesyre bakterier er så viktig til preservering av ulike næringsmidler, er det alltid av interesse å forbedre stabiliteten og lagringskapasiteten til disse bakteriene. Mille, Obert, Beney og Gervais (2004) har sett på en optimaliseringsprosess av melkesyre bakteriene *Lactobacillus plantarum* og *L. bulgaricus* hvor kaseinpulver og lufttørking i fluidized bed inngår. Fordelene med denne tørkemethoden er flere. Blant annet lave investerings- og vedlikeholdskostnader, mulighet for kontinuerlig storskala produksjon, rask utveksling av varme og masse mellom gass og partikler slik at overheting av bakteriene blir minimal, og kort tørketid. Fordi dehydrering medfører forstyrrelser i produktet som fosfolipid faseovergang og volumvariasjoner i cellene, er raten som vannet fjernes fra cellene avgjørende for den senere levedyktigheten, jf. del 2.8.5. Optimal dehydreringstid i fluidized bed ble funnet til å være 30 minutter. Melkesyre bakteriene ble mikset med kaseinpulver for å få en melet konsistens. Tilsats av praktisk talt tørt pulver induserer osmotisk sjokk, som er med på å bestemme levedyktigheten til bakteriene. Jo høyere vannaktivitet det var på kaseinpulveret, jo mer vann var tilgjengelig for mikroorganismene og dette førte til større levedyktighet. Det var mulig å redusere vannaktiviteten i *L. plantarum* og kasein-blandingen fra 0,99 til 0,17 med fullstendig celleoverlevelse. Under samme omstendigheter var overlevelsesprosenten kun én for *L. bulgaricus*. Den høye dødeligheten kan skyldes at denne bakteriearten er sensitiv for oksygen i tørr tilstand (Mille et al., 2004).

### 3.3.3 Innkapsling

Liposomer har blitt oppdaget som en god bærer for farmasøytiske preparater i den senere tid. Både vannløselige og fettløselige forbindelser går fint å benytte sammen med liposomer, og mange legemidler har fått forbedret virkningsgrad ved bruk av liposom som bærer. De vannløselige forbindelsene fanges i vannfasen inni liposomet, mens de fettløselige i bilaget av liposomene. Frysetørkede liposomer med innkapslede preparater kan lagres over en lang periode og fremdeles være stabile. Men gjennom prosessene frysing og frysetørking kan blærene i liposomene skades og dette kan føre til at lekkasje av forbindelsene, og retensjonsraten til det endelige produktet vil derfor variere. Det betyr at blærestørrelsen blir en

viktig parameter for å bestemme farmakokinetikken av de liposomale bærerne. Dehydrering og rehydrering av liposomer uten at tilpassede protektanter er til stede kan forårsake massiv fusjon, og i stedet for små lamellære hulrom ender en opp med multilamellære blærer. Disse vil ha en annen væremåte enn den originale blærestrukturen. Valg av rett cryoprotektant vil være med å beskytte liposomene, og sukkerarter viser seg å være gode protektanter til dette formålet. En passende cryoprotektant vil ivareta den originale fysiske karakteristikken av den liposomale bæreren. Den laveste frysetørketemperaturen bør være lavere enn glassovergangstemperaturen til protektanten. Glassovergangstemperaturen vil øke etter hvert som fuktinnholdet i materialet synker, og både under dehydrering og lagring bør temperaturen på legemidlet holdes under denne slik at liposomene blir ”festet” i en stiv matriks. Den beskyttende effekten kan både forhindre sammensmelting av hulrom og retensjon av forbindelsen i liposomet. Li, Hua, Shu, Xiao og Yan (2002) fant at 10 % konsentrasjon med trehalose fungerte best som cryoprotektant. Den hadde den mest beskyttende effekten og forandring i porestørrelsen hos liposomene var liten. Av de preparatene disse forskerne prøvde, viste det seg at liposomene var bedre egnet til å kapsle inn fettløselige stoffer (i dette tilfellet vitamin A og 99 % retensjon) enn vannløselige. Dessuten ga høyere konsentrasjon av trehalose bedre beskyttelse av liposomer mot frysetørkingen.



## 4 Materialer og metoder

Store Norske Leksikon definerer vev som en samling av celler som har ensartet bygning og funksjon. Vev deles inn i fem hovedgrupper; epitelvev, binde- og støttevev, muskelvev, nervevev og flytende vev. Flytende vev, som blod og lymfe, er beslektet med binde- og støttevev (Store Norske Leksikon, 2005). I dette prosjektet er tørkeforsøk utført på en fast vevstype.

Dette kapitlet omhandler material- og parametervalg. Metoder benyttet i forsøkene og i analysesammenheng blir her beskrevet og forklart.

### *4.1 Valg av forsøksmateriale og analyseparametere*

I samråd med Eli Helge og Jostein Halgunset ved Institutt for Laboratoriemedisin, Barne- og Kvinnesykdommer (LBK), Regional forskningsbiobank i Midt-Norge, NTNU, falt valg av forsøksmateriale på rottelever. Begrunnelsen for dette er at lever er en meget homogen vevstype. Organet er cellerikt, og erfaringsmessig er det mulig å få ut mye RNA fra dette vevet. Det ble vurdert å utvide prøvematerialet til å inneholde flere vevstyper i masteroppgaven, men avgjørelsen ble å arbeide videre med lever som i forprosjektet. Når RNA isoleres fra prøven er det tre parametere som er avgjørende for å kunne si noe om kvaliteten på prøven. Kvalitetsmål på RNA er kvantitet, integritet (grad av degradering) og renhet (kontaminasjon). Det er mengde RNA, degradering av RNA og grad av forurensning i prøven. Dette avgjøres ved hjelp av spektrofotometer og kapillærelektroforese. Analysene er utført ved LBK. Da det i forprosjektet kun ble sett på RNA og RNA-kvalitet, ble det i masteroppgaven lagt til flere analyseparametere. I tillegg til RNA blir DNA sjekket, det ble utført lipidundersøkelse og elektronmikroskopisk (EM) undersøkelse. Med tanke på tørking som en konserveringsmetode i biobanksammenheng, er det av stor interesse å se hva som skjer med prøvene under lagring. Derfor ble det denne gangen også lagt av tørkede prøver til oppbevaring.

## 4.2 Forsøksprosedyre

Rotteliverprøvene ble tatt ut og preparert ved Biobanken. Dyret får anestesi og organet tas ut mens rotten enda er i live. Dette gjøres for å unngå degraderingsprosesser som raskt starter når døden inntreffer. Prøvene ble kuttet i tynne skiver med en spesialskalpell og klemte i en fryseklemme før de kjapt ble lagt i flytende nitrogen. Prøvene er på denne måten i minst mulig kontakt med luft og blir i minst mulig grad utsatt for høye temperaturer. Størrelsen varierte noe mellom de ulike bitene, men de aller største bitene ble knekt i to da de ble lagt i brettørka for å få en jevnere fordeling på prøvestørrelsene. Prøvene ble fraktet opp til laboratoriet på Gløshaugen i termos med flytende nitrogen for å unngå opptining. All håndtering av prøver og utstyr som skulle i nærheten av prøvene ble behandlet så sterilt og så RNasefritt som mulig, og det ble benyttet hansker i kontakt med prøver og utstyrmateriell. Aktuelt utstyr ble vasket etter prosedyre gitt av Eli Helge, se vedlegg A.2. Prøvene ble lagt utover midterste rille i brettørka. Fordi bitene var små, ble de liggende på aluminiumsfolie under tørkeprosessen for å unngå at de falt gjennom hullene eller satt seg fast i den perforerte platen. Tørketemperaturene var  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$  og  $+10\text{ }^{\circ}\text{C}$ , og tørkingen foregår under atmosfærisk trykk. Ved plussgrader, som var nye tørketemperaturer i forhold til forprosjektet, hadde prøvene en tendens til å ”smelte” utover og sette seg godt fast i aluminiumsfolien. Når prøvene så skulle tas av folien var det ikke mulig å få av en hel bit, men prøvene pulveriserte. Dette ble løst ved å legge prøvene på en teflonduk ved disse temperaturene.



**Figur 14** Bilder av en typisk rotteliverprøve.

Tabell 4 Forsøksoppsett

Forsøk	Tørketemperatur	Tørketid/uttak
Tørkekurve	+5 °C	Så ofte som mulig
Tørkekurve	+10 °C	Så ofte som mulig
1. parallell	+10 °C	3 uttak: etter 3, 6 og 23 timer
1. parallell	+5 °C	3 uttak: etter 3, 7 og 24 timer
1. parallell	-10 °C	4 uttak: etter 5, 10, 25 og 50 timer
2. parallell	+10 °C	3 uttak: etter 3, 6 og 23 timer
2. parallell	+5 °C	3 uttak: etter 3, 7 og 24 timer
2. parallell	-10 °C	4 uttak: etter 5, 10, 25 og 50 timer

Til sammen ble det utført 8 tørkeforsøk på rottelever. To for å finne tørkekurven ved de nye tørketemperaturene, +5 °C og +10 °C, og to paralleller ved hver av tørkebetingelsene. For å finne en nøyaktig tørkekurve som mulig, ble det tatt ut prøver en gang i timen så lenge det lot seg kombinere med arbeidstid i laben. Utover arbeidstid ble det tatt ut prøver ved utvalgte tidspunkt. Ved plussgradene ble det gjort 3 uttak i tillegg til kontrollprøvene, mens det ved -10 °C ble tatt ut prøver 4 ganger, nøyaktig etter samme tider som i forprosjektet. Disse ble lagt i merkede cryorør før de ble oppbevart i en beholder med flytende nitrogen til hele tørkeforsøket var ferdig. Da ble alle de ferdigtørkede prøvene fraktet i flytende nitrogen tilbake til LBK for analyse. Også prøver til lagring ble lagt i cryorør.





**Figur 15** Prøvene og plassering i brettørka.

### **4.3 Tørkekurve**

Prøvene ble tatt ut jevnlig for å få en så smidig og representativ tørkekurve som mulig. Prøvene ble så innveid på vekten *Mettler AT261 DeltaRange*, en vekt med fem siffrers nøyaktighet. Deretter ble bitene satt i keramikkdigel i et varmeskap som holdt 105 °C i 24 timer for å være sikker på at de var ordentlig tørre. Etter 24 timer i varmeskapet ble prøvene igjen veid og vanninnholdet for det aktuelle tidspunktet ved uttak ble bestemt ut fra likning (4.1).

$$Vanninnhold = \frac{\text{vekt vann i prøve}}{\text{vekt innveid prøve}} * 100 \quad [\%] \quad (4.1)$$

### **4.4 Vannaktivitet, $a_w$**

Jevnlige uttak av prøver ble lagt i *AquaLab CX-2*, et apparat som måler vannaktivitet. Slik kunne en følge tørkeprosessen. Prøvebitene ble lagt i spesielle målekopper tilegnet måleapparatet. Vannaktiviteten ble målt ved de samme tidspunktene som tørkekurvene ble bestemt ved, slik at vannaktiviteten og tørkekurven for de ulike tørkebetingelsene skulle kunne sammenlignes. Ved hjelp av apparatet *Cisorp Water Sorption Analyser* ble sorpsjonsisotermen til rotteleveren bestemt. Tørkede prøver fra tørkeforsøk ved både +5 °C og +10 °C ble testet. Nå var det mulig å sammenligne sorpsjonsisotermen fra prøver tørket

ved minusgrader i forprosjektet, og nå de nye plussgradene. Det var ønskelig å finne sorpsjonsisotermen ved 4 °C (kjøleskapstemperatur), men apparaturen opererte ikke ved så lav temperatur. I stedet ble det valgt å finne sorpsjonsisotermen ved den laveste temperaturen apparaturen kunne klare. Det viste seg å være rundt 12 °C.

#### ***4.5 Lagring***

Hovedproblemstillingen rundt dette prosjektet er å se på tørking som en mulig konserveringsmetode for biobankmaterialer. Derfor er lagring av stor interesse rundt dette prosjektet. Hva skjer med prøvene etter at de har ligget en stund? Er det fremdeles mulig å utføre nødvendige analyser på prøvene etter lang tids oppbevaring? For at ikke resultatmatrisen skulle bli for stor, ble det valgt å se hva som skjedde med de prøvene som var tørket lengst. Ut fra resultatene fra forprosjektet viste det seg ikke å være noen markant endring på kvaliteten mellom de ulike prøveuttakene, og dette bygget oppunder å velge å ta ut prøver som var tørket lengst mulig. I teorien skal lagringsstabiliteten bedre seg med lavere vanninnhold og nedsatt vannaktivitet. Det ble tatt ut prøver til lagring i flytende nitrogen, ved -20 °C, ved kjøleskapstemperatur og i romtemperatur. Prøvene ble lagt i cryorør og disse ble antatt tette nok slik at det blir minimalt med oksygendiffusjon inn til testmaterialet, og også ingen fuktinntregning. Grunnet tidsrammen rundt masteroppgaven, ble noen av prøvene liggende så lenge som mulig og analysert like før innleveringsfrist. Dessuten ble noen cryorør satt av til langtidslagring. Disse vil bli analysert etter ett års lagringstid, og kommer av naturlige årsaker ikke med i denne rapporten.

#### ***4.6 RNA-isolering***

RNA-isolering og analyser av de tørkede prøvene ble utført av Eli Helge ved LBK. I denne delen beskrives metodene som brukes til å evaluere RNA-prøver ved det aktuelle laboratoriet.

Til automatisk RNA-isolering brukes instrumentet *MagnaPure (Roche)*. Før isolering blir vevet homogenisert ved hjelp av keramiske kuler og lyseringsbuffer i *MagnaLyser*, en sentrifuge spesielt tilpasset formålet. For å få best mulig resultat benyttes 700 µl lyseringsbuffer og 30 mg vev. Metoden er blitt forbedret etter forsøkene i høst, siden det ikke tidligere har vært isolert RNA fra tørket vev. Homogeniseringstiden i *MagnaLyser* er 20 sekunder med 6500 omdreininger i minuttet. Under isoleringsprosessen fjernes DNA,

proteiner med mer, slik at rent RNA kan bli isolert ved hjelp av magnetiske glasspartikler og elueres i en elueringsbuffer til slutt. Det er kun de øverste 350  $\mu\text{l}$  som benyttes videre til analyser i *MagnaPure*. Dette gjøres for å være sikker på at ingen forurensning er med i eluatet, slik som for eksempel vevsrester. For en del analyser, spesielt genekspressjonsanalyser, er en avhengig av at RNA er av høy kvalitet. Som regel er det mRNA som er av spesiell interesse. Til å kvalitetssikre RNA benyttes elektroforese og spektrofotometer (Helge, 2005).

#### 4.6.1 Spektrofotometer

Spektrofotometer brukes i en rekke analyser for å bestemme mengde og/eller konsentrasjon. Prinsippet er at lys sendes inn i en løsning som inneholder stoff som absorberer lys av en bestemt bølgelengde. Intensiteten på transmittert lys vil da være lavere enn det som ble sendt inn. Hvor mye lavere avhenger av mengde absorberende stoff i løsningen. DNA og RNA absorberer lys i nært UV-område og har absorpsjonsmaksimum ved 260 nm. Spektrofotometeret Biobanken bruker til å kvalitetssikre RNA/DNA heter *NanoDrop*. Grunnen til at dette spektrofotometeret er valgt er evnen til å måle svært lave konsentrasjoner, nærmere bestemt fra 3700 ng/ $\mu\text{l}$  til 2 ng/ $\mu\text{l}$ , og at en bare bruker 1-2  $\mu\text{l}$  av prøvematerialet. *NanoDrop* gir konsentrasjonen på RNA/DNA i løsningen. Fra produsenten er det gitt et standardavvik på  $\pm 2$  ng/ $\mu\text{L}$  for prøvekonsentrasjon mellom 1-100 ng/ $\mu\text{L}$ . Den gir også to ratioer: 260/280 og 260/230. Begge ratioene bør ligge mellom 1,8 – 2,2 for at RNA kan antas å være av god kvalitet. DNA-kvalitet angis kun av 260/280-ratio (Helge, 2005; NanoDrop, 2006).



**Figur 16** Spektrofotometer  
(NanoDrop, 2005)

- 260/280-ratio: Forholdet mellom absorpsjon på 260 nm og 280 nm. Proteiner har absorpsjon på 280 nm. En ratio som er 1.8 eller lavere indikerer at proteiner er til stede og forurenser løsningen med RNA. Også høyere verdier enn 2,2 indikerer at prøven er forurenset.
- 260/230-ratio: Forholdet mellom absorpsjon på 260 nm og 230 nm. Organiske komponenter som fenol, Trizol og andre reagenser som ofte er brukt i isoleringsprosedyren har absorpsjon på 230 nm, og også for eksempel karbohydrater fra vevet selv. En ratio på 1.8 eller lavere indikerer at slike stoffer er til stede i

løsningen med isolert RNA. Også høyere verdier enn 2,2 indikerer at prøven er forurenset. 260/230-ratio er et sekundært mål på kvaliteten av nukleinsyrer.



**Figur 17** Forsiktig legges en liten dråpe av prøven på spektrofotometeret.

RNA og DNA har samme absorpsjonsmaksimum. Isolert RNA kan komme ut med en falskt forhøyet konsentrasjon dersom DNA også er til stede i eluatet. Dette er sjelden et problem fordi de fleste isoleringsteknikker for RNA i dag inkluderer DNase som destruerer DNA.

#### 4.6.2 Bioanalyser

Et spektrofotometer gir ingen mål på om RNA er degradert. Degradering av RNA kan ha flere årsaker. Den vanligste er at materialet er oppbevart ved feil temperatur før isolering, eller at RNA etter isolering har blitt utsatt for høye temperaturer. Generelt bør ikke RNA bli utsatt for temperaturer høyere enn kjøleskapstemperatur under håndtering. Ellers bør RNA så fort som mulig plasseres i  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -fryser. Materialet som det skal isoleres fra må likeledes så fort som mulig bli puttet i flytende nitrogen eller i  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  fryser.



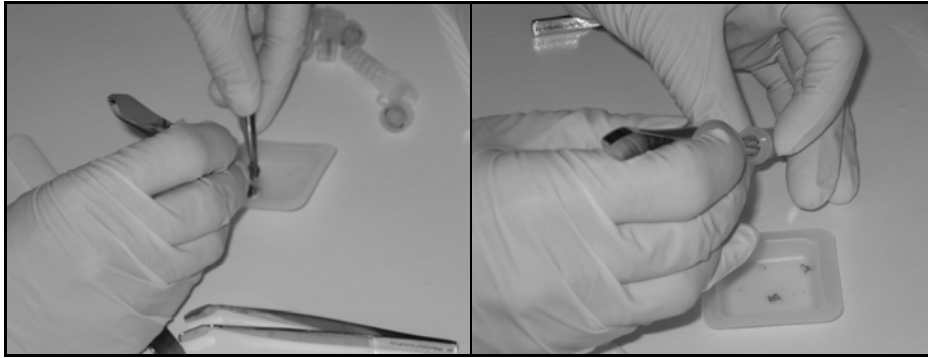
**Figur 18** *Bioanalyzer*  
(Agilent Technologies, 2006)

For å kontrollere for degradering av RNA benyttes elektroforese. I stedet for å gjøre dette manuelt, har Biobanken anskaffet instrumentet *Bioanalyzer*. Fordelene med instrumentet er mange. Kun 5 ng er nok til å kvalitetssikre RNA. Så lite som 200 pg er også mulig å bruke. Det finnes et kit spesielt beregnet på så lave konsentrasjoner. En slipper også å håndtere helsefarlig Ethidiumbromid, som inngår i manuell tillaging av geler, og instrumentet bruker bare 20 min på å analysere 12 prøver. Ved manuelle analyser blir gel-

bildene tolket subjektivt av den som utfører analysen, derfor blir det vanskelig å sammenligne resultater fra en lab til en annen og en får heller ikke resultatene digitalt. *Bioanalyzer* løser dette. *Bioanalyzer* bruker "Lab-on-a-Chip" mikrofluidteknologi som er basert på et nettverk av miniatyrkanaler og brønner som er etset inn i glass eller polymerbrikker (chip'er) og gir et "mini-laboratorium". Trykk eller elektrokinetiske krefter sender pico eller nanoliter mengder av prøven gjennom kanalene i meget kontrollerte bevegelser. Dette gir prøvebehandling, separasjon, farging, deteksjon og databehandling integrert i ett system. Elektroforesen skiller mellom 28s og 18s ribosomalt RNA (rRNA), og det blir beregnet en ratio. Ratioen skal ideelt ligge mellom 1.8-2.0. I tillegg har *Bioanalyzer* et program som beregner RNA Integrity Number (RIN). rRNA forholdet (28s/18s) alene gir ofte ikke en tilfredsstillende vurdering av kvaliteten – eller grad av degradering – på RNA. Produsenten har utviklet en objektiv og anerkjent automatisk analyse som angir kvaliteten av RNA på en skala fra 1 til 10. RIN-faktoren tar hensyn til flere segmenter enn kun 18s og 28s ribosomalt RNA. Den ser på hele det elektroforetiske sporet av RNA-prøven. Dette gjør at RIN gir en viktig og nødvendig standardisering av RNA kvalitetsvurdering. Ligger RIN-faktoren mellom 7-10 er prøvematerialet av god kvalitet. For å kunne bruke RNA til genekspressjonsanalyser, må nukleinsyren ikke være degradert og RNA-mengden må være stor nok. *Bioanalyzer* har en usikkerhet på 10 % på kvantifisering av RNA-mengde, derfor brukes ikke denne apparaturen til dette formålet (Helge, 2005; Schroeder et al., 2006).

#### ***4.7 DNA-isolering***

DNA-isolering fungerer stort sett på samme måte som RNA-isolering, men er noe mindre omfattende. DNA er mye mer robust enn RNA og har større sannsynlighet for å være intakt lenger. Ved Biobanken isoleres DNA på denne måten: 30 mg vev legges i 200 µl lysesbuffer. Homogeniseringstiden i *MagnaLyser* er nå redusert til 15 sekunder mot 20 for RNA. Totalt tas 80 µl videre til *MagnaPure* for automatisk DNA-isolering. Det er vanlig å presentere DNA-kvaliteten kun med 260/280-ratio-verdier. Er kvaliteten god, ligger disse verdiene mellom 1,8 og 2,2 (Helge, 2006).



**Figur 19** Tørkede prøver deles i passende biter og blir lagt i rør som skal tilsettes lyseringsbuffer.

#### ***4.8 Lipidundersøkelse***

Lipidperoksidering er en analyse som brukes som en indikator på oksidativt stress i vev og celler. Lipidperoksider er ustabile, og reagerer lett med andre stoffer. Flerumettede fettsyreperoksider danner malondialdehyd (MDA). Å måle MDA i vev/celler er et mål på grad av lipidperoksidering.

For å måle dette blir det gjort som følger:

Reagenset N-methyl-2 phenylindole reagerer med MDA ved 45 °C, og danner en farget løsning. Fargen leses av med et spektrofotometer ved 586 nm. Intensiteten i fargen øker med økende konsentrasjon av MDA. Først blir det laget en standardkurve ved å fortenne en ferdiglaget standard som følger med kitet. Konsentrasjonen på standardene som blandes ut er som følger; 0, 0,5, 1, 2, 3, og 4 µM. Prøvens absorbans registreres, og standardkurven brukes for å finne konsentrasjonen av MDA i prøven. Prøven homogeniseres i en buffer og tilsettes kjemikalier så den ikke skal oksideres ytterligere. Homogenatet sentrifugeres, og supernatanten brukes videre. Deretter tilsettes N-methyl-2 phenylindole og saltsyre, og det hele inkuberes ved 45 °C i 1 time. Da kan absorbansen leses av. Litt av prøven brukes til å måle proteinmengde (mg/mL), og mengden målt MDA relateres til denne. Da unngår man problemer hvis prøvene er av ulik vekt/størrelse (Helge, 2006).

#### ***4.9 Elektronmikroskopisk undersøkelse***

Beskrivelse av metoden som er benyttet til elektronmikroskopisk undersøkelse er mottatt fra EM-laben ved St. Olavs Hospital og er som følger:

Tabell 5 Oversikt over EM-prøvene.

Cryo-merking	Metode	Bildemerking
BB1	Standard EM-preparering (Kontroll rett i glutaraldehyd.)	Std.
BB2	Fryst og vakuuminfiltrert (Bare ligget i liq. N <sub>2</sub> .)	F
BB3	Fryst, tørket (+10 °C), fryst og vakuuminfiltrert	FTF

**BB1: Standard EM preparering (kontrollbit)**

Vevsbitene ble fiksert i 2 % glutaraldehyd, vasket i 0,1M fosfatbuffer i 2x5 min, postfiksert i osmiumtetraoksid i 1 time (tildekket), og så vasket i 0,1M fosfatbuffer i 2x5 min. Deretter dehydrert i etanol på denne måten: 50 – 70 – 90 % etanol à 10 min, så i absolutt etanol 4 x 15 min. Videre i propylenoksyd 2x15 min, infiltrert med propylenoksyd + EPON; først i fortykning 2+1 i 30 min og så i 1+2 i 30 min. Til slutt i bare EPON over natta på rotasjon. Vevsbitene ble innstøpt i plastbrønner i nylaget EPON og polymerisert ved 56 °C i 3 døgn.

**BB2 og BB3:**

Vevsbitene ble vakuuminfiltrert i EPON over natta på rotasjon. Vakuuminfiltrering betyr at den frosne prøven ble lagt på toppen av frosset resin (EPON). Vakuum ble etablert før resin og vevsbiten smeltet. Vev og resin blir stående i vakuum i to timer. De er da ved romtemperatur, og vevsbiten har sunket ned. Etablerer atmosfærisk trykk og det hele får stå videre i romtemperatur (rotasjon). Som for BB1 ble vevsbitene innstøpt i plastbrønner i nylaget EPON og polymerisert ved 56 °C i 3 døgn.

Alle plastblokkene ble snittet på ultramikrotom EM UC6 (*Leica*). For orientering ble det laget semintynne snitt; 1 µm snitt ble farget med toludinblå, skylt med sterilt vann og 70 % sprit, montert med dekkglass og histokitt.

Tynnsnitting: 100 nm snitt ble snittet med en diamantkniv og lagt på formvardekket kobbergrid (200 mesh).

Kontrastering: Snittene ble kontrastfarget med 4 % uranylacetat i 50 % alkohol i 25 min og skylt med sterilt vann. Videre med 0, 1 % blycitrat i 0,1M NaOH i 5 min og skylt med sterilt vann.

Mikroskopering: Snittene ble mikroskopert i TEM, Jeol JEM-1011. Bildene ble tatt med et digitalt kamera Morada (*BorAS*)

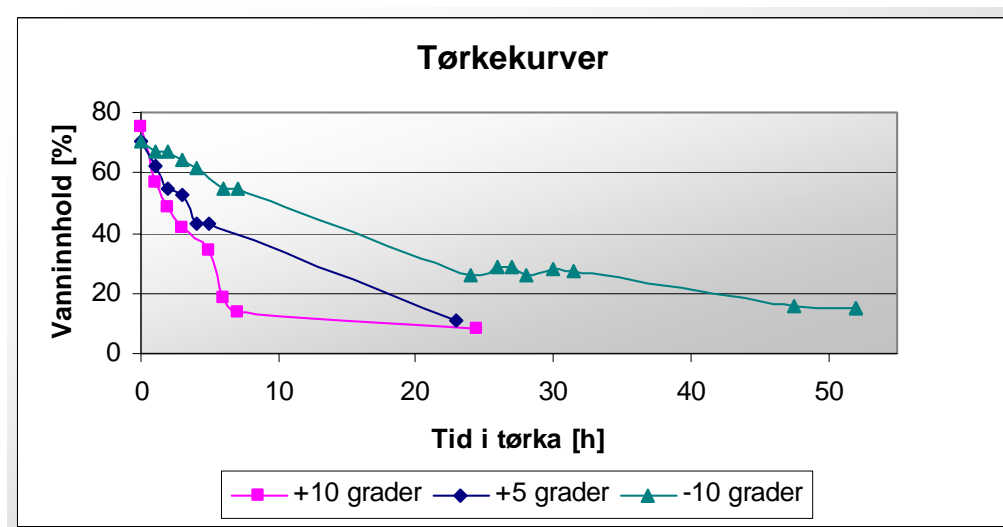
Bildene fra EM-undersøkelsene vises kapittel 5.9.

## 5 Resultater

Etter å ha gjennomført forsøk og analyser som beskrevet i forrige kapittel, blir oppnådde resultater her presentert grafisk. De nøyaktige verdiene er samlet i tabeller og plassert i vedlegg bak i rapporten for nærmere studier hvis ønskelig. Dette kapitlet presenterer resultatene, mens diskusjon og kommentarer til og rundt disse vil bli å finne i neste kapittel.

### 5.1 Tørkekurver

For å finne ut hvor raskt prøvene tørket ved de forskjellige tørkebetingelsene, ble det gjennomført testforsøk for hver av disse. Dette ble gjennomført for å kunne vite når det ville være mest hensiktsmessig å ta ut prøver til analyse ved Biobanken, slik at vanninnholdet i prøvene var av passende variasjon. Resultatet av disse tørkeforsøkene kan ses av figuren nedenfor. Grafen viser vanninnholdet i prøvene etter visse antall timer i brettørka.

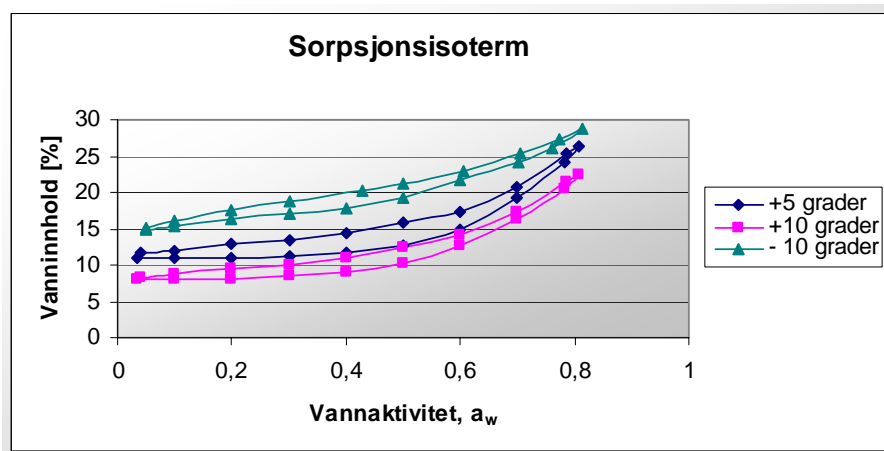


Figur 20 Tørkekurver



## 5.2 Sorpsjonsisoterm

Sorpsjonsmålinger er gjennomført i *Cisorp*. Kurvene viser adsorpsjon og desorpsjon for rottelever tørket ved de anvendte tørketemperaturene.



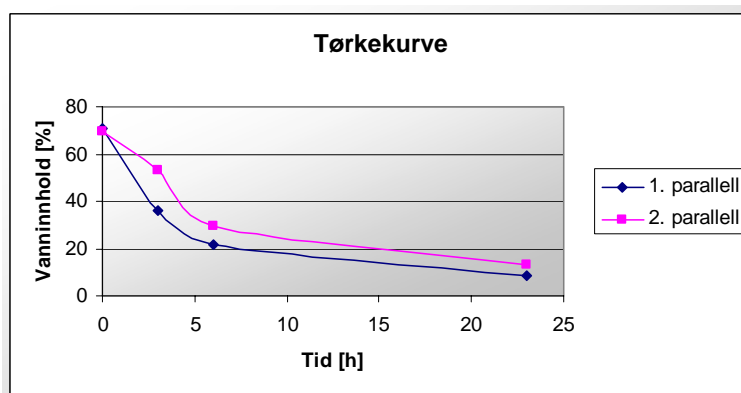
Figur 21 Sorpsjonsisotemer

## 5.3 Tørking ved +10 grader – analyseresultater

Resultatene fra hver av tørketemperaturene blir presentert hver for seg, for så å bli sammenlignet mot slutten av dette kapitlet. De forskjellige analyseparametrene er satt opp så likt som mulig for de ulike temperaturene for å gi et enklere grunnlag for å sammenligning på tvers av tørketemperaturer.

### 5.3.1 Tørkekurvene

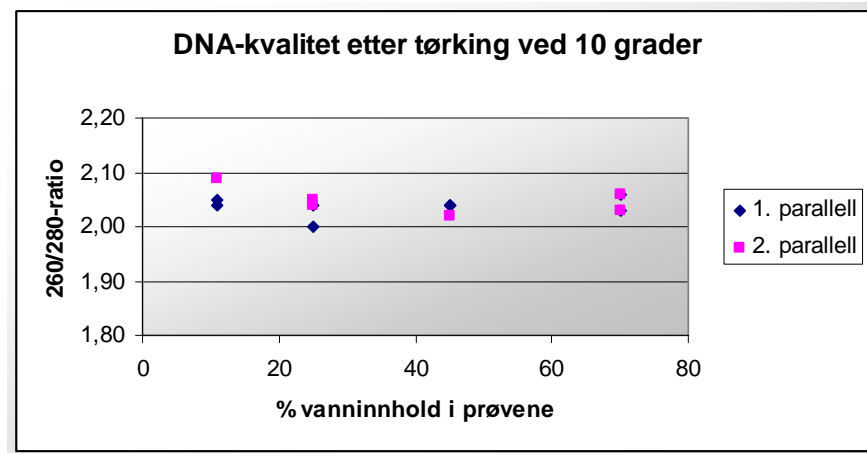
Slik er tørkekurvene for prøvene som er tatt ut til analyse ved LBK. Det vil si at prøvebiter er tatt ut samtidig, både til levering til analyse, og til å følge med hvordan tørkekurven forholder seg i forhold til testkurven og til parallellen.



Figur 22 Tørkekurve + 10 °C

### 5.3.2 DNA-kvalitet

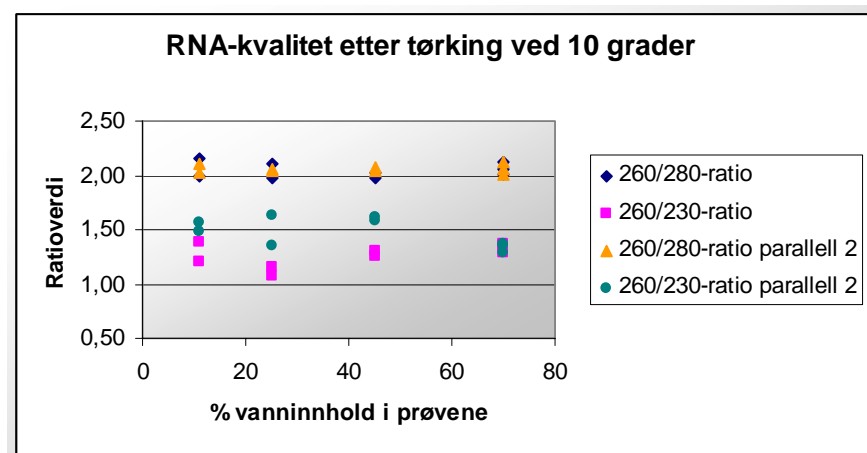
Her presenteres DNA-kvaliteten med 260/280-ratio som funksjon av vanninnholdet i de analyserte prøvene. For å indikere god DNA-kvalitet bør verdiene ligge innenfor 1,8 og 2,2. y-aksen er derfor angitt av nettopp dette intervallet. Vanninnholdet er et gjennomsnitt av verdiene funnet av tørkekurvene i Figur 22. Tørketiden går mot venstre i diagrammet. For spesifikke verdier henvises det til tabell i vedlegg.



Figur 23 DNA-kvalitet ved 10 °C

### 5.3.3 RNA-kvalitet

RNA-kvaliteten er gitt av to ratioer; 260/280 og 260/230. For å indikere god RNA-kvalitet bør disse, som for DNA, ligge mellom verdiintervallet 1,8-2,2. Det er dog vanlig, og ikke ensbetydende med RNA-degradering, at sistnevnte ratio er noe lavere i verdi enn 1,8. Siden disse verdiene er av større variasjon enn de for DNA, er y-aksen presentert med et større intervall, her fra 0,5-2,5. Nøyaktige verdier finnes vedlagt.



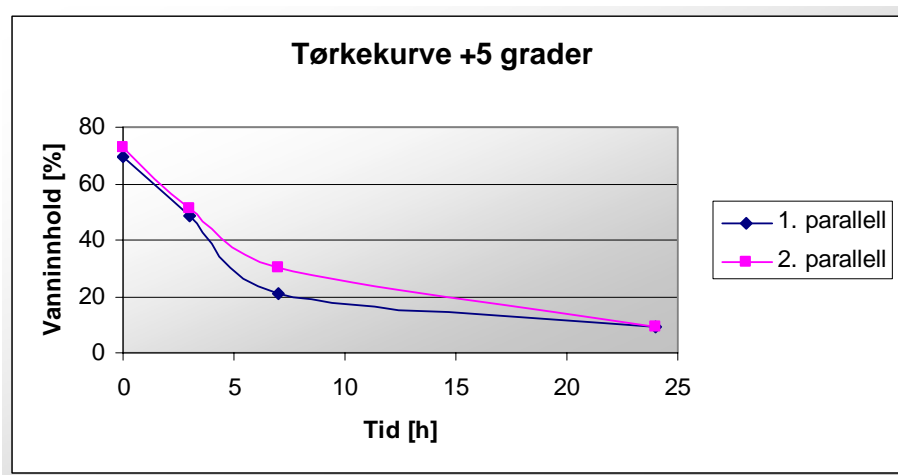
Figur 24 RNA-kvalitet ved 10 °C.

## 5.4 Tørking ved +5 grader – analyseresultater

Her vises resultatene som er fremkommet ved tørking ved +5 °C.

### 5.4.1 Tørkekurvene

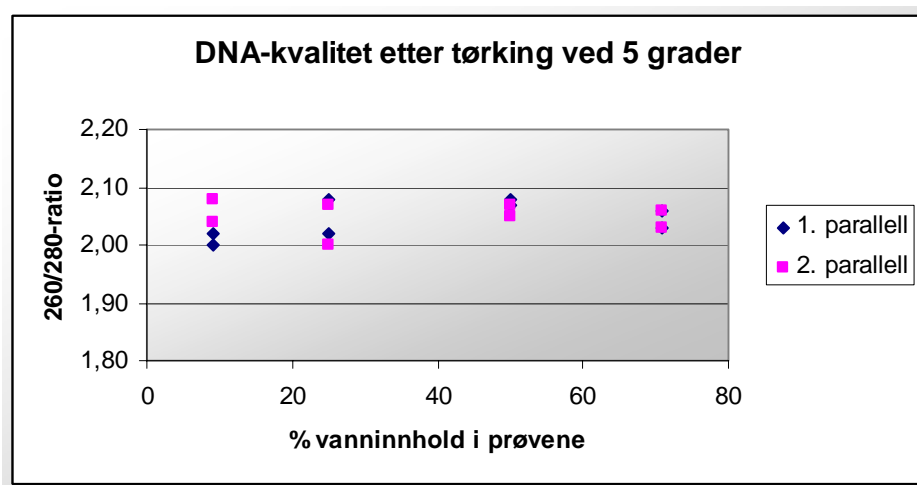
Slik er tørkekurvene for prøvene som er tatt ut til analyse ved Biobanken på St. Olavs Hospital.



Figur 25 Tørkekurve 5 °C

### 5.4.2 DNA-kvalitet

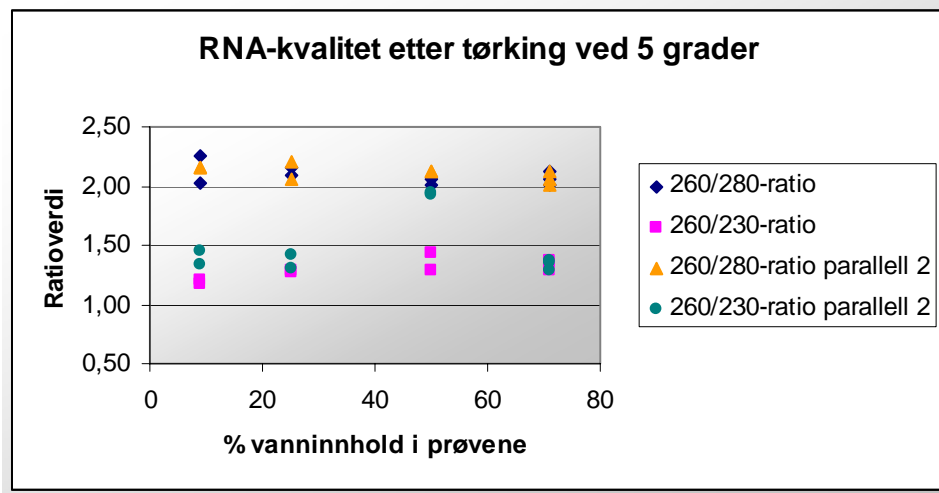
Resultatene er presentert på samme måte som i del 5.3.2 og viser oppnådd DNA-kvalitet ved den anvendte tørketemperaturen.



Figur 26 DNA-kvalitet ved 5 °C.

### 5.4.3 RNA-kvalitet

Resultatene er gjengitt på samme måte som i del 5.3.3 og viser RNA-kvaliteten ved 5 graders tørketemperatur.



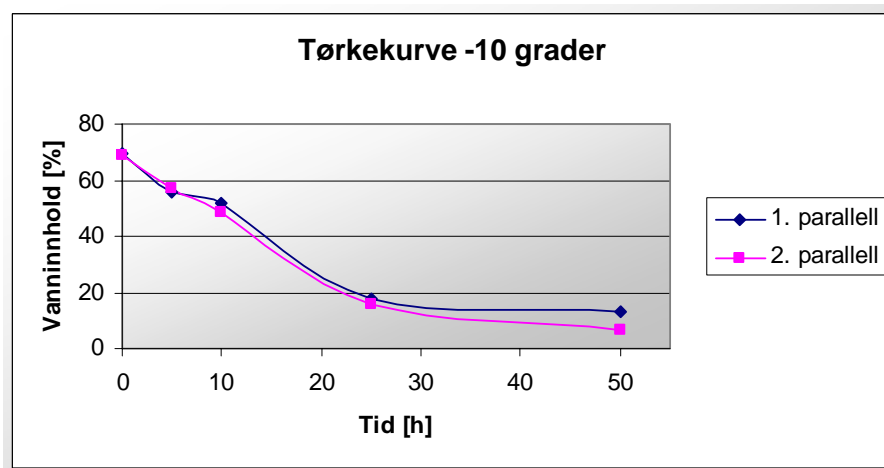
Figur 27 RNA-kvalitet ved 5 °C.

## 5.5 Tørking ved -10 grader – analyseresultater

Til slutt vises resultatene som er fremkommet etter tørking ved -10 °C.

### 5.5.1 Tørkekurvene

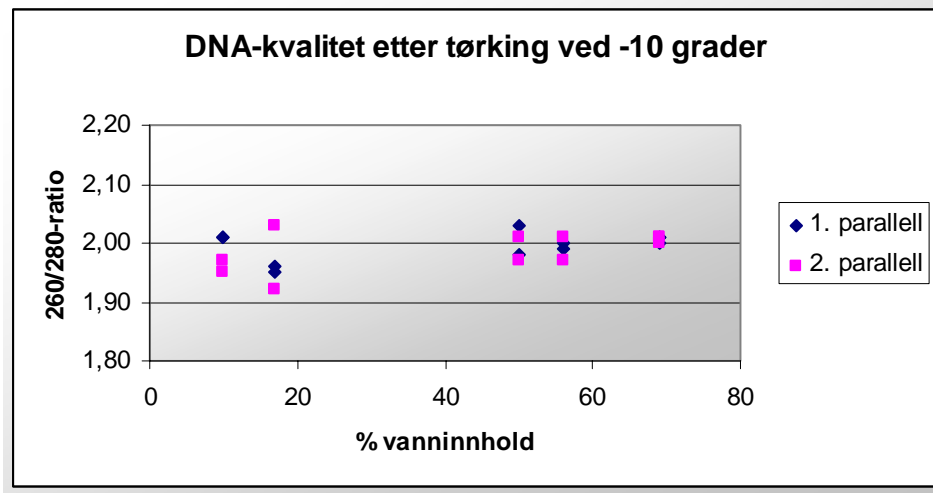
Disse tørkekurvene ble slik etter målinger av prøver tatt ut samtidig med uttak av prøver til analyse.



Figur 28 Tørkekurve -10 °C

### 5.5.2 DNA-kvalitet

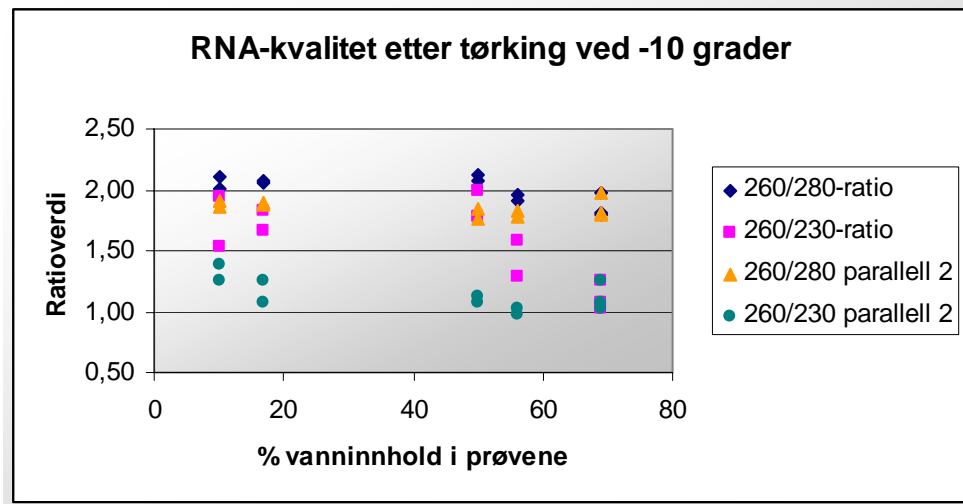
Resultatene er presentert på samme måte som i del 5.3.2.



Figur 29 DNA-kvalitet ved -10 °C.

### 5.5.3 RNA-kvalitet

Resultatene er gjengitt på samme måte som i del 5.3.3.



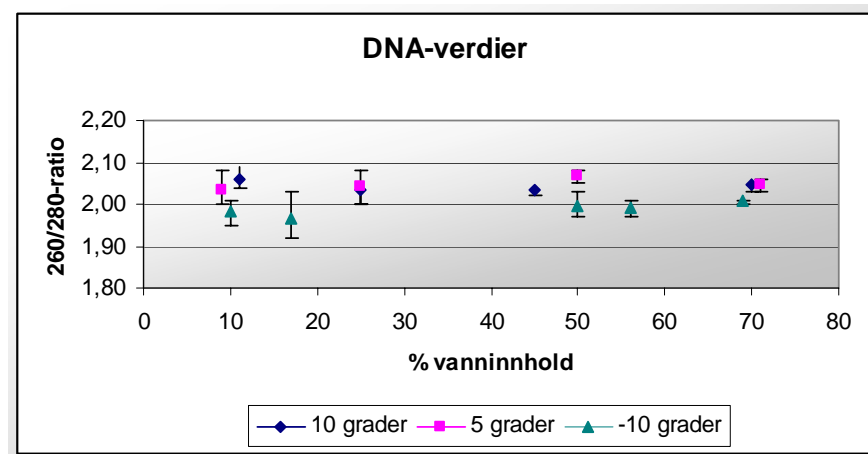
Figur 30 RNA-kvalitet ved -10 °C.

## 5.6 Sammenligning av tørketemperaturene

For å lettere kunne påpeke ulikheter og signifikante forskjeller mellom de utvalgte tørketemperaturene og hvordan de påvirker analyseparameterne, blir resultatene i dette delkapitlet samlet etter beste skjønn.

### 5.6.1 DNA-kvalitet

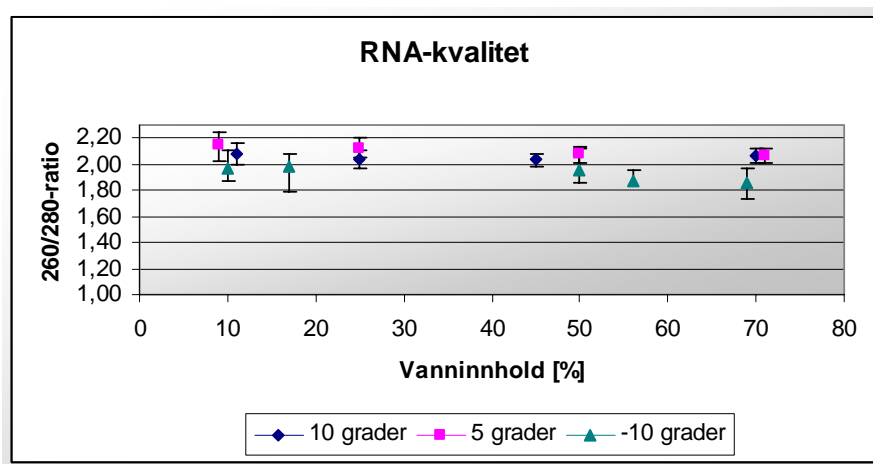
Verdiene for DNA-kvalitet oppnådd under forsøkene er samlet i grafen under. Det er vanlig å presentere dem kun med 260/280-ratio. Disse skal som nevnt ligge mellom 1,8 og 2,2 for å indikere gode kvalitetsverdier, og derfor er dette intervallet igjen valgt på y-aksen.



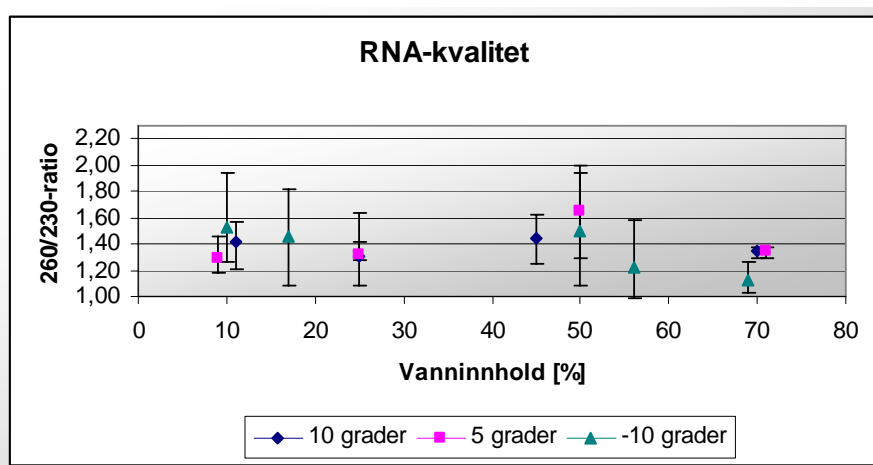
Figur 31 DNA – sammenligning av tørketemperaturer.

### 5.6.2 RNA-kvalitet

Samme som for DNA, så bør RNA-kvaliteten ligge mellom verdiene 1,8 og 2,2. I tillegg til 260/280-ratio blir RNA-kvalitet som kjent presentert med enda en ratio; 260/230. Alle verdiene fra analysene gikk ikke innenfor det ønskede intervallet, og derfor har y-aksen fått et større verdiintervall. For å enklere kunne sammenligne de to kvalitetsratioene, ble y-aksen valgt med samme verdier, nemlig fra 1,0-2,3.



Figur 32 260/280-ratio – sammenligning av tørketemperaturer.

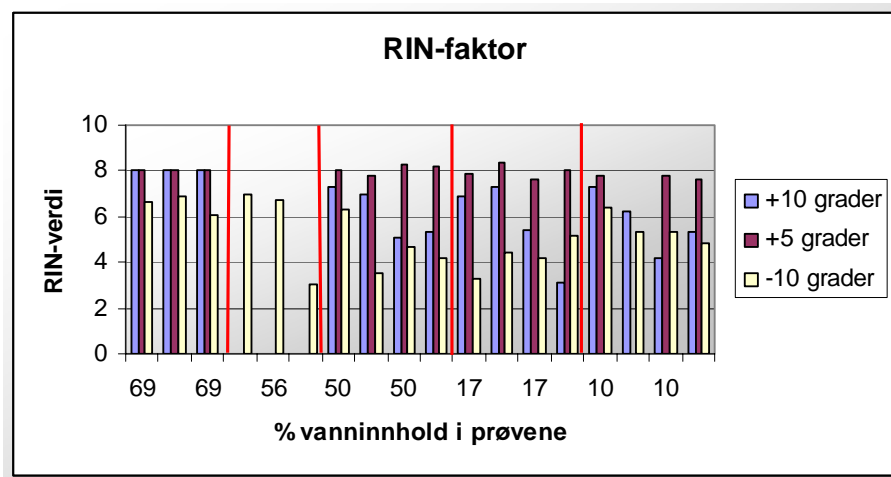


Figur 33 260/230-ratio – sammenligning av tørketemperaturer.

### 5.6.3 RIN-faktor

Ratio-verdiene 260/280 og 260/230 gir mengde RNA samt en kvalitetsvurdering av molekylet, men sier ingenting om det har skjedd en degradering av RNAet. Til dette brukes apparatet *Bioanalyser*. Den gir en standardisert verdi av hvor intakt RNAet er. Jo høyere verdi, jo mindre degradering har skjedd og jo mindre oppkuttet er RNAet. Resultatene er presentert i et stolpediagram som visuelt sett enkelt viser for hvilken tørketemperatur de høyeste RIN-tallene inntreffer. Fordi det ble utført flere uttak ved -10 °C enn ved tørking med plussgrader, står disse parallellene alene ved ca 56 % vanninnhold. Vanninnholdet på x-aksen er omtrentlige verdier på prøver tatt ut ved de forskjellige tørketemperaturene. De nøyaktige for hver av tørketemperaturene finnes vedlagt. For å vise at skalaen på x-aksen ikke er lineær, men at den viser uttak av prøver fra utørket til tørt produkt, er skillete ved de forskjellige

vanninnholdene (uttakene) i diagrammet markert med en rød strek. Alt vanninnhold er gitt på våt basis.



Figur 34 RIN-faktor – sammenligning av tørketemperaturer.

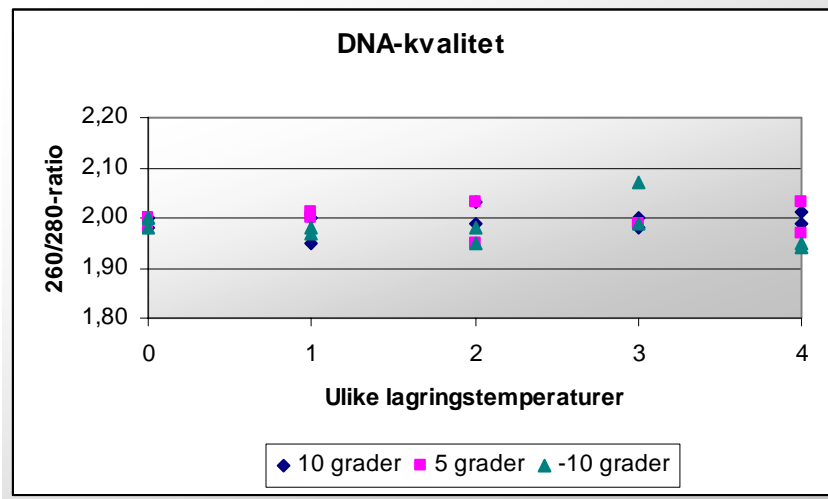
## 5.7 Lagrede prøver

Prøvene som presenteres i dette delkapitlet har ligget lagret så nær opptil innleveringsfrist som mulig. Det betyr at de forskjellige prøvene har lagt i noe ulik lengde, variasjonen er mellom 60 og 85 dager. De utvalgte lagringstemperaturene var romtemperatur, kjøleskapstemperatur, lagring i -20 °C-fryser og i flytende nitrogen. For enkelhets skyld er disse kategorisert i grafene slik at det blir enklere å kunne sammenligne tørke- og lagringstemperaturer. Kategoriseringen på x-aksen som er brukt i de kommende grafene er som følger:

- 0 → Kontroller. Disse er ikke tørket, bare oppbevart i flytende nitrogen.
- 1 → Tørkede prøver lagt i romtemperatur, ca 20 °C.
- 2 → Tørkede prøver lagt i kjøleskap, 4 °C.
- 3 → Tørkede prøver lagt i fryser, -20 °C.
- 4 → Tørkede prøver lagt i flytende nitrogen, -196 °C.

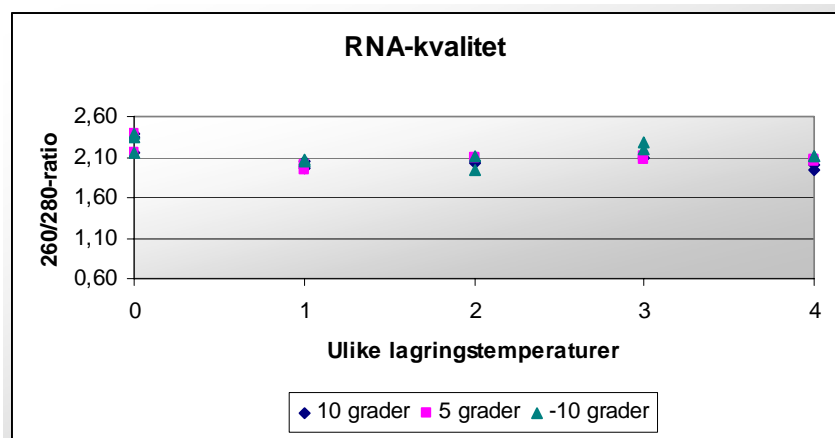


### 5.7.1 DNA-kvalitet

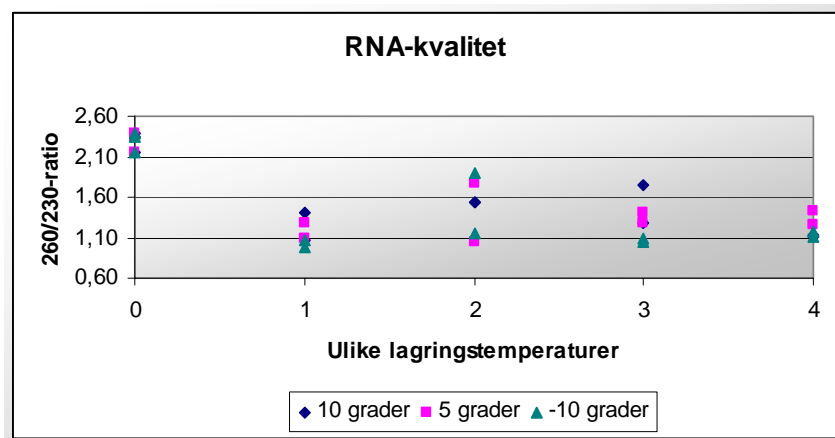


Figur 35 Måling av DNA fra lagrede prøver.

### 5.7.2 RNA-kvalitet



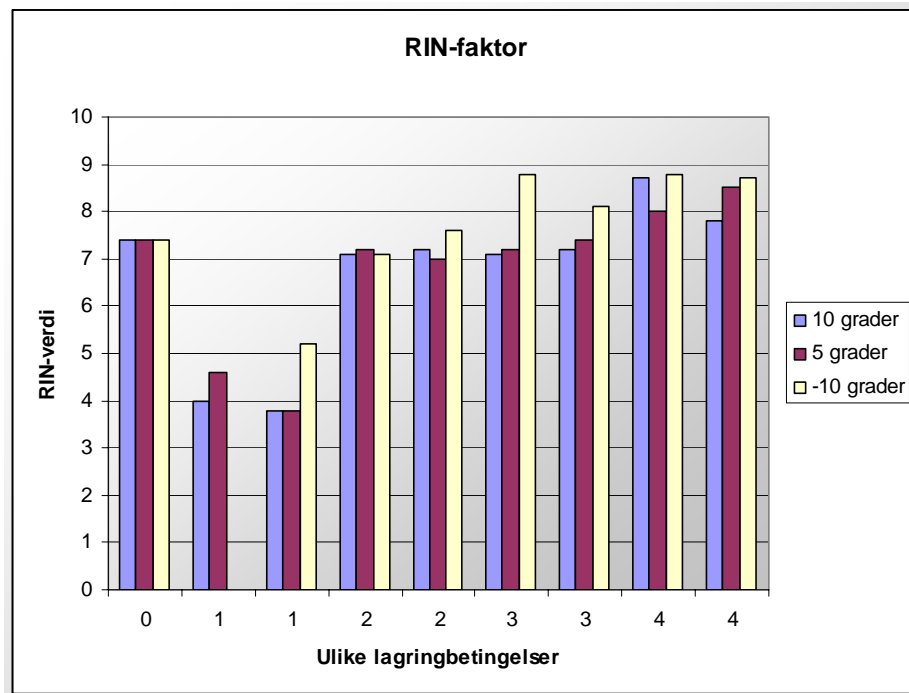
Figur 36 RNA fra lagrede prøver gitt ved 260/280.



Figur 37 RNA fra lagrede prøver gitt ved 260/230.

### 5.7.3 RIN-faktor

Lagringsbetingelsene er kategorisert som beskrevet tidligere. Doble nummer angir at prøvene er analysert i parallell. 1. parallell ved lagringsbetingelse 1 ga ingen verdi for prøven tørket ved -10 °C. Nøyaktige verdier kan leses av i tabell i vedlegg.



Figur 38 RIN-verdier for tørkede og lagrede prøver.

## 5.8 Lipidundersøkelse

De neste tabellene viser funnene fra lipidundersøkelsene. Det er kolonnen til høyre som er av interesse. Jo lavere verdi som er oppnådd her, jo mindre lipidperoksidering har inntruffet. Første tabell viser resultatene fra de tørkede prøvene som er lagret i 2-3 måneder, mens neste tabell viser prøver som er tørket og deretter lagt direkte tilbake i flytende nitrogen.

**Tabell 6** Tørkede og lagrede prøver.

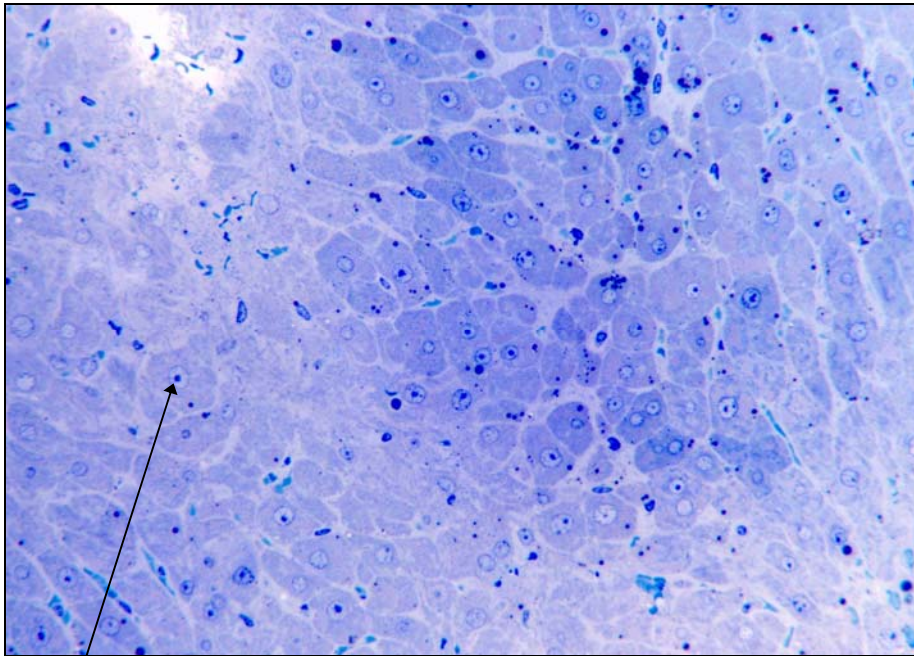
Prøvenavn	Tørketemp. [°C]	Lagringstemp.	Protein [mg/mL]	Kons. peroksidert lipid/mg protein
1	10	Romtemp.	2,90	1,23
2	5	Romtemp.	2,33	1,52
3	-10	Romtemp.	1,36	2,93
4	10	4 °C	1,53	2,80
5	5	4 °C	1,64	3,04
6	-10	4 °C	1,79	2,61
7	10	-20 °C	1,54	2,04
8	5	-20 °C	1,19	0,61
9	-10	-20 °C	3,69	1,16
10	10	Liq. N <sub>2</sub>	6,96	0,83
11	5	Liq. N <sub>2</sub>	7,88	1,07
12	-10	Liq. N <sub>2</sub>	4,93	1,08

**Tabell 7** Tørkede prøver.

Prøvenavn	Tørketemp. [°C]	Tørketid [h]	Protein [mg/mL]	Kons. peroksidert lipid/mg protein
Negativ kontroll	-	0	3,67	1,145
Positiv kontroll	-	0	1,97	4,024
1.1	10	3	1,67	0,793
1.2	10	6	3,60	0,128
1.3	10	23	3,18	0,387
2.1	10	3	4,14	0,576
2.2	10	6	N/A	N/A
2.3	10	23	6,94	0,756
1.1	5	3	3,34	0,320
1.2	5	7	3,08	0,509
1.3	5	24	3,15	0,593
2.1	5	3	6,79	0,743
2.2	5	7	3,06	0,660
2.3	5	24	3,47	0,713
1.1	-10	5	2,70	0,992
1.2	-10	10	3,56	1,020
1.3	-10	25	7,89	1,315
1.4	-10	50	4,71	0,970
2.1	-10	5	1,54	3,210
2.2	-10	10	4,09	1,508
2.3	-10	25	3,61	1,504
2.4	-10	50	4,42	1,062

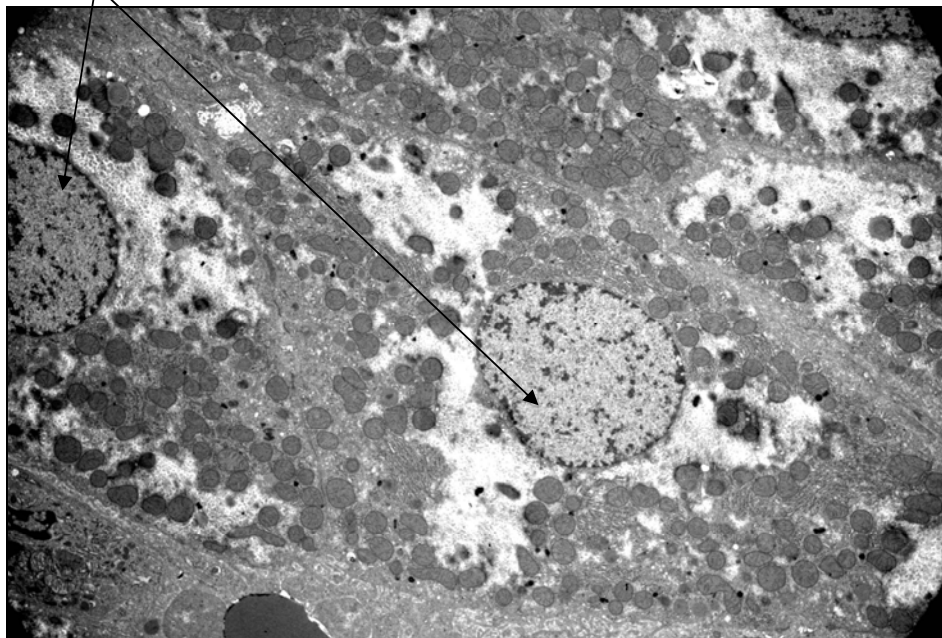
## 5.9 Elektronmikroskopi

Her vises bildene som ble tatt under elektronmikroskopiundersøkelsene. De blå bildene kalles blåsnitt og viser et oversiktsbilde over hvordan leverstrukturen er, og brukes til å orientere seg i snittet. De mørkeblå prikkene er cellekjernene og de mellomblå feltene selve cellene. De grå bildene viser forstørrelse av snittene gjort i mikroskopet (*TEM, Jeol JEM-1011*).

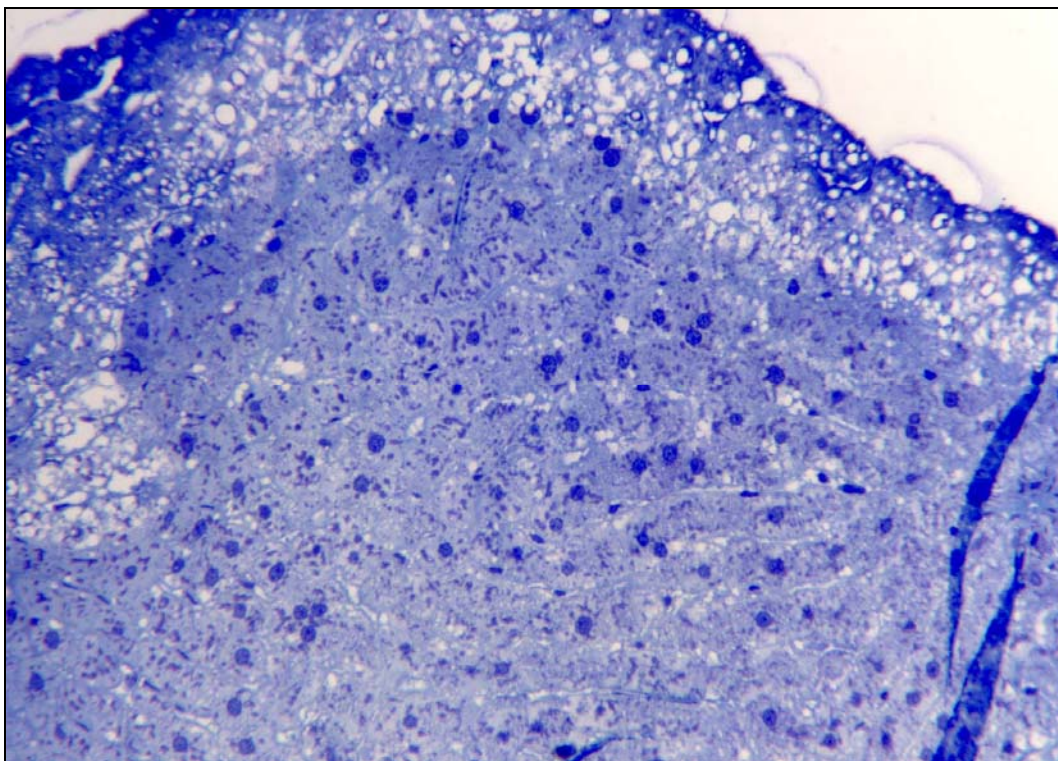


**Figur 39** Blåsnitt over standard prøve (BB1; Std.).

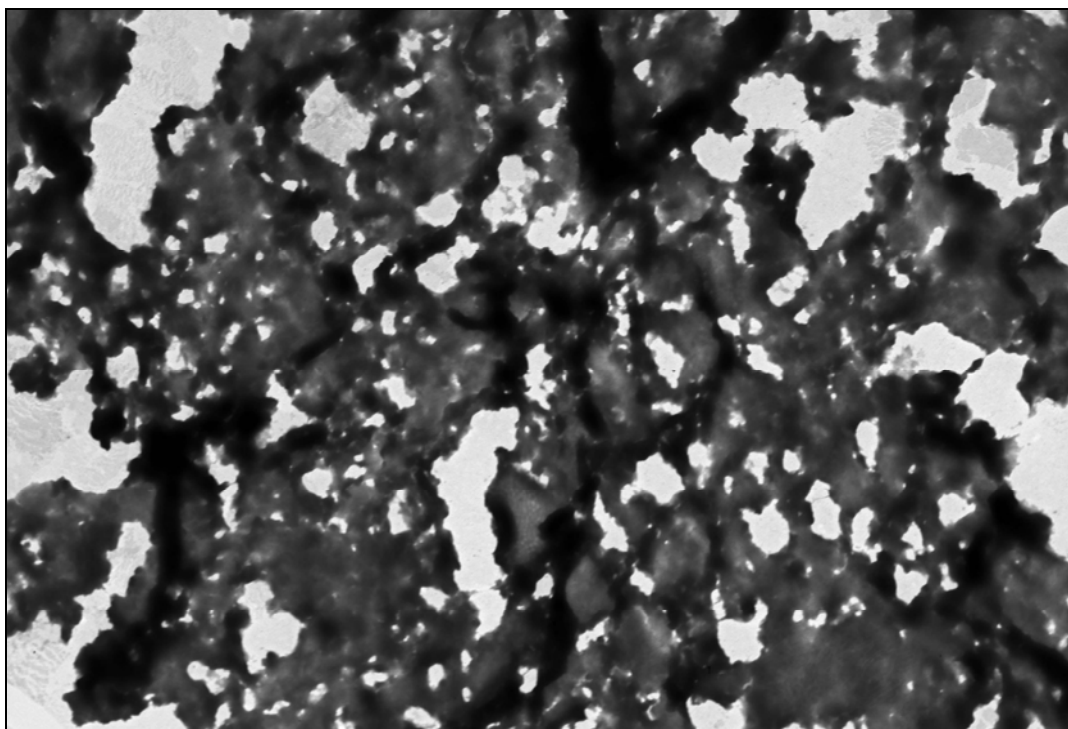
Cellekjerner



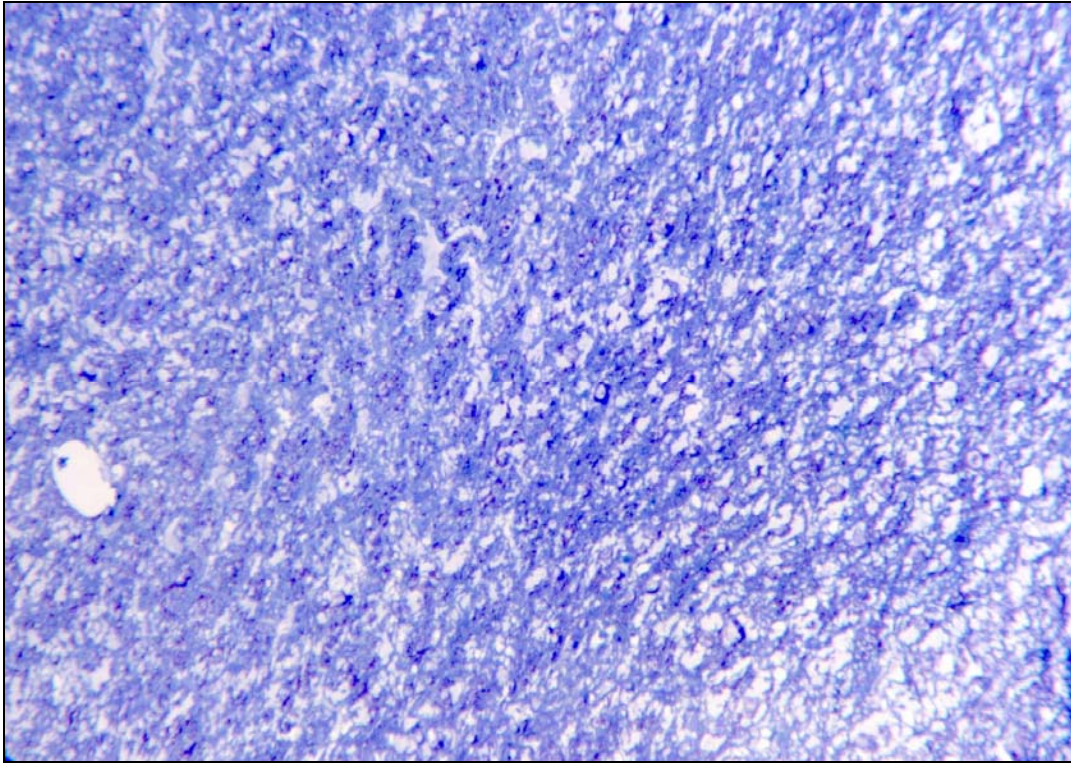
**Figur 40** Mikroskopert bilde av vevsnittet (BB1; Std.).



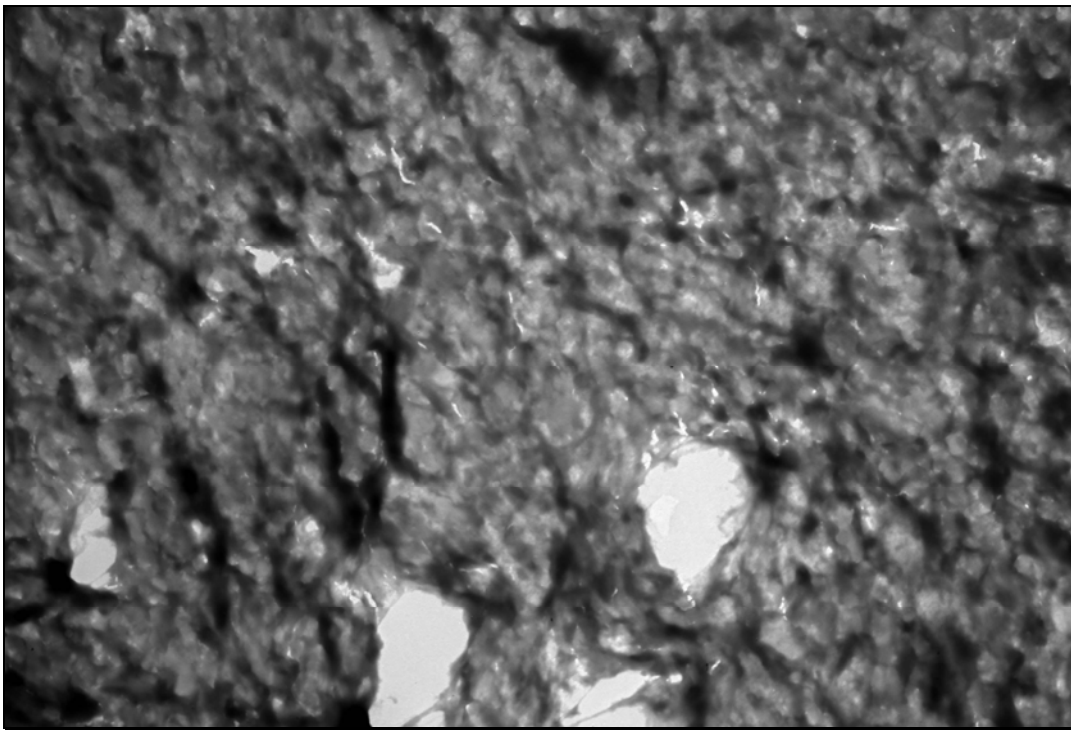
**Figur 41** Blåfargesnitt av frosset prøve (BB2; F).



**Figur 42** Forstørret bilde av frosset prøve (BB2; F).



**Figur 43** Blåsnitt av prøve tørket ved +10 °C (BB3; FTF).



**Figur 44** Forstørret bilde av den tørkede prøven (BB3; FTF).



## 6 Diskusjon

I denne delen av rapporten blir resultatene, som er presentert i forrige kapittel, kommentert og diskutert. Til slutt vil det bli en diskusjon av resultatene knyttet opp mot problemstillingen biobank og lagring av humant materiale.

### 6.1 Tørkekurvene

Figur 20 viser tørkekurvene for de tre utvalgte tørketemperaturene. Ikke overraskende tørker vevsmaterialet raskest ved høyeste temperatur, altså +10 °C, mens tørking ved -10 °C brukte lengst tid for å bli tilsvarende tørt. Dette bekrefter teorien om at økt tørketemperatur gir økt tørkehastighet. Prøvebitene var meget små og umulig å få helt uniforme. Slik kan tørkehastigheten variere noe innad blant vevsbitene og således vanninnholdet avvike fra bit til bit selv om de tas ut på samme tidspunkt. Denne variasjonen vil likevel ikke være så stor at det får særlige konsekvenser for analyseresultatene.

### 6.2 Sorpsjonsisotermene

Sorpsjonsisotemer viser mengden av vann adsorbent som funksjon av stasjonært, relativt damptrykk ved en konstant temperatur. Isotermene presentert i Figur 21 er fremkommet etter måling av sorpsjonen i apparatet *Cisorp Water Sorption Analyser*. I dette apparatet måles sorpsjonen av vann i tørt materiale ved atmosfæres trykk. Våte og tørre luftstrømmer mikses automatisk for å oppnå relativ fuktighet som på forhånd blir definert i programmet. Temperaturen ble holdt så lav som mulig for å klare å komme så nære kjøleskapstemperatur som mulig. I praksis vil dette si at prøvene gjennomgikk sorpsjon ved ca. 12 °C. Av grafen kommer det tydelig frem at i hystereseeffekten inntreffer for alle tre tørketemperaturer, men hysteresen for alle temperaturer er liten. Mest hysteresen er å finne på prøver tørket ved +5 °C. Hysteresene kan skyldes endringer i vevsmaterialet som svelling. Isotermene ligger under hverandre etter stigende tørketemperatur. Den varmeste temperaturen har klart å fjerne mest vann fra materialet. Ergo er vanninnhold i tørt materialet lavere her enn for leverbiter tørket ved -10 °C.



Det er ikke gjennomført separate rehydreringstester i masteroppgaven selv om dette ble utført i forprosjektet. Begrunnelsen for dette er at det viktigste med tørking av fast vev er at analyser som trengs å gjennomføres på og av materialet også lar seg gjøre etter at deler av vannet er fjernet. Vevet skal ikke bli rekonstituert igjen, men kun benyttes til analyser og i forskningsøyemed. I litteraturstudiet er det presentert frysetørkeforsøk gjennomført på røde blodceller og på blodplater. Disse skal i ettertid for eksempel brukes på pasienter og rehydrering blir derfor en naturlig del av vurderingen om tørkeforsøkene har vært vellykkede. Også tørking av bakterier og gjær skal i etterkant ofte rehydreres, da målet er å sette i gang biologiske prosesser etter en lengre lagringsperiode med nedsatt funksjon. I forsøkene som er gjennomført i dette prosjektet er altså ikke rekonstitusjon det viktigste målet, men heller bevaring av celle- og vevskomponenter som er nyttige i analyser hos biobanken.

### **6.3 DNA-kvalitet**

DNA har en robust karakter, er kjemisk stabilt og tåler godt en påkjenning før det blir ødelagt. For alle tre tørketemperaturer ligger DNA-kvaliteten godt innenfor akseptområdet 1,8-2,2, jf. Figur 23, Figur 26 og Figur 29. Fordi DNA er kjent for å holde seg godt, var ikke disse resultatene overraskende. Det er ut fra oppnådde verdier bekreftet at DNA fra tørket rottelever ikke er nedbrutt. Nøyaktig verdi kan leses av i tabellene vedlagt. Også prøvene som var blitt lagret i 2-3 måneder viser gode resultater. Det er ingen signifikant forskjell på de ulike lagringstemperaturene, og alle testene ligger innenfor anbefalt intervall 1,8-2,2, se Figur 35.

### **6.4 RNA-kvalitet**

RNA er, i motsetning til DNA, vanskeligere å holde intakt. Dette stoffet degraderes lett og må utsettes minst mulig for luft og høye temperaturer. RNase, enzymer som bryter ned RNA, finnes stort sett overalt og slik blir altså RNA lett degradert. Det betyr at utstyr og apparatur som benyttes i kontakt med RNA må være RNase-fritt for at RNAet skal bevares.

De to angitte ratioene 260/280 og 260/230 forteller om hvordan kvaliteten er på det RNAet som er blitt ekstrahert fra prøvematerialet. For at RNAet skal være av topp kvalitet bør begge ratioene fra analyser gjennomført på *NanoDrop* ligge innenfor et anbefalt intervall, nemlig 1,8-2,2. Både for høye og for lave verdier tilsier at det er forurensninger til stede i eluatet og at RNAet ikke er av ren kvalitet. Resultatene som er oppnådd fra tørkeforsøkene har jevnt

over gitt gode RNA-data, spesielt for 260/280-ratioen. Ratioen 260/230 har ikke alltid nådd opp til ønsket akseptintervall, og ligger stort sett hele tiden under 260/280-ratioen. Dette har vist seg å ha sammenheng med konsentrasjonen av RNAet som er ekstrahert. Det viser seg at hvis RNA-konsentrasjonen ligger under 100 ng/ $\mu$ l, blir 260/230-ratioen litt lavere av den grunn, altså fordi det blir for mye elueringsbuffer i forhold til mengde RNA (Helge, 2006). Det behøver ikke bety at det er noen kontaminasjon i prøven selv om ikke ratioen har nådd ønsket nivå. Dersom Figur 32 og Figur 33 sammenlignes er det lett å se at 260/280-ratioen nesten hele veien ligger høyere enn 260/230-ratioen. I vedlegg B.4 og B.6 er konsentrasjonene samlet i samme tabell som ratioene, slik at disse kan studeres sammen. Der konsentrasjonen når 100 ng/ $\mu$ l vil en også kunne se at ratioen 260/230 når akseptverdi. Ved å sammenligne de tre forskjellige tørketemperaturene innad i nevnte grafer, er det lite som skiller de ulike temperaturene. For 260/280-ratioen ligger så å si alle resultater innenfor ønskede tallverdier. Det er derfor vanskelig ut fra disse ratioene å konkludere noe om hvilken tørketemperatur som har utmerket seg mest. Likevel synes det som om det er verdier fra prøver tørket ved -10 °C er de som varierer mest mellom parallellene.

For å kunne benytte RNA til genekspressjonsanalyser og andre aktuelle undersøkelser, er det viktig at RNA-kvaliteten er tilfredsstillende. Etter at kvaliteten på RNA er sjekket på *NanoDrop*, testes grad av degradering ved hjelp av apparatet *Bioanalyzer*. Dette er også et mål på kvalitet. For at RNA skal kunne brukes til genekspressjonsanalyser, kan ikke RNA være kuttet i småbiter. Dette vil gi et ufullstendig uttrykk av genene. RNAet må være langt nok slik at de gir et rett uttrykk av genet en ønsker å studere. For å se at RNAet er av god nok kvalitet, sjekkes RIN-tallet, som er omtalt i kapittel 4.6.2. Når RIN-tallet er 10, er RNAet perfekt, men gode genekspressjonsanalyser er også gjennomført ved RIN=6,9 (Helge, 2005). Resultatene fra de tørkede prøvene viser bra RIN-verdier, og spesielt gode er de prøvene som er tørket ved 5 °C. En grunn til dette kan være at denne temperaturen er lav nok slik at ingen degradering skjer, og samtidig høy nok til at tørkehastigheten er relativt rask. Disse prøvene er tørket i ett døgn, men tørketiden fram til omtrent 10 % vanninnhold er sannsynligvis kortere enn dette, jf. tørkekurvene. Så ut fra RIN-faktoren, sammen med de ovennevnte ratioene, ser det ut til at tørketemperaturen 5 °C har gitt best resultat med tanke på RNA-kvalitet. Likevel er det slik at frysetørring går for å være en mer skånsom tørkeprosess, men RIN-tallene fra -10 °C-forsøkene ligger jevnt over lavere enn de som er tørket ved 5 °C. Ved å ta en nærmere titt på RIN-tallene fra kontrollene er også disse lavere enn hva som er å finne for kontrollene til forsøkene som er gjennomført ved plussgrader. Så materialet kan i

utgangspunktet ha vært av en svakere beskaffenhet. Dette betyr at forsøkene ved  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  ideelt sett burde vært testet ut en gang til.

For de lagrede prøvene er RIN-tallet godt for alle tørketemperaturer og lagringstemperaturer bortsett fra de prøvene som er lagret i romtemperatur. Her er alle verdiene lave. RIN-tallene har en jevn stigning fram til lagring i flytende nitrogen, som gir de beste verdiene. Prøvebiter som er lagret i kjøleskapstemperatur og kaldere har alle så gode RIN-tall at de i prinsippet skal kunne brukes til genekspresjonsanalyser og RNA-oppforming. Bitene som ble lagret i romtemperatur ble ikke beskyttet mot lys, så dette kan ha innvirket på at resultatet her er såpass mye dårligere enn ved de andre lagringsbetingelsene. Alle verdiene for 260/280-ratioen av de lagrede prøvene ligger innenfor ønskelig intervall, men akkurat som for de ulagrede prøvene har 260/230-ratioen lavere verdier bortsett fra der RNA-konsentrasjonen i eluatet overstiger  $100\text{ ng}/\mu\text{l}$ .

## ***6.5 Lipidundersøkelse***

Metoden som er brukt for å undersøke lipidene i de tørkede prøvene er ikke så sensitiv for variasjoner og gir derfor bare et grovt bilde av hvordan peroksideringen av lipidene har vært. I utgangspunktet ønskes det at lipidene er så like som de opprinnelig er å finne i materialet, altså at det har vært minst mulig oksidering. Verdiene gis som konsentrasjon peroksidert lipid [ $\mu\text{M}$ ] over mg protein. Verdiene fra dette forholdet bør være lavt for å kunne si at oksideringen har vært liten. I tilfellet med tørkede rotteleverbiter er disse verdiene lave, men stiger for de bitene som er tørket ved  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Dette kan forklares med at disse leverbitene har vært utsatt for oksygen mer enn dobbelt så lenge som prøvene som er tørket ved plussgrader. Materialer tørket ved frysetørring får også en mer porøs struktur enn de som er tørket ved plussgrader. Ved at prøven er mer porøs vil oksygenet lettere diffundere inn i materialet forsterker på den måten lipidperoksideringen (Roos, 1995). Den negative kontrollprøven er en leverbit som ikke er tørket, men som kun har lagt i flytende nitrogen, og den positive kontrollen er fettstoff som har ligget fremme i romtemperatur i flere dager for å sikre høy grad av peroksidering. Den negative kontrollen har fått verdien 1,145, se Tabell 7. Noen av de tørkede prøvene har fått en lavere verdi enn dette. Igjen må det påpekes at metoden ikke er sensitiv for små endringer, og en kan derfor ikke si med sikkerhet at det er stor forskjell på en bit som får 0,660 i verdi mot selve kontrollverdien. Disse kan i utgangspunktet være jevngode. Den positive prøven ga en høyere verdi; 4,024. Da dette fettstoffet er et annet

materiale enn lever, kan denne verdien kun brukes som en guide til å påvise sterk peroksidering, men ikke være et fast mål.

Ved å så sjekke hvordan det gikk med testbitene som har vært lagret, viser stort sett alle disse høyere verdier enn de prøvene som kun er tørket og deretter lagt rett tilbake i flytende nitrogen. Dårligst står det til med prøvene som har vært lagret i kjøleskap og i romtemperatur. Det kan virke som om oksidiseringsprosessen har kommet lenger her og at materialet er i ferd med å harskne, jf. den positive kontrollen.

## ***6.6 EM-undersøkelse***

Elektronmikroskopi er en noe omhyggelig og tidkrevende prosess. På grunn av dette ble det valgt ut ulike prøver som skulle studeres. Disse ble, i tillegg til kontrollen, en prøve som kun var lagt i flytende nitrogen og en prøve som var tørket ved +10 °C i 23 timer. Konklusjonen ut fra bildene presentert i del 5.9 er at EM ikke kan gjennomføres på frosne og tørkede prøver, men det betyr nødvendigvis ikke at prøven er ødelagt for det. Det betyr bare at vevet må fikseres før det kan benyttes til EM. Fuktighet trenger inn i materialet og slik mister vevet struktur og blir deformert. Dersom bildene med blåsnitt sammenlignes er det tydelig at cellestrukturene er mer visket ut for BB2 og BB3 i forhold til standarden. I kontrollen er det lett å skille ut cellekjernene og også mulig å se selve celleformasjonene. For det trente øye er det i mikroskopibildene også mulig å skille de forskjellige celleorganellene fra hverandre. Fra EM-laben sin side var det ønskelig å forsøke en annen teknikk, nemlig frysesubstitusjon, for å se hvordan denne teknikken skilte seg fra standard EM. Men denne metoden tar flere uker å gjennomføre og ble derfor uaktuell å ta med i denne rapporten da de ferdiganalyserte resultatene ankom kandidaten siste arbeidsdag før innlevering.

## ***6.7 Generell diskusjon***

Etter sekvenseringen av det menneskelige genom er det en optimisme og entusiasme blant forskere innenfor bioteknologi, men også innenfor andre vitenskaper. Det er bred enighet om at sekvenseringen har åpnet dører for mer forståelse om sykdomsforløp, om sammenhenger mellom arv og miljø, at genforskning kan gi forbedrede diagnostiseringsmetoder og til og med bidra innen en viktige miljøspørsmål. I den sammenheng er biobanker i vinden. Dagens metoder for oppbevaring av prøvematerialer i biobanker er frysing i mekaniske fryserer eller i

flytende nitrogen, eller å fikserer vevet i lyseringsbuffere (Sjøvold, 2005). Flytende nitrogen er kostbart og må stadig etterfylles, og frysere kan blant annet gi avisingsproblematikk og krever konstant tilgang på elektrisitet. På den måten vil det hele tiden være behov for tilgjengelige back-up-frysere slik at det dyrebare prøvematerialet kan flyttes når det er behov for avising, eller ved et eventuelt strømbrudd. På slike frysere er det vanlig med alarmsystemer som kontakter sikkerhetspersonell ved for store temperaturavvik. Både på frysere og alarmersystemer vil det til tider være aktuelt med service. Til sammen gjør alle disse tingene at nedfrysning som lagringsmetode er kostbart og energikrevende.

Men dersom dagens metoder fungerer tilfredsstillende og oppbevarer biobankmaterialet på en trygg og sikker måte, hvorfor er det da i det hele tatt interessant å forsøke å finne en ny måte å gjøre dette på? Tørking som konserveringsmetode gjør at prøvematerialet kan oppbevares i tørr tilstand med nedsatt vannaktivitet. Lav vannaktivitet er med på å gjøre materialet lagringsstabil. Den kanskje viktigste fordel med en slik lagringsmetode vil være at prøvematerialet slipper å gjennomgå påkjennende tine- og frysesykler. For hver gang materialet tines opp vil det føre til drypp fra materialet. Det begrenser seg selv hvor mange ganger en kan ta av samme materiale til tester. Dersom materialet er tørt og for eksempel blir lagret i et type arkiv, enten i rom- eller kjøletemperatur, kan nødvendig testmengde hentes til analyse uten at det vil påvirke det resterende prøvematerialet. Materialet er allerede behandlet. En annen fordel med tørt materiale er at det forenkler pakking, transport og logistikk. Ved å tenke litt utenfor den vestlige velstand kan en forestille seg at tørketeknikken kan bidra til at forskning kan være aktuelt å gjennomføre for forskningsorganisasjoner også i fattige land. Prøvene kan tas, tørkes, fraktes og oppbevares til senere analyser. Det er også mulig å snu på det. For eksempel kan tørkede blodplater (omtalt i del 3.2) enklere fraktes til pasienter i behovsområder i fattige land og i krisestruk enn om det skulle være behov for flytende nitrogen eller annen avkjøling under transporten.

Biobank er et stort begrep som rommer flere typer tolkninger. Biobanker benyttes blant annet til diagnostisering, til lager av diverse preparater nødvendig i behandling, og som oppbevaring for en stor mengde prøvemateriale fra en utvalgt befolkningsgruppe som senere skal benyttes til forskning på diagnostiseringsmetode, sykdomsbilde og personlig medisinering. Hvilke forsøk bør gjennomføres for å kunne konkludere med at tørking er en nyttig prosess i biobanksammenheng? Forsøkene som er gjennomført i denne oppgaven er bare en start, og flere tester må gjøres for å vinne frem. Likevel synes resultatene som har fremkommet av de

utførte testene at det er all grunn til optimisme og fortsettelsesglød rundt prosjektet. Det viktigste funnet i denne omgang er at RNA ikke tar stor skade av dehydrering. Ratioverdiene sammen med de gode RIN-tallene forteller at kvaliteten på RNA i prinsippet er slik det behøver å være for å kunne gjennomføre ulike genanalyser. Riktignok er testmaterialet rottelever, og biobanker hvor lavtemperatur tørketeknikk er tiltenkt som konserveringsmetode oppbevarer stort sett bare humant vev. Om resultatene lar seg gjenskape på humane vevstyper gjenstår å se. Tester på humant vevsmateriale må nødvendigvis utføres etter hvert. Litteraturstudiet viser at forskning på ulike blodfragmenter allerede er i full gang, og mange av disse forsøkene har gitt oppløftende utfall. Igjen er dette et tegn på at tørketeknikk kan egne seg som konserveringsmetode for aktuelle biobankmaterialer. Den kommersielle gevinsten av å utvikle en tørketeknikk som resulterer i lagringsstabile produkt/preparater/prøvematerialer burde være stor da antall biobanker er nesten utallige. Siden troen på genforskningens muligheter og bruksområder er forsterket etter sekvenseringen av det menneskelige genom, vil biobanker antakelig bare øke i omfang. Markedet er potensielt stort. Om de er klare for å endre sine nåværende konserveringsmetoder gjenstår enda å se.



## 7 Konklusjon

Tørkeforsøkene gjennomført på rottelever gir indikasjoner på at fjerning av vann fra vev ikke skader materialet, men at det beholder en RNA-kvalitet som er god nok til å gjennomføre analyser av genene i etterkant. Tørketemperatur 5 °C er den tørketemperaturen som har vist seg å gi de beste resultatene for testede ratioverdier og RIN-faktor, og har slik oppnådd best kvaliteten på RNA. Også lipidperoksideringen ser ut til å være liten ved denne tørketemperaturen, men er også jevnt over små ved de andre tørketemperaturene.

For de fire utvalgte lagringsbetingelsene var det lagring i romtemperatur som kom dårligst ut. Den største forskjellen fra disse prøvene i motsetning til de som ble lagret ved de andre lagringsbetingelsene var at i romtemperatur ble ikke prøvene beskyttet mot lys. Derfor kan lyset ha vært med på å gjøre resultatene dårligere enn de i utgangspunktet behøver å være. Lipidundersøkelsen av de tørkede prøvene viser at oksideringsprosessen har kommet lengst for prøver oppbevart i kjøle- og romtemperatur. Minst lipidperoksidering er å finne på prøver lagt i flytende nitrogen. Metoden som er blitt benyttet til lipidundersøkelsene gir et grovt bilde av hva som har skjedd med testmaterialet da den ikke er sensitiv for små endringer. Å trekke noen konkrete slutninger ut fra disse analysene kan derfor ikke gjøres.

Elektronmikroskopi viste seg å fungere dårlig på frosset og tørt materiale. Det dårligste bildet ble tatt av prøven som var tørket ved 10 °C i 23 timer. For både frosset og tørr prøve har cellestrukturen blitt jevnet ut i forhold til ved standard EM-metode. Likevel behøver ikke dette nødvendigvis bety at vevet er ødelagt. Morfologien bør sjekkes med en annen metode, for eksempel med frysesubstitusjon.





## 8 Videre arbeid

Kort og greit kan en si at alt må, i hvert fall bør, gjøres om igjen. Det er nemlig et poeng å sjekke om verdiene som er oppnådd, både av de gode og mindre gode, er reproduerbare slik at det enklere kan trekkes konklusjoner om prosessen. Generelt er resultatene som er oppnådd gjennom testene i denne masteroppgaven er så oppløftende at de oppfordrer til videre arbeid med problemstillingen, og reproduserbarhet blir derfor viktig. Og enda er det flere ting som bør undersøkes for å utvikle en konserveringsmetode som er best mulig. Målet må være å utvikle en metode som skaper et stabilt og lagringsvennlig biobankmateriale med en prosess som er rask og kostnadseffektiv.

Til nå er det kun lave tørketemperaturer som er undersøkt. Dersom temperaturen kan økes vil prosessen gå raskere og tørt, stabilt materiale fås fortere. Derfor kan det være interessant å teste et større temperaturområde. Hva er optimumtemperaturen til for eksempel RNA? Det går an å forsøke å tørke leverprøvene ved stadig høyere temperaturer, kanskje opp til 30-40 °C, for så å se hvor optimum befinner seg. Muligens er det ikke mest hensiktsmessig å tørke ved konstant temperatur. Da kan tørkeprogram være verd å undersøke. Ved å benytte et temperaturprogram kan tørkebetingelsene endres underveis i tørkeprosessen slik at både kvalitetsmessige og energimessige krav blir ivaretatt, og med tørkeprogram lar det seg gjøre å kombinere tørking både over og under 0 °C. Dersom en periode med frysetørking blir lagt inn, blir grad av krymping hos materiale redusert. Mulighetene for å regulere tørkebetingelsene er en av hovedfordelene med å ha en varmpumpe tilknyttet tørkeapparaturen.

Lagring er hovedhensikten ved å tørke biobankmaterialer, og gjerne lagring i så enkle omgivelser som mulig slik som i romtemperatur. De prøvene som til nå har vært lagret har vært tørket helt tørre. Kanskje er ikke dette nødvendig? Er muligens prøvene stabile allerede ved 30 % vanninnhold? I såfall vil også dette korte ned på tørkeprosessen. Etter tørking i brettørka ble prøvene lagt rett i cryorør uten videre bearbeidelse, klare til lagringsforsøk. Det kan være en idé å skru igjen cryorørene under en strøm av nitrogengass eller karbondioksidgass for å unngå at prøvene ligger med oksygen/luft for å se om dette kan bedre lagringsforholdene og minske oksideringsprosessen. De prøvene som i denne omgang ble lagret i romtemperatur ble ikke beskyttet mot lys og hadde generelt dårligere RIN-faktor enn

hva som ble resultatet fra de tre andre lagringsbetingelsene. For å ikke avvise romtemperatur som et mulig lagringssted, bør det testes om lys kan ha påvirket de reduserte verdiene som fremkom her.

Fordi oksidering ikke er ønskelig hadde det vært interessant å sjekke hva som skjer med materialet om et annet tørkemedium enn luft blir benyttet, for eksempel nitrogengass. Oksygen er et aggressivt stoff som reagerer med mange biologiske komponenter. Ved å utelukke oksygen, kan en blant annet unnsnippe oksidering av det tørkende materialet. Ved å videre lagre tørket materiale uten tilgang på oksygen, burde en være sikker på at materialet ikke harskner.

En parameter om er aktuell å sjekke, men som det ikke var mulighet å gjennomføre i dette prosjektarbeidet på grunn av tilgang på teknisk apparatur ved LBK, er å se på proteinet. Fører tørking til noen irreversible endringer av proteinet, eller er proteinet intakt og reproduserbart? Det bør derfor gjennomføres et proteinmål. Ved å rehydrere og sjekke diverse enzym får en et mål på proteinaktiviteten i det tørre vevet.

Ikke minst bør RNAet verifiseres for å teste om det kan brukes til nødvendige og ønskelige formål. Typer RNA må kvantifiseres og mRNA må verifiseres for å sjekke at det består av lange nok fragmenter slik at det lar seg oppformere. Lavtemperatur tørketeknikk som konserveringsmetode er ikke god nok før komponentene i det tørre materiale kan benyttes i de nødvendige arbeidsoppgavene i etterkant av tørking og lagring.

Sist, men ikke minst: Hvordan fungerer det å tørke andre typer vev i forhold til cellerik, homogen rottelever? I en biobank er det mange typer vev som lagres, både sykt og friskt. For at tørking skal være en aktuell metode å bruke i biobanker bør prosessen vise seg å være aktuell for mer enn én vevstype. Det er for eksempel en mulighet å teste tørking på flyktige vevstyper også. Gjennom kartleggingen av populasjonsbaserte forskningsbiobanker som ble gjennomført i prosjektoppgaven (2005) kom det fram at det var blod og bestanddeler av blod som var mest vanlig å lagre i slike typer biobanker. Som litteraturstudiet i kapittel 3 viste, er det gjennomført en rekke forsøk på å tørke røde blodceller og blodplater, og det med hell. Dermed kan det være interessant å utforske også dette videre.

# Referanser

## Bøker og artikler

- Adamiec, J., Strumillo, C. (1998). "Attempts of low-temperature spray drying of mixed population of lactic acid bacteria and yeast". *Proceedings of the 11<sup>th</sup> International Drying Symposium, Halkidiki, Hellas, 19.-22. August, s. 1669-1674.*
- Adams, G. D. J. (1991). "Freeze-drying of Biological Materials" *Drying Technology* 9(4): 891-925.
- Alves-Filho, O., Strømmen, I. (1995). "The application of heat pump in drying of biomaterials" *Bidrag til Drying Technology.*
- Ananta, E., Volkert, M., Knorr, D. (2005). "Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG". *International Dairy Journal.* 15: 399-409.
- Beaudry, C., Raghavan, G.S.V., Rennie, T.J. (2003). "Microwave Finish Drying of Osmotically Dehydrated Cranberries" *Drying Technology.* 21 (9): 1797-1810.
- Bell, L.N, Labuza, T.P. (2000). *Moisture Sorption - Practical Aspects of Isotherm Measurement and Use,* American Association of Cereal Chemists Inc. 2<sup>nd</sup> edition.
- Bjålie, Jan G., Haug, Egil, Sand, Olav, Sjaastad, Øystein V. (2004). *Menneskekroppen – Fysiologi og anatomi.* Gyldendal Akademisk forlag, 6. opplag, Oslo.
- Bolland, Olav (1994). *Tørketeknikk,* s. 273-350. Kompendium i Næringsmiddelteknologi, NTNU.
- Boza, Y., Barbin, D., Scamparini, A.R.P (2004). "Effect of spray-drying on the quality of encapsulated cells of *Beijerinckia* sp". *Process Biochemistry.* 39: 1275-1284.
- Celiker, H., Kisakürek, B. (1984). "Progress in freeze-drying" *Drying,* 95-98.
- Desmond, C., Ross, R.P, O'Callaghan, E., Fitzgerald, G., Stanton, C (2002). "Improved survival of *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 in spray-dried powders containing gum acacia". *Journal of Applied Microbiology.* 93:1003-1011.
- Di Matteo, P., Donsi G., Ferrari G. (2003). "The role of heat and mass transfer phenomena in atmospheric freeze-drying of foods in a fluidised bed" *Journal of Food Engineering,* 59: 267-275.
- Fellows, P.J. (2000). *Food Processing Technology – principles and practice,* CRC Press, 2<sup>nd</sup> edition, Cambridge, England.
- Femina, A. M. J. Bestard, N. Sanjuan, C. Rosselló and A. Mule (2000). "Effect of rehydration temperature on the cell wall components of broccoli (*Brassica oleracea* L. Var. *italica*) plant tissues" *Journal of Food Engineering,* 46 (3); 157-163.
- Ferreira, V, Soares, V, Santos, C, Silva, J, Gibbs, P.A, Teixeira, P (2005). "Survival of *Lactobacillus sakei* during heating, drying and storage in the dried state when growth has occurred in the presence of sucrose or monosodium glutamate". *Biotechnology Letters.* 27: 249-252.
- Indergård, Erlend (1998). "Tørking og overlevelse av melkesyre bakterier". Hovedoppgave ved Fakultet fro Kjemi og Biologi, NTNU.
- Kheirilomoom, A., Satpathy, G.R., Török, Z. Banerjee, M., Bali, R., Novaes, R.C., Little, E., Manning, D.M, Dwyre, D.M., Tablin, F., Crowe, J.H., Tsvetkova, N.M. (2005). "Phospholipid vesicles increase the survival of freeze-dried human red blood cells". *Cryobiology.* 51: 290-305.
- Kramer, K., Song, X., Stene, J., Strømmen, I (1994). *Bruk av varmepumpe i tørkesammenheng. Vakuumpfrysing.* s. 375-404. Kompendium i Næringsmiddelteknologi, NTNU.

- Labuza, T.P, Le Roux, J.P, Fan, T.S, Tannenbaum, S.R (1970). "Engineering Factors in Single-Cell Protein Production. II. Spray Drying and Cell Viability". *Biotechnology and bioengineering. XII*; 135-140.
- Lee, K.T., Farid, M., Nguang, S.K. (2006). "The mathematical modelling of the rehydration characteristics of fruits" *Journal of Food Engineering*, 72: 16-23.
- Lewicki, Piotr P. (1998). "Some remarks on Rehydration of Dried Foods" *Journal of Food Engineering*, 36: 81-87.
- Li, B.G., Hua, T.C., Shu, S.Q., Xiao, H.H., Yan, Y. (2002) "Study on Freeze-Drying of Liposome and Retention Rate of Entrapped Pharmaceuticals" *Proceedings of the 13<sup>th</sup> International Drying Symposium (IDS'2002)*, Beijing, Kina, 27.-30. August, Vol. A, pp:724-731.
- Lian, W.C, Hsiao, H.C, Chou, C.C (2002). "Survival of bifidobacteria after spray-drying". *International Journal of Food Microbiology*. 74: 79-86.
- Lievens, L.C., van't Riet, K. (1993). "Convective Drying of Bacteria I. The Drying Process". *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 50: 45-63.
- Lievens, L.C, van't Riet, K. (1994). "Convective Drying of Bacteria II. Factors Influencing Survival" *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 51:71-89.
- Linders, L.J.M., Kets, E.P.W., de Bont, J.A.M., van't Riet, K. (1998). "Combined Influence of Growth and Drying Conditions on the Activity of Dried *Lactobacillus plantarum*" *Biotechnology Progress*. 14 (3): 537-539.
- Lindmo, Tore et al (2004). *Medical Technology: Health Surveys and Biobanking*. A Foresight Analysis towards 2020, NTNU.
- Lu, L., Tang, J., Liang, L. (1998). "Moisture Distribution in Spherical Foods in Microwave Drying" *Drying Technology* 16 (3-5): 503-524.
- Luna-Solano, G., Salgado-Cervantes, M., García-Alvarado, M.A., Rodríguez-Jimenes, G. (1998). "Yeast viability dried by fluidized bed and spray drying". *Proceedings of the 11<sup>th</sup> International Drying Symposium, Halkidiki, Hellas, 19.-22. August, s. 1815-1821*.
- McLoughlin, C.M., McMinn, W.A.M., Magee, T.R.A. (2003). "Microwave-Vacuum Drying of Pharmaceutical Powders" *Drying Technology*. 21 (9): 1719-1733.
- Meryman, H. T. (1959). "Sublimation freeze drying without vacuum" *Science* (trykt utgave), 130: 628-629.
- Mille, Y., Obert, J.P, Beney, L., Gervais, P. (2004). "New Drying Process for Lactic Acid Bacteria Based on Their Dehydration Behavior in Liquid Medium" *Biotechnology and Bioengineering* 88 (1): 71-76.
- Mumenthaler, M. og Leuenberger, H. (1991). "Atmospheric spray-freeze drying: a suitable alternative in freeze-drying technology" *International Journal of Pharmaceutics*, 72: 97-110.
- NOU 2001:19, "Biobanker – Innhenting, oppbevaring, bruk og destruksjon av humant biologisk materiale", Sosial- og helsedepartementet.
- Okello, H.O, Brennan, J.G, Lewis, M.J, Gilmour, S (1998). "Optimisation of the Spray Drying of the Enzyme Polyphenol Oxidase by Response Surface Methodology". *Proceedings of the 11<sup>th</sup> International Drying Symposium, Halkidiki, Hellas, 19.-22. August, s. 1713-1722*.
- Perera, C.O. (1994). "Modified atmosphere heat pump drying of food products" s. 153-163. *Dehydration of Products of Biological Origin*. Science Publishers, Inc.
- Rindler, V., Lüneberger, S., Schwindke, P., Heschel, I., Rau, G. (1999). "Freeze-Drying of Red Blood Cells at Ultra-Low Temperatures". *Cryobiology*. 38:2-15.

Rindler, V., Heschel, I., Rau, G. (1999). "Freeze-Drying of Red Blood Cells: How Useful are Freeze/Thaw Experiments for Optimization of the Cooling Rate?" *Cryobiology*. 39: 228-235.

Roos, Y.H. (1995). *Phase Transitions in Foods*, Academic Press, Inc., San Diego, California.

Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Dranzow, M., Ragg, T. (2006). "The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements" *BMC Molecular Biology* 7 (3). (<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2199-7-3.pdf>)

Simpson, P.J, Stanton, C., Fitzgerald, G.F., Ross, R.P (2005). "Intrinsic tolerance of *Bifidobacterium* species to heat and oxygen and survival following spray drying and storage". *Journal of Applied Microbiology*. 99: 493-501.

Sjøvold, J. (2005). "Utvikling av ny metode for konservering av biobankmaterialer". Forprosjekt ved Institutt for Energi- og Prosessteknikk, NTNU.

Souzu, H. (1999). "Basic Aspects and Industrial Strategies for the Preservation of Microorganisms by Freezing and Drying". *Drugs and the Pharmaceutical Sciences – Freeze-Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products*. 96: 231-265.

Sowemimo-Coker, S.O, Goodrich, R.P, Zerez, C.R, Tanaka, K.R (1993). "Refrigerated storage of lyophilized and rehydrated, lyophilized human red cells". *Transfusion*. 33 (4): 322-329.

Strømmen, Ingvald (1994). *Avvanningsteknikk*, Kompendium i SIO 7060 Næringsmiddelteknologi.

Strømmen, I., Magnussen, O.M. (1994). "Heat Pump Drying of Bio-Materials". Bidrag til *Thermal processing of bio-materials*.

Török, Z., Satpathy, G.R., Banerjee, M., Bali, R., Little, E., Noaves, R., van Ly, H., Dwyre, D.M., Kheiolomoom, A., Tablin, F., Crowe, J.H., Tsvetkova, N.M. (2005). "Preservation of trehalose-Loaded Red Blood Cells by Lyophilization". *Cell Preservation Technology*. 3 (2): 96-111.

Wolkers, W., Walker, N.J., Tablin, F., Crowe, J.H. (2001). "Human Platelets Loaded with Trehalose Survive Freeze-Drying" *Cryobiology*. 42: 79-87.

Wolkers, W.F., Walker, N.J., Tamari, Y., Tablin, F., Crowe, J.H. (2003). "Towards a Clinical Application of Freeze-Dried Human Platelets". *Cell Preservation Technology* 1 (3): 175-188.

### **Internettsider**

Alumni: <http://www.alumni.ca/~mcgo4s0/t3/RNA.html>, (07.10.05)

Agilent Technologies: <http://www.chem.agilent.com/Scripts/PDS.asp?IPage=51>, (30.05.06)

Gensidene: <http://www.uib.no/aasland/gensidene/start.html>, (06.10.05)

Human Genome Project Information: [http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human\\_Genome/home.shtml](http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/home.shtml),  
[http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human\\_Genome/project/info.shtml](http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/project/info.shtml). (nov./des. 05)

NanoDrop. *Brukermanual*: <http://www.nanodrop.com/pdf/nd-1000-users-manual.pdf>, 12.05.06.

Store Norske Leksikon: melkesyrebakterier; <http://www.sn.no/article.html?id=675525>, 03.04.06: gjærsopp;  
<http://www.sn.no/article.html?id=566740>, 03.04.06: vev;  
<http://www.sn.no/article.html?id=798049&o=1&search=vev>, 21.05.06.

### **Annet**

Helge, Eli: Avdelingsingeniør, St. Olavs Hospital, *Personlige meddelelser*. Samtaler og e-postveksling gjennom høst 2005 og vår 2006.



## Vedlegg A: Prosedyrer

### A.1 *Forsøksplan*

**Tørkeforsøk:** Det skal gjennomføres tørkeforsøk ved frysetørking (-10 °C) og ved plussgrader → +5 og +10 °C. For de nye tørketemperaturene må det gjennomføres testforsøk for å finne tørkekurven til rottelever her. Til sammen skal det utføres 8 tørkeforsøk: 2\* -10 °C, 3\* +5 °C og 3\* +10 °C. Forsøkene fordeler seg utover semesteret og koordineres med SINTEF.

- **Lagringsforsøk:** Det er interessant å se hva som skjer med det tørkede materialet når det er lagret over tid. Fire parametere skiller seg ut som aktuelle å sjekke/vurdere: **vanninnhold** i prøven som lagres, **tørketemperatur**, **lagringstemperatur** og **lagringstid**. Disse vil si noe om hva som gir best lagring for å unngå degradering av RNA/DNA. Lagringsforsøk må derfor utføres etter følgende:
  - Tørketemperatur: Tørker ved -10 °C, +5 °C og +10 °C.
  - Vanninnhold: For at ikke forsøksmatrisen skal bli for stor og uoversiktlig, blir det bare tatt ut prøver som har ligget lengst i tørka til lagringsforsøk.
  - Lagringstemperatur: Prøver med ulikt vanninnhold lagres ved romtemperatur (ca 20 °C), kjøleskapstemperatur (+4 °C), i vanlig fryser (-20 °C) og i flytende nitrogen (-196 °C). Prøvene kan da ligge i de vanlige cryorørene.
  - Lagringstid: Man bør vite hvordan materialet er når det blir lagt til lagring for så å kunne si om degradering har inntruffet. Derfor bør prøver testes ved t=0. Så kan prøvene lagres i lengre periode, muligens med ett uttak i perioden. Prøvene ligger fra uttak og så lenge det lar seg gjøre før fristen til innlevering av masteroppgaven går ut. Det blir tatt ut enda et sett med prøver som ligger et års tid, men som da faller utenfor denne oppgaven.
- **Testparametere** for å sjekke grad av brukbarhet på tørkemethoden: RNA- og DNA-kvalitet. Lipidundersøkelse og det vil bli gjennomført en elektronmikroskopisk (EM) undersøkelse for å sjekke morfologien. Det blir gjennomført to tørke-paralleller, og to eller tre analyseparalleller for hvert prøveuttak.
- God **kommunikasjon** med SINTEF, som også bruker tørka, for å avtale tid og fordeling av bruken, og med Eli Helge + Jostein Halgunset for å passe på at prøver er klare til henting når de trengs.
- **Logistikk:** Prøver hentes ved St. Olavs Hospital på morfologiavdelingen og fraktes til Gløshøyen i termos med flytende nitrogen. Likeledes blir tørkede prøver fraktet tilbake på samme måte. All lagring av prøver kan ligge i lokalene til Varmeteknisk, men lagring ved -196 °C må foregå på St. Olavs Hospital. Prøvene for langtidslagring fraktes til St. Olav mot slutten av semesteret for oppbevaring der.



## A.2 Rengjøringsprosedyre

(Prosedyre tildelt av Eli Helge)

### **Rengjøring av utstyr som brukes i materiale til RNA-isolering**

Utstyr som har vært i kontakt med biologisk materiale:

Vaskes i såpe og vann

Rengjøres i 70 % alkohol

Skylls grundig i Rnasefritt vann (f.eks sterilt vann på flaske)

La tørke

Dersom utstyret er laget av et materiale som tåler det, bak ved 250 °C i 12 timer

Hvis materialet ikke tåler denne temperaturen, eller det er praktisk vanskelig, spray på RnaseZap. La det virke i 2-3 minutter. Tørk av. Skyll grundig i Rnasefritt vann.

La tørke

Oppbevares i rene plastposer eller dekket til

Etter rengjøring må utstyret ikke berøres uten hansker.

*Alt* som materialet kommer i kontakt med skal være så Rnasefritt som mulig.

Rengjøring av benker og andre flater:

Vask rent med såpe og vann

Tørk over med sterilt vann

Spray på RnaseZap

La virke i 2-3 minutter

Skyll med Rnasefritt vann

Tørk av

RnaseZap oppbevares i romtemperatur.

## Vedlegg B: Forsøksresultater

Her blir resultatene fra tørkeforsøkene og laboratorieanalyser presentert med nøyaktige tallverdier. Suppler gjerne med grafene gjengitt i kapittel 5.

### B.1 Tørkekurver

**Tabell 8** Tørkekurve -10 °C.  $A_w$  fra AquaLab.

Tid [h]	Vanninnhold [%]	Vannaktivitet
0	70,83	0,952
1	66,99	0,942
2	66,67	0,942
3	64,41	0,939
4	61,70	0,932
5	41,67	0,834
6	54,39	0,941
7	54,39	0,931
24	26,32	0,684
25	8,70	0,403
26	28,95	0,737
27	28,57	0,695
28	26,09	0,600
29	24,32	0,487
30	28,00	0,606
31,5	27,27	0,641
47,5	15,79	0,342
51	11,76	0,297
52	15,00	0,325
54	15,38	0,347

**Tabell 9** Tørkekurve +5 °C.  $A_w$  fra AquaLab.

Tid [h]	Vanninnhold [%]	Vannaktivitet
0	75,08	0,929
1	56,73	0,961
2	48,28	0,890
3	41,41	0,861
5	33,89	0,817
6	18,13	0,456
7	13,54	0,296
24,5	7,93	0,094

**Tabell 10** Tørkekurve +10 °C.  $A_w$  fra AquaLab.

Tid [h]	Vanninnhold [%]	Vannaktivitet
0	70,17	0,931
1	62,33	0,928
2	55,00	0,924
3	52,42	0,920
4	43,32	0,857
5	43,17	0,855
23	10,95	0,276

## B.2 Sorpsjonsdata

Sorpsjonsdata fra isotermmålinger i *Cisorp*.

**Tabell 11** Tørketemp. -10 °C

% vanninnhold	$a_w$
15,000	0,050
15,401	0,100
16,384	0,200
17,044	0,300
17,717	0,400
19,186	0,500
21,650	0,600
24,096	0,701
26,155	0,762
28,662	0,813
27,348	0,774
25,282	0,705
22,830	0,606
21,161	0,500
20,163	0,429
18,674	0,300
17,486	0,200
16,112	0,100
15,168	0,050

**Tabell 12** Tørketemp. +5 °C

% vanninnhold	$a_w$
11,000	0,034
11,018	0,100
11,077	0,200
11,275	0,300
11,795	0,400
12,666	0,500
14,892	0,600
19,270	0,700
24,100	0,783
26,280	0,809
35,454	0,786
20,716	0,700
17,328	0,600
15,815	0,500
14,345	0,400
13,363	0,300
12,846	0,200
11,961	0,100
11,768	0,040

**Tabell 13** Tørketemp. +10 °C.

% vanninnhold	$a_w$
8,000	0,034
8,022	0,100
8,157	0,200
8,461	0,300
9,133	0,400
10,266	0,500
12,695	0,600
16,394	0,700
20,506	0,783
22,389	0,809
21,480	0,786
17,295	0,700
14,253	0,600
12,365	0,500
11,034	0,400
10,072	0,300
9,500	0,200
8,692	0,100
8,372	0,040

## B.3 DNA-data

**Tabell 14** Tørket ved -10 °C.

Prøvenavn	Vanninnhold [%]	Konsentrasjon [ng/ $\mu$ l]	260/280-ratio
Ktr.	69	197,50	2,00
Ktr.	69	192,08	2,01
Ktr.	69	193,42	2,01
1.1	56	152,77	1,99
1.1	56	142,12	2,00
2.1	56	169,21	1,97
2.1	56	161,10	2,01
1.2	50	165,84	2,03
1.2	50	156,12	1,98
2.2	50	134,77	1,97
2.2	50	141,84	2,01
1.3	17	114,56	1,96
1.3	17	109,21	1,95
2.3	17	97,65	1,92
2.3	17	103,81	2,03
1.4	10	208,70	2,01
1.4	10	196,46	2,01
2.4	10	85,49	1,95
2.4	10	73,14	1,97

**Tabell 15** Tørket ved +5 °C.

Prøvenavn	Vanninnhold [%]	Konsentrasjon [ng/μl]	260/280-ratio
Ktr.	71	188,33	2,03
Ktr.	71	193,74	2,06
1.1	50	184,87	2,07
1.1	50	174,99	2,08
2.1	50	119,23	2,07
2.1	50	93,92	2,05
1.2	25	317,4	2,08
1.2	25	92,81	2,02
2.2	25	85,92	2,00
2.2	25	95,99	2,07
1.3	9	75,59	2,00
1.3	9	117,53	2,02
2.3	9	132,81	2,08
2.3	9	139,47	2,04

**Tabell 16** Tørket ved +10 °C.

Prøvenavn	Vanninnhold [%]	Konsentrasjon [ng/μl]	260/280-ratio
Ktr.	69	197,50	2,00
Ktr.	69	192,08	2,01
Ktr.	69	193,42	2,01
1.1	56	152,77	1,99
1.1	56	142,12	2,00
2.1	56	169,21	1,97
2.1	56	161,10	2,01
1.2	50	165,84	2,03
1.2	50	156,12	1,98
2.2	50	134,77	1,97
2.2	50	141,84	2,01
1.3	17	114,56	1,96
1.3	17	109,21	1,95
2.3	17	97,65	1,92
2.3	17	103,81	2,03
1.4	10	208,70	2,01
1.4	10	196,46	2,01
2.4	10	85,49	1,95
2.4	10	73,14	1,97

**B.4 RNA-data****Tabell 17** Tørket ved -10 °C.

Prøvenavn	Tørketid [h]	Vanninnhold [%]	Konsentrasjon [ng/µl]	260/280-ratio	260/230-ratio	RIN-faktor
Ktr.	0	69	34,27	1,97	1,26	6,60
Ktr.	0	69	21,10	1,81	1,03	6,90
Ktr.	0	69	18,82	1,80	1,07	6,10
1.1	5	56	37,69	1,91	1,29	7,00
1.1	5	56	52,01	1,96	1,58	6,70
2.1	5	56	18,20	1,82	1,03	N/A
2.1	5	56	17,34	1,78	0,98	3,00
1.2	10	50	65,93	2,07	1,78	6,30
1.2	10	50	105,43	2,12	2,00	3,50
2.2	10	50	23,17	1,76	1,08	4,70
2.2	10	50	24,79	1,84	1,13	4,20
1.3	25	17	68,61	2,06	1,82	3,30
1.3	25	17	74,15	2,08	1,67	4,40
2.3	25	17	23,18	1,90	1,08	4,20
2.3	25	17	17,48	1,87	1,26	5,20
1.4	50	10	144,03	2,11	1,94	6,40
1.4	50	10	59,27	2,01	1,53	5,30
2.4	50	10	18,41	1,91	1,26	5,30
2.4	50	10	16,54	1,86	1,38	4,80

**Tabell 18** Tørket ved +5 °C.

Prøvenavn	Tørketid [h]	Vanninnhold [%]	Konsentrasjon [ng/µl]	260/280-ratio	260/230-ratio	RIN-faktor
Ktr.	0	71	48,08	2,01	1,37	8,00
Ktr.	0	71	46,32	2,12	1,36	8,00
Ktr.	0	71	42,79	2,05	1,29	8,00
1.1	3	50	44,69	2,06	1,43	8,00
1.1	3	50	37,11	2,01	1,29	7,80
1.1	3	50	147,60	2,13	1,94	8,30
1.1	3	50	158,56	2,12	1,93	8,20
1.2	7	25	32,20	2,09	1,27	7,90
1.2	7	25	33,42	2,16	1,29	8,40
1.2	7	25	35,95	2,05	1,31	7,60
1.2	7	25	22,63	2,20	1,41	8,00
1.3	24	9	27,78	2,02	1,21	7,80
1.3	24	9	24,16	2,25	1,18	*
1.3	24	9	23,13	2,15	1,33	7,80
1.3	24	9	22,74	2,16	1,45	7,60

**Tabell 19** Tørket ved +10 °C.

Prøvenavn	Tørketid [h]	Vanninnhold [%]	Konsentrasjon [ng/µl]	260/280 ratio	260/230 ratio	RIN-faktor
Ktr.	0	70	48,08	2,01	1,37	8,00
Ktr.	0	70	46,32	2,12	1,36	8,00
Ktr.	0	70	42,79	2,05	1,29	8,00
1.1	3	45	35,34	2,03	1,25	7,30
1.1	3	45	44,34	1,98	1,30	7,00
2.1	3	45	82,60	2,08	1,62	5,10
2.1	3	45	73,98	2,04	1,58	5,30
1.2	6	25	29,24	2,11	1,08	6,90
1.2	6	25	28,52	1,97	1,16	7,30
2.2	6	25	73,60	2,04	1,63	5,40
2.2	6	25	45,65	2,05	1,36	3,10
1.3	23	11	52,29	2,00	1,38	7,30
1.3	23	11	33,30	2,16	1,21	6,20
2.3	23	11	46,35	2,10	1,49	4,20
2.3	23	11	64,40	2,03	1,57	5,30

### B.5 *DNA-data fra lagrede prøver*

**Tabell 20** DNA - lagrede prøver.

Tørketemp. [°C]	Lagringstemp.	Konsentrasjon [ng/µl]	260/280-ratio
Ingen – Ktr. 30 mg	Ktr	54,41	1,98
Ingen – Ktr. 30 mg	Ktf	54,24	2,00
Ingen – Ktr. 30 mg	Ktr.	91,61	2,00
10	Romtemp.	157,79	2,00
10	Romtemp.	128,97	1,95
5	Romtemp.	277,49	2,01
5	Romtemp.	203,35	2,00
-10	Romtemp.	135,58	1,98
-10	Romtemp.	173,18	1,97
10	4 °C	192,46	1,99
10	4 °C	398,57	2,03
5	4 °C	327,01	2,03
5	4 °C	103,29	1,95
-10	4 °C	131,46	1,98
-10	4 °C	106,30	1,95
10	-20 °C	220,58	2,00
10	-20 °C	179,12	1,98
5	-20 °C	169,84	1,99
5	-20 °C	181,94	1,99
-10	-20 °C	211,95	2,07
-10	-20 °C	150,54	1,99
10	Liq. N <sub>2</sub>	142,70	1,99
10	Liq. N <sub>2</sub>	191,48	2,01
5	Liq. N <sub>2</sub>	292,56	2,03
5	Liq. N <sub>2</sub>	142,83	1,97
-10	Liq. N <sub>2</sub>	111,67	1,95
-10	Liq. N <sub>2</sub>	130,66	1,94

**B.6 RNA-data fra lagrede prøver****Tabell 21** RNA - lagrede prøver.

Tørketemp.	Lagringstemp	Vanninnhold [%]	Konsentrasjon [ng/μl]	260/280ratio	260/230-ratio	RIN
Ktr. 30 mg	Ktr.	70	12,65	2,35	1,18	7,40
Ktr. 30 mg	Ktr.	70	10,43	2,38	1,06	-
Ktr. 30 mg	Ktr.	70	10,08	2,16	0,99	-
10	Romtemp.	11	44,36	2,04	1,40	4,00
10	Romtemp.	11	20,2	1,96	1,06	3,80
5	Romtemp.	9	24,72	1,95	1,08	4,60
5	Romtemp.	9	30,89	2,01	1,28	3,80
-10	Romtemp.	10	18,11	2,07	0,99	N/A
-10	Romtemp.	10	20,01	2,05	1,06	5,20
10	4 °C	11	37,75	2,04	1,53	7,10
10	4 °C	11	48,78	2,03	1,53	7,20
5	4 °C	9	34,08	2,08	1,05	7,20
5	4 °C	9	97,24	2,08	1,77	7,00
-10	4 °C	10	23,94	1,95	1,15	7,10
-10	4 °C	10	163,37	2,11	1,89	7,60
10	-20 °C	11	89,03	2,08	1,74	7,10
10	-20 °C	11	22,5	2,08	1,29	7,20
5	-20 °C	9	22,03	2,06	1,28	7,20
5	-20 °C	9	31,09	2,11	1,41	7,40
-10	-20 °C	10	19,13	2,29	1,09	8,80
-10	-20 °C	10	17,67	2,20	1,04	8,10
10	Liq. N <sub>2</sub>	11	23,01	2,00	1,10	8,70
10	Liq. N <sub>2</sub>	11	22,82	1,94	1,13	7,80
5	Liq. N <sub>2</sub>	9	31,32	2,04	1,27	8,00
5	Liq. N <sub>2</sub>	9	37,43	2,06	1,43	8,50
-10	Liq. N <sub>2</sub>	10	16,4	2,12	1,11	8,80
-10	Liq. N <sub>2</sub>	10	17,34	2,12	1,17	8,70

## B.7 Lipid-data

**Tabell 22** Tørkede prøver.

Prøvenavn	Tørketemp. [°C]	Tørketid [h]	Protein [mg/mL]	Konsentrasjon 1. parallell [uM]	Konsentrasjon 2. parallell [uM]	Kons. peroksidert lipid/mg protein
Negativ kontroll	-	0	3,67	1,206	4,200	1,114
Positiv kontroll	-	0	1,97	8,260	7,610	4,024
1.1	10	3	1,67	1,280	1,370	0,793
1.2	10	6	3,60	1,324	0,599	0,128
1.3	10	23	3,18	1,330	1,132	0,387
2.1	10	3	4,14	1,879	2,893	0,576
2.2	10	6	N/A	N/A	N/A	N/A
2.3	10	23	6,94	4,759	5,734	0,756
1.1	5	3	3,34	0,963	1,177	0,320
1.2	5	7	3,08	1,574	1,561	0,509
1.3	5	24	3,15	1,769	1,964	0,593
2.1	5	3	6,79	4,375	5,714	0,743
2.2	5	7	3,06	2,139	1,899	0,660
2.3	5	24	3,47	2,458	2,490	0,713
1.1	-10	5	2,70	2,588	2,770	0,992
1.2	-10	10	3,56	3,368	3,894	1,020
1.3	-10	25	7,89	9,757	10,992	1,315
1.4	-10	50	4,71	4,323	4,811	0,970
2.1	-10	5	1,54	4,557	5,331	3,210
2.2	-10	10	4,09	5,526	6,813	1,508
2.3	-10	25	3,61	5,331	5,526	1,504
2.4	-10	50	4,42	4,863	4,525	1,062

**Tabell 23** Tørkede og lagrede prøver.

Prøvenavn	Tørketemp. [°C]	Lagringstemp.	Protein [mg/mL]	Konsentrasjon 1. parallell [uM]	Konsentrasjon 2. parallell [uM]	Kons. peroksidert lipid/mg protein
1	10	Romtemp.	2,90	3,329	3,810	1,23
2	5	Romtemp.	2,33	3,446	3,660	1,52
3	-10	Romtemp.	1,36	3,634	4,323	2,93
4	10	4 °C	1,53	3,907	4,674	2,80
5	5	4 °C	1,64	4,642	5,318	3,04
6	-10	4 °C	1,79	4,583	4,759	2,61
7	10	-20 °C	1,54	3,212	3,062	2,04
8	5	-20 °C	1,19	0,051	1,392	0,61
9	-10	-20 °C	3,69	4,135	4,408	1,16
10	10	Liq. N <sub>2</sub>	6,96	5,316	6,286	0,83
11	5	Liq. N <sub>2</sub>	7,88	8,256	8,613	1,07
12	-10	Liq. N <sub>2</sub>	4,93	5,747	4,882	1,08



**Program for industriell økologi (IndEcol)** er et tverrfaglig universitetsprogram etablert i 1998 for en periode på minst ti år ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU). Programmet omfatter et studieprogram opprettet i 1999 og et stort antall doktorgradsprosjekter og forskningsprosjekter rettet mot vareproduserende industri, energi- og byggesektoren. Tverrfaglig forskning og undervisning står sentralt ved IndEcol, og målet er å knytte sammen teknologiske, naturvitenskapelige og samfunnsvitenskapelige bidrag i letingen etter bærekraftige løsninger på produksjon og forbruk av energi og ressurser.

**The Industrial Ecology Programme (IndEcol)** is a multidisciplinary university programme established at the Norwegian University of Science and Technology (NTNU) in 1998 for a period of minimum ten years. It includes a comprehensive educational curriculum launched in 1999 and a significant number of doctoral students as well as research projects geared towards Norwegian manufacturing, energy and building industries. The activities at IndEcol have a strong attention to interdisciplinary research and teaching, bridging technology, natural and social sciences in the search for sustainable solutions for production and consumption of energy and resources.



NTNU-IndEcol  
Industrial Ecology Programme  
NO-7491 Trondheim

Tel.: + 47 73 59 89 40  
Fax: + 47 73 59 89 43  
E-mail: [indecoll@indecoll.ntnu.no](mailto:indecoll@indecoll.ntnu.no)  
Web: [www.indecoll.ntnu.no](http://www.indecoll.ntnu.no)