

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Lebensmittelverfahrenstechnik und Molkereitechnologie

**Bedeutung der Verfahrenstechnik und des Glaszustands für die Stabilität von  
Mikroorganismen während der Lyophilisation und der Lagerung**

**Bettina Higl**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landwirtschaft und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktor-Ingenieurs

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. K. Sommer

Prüfer der Disseration:

1. Univ.-Prof. Dr. U. Kulozik

2. Univ.-Prof. Dr. H. Nirschl,  
Universität Karlsruhe (TH)

Die Dissertation wurde am 16.05.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 08.07.2008 angenommen.

## **VORWORT**

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Juli 2003 bis Dezember 2007 während meiner Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Lebensmittelverfahrenstechnik und Molkereitechnologie der TU München unter der Leitung von Herrn Professor. Dr.-Ing. Ulrich Kulozik.

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr.-Ing. Ulrich Kulozik für die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Arbeit, für seine wertvollen Ratschläge und für die Unterstützung, die er mir bei der Durchführung der Arbeit zuteil werden ließ. Auch dem Zweitprüfer Herrn Professor Dr.-Ing. Hermann Nirschl sowie dem Prüfungsvorsitzenden Herrn Professor Dr.-Ing. Karl Sommer danke ich für die Übernahme des jeweiligen Amtes.

Ein großes Dankeschön geht an Frau Dr.-Ing. Petra Först. Sie war der perfekte Diskussionspartner bei allen theoretischen und experimentellen Überlegungen. Ihre Unterstützung, ihr stetes Interesse und ihre kritischen Anregungen waren beispielhaft und haben sowohl diese Arbeit als auch mich selbst geprägt.

Für ihr eindrucksvolles Engagement und ihre Motivation bei der praktischen Durchführung der Experimente möchte ich Maria Muranyi, Simon Bauer, Karin Karasch, Marianne Holzmann, Bettina Geiler, Marina Hahn und Karin Karasch sowie den Studenten Tobias Reitmaier, Veronika Kaufmann, Claudia Fiebig, Nadine Eichinger, Jennifer Ratjen und Kathrin Reisenwedel danken. Ich hoffe, jeder findet sich in der Arbeit wieder.

Insbesondere möchte ich meinen ehemaligen Bürokollegen Chalat Santivarangkna und Martin Heinrich für die angenehme Atmosphäre in unserem Büro danken. Den Jungs von der Werkstatt, Christian Ederer, Franz Fraunhofer und Erich Schneider, danke ich für die technische Unterstützung sowie für die musikalischen Pausen, die sich immer sehr positiv auf meine wissenschaftliche Kreativität und Motivation ausgewirkt haben. Ein besonderer Dank geht auch an Sabine Becker, Friederike Schöpflin und Birgit Weber, die mich bei allen administrativen Aufgaben unterstützt haben. Außerdem danke ich allen Kollegen des Lehrstuhls für die vorherrschende freundliche und kollegiale Atmosphäre.

Last but not least möchte ich an dieser Stelle ganz herzlich meiner Mutter Barbara Higl und ihrem Lebensgefährten Gerhard Kruckenberg für ihre liebevolle Unterstützung in allen Lebenslagen danken. Bei ihnen finde ich stets ein offenes und geduldiges Ohr sowie bestärkenden Zuspruch, der mir immer wieder Mut und Auftrieb für mein gesamtes Handeln gibt.

Für meine Mutter



**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>I</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>IV</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>2 GRUNDLAGEN</b> .....	<b>4</b>
2.1 Hydrierung von Zellmembran und Proteinen von Bakterien .....	4
2.2 Gefriertrocknung .....	7
2.2.1 Gefrieren.....	9
2.2.2 Wasserentfernung.....	15
2.3 Glaszustand .....	18
2.4 Schutzmechanismen von Biomolekülen .....	23
2.4.1 Preferential Hydration, Preferential Binding .....	23
2.4.2 Water Replacement .....	25
2.4.3 Stabilisierungspotential einer Matrix im Glaszustand .....	27
<b>3 AKTUELLER STAND DES WISSENS</b> .....	<b>28</b>
3.1 Einflussfaktoren auf die Stabilität von Mikroorganismen beim Gefrieren .....	28
3.2 Gefriertrocknung von Mikroorganismen .....	32
3.3 Lagerung von getrockneten Mikroorganismenpräparationen .....	35
3.4 Glaszustand als Stabilitätskriterium für biologische Systeme .....	36
<b>4 ZIELSETZUNG UND LÖSUNGSWEG</b> .....	<b>39</b>
<b>5 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>43</b>
5.1 Material .....	43
5.1.1 Modellmikroorganismus .....	43
5.1.2 Chemikalien und Geräte.....	44
5.2 Verfahrenstechnische Methoden .....	44
5.2.1 Anzucht der Mikroorganismen und Herstellung aufgereinigter Zellsuspensionen..	46
5.2.2 Gefrieren und Lyophilisation .....	50
5.2.3 Lagerung.....	55
5.3 Analysen.....	57
5.3.1 Thermische Analyse.....	57
5.3.2 Produkttemperaturmessung während des Gefrierens und der Gefriertrocknung .....	61

5.3.3	Restwassergehalt ( $X$ ) und prozentualer Masseverlust ( $M$ ) .....	62
5.3.4	Wasseraktivität .....	63
5.3.5	Ermittlung von Sorptionsisothermen .....	63
5.3.6	Bestimmung der Überlebensrate nach der Trocknung und Lagerung.....	63
5.3.7	Formale Reaktionskinetik und Statistik .....	65
<b>6</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....</b>	<b>68</b>
6.1	Gefrieren von Mikroorganismenpräparationen.....	68
6.1.1	Gefrierkurven einer wässrigen Laktoselösung sowie von Zellsuspensionen mit unterschiedlichen Formulierungen.....	69
6.1.2	Einfluss der Kühlrate und der Gefriertemperatur auf die Überlebensrate von <i>Lb. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> .....	78
6.1.3	Zeitlicher Verlauf der Überlebensrate von <i>Lb. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> im gefrorenen Zustand bei Einsatz unterschiedlicher Schutzstoffe .....	80
6.1.4	Diskussion der Prozesseinflüsse des Gefrierens auf die Überlebensrate der Zellen mit und ohne Schutzstoffe.....	82
6.2	Gefriertrocknung von Mikroorganismenpräparationen .....	85
6.2.1	Trocknungsverlauf und Überlebensrate für <i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> ohne Schutzstoffe für verschiedene Prozessbedingungen.....	85
6.2.2	Diskussion und Modellierung der Einflüsse verfahrenstechnischer Bedingungen auf die Überlebensrate der Zellen in einer Matrix ohne Schutzstoffe.....	94
6.2.3	Phasenzustandsdiagramm und Trocknungsverlauf von <i>Lb. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> in einer Laktosematrix.....	103
6.2.4	Überlebensrate von <i>Lb. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> mit Laktose für unterschiedliche Trocknungsbedingungen.....	119
6.2.5	Diskussion der Bedeutung des Glaszustands und Einfluss der Prozessbedingungen $T_p > T_g$ und $T_p \leq T_g$ .....	121
6.2.6	Überlebensrate in Abhängigkeit vom Restwassergehalt für verschiedene Trocknungsbedingungen und verschiedene Formulierungen .....	125
6.2.7	Diskussion des Schutzpotentials unterschiedlicher Schutzstoffe und Konzentrationen .....	131
6.3	Lagerung von gefriergetrockneten Mikroorganismen in einer Laktose- und einer Trehalosematrix bei Bedingungen $T > T_g$ und $T < T_g$ .....	134
6.3.1	Sorptionsisothermen $X(a_w)$ und Zustandsdiagramm $T_g(a_w)$ für getrocknete Mikroorganismenpräparationen in einer Laktosematrix.....	134

---

6.3.2	Überlebensrate von <i>Lb. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> in einer Laktosematrix während der Lagerung im Glaszustand und im Nicht-Glaszustand.....	140
6.3.3	Diskussion der Bedeutung von Lagerbedingungen im Glaszustand und im Nicht-Glaszustand.....	144
6.3.4	Lagerung der Zellen in einer Trehalosematrix.....	154
<b>7</b>	<b>SCHLUSSFOLGERUNG.....</b>	<b>157</b>
<b>8</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>162</b>
<b>9</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>166</b>
<b>10</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>169</b>
<b>11</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>180</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

### *Lateinische Formelzeichen*

$A$	$m^2$	Fläche
$a_w$	-	Wasseraktivität
$b$	s	molekularer Bewegungsbeiwert
$C_P$	$\text{kJ}/(\text{kg}\cdot\text{K})$	Wärmekapazität bei konstantem Druck
$C_V$	$\text{kJ}/(\text{kg}\cdot\text{K})$	Wärmekapazität bei konstantem Volumen
$c$	%, g/ml	Feststoffkonzentration
$c_g'$	%	Feststoffkonzentration der maximal gefrierkonzentrierten Lösung bei $T_g'$
$D$	$m^2/s$	Diffusionskoeffizient
$d$	m	Durchmesser
$E_a$	$\text{kJ}/\text{mol}$	Aktivierungsenergie
$f$	-	Anteil der eisfreien oder gefrorenen Schicht
$G$	J	Gibbs Energie
$H$	$\text{J}/\text{g}$	Enthalpie
$k_{T,aw}$	$\text{d}^{-1}$	Reaktionsgeschwindigkeitskonstante bei der Temperatur $T$ und Wasseraktivität $a_w$
$k_g$	-	Verhältnis aus den Wärmekapazitätsänderungen der reinen Substanzen am Glasübergang
$k_T$	$\text{h}^{-1}$	Geschwindigkeitskonstante bei Temperatur $T$
$l$	m	Länge
$M$	%	Prozentualer Masseverlust bezogen auf Produktmasse vor der Trocknung
$m$	kg	Masse
$N$	$\text{kbE}/\text{ml}$	Keimzahl
$N_0$	$\text{kbE}/\text{ml}$	Keimzahl der konzentrierten und aufgereinigten Zellsuspension
$n$	-	Reaktionsordnung
$OD$	-	Optische Dichte, Absorption des Lichtes von $\lambda=600\text{nm}$
$p$	Pa	Druck



$p_K$	Pa	Kammerdruck
$q$	W/g	spezifischer Wärmestrom
$r$	m	Radius
$S$	%, -	Überlebensrate
$SA_x$		Standardabweichung der Größe $x$
$s$	m	Schichtdicke
$T$	°C	Temperatur
$T_g$	°C	Glasübergangstemperatur
$T_g'$	°C	Glasübergangstemperatur der maximal gefrierkonzentrierten Lösung
$T_K$	°C	Temperatur des Eiskondensators
$T_R$	°C	Referenztemperatur Williams-Landel-Ferry
$T_S$	°C	Kristallisationstemperatur/Lösungstemperatur der gelösten Substanz
$t$	h, d	Zeit
$V$	m <sup>3</sup>	Volumen
$W$	J	Arbeit
$X$	%	Restwassergehalt

*Abkürzungen*

ATP	Adenosinriphosphat
cfu	Colony Forming Units (vgl. kbE)
CNRZ	Centre National de Recherches Zootechniques, Jouy-en-Josas, France
kbE	Koloniebildende Einheiten
L	Laktose
<i>Lb.</i>	Lactobacillus
MRS	de Man - Rogosa – Sharp, Nährmedium
NFSM	non fat skim milk
PBS	Phosphatpufferlösung
PEG	Polyethylenglykol

---

RZB	Radiale Zentrifugalbeschleunigung
T	Trehalose
UFW	nicht ausgefrorenes Wasser
WLF	Williams-Landel-Ferry

*Indizes*

A	Anfang
E	Ende
e	Eutektischer Punkt
ef	eisfrei
G	nach dem Gefrieren
L	nach der Lagerung
m	Schmelzen
T	nach der Trocknung
P	Produkt
rot	Rotationsbewegung
St	Stellfläche
Sub	Sublimation
TM	Trockenmasse
trans	Translationsbewegung
v	Verdampfung
vT	vor der Trocknung
W	Wasser

*Griechische Formelzeichen*

$\alpha$	$K^{-1}$	Volumtrischer Expansionskoeffizient
$\gamma$	-	Kopplungsfaktor
$\eta$	Pas	Viskosität
$\eta_0$	Pas	Viskosität für $(1/T \rightarrow 0)$
$\lambda$	nm	Wellenlänge
$\mu$	-	Widerstandsfaktor für die poröse Schicht
$\pi$	-	Kreiszahl

---

$\varphi$	-	Relative Luftfeuchtigkeit
<i>Konstanten</i>		
$C_1$	-	Universelle Konstante Williams-Landel-Ferry: 17,4
$C_2$	K	Universelle Konstante Williams-Landel-Ferry: 51,6 K
$g$	$\text{m/s}^2$	Gravitationskonstante $6,67428 \cdot 10^{-11} \text{ m}^3/(\text{kg} \cdot \text{s}^2)$
$k_B$	J/K	Boltzmannkonstante $1,381 \cdot 10^{-23}$
R	J/(mol·K)	Universelle Gaskonstante 8,314472
<i>Operatoren</i>		
d		Differential
$\Delta$		Differenz
e		Exponent
ln		natürlicher Logarithmus
log		dekadischer Logarithmus



## 1 EINLEITUNG

Biologische Prozesse werden zunehmend zur Herstellung und Veredelung hochwertiger Produkte eingesetzt. Das Potential von Bioprozessen besteht vor Allem in der Entwicklung neuer als auch umweltverträglicher Erzeugnisse und Verfahren. So kann eine Vielzahl von Produkten im Vergleich zu chemischen Prozessen mit niedrigerem Energieaufwand bei gleichzeitiger Reduktion von Abfall- und Nebenprodukten synthetisiert werden. Bei den biologischen Prozessen werden wesentliche funktionelle Eigenschaften lebender Organismen und deren zelluläre und subzelluläre Bestandteile genutzt. Die Zahl der einzelnen technischen Produktionsschritte wird zum Teil deutlich reduziert, denn die gesamte Synthese läuft in dem biologischen System „Mikroorganismus“ ab. Diese Methoden und Anwendungen werden auch unter dem Begriff „Weiße Biotechnologie“ als dritte Welle der Biotechnologie nach der „Roten“ und „Grünen“ zusammengefasst. Aufgrund der Reduktion der Prozessintensität und der Energie erwarten Experten ein hohes Wachstumspotential dieser Disziplin (Villadsen, 2007).

Bei genauerer Betrachtung stellt man fest, dass der Ansatz der „Weißen Biotechnologie“ nicht grundsätzlich neu ist sondern in einigen Disziplinen, wie beispielweise der Lebensmitteltechnologie, verfolgt wird. Der älteste von Menschen genutzte mikrobiologische bzw. enzymatische Prozess ist die Fermentation zur Herstellung und Veredelung von Nahrungsmitteln. Waren es in früheren Zeiten spontan ablaufende Gärungen, so werden heute definiert selektierte Kulturen den Rohstoffen und halbfertigen Erzeugnissen zugesetzt und die Fermentation unter genau festgelegten Bedingungen durchgeführt. Durch Zugabe der Kulturen werden die Rohstoffe biochemisch modifiziert. Dadurch werden eine verlängerte Haltbarkeit, die Entwicklung typischer Aroma- und Geschmacksstoffe, sowie der Abbau von Gerbstoffen erreicht. Des Weiteren werden die Kulturen auch zur Herstellung von Lebensmittelzusatzstoffen, wie Vitaminen, Zuckerersatzstoffen oder Säuren, eingesetzt (Demain, 2000; Jagerstad et al., 2005; Kawaguti et al., 2006; Lilly et al., 2000; Stiles, 1996; Wiseman, 2004).

Einhergehend mit dem Wandel des Lebensmittels als reine Energie- und Genussquelle zu einem Produkt mit gesundheitsrelevanten Eigenschaften werden ausgewählte Spezies von Mikroorganismen mittlerweile auch als solche konsumiert. Entweder werden sie als Zusatzstoff in einer Lebensmittelmatrix oder auch als Nahrungsergänzungsmittel in konzentrierter Form verabreicht. Es wird vermutet, dass sie mit biochemischen Regulationsmechanismen des menschlichen Organismus positiv interagieren und so zu gesundheitstherapeutischen Zwecken nützlich sind (Shah, 2007).

Sollen nun mit oder aus den selektierten Mikroorganismen kommerzielle Produkte hergestellt werden, so reicht die Erforschung und Entwicklung der Kulturen unter rein metabolischen und ernährungsrelevanten Gesichtspunkten nicht mehr aus. An diesem Punkt ist es erforderlich, Verfahren in den Vordergrund zu stellen, unter deren Anwendung die biologischen Systeme in einen prozess- und lagerstabilen Zustand überführt werden können.

Mittlerweile ist es weltweit in fast allen Branchen üblich, dass sich einzelne Betriebe auf einzelne Prozessabschnitte spezialisieren. So werden Kulturen zur Herstellung von Nahrungsmitteln nicht mehr beim Lebensmittelhersteller, sondern zentral von spezialisierten Unternehmen produziert und vertrieben. Als Folge müssen halbfertige Waren und Endprodukte lange Transportwege bis zum nächsten Verarbeitungsschritt und auch zum Endverbraucher zurücklegen. Teilweise werden sie dann bis zum Einsatz auch über längere Zeiträume gelagert. Folglich ist eine Konservierung der Zellen notwendig. Eine Möglichkeit, das zu erreichen, ist die Entfernung des Wassers als Reaktionsmedium und –partner, die Zellsuspensionen werden also nach der Fermentation getrocknet. Durch die Wasserentfernung können Schädigungsreaktionen bei Raumtemperatur im Vergleich zum hydrierten Zustand verlangsamt oder auch komplett eliminiert werden. Außerdem führt die Dehydrierung sowohl zur Gewichtsreduktion als auch zur Konzentrierung der Präparate. Dadurch wird der Transport günstiger und die Produkte können in höheren Konzentrationen im Endprodukt eingesetzt werden.

Trotz der vielen Vorteile erweist sich die Trocknung als solche eher problematisch. Die Mikroorganismen verlieren aufgrund des Wasserentzugs einen Teil ihre Vitalität und auch während der Lagerung können ungünstige Bedingungen zu einer Abnahme der funktionellen Eigenschaften des Präparates führen. Um destabilisierende Einflüsse auf die lebenden Organismen zu minimieren, werden Schutzstoffe wie z.B. Disaccharide zugegeben. Bisherige Ergebnisse zeigen zwar, dass die Anwendung von Schutzstoffen zu einer höheren Aktivität von Mikroorganismen nach der Trocknung und zu einer verbesserten Lagerstabilität führen kann. Es ist jedoch nicht möglich, die experimentell ermittelten Ergebnisse zu verallgemeinern. Es fehlt nach wie vor das Verständnis über die grundlegenden Schädigungs- und Schutzmechanismen für diese komplexen Systeme und über das Zusammenspiel zwischen verfahrenstechnischen Parametern und dem Potential der Schutzstoffe, das für eine zielgerichtete Prozessführung der Trocknung und Lagerung von Mikroorganismen erforderlich ist.

Ein denkbarer, jedoch für Mikroorganismen bisher nicht erforschter Schutzmechanismus von Zuckern ist die Ausbildung einer Glasmatrix. In einer Glasmatrix laufen destabilisierende Reaktionen während der Trocknung und Lagerung aufgrund der hohen Viskosität des Sys-

tems stark verzögert ab. Unter dieser Annahme kommt den verfahrenstechnischen Parametern während der Trocknung sowie den Lagerungsbedingungen im Hinblick auf den Glaszustand eine entscheidende Rolle zu. Vor diesem Hintergrund wird in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der verfahrenstechnischen Gestaltung der Gefriertrocknung und Lagerung auf die Mikroorganismen sowohl mit als auch ohne Schutzstoff untersucht. Unter der Annahme des Glaszustands als Schutzmechanismus werden Phasen-Zustandsdiagramme der Zellsuspensionen erstellt. Auf diesen basierend werden durch entsprechende Auswahl der Trocknungs- und Lagerbedingungen diese Prozesse bei unterschiedlichen physikalischen Zuständen realisiert. Durch gleichzeitige Analyse der Vitalität der Zellen im Verlauf der Trocknung und Lagerung kann die Bedeutung des Glaszustandes und der Verfahrenstechnik ermittelt werden.

Vor der detaillierten Erläuterung der konkreten Zielsetzung für diese Arbeit werden nachfolgend die etablierten Grundlagen sowie der aktuelle Stand des Wissens dargelegt, um die Vorgehensweise darauf aufbauend zu begründen.

## 2 GRUNDLAGEN

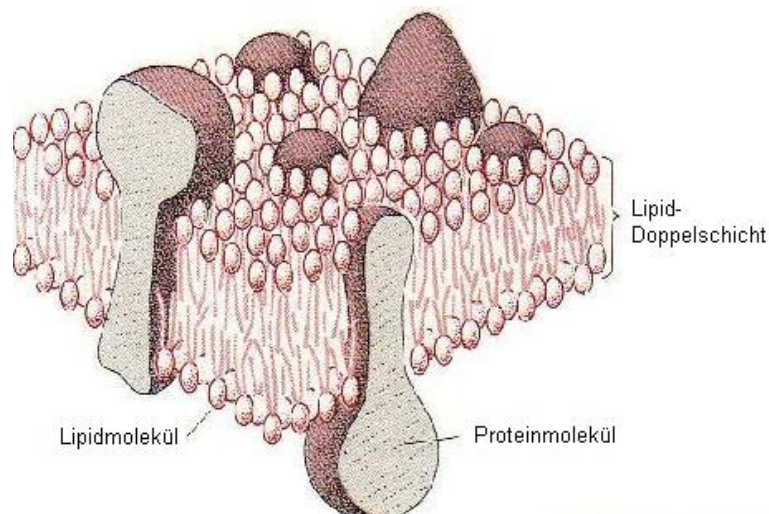
### 2.1 Hydrierung von Zellmembran und Proteinen von Bakterien

Aufgrund der zentralen Bedeutung einer intakten Zellmembran für die Regulation biochemischer Stofftransportvorgänge soll einleitend ein Überblick zur Struktur von Bakterienzellen gegeben werden. Die Grundlagen des nachfolgenden Abschnittes sind im Wesentlichen aus Alberts et al. (1990) und Jain (1988) entnommen.

Bakterien besitzen eine Zellwand, unter der eine Plasmamembran ein cytoplasmatisches Kompartiment einschließt, in dem verschiedene Moleküle eingebettet sind. Die Erläuterung der Zellorganellen beschränkt sich im Folgenden auf die Zellmembran und Proteine, da es vorwiegend diese Systeme sind, deren Schädigung durch Trocknung und Lagerung zum Verlust der Zellvitalität führt.

Die Plasmamembran fungiert als Barriere zwischen intra- und extrazellulärem Raum. Als selektiver Filter und als Vorrichtung für aktive Transportvorgänge steuert sie den Eintritt von Nährstoffen und den Austritt von Abbauprodukten. Außerdem erzeugt sie unterschiedliche Ionenkonzentrationen im Zellinneren und -äußeren an der Oberfläche der Zellen.

Abbildung 1 zeigt schematisch eine Zellmembran mit membrangebundenen Proteinen.



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung eines Ausschnitts aus einer Zellmembran (Alberts et al., 1990)

Das Grundgerüst biologischer Membranen ist die Phospholipid-Doppelschicht. Sie stellt einen relativ undurchlässigen Schutzwall gegen die meisten wasserlöslichen Moleküle dar. Sie ist durch Proteine zum Teil unterbrochen und zum Teil an der Oberfläche mit diesen bedeckt.

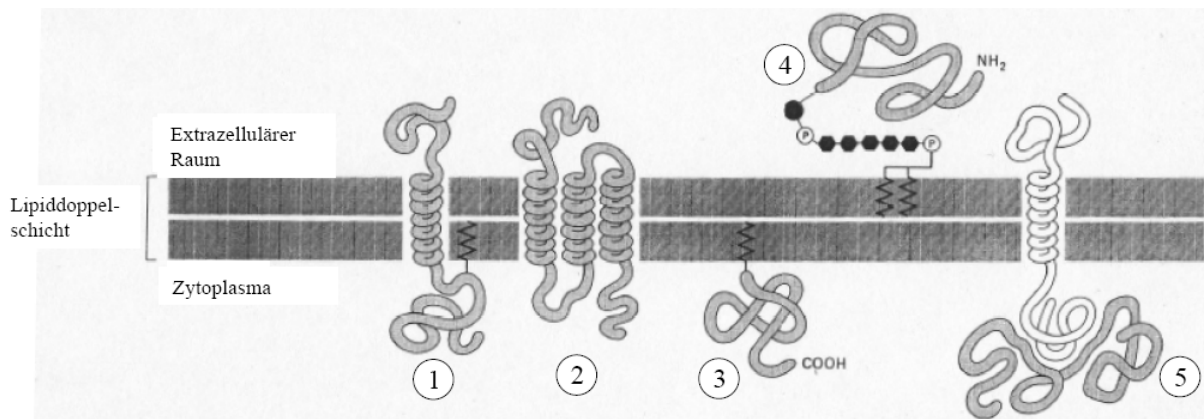


Die Phospholipide bestehen aus einem unpolaren und einem polaren Anteil. Der unpolare Anteil ist der wässrigen Umgebung abgewandt. Der polare Anteil befindet sich an der Grenzfläche zum umgebenden wässrigen Medium.

Die Lipid- und Proteinmoleküle werden überwiegend durch nicht-kovalente Bindungen, d.h. Wasserstoffbrückenbindungen, Ionenbindungen und van der Waals Kräfte zusammengehalten. Der unpolare Anteil wird durch hydrophobe Abstoßungskräfte zur wässrigen Umgebung im Inneren der Membran stabilisiert.

Die Zellmembran ist im flüssig-kristallinen Zustand eine dynamische, fließende Struktur, in deren Ebene die meisten der Lipid- und Proteinmoleküle beweglich sind. Die Fluidität einer Zellmembran ist für ihre Funktion eine ihrer wichtigsten Eigenschaften. Wird die Membran zu starr, so kommen Membrantransportprozesse und Enzymaktivitäten zum Erliegen. Die physikalischen Eigenschaften der Lipid-Doppelschicht werden durch Wasserstoffbrückenbindungen beeinflusst. Es wird vermutet, dass zwischen 5-20 Wassermoleküle mit einem Molekül Phospholipid assoziiert sind. Als Folge der Wasserassoziation bilden die Phosphatenden stärkere Wasserstoffbrückenbindungen mit der umgebenden wässrigen Lösung aus, wodurch Interaktionen der Phosphatmoleküle untereinander geschwächt werden. Bei Entfernung des Wassers führt eine Annäherung der Phosphatreste somit zu einer höheren Dichte zwischen den Phospholipidmolekülen, was wiederum eine Verstärkung der van der Waals Anziehungskräfte zwischen den Fettsäureresten zur Folge hat. Die Entfernung von Wasser oder auch eine Temperaturabsenkung unter die membranspezifische Phasenübergangstemperatur führen schließlich zum Phasenübergang vom physiologisch intakten flüssig-kristallinen Zustand zum Gelzustand. Im Gelzustand ist die Funktionalität der Membran nicht mehr gegeben.

Die Proteine machen in einer bakteriellen Zellmembran einen Gewichtsanteil von ca. 50 % aus. Es kommen sowohl globuläre als auch fibrilläre Proteine vor. Sie vermitteln den Transport von Molekülen in die Zelle und aus der Zelle, regulieren membranassoziierte Reaktionen und stellen Verbindungsstücke zwischen Plasmamembran und Cytoskelett dar. Proteine sind auf unterschiedliche Weise in die Membran eingebunden bzw. mit ihr assoziiert. Abbildung 2 zeigt die verschiedenen Integrations bzw. Assoziationsmöglichkeiten.



**Abbildung 2: Integrations- und Assoziationsmöglichkeiten von membrangebundenen Proteinen. (1) und (2) integrale Proteine, (3) und (4) Oberflächenproteine durch Fettsäuren kovalent mit der Membran verbunden, (5) Oberflächenproteine durch nicht-kovalente Wechselwirkungen mit anderen Membranproteinen oder Phospholipiden verbunden (Alberts et al., 1990).**

Integrale Proteine (vgl. Abbildung 2 (1,2)) besitzen eine amphipatische (polarer und apolarer Teil) Struktur und durchdringen die Lipid-Doppelschicht. Sie treten durch hydrophobe Bindungen mit Lipidmolekülen im Inneren der Lipid-Doppelschicht in Wechselwirkung, d.h sie sind in dieser gelöst. Hydrophile Abschnitte sind dem wässrigen extra- und intrazellulären Raum zugewandt. Eine weitere Gruppe der membranassoziierten Proteine, die Oberflächenproteine sind im Wesentlichen wasserlöslich und mit der Membran entweder über Fettsäuren kovalent (vgl. Abbildung 2 (3,4)) oder nur an eine der beiden Membranaußenseiten durch nicht-kovalente Wechselwirkungen mit anderen Membranproteinen oder Phospholipiden gebunden (vgl. Abbildung 2 (5)). Die Bindungen der Oberflächenproteine können durch Behandlung mittels hoher oder niedriger Ionenstärke und durch extreme pH-Werte geschwächt werden, wodurch die Moleküle leicht entfernt werden können.

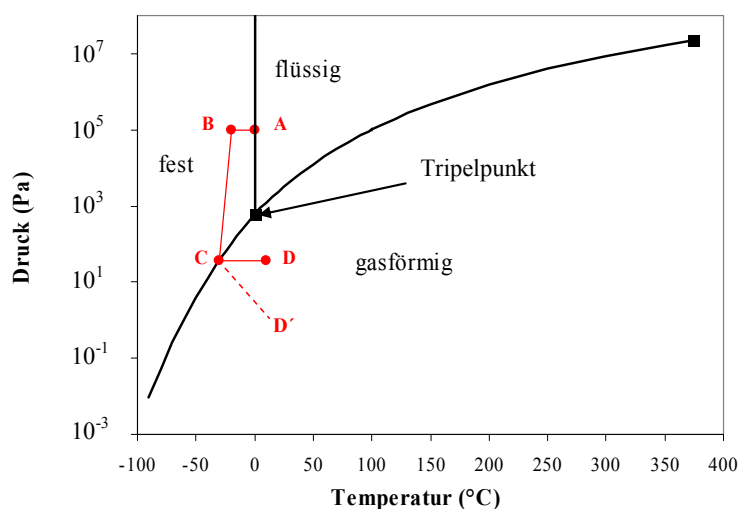
Proteine besitzen eine dreidimensionale Struktur, die für ihre funktionelle Integrität von größter Bedeutung ist. Die Aufrechterhaltung der dreidimensionalen Struktur des Proteins, sowie die Wechselwirkung der makromolekularen Ketten erfolgt durch nicht-kovalente Bindungen (van der Waals, elektrostatische Bindungen, Wasserstoffbrücken, hydrophobe Wechselwirkungen). Wasser besitzt als Lösungsmittel eine große Bedeutung für die Intaktheit der dreidimensionalen Struktur und die Wechselwirkungen. Befinden sich die Makromoleküle in einer wässrigen Lösung, so treten die Wassermoleküle mit deren polaren Gruppen in Wechselwirkung und es wird eine dreidimensionale Struktur des Wassers mit dem eingebetteten Makromolekül erzeugt. Gleichzeitig werden durch die Strukturierung des Wassers an der Grenzfläche zwischen Protein und Wasser hydrophobe Gruppen im Inneren durch Abstoßungskräfte zusammen gezwungen (Fennema et al., 1973). Je nach Wassergehalt, Temperatur und Ionen-

stärke werden die Abstoßungskräfte abgeschwächt und die hydrohoben Gruppen gelangen an die Oberfläche, was unter Umständen zur Aggregation von aufgefalteten Proteinen führen kann (Fennema et al., 1973; Shuryo und Eunice, 1988).

In Zellmembranen beruht die funktionelle Integrität der membrangebundenen Proteine zusätzlich auf Interaktionen spezifischer Segmente der Proteine mit der Lipid-Doppelschicht. Die Funktionalität von Membranproteinen hängt nicht nur von ihrer Struktur und Konformation ab, sondern auch von ihrer groben Ausrichtung in einer intakten Umgebung. Somit führen bereits geringe physikalische Änderungen der Lipid-Doppelschicht, wie beispielsweise eine erhöhte Viskosität aufgrund von Temperaturabsenkung, Wasserentfernung oder Änderung der Wasserverfügbarkeit aufgrund eines Phasenübergangs, zum Verlust der Proteinfunktionalität. Das bedeutet, dass keine Konformationsänderung des Proteins an sich (Auffaltung, Aggregation) für einen Verlust der Funktionalität notwendig ist (Jain, 1988).

## 2.2 Gefriertrocknung

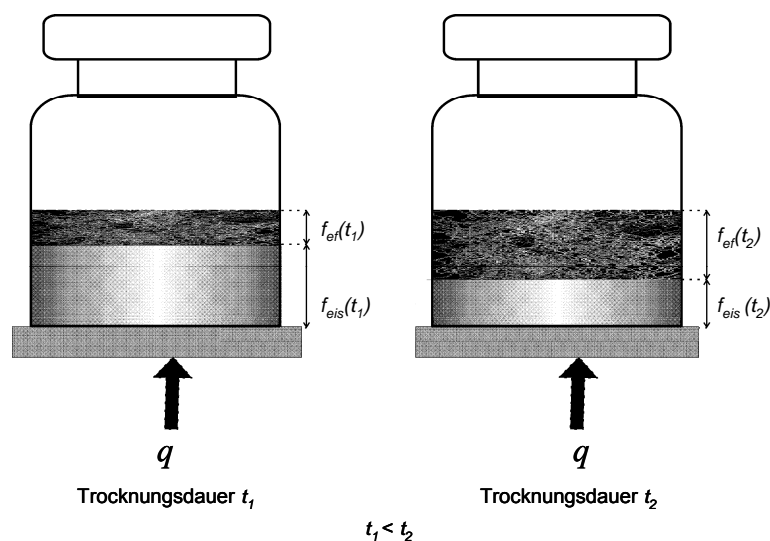
Bei der Gefriertrocknung, dem gebräuchlichsten Verfahren in der pharmazeutischen Industrie und zum Teil auch in der Lebensmittelindustrie, erfolgt die Entfernung eines Lösungsmittels aus dem gefrorenen Zustand durch direkte Überführung in den gasförmigen Zustand unter Umgehung des flüssigen Zustands. Dabei werden die Druck-Temperatur-Beziehungen zwischen dem festen und dem gasförmigen Zustand genutzt. Abbildung 3 zeigt das Phasendiagramm von Wasser mit Druck/Temperaturbedingungen, wie sie bei der Gefriertrocknung Anwendung finden.



**Abbildung 3: Phasendiagramm von Wasser mit Druck/Temperatur-Bedingungen während der Gefriertrocknung: (A) Gefrieren, (B) Temperaturabsenkung des gefrorenen Präparates, (C) Sublimation, (D) Temperaturerhöhung (Desorption von Wasser).**

Die Gefriertrocknung wird meist in drei Schritte eingeteilt, die zeitlich nacheinander ablaufen. Das flüssige Produkt wird durch Temperaturniedrigung unter Atmosphärendruck bei Punkt A (vgl. Abbildung 3) in den festen Zustand überführt und anschließend noch weiter abgekühlt (Punkt B). In einem weiteren Schritt, der primären Trocknung, werden die gebildeten Eiskristalle durch Druckabsenkung unterhalb des Tripelpunktes (Wasser  $T = 273 \text{ K}$ ,  $p = 611,657 \text{ Pa}$ ) und stetiger Wärmezufuhr zur Aufrechterhaltung des Sublimationsprozesses bei Punkt C (vgl. Abbildung 3) in die Gasphase überführt. Durch eine daran anschließende sekundäre Trocknung kann auch das stärker im Produkt gebundene und nicht ausgefrorene Wasser durch Desorption entfernt werden, indem die Temperatur weiter erhöht wird (D), so dass Druck/Temperatur-Bedingungen des gasförmigen Zustands erreicht werden. Gleichzeitig zur Temperaturerhöhung kann auch eine weitere Drucksenkung ( $D'$ ) stattfinden (Oetjen und Hasseley, 2004).

Bei der Sublimationstrocknung tritt der Trocknungsspiegel gleich zu Beginn unter die Guts-oberfläche und sinkt im weiteren Verlauf der Trocknung stetig ab. Dies ist in der verringerten Bewegungsmöglichkeit bzw. der hohen Viskosität der nicht gefrorenen Phase begründet. In dieser Hinsicht unterscheidet sich die Gefriertrocknung grundsätzlich von der Trocknung im flüssigen Zustand (Kessler, 1961). So liegt bei einem Trocknungszeitpunkt  $t_i$  ein Präparat vor, das im oberen Abschnitt aus einem eisfreien, porösen Gerüst mit dem Anteil  $f_{ef}(t_i)$  besteht, und im unteren Teil aus einem eishaltigen, gefrorenen Produkt mit Anteil  $f_{eis}(t_i)$ , aus dem das Eis noch entfernt werden muss. Dieser Zusammenhang ist in Abbildung 4 schematisch dargestellt.



**Abbildung 4:** Anteil von eisfreier  $f_{ef}(t_i)$  und eishaltiger Schicht  $f_{eis}(t_i)$  während der Gefriertrocknung. Zur Aufrechterhaltung des Sublimationsprozesses wird stetig die Wärme  $q$  zugeführt.

Im Folgenden werden die einzelnen Abschnitte der Gefriertrocknung erläutert.

### 2.2.1 Gefrieren

Durch das Gefrieren wird das flüssige System als Ganzes oder einzelne Komponenten daraus in den festen Aggregatzustand überführt. Wasser, sowohl in reiner Form als auch in wässrigen Lösungen, bildet bei seiner Gefrieretemperatur nicht spontan Eis aus. Es muss zunächst unter den Gefrierpunkt unterkühlt werden, damit sich Kristalle bilden (Nukleation), die im weiteren Verlauf durch Diffusion von Wassermolekülen und Absorption an der Oberfläche der gebildeten Kristalle anwachsen (Fennema et al., 1973).

Die Kristallbildungsgeschwindigkeit verläuft bei stärkerer Unterkühlung schneller, während das Kristallwachstum bei geringerer Unterkühlung eine höhere Geschwindigkeit besitzt (Van Hook, 1961). Die Geschwindigkeit ist für beide Prozesse in Abhängigkeit von der Unterkühlung bzw. Übersättigung in Abbildung 5 dargestellt.

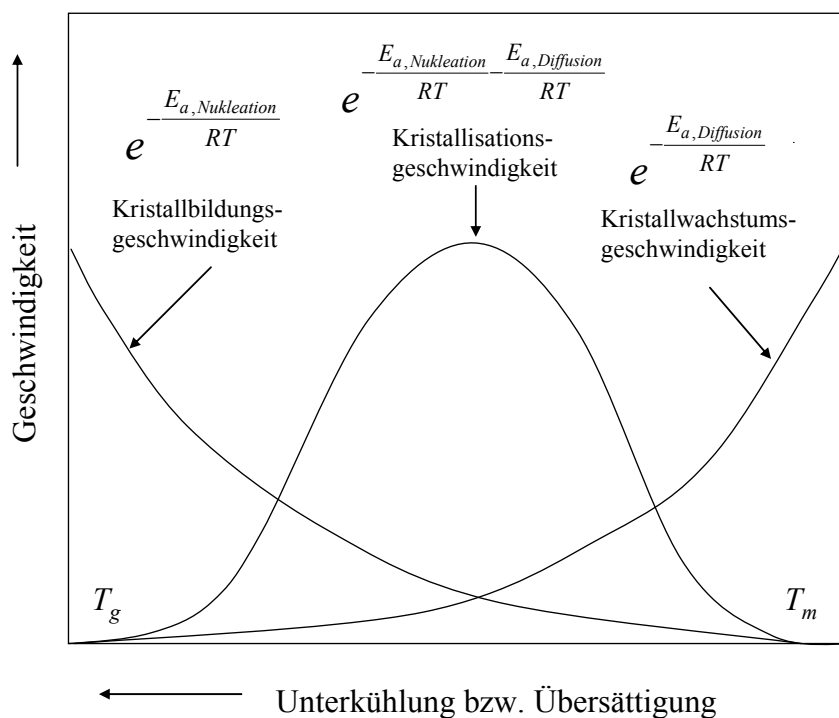


Abbildung 5: Geschwindigkeit der Kristallbildung, des Kristallwachstums sowie der aus beiden kombinierten Kristallisationsgeschwindigkeit in Abhängigkeit vom Unterkühlungs- bzw. Übersättigungsgrad.  $E_{a,Nukleation}$  stellt dabei die notwendige Arbeit zur Bildung eines Nukleus dar und  $E_{a,Diffusion}$  ist die Aktivierungsenergie für die Diffusion der Wassermoleküle zu bereits gebildeten Kristallen (nach Van Hook, 1961).

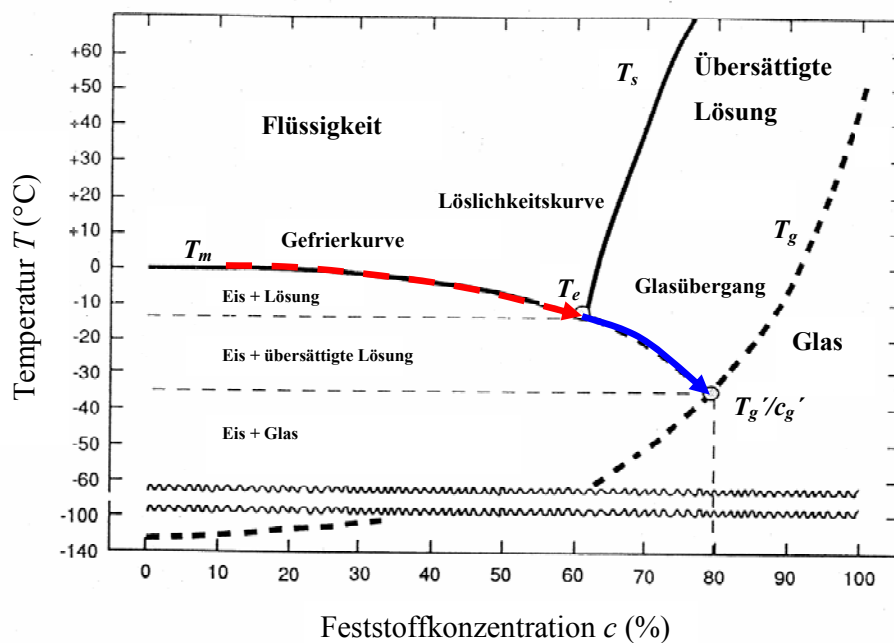
Je nach Temperatur bzw. Sättigung kann also eine große Anzahl an kleinen Kristallen (starke Unterkühlung bzw. Übersättigung) oder eine geringere Anzahl an großen Kristallen (geringe Unterkühlung bzw. Übersättigung) entstehen, was sich letztendlich auf die Grenzfläche zwi-

schen Eis und nicht gefrorener Lösung und im Hinblick auf die anschließende Trocknung auch auf die spezifische Oberfläche des getrockneten Produktes auswirkt.

Homogene Kristallisation setzt bei Wasser erst bei einer Temperatur von  $-39\text{ °C} \div -41\text{ °C}$  ein. Bei der Anwesenheit weiterer Moleküle und Partikeln in Wasser wirken diese bereits als Kristallisationskeime bzw. -katalysatoren, die Aktivierungsenergie für die Kristallisation (heterogene Kristallisation) ist in einem solchen System also herabgesetzt (Fennema et al., 1973). Folglich ist die starke Unterkühlung des Wassers in einer Suspension nicht mehr möglich und auch nicht mehr nötig.

Bei Mehrkomponentensystemen muss bezüglich des Einfrierens die Gefrierpunktabenkung aufgrund gelöster Substanzen im Vergleich zu reinem Wasser berücksichtigt werden.

In Abbildung 6 ist das Phasen- und Zustandsdiagramm des binären Systems Saccharose/Wasser und der Temperaturverlauf während des Einfrierens der Lösung mit einer Ausgangskonzentration von 10 % dargestellt (nach Roos, 1995).



**Abbildung 6:** Phasen- und Zustandsdiagramm einer Saccharoselösung sowie Temperatur/Feststoffbeziehungen während des Gefrierens bis zur Glasübergangstemperatur der maximal gefrierkonzentrierten Lösung  $T_g'$  (Phasen-Zustandsdiagramm der Saccharoselösung nach Roos, 1995). ( $T_m$  = Schmelztemperatur von Wasser,  $T_g$  = Glasübergangstemperatur der Lösung,  $T_s$  = Kristallisationstemperatur der gelösten Komponente, hier Saccharose).

Die Gefrierkurve zeigt den Gleichgewichtszustand zwischen der Lösung im flüssigen, unter-sättigten Zustand und der festen Form des Lösungsmittels, in diesem Fall Wasser. Die Lös-

lichkeitskurve zeigt das Gleichgewicht zwischen der untersättigten Lösung und dem kristallinen Zustand der gelösten Substanz (Fennema et al., 1973).

Durch Temperaturabsenkung der Ausgangslösung gefriert Wasser aus, wodurch die Lösung konzentriert wird. Dies führt entsprechend der Gefrierkurve wieder zu einer Erniedrigung der Gefriertemperatur usw. Durch zunehmende Konzentrierung wird schließlich die Löslichkeitsgrenze am eutektischen Punkt  $T_e$  erreicht.

Der eutektischen Punkt  $T_e$  stellt einen thermodynamischen Gleichgewichtszustand dar, an dem beide Stoffe (Wasser und Gelöstes) nebeneinander als Kristalle vorliegen. Bei gut kristallisierenden Stoffen mit hoher Kristallisationsgeschwindigkeit wird dieser thermodynamische Gleichgewichtszustand auch erreicht. Verschiedene Substanzen weisen allerdings unterschiedliche Kristallisationsgeschwindigkeiten auf, was zur Folge haben kann, dass beispielsweise am eutektischen Punkt einer wässrigen Lösung nur Wasser auskristallisiert.

Generell ist die Kristallisationsgeschwindigkeit der einzelnen Stoffe in einem Mehrkomponentensystem von verschiedenen Faktoren abhängig (Oetjen und Haseley, 2004):

- Art und Menge der gelösten Komponenten,
- Löslichkeit der gelösten Substanzen,
- Anfangskonzentrationen,
- Abkühlgeschwindigkeit,
- Endtemperatur und Verweilzeit bei dieser Temperatur,
- Viskosität der Lösung.

Die Unterschiede in den Kristallisationsgeschwindigkeiten zwischen dem Lösungsmittel Wasser und gelöstem Stoff können dazu führen, dass am eutektischen Punkt  $T_e$  zunächst nur Wasser, und nicht gleichzeitig auch die gelöste Komponente auskristallisiert. Als Folge wird die Lösung übersättigt. Auch bei weiterer Abkühlung unter den eutektischen Punkt kristallisiert zunehmend nur Wasser und die Lösung wird weiter aufkonzentriert. Dieses Verhalten ist sowohl in binären als auch in Mehrkomponentensystemen nicht ungewöhnlich, vor allem dann, wenn diese eine erhöhte Viskosität aufweisen, wodurch die Kristallisationsgeschwindigkeit der gelösten Substanz verringert wird. Die Einstellung des Gleichgewichts zwischen einer festen und flüssigen Phase kann in komplexen Systemen mit geringer Geschwindigkeit erfolgen (Fennema et al., 1973). Die Zustände der Übersättigung sind in Abbildung 6 als Verlängerung der Gefrierkurve nach dem eutektischen Punkt zwischen  $T_e$  und  $T_g'$  dargestellt. Die

Kurve zwischen  $T_e$  und  $T_g'$  zeigt Bedingungen, unter denen das Eis neben einer übersättigten Lösung in einem thermodynamisch instabilen Zustand vorliegt. Zusätzlich zur Erhöhung der Konzentration des Feststoffes erfolgt auch eine starke Erhöhung der Viskosität  $\eta$  des übersättigten Systems. Dies führt wiederum zu einer Verringerung der Kristallisationsgeschwindigkeit (vgl. Abbildung 5)

Mit zunehmender Verringerung der Kristallisationsgeschwindigkeit und gleichzeitig zunehmender Aufkonzentrierung kommt die Eiskristallbildung beim Schnittpunkt der Gefrierkurve mit der Glasübergangskurve bei der Konzentration  $c_g'$  und der Temperatur  $T_g'$  schließlich ganz zum Erliegen. Das System erstarrt kinetisch ohne vollständige Phasentrennung, und ein Rest an nicht ausfrierbarem Wasser (UFW) verbleibt in der Lösung.  $c_g'$  bezeichnet die Konzentration der maximal gefrierkonzentrierten Lösung. An diesem Punkt geht die übersättigte, maximal gefrierkonzentrierte Lösung in einen hochviskosen, amorphen Zustand, den Glaszustand über. Die physikalischen Grundlagen des Glaszustands werden in Kapitel 2.3 näher erläutert. Trotzdem soll an dieser Stelle zum besseren Verständnis der Messgrößen zur Bestimmung des Glasübergangs bereits vorweggenommen werden, dass der Glasübergang bezüglich der Änderung der spezifischen Wärmekapazität  $C_p$  vergleichbar mit einem Phasenübergang 2. Ordnung ist (Ehrenfest, 1933). Die spezifische Wärmekapazität  $C_p$  weist bei der Glasübergangstemperatur  $T_g$  eine sprungartige, jedoch stetige Änderung auf (vgl. Abbildung 7). Der Glasübergang bzw. die Wärmekapazitätsänderung  $\Delta C_p$  erfolgt nicht bei einer konkreten Temperatur sondern innerhalb eines bestimmten Temperaturbereichs. Deshalb ist es erforderlich, bei der Ermittlung und Angabe von Glasübergangstemperaturen  $T_g$  zu spezifizieren, an welchem Punkt des Übergangs diese Temperatur vorliegt (Onset, Midpoint, Endset) (Roos, 1995).



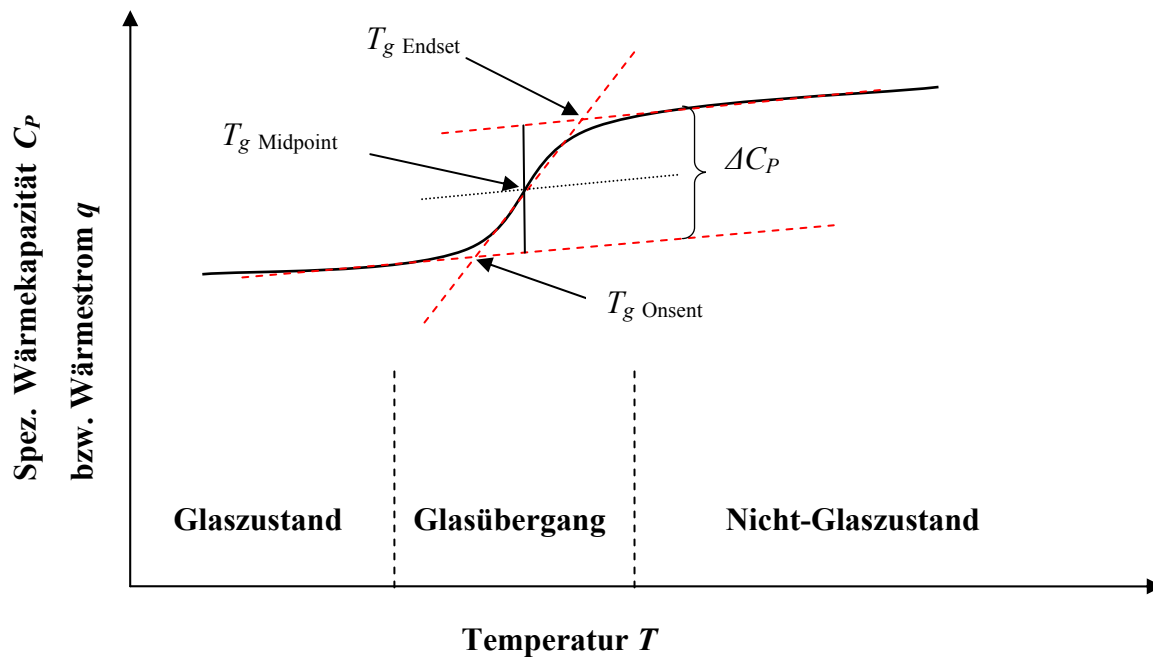


Abbildung 7: Schematische Darstellung der spezifischen Wärmekapazität  $C_p$  bzw. des Wärmestroms  $q$  in Abhängigkeit von der Temperatur  $T$  sowie deren sprunghafte Änderung am Glasübergang. Die Bestimmung der Größen  $T_{g \text{ Onset}}$ ,  $T_{g \text{ Midpoint}}$  und  $T_{g \text{ Endset}}$  erfolgt aus den Schnittpunkten der Tangenten an die Kurve unterhalb des Glasübergangs, oberhalb des Glasübergangs sowie bei halber Höhe ( $1/2\Delta C_p$ ) des Glasübergangs.

Im Allgemeinen ist die Glasübergangstemperatur  $T_g$  eine charakteristische Stoffeigenschaft und von Wassergehalt, Molmasse und chemischer Zusammensetzung der Lösung abhängig (Roos, 1995).

Die Abhängigkeit der Glasübergangstemperatur  $T_g$  von der Feststoffkonzentration  $c$  ist in Abbildung 6 als Glasübergangskurve bzw. Phasendiagramm dargestellt. Diese Kurve stellt nicht die Phase der Koexistenz zweier Aggregatzustände dar, sondern sie repräsentiert Temperaturen und Konzentrationen, an denen die gleiche Viskosität vorliegt. Ein Phasendiagramm kann für ein binäres System unter Berücksichtigung der Glasübergangstemperaturen  $T_g$  der Substanzen 1 und 2, den Gewichtsanteilen  $c_1$  und  $c_2$  sowie den Wärmekapazitätsänderungen der reinen Substanzen am Glasübergang,  $\Delta C_{p1}$  und  $\Delta C_{p2}$ , nach Gleichung (1) berechnet werden (Gordon und Taylor, 1952).

$$T_g(c_1) = \frac{c_1 T_{g1} + k_g c_2 T_{g2}}{c_1 + k_g c_2} \quad (1)$$

$$\text{mit } k_g = \frac{\Delta C_{p2}}{\Delta C_{p1}} \text{ und } c_2 = 100 - c_1$$

Die Glasübergangstemperaturen  $T_g$  und die Wärmekapazitätsänderung  $\Delta C_p$  von verschiedenen Zuckern sowie von Wasser sind aus der Literatur bekannt. Tabelle 1 zeigt Werte für Laktose, Trehalose und Wasser.

**Tabelle 1: Glasübergangstemperatur  $T_g$  von Wasser, Laktose und Trehalose, Wärmekapazitätsänderung von Wasser  $\Delta C_{p,Wasser}$  bzw. Verhältnis  $\Delta C_{p,Wasser}/\Delta C_{p,Zucker}$  für wässrige Lösungen der Zucker, Glasübergangstemperatur der maximal aufkonzentrierten Lösung  $T_g'$  und Konzentration  $c_g'$  der maximal aufkonzentrierten wässrigen Zuckerlösung. Für die Glasübergangstemperaturen sind jeweils die Midpoint-Temperaturen angegeben (Chen, 2000; Omar und Roos, 2007; Roos, 1995).**

Substanz	$T_g$ (°C)	$\Delta C_{p,Wasser}$ (kJ/(kg·K) bzw. $\Delta C_{p,Wasser}/\Delta C_{p,Zuckere}$ (-)	$T_g'$ (°C)	$c_g'$ (%(w/w))
Wasser	-123 bis -143	0,1 bis 1,94	-	-
Laktose	101	6,3	-36	81,3
Trehalose	100	6,5	-35	72 - 83,3

Phasendiagramme ( $T_g(c)$ ) existieren in großer Anzahl für verschiedene, definiert zusammengesetzte Protein-Zucker-Systeme und einige Lebensmittel (Bai et al., 2001; Elmonsef Omar und Roos, 2007; Kawai et al., 2007; Ohkuma et al., 2007; Sablani et al., 2004; Shafiur Rahman et al., 2003; Singh und Roos, 2006; Telis und Sobral, 2001). Für komplexe Mikroorganismen existieren bisher nur die Arbeiten von Fonseca et al. (2001a) und Schebor et al. (2000). Dabei stellten Fonseca et al. (2001a) fest, dass die Zellen die Glasübergangstemperatur der kontinuierlichen Phase nicht signifikant beeinflussen. Schebor et al. (2000) verwendeten ein undefiniertes System, dessen genaue Zusammensetzung unbekannt war. Insofern kann aus dieser Arbeit nicht auf die Einflüsse der Mikroorganismen auf die Glasübergangstemperatur geschlossen werden.



entsprechend des Wasserdampfdruckes, wie aus Abbildung 3 ersichtlich, von der Höhe des Kammerdruckes bestimmt (Oetjen und Haseley, 2004).

Bei der Gefriertrocknung findet, wie aus Abbildung 9 ersichtlich, ein gekoppelter Wärme- ( $q$ ) und Stofftransport ( $dm/dt$ ) statt (Oetjen und Haseley, 2004).

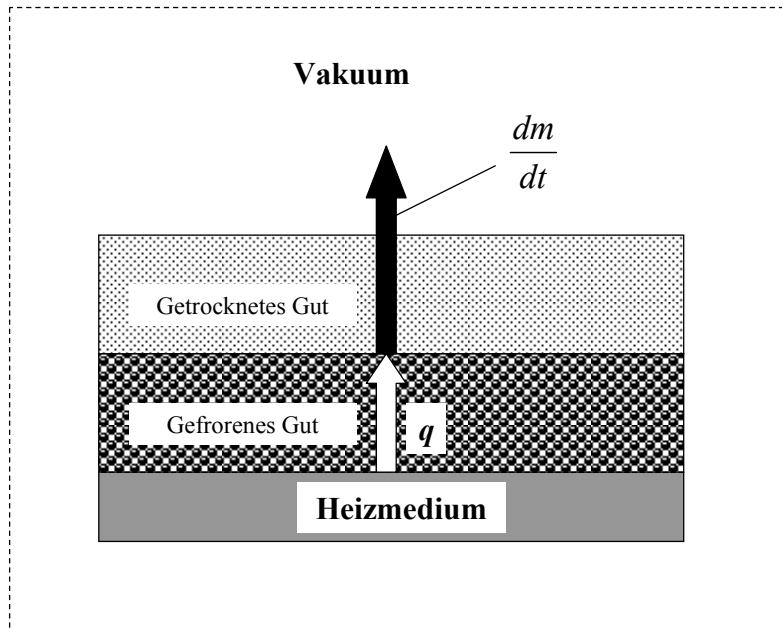


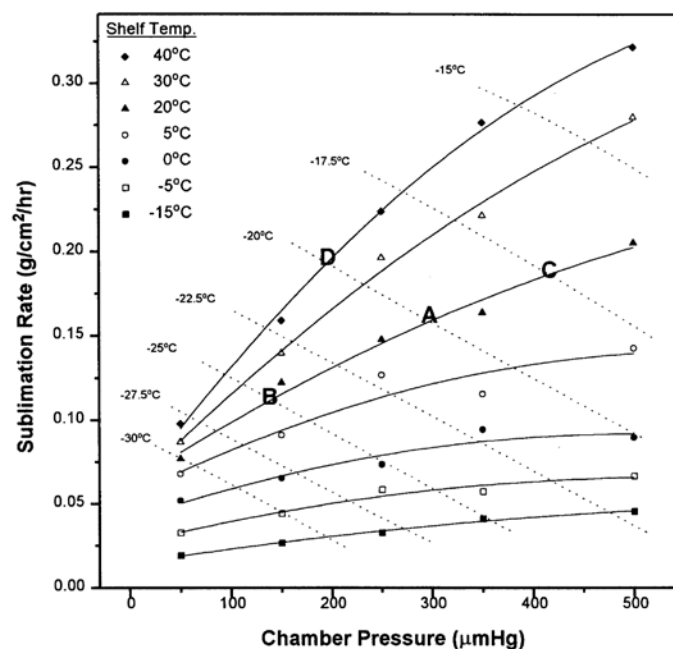
Abbildung 9: Schematische Darstellung des Stoff- ( $dm/dt$ ) und Wärmetransports ( $q$ ) bei der Sublimation (nach Oetjen und Haseley, 2004)

Zur Sublimation muss der Probe Sublimationsenergie zugeführt werden, die sich aus der Summe von Schmelzenthalpie  $\Delta H_m$  und Verdampfungsenthalpie  $\Delta H_V$  zusammensetzt (siehe Tabelle 14 im Anhang). Die zur Sublimation benötigte Wärmeenergie wird durch Leitung über eine beheizte Stellfläche und/oder Strahlung an das gefrorene Produkt übertragen. Die zugeführte Wärme wird im Produkt bis an die Grenzfläche zwischen poröser, bereits getrockneter und noch gefrorener Schicht weitergeleitet. Der dabei gebildete Wasserdampf bewegt sich durch die immer dicker werdende poröse Schicht zur Produktoberfläche. Dort werden die Wassermoleküle an die Umgebung abgegeben. Somit ergibt sich eine temperaturbedingte Partialdampfdruckdifferenz  $\Delta p$  zwischen der Oberfläche der Eisschicht im Produkt und der Eiskondensatoroberfläche, das für den Stofftransport  $dm/dt$  durch poröse Güter erforderlich ist. Der Stofftransport  $dm/dt$  berechnet sich aus der Partialdampfdruckdifferenz  $\Delta p$ , der Querschnittsfläche  $A$ , dem Bewegungsbeiwert  $b$ , dem Widerstandsbeiwert  $\mu$  sowie aus der Schichtdicke  $d$  nach Gleichung (2) (Kessler, 1961).

$$\frac{dm}{dt} = -A \frac{b}{\mu} \frac{\Delta p}{d} \quad (2)$$

Wird bei der Gefriertrocknung ein Eiskondensator als „Dampffalle“ verwendet, so ist die Partialdruckdifferenz  $\Delta p$  von der Temperaturdifferenz  $\Delta T$  zwischen der Produkttemperatur  $T_p$  und der Eiskondensatortemperatur  $T_K$  abhängig. Die Partialdruckdifferenz  $\Delta p$  nimmt mit zunehmender Temperaturdifferenz  $\Delta T$  ebenfalls zu, wodurch der Stofftransport beschleunigt wird. Die Produkttemperatur  $T_p$  wird, wie bereits erläutert, über den Kammerdruck  $p_K$  entsprechend der Sublimationstemperatur  $T_{sub,W}$  vorgegeben. Des Weiteren beeinflusst der Kammerdruck Wärmeleitungsvorgänge in der Vakuumkammer, die bei höheren Drücken ebenfalls verbessert sind. Eine Beschleunigung der Trocknung erfolgt auch durch eine höhere Temperaturdifferenz zwischen der Produkttemperatur  $T_p$  und Stellflächentemperatur  $T_{St}$ . Somit wird die Trocknungsgeschwindigkeit während der Haupttrocknung, aber auch während der Nachtrocknung neben den Einflüssen der Produktstruktur und -geometrie vor allem durch zwei Variablen, den Kammerdruck  $p_K$  und die Stellflächentemperatur  $T_{St}$  für die Zufuhr von Sublimationsenergie, bestimmt (Gehrke, 1991).

Abbildung 10 zeigt den Einfluss des Kammerdrucks auf die Sublimationsgeschwindigkeit bei unterschiedlichen Stellflächentemperaturen (Chang und Fischer, 1995).



**Abbildung 10:** Sublimationsgeschwindigkeit in Abhängigkeit vom Kammerdruck bei unterschiedlichen Stellflächentemperaturen (Shelf Temp.). Die gestrichelten Linien stellen Isothermen der Produkttemperatur  $T_p$  dar (A, B, C, D zeigen die Punkte, bei denen die Autoren die Experimente durchführten) (Chang und Fischer, 1995)

Bei höherem Kammerdruck und mit zunehmender Stellflächentemperatur steigt die Sublimationsrate an. Die Produkttemperatur, die meist so eingestellt wird, dass sie etwa 20 - 30 K

unterhalb der Stellflächentemperatur liegt, bleibt während der Haupttrocknung relativ konstant und steigt erst gegen Ende der primären Trocknung an, wenn die Sublimation weitgehend abgeschlossen ist.

Durch die primäre Trocknung kann der Restwassergehalt im Produkt je nach Anteil an ausgefrorenem Wasser nur bis zu einem gewissen Grad abgesenkt werden. Bei Systemen, in denen das Wasser nicht vollständig ausgefroren werden kann und bei denen somit die gewünschte Restfeuchte nach der primären Trocknung noch nicht erreicht ist, schließt sich ein weiterer Trocknungsschritt, die sekundäre Trocknung, zur Entfernung des nicht ausgefrorenen Wassers an. Um auch aus der inneren Oberfläche des porösen Mediums das nicht gefrorene Wasser durch Desorption entfernen zu können, muss die Trocknungstemperatur während der Nachtrocknung möglichst weit bis zu einer für das Trocknungsprodukt gerade noch vertretbaren Höhe angehoben und der Druck abgesenkt werden. Chang und Fischer (1995) ermittelten, dass es auch möglich und im Hinblick auf die Prozesssteuerung einfacher ist, eine sogenannte „single step“ Gefriertrocknung durchzuführen. Dabei wird nach der Haupttrocknung (Sublimation) der Kammerdruck nicht erniedrigt und die Stellflächentemperatur nicht erhöht. Die Stellflächentemperatur wird bereits während der Haupttrocknung so hoch eingestellt, dass auch eine Nachtrocknung möglich ist, das Produkt aber während der Haupttrocknung nicht schmilzt. Entsprechend physikalischer Gesetzmäßigkeiten bleibt die Produkttemperatur während der Haupttrocknung aufgrund der zur Sublimation notwendigen Energie auf einem relativ konstanten Niveau und nimmt während der Sublimation sehr viel niedrigere Werte an als die Stellflächentemperatur.

### 2.3 Glaszustand

Wird ein Zustand als „fest“ bezeichnet, so werden damit die mechanischen Eigenschaften des Systems ausgedrückt. Betrachtet man Festkörper im Hinblick auf ihre molekulare Anordnung, so ist diesbezüglich zwischen dem kristallinen und dem amorphen Zustand zu differenzieren. Der kristalline Zustand ist ein thermodynamischer Gleichgewichtszustand, in dem die Moleküle in einer geordneten Struktur eingefügt sind. Im Gegensatz dazu liegen die Moleküle in einem amorphen System ungeordnet vor. Ein Festkörper im amorphen Zustand wird als Glas bezeichnet. Der Glaszustand ist ein thermodynamischer Ungleichgewichtszustand und wird nur durch seine hohe Viskosität kinetisch stabilisiert. Die Viskosität eines Glases beträgt  $10^9 - 10^{14}$  Pa·s, was auf eine stark eingeschränkte Mobilität der Moleküle des Systems zurückzuführen ist (Sperling, 1986). Aufgrund dieser hohen Viskosität sind chemische und physikalische Reaktionen stark verlangsamt und auf Vibrationen, kurze Rotationen und kurze Bewe-

gungen von Polymerketten beschränkt (Levine und Slade, 1988; Champion, 2000). Der Zusammenhang zwischen der Beweglichkeit bzw. Diffusionsmöglichkeit der Moleküle und der Viskosität wird durch die Stokes-Einstein-Gleichung für Translation  $D_{trans}$ , Gleichung (3), und Rotation  $D_{rot}$ , Gleichung (4), aus der Temperatur  $T$ , der Boltzmannkonstante  $k_B$ , der Viskosität  $\eta$  und dem hydrodynamischen Radius  $r$  beschrieben (Einstein, 1905).

$$D_{trans} = \frac{k_B T}{6\pi\eta r} \quad (3)$$

$$D_{rot} = \frac{k_B T}{8\pi\eta r^3} \quad (4)$$

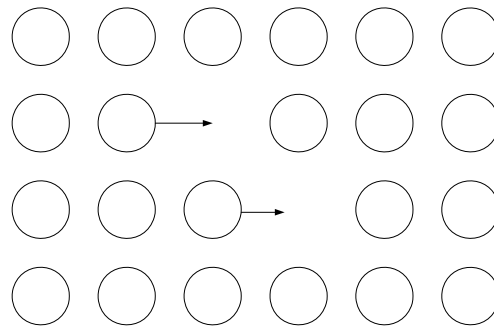
Gemäß der Stokes-Einstein-Beziehung verhält sich der Diffusionskoeffizient  $D_{trans/rot}$  umgekehrt proportional zur Viskosität  $\eta$ . Beispielsweise würde nach Gleichung (3) die Diffusion eines Wassermoleküls über eine Länge von  $1\mu\text{m}$  in einer Glasmatrix  $10^6$  Jahre dauern.

Der Glaszustand wird unterhalb der stoffspezifischen Glasübergangstemperatur  $T_g$  durch Temperaturabsenkung einer Lösung oder Wasserentfernung aus dieser erreicht (Roos, 1995).

Quervernetzte Polymere zeigen im Nicht-Glaszustand elastisches Verhalten, während lineare Polymere und Polymere mit niedrigem Molekulargewicht viskoses Verhalten zeigen (Fenne-  
ma, 1996; Sperling, 1986).

Es existieren verschiedene Theorien über die Vorgänge beim Glasübergang. Hier soll lediglich die Theorie des freien Volumens näher erläutert werden, da sich aus dieser auch der konkrete Lösungsansatz für diese Arbeit ableitet.

Wie oben bereits erwähnt, ist der Diffusionskoeffizient einer Substanz in einem System umgekehrt proportional zu dessen Viskosität. Durch die Viskosität wird also ein Maß an molekularer Beweglichkeit ausgedrückt. Bei der Theorie des freien Volumens wird erklärt, dass die Beweglichkeit der Moleküle auf das Vorhandensein von Hohlräumen, die in ihrer Gesamtheit als freies Volumen  $V_{frei}$  bezeichnet werden, zurückzuführen ist (vgl. Abbildung 11). Je größer der Anteil des freien Volumens ist, umso beweglicher sind die Moleküle. Das bedeutet auch, dass bei mechanischer Beanspruchung des Materials dessen Relaxationszeit (Zurückkehren in den ursprünglichen Zustand) kürzer ist, je höher die Beweglichkeit bzw. der Anteil an freiem Volumen ist.



**Abbildung 11: Anordnung von Molekülen (Kreise) und Hohlräumen in einem System. Die Pfeile deuten die Platzwechsel zwischen Molekül und Hohlraum an (nach Sperling, 1986).**

Der Anteil von  $V_{frei}$  ist im Nicht-Glaszustand temperaturabhängig und nimmt mit abnehmender Temperatur ab. Das bedeutet, dass die molekulare Mobilität im Nicht-Glaszustand mit abnehmender Temperatur abnimmt. Beim Erreichen der Glasübergangstemperatur weist  $V_{frei}$  einen für unterschiedliche Materialien universellen Wert von 11,3 % auf, bei dem die molekulare Mobilität stark eingeschränkt ist. Somit stellt das freie Volumen bei der Glasübergangstemperatur eine Konstante dar. Im Gegensatz zum Nicht-Glaszustand ist  $V_{frei}$  im Glaszustand nicht mehr temperaturabhängig sondern bleibt bei veränderlicher Temperatur konstant. Entsprechend der Unabhängigkeit des freien Volumens von der Temperatur im Glaszustand ändert sich am Glasübergang der thermische Expansionskoeffizient  $dV/dT$  des Materials bzw. die Wärmekapazität  $C_p$  als erste Ableitung des Volumens nach der Temperatur (vgl. Abbildung 7) (Sperling, 1986).

Diese Unterschiede bezüglich der Entwicklung von freiem und besetztem Volumen zwischen Glaszustand und Nicht-Glaszustand müssen bei der Anwendung mathematischer Modelle zur Temperaturabhängigkeit berücksichtigt werden. In diese Modelle fließt unter anderem die Aktivierungsenergie  $E_a$  für viskoses Fließen ein, die für den Platzwechsel der Moleküle einschließlich der Arbeit zur Bildung der Lücken nötig ist (Frisch et al., 1940). Aufgrund der unterschiedlichen Entwicklung des freien und besetzten Volumens im Glaszustand und im Nicht-Glaszustand in Abhängigkeit von der Temperatur existieren unterschiedliche Modelle für diese Zustände.

Nach Slade und Levine (1991) kann die Temperaturabhängigkeit der Viskosität  $\eta$  im Glaszustand mit Hilfe des Arrheniusansatzes aus der absoluten Temperatur  $T$ , der Aktivierungsenergie  $E_a$ , der universellen Gaskonstante  $R$  sowie dem präexponentiellen Faktor  $\eta_0$  nach Gleichung (5) beschrieben werden.

$$\eta(T) = \eta_0 \cdot e^{-\frac{E_a}{R \cdot T}} \quad (5)$$



Bei diesem Ansatz wird eine temperaturunabhängige Aktivierungsenergie vorausgesetzt. Diese Voraussetzung ist für Systeme im Glaszustand sowie für untersättigte, niedrigviskose System gültig, da der Anteil zwischen freiem und besetztem Volumen bei diesen ebenfalls nahezu temperaturunabhängig ist. Die Aktivierungsenergie  $E_a$  für diese Systeme liegt in einem Bereich von 10 – 50 kJ/mol.

Angell et al. (1994) teilen amorphe Substanzen im Nicht-Glaszustand im Hinblick auf die Temperaturabhängigkeit ihrer Viskosität in stabile und fragile Substanzen ein. Bei stabilen Substanzen tritt wiederum der Fall ein, dass das freie Volumen nicht temperaturabhängig ist. Somit kann die Temperaturabhängigkeit der Viskosität  $\eta$  auch im Nicht-Glaszustand der übersättigten Lösung (Bereich zwischen der Glasübergangstemperatur  $T_g$  und der Schmelztemperatur von Wasser  $T_m$  bzw. Gelöstem  $T_S$ , vgl. Abbildung 6) nach Arrhenius (Gleichung (5)) beschrieben werden. Für fragile Substanzen hat sich gezeigt, dass die Viskosität im Nicht-Glaszustand sehr viel stärker temperaturabhängig ist, als sie mit der Arrheniusgleichung beschrieben werden kann. Bei diesen Systemen ist die Aktivierungsenergie  $E_a$  von Relaxationsprozessen temperaturabhängig und nimmt mit steigender Temperatur ab.

Im Nicht-Glaszustand einer übersättigten Lösung nimmt die Wechselwirkungsenergie mit abnehmender Temperatur zu. Die Aktivierungsenergie für viskoses Fließen wird in diesem Bereich durch die Temperaturabhängigkeit der intermolekularen Wechselwirkungen und durch die Temperaturabhängigkeit des freien Volumens beeinflusst. Das bedeutet, dass die Moleküle in diesem Zustand sowohl aufgrund einer erhöhten thermischen Energie als auch aufgrund des zunehmenden Anteils an freiem Volumen im System beweglicher werden. Die Aktivierungsenergie nimmt mit abnehmender Temperatur zu und nähert sich im Bereich der Glasübergangstemperatur sehr hohen Werten von 200 – 400 kJ/mol an (Champion et al., 2000).

Für amorphe Polymere wird der Zusammenhang zwischen der Viskosität  $\eta$  und der Temperatur im Nicht-Glaszustand in einem Temperaturbereich  $T_g+50$  K nach der empirisch ermittelten Williams-Landel-Ferry-(WLF)-Gleichung (6) beschrieben (Williams et al., 1955).

$$\log \frac{\eta}{\eta_R} = \frac{-C_1(T - T_R)}{C_2 + (T - T_R)} \quad (6)$$

In Gleichung (6) wird die Viskosität  $\eta$  bei der Temperatur  $T$  auf die Viskosität  $\eta_R$  bei der Referenztemperatur  $T_R$  bezogen. Wird als Referenztemperatur die Glasübergangstemperatur  $T_g$

herangezogen, so konnten Williams et al. (1955) universelle Werte für  $C_1$  bzw.  $C_2$  von 17,4 bzw. 51,6 K ermitteln.

Entsprechend der Viskosität  $\eta$  kann die Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten chemischer Prozesse,  $k$ , für die ein diffusionslimitierter Schritt (siehe Stokes-Einstein, Gleichungen (3) und (4)) geschwindigkeitsbegrenzend wirkt, nach den erläuterten Modellen beschrieben werden. In den meisten Fällen ist  $k$  jedoch nicht perfekt an die Viskosität gekoppelt. Aus diesem Grund wurde ein Kopplungsfaktor  $\gamma$  eingeführt. Damit soll dem Unterschied zwischen der Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten  $k$  mit der Diffusionskonstanten  $D$  und der Temperaturabhängigkeit der Viskosität  $\eta$  nach Gleichung (7) Rechnung getragen werden (Gou et al., 2000).

$$\frac{k_{T_2}}{k_{T_1}} \approx \frac{D_{T_2}}{D_{T_1}} \approx \left( \frac{\eta_{T_1}}{\eta_{T_2}} \right)^\gamma \quad (7)$$

Sind strukturelle und chemische Reaktionen direkt gekoppelt, dann nimmt  $\gamma$  den Wert 1 an. Aus den Gleichungen (6) und (7) geht hervor, dass bei diffusionslimitierten Reaktionen im Nicht-Glaszustand die Reaktionsgeschwindigkeit nicht von der Temperatur  $T$  *per se*, sondern nur von der Temperaturdifferenz zwischen Glasübergangstemperatur  $T_g$  und der Temperatur  $T$  abhängig ist.

Betrachtet man nun die Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten  $k$  für eine Reaktion über einen Temperaturbereich hinweg, der den Glaszustand ( $T < T_g$ ), den übersättigten Nicht-Glaszustand ( $T_g < T < T_{m,S}$ ) und den Zustand der untersättigten Lösung ( $T > T_{m,S}$ ) einschließt, so ergibt sich für ein fragiles System theoretisch der in Abbildung 12 dargestellte Verlauf.

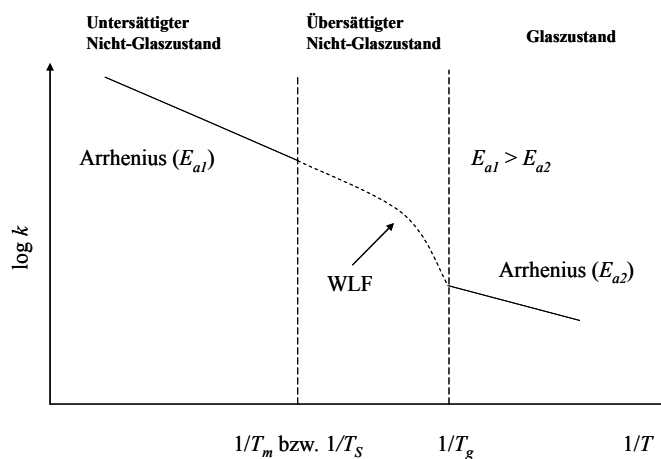


Abbildung 12: Einfluss der Temperatur auf die Geschwindigkeitskonstante  $k_{T,aw}$  in einem fragilen System (modif. nach Karel und Saguy (1989)). (WLF=Williams-Landel-Ferry)

Abbildung 12 zeigt, dass die Geschwindigkeitskonstante unterhalb von  $T_g$  auf einem niedrigen Niveau und mit einer temperaturunabhängigen Aktivierungsenergie  $E_a$  nach Arrhenius beschreibbar in Abhängigkeit von  $1/T$  verläuft. Bei Überschreitung von  $T_g$  nimmt die Geschwindigkeitskonstante sprunghaft und nach WLF beschreibbar zu. Begründet ist dies in einer sprunghaft abnehmenden Diffusionslimitierung der Moleküle. Je höher also die Diffusionslimitierung und je fragiler das System ist, umso stärker ist auch der sprunghafte Anstieg ausgeprägt.

## 2.4 Schutzmechanismen von Biomolekülen

Unterschiedliche Hilfsstoffe können gefrier- und trocknungsbedingte Membranveränderungen und Proteindenaturierung vermeiden. Man bezeichnet Schutzstoffe, die während des Gefrierens wirken, als Cryoprotektoren, und Schutzstoffe, die während der Gefriertrocknung wirken, als Lyoprotektoren. Zu den Cryo- und Lyoprotektoren gehören beispielsweise Saccharide, Aminosäuren, Polyole, Methylamine, Polyethylenglykol und anorganische Salze.

Die Schutzwirkung der Zucker auf Membranlipide und Proteine lässt sich auf unterschiedliche Schutzmechanismen zurückführen, nämlich

- Preferential Hydration,
- Water Replacement,
- Stabilisierung in einer Glasmatrix.

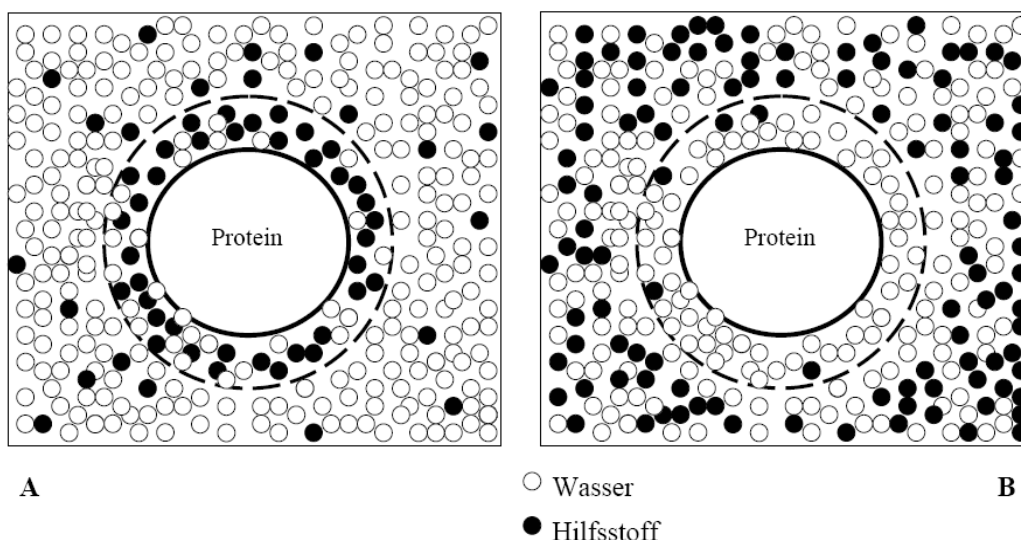
Durch diese Modelle kann die Schutzwirkung der cryo- und lyoprotektiven Stoffe bzw. die Verhinderung irreversibler Veränderungen der strukturellen und funktionellen Integrität während der unterschiedlichen Phasen der Gefriertrocknung theoretisch beschrieben werden. Diese Schutzmechanismen wurden aus Experimenten an isolierten Systemen (Proteine, Phospholipiden) abgeleitet und für diese teilweise verifiziert. Im Folgenden werden die genannten Modelle näher erläutert sowie das etablierte Wissen und die Erkenntnisse darüber dargestellt. Es sei darauf hingewiesen, dass die Modelle nicht in Konkurrenz zueinander stehen, sondern während unterschiedlicher Phasen der Gefriertrocknung, je nach Restwassergehalt und physikalischem Zustand, theoretisch bedeutsam sind.

### 2.4.1 Preferential Hydration, Preferential Binding

Der Wasserentzug während des Gefrierens und der Gefriertrocknung kann aufgrund der in Kapitel 2.1 beschriebenen Mechanismen zur Denaturierung von Proteinen und zur Schädigung der Zellmembran führen. Man kann jedoch stabilisierende Hilfsstoffe, wie Zucker oder

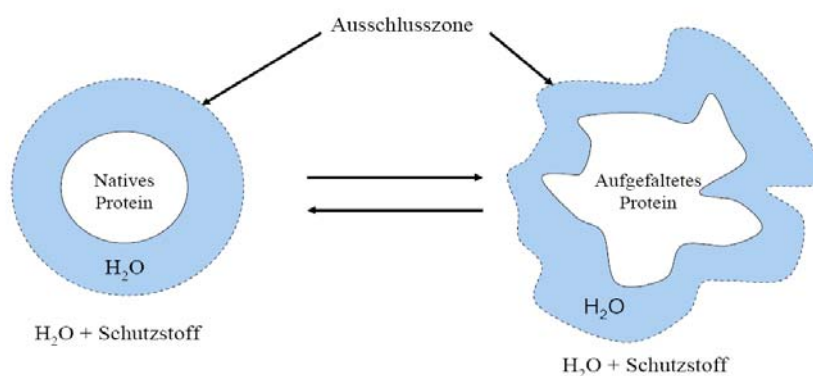
andere kompatible Substanzen (z.B. Prolin, Glutamat, Betain, Carnitin) einsetzen, die das Gleichgewicht zwischen dem denaturierten Zustand und dem nativen Zustand zu Gunsten des nativen Zustands verschieben (Timasheff, 2002). Die mechanistischen Vorstellungen zu diesem Effekt sollen nachfolgend dargelegt werden.

Timasheff (2002) konnte ermitteln, dass in einer wässrigen Lösung mit Hilfsstoffmolekülen, Wassermolekülen und Proteinmolekülen eine ganz spezifische Anordnung der Stoffe untereinander stattfindet. Je nach Wechselwirkung werden die Hilfsstoffe entweder an der Proteinoberfläche angereichert, wie in Abbildung 13A dargestellt (Preferential Binding). Diese Konstellation führt zur Destabilisierung der nativen Proteinstruktur, da intermolekulare Bindungen im Protein geschwächt werden. Andere Hilfsstoffe werden vorzugsweise von der Proteinoberfläche ausgeschlossen. Die Mechanismen, die zum Ausschluss des Hilfsstoffes führen sind unterschiedlich. Es ist ein Zusammenspiel zwischen unspezifischen und spezifischen Effekten, wie sterische Hinderung, solvophobe Effekte und Erhöhung der Oberflächenspannung von Wasser (Cioci und Lavecchia, 1997; Timasheff und Arakawa, 1989). Als Folge des Ausschlusses der Hilfsstoffmoleküle wird die direkte Umgebung des Proteins vorzugsweise mit Wassermolekülen angereichert (Preferential Hydration). Dies führt zur Stabilisierung der nativen Proteinstruktur (Abbildung 13B). Es wurde ermittelt, dass alle Substanzen, die von der Proteinoberfläche ausgeschlossen werden, die native Struktur bei denaturierenden Bedingungen stabilisieren.



**Abbildung 13: Anlagerung von Hilfsstoffen an die Proteinoberfläche A: Preferential Binding; B: Preferential Hydration (Preferential Exclusion) (Timasheff und Arakawa, 1989).**

Die Stabilisierung des Proteins wird durch die Erhöhung des chemischen Potentials des Proteins durch den Hilfsstoff erklärt, der eine Wechselwirkung mit dem Lösungsmittel favorisiert. Diese Erhöhung ist proportional zur Grenzfläche zwischen Protein und Lösungsmittel. Eine Denaturierung des Proteins würde dazu führen, dass die Kontaktfläche zwischen Protein und Lösungsmittel und damit auch der Bereich des Ausschlusses des Hilfsstoffes deutlich vergrößert wäre (vgl. Abbildung 14). Aufgrund der geringeren und somit energetisch günstigeren Ausschlussfläche des nativen Proteins im Vergleich zum entfalteten wird deshalb das Gleichgewicht zwischen dem denaturierten Zustand und dem nativen Zustand zu Gunsten des nativen Zustands verschoben.



**Abbildung 14: Ausschlussfläche des nativen und entfalteten Proteins (Timasheff, 1992)**

Es kann also abgeleitet werden, dass das Vorhandensein von Wasser bei diesem Schutzmechanismus eine große Rolle spielt. Der Schutzmechanismus „Preferential Hydration“ kann somit nur bis zu einem minimalen Restwassergehalt wirken, bei dem noch genügend Wasser für die Ausbildung einer Hydratierungsschicht um das Protein vorhanden ist. Dieser Restwassergehalt liegt bei Makromolekülen im Bereich von ca.  $0,3 \text{ g}_{\text{H}_2\text{O}}/\text{g}_{\text{Trockenmasse}}$  (Hoekstra, 2001).

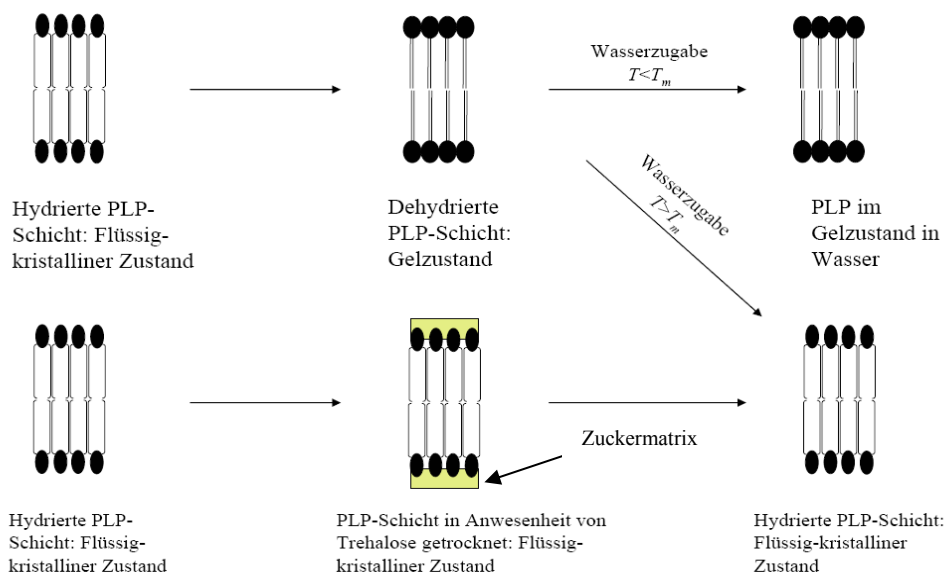
## 2.4.2 Water Replacement

Wie soeben erläutert, kann der Schutzmechanismus „Preferential Hydration“ nur bis zu einem Wasseranteil von  $0,3 \text{ g}_{\text{H}_2\text{O}}/\text{g}_{\text{Trockenmasse}}$  wirken. Um bei weiterem Wasserentzug eine strukturelle Veränderung von Membranen oder Proteinen durch Verlust der Hydrathülle zu verhindern, ersetzen Hilfsstoffmoleküle das entfernte Wasser durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Zucker und polaren Gruppen von Phospholipiden und Proteinen. Zusammen mit den wenigen Restwassermolekülen bilden die Zucker eine der Hydrathülle ähnliche Schutzschicht aus (vgl. Abbildung 15), was zur Folge hat, dass die native Proteinstruktur auch im stark dehydrierten Zustand dem im hydrierten entspricht und so stabilisiert wird (Oetjen und Haseley, 2004; Crowe et al., 1998).



**Abbildung 15: Wirkungsweise von Schutzstoffen in dehydrierten Proteinlösungen (Oetjen und Haseley, 2004)**

Wie bereits in Kapitel 2.1 beschrieben, führt die Entfernung des Wassers von den polaren Kopfgruppen der Phospholipide dazu, dass deren Abstand vermindert wird und die Packungsdichte der Acylketten steigt, wodurch die Phasenübergangstemperatur  $T_m$  der Membran vom Gel- in den flüssig-kristallinen Zustand ansteigt. Di-, Tri-, Tetrasaccharide sowie Fruktane sind in der Lage, durch „Water Replacement“ das den Phospholipiden durch Trocknung entzogene Wasser durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit den polaren Kopfgruppen zu ersetzen. Diese Interaktionen der Zuckermoleküle mit den Kopfgruppen der Membranlipide haben zur Folge, dass der ursprüngliche Abstand zwischen den Kohlenwasserstoffketten auch während der Trocknung weitgehend erhalten bleibt und  $T_m$  gesenkt wird (vgl. Abbildung 16).



**Abbildung 16: Schutzwirkung der Zucker bei der Trocknung von biologischen Membranen (Crowe et al., 1998)**

So kann der Phasenübergang der Membran sowie Schädigungen während der Trocknung verhindert werden. Bei der Rehydratisierung werden die Zuckermoleküle wieder durch Wassermoleküle ersetzt (Crowe et al., 1998).

Bei Membranen dagegen, die aufgrund des Mangels an Schutzstoffen nach der Trocknung im Gelzustand vorliegen, kann während der Wiederbefeuchtung der Phasenübergang in den flüssig-kristallinen Zustand nur bei Rehydratisierungstemperaturen oberhalb von  $T_m$  stattfinden. Eine Rehydratisierung bei Temperaturen unterhalb von  $T_m$  hat deshalb eine Zerstörung der Zelle zur Folge (vgl. Abbildung 16) (Billi et al., 2000; Crowe et al., 1988; Hoekstra et al., 2001; Leslie et al., 1995).

### 2.4.3 Stabilisierungspotential einer Matrix im Glaszustand

Die Interaktionen zwischen Zucker- und Biomolekülen nach Entfernung des Wassers und somit die Schutzfunktion können nur wirken, wenn sich der Zucker im gelösten bzw. amorphen Zustand befindet und nicht auskristallisiert (Crowe et al., 1998; Izutsu et al., 1994; Pikal und Rigsbee, 1997). Je nach Temperatur und Restwassergehalt ist der amorphe Zustand jedoch ein sehr instabiler Zustand. Deshalb müssen Bedingungen gewählt werden, die zur Ausbildung einer kinetisch stabilen Glasmatrix des Zuckers führen. In diese Glasmatrix werden die Biomoleküle eingeschlossen und stabilisiert. Es wird die Diffusion von Molekülgruppen verhindert, die schädigende Reaktionen bewirken könnten. Nach Crowe et al. (1998) sind es vor allem die Disaccharide, die als Lyoprotektoren eingesetzt werden sollten, da sie von der hydrierten Proteinoberfläche bevorzugt ausgeschlossen werden können, bei Raumtemperatur im Glaszustand vorliegen und aufgrund ihrer geringen Größe und der multiplen Hydroxylgruppen gut mit den polaren Resten dehydrierter biomolekularer Oberflächen reagieren können.

Im Hinblick auf die Schutzmechanismen von Zuckern kann also grundlegend davon ausgegangen werden, dass während unterschiedlicher Trocknungsphasen je nach Restwassergehalt unterschiedliche Schutzmechanismen wirken. Solange sich das Biomolekül während der Trocknung noch im hydrierten Zustand befindet, wird dessen molekulare Veränderung durch die bevorzugte Hydrierung der Oberfläche bzw. der Ausbildung einer Hydrathülle um die Oberfläche verhindert (Preferential Hydration). Bei weiterem Wasserentzug, der auch die Entfernung der Hydrathülle zur Folge hat, sollten die Zuckermoleküle direkt an die polaren Reste der Moleküloberfläche binden, um strukturelle Veränderungen durch inter- und intramolekulare Bindungen zu vermeiden (Water Replacement). Dieser Zustand des „Water Replacement“ ist jedoch nur dann stabil, wenn sich das System im Glaszustand befindet, da in diesem Zustand chemische und physikalische Veränderungen aufgrund der hohen Viskosität und des geringen Anteils an freiem Volumen stark verzögert ablaufen.

### 3 AKTUELLER STAND DES WISSENS

Im Folgenden werden die bekannten Einflussfaktoren auf die Stabilität von Mikroorganismen während der einzelnen Schritte des Gefriertrocknungsprozesses (Gefrieren und Wasserentfernung) sowie der anschließenden Lagerung dargestellt. Die bisherigen Arbeiten auf diesen Gebieten sind überwiegend empirischer Natur. Es konnten Phänomene ermittelt werden, die allerdings beim Vergleich untereinander kein eindeutiges Bild ergeben. Die Gründe für die fehlende Vergleichbarkeit sind vor allem das fehlende Aufklären der Hintergründe zu den ermittelten Phänomenen sowie lückenhafte Angaben zu Versuchsbedingungen. Insbesondere sind über den Einfluss des Glaszustands auf die Stabilität von Mikroorganismen zum jetzigen Zeitpunkt keine aussagekräftigen Arbeiten verfügbar, sondern müssen erst noch erarbeitet werden. Deshalb werden für den Aspekt der Stabilisierung von Biomolekülen im Glaszustand die Kenntnisse an isolierten Systemen (Proteine, Liposomen) (Kapitel 3.4) näher erläutert.

#### 3.1 Einflussfaktoren auf die Stabilität von Mikroorganismen beim Gefrieren

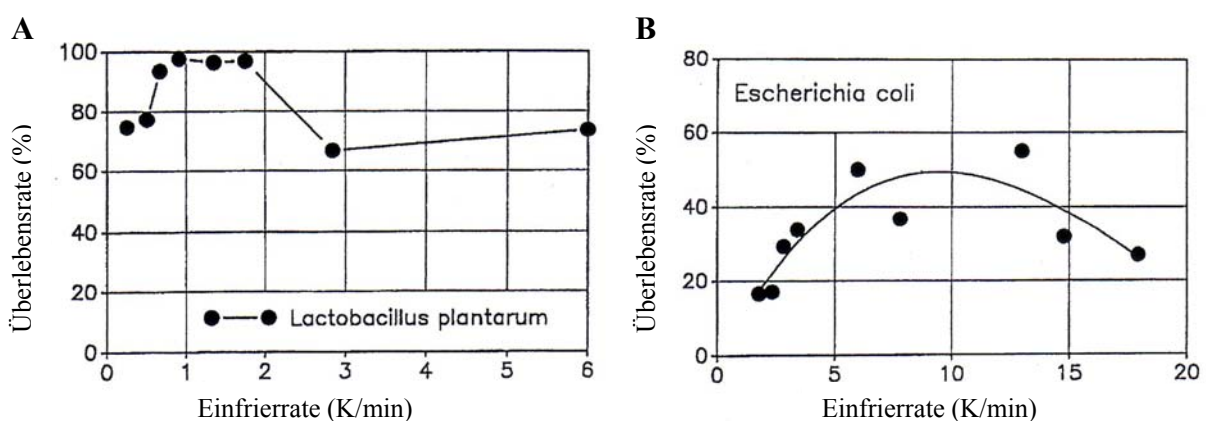
Für die Überlebensrate nach dem Gefrieren wurden bisher diverse Einflussfaktoren ermittelt. Ein Einflussfaktor, für den aus der Literatur stimmige Ergebnisse verfügbar sind, ist die Verbesserung der Überlebensrate nach dem Gefrieren, wenn Schutzstoffe (Glycerin, Sulfoxide, Polyvinylpyrrolidon, Saccharide) zugesetzt werden im Vergleich zum Gefrieren ohne Schutzstoffe (de Antoni et al., 1989; Merymann, 1971). Außerdem wurde vereinzelt der Einfluss der Fermentationsparameter auf die Gefriertoleranz von Mikroorganismen ermittelt. So spielt der physiologische Zustand der Zellen, in dem die Fermentation beendet wird, eine wichtige Rolle. Zellen, die am Ende der exponentiellen Wachstumsphase am Übergang zur stationären Phase geerntet wurden, sind resistenter als Zellen aus der exponentiellen Phase (Pèter und Reichart, 2001). Im Hinblick auf die Fermentationsbedingungen während der Herstellung von Hefen und Lactobacillen besitzt nach Beal et al. (2001) auch die Zusammensetzung des Anzuchtmediums einen Einfluss auf die Widerstandsfähigkeit der Zellen während des Gefrierens. Durch die Verwendung von ungesättigten Fettsäuren im Fermentationsmedium resultieren Zellen, die ebenfalls einen erhöhten Gehalt an Phospholipiden mit ungesättigten Fettsäuren aufweisen. Der erhöhte Gehalt an ungesättigten Fettsäuren in einer Zellmembran bewirkt eine erhöhte Fluidität, die wiederum zu einem geringeren Verlust an lebenden Zellen nach dem Gefrierprozess führt. Außerdem kann die Zelldichte der zum Gefrieren verwendeten Suspension die Überlebensrate beeinflussen, da sich die Zellen in hochkonzentrierten Zellsuspensionen laut Gehrke (1991) gegenseitig vor den Schäden schützen. Ein Modell, das die Mechanismen dieser Schutzfunktion bei hohen Zelldichten erläutert, existiert jedoch nicht.



Bezüglich des Gefrierverfahrens besitzt die Kühlrate einen Einfluss auf die Überlebensrate. Hier ergeben sich aus der Literatur allerdings sehr unterschiedliche und unstimmgige Ergebnisse. Teilweise hat sich gezeigt, dass die Überlebensrate von Milchsäurebakterien mit zunehmender Gefriertrate im Bereich von 2 K/min bis 300 K/min zunehmend verbessert werden kann (Fonseca et al., 2001b; Morice et al., 1992). Im Gegensatz dazu hat sich bei Pèter und Reichart (2001) allerdings gezeigt, dass das Gefrieren in flüssigem Stickstoff mit einer Gefriertrate von 233 K/min bei Milchsäurebakterien zu einer schlechteren Überlebensrate führte als eine niedrigere Gefriertrate von 2,5 K/min. Aus diesen Ergebnissen lässt sich also weder ein qualitativer Einfluss der Gefriertrate, noch ein Schädigungsmechanismus ableiten. Begründet ist dies vor allem auch darin, dass die Autoren die unterschiedlichen Gefriertraten durch unterschiedliche Verweilzeiten und unterschiedliche Gefriertemperaturen realisierten. Folglich wurde neben der Gefriertrate sowohl die Zeit als auch die Endtemperatur variiert, deren Einflüsse möglicherweise nicht zu vernachlässigen sind.

Gehrke (1991) kommt unter Konstanthalten der Endtemperatur bei unterschiedlichen Gefriertraten zu einem anderen Ergebnis. Nach seinen Resultaten gibt es nicht ausschließlich einen Anstieg oder Abfall der Überlebensrate mit zunehmender Kühlrate, sondern die Überlebensrate weist in Abhängigkeit von der Kühlrate ein Optimum auf. Insbesondere existieren für unterschiedliche Mikroorganismen unterschiedliche optimale Gefriertraten.

Abbildung 17 zeigt die von Gehrke (1991) ermittelten Überlebensraten von *Lactobacillus plantarum* und von *Escherichia coli* in Abhängigkeit von der Gefriertrate.



**Abbildung 17:** Einfluss der Einfriertrate auf die Überlebensrate von **A:** *Lactobacillus plantarum*; **B:** *Escherichia coli* (Gehrke, 1991).

Abbildung 17 zeigt, dass das Optimum der Gefriertrate für *Lactobacillus plantarum* bei niedrigeren Werten liegt als für *Escherichia coli*. Gehrke (1991) begründet seine Ergebnisse mit

den Vorgängen bei der Eiskristallbildung. Demnach beginnt beim langsamen Gefrieren von Mikroorganismensuspensionen die Eiskristallbildung zunächst extrazellulär, was durch das Konzentrieren der extrazellulären Elektrolyte zu einer Differenz des Wasserdampfdrucks zwischen dem Zellinneren und der Umgebung führt (Mazur, 1984; Karlsson, 2001). Um das transmembrane osmotische Gleichgewicht zu erhalten, gibt die Zelle Wasser aus dem Cytoplasma an ihre Umgebung ab, wodurch sich die intrazelluläre Lösung weiter aufkonzentriert und so die extrazelluläre Eismasse weiter anwächst. Dies hat zur Folge, dass die Wasserabgabe aus dem intrazellulären Bereich zu einer Veränderung der intrazellulären Ionenkonzentration und des pH-Wertes führt. Dadurch werden Proteine denaturiert und die Zellmembran geschädigt.

Beim schnellen Gefrieren, zum Beispiel durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff, verbleibt ein Großteil des Wassers in der Zelle. Als Folge bilden sich in der intrazellulären übersättigten Suspension Eiskristalle. Nachdem sich zunächst sehr klein Eiskristalle gebildet haben folgt deren Wachstum und Zusammenlagerung, insbesondere wenn diese Vorgänge durch eine Temperaturerhöhung, beispielsweise während des Auftauens, beschleunigt werden. Große Eiskristalle können zu Strukturschädigungen der Zelle führen.

Die optimale Gefriertrate, bei der vergleichsweise wenige Zellen absterben, ist nach Gehrke (1991) langsam genug, um die Entstehung von intrazellulären Eiskristallen zu vermeiden und schnell genug, um hohe Salzkonzentrationen nicht zu lange auf die Zellen einwirken zu lassen.

Die optimale Gefriertrate ist von der Spezies, der Wasserabgabefähigkeit, sowie der Größe der Zellen, der Dicke der Zellmembran und dem physiologischen Zustand, in dem die Zellen eingefroren werden, abhängig. So konnten sowohl Gehrke (1991) als auch Pèter und Reichart (2001) beobachten, dass Hefen durch das sehr schnelle Gefrieren in flüssigem Stickstoff eine niedrigere Überlebensrate aufweisen als nach dem Gefrieren mit niedrigen Gefriertraten. Aufgrund der langsamen Wasserabgabe aus dem Zellinneren gefriert ein Großteil des Wassers intrazellulär und führt zu strukturellen Schädigungen. Auch bei *Lactobacillus plantarum* erfolgt die Wasserabgabe langsam, was in der dichteren Zellmembran des gram positiven Bakteriums begründet ist. Somit liegt das Gefriertratenoptimum bei diesem Mikroorganismus bei niedrigen Werten (vgl. Abbildung 17). Im Gegensatz dazu weist *Escherichia coli* als gramnegatives Bakterium eine hohe optimale Gefriertrate auf (vgl. Abbildung 17), da die Wasserabgabe bei diesem Bakterium aufgrund der dünnen Zellmembran sehr schnell verläuft.

Nachdem bekannt ist, dass durch das Gefrieren an sich die Überlebensrate mehr oder weniger beeinträchtigt werden kann, stellt sich nun die Frage, inwieweit diese Gefrierschädigung einen Anteil an der Gesamtschädigung nach der Lyophilisation besitzt. Zwar konnten To und Etzel (1997) sowie Tsvetkov und Brankova (1983) ermitteln, dass die Zellen, die das Gefrieren überstanden haben auch die Dehydrierung überstehen. Dies ist insofern plausibel, als dass durch das Gefrieren bereits das verfügbare Wasser aus dem System entzogen wird, wobei während der Sublimation nur noch Eiskristalle, entfernt werden. Das Gefrieren würde somit den eigentlichen Wasserentzugsschritt darstellen. Gehrke (1991) kam jedoch bei genauerer Differenzierung zwischen den unterschiedlichen Abschnitten der Gefriertrocknung und deren Auswirkungen auf die Überlebensrate zu einem anderen Ergebnis. Während des Einfrierens ist bereits ein relativ hoher Verlust an Keimzahlen zu verzeichnen, der während der Sublimation nur in sehr geringem Maß zunimmt. Jedoch findet während der Desorptionsphase bei niedrigen Restwassergehalten eine weitere Inaktivierung statt. Gehrke (1991) untersuchte diesen Zusammenhang jedoch nur für eine einzelne Gefriertrocknungsbedingung, also ohne Variation von Kammerdruck und Stellflächentemperatur. Zu einem ganz anderen Ergebnis kamen Conrad et al. (2000). In deren Arbeit konnte die Lebensfähigkeit von *Lactobacillus acidophilus* direkt nach dem Gefrieren vollständig erhalten werden, am Ende der anschließenden Trocknung war die Überlebensrate jedoch verringert (Überlebensrate 64 – 90% nach der Gefriertrocknung). Es ist demnach also unklar, welche Bedeutung der Gefrierprozess im Gesamtkontext der Gefriertrocknung für die Überlebensrate besitzt. Aufschluss darüber könnte die Ermittlung des Anteils an ausgefrorenem Wasser nach dem Gefrieren geben, da dieser Prozess aufgrund der Bildung von Eiskristallen bereits eine „Trocknung“ darstellt. Bei der anschließenden Sublimation von Eiskristallen wird somit nur Wasser entfernt, das für die Intaktheit der Mikroorganismen keine Bedeutung mehr besitzt, da es bereits vor der Sublimation aus dem System entfernt wurde. Dieser Aspekt wurde bisher allerdings nicht berücksichtigt.

Abschließend lassen sich bezüglich der Überlebensrate nach dem Gefrieren also folgende Aussagen treffen. Die Zellen werden durch das Gefrieren mehr oder weniger geschädigt. Unter Umständen können auch Fermentationsbedingungen, Zellkonzentration und die Gefriertrate einen Einfluss auf die Stabilität der Zellen während des Gefrierens besitzen. Die genauen Mechanismen für diese Einflüsse sind jedoch nicht bekannt. Lücken ergeben sich insbesondere für die Bedeutung der Gefrierendtemperatur und der Verweilzeit entkoppelt von der Gefriertrate für die Überlebensrate. Aus dem Kenntnisstand bezüglich des Gefrierens von Mikroorganismen lassen sich also keine als optimal geltenden Gefrierbedingungen für die hier vor-

liegende Arbeit ableiten. Diese müssen separat ermittelt werden. Außerdem kann keine Aussage getroffen werden, welche schädigende Wirkung der Gefrierprozess im Gesamtkontext der Gefriertrocknung besitzt.

### 3.2 Gefriertrocknung von Mikroorganismen

Schädigungen von Mikroorganismen durch Trocknung im Allgemeinen lassen sich nach Vermutungen von Leslie et al. (1994) vor allem auf Veränderungen des physikalischen Zustands von Membranlipiden und der Struktur von sensitiven Proteinen in Zellwand und Zellmembran zurückführen. Diese Veränderungen können den Zelltod zur Folge haben. Die Autoren leiten diese Hypothese aus einer FTIR-Messung des Anstiegs der Schmelz- bzw. Übergangstemperatur der Membran von der flüssig-kristallinen Phase zur Gelphase mit fortschreitendem Wasserentzug ab. Je nach Trocknungstemperatur und Restwassergehalt erreicht die Produkttemperatur die Phasenübergangstemperatur, bei der ein Phasenübergang von der flüssig-kristallinen Phase in die Gelphase stattfindet. Bei der Rehydratisierung durchlaufen die Membranen in der Gelphase dann wieder den Phasenübergang zum flüssig-kristallinen Zustand wenn die Rehydratisierungstemperatur oberhalb von  $T_m$  liegt. Dabei wird die Doppelschicht in den Regionen mit Packungsfehlern partiell durchlässig. Infolgedessen kommt es zur Störung der ansonsten sehr kontrollierten Transportvorgänge durch die Zellmembran (Crowe et al., 1989). Auch Santivarangkna et al. (2007) konnten eine Schädigung der Zellhülle nach der Vakuumtrocknung feststellen. Für die Gefriertrocknung von *Lactobacillus acidophilus* stellten Brennan et al. (1986) eine erleichterte Extraktion eines Oberflächenproteins aus der Zellwand fest. Daraus schlossen die Autoren auf eine Destabilisierung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Protein und der Zellwand, die für die Enzymfunktionalität notwendig sind. Aus diesen Ergebnissen kann also geschlossen werden, dass der Ort der Hauptschädigung durch Dehydrierung die Zellmembran mit den membrangebundenen Proteinen darstellt. Diese Zellkomponente muss also während der Trocknung geschützt und in ihrem nativen Zustand erhalten bleiben.

Wegen der großen Bedeutung des Wasser für die native Konformation von Proteinen und für die Intaktheit der Zellmembran kann vermutet werden, dass der Restwassergehalt im getrockneten Produkt, der neben der Zusammensetzung und der Trocknungsdauer auch von den Trocknungsparametern Druck und Stellflächentemperatur abhängt, einen großen Einfluss auf die Überlebensrate besitzt. Mit zunehmender Trocknungsdauer nimmt der Restwassergehalt im Produkt immer weiter ab, was sich somit auch bei der Überlebensrate zeigen müsste. Allerdings wurde die Entwicklung der Lebendkeimzahl während der Gefriertrocknung in Ab-

hängigkeit vom Restwassergehalt nur in Arbeiten von de Valdez et al. (1985a) und Gehrke (1991) erfasst. Sie haben gezeigt, dass für verschiedene Spezies bei jeweils gleich bleibenden Trocknungsbedingungen die Lebendkeimzahlen im Laufe des Wasserentzugs konstant bleiben, bis eine kritische Feuchte im Produkt unterschritten wird. Diese kritische Feuchte betrug Werte um 5 % (bezogen auf die Masse der feuchten Probe nach der Gefriertrocknung).

Von diesen Arbeiten abgesehen wurde jedoch in der überwiegenden Zahl der publizierten Untersuchungen der Restwassergehalt nicht berücksichtigt und nur die Zellkonzentration am Ende im Vergleich zur Zellkonzentration vor der Trocknung ermittelt (Abadias et al., 2001; Costa et al., 2000; Palmfeldt et al., 2003;). Als Ende der Trocknung wurde jeweils das Erreichen gleicher Trocknungszeiten definiert, was bei unterschiedlicher Zusammensetzung unterschiedliche Restwassergehalte der Präparate zur Folge hat (de Valdez et al., 1985a) und somit zu falschen Schlussfolgerungen im Hinblick auf Schutzeffekte führen kann. Beispielsweise hat sich in der Arbeit von de Valdez et al. (1985a) herausgestellt, dass Adonit im Vergleich zu anderen Zusatzstoffen wie Polyethylenglycol oder Magermilch bei gleicher Trocknungsdauer zwar zur höchsten Überlebensrate führt. Gleichzeitig weisen die Proben mit Adonit bei gleicher Trocknungsdauer jedoch auch den höchsten Restwassergehalt auf. Deshalb vermuten de Valdez et al. (1983), dass von Schutzstoffen ein indirekter Schutzeffekt aufgrund einer erhöhten Wasserbindung ausgeübt wird. Unterschiede im Restwassergehalt nach der Gefriertrocknung machen auch Ekdawi-Sever et al. (2003) sowie Zhao und Zhang (2005) für Unterschiede in der Überlebensrate nach der Gefriertrocknung verantwortlich. Sie stellten fest, dass bei einer höheren Gefriertrate kleinere Eiskristalle und somit kleinere Poren in der Produktmatrix vorliegen (vgl. Kapitel 22), die einen Widerstand für das sublimierende Eis darstellen. Aufgrund der langsameren Entfernung des Wassers besaßen die Proben nach gleicher Trocknungsdauer einen höheren Restwassergehalt, auf den die Autoren die etwas erhöhte Überlebensrate zurückführen.

In der Mehrzahl der publizierten Arbeiten wurde bei der Ermittlung des Einflusses verschiedener Schutzstoffe auf die Überlebensrate dem Restwassergehalt allerdings keine Rechnung getragen, was wegen der anzunehmenden großen Bedeutung dieses Faktors als eine zu schließende Kenntnislücke zu sehen ist. Das hat zur Folge, dass die Vergleichbarkeit und die Aussagen über Schutzpotential von Schutzstoffen, die im Folgenden zusammengefasst sind, kritisch zu betrachten sind.

Als Schutzstoffe werden für die Gefriertrocknung von verschiedenen Mikroorganismenspezies zum Beispiel Zucker (Glukose, Fruktose, Laktose, Trehalose, Saccharose), Polyole (Gly-

cerin, Mannit, Sorbit, Inosit, Adonit), Polymere (Dextrane, Stärke, Polyethylenglycol), Proteine, Aminosäuren, stickstoffhaltige Verbindungen (Glutamat, Pepton), Antioxidantien (Propylgallat) oder komplexe Systeme wie Magermilch eingesetzt (Carvalho et al., 2003; Carvalho et al., 2004, de Valdez et al., 1983; Zhao und Zhang, 2005). Trotz der Vielzahl an Arbeiten ist es jedoch trotzdem nicht möglich, einen besten Schutzstoff für Milchsäurebakterien zu benennen.

Abadias et al. (2001) konnten nachweisen, dass die Schutzwirkung nicht nur vom jeweils zugesetzten Stoff, sondern auch von dessen Konzentration abhängig ist.

Die Autoren de Valdez et al. (1983) haben festgestellt, dass die Wirkung der Schutzstoffe mit der jeweiligen Mikroorganismenspezies auf nicht näher beschriebene Weise variiert. Nach Palmfeldt et al. (2003) ist die Überlebensrate von Mikroorganismen nach der Gefriertrocknung generell von der jeweiligen Spezies, zum Teil vom Stamm und von der Zellkonzentration abhängig.

Weitere Einflussfaktoren auf die Überlebensrate nach der Gefriertrocknung stellen die Anzuchtbedingungen sowie die Rehydratisierungsbedingungen dar (Abadias et al., 2001b; Broadbent und Lin, 1999; Costa et al., 2000; de Valdez et al., 1985b).

Summarisch kann bei Betrachtung des Kenntnisstands bezüglich der Einflussfaktoren der Lyophilisation auf die Überlebensrate von Mikroorganismen folgendes festgestellt werden. Es existieren Schutzstoffe, durch deren Zusatz die Überlebensrate nach der Gefriertrocknung verbessert werden kann. Es ist jedoch weder möglich, einen Schutzstoff als den besten Schutzstoff zu bestimmen, noch ist es möglich einen Schutzmechanismus aus den Darstellungen abzuleiten. Die Vergleichbarkeit der einzelnen Arbeiten ist aufgrund der vielen einzelnen Variablen (Schutzstoffart, Schutzstoffkonzentration, Trocknungsbedingungen, Zellkonzentration, Fermentationsbedingungen, Gefrierbedingungen, Restwassergehalt), die vermutlich alle einen Einfluss auf das Endergebnis besitzen, nicht möglich. Diese Variablen waren in den unterschiedlichen Arbeiten entweder nicht konstant oder wurden zum Teil überhaupt nicht berücksichtigt oder spezifiziert. Insbesondere existieren Lücken bezüglich der Bedeutung des Restwassergehalts im Verlauf der Gefriertrocknung für die Überlebensrate. Darüberhinaus ist unbekannt, in welchem Abschnitt der Gefriertrocknung ein Schutzstoff wirksam ist und mit welchem Schutzmechanismus die Schutzwirkung erklärt werden kann. Vor allem aber gibt es keine Ergebnisse zur Bedeutung der Gefriertrocknungsbedingungen wie Kammerdruck, Produkttemperatur, Stellflächentemperatur und Trocknungsgeschwindigkeit sowie hinsichtlich

des Zusammenhangs zwischen Trocknungsbedingungen und dem Schutzpotential von Schutzstoffen.

### 3.3 Lagerung von getrockneten Mikroorganismenpräparationen

Während der Lagerung finden verschiedene chemische Veränderungen in der Zelle statt, die zum Verlust der Lebensfähigkeit der Keime führen können. Castro et al. (1996) ermittelten für *Lactobacillus bulgaricus* Phospholipidveränderungen und konnten dafür zwei verschiedene Mechanismen nachweisen: Lipolyse und Oxidation. Durch lipolytische Aktivität nimmt der Anteil an gesättigten Fettsäuren direkt nach der Gefriertrocknung ab. Im weiteren Verlauf der anschließenden Lagerung war der Anteil an gesättigten Fettsäuren relativ konstant, hier konnte jedoch eine Abnahme der ungesättigten Fettsäuren aufgrund von Oxidation festgestellt werden. Die Änderung des Fettsäureprofils der Zellmembran scheint auch während der Lagerung einen großen Einfluss auf die Vitalität der Zelle zu besitzen. Infolge der Zunahme an gesättigten Fettsäuren nimmt die Membranfluidität ab wodurch die Phasenübergangstemperatur der Membran steigt. Durch die Veränderung der Fettsäuren wird auch die Hydrophobizität herabgesetzt. Infolgedessen wird die Abstoßungskraft der Membran für hydrophile Gruppen abgeschwächt. Durch das Herabsetzen der Hydrophobizität von Membranphospholipiden können zum Einen hydrophile Gruppen, wie beispielsweise Protonen, eindringen. Zum Anderen sind die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Membran und Enzymen unerlässlich für die Aktivität der Enzyme. Es konnte beispielsweise eine Abnahme der Aktivität des membrangebundenen Enzyms ATPase während der Lagerdauer ermittelt werden. Es wird vermutet, dass eine direkte Wechselwirkung von Peroxiden und deren Abbauprodukte mit dem Enzym verantwortlich für dessen Zerstörung sind. Eine Maßnahme, die zu einer höheren Stabilität führt, ist der Ausschluss von Sauerstoff (Andersen et al., 1999; Castro et al., 1995).

Die chemischen Schädigungsreaktionen werden durch höhere Temperaturen und erhöhte Wasseraktivität beschleunigt. So nimmt beispielsweise die Vitalität von getrockneten Mikroorganismen mit abnehmender Temperatur und abnehmender relativer Luftfeuchte langsamer ab (Abadias et al., 2001b; Ananta, 2006; Andersen et al., 1999; Castro et al., 1995; Clementi und Rossi, 1984; de Valdez und Diekmann, 1993; Teixeira et al., 1995; Scott, 1958) Die Lagerstabilität an sich ist auch vom jeweiligen Stamm abhängig (Carvalho et al., 2003; Carvalho et al., 2004; Scott, 1958).

Die Stabilität von Mikroorganismen während der Lagerung kann durch den Zusatz von Schutzstoffen zum Wachstumsmedium und/oder zum Trocknungsmedium verbessert werden. Schutzstoffe, die bisher zum Einsatz kamen, sind Zuckeralkohole (Mannit, Inosit, Sorbit),

Saccharide (Glucose, Arabinose, Saccharose, Laktose, Trehalose, Fruktose, Mannose), Polymere (Maltodextrin), Propylgallat und Glutamat (Andersen et al., 1999, Carvalho et al., 2004; Scott, 1958). Generell ist bekannt, dass Schutzstoffe, die von Mikroorganismen verstoffwechselt werden, keinen besseren Schutzeffekt besitzen als diejenigen, die schlechter bzw. nicht metabolisiert werden (Carvalho et al., 2002; de Valdez et al., 1983). Auch die von den Bakterien selbst gebildeten Exopolysaccharide führen zu keiner Verbesserung der Überlebensrate im Vergleich zu anderen Substanzen (Carvalho et al., 2004). In der Arbeit von de Valdez und Diekmann (1993) wurde außerdem ermittelt, dass bei niedrigen Temperaturen die Matrixzusammensetzung kaum einen Einfluss auf die Inaktivierung besitzt, bei hohen Lagertemperaturen allerdings große Inaktivierungsunterschiede bei verschiedenen Matrixzusammensetzungen erkennbar sind.

Wie bei der Gefriertrocknung ist es auch bei der Lagerung nicht möglich, ein eindeutiges Bild über das Potential einzelner Schutzstoffe aus der Literatur zu gewinnen und den Schutzstoff mit dem größten Schutzpotential festzulegen. Es hat sich gezeigt, dass unterschiedliche Schutzstoffe auch ein unterschiedliches Schutzpotential besitzen. Auf welchem Mechanismus die Schutzwirkung beruht, ist nicht bekannt. Die Vergleichbarkeit der Schutzwirkung zwischen den unterschiedlichen Arbeiten wird außerdem dadurch verhindert, da in den meisten Fällen keine Angaben zur relativen Luftfeuchte gegeben sind, unter denen die Mikroorganismepreparate gelagert wurden, die aber bekanntlich einen großen Einfluss auf die Stabilität besitzt.

Abschließend lässt sich feststellen, dass Vermutungen über Schädigungsmechanismen existieren (Zellmembran, membrangebundene Proteine), aber kein Mechanismus bekannt ist, auf dem der Schutzeffekt von zugesetzten Schutzstoffen beruht. Dies ist vor allem darin begründet, dass das Schutzpotential verschiedener Schutzstoffe nicht systematisch unter Berücksichtigung der Lagerbedingungen untersucht wurde. Entsprechend der theoretisch vorgeschlagenen Schutzmechanismen für Biomoleküle (Kapitel 2.4) besitzen auch die Lagerbedingungen einen Einfluss auf den Schutzeffekt, vor allem im Hinblick auf das Erreichen des Glaszustands. Dieser Zusammenhang ist für Mikroorganismen jedoch weitgehend unbekannt.

### **3.4 Glaszustand als Stabilitätskriterium für biologische Systeme**

Studien an isolierten Systemen haben gezeigt, dass die Glasübergangstemperatur  $T_g$  eine Grenzbedingung für die Stabilität von Biomolekülen darstellt. So konnte festgestellt werden, dass Proteinauffaltung und -aggregation, Fusion von Liposomen sowie Kristallisation amorpher Komponenten aufgrund der verringerten Viskosität im Nicht-Glaszustand schneller ab-



läuft als im Glaszustand (Chang et al., 1996; Sun et al., 1996; Chen et al., 1999; Franks, 1990; Ibach und Kind, 2007; Sun et al., 1998; Sun, 1998; Taragano und Pilosof, 2001). Nun sollte als nächster Schritt die Frage beantwortet werden, ob es außer der qualitativen Ermittlung der Stabilität im Glaszustand verglichen mit dem Nicht-Glaszustand bisher auch gelungen ist, die Temperaturabhängigkeit der Inaktivierung mit der molekularen Mobilität des Systems zu koppeln. Das bedeutet, dass die Temperaturabhängigkeit der Inaktivierung im Nicht-Glaszustand mit dem bekannten Modell von WLF vorhergesagt werden kann. Diese Frage kann aus der Literatur nicht ohne weiteres beantwortet werden. Es hat sich zwar bei Sun (1996) gezeigt, dass die Temperaturabhängigkeit der Stabilität von Erythrozyten im Nicht-Glaszustand mit Gleichung (6) und den universellen Werten der Konstanten beschrieben werden kann. Jedoch wurde in anderen Arbeiten der universelle Charakter von  $C_1$  und  $C_2$  widerlegt, so dass diese Koeffizienten systemabhängig angepasst werden müssen (Peleg, 1992; Sun, 1997; Sun, 1998). Darüberhinaus sind bisher nur Reaktionen bekannt, bei denen die Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit schwächer ausgeprägt ist, als die der Viskosität laut WLF (Gou et al., 2000; Roos und Himber, 1994; Shamblin et al., 2006). In den Arbeiten von Karmas et al. (2002), Schebor et al. (1996) und Schebor et al. (1997) wurde insbesondere eine Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten von der Temperatur *per se* im Nicht-Glaszustand gefunden. Aus diesen Arbeiten wurde geschlossen, dass die Theorie des Glaszustands nicht angewandt werden kann, um die Stabilität von Proteinen zu beschreiben, weil keine eindeutige alleinige Abhängigkeit der Inaktivierungsgeschwindigkeit von der Differenz  $T-T_g$  vorlag.

Neben den Untersuchungen an isolierten Systemen findet sich eine einzelne Arbeit, in der die Stabilität von getrockneter Hefe in einer trehalosehaltigen Matrix im Glaszustand und im Nicht-Glaszustand ermittelt wurde (Schebor et al., 2000). In dieser Arbeit wurden Temperaturen untersucht, die sowohl oberhalb wie teilweise unterhalb der gemessenen Glasübergangstemperatur  $T_g$  lagen. Für dieses System wurde festgestellt, dass die Inaktivierungsgeschwindigkeit im Glaszustand nicht markant verringert war. Allerdings wurden diese Untersuchungen bei verhältnismäßig hohen Temperaturen (45 °C – 85 °C) durchgeführt. Bei diesen Temperaturen konnten auch für andere biologische Systeme, wie beispielsweise Enzympräparate, kein Einfluss des Glaszustands mehr festgestellt werden (Schebor et al., 1997), da hier andere Schädigungsreaktionen sehr dominant sind. Möglicherweise hatte bei diesen Temperaturen der Glaszustand keinen Effekt mehr, weil hier bereits thermische Schädigungen auftreten, die auch durch eine herabgesetzte molekulare Mobilität nicht mehr verhindert werden können. Es ist anzunehmen, dass die Schutzwirkung des Glaszustands wenn dann bei moderaten Tempe-

raturen, für mesophile Mikroorganismen also in einem Bereich von 20 °C bis maximal 45 °C (Einsele et al., 1985) ausgeprägt ist.

Aus diesen Darstellungen geht also hervor, dass die alleinige Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten von der Temperaturdifferenz  $T-T_g$  für die Destabilisierung von Biomolekülen nicht geklärt ist. Dementsprechend ist offen, ob die Kopplung von Viskosität und Stabilität für biologische Systeme, insbesondere für komplexe Mikroorganismen, für den Glaszustand und den Nicht-Glaszustand gültig ist.

Im folgenden Kapitel sind nun die Zielsetzung und der Lösungsweg dargestellt, die sich aus den bisherigen Ausführungen ableiten.

#### 4 ZIELSETZUNG UND LÖSUNGSWEG

Zur Minimierung destabilisierender Einflüsse während der Trocknung und Lagerung von Mikroorganismen werden Schutzstoffe, z.B. Disaccharide, zugesetzt. Die Ergebnisse aus der Literatur zeigen, dass durch den Zusatz verschiedener Additive die Überlebensrate nach der Trocknung und während der anschließenden Lagerung erhöht werden kann. Allerdings ist es nicht möglich, eine generelle Aussage hinsichtlich der Schutzmechanismen und der Einflüsse von Trocknungsparametern zu treffen. Es fehlt das grundlegende Verständnis über Schutz- und Inaktivierungsmechanismen während der Trocknung und Lagerung für diese komplexen Systeme. Ferner sind die Einflüsse der verfahrenstechnischen Trocknungs- und Lagerungsbedingungen auf die Vitalität der Zellen sowie deren Zusammenspiel mit dem Schutzpotential von Additiven unbekannt. Auch die Entwicklung der Überlebensrate während der Gefrier-trocknung in unterschiedlichen Formulierungen sowie für unterschiedliche Verfahrensführungen in Abhängigkeit vom Restwassergehalt ist bisher noch nicht erforscht. Demnach ist unbekannt, in welchem Abschnitt der Trocknung die Mikroorganismen am stärksten geschädigt werden.

Es wird vermutet, dass während der Gefriertrocknung und Lagerung vor allem die Zellmembran und die membrangebundenen Proteine der Mikroorganismen geschädigt werden, was zum Verlust der Funktionalität führt. Für die Stabilität isolierter Modellsysteme (Proteine, Biomembranen) ist bekannt, dass diese verbessert wird, wenn die Biomoleküle in eine Schutzstoffmatrix eingebettet sind, die sich im Glaszustand befindet. Dagegen ist die Bedeutung des Glaszustands für die Stabilität von Mikroorganismen während der Trocknung und Lagerung unbekannt. Unter der Annahme des Glaszustands als Schutzmechanismus kommt der Verfahrensführung während der Trocknung und Lagerung allerdings eine entscheidende Rolle zu. Diese müsste demnach so gewählt werden, dass sich das Präparat einen Großteil der Prozesszeit im Glaszustand unterhalb der Glasübergangstemperatur befindet. Als Folge würde eine höhere Überlebensrate von Mikroorganismen resultieren, wenn die Präparate im Glaszustand getrocknet und gelagert werden.

Ziel der Arbeit war es deshalb, die Bedeutung der Verfahrenstechnik und des Weges zum Erreichen des Glaszustands für die Stabilität von Mikroorganismen während der Gefrier-trocknung und Lagerung für unterschiedliche Formulierungen aufzuklären. Dabei sollte ermittelt werden, ob die Schutzwirkung eines zugesetzten Schutzstoffes auf seiner Glasbildung beruht und die Zellen bei Trocknungs- und Lagerungsbedingungen im Glaszustand demnach besser geschützt werden als im Nicht-Glaszustand. Insbesondere sollte erforscht werden, ob

die Inaktivierung der Zellen während der Lagerung im Glaszustand und im Nicht-Glaszustand mit strukturellen Relaxationsprozessen gekoppelt ist und demnach mit bekannten Modellen für die Temperaturabhängigkeit dieser Relaxationprozesse beschrieben werden kann (Williams-Landel-Ferry oder Arrhenius).

Ein weiteres Ziel ist die Ermittlung der Zellenaktivierung während der Trocknung mit und ohne Schutzstoffe in Abhängigkeit vom Restwassergehalt. Dabei soll erforscht werden, in welchem Abschnitt der Trocknung die Zellen am stärksten geschädigt werden, in welchem Abschnitt unterschiedliche Schutzstoffe und Konzentrationen wirksam bzw. notwendig sind und welche Rolle die Prozessbedingungen bei der Trocknung mit und ohne Schutzstoffe besitzen.

Durch die Kenntnis des Zusammenhangs zwischen dem physikalischen Zustand und dem Einfluss von Prozessbedingungen soll es ermöglicht werden, durch gezielte Auswahl von Formulierungen für diese die am besten geeigneten Prozessbedingungen auszuwählen. Ferner sollen die Ergebnisse zu einem besseren Verständnis der Inaktivierung und Stabilisierung von Mikroorganismen während der Trocknung und Lagerung beitragen.

Der Lösungsweg dazu gliedert sich in folgende Schritte:

### **Gefrieren**

- Zur Gestaltung des Gefrierprozesses ist die Kenntnis über das Gefrierverhalten der Zellsuspensionen notwendig. Deshalb wurde der Zusammenhang zwischen der Gefriertemperatur und der Menge an ausgefrorenem Wasser für die Zellsuspensionen mit Laktose und Magermilch sowie ohne Schutzstoffe untersucht. Ferner stellt die Gefrierkurve der Zellsuspensionen mit Laktose einen Teil des für diese Formulierung erstellten Phasen-Zustandsdiagramms dar.
- Der Gefrierprozess, der dem Gefriertrocknungsprozess vorgeschaltet ist, muss zunächst so gestaltet werden, dass die Überlebensrate während dieses Prozesses nur minimal abnimmt. Aus diesem Grund wurde der Einfluss der Gefriergeschwindigkeit sowie der Endtemperatur auf die Überlebensrate des Testkeims ermittelt und im Anschluss die günstigsten Bedingungen ausgewählt. Dabei wurden die Zellen in einer umgebenden Lösung ohne Schutzstoff sowie mit Laktose oder Magermilch als Schutzstoff gefroren.
- Die Information über die Zeitabhängigkeit der Überlebensrate im gefrorenen Zustand soll zum Verständnis der prozessbedingten Abnahme der Überlebensrate wäh-

rend der anschließenden Lyophilisation beitragen. Aufgrund physikalischer Gesetzmäßigkeiten liegt während der Gefriertrocknung bei einem Trocknungszeitpunkt  $t_i$  ein Pellet vor, das oberhalb des Eisspiegels aus einem eisfreien, porösen Gerüst besteht. Unterhalb des Eisspiegels liegt gefrorenes Wasser neben dem nicht ausgefrorenen Anteil vor. Im Hinblick auf die Inaktivierung der Mikroorganismen während der anschließenden Gefriertrocknung kann also ein summarischer Inaktivierungseffekt vermutet werden, der sich zum Einen aus dem Wasserentzug und zum Anderen aus physikalischen/chemischen Schädigungsprozessen im gefrorenen Zustand zusammensetzt. Deshalb wurde die Überlebensrate in Abhängigkeit von der Verweilzeit im gefrorenen Zustand analysiert und untersucht, welchen Einfluss das Verweilen im gefrorenen Zustand während der Trocknung auf die Überlebensrate am Ende der Trocknung besitzt.

### Gefriertrocknung

- Für die Gefriertrocknung wurden Phasen-Zustandsdiagramme ( $T_m(c)$  und  $T_g(c)$ ) für Mikroorganismus/Laktose-Suspensionen mit unterschiedlichen Laktosekonzentrationen erstellt. Zur Ermittlung, ob Zellkomponenten in den Glaszustand übergehen oder ob die gemessene Glasübergangstemperatur  $T_g$  nur vom zugesetzten Zucker als Schutzstoff bestimmt wird, wurde auch das thermische Verhalten von getrockneten Zellsuspensionen ohne Schutzstoff gemessen. Die Zusammenhänge  $T_m(c)$  und  $T_g(c)$  von Zellsuspensionen mit Schutzstoff dienen zur Ermittlung des physikalischen Zustands des Präparates während der Trocknung. Ferner werden auf diesem basierend entsprechende Prozessbedingungen im Nicht-Glaszustand und im Glaszustand mit unterschiedlichen Temperaturdifferenzen  $T_P-T_g$  und Verweilzeiten in einem kinetisch stabilen oder instabilen Zustand ausgewählt. Für diese Prozessbedingungen werden sowohl die Trocknungscharakteristik als auch die Überlebensrate der Mikroorganismen während der Gefriertrocknung ermittelt.
- Im Vergleich zur Trocknung mit Laktose als Schutzstoff wird für die gleichen Prozessbedingungen auch die Überlebensrate der Zellen ohne Schutzstoff während der Gefriertrocknung in Abhängigkeit vom Restwassergehalt und der Trocknungszeit ermittelt. Diese Ergebnisse sollen einen Referenzwert darstellen und Aufschluss darüber geben, in welchem Abschnitt der Trocknung die verwendeten Schutzstoffe wirksam und notwendig sind. Ferner wird die Laktose enthaltende Magermilch und die als sehr effektiv geltende Trehalose auf ihr Schutzpotential bei unterschiedlichen

Prozessbedingungen zum Vergleich mit dem Schutzpotential von Laktose analysiert. Als niedrigster Restwassergehalt wurde für alle Formulierungen ein Wert von 5 % angestrebt, da dies ein üblicher Wert für gefriergetrocknete Systeme ist.

### Lagerung

- Für die Auswahl der Lagerbedingungen sowie für die Kenntnis des physikalischen Zustands während der Lagerung wird der Zusammenhang zwischen Glasübergangstemperatur und Wasseraktivität  $T_g(a_w)$  von Mikroorganismus/Laktose-Suspensionen für unterschiedliche Lagertemperaturen erstellt.
- Die Produkttemperatur  $T_P$  und die Wasseraktivität  $a_w$  werden als Lagerbedingungen systematisch kombiniert. Wegen der Abhängigkeit  $T_g(a_w)$  ist durch die Einstellung von  $a_w$  die Einstellung von  $T_g$  möglich. Durch die Auswahl verschiedener Lagertemperaturen  $T_P$  bei verschiedenen Glasübergangstemperaturen  $T_g$  ist es möglich, eine Lagerung im Glaszustand oder im Nicht-Glaszustand auf einem Temperaturniveau aber auch vergleichbare physikalische Zustände auf unterschiedlichen Temperaturniveaus zu realisieren. Für die unterschiedlichen Lagerbedingungen wird die Überlebensrate der Kultur während der Lagerung analysiert und als charakteristische Größe für die Inaktivierung die Geschwindigkeitskonstante  $k_{T,aw}$  formalkinetisch ermittelt.
- Falls die Geschwindigkeitskonstante  $k_{T,aw}$  der Inaktivierungsreaktion signifikant durch den Glasübergang und die darauf zurückzuführende Veränderung der Diffusion der Reaktanden aufgrund des zunehmenden Anteils an freiem Volumen  $V_{frei}$  beeinflusst wird (fragiles System), so ergibt sich die in Abbildung 12 dargestellte Temperaturabhängigkeit von  $k_{T,aw}$  für den Glaszustand und den Nicht-Glaszustand. Im Rahmen dieser Arbeit soll ermittelt werden, ob der Verlauf für ein fragiles System für die Inaktivierung von Mikroorganismen ermittelt werden kann und die Inaktivierungsreaktion nach Williams-Landel-Ferry (WLF), Gleichung (6), beschrieben werden kann.

## 5 MATERIAL UND METHODEN

### 5.1 Material

#### 5.1.1 Modellmikroorganismus

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Keim *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* (F19<sup>®</sup>) (Medipharm, Kågeröd, Schweden) aufgrund seines häufigen Einsatzes zur Herstellung probiotischer Lebensmittel als Modellmikroorganismus verwendet. Abbildung 18 zeigt eine mikroskopische Aufnahme des Modellbakteriums.

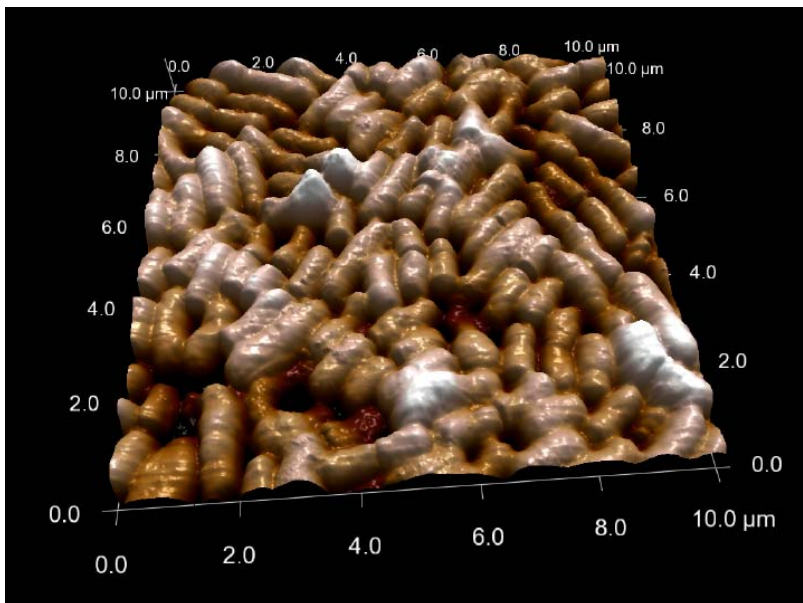


Abbildung 18: AFM Aufnahme von *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* F19

*Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* gehört zur Gruppe der gram-positiven, fakultativ anaeroben, fakultativ heterofermentativen, mesophilen Milchsäurebakterien (Hammes und Vogel, 1995).

Ursprünglich wurde das Bakterium aus dem Dünndarm isoliert. Es besitzt eine hohe Resistenz gegenüber Magensaft, niedrigen pH-Werten und Gallensalzen, die es dem Keim ermöglicht, den oberen Gastro-Intestinal-Trakt intakt zu passieren und sich im Colon an die Darmmukosa anzuheften (Sullivan et al., 2002; Ljungh et al., 2002). *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* zeigt eine hohe proteolytische Aktivität und verstoffwechselt Laktose, Trehalose, Glukose, Saccharose, sowie präbiotische Stoffe wie Inulin und Amylopektin (Ljungh et al., 2002; Ohlsen et al., 2002).

Ferner ist *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* auch nach häufiger industrieller Reproduktion genetisch stabil (Morelli und Campominosi, 2002).

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurde gefrorenes Konzentrat der Kultur als Inokulum für die Anzucht von Untersuchungsmaterial verwendet (genaue Vorgehensweise Kapitel 5.2.1). Das gefrorene Konzentrat wies eine Zellkonzentration von  $10^{11}$  kbE/g auf und konnte bei einer Temperatur von  $-40\text{ °C}$  für mehrere Monate ohne Vitalitätsverluste gelagert werden.

### **5.1.2 Chemikalien und Geräte**

In Tabelle 12 und Tabelle 13 im Anhang sind die verwendeten Chemikalien und Geräte sowie deren Anwendung und Hersteller aufgelistet.

## **5.2 Verfahrenstechnische Methoden**

Im Folgenden wird zunächst ein grober Überblick über die Prozessabfolge gegeben. Die Details der einzelnen Prozessschritte werden nachfolgend beschrieben.

In Abbildung 19 ist zur Gesamtübersicht ein Fließschema der Versuchsdurchführung für die Herstellung und Lagerung gefriergetrockneter Mikroorganismen mit den wichtigsten Prozessschritten dargestellt.



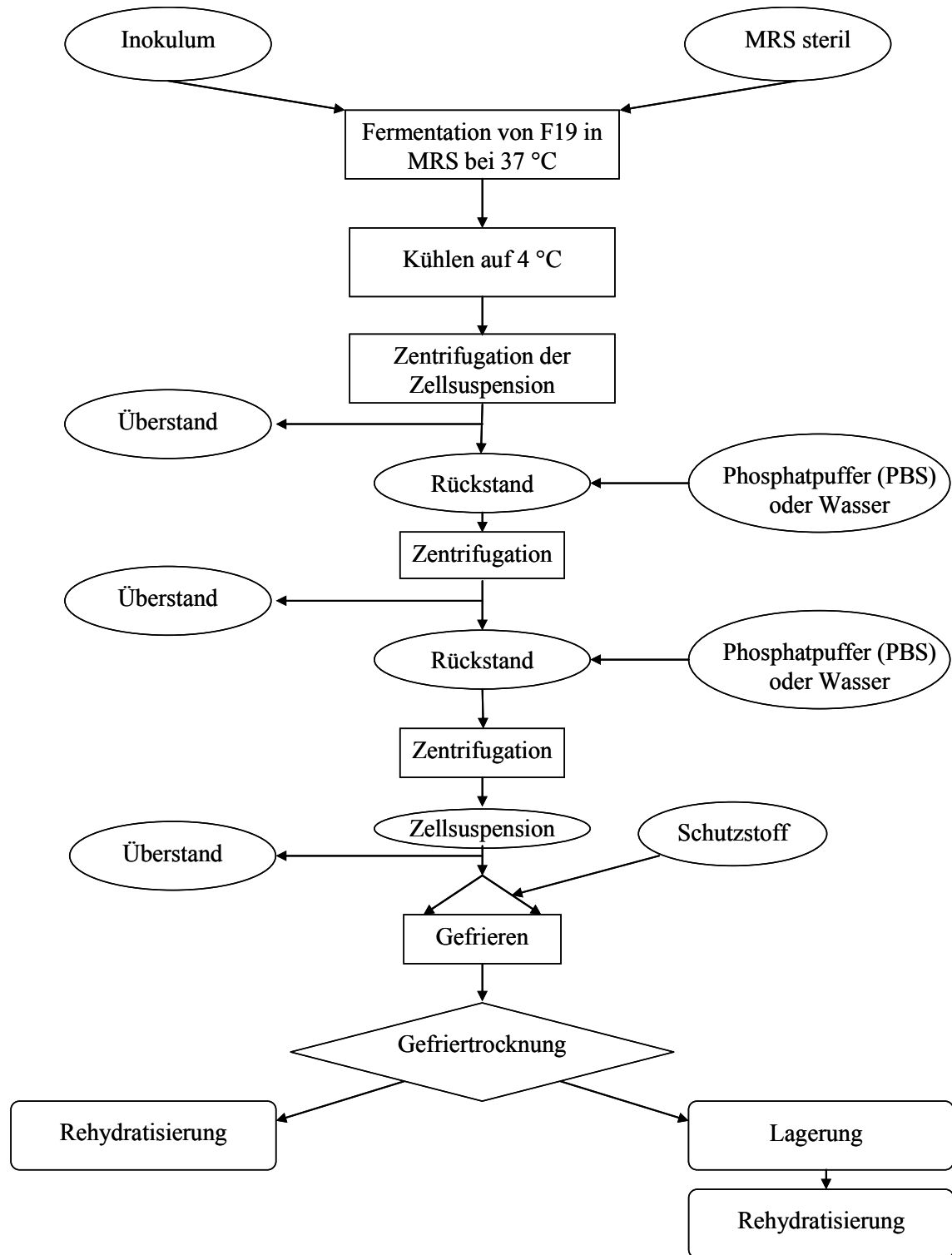


Abbildung 19: Prozessschema der Versuchsdurchführung für die Herstellung und Lagerung von *Lb. paracasei ssp. paracasei*.

Zur Gewinnung von Versuchsmaterial wurde *Lb. paracasei ssp. paracasei* zunächst in MRS bei einer Temperatur von 37 °C angezchtet (Submersfermentation). Am Ende der exponentiellen Wachstumsphase wurde die Fermentation durch Kühlen der Zellsuspension beendet. Die daraus resultierenden Zellen wurden anschließend mittels Zentrifugation geerntet, auf-

konzentriert und mit Phosphatpuffer gewaschen. Einem Teil der aufbereiteten Zellsuspension wurde ein Schutzstoff (Magermilchpulver, Laktose, Trehalose) zugesetzt. Die erhaltenen Zellsuspensionen wurden dann dem Gefrieren zugeführt. Nach unterschiedlichen Trocknungszeiten wurden die Proben entweder unmittelbar nach der Trocknung mit sterilem bidestilliertem Wasser bei 25 °C rehydratisiert oder der Lagerung unter ausgewählten Bedingungen zugeführt. Die gelagerten Proben wurden nach unterschiedlichen Lagerzeiten ebenfalls bei 25 °C mit sterilem bidestilliertem Wasser rehydratisiert. Als Rehydratisierungsmedium wurde bidestilliertes Wasser ausgewählt, da es diese Komponente ist, die während der Trocknung entfernt wird. Der Einsatz von Nährmedium oder einer Salzlösung als Rehydratisierungsmedium würde zu einer Veränderung der Osmolarität und der Nährstoffverfügbarkeit nach der Rehydratisierung im Vergleich zum Zustand vor der Trocknung führen. Dies sollte vermieden werden.

Fermenter und Zentrifugationsröhrchen wurden bei 121 °C für 20 min mit Sattedampf sterilisiert. Glasvials wurden unter trockener Hitze bei einer Temperatur von 180 °C für acht Stunden sterilisiert.

### **5.2.1 Anzucht der Mikroorganismen und Herstellung aufgereinigter Zellsuspensionen**

#### *Inokulation und Fermentation*

Als Fermentationsmedium diente MRS-Boullion. Die einzelnen Fermentationen umfassten Volumina zwischen 1500 – 4000 ml. In Vorversuchen wurde festgestellt, dass Unterschiede des Volumens in dieser Größenordnung keinen Einfluss auf den Verlauf des Wachstums zeigen. Die Fermentation wurde in einer Glasflasche im temperierten Wasserbad durchgeführt (Abbildung 20).



**Abbildung 20: Fermentation in Glasflasche im Wasserbad.**

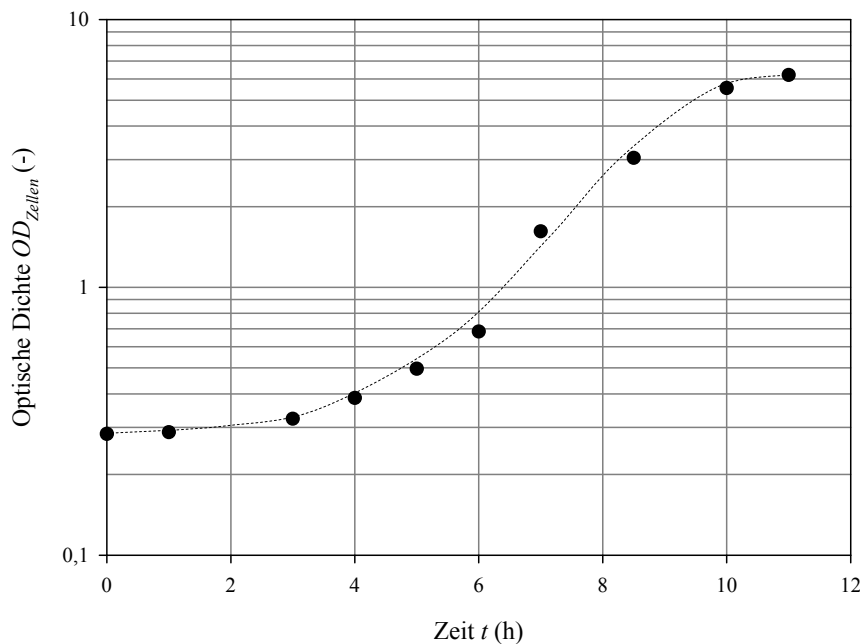
Die Anfangszellkonzentration der Fermentation wurde auf einen Wert von  $10^8$  kbE/ml eingestellt, was einer optischen Dichte (Extinktion) der MRS-Zellsuspension  $OD_{Fermentation}$  von 0,3 entspricht. Um diese Zellkonzentration bzw. optische Dichte in der Fermentationssuspension zu erreichen, wurde zunächst eine Inokulationssuspension (Inokulum) von 50 ml mit einer Zelldichte von ca.  $10^{11}$  kbE/ml hergestellt. Zu diesem Zweck wurden 2-3 g des gefrorenen Zellkonzentrats in 50 ml MRS bei Raumtemperatur suspendiert. Anschließend wurde ein exakt bestimmtes Volumen des Inokulums in das noch zellfreie Fermentationsmedium transferiert. Zur exakten Ermittlung des Inokulationsvolumens wurde die optische Dichte von Inokulum  $OD_{Inokulum}$  photometrisch bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 600$  nm gegen zellfreies Nährmedium bestimmt.

Aus der gemessenen optischen Dichten des Inokulums lässt sich dessen erforderliches Volumen  $V_{Inokulum}$ , das für die Fermentationssuspension (optische Dichte zu Beginn der Fermentation 0,3) benötigt wird, nach Gleichung (8) berechnen.

$$V_{Inokulum} = \frac{V_{Fermentation} \cdot OD_{Fermentation}}{OD_{Inokulum}} \quad (8)$$

Die Fermentation wurde bei einer Temperatur von 37 °C, dem Wachstumsoptimum von *Lb. paracasei* ssp. *paracasei*, durchgeführt. Während der Fermentation wurde die Zellsuspension ständig gerührt, um eine homogene Verteilung von Zellen, Substrat und Produkt zu gewährleisten. Die während der Fermentation gebildete Milchsäure wurde nicht neutralisiert, was eine Verringerung des pH-Wertes der Fermentationsbrühe von 5,8 auf 4,3 während einer Fermentationsdauer von 10 h zur Folge hatte. Vorversuche hatten jedoch gezeigt, dass die pH-Absenkung während der Fermentation keine negativen Auswirkungen auf das Wachstum des pH-toleranten Stammes besaß. Die Fermentation ohne pH Ausgleich hatte den Vorteil, dass aufgrund einer verringerten Anzahl technischer Gerätschaften und Medien die Kontaminationsgefahr der Fermentationssuspension mit Fremdkeimen verringert war.

Abbildung 21 zeigt den Wachstumsverlauf (optische Dichte der Zellen,  $OD_{Zellen}$ ) von *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* während der Fermentation in MRS-Boullion bei einer Temperatur von 37 °C ohne Neutralisation.



**Abbildung 21: Optische Dichte,  $OD_{Zellen}$ , von *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* in Abhängigkeit von der Fermentationszeit in MRS bei einer Tempertur von 37 °C ohne Neutralisation.**

Aus Abbildung 21 ist ersichtlich, dass die Wachstumskurve zunächst eine lag-Phase von 3 h und danach eine exponentielle Wachstumsphase von 7 h durchläuft. Nach einer Fermentationsdauer von insgesamt 10 h waren eine optische Dichte von ca. 6,5 und eine Zellkonzentration von ca.  $10^{10}$  kbE/ml erreicht. Die Fermentation wurde nach 10 h durch rasche Temperaturabsenkung in Eiswasser (Abkühlgeschwindigkeit ca. 2,5 K/min) auf 4 °C gestoppt.

#### *Zellernte und Zellaufreinigung*

Nach der Fermentation wurden die Zellen durch Zentrifugation vom Fermentationsmedium abgetrennt. Der Überstand wurde abdekantiert und so eine 25-fache Aufkonzentrierung der Zellen im Sediment erreicht. Anschließend wurde das Zellkonzentrat zwei weitere Male mit Phosphatpufferlösung (PBS) versetzt und jeweils wieder zentrifugiert, um Reste des Fermentationsmediums zu entfernen. Durch die Entfernung definierter Volumina des Überstand wurde während des Waschprozesses eine weitere Aufkonzentrierung der Zellsuspension um den Faktor 2,6 erreicht.

Der Trenn- und Aufreinigungsprozess der Zellsuspension erfolgte in sterilen Zentrifugationsröhrchen mit einem Volumen von 50 ml. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei einer radialen Zentrifugalbeschleunigung *RZB* von 4000g für 10 min bei einer Temperatur von 4 °C durchgeführt.

Nach der Zellernte und der Zellaufreinigung lag eine Zellsuspension mit einer Zellkonzentration von  $10^{11}$  kbE/ml und einer Zelltrockenmassekonzentration,  $c_{Zellen}$ , von 0,12 g/ml vor. Die Zelltrockenmasse wurde mittels Karl-Fischer (vgl. Kapitel 5.3.3) bestimmt. Diese Suspension stellte die Ausgangszellsuspension dar. Sie wurde im Weiteren entweder mit einem Schutzstoff versetzt oder ohne Schutzstoffzugabe zu je 1 ml in sterile Glasvials abgefüllt. Die Glasvials wurden mit einem geriffelten Gummistopfen bestückt, aus denen der Dampf während der Sublimation durch Kanäle entweichen konnte, und dem Gefriertrocknungsprozess zugeführt.

### *Schutzstoffe*

Die zugegebene Menge der Schutzstoffe richtete sich nach der Zelltrockenmassekonzentration  $c_{Zellen}$ . Die weiteren Gewichtskonzentrationsangaben der Schutzstoffe in der Zellsuspension sind ausschließlich auf die Zelltrockenmassekonzentration bezogen.

Als Schutzstoffe wurden Laktosemonohydrat, Trehalose, und Magermilchpulver verwendet. Laktosemonohydrat wurde in den Konzentrationen von  $0,25 \text{ g/g}_{\text{Zelltrockenmasse}}$  und  $0,5 \text{ g/g}_{\text{Zelltrockenmasse}}$  als Schutzstoff verwendet und im Hinblick auf die Schutzwirkung auf die Überlebensrate der Mikroorganismen untersucht. Ferner wurden Konzentrationen von  $0,01 \text{ g/g}_{\text{Zelltrockenmasse}}$ ,  $0,25 \text{ g/g}_{\text{Zelltrockenmasse}}$  und  $0,5 \text{ g/g}_{\text{Zelltrockenmasse}}$  zur Erstellung von Zustandsdiagrammen verwendet. Dieser Bereich an Schutzstoffkonzentrationen liegt im Bereich der üblicherweise verwendeten Konzentrationen.

Für Trehalose wurde eine Konzentration von  $0,25 \text{ g/g}_{\text{Zelltrockenmasse}}$  verwendet. Durch die Wahl dieser Konzentration sollte der Schutzeffekt von Trehalose vergleichbar mit dem Schutzeffekt von Laktose in einer Konzentration von  $0,25 \text{ g/g}_{\text{Zelltrockenmasse}}$  sein. Magermilchpulver wurde in einer Konzentration von  $0,5 \text{ g/g}_{\text{Zelltrockenmasse}}$  verwendet. Das Magermilchpulver wies eine Laktosekonzentration von 50 % (w/w) auf. Somit wurde in der Zellsuspension die gleiche Laktosekonzentration erreicht wie bei reiner Zugabe von Laktosemonohydrat mit einer Konzentration von  $0,25 \text{ g/g}_{\text{Zelltrockenmasse}}$ .

Die Schutzstoffe wurden den aufgereinigten Zellsuspensionen jeweils als Pulver zugegeben und mit Hilfe eines Vortex-Mischers eingemischt.

Direkt im Anschluss an die Schutzstoffzugabe wurde jeweils 1 ml der unterschiedlichen Zellsuspensionen in sterile Vials abgefüllt und mit einem geriffelten Gummistopfen bestückt. Die befüllten Vials wurden im Anschluss dem Gefrierprozess bzw. dem Gefriertrocknungsprozess zugeführt.

## 5.2.2 Gefrieren und Lyophilisation

### *Gefrieren*

Für den Gefrierprozess wurde der Einfluss der Kühlrate  $\Delta T_p/\Delta t$  auf die Überlebensrate sowie der Einfluss der Endtemperatur nach dem Gefrieren auf die Überlebensrate untersucht. Das Ziel war eine Prozessgestaltung des Gefrierprozesses, die einen möglichst geringen Verlust von vermehrungsfähigen Keimen zur Folge hatte.

Die unterschiedlichen Kühlraten wurden realisiert, indem die Zellsuspensionen in Kühlapparate bzw. –medien mit unterschiedlichen Temperaturen eingebracht wurden. Die vorliegende Temperaturdifferenz zwischen Proben- und Kältemedientemperatur führte zu unterschiedlichen Kühlraten. Dabei kamen folgende Temperaturen und Apparate bzw. Medien zum Einsatz:

- -20 °C: Glasvials mit Proben auf gekühlter Stellfläche,
- -40 °C: Glasvials mit Proben auf gekühlter Stellfläche,
- -196 °C: Flüssiger Stickstoff, in den die Glasvials eingetaucht wurden.

Bei der hier vorliegenden Versuchsgestaltung änderte sich die Kühlrate während des Kühl- und Gefrierprozesses. Begründet ist dies sowohl in der Instationarität des Wärmeübergangs innerhalb eines Aggregatzustands als auch in den unterschiedlichen Wärmekapazitäten der unterschiedlichen Aggregatzustände. Zur Quantifizierung der Kühlrate  $\Delta T_p/\Delta t$  wird diese entsprechend Gehrke (1991) aus dem Quotient zwischen der Differenz aus End- und Anfangstemperatur  $T_{PE}-T_{PA}$  der Probe und der Zeit  $t_E-t_A$ , in der diese Temperaturdifferenz erreicht wurde, nach Gleichung (9) definiert.

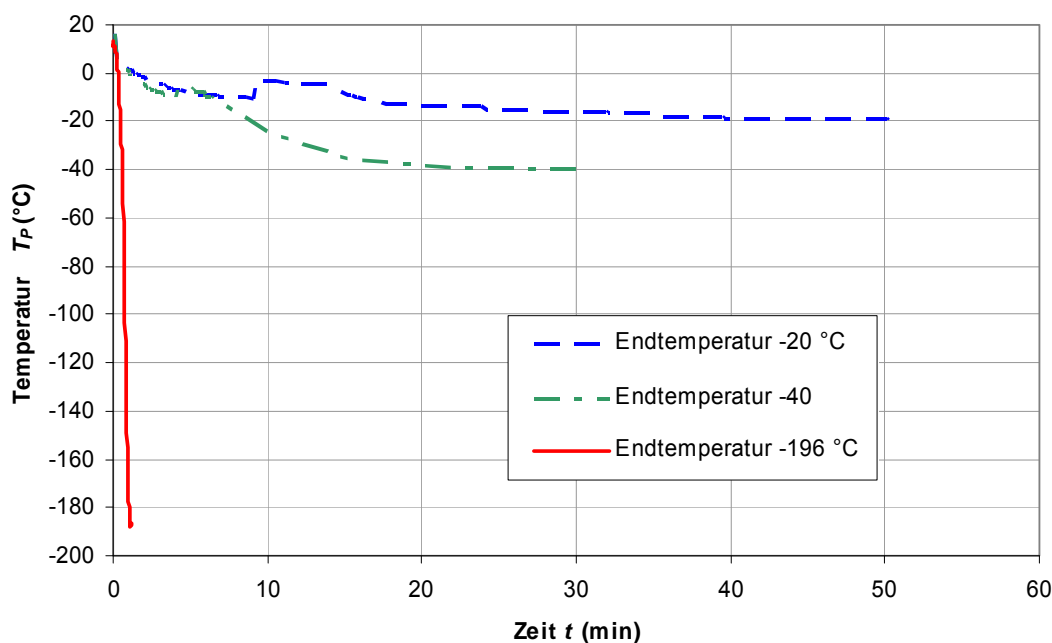
$$\frac{\Delta T_p}{\Delta t} = \frac{T_{PE} - T_{PA}}{t_E - t_A} \quad (9)$$

Es wurde davon ausgegangen, dass auch die Endtemperatur einen Einfluss auf die Überlebensrate besitzt. Deshalb wurde der Einfluss der Kühlrate für eine konstante Endtemperatur von -20 °C untersucht. Diese Endtemperatur wurde ausgewählt, da dieser Wert die höchste Produkttemperatur während der Haupttrocknung darstellte (siehe Abschnitt „Gefriertrocknung“). Das Ziel war, während der Haupttrocknung keine höhere Produkttemperatur zu erreichen als nach dem Gefrieren. Ansonsten würden die Zellen während des Gefrierens eingefroren und während der Haupttrocknung wieder teilweise aufgetaut werden. Als Folge könnten die Zellen während des Gefrierens bereits stärker geschädigt werden, als während der Gefriertrocknung. Beispielsweise konnten Anchordoquy et al. (2000) für Laktatdehydrogenase ermit-

teln, dass die Aktivität des Enzyms abnahm, wenn es bei  $-196\text{ °C}$  eingefroren wurde und anschließend bei  $-20\text{ °C}$  getrocknet wurde. Dementsprechend folgt für die Endtemperatur  $T_{PE}$  in Gleichung 9 der Wert  $-20\text{ °C}$ . Die Anfangstemperatur der Proben  $T_{PA}$  betrug  $10\text{ °C}$ . Somit ergibt sich für die Temperaturdifferenz der Probe  $\Delta T_P$  während des Kühl- und Gefrierprozesses für alle Kühlraten ein Wert von  $30\text{ K}$ .

Zur genauen Ermittlung der Kühlrate wurde der Verlauf der Proben temperatur während der Kühlung gemessen.

Abbildung 22 zeigt die Temperaturverläufe von Zellsuspensionen ohne Schutzstoff in den Apparaten bzw. Medien mit unterschiedlicher Temperatur.



**Abbildung 22: Temperaturverlauf der Zellsuspensionen ohne Schutzstoff während des Gefrierprozesses in Kühlmedien mit unterschiedlicher Temperatur.**

Aus den Temperaturverläufen in Abbildung 22 wurden die unterschiedlichen Kühlraten  $\Delta T_P/\Delta t$  nach Gleichung (9) ermittelt.

Tabelle 2 zeigt die mit Gleichung (9) ermittelten Gefrieraten  $\Delta T_P/\Delta t$  für die unterschiedlichen Temperaturen der Kühlvorrichtungen sowie die Zeit  $\Delta t$ , die benötigt wird, bis die Zellsuspensionen eine Temperatur von  $-20\text{ °C}$  erreicht haben.

**Tabelle 2: Temperaturen verschiedener Kühlvorrichtungen sowie daraus resultierende Kühlraten und Kühlzeiten zur Temperaturabsenkung von Zellsuspensionen ohne Schutzstoffe von 10 °C auf -20 °C.**

Temperatur Kühlvorrichtung (°C)	$\Delta t$ (min)	$\Delta T_P/\Delta t$ (K/min)
-20	50	0,6
-40	9	3,3
-196	0,5	60

Die Zellsuspensionen wurden anhand der in Tabelle 2 angegebenen Zeiten bis -20 °C gekühlt. Im Anschluss wurden die Proben im Wasserbad bei 25 °C innerhalb von 2 min aufgetaut, wobei sie leicht bewegt wurden, und die Keimzahl  $N_G$  bestimmt.

Ferner wurde auch der Einfluss der Endtemperatur untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit den unterschiedlichen Kühlraten bis zu den Endtemperaturen der Kühlvorrichtungen gefroren. Die Verweilzeiten der Zellsuspensionen in den unterschiedlichen Vorrichtungen wurden für diese Versuche so ausgewählt, dass die Temperaturen von -20 °C, -40 °C und -196 °C gerade erreicht wurden. Diese betragen für -20 °C 50 min, für -40 °C 29 min und für -196 °C 1,8 min. Bei Erreichen der entsprechenden Temperaturen wurden die Zellen wie oben beschrieben wieder aufgetaut.

Des Weiteren wurde die zeitliche Entwicklung der Überlebensrate im gefrorenen Zustand bei unterschiedlichen Temperaturen ermittelt. Diese Information sollte zum Verständnis der prozessbedingten Abnahme der Überlebensrate während der Gefriertrocknung beitragen. Um den schädlichen Einfluss des Verweilens im gefrorenen Zustand während der Gefriertrocknung berücksichtigen zu können, wurde die Inaktivierungskinetik für die Temperaturen -20 °C und -30 °C, die auch für die Haupttrocknung bei unterschiedlichen Trocknungsraten verwendet wurden, und für unterschiedliche Zusammensetzungen der Zellen in einer gefrorenen Matrix ermittelt. Die Proben wurden dabei auf einer gekühlten Stellfläche mit einer Temperatur von -20 °C eingefroren. Für das Verweilen bei einer Temperatur von -20 °C wurden die Proben auf dieser Stellfläche belassen. Für das Verweilen bei einer Temperatur von -30 °C wurden die Proben in ein Alkoholbad, das auf -30 °C temperiert wurde, transferiert.

Tabelle 3 zeigt die untersuchten Produkttemperaturen  $T_P$  die untersuchten Verweilzeiten  $t$ , nach denen die Keimzahl  $N_G$  bestimmt wurde, sowie die Kühlzeit bis zum Erreichen der Endtemperatur. Die Verweilzeit  $t = 0$  stellt die Zeit dar, bei der die entsprechende Temperatur  $T_P$  erreicht wurde.



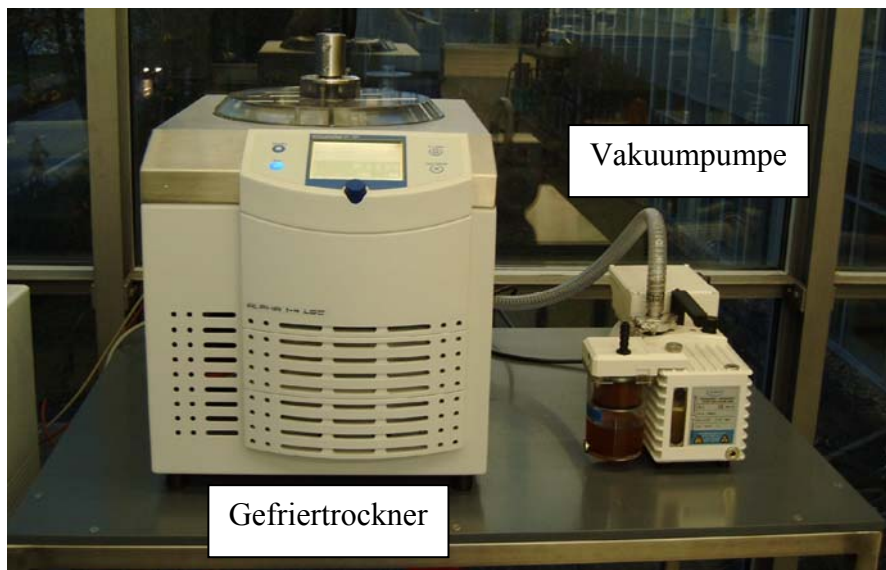
**Tabelle 3: Produkttemperatur  $T_P$  der gefrorenen Proben, Gefrierzeit bis zum Erreichen der Endtemperatur, sowie die untersuchten Verweilzeit der Proben im gefrorenen Zustand.**

Produktendtemperatur $T_P$ (°C)	Gefrierzeit bis Erreichen von $T_P$ (h)	Verweilzeiten $t$ bei $T_P$ (h)
-20	0,75	0; 0,5; 1,5; 2
-30	0,67	0; 1; 1,5; 2; 2,5

Der Auftauprozess wurde analog zu den bereits erläuterten Untersuchungen im Wasserbad bei 25 °C durchgeführt.

#### *Gefriertrocknung*

Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete Gefriertrockner Alpha LSC 1-4 der Firma Martin Christ, Osterode, Deutschland, ist in Abbildung 23 dargestellt.



**Abbildung 23: Gefriertrockner Alpha LSC 1-4.**

Der Gefriertrockner besteht aus einer Vakuumkammer mit einem Eiskondensator und einer beheizbaren Stellfläche. Während der Gefriertrocknung wurde das Vakuum mit Hilfe des Eiskondensators aufrechterhalten. Zur Erzeugung des Vakuums zu Beginn des Sublimationsprozesses diente eine Membranpumpe.

Abbildung 24 zeigt schematisch die Darstellung der Vakuumkammer des Gefriertrockners.

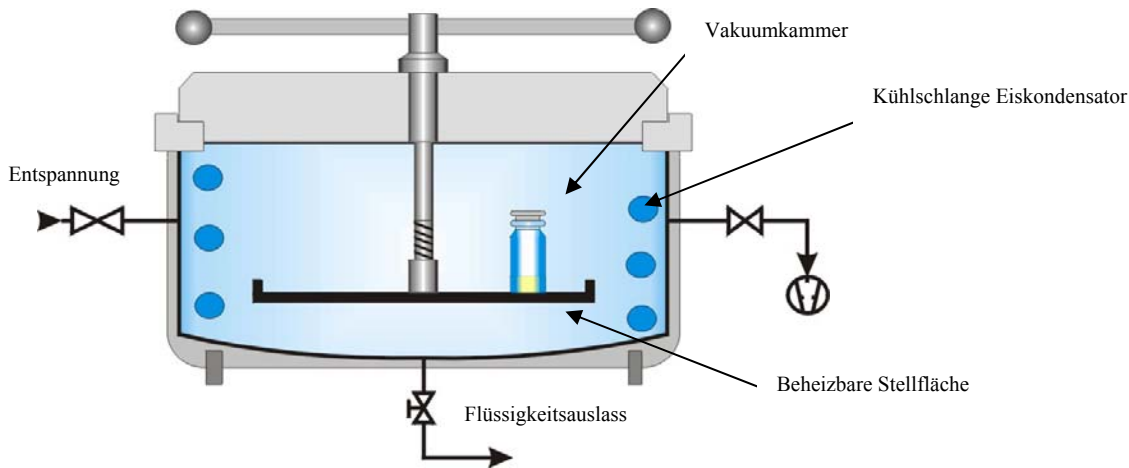


Abbildung 24: Schematische Darstellung der Vakuumkammer des Gefriertrockners.

Ziel der Arbeit war es, den Einfluss unterschiedlicher Gefriertrocknungsbedingungen auf die Überlebensrate von *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* in verschiedenen Matrices nach unterschiedlichen Trocknungszeiten zu ermitteln. Die unterschiedlichen Prozessbedingungen wurden durch ausgewählte Kammerdrücke  $p_K$  sowie durch ausgewählte Stellflächentemperaturen  $T_{St}$  realisiert.

Tabelle 4 zeigt die untersuchten Prozessbedingungen.

Tabelle 4: Kammerdruck  $p_K$ , entsprechende Sublimationstemperatur von Wasser  $T_{sub,w}$ , Stellflächentemperatur  $T_{St}$ , und Bezeichnung der Bedingungen im weiteren Verlauf der schriftlichen Ausführung.

Bedingung Variable	1	2	3	4	5	6	7
Kammerdruck $p_K$ (Pa)	12	37	37	37	102	102	102
Sublimations- temperatur von Wasser $T_{sub,w}$ (°C)	-40	-30	-30	-30	-20	-20	-20
Stellflächen- temperatur $T_{St}$ (°C)	-20	+50	+10	-10	+80	+10	-10
Bezeichnung in Kapitel „Ergeb- nisse und Dis- kussion“ $p_K/T_{sub,w}/T_{St}$	12/-40/-20	37/-30/50	37/-30/10	37/-30/-10	103/-20/80	103/-20/10	103/-20/-10

Der vorhergehende Gefrierprozess wurde für die Trocknung immer in gleicher Weise bei einer Temperatur von -20 °C für 1 h durchgeführt.

### 5.2.3 Lagerung

Im Rahmen der Arbeit wurde die Lagerstabilität der Zellen in einer Laktosematrix oder in einer Trehalosematrix untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Zellen nach der oben erläuterten Fermentations- und Ernteprozedur in Phosphatpuffer (PBS) gewaschen und anschließend entweder mit Laktosemonohydrat oder mit Trehalose mit einer Konzentration von jeweils  $0,25\text{g/g}_{\text{Zelltrocknenmasse}}$  versetzt. Die Gefriertrocknung wurde für die Herstellung getrockneter Proben für die Lagerversuche immer unter den in Tabelle 5 aufgelisteten Bedingungen durchgeführt.

**Tabelle 5: Gefriertrocknungsbedingungen  $T_{p_{\text{gefr.}}}$ ,  $t_{\text{gefr.}}$ ,  $p_K$ ,  $T_{St}$  und  $t_S$  zur Herstellung getrockneter Zellpräparate für die Untersuchung der Lagerstabilität.**

Temperatur Gefrieren $T_{p_{\text{gefr.}}}$ (°C)	Gefrierzeit $t_{\text{gefr.}}$ (h)	Druck $p_K$ (Pa)	Stellflächentemp. $T_{St}$ (°C)	Trocknungszeit $t_S$ (h)
-20	1	37	10	3

Unmittelbar nach der Trocknung wurden die Proben ausgewählten Lagerbedingungen im Hinblick auf Temperatur  $T_p$  und relativer Luftfeuchte  $\varphi$  ausgesetzt. Die relativen Luftfeuchten wurden mit Hilfe von gesättigten Salzlösungen, die unterschiedliche Wasseraktivitäten aufweisen, eingestellt. Tabelle 6 zeigt die verwendeten Salzlösungen, die entsprechenden Wasseraktivitäten bei 25 °C (Greenspan, 1977), die untersuchten Lagertemperaturen  $T_p$  für Zellen in einer Laktose- (L) oder Trehalosematrix (T).

**Tabelle 6: Lagerbedingungen  $T_p/a_w$ , für die die Untersuchungen durchgeführt wurden sowie die verwendeten gesättigten Salzlösungen zur Einstellung der Wasseraktivität (Greenspan, 1977). L = Untersuchungen für Zellen in Laktosematrix; T = Untersuchungen für Zellen in Trehalosematrix. Die Wasseraktivität wird mit den gesättigten Salzlösungen bei einer Temperatur von 25 °C erreicht.**

Temperatur $T_p$ (°C)	4	15	20	30	37
$a_w$ (-) (Gesättigte Salzlösung)					
<b>0,07</b> (KOH bzw. NaOH <sup>a</sup> )			L	LT	L
<b>0,11</b> (LiCl)			L	LT	L
<b>0,23</b> (CH <sub>3</sub> COOK bzw. KF <sup>b</sup> )	L	LT	L	LT	L
<b>0,33</b> (MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O)	LT			LT	L
<b>0,43</b> (K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> bzw. Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> <sup>c</sup> )	LT	LT	L	LT	L
<b>0,75</b> (NaCl)	LT	LT			

<sup>a</sup> NaOH bei 30 °C

<sup>b</sup> KF bei 37 °C

<sup>c</sup> Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> bei 37 °C

Die Salzlösungen wurden in Exsikkatoren gefüllt. Diese Exsikkatoren wurden zunächst ohne Proben zur Konditionierung der Luft und zur Temperierung in Brutschränke mit unterschiedlichen Temperaturen gegeben. Nach einer Woche begann die Bestückung der Exsikkatoren mit Proben.

## 5.3 Analysen

### 5.3.1 Thermische Analyse

Das thermische Verhalten der Zellsuspensionen wurde mittels Differential Scanning Calorimetry (DSC) bestimmt. Die DSC-Messung ist eine thermoanalytische Methode, bei der Zustandsänderungen eines Materials als Funktion von der Temperatur erkennbar sind. Dabei werden das zu untersuchende Material und eine Referenz gleichzeitig einem definierten Temperaturprofil unterworfen. Während der Messung werden Temperaturdifferenzen zwischen Probe und Referenz gemessen und unter Anwendung gerätespezifischer Konstanten in Abhängigkeit von der Temperatur  $T$  und von der Zeit  $t$  in einen Differenzwärmestrom  $q$  zwischen Probe und Referenz umgerechnet (Höhne et al., 2003).

Für die Versuche im Rahmen diese Arbeit wurde das Gerät Q1000 (TA Instruments, Eschborn, Deutschland) verwendet.

Je nach Zusammensetzung der Zellpräparate waren unterschiedliche Zielgrößen von Interesse. Dafür wurden unterschiedliche Modi der Messung angewandt. Zielgrößen waren die Gefrier- bzw. Schmelztemperatur  $T_m$ , die Menge an ausgefrorenem Wasser  $m_{Eis}$  bzw. die Feststoffkonzentration  $c$  der nicht ausgefrorenen Phase sowie die Glasübergangstemperatur  $T_g$  von Zellsuspensionen in Abhängigkeit von der Zusammensetzung.

Für alle Bestimmungen wurden hermetisch verschließbare Aluminiumtiegel verwendet. Als Referenz diente ein leerer Aluminiumtiegel. Die Masse des leeren Aluminiumtiegels wurde jeweils im Ergebnis berücksichtigt. Die Wägung der Massen von Tiegel und Probe erfolgte mit einer Ablesegenauigkeit von  $\pm 0,00001\text{g}$  mit einer speziell für diesen Wägebereich vorgesehenen Waage (vgl. Tabelle 13).

Die Kalibrierung der Materialkonstanten und der Temperatur des Gerätes erfolgte mit Hilfe von Saphirscheiben und Indium (Schmelztemperatur  $156,6\text{ °C}$ ) gemäß der Gerätevorschrift des Herstellers.

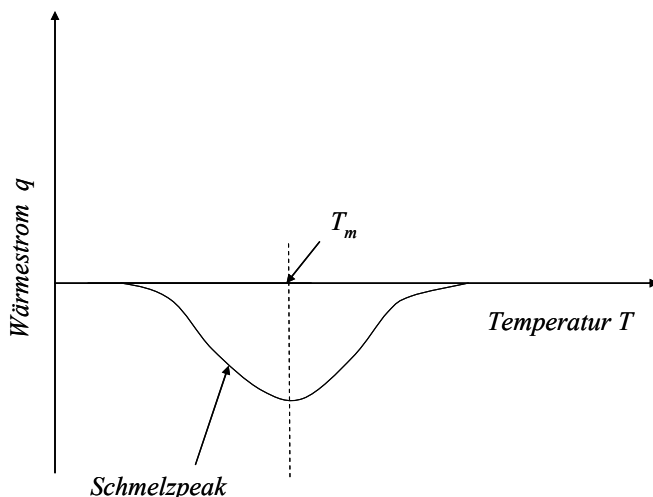
#### *Gefriertemperatur*

Das Gefrierverhalten wurde von frischen Zellsuspensionen in Phosphatpufferlösung (PBS) ohne Schutzstoffe sowie mit Laktose ( $0,25\text{ g/g}_{\text{Zelltrockenmasse}}$ ) oder Magermilch ( $0,5\text{ g/g}_{\text{Zelltrockenmasse}}$ ) analysiert. Die Feststoffkonzentration der Proben entsprach also derjenigen, die für die Gefrier- und Gefriertrocknungsversuche zum Einsatz kam. Ferner wurde das Gefrierverhalten für laktosehaltige Zellsuspensionen ( $0,25\text{ g/g}_{\text{Zelltrockenmasse}}$ ) mit unterschiedli-

chen Restwassergehalten bestimmt. Um verschiedene Feststoffkonzentrationen zu erreichen, wurden die Zellsuspensionen mit der Trocknungsbedingung 3 (vgl. Tabelle 4) für 1,5 h getrocknet. Anschließend wurden definierte Feststoffkonzentrationen  $c$  von 70, 60, 50 und 20 % (w/w) durch die Zugabe von bidestilliertem Wasser eingestellt.

Für die Bestimmung der Gefriertemperatur  $T_m$  wurde die thermische Analyse im modulierten Modus (MDSC) durchgeführt. Dabei wird der linearen Heizrate eine sinusförmige Modulation der Temperatur überlagert. Mit Hilfe dieses Messmodus werden die thermodynamische Wärmekapazität der Probe aus dem periodischen Anteil und die latente Wärme der auf die Temperaturmodulation nicht reagierenden Phasenübergänge getrennt messbar. Gerade bei komplexen Systemen können Glasübergänge unter Umständen von anderen gleichzeitig ablaufende thermischen Ereignissen im Signal des Gesamtwärmestroms überlagert werden. Weitere Vorteile von MDSC sind die verbesserte Sensitivität, um schwache Glasübergänge zu detektieren und eine verbesserte Auflösung. Diese Vorteile resultieren aus dem gleichzeitigen Anlegen von sich überlagernden, unterschiedlich hohen Heizraten.

Die beiden Tiegel (Probe und Referenz) wurden mit einer Amplitude von  $\pm 0,5$  K/min und einer linearen Heizrate von 2 K/min von  $-90$  °C auf  $20$  °C erwärmt. Vor dem Erwärmen wurden die Tiegel 2 min bei  $-90$  °C isotherm gehalten. Aus den erhaltenen Thermogrammen wurde die Schmelztemperatur  $T_m$  als Temperatur des Peakmaximums sowie die Fläche des Schmelzpeaks als Maß für den Anteil an ausgefrorenem Wasser für die gemessene Probe mit entsprechender Feststoffkonzentration bestimmt (vgl. Abbildung 25).



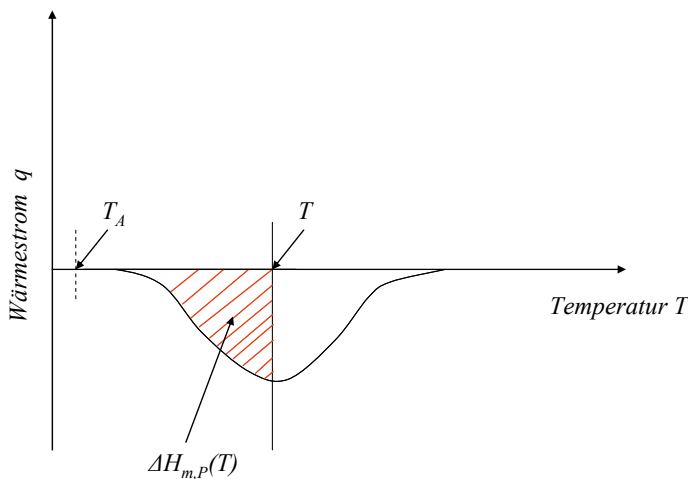
**Abbildung 25:** Schematische Darstellung des Wärmestroms  $q$  in Abhängigkeit von der Temperatur  $T$  während des Schmelzens. Die Schmelztemperatur  $T_m$  ist dabei die Temperatur am Peakmaximum. Die Fläche des Schmelzpeaks ist proportional zur Masse des Geschmolzenen.

Des Weiteren wurde die Fläche des Schmelzpeaks in Abhängigkeit von der Temperatur bestimmt und auf diese Weise direkt der Anteil an ausgefrorenem Wasser bei einer bestimmten Temperatur ermittelt. Die Menge an nicht ausgefrorenem Wasser  $m_{UFW}$  sowie die Feststoffkonzentration  $c$  in der nicht ausgefrorenen Phase berechnet man aus der Fläche des Schmelzpeaks nach folgender Vorgehensweise.

Die latente Schmelzwärme  $\Delta H_{m,p}(T)$  die während des Phasenübergangs von der Probe zum Schmelzen des Eises benötigt wird, berechnet man durch Integration des gemessenen Wärmestroms  $q(t)$ , bzw. unter Berücksichtigung der Heizrate  $dT/dt$  aus  $q(T)$  nach Gleichung (10):

$$\Delta H_{m,p}(T) = \int_{T_A}^T q(T) \cdot dT \quad (10)$$

In diesem Fall stellt  $T_A$  die Starttemperatur des Peaks dar. Abbildung 26 zeigt die graphische Darstellung der Vorgehensweise.



**Abbildung 26: Graphische Darstellung der partiellen Peakintegration.**

Latente Wärme wird aufgrund des Übergangs von Eis zu Wasser benötigt. Infolgedessen ist die Phasenübergangswärme, die von der kompletten Masse der Probe  $m_P$  benötigt wird, gleich der latenten Wärme, die für das Schmelzen der Masse an Eis  $m_{Eis}$  benötigt wird. Die Gesamtmasse der Probe  $m_P$  setzt sich aus der Masse des Wassers  $m_W$  und der Trockenmasse  $m_{TM}$  nach Gleichung (11) zusammen.

$$m_P = m_W + m_{TM} \quad (11)$$

Unter Berücksichtigung der spezifischen Schmelzenthalpie von Wasser  $\Delta H_{m,W} = 330 \text{ kJ/kg}$  folgt dann nach Gleichung (12) die Berechnung der Masse an Eis in Abhängigkeit von der Temperatur  $m_{Eis}(T)$

$$m_{Eis}(T) = \frac{\Delta H_{m,P}(T) \cdot m_P}{\Delta H_{m,W}} \quad (12)$$

Die Menge an nicht ausgefrorenem Wasser in Abhängigkeit von der Temperatur  $m_{UFW}(T)$  kann nach Gleichung (13) berechnet werden.

$$m_{UFW}(T) = m_W - m_{Eis}(T) \quad (13)$$

Die Berechnung der Feststoffkonzentration  $c$  (%(w/w)) der gefrierkonzentrierten Suspension in Abhängigkeit von der Temperatur folgt mit Gleichungen (10), (12) und (13) nach Gleichung (14).

$$c(T) = 100 - \frac{m_{UFW}(T)}{m_{UFW}(T) + m_{TM}} \quad (14)$$

### *Glasübergangstemperatur*

Der Glasübergang zeigt sich in einem Thermogramm als stetige, stufenförmige Änderung des Wärmestroms  $q$  in Abhängigkeit von der Temperatur  $T$  bzw. der Zeit  $t$ . Die Bestimmung der Glasübergangstemperatur erfolgt durch das Anlegen von jeweils einer Tangente an die Basislinie unmittelbar vor dem Glasübergang und unmittelbar nach dem Glasübergang. Der Abstand dieser Tangenten stellt die Höhe des Glasübergangs dar. Charakteristisch für den Glasübergang sind die Temperatur bei halber Höhe des Glasübergangs (midpoint temperature) und die extrapolierte Anfangstemperatur (onset temperature) des Übergangs. Die extrapolierte Anfangstemperatur wird durch Extrapolation der Tangente an die Kurve  $q(T)$  bei halber Höhe des Glasübergangs und deren Schnittpunkt mit der Tangente vor dem Glasübergang ermittelt (Höhne et al., 2003) (vgl. Abbildung 7).

Für die Ermittlung der Glasübergangstemperatur  $T_g$  der gefriergetrockneten Präparate wurde ebenfalls der modulierte Modus angewandt. Die Probe wurde mit einer Amplitude von  $\pm 0,5$  K/min und einer linearen Heizrate von 2 K/min von  $-90$  °C auf  $200$  °C erwärmt. Die Glasübergangstemperatur  $T_g$  wurde für Proben bestimmt, die mit den in Tabelle 4 aufgelisteten Prozessbedingungen 1, 3, 5, 7 für unterschiedliche Zeiten getrocknet wurden. Durch gleichzeitige Bestimmung des Restwassergehalts der entsprechenden Proben konnte ein Zustandsdiagramm  $T_g(c)$  erstellt werden. Für die Erstellung des Zustandsdiagramms in Abhängigkeit vom Restwassergehalt wurde die Midpoint-Temperatur verwendet. Aufgrund der Veränderung der Glasübergangstemperatur und der Produkttemperatur während der Gefriertrocknung charakterisiert diese Größe den Glasübergang am besten. Für die Ermittlung der Glas-



übergangstemperatur der maximal gefrierkonzentrierten Suspension  $T_g'$  und der zugehörigen Konzentration  $c_g'$  wurden Präparationen mit Feststoffkonzentration zwischen 60 % (w/w) und 70 % (w/w) herangezogen. Diese Proben wurden ebenfalls der thermischen Analyse mit den soeben dargestellten Messparametern unterzogen. Die dabei ermittelte Glasübergangstemperatur wurde gemäß Roos und Karel (1991) als  $T_g'$  festgelegt. Für die Ermittlung von  $c_g'$  wurden folgende verschiedene analytische Vorgehensweisen angewandt.

- (a) Ermittlung der Konzentration des ausgefrorenen Wassers aus der Peakfläche des Schmelzpeaks unter Berücksichtigung des Wassergehalts der nicht gefrorenen Suspension (Levine und Slade, 1988)
- (b) Extrapolation des linearen Zusammenhangs zwischen der Schmelzwärme  $\Delta H_{m,P}$  und dem Wasser bzw. Feststoffgehalts der flüssigen Probe zu  $\Delta H_{m,P} = 0$  (Simatos et al., 1975)

Ferner wurde die Glasübergangstemperatur der gelagerten Proben für unterschiedliche Wasseraktivitäten gemessen, um  $T_g(a_w)$  zu ermitteln. Diese Ermittlung erfolgte bei den Temperaturen 4 °C, 20 °C und 37 °C. Zusätzlich wurde bei einer Lagertemperatur von 20 °C auch der zeitliche Verlauf der Glasübergangstemperatur von Beginn der Lagerung bis zur Einstellung eines konstanten Wertes gemessen. Da die Glasübergangstemperatur der getrockneten Zellpräparate aufgrund der Wiederbefeuchtung in einer feuchten Atmosphäre abnimmt, war zunächst unklar, ab welchem Zeitpunkt eine konstante Glasübergangstemperatur gemessen und zur Erstellung des Zustandsdiagramms  $T_g(a_w)$  verwendet werden kann. Für den Zusammenhang  $T_g(a_w)$  wurde die Onset-Temperatur des Glasübergangs verwendet, da die Produkttemperatur und die Glasübergangstemperatur während der Lagerung konstant blieben und somit die Onset-Temperatur als die höchste konstante Temperatur betrachtet werden kann, in der sich die Probe noch im Glaszustand befand.

### 5.3.2 Produkttemperaturmessung während des Gefrierens und der Gefriertrocknung

Die Produkttemperatur  $T_P$  wurde während des Gefriertrocknungsprozesses kontinuierlich mit einem Pt100 Temperatursensor gemessen. Der Sensor besaß die in Abbildung 27 dargestellten Abmessungen und war während der Trocknung entsprechend Abbildung 27 in der Probe lokalisiert.

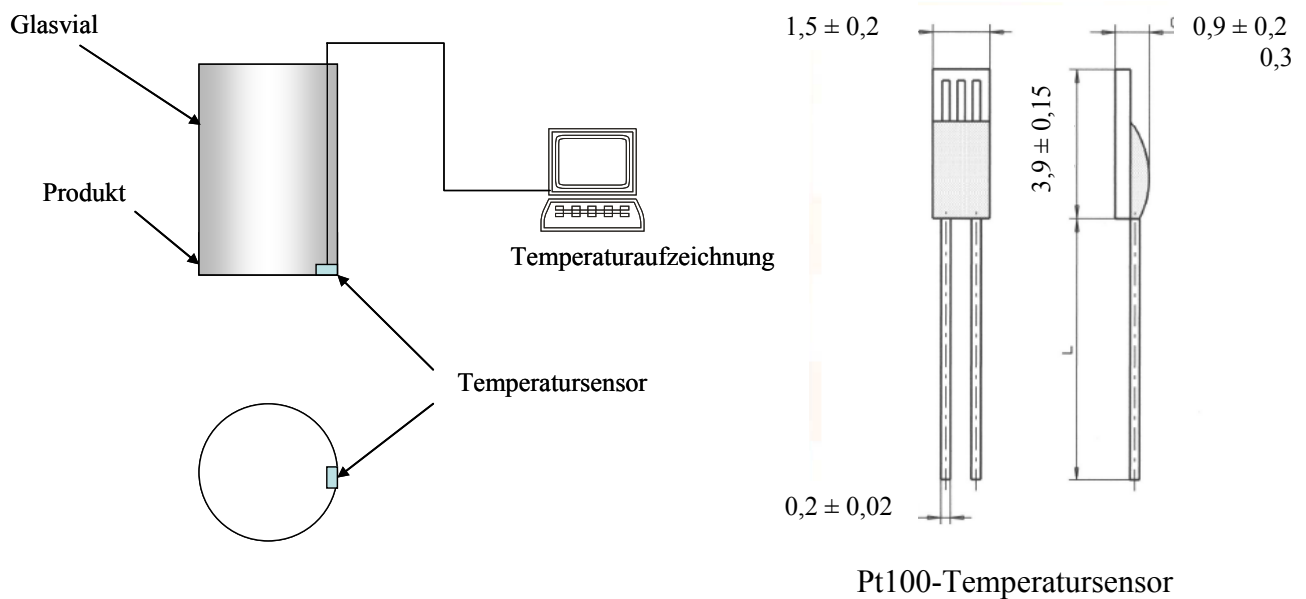


Abbildung 27: Lokalisierung des Temperatursensors in der Probe bzw. im Glasvial sowie dessen Abmessungen (<http://www.heraeus-sensor-technology.de/produkte/elemente.html>)

### 5.3.3 Restwassergehalt ( $X$ ) und prozentualer Masseverlust ( $M$ )

Der Restwassergehalt ( $X$ ) wurde mittels Karl-Fischer-Titration bestimmt. Die Analyse wurde bei einer Temperatur von 40 °C in einem Gemisch aus Hydranal®-Formamid dry und Hydranal®-Methanol Rapid (Volumenverhältnis 1:1) durchgeführt. Die Titration erfolgte innerhalb von ca. 10 min mit Hydranal®-Composite 5. Zur Kalibrierung des Systems diente Hydranal®-Water Standard. Die Herstellerangaben finden sich in Tabelle 12 im Anhang.

Den prozentualen Restwassergehalt im Verlauf der Trocknung  $X(t)$  berechnet man aus der Masse an Wasser in der Probe  $m_W$  und aus der Probenmasse  $m_P$  nach Gleichung (15).

$$X(t) = \frac{m_W(t)}{m_P(t)} \cdot 100 \quad (15)$$

Die prozentuale Feststoffkonzentration  $c$  berechnet sich aus dem Restwassergehalt  $X$  nach Gleichung (16).

$$c = X - 100 \quad (16)$$

Der prozentuale Masseverlust  $M$  während der Trocknung wurde gravimetrisch unter Verwendung einer Analysenwaage (Ablesegenauigkeit 0,0001g, vgl. Tabelle 13) bestimmt und berechnet sich aus der Probenmasse vor der Trocknung  $m_{PvT}$  und der Probenmasse nach der Trocknung  $m_{PT}$  nach Gleichung (17).

$$M(t) = \frac{m_{PvT} - m_{PT}(t)}{m_{PvT}} \cdot 100 \quad (17)$$

### 5.3.4 Wasseraktivität

Die Wasseraktivität  $a_w$  wurde mit dem Gerät Novasina Sprint (vgl. Tabelle 13) ermittelt. Das Gerät besitzt einen Feuchtesensor, mit dem die Feuchtigkeit der Luft in der Probenkammer gemessen wird. Die Feuchtigkeit der Luft wird von der Feuchtigkeit der Probe, die mit der Luft im Gleichgewicht steht, bestimmt. Die Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt.

### 5.3.5 Ermittlung von Sorptionsisothermen

Für die getrockneten Zellpräparationen mit Laktose (0,25g/g<sub>Zelltrockenmasse</sub>) wurde der Zusammenhang zwischen Wasseraktivität  $a_w$  und Restwassergehalt  $X$  ermittelt. Diese Analyse erfolgte für die Temperaturen 4 °C, 20 °C und 37 °C. Zu diesem Zweck wurde das getrocknete Material bei den entsprechenden Bedingungen für 15 Tage gelagert und im Anschluss die Wasseraktivität und der Restwassergehalt ermittelt.

### 5.3.6 Bestimmung der Überlebensrate nach der Trocknung und Lagerung

Zur Beurteilung des Einflusses der Trocknung und Lagerung auf die Schädigung von *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* wurde die Keimzahl  $N$  als Anzahl koloniebildender Einheiten (kbE) auf MRS vor der Trocknung, nach dem Gefrieren, nach unterschiedlichen Trocknungszeiten und nach unterschiedlichen Lagerzeiten bestimmt.

Die Bestimmung der kbE basiert darauf, dass vermehrungsfähige Keime in der Lage sind, auf einem geeigneten Nährmedium eine mit dem Auge sichtbare Kolonie zu bilden. Dabei geht man vereinfachend davon aus, dass jede Kolonie aus einer einzelnen Zelle entsteht.

Um die kbE nach der Trocknung bestimmen zu können, wurden die gefriergetrockneten bzw. gelagerten Proben mit einem Trocknungsgewicht von  $m_{PT}$  zunächst mit sterilem bidestilliertem Wasser bei 25 °C auf ihr Ausgangsgewicht vor der Trocknung  $m_{PvT}$  rehydratisiert. Die Menge an zugegebenem Wasser  $m_W$  entsprach der Differenz  $\Delta m_P$  zwischen der Probenmasse vor der Trocknung  $m_{PvT}$  und nach der Trocknung  $m_{PT}$ .

Zur Ermittlung der kbE wurden mit je 1 ml der ungetrockneten Zellsuspensionen beziehungsweise der rehydratisierten Proben Verdünnungsreihen von 1:10 in Ringerlösung hergestellt. Von den einzelnen Verdünnungsstufen wurden 100 µl auf MRS Nährmedium aufgetragen (Petrischale) und im Oberflächenspatelverfahren mit einem Drigalsky-Spatel verteilt. Von

jeder ausgestrichenen Verdünnungsstufe wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Die MRS-Agar-Platten wurden anschließend bei 37 °C für 48 h unter anaeroben Bedingungen inkubiert. Der Luftsauerstoff wurde entweder chemisch gebunden oder durch Evakuierung und Begasung der Inkubationsgefäße mit Kohlendioxid und Stickstoff physikalisch entfernt. Durch die Evakuierung wurde ein Sauerstoffpartialdruck von 0,008 bar im Gasgemisch erreicht. Die von den vermehrungsfähigen Keimen gebildeten weißen Kolonien (Abbildung 28) wurden nach der Inkubation ausgezählt und zur Berechnung der kbE mit dem Verdünnungsfaktor der jeweiligen Platte multipliziert.



**Abbildung 28:** *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* auf MRS nach der Bebrütung bei 37 °C für 48 Stunden.

Für die Auswertung wurden nur Platten berücksichtigt, auf denen eine Anzahl zwischen 30 und 300 Kolonien auf dem Nährmedium zu erkennen war. Wenn also bei einem Volumen von 100 µl der unverdünnten Probe die zu wertende Mindestanzahl an kbE 30 ist, so liegt die Nachweisgrenze des Spatelverfahrens bei 300 kbE/ml der unverdünnten Zellsuspension. Bei niedrigeren Zellkonzentrationen kann die Keimzahl nicht mehr spezifiziert werden.

Aus den gemessenen Keimzahlen  $N$  wurde die Überlebensrate  $S$  berechnet. Die prozentuale Überlebensrate nach dem Gefrieren  $S_G$  berechnet sich aus der Keimzahl der frischen Zellsuspension vor dem Gefrieren  $N_0$  und der Keimzahl nach dem Gefrieren  $N_G$  nach Gleichung (18).

$$S_G = \frac{N_G}{N_0} \cdot 100 \quad (18)$$

Die Überlebensrate  $S_T$  nach unterschiedlichen Zeiten der Gefriertrocknung berechnet sich analog aus der Keimzahl der frischen Zellsuspension vor dem Gefrieren  $N_0$  und der Keimzahl nach unterschiedlichen Trocknungszeiten  $N_T$  nach Gleichung (19):

$$S_T = \frac{N_T}{N_0} \cdot 100 \quad (19)$$

Für die Ermittlung der Lagerstabilität wurde die Keimzahl nach unterschiedlicher Lagerdauer  $N_L$  auf die Keimzahl nach der Gefriertrocknung,  $N_T$ , entsprechend Gleichung (20) bezogen.

$$S_L = \frac{N_L}{N_T} \quad (20)$$

### 5.3.7 Formale Reaktionskinetik und Statistik

#### *Formale Reaktionskinetik*

Die prozess- bzw. zeitabhängige Veränderung der Zellkonzentration  $N$ , die bei der Temperatur  $T$  und der Wasseraktivität  $a_w$  durch die betrachtete Reaktion abgetötet wird, ist durch die Reaktionsgeschwindigkeit  $dN/dt$  mit der Geschwindigkeitskonstanten  $k_{T,a_w}$  nach Gleichung (21) definiert. Der Exponent  $n$  stellt die Reaktionsordnung dar (Schwister, 1996).

$$\frac{dN}{dt} = -k_{T,a_w} \cdot N^n \quad (21)$$

Die Reaktionsgeschwindigkeit einer irreversibel verlaufenden Reaktion ist der Konzentration der Reaktanden proportional. Die Proportionalitätskonstante  $k_{T,a_w}$  ist die Geschwindigkeitskonstante des Inaktivierungsvorganges. Sie hat bei gegebener Temperatur und Wasseraktivität einen charakteristischen Wert. Für eine Reaktion 1. Ordnung, nach der in einer Vielzahl der Fälle auch die Mikroorganismeninaktivierung erfolgt, nimmt der Exponent  $n$  den Wert 1 an. Durch Integration von Gleichung (21) erhält man für den zeitlichen Verlauf der Mikroorganismenkonzentration  $N$  bezogen auf die Mikroorganismenkonzentration zum Zeitpunkt  $t=0$ ,  $N_0$ , Gleichung (22).

$$\frac{N}{N_0}(t) = e^{-k_{T,a_w} \cdot t} \quad (22)$$

Die Geschwindigkeitskonstante  $k_{T,a_w}$  ist temperaturabhängig. Diese Temperaturabhängigkeit kann entweder nach Arrhenius (Gleichung (5)) im flüssigen Zustand und im Glaszustand oder nach Williams-Landel-Ferry (WLF) (Gleichung (6)) für ein fragiles System im Nicht-Glaszustand beschrieben werden.

### Statistik

Alle Versuche wurden in unabhängigen Experimenten wiederholt. Das heißt, dass für jeden Einzelmesswert eine eigene Fermentation mit den daran anschließenden Versuchsschritten, entsprechend vorhergehender Beschreibung, durchgeführt wurde.

Bei der Untersuchung des Einflusses der Gefriertrate und der Endtemperatur wurde eine dreifache Bestimmung der Überlebensrate durchgeführt. Für die Analyse des Einflusses der Verweilzeit im gefrorenen Zustand wurde der Verlauf der Überlebensrate in zwei unabhängigen Versuchen ermittelt. Die Überlebensrate, der Restwassergehalt und das entfernte Wasser während der Gefriertrocknung wurden in drei unabhängigen Experimenten wiederholt ermittelt. Die Messung der Glasübergangstemperatur erfolgte für die entsprechenden Prozessbedingungen jeweils in zwei unabhängigen Experimenten. Auch das Gefrierverhalten wurde für eine Formulierung zweimal unabhängig voneinander analysiert. Die Mittelwertbildung erfolgt mit Hilfe des arithmetischen Mittelwertes, Gleichung (23). Das Streumaß des Mittelwertes wurde bei einem Stichprobenumfang von 3 nach der empirischen Standardabweichung bestimmt, für einen Stichprobenumfang von 2 werden als Grenzen des Fehlerbereichs der maximale und der minimale gemessene Wert dargestellt.

Der Verlauf der Überlebensrate der gefriergetrockneten Zellpräparationen während der Lagerung wurde für alle Lagerbedingungen zweimal in unabhängigen Experimenten untersucht. Die Ermittlung der Geschwindigkeitskonstanten  $k_{T,aw}$  erfolgte mittels linearer Regression unter Verwendung aller Einzelergebnisse für die gleichen Lagerbedingungen. Zur Bestimmung des Fehlerbereichs des Mittelwertes wurde die Standardabweichung der ermittelten Steigung der Geraden herangezogen. Für die Ermittlung der Glasübergangstemperatur in Abhängigkeit von der Wasseraktivität wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Der arithmetische Mittelwert  $\bar{x}$  berechnet sich mit dem Stichprobenumfang  $z$  und dem Ergebnis eines Einzelversuchs  $x_i$  nach Gleichung (23).

$$\bar{x} = \frac{1}{z} \sum_{i=1}^z x_i \quad (23)$$

Um den Betrag des zufälligen Fehlers bei einer dreifachen Bestimmung abschätzen zu können, mit dem die Einzelversuche behaftet sind, beziehungsweise um zu ermitteln, wie stark die Versuchsergebnisse streuen, wurde die empirische Standardabweichung  $SA$  nach Gleichung (24) bestimmt:

$$SA = \sqrt{\frac{1}{z-1} \sum_{i=1}^z (x_i - \bar{x})^2} \quad (24)$$

Zur Quantifizierung der Streuung einer Doppelbestimmung wurde die Differenz zwischen dem arithmetischen Mittelwert und dem Maximal- bzw. Minimalwert herangezogen.

Zur Bestimmung der Streuung einer indirekt ermittelten Größe  $h$  wird entsprechend der Fehlerfortpflanzung nach Gauss eine mittlere Abweichung  $\Delta h$  aus den Standardabweichungen  $SA_x$  und  $SA_y$  der direkt gemessenen Größen  $x$  und  $y$  nach Gleichung (25) berechnet (Kreyszig, 1979).

$$\Delta h = \sqrt{\left(\frac{\partial h}{\partial x}\right)^2 SA_x^2 + \left(\frac{\partial h}{\partial y}\right)^2 SA_y^2} \quad (25)$$

## 6 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Im Folgenden werden die Ergebnisse bezüglich des Gefrierverhaltens, der Einflussgrößen des Gefrierens auf die Überlebensrate des Modellmikroorganismus sowie der daraus abgeleiteten Gestaltung des Gefrierprozesses dargestellt. An diese Ergebnisse schließen die Untersuchungen zur Bedeutung der Verfahrenstechnik der Gefriertrocknung und des Phasen-Zustandsdiagramms für die Überlebensrate an. Im letzten Abschnitt erfolgt die Darstellung der Entwicklung der Überlebensrate während der Lagerung unter verschiedenen Bedingungen sowie die Bedeutung des physikalischen Zustands für die Stabilität der Mikroorganismen.

### 6.1 Gefrieren von Mikroorganismenpräparationen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Gefrierverhalten von Zellsuspensionen im Hinblick auf die Gefrierpunktsabsenkung untersucht und der Anteil an nicht ausfrierbarem Wasser für verschiedene Formulierungen ermittelt. Der Gefrierprozess selbst stellt bereits eine Dehydrierung des biologischen Systems dar. Schutzstoffe sind in der Lage, den Gefrierpunkt abzusenken, so dass bei diesen Formulierungen bei einer bestimmten Temperatur weniger Wasser im kristallinen Zustand vorliegt als bei Suspensionen ohne Schutzstoff. Die Information über das Gefrierverhalten der verschiedenen Formulierungen ist für die Auswahl der Prozessparameter während des Gefrierens und der Gefriertrocknung notwendig. Ferner stellt die Gefrierkurve der Zellsuspensionen mit Laktose einen Teil des für diese Formulierung erstellten Phasen-Zustandsdiagramms dar.

Des Weiteren wurden in dieser Arbeit der Einfluss der Kühlrate, der Zusammensetzung sowie der Endtemperatur auf die Überlebensrate von *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* separat untersucht. Dies sollte dem Zweck dienen, den Gefrierprozess, der einem Lyophilisationsprozess immer vorgeschaltet ist, im Hinblick auf die Überlebensrate für die weiteren Gefriertrocknungsuntersuchungen günstig gestalten zu können.

Überdies wurde die Überlebensrate in Abhängigkeit von der Verweilzeit im gefrorenen Zustand analysiert. Die Information über die Zeitabhängigkeit der Überlebensrate im gefrorenen Zustand soll zum Verständnis der prozessbedingten Abnahme der Überlebensrate während der Gefriertrocknung beitragen. Im Hinblick auf die Inaktivierung der Mikroorganismen während der anschließenden Gefriertrocknung kann ein summarischer Inaktivierungseffekt vermutet werden, der sich aus dem Wasserentzug und aus physikalischen/chemischen Schädigungsprozessen im gefrorenen Probenabschnitt zusammensetzt.



### 6.1.1 Gefrierkurven einer wässrigen Laktoselösung sowie von Zellsuspensionen mit unterschiedlichen Formulierungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Abhängigkeit der Gefriertemperatur  $T$  von der Feststoffkonzentration  $c$  für Zellsuspensionen unterschiedlicher Zusammensetzung ermittelt. Die Gefriertemperatur wird für diesen Zusammenhang während des Schmelzvorgangs (nach vorangegangenem Gefrieren) und somit als Schmelztemperatur ermittelt. Die Kristallisation würde erst nach Unterkühlung einsetzen und als Folge würde die dabei ermittelte Kristallisationstemperatur keine Größe für einen thermodynamischen Gleichgewichtszustand darstellen.

Folgende Formulierungen wurden untersucht:

- *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* in Phosphatpufferlösung (PBS),
- *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* in PBS+Laktose (0,25 g/gZelltrockenmasse),
- *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* in PBS+Magermilchpulver (0,5 g/gZelltrockenmasse),
- Wässrige Laktoselösung, für die das Gefrierverhalten aus der Literatur bekannt ist, dient zum Abgleich der verschiedenen Methoden.

Zur Erstellung einer Gefrierkurve wurden zwei Methoden angewendet:

1. Es wurde eine Konzentrationsreihe der entsprechenden Lösung/Suspension erstellt und die unterschiedlichen Konzentrationen einer thermischen Analyse unterzogen. Vom gemessenen Wärmestrom  $q$  in Abhängigkeit von der Temperatur  $T$  wird jeweils die Temperatur  $T_{max,c}$  am Peakmaximum von  $q$  während des Schmelzvorgangs einer Lösung/Suspension mit der Konzentration  $c$  herangezogen. Diese Temperaturen werden als Schmelztemperatur für die entsprechende Konzentration angesehen. Der Zusammenhang  $T_{max,c}(c)$  stellt die Gefrierkurve dar.
2. Der Wärmestrom  $q$  wurde im Temperaturbereich des Schmelzens in Abhängigkeit von der Temperatur integriert. Die Gefrierkurve ergibt sich aus dem Zusammenhang zwischen der Fläche  $\Delta H_{m,P}(T)$  (mit  $\Delta H_{m,P} = \int_{T_A}^T q(T)dT$ )

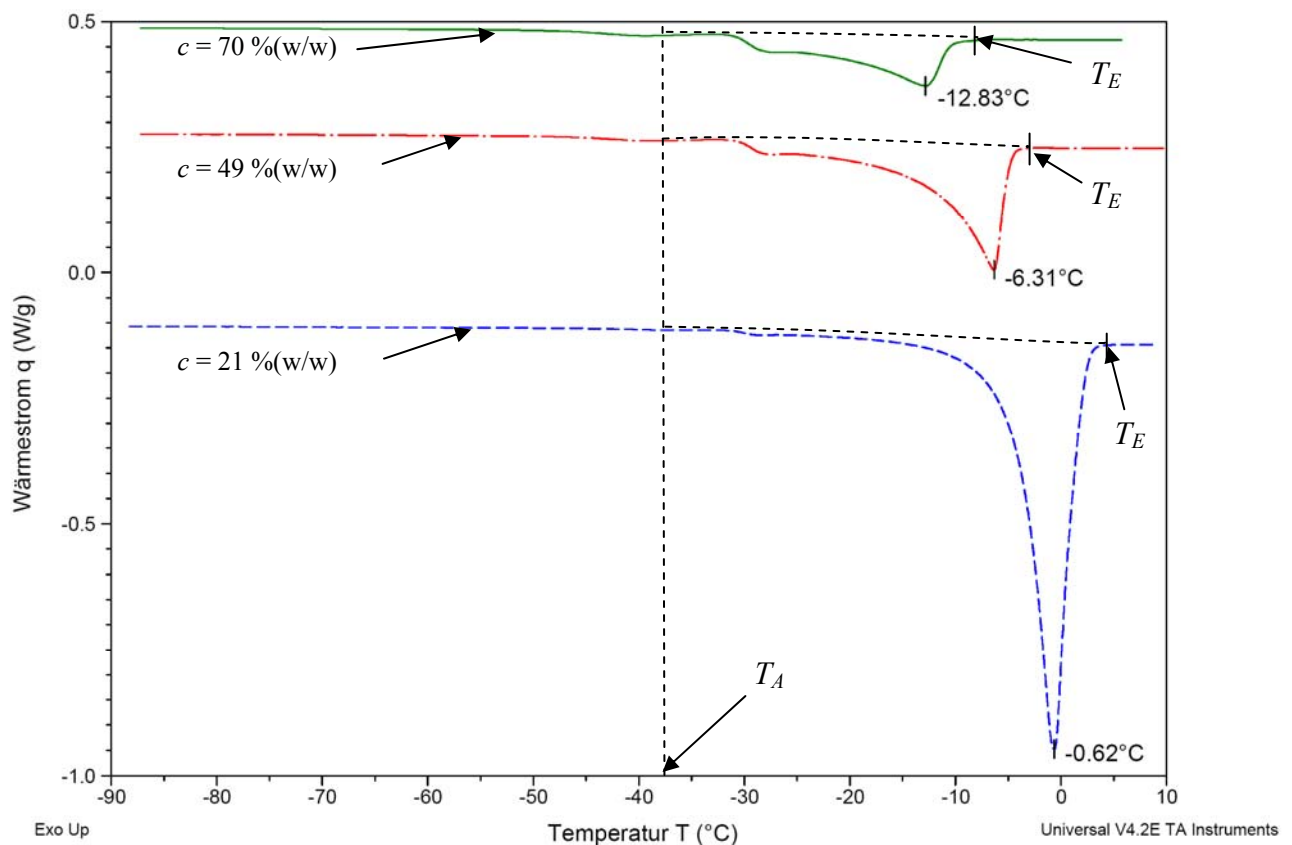
#### *Gefrierkurve einer wässrigen Laktoselösung*

Zum Abgleich der verschiedenen Methoden wurde zunächst das Gefrierverhalten einer wässrigen Laktoselösung ermittelt, deren Gefrierkurve aus der Literatur (Vuataz, 2002) bekannt

ist. Aus diesem Grund werden im Folgenden zunächst die Vorgehensweise und die Ergebnisse der reinen Laktoselösung erläutert.

Abbildung 29 zeigt den Wärmestrom  $q$  in Abhängigkeit von der Temperatur  $T$  für Laktoselösungen mit den Ausgangsfeststoffkonzentrationen  $c = 21\%$  (w/w),  $49\%$  (w/w) und  $70\%$  (w/w). Die Proben wurden während der DSC-Messung auf  $-90\text{ °C}$  abgekühlt und anschließend wieder erwärmt. In Abbildung 29 ist nur der Wärmestrom während der Erwärmung und nicht während der Abkühlung dargestellt.

Die Temperaturen der Peakmaxima,  $T_{max,c}$ , sowie die Temperaturbereiche ( $T_A$  bis  $T_E$ ), über den die Kurven integriert wurden, sind markiert.



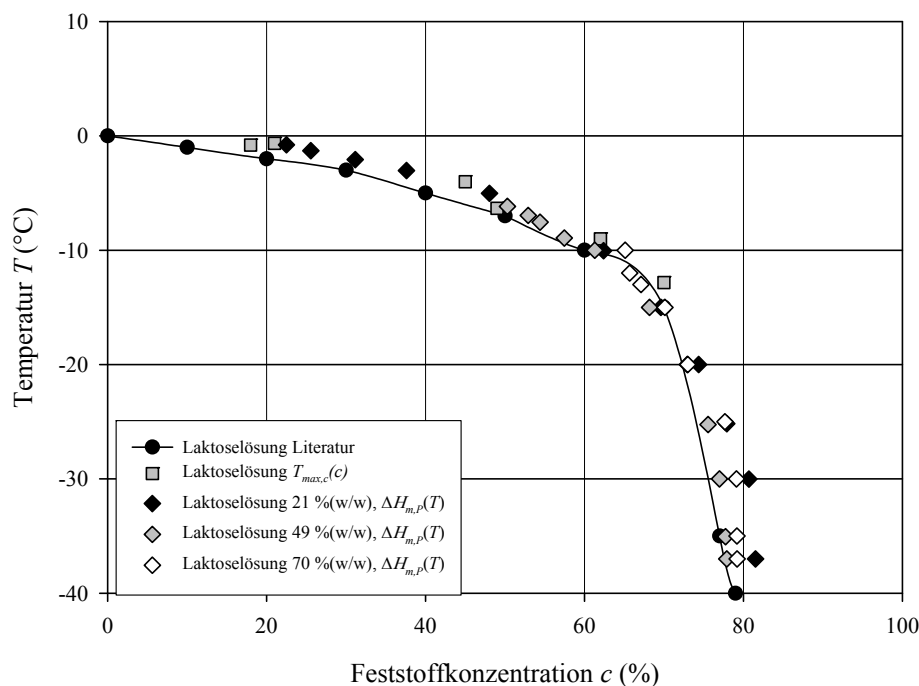
**Abbildung 29:** Wärmestrom  $q$  in Abhängigkeit von der Temperatur  $T$  für wässrige Laktoselösungen mit Feststoffkonzentrationen von  $21\%$  (w/w),  $49\%$  (w/w) und  $70\%$  (w/w).  $T_A$  ist die Schmelzpeakanfangstemperatur,  $T_E$  die Endtemperatur. Die Schmelzpeaks werden jeweils von  $T_A$  bis  $T_E$  integriert.

Abbildung 29 zeigt, dass das Peakmaximum für höhere Feststoffkonzentrationen  $c$  bei niedrigeren Temperaturen liegt. So können für die Konzentrationen  $21\%$  (w/w),  $49\%$  (w/w) bzw.  $70\%$  (w/w) Temperaturen  $T_{max,c}$  von  $-0,62\text{ °C}$ ,  $-6,31\text{ °C}$  bzw.  $-12,83\text{ °C}$  ermittelt werden. Ferner ist deutlich, dass die Peakfläche mit zunehmender Feststoffkonzentration abnimmt, da

weniger Wasser aus der Laktoselösung ausfriert. Die Thermogramme für 49 % (w/w) und 70 % (w/w) zeigen überdies eine stufenförmige Änderung der Basislinie, die sich von einer Temperatur von ca.  $-47\text{ °C}$  bis  $-40\text{ °C}$  erstreckt. Diese Änderung ist auch bei 21 % (w/w) vorhanden, allerdings bei dieser Auflösung nicht zu erkennen. Die stufenförmigen Änderungen stellen den Glasübergang der Laktoselösung dar (Roos, 1995). Dieser Anstieg der Basislinie wird somit noch nicht zum Schmelzvorgang des Wassers gezählt. Das Schmelzen des Wassers der Laktoselösungen beginnt für alle Ausgangsfeststoffkonzentrationen annähernd bei der gleichen Temperatur  $T_A$  von  $-37\text{ °C}$ . Der asymmetrische Verlauf der Peaks ergibt sich aus der Temperaturabhängigkeit des Schmelzens von Eis in einer Lösung.

Es wurden Gefrierkurven  $T(c)$  erstellt, indem sowohl  $T_{max,c}$  in Abhängigkeit von  $c$  ermittelt wurde als auch die Größe der Peakfläche für unterschiedliche Ausgangskonzentrationen in Abhängigkeit von der oberen Temperaturgrenze  $T$  der Fläche  $\Delta H_{m,P}(T)$  (vgl. Abbildung 25 und Abbildung 26). Aus der Peakfläche wurde die Konzentration an nicht ausgefrorenem Wasser ermittelt, wodurch wiederum  $T(c)$  ermittelt werden konnte.

Abbildung 30 zeigt die Verläufe der Gefriertemperatur in Abhängigkeit von der Feststoffkonzentration für eine wässrige Laktoselösung aus der Literatur sowie die Ergebnisse  $T_{max,c}(c)$  und  $\Delta H_{m,P}(T)$  nach den beschriebenen Methoden.



**Abbildung 30:** Gefriertemperatur in Abhängigkeit von der Feststoffkonzentration für eine wässrige Laktoselösung nach Vuataz (2002) sowie mit Hilfe der Methoden (1)  $T_{max,c}(c)$  und (2)  $\Delta H_{m,P}(T)$  berechnet.

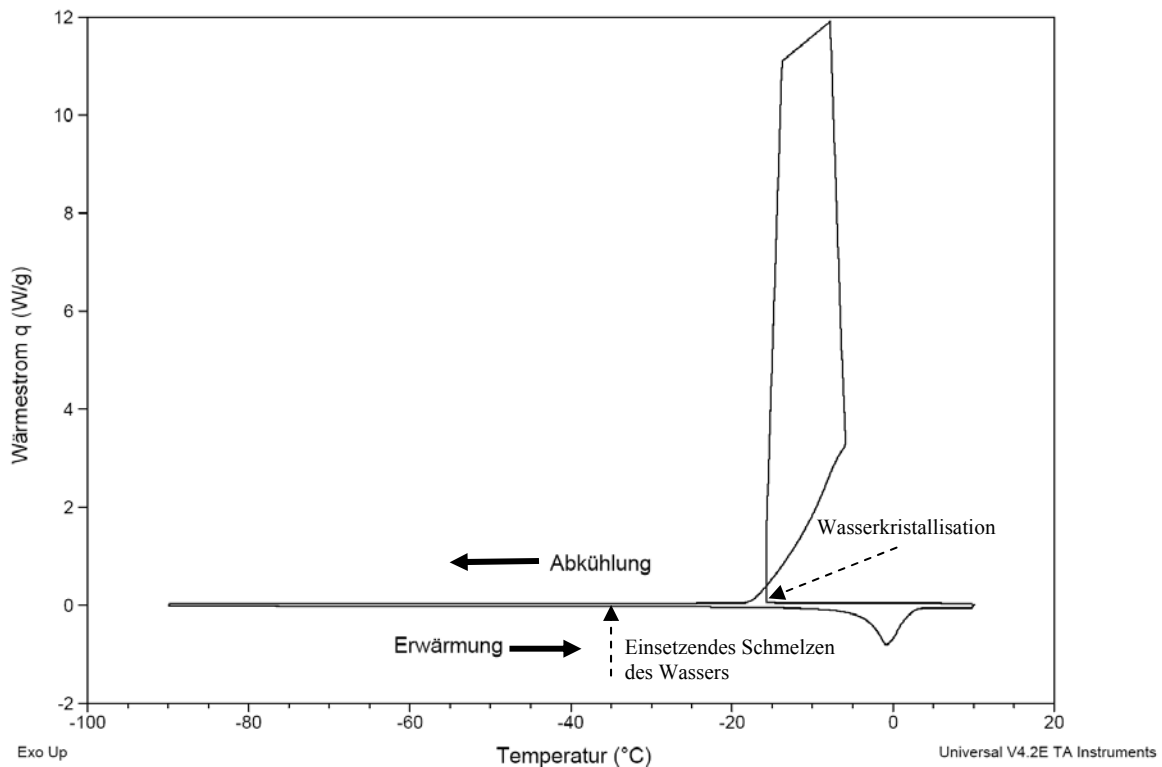
Es wird deutlich, dass die unterschiedlichen Methoden zu vergleichbaren Ergebnissen führen und auch gut mit der Literatur übereinstimmen. Es ist also möglich, durch Integration der Schmelzpeaks die Gefrierkurve zu ermitteln. Vorteilhaft ist dabei, dass nur eine Konzentration benötigt wird und keine Konzentrationsreihe erstellt werden muss. Des Weiteren entspricht der Verlauf der Konzentration an nicht ausgefrorenem Wasser aus dem Verlauf der Peakfläche den Vorgängen im Rahmen der Versuche beim Einfrieren der Proben besser. Mit zunehmender Feststoffkonzentration wird die Herstellung der entsprechenden Konzentration aufwändiger, da der Zucker zunächst bei immer höheren Temperaturen gelöst werden muss und erst im Anschluss gekühlt werden kann. Gerade bei den Mikroorganismenpräparaten mit hohen Feststoffkonzentrationen und niedriger Gefriertemperatur kann die Lösungsprozedur nicht mehr durchgeführt werden, ohne das Präparat thermisch zu verändern. Niedrige Gefriertemperaturen bei hohen Feststoffkonzentrationen können folglich unter Verwendung einer Konzentrationsreihe nicht ermittelt werden.

#### *Gefrierkurven von Zellsuspensionen mit und ohne Schutzstoffe*

Beide Methoden wurden auch für Zellsuspensionen in Phosphatpuffer mit Laktose (0,25 g/gZelltrockenmasse) angewendet. Dabei sollte ermittelt werden, ob auch für dieses System beide Methoden vergleichbare Ergebnisse liefern. Zur Ermittlung der Gefriertemperatur wurden Proben mit einer Feststoffkonzentration im Bereich von 15 %, 20 %, 50 %, 60 und 70 % erstellt. Der genaue Trockenmasse- bzw. Wasseranteil wurde jeweils mittels Karl Fischer Titration bestimmt.

Die DSC-Messung bestand aus einem Kühlzyklus von 20 °C auf -90 °C. Anschließend wurden diese Proben mit einer linearen Heizrate von 2 K/min (sowie einer Modulation von  $\pm 0,5$  K/min) wieder erwärmt und die Schmelztemperatur ermittelt.

Abbildung 31 zeigt den gemessenen Wärmestrom  $q$  in Abhängigkeit von der Temperatur  $T$  für eine Suspension aus *Lb paracasei* ssp. *paracasei* in PBS mit Laktose (0,25 g/gZelltrockenmasse) nach der Aufreinigungsprozedur. Es sind der Abkühlungsprozess und der Erwärmungsprozess markiert. Das Präparat weist eine Feststoffkonzentration  $c$  von 14 % auf.

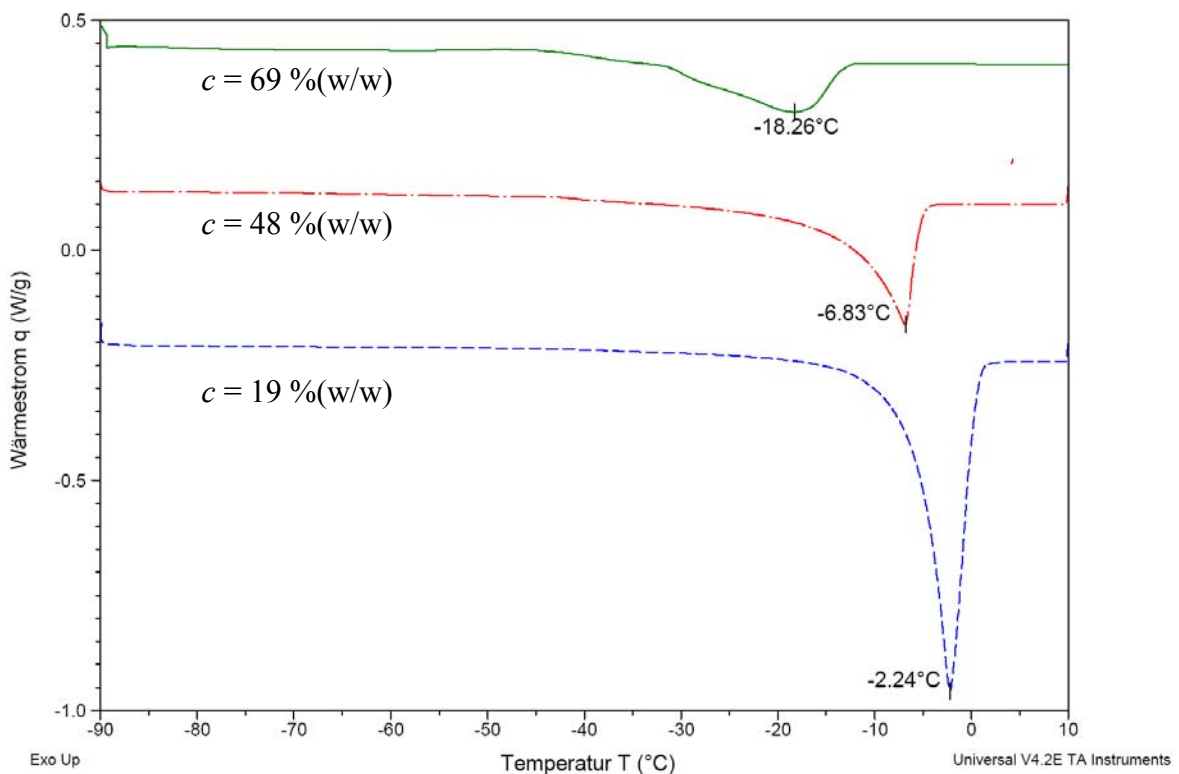


**Abbildung 31: Wärmestrom  $q$  in Abhängigkeit von der Temperatur  $T$  während des Abkühlungs- und Erwärmungszyklus für *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* mit Laktose (0,25 g/g<sub>Zelltrockenmasse</sub>). Feststoffkonzentration 14 %. Schmelzwärme bzw. Fläche des Schmelzpeaks 261 kJ/kg.**

Während des Abkühlungsprozesses setzt bei einer Temperatur von ca.  $-17\text{ °C}$  die Kristallisation von Wasser ein. Durch die freiwerdende Kristallisationswärme steigt der Wärmestrom an. Die vordefinierte Kühlrate ist vergleichsweise gering, so dass die freiwerdende Wärmemenge nicht schnell genug aus dem Produkt abgeleitet werden kann. Stattdessen wird die Temperatur des Produktes (x-Achse) während des Kristallisationsprozesses erhöht. Durch diese Vorgänge erscheint die Kurve während der Kristallisation „schleifenförmig“. Während des Gefrierens wird Eis aus der flüssigen Phase separiert und die gelösten Substanzen sowie die Zellen werden aufkonzentriert. Während der weiteren Abkühlung bleibt der Wärmestrom konstant, es tritt kein Phasenübergang mehr auf. Bei der anschließenden Erwärmung, die bei  $-90\text{ °C}$  beginnt, findet bei einer Temperatur von  $-35\text{ °C}$  das endotherme Schmelzen des Wassers statt. Der Schmelzvorgang erreicht bei einer Temperatur von  $-1,1\text{ °C}$  das Maximum des benötigten Wärmestroms  $q$  für den Schmelzvorgang. Die Fläche unter der Kurve ist ein Maß für die benötigte latente Wärme. In dem Beispiel von Abbildung 31 beträgt die latente Wärme 261 kJ/kg.

Abbildung 32 zeigt den Wärmestrom  $q$  in Abhängigkeit von der Temperatur  $T$  für Suspensionen bestehend aus *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* mit Laktose (0,25 g/g<sub>Zelltrockenmasse</sub>) in PBS, die

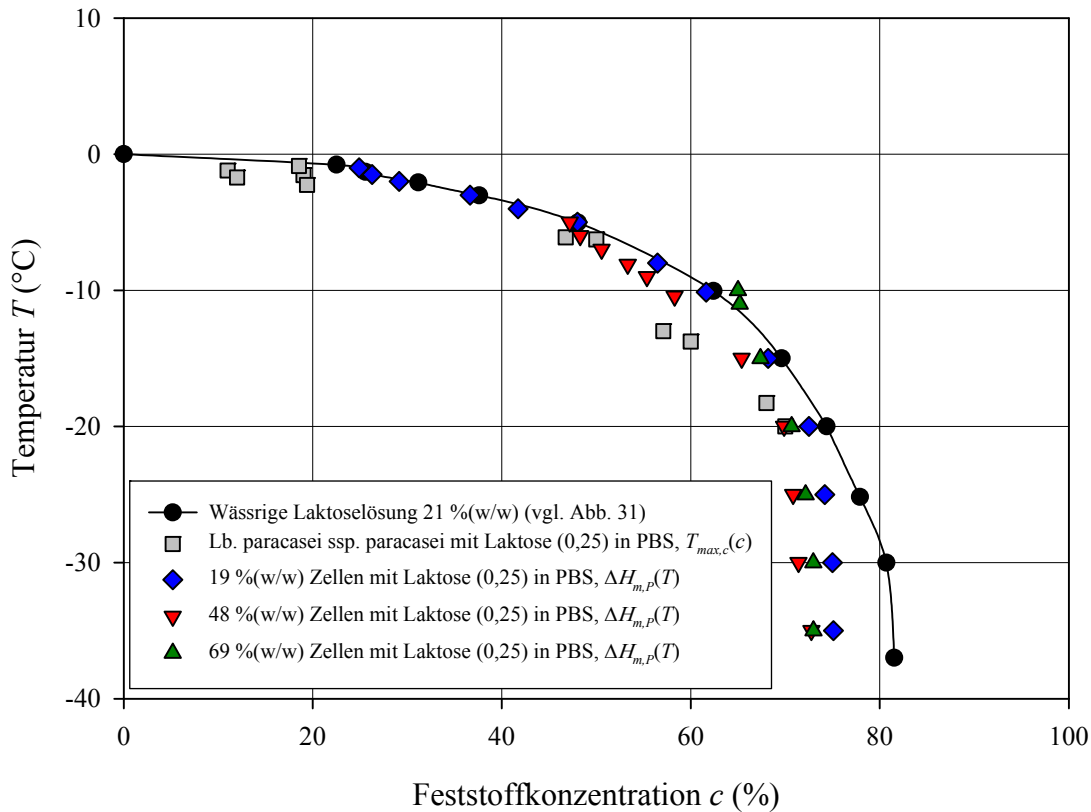
unterschiedliche Feststoffkonzentrationen aufweisen. Die Proben wurden zunächst eingefroren und auf  $-90\text{ °C}$  abgekühlt und anschließend wieder erwärmt. In Abbildung 32 ist das thermische Verhalten von Zellsuspensionen mit Laktose ( $0,25\text{ g/g}_{\text{Zelltrocknmasse}}$ ) mit unterschiedlichen Feststoffkonzentrationen  $c$  dargestellt. Im Gegensatz zu Abbildung 31 ist in Abbildung 32 nur der Wärmestrom während der Erwärmung und nicht während der Abkühlung dargestellt.



**Abbildung 32:** Wärmestrom  $q$  in Abhängigkeit von der Temperatur  $T$  für *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* mit Laktose ( $0,25\text{ g/g}_{\text{Zelltrocknmasse}}$ ) in PBS mit Ausgangsfeststoffkonzentrationen der flüssigen, nicht gefrorenen Suspension von  $19\text{ \% (w/w)}$ ,  $48\text{ \% (w/w)}$ ,  $69\text{ \% (w/w)}$ . Das Verhältnis von Laktosemasse und Zelltrocknmasse war für alle unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen konstant ( $0,25\text{ g/g}_{\text{Zelltrocknmasse}}$ ).

Abbildung 33 zeigt die Gefriertemperatur in Abhängigkeit von der Feststoffkonzentration  $c$  für Suspensionen bestehend aus *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* mit Laktose ( $0,25\text{ g/g}_{\text{Zelltrocknmasse}}$ ). Es sind sowohl die Temperaturen der Peakmaxima,  $T_{max,c}$  in Abhängigkeit von der entsprechenden Ausgangsfeststoffkonzentration als auch die Ergebnisse aus der Integration der Schmelzpeaks,  $\Delta H_{m,P}(T)$ , dargestellt. Die Peakanfangstemperatur  $T_A$  lag

bei  $-35\text{ °C}$ . Zusätzlich sind auch zum besseren Vergleich die Messwerte der wässrigen Laktoselösung (vgl. Abbildung 30) mit aufgetragen.

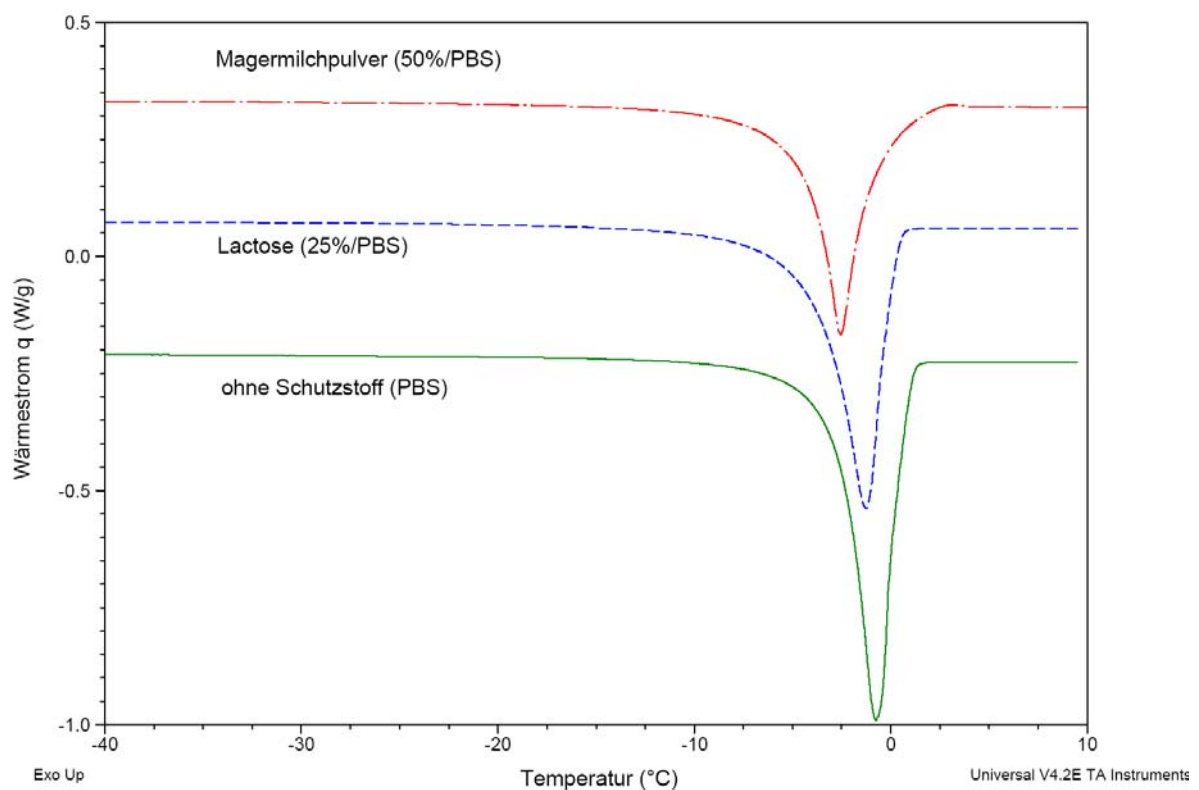


**Abbildung 33:** Gefrieretemperatur in Abhängigkeit von der Feststoffkonzentration für eine Suspension bestehend aus *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* mit Laktose (0,25 g/g<sub>Zelltrockenmasse</sub>) mit Hilfe der Methoden  $T_{max,c}(c)$  und  $\Delta H_{m,p}(T)$  berechnet. Zum Vergleich ist der Verlauf der Gefrieretemperatur der wässrigen Laktoselösung mit einer Ausgangskonzentration von 21% (vgl. Abbildung 30) dargestellt.

Abbildung 33 zeigt, dass die Zellsuspensionen ab einem Gehalt an nicht ausgefrorenem Wasser von ca. 50 % einen etwas niedrigeren Gefrierpunkt aufweisen als die wässrige Laktoselösung. Bei gleicher Temperatur ist der Anteil an nicht ausgefrorenem Wasser für Zellen/PBS/Laktose niedriger als für eine wässrige Laktoselösung. Des Weiteren zeigt Abbildung 33, dass die Messungen einzelner Konzentrationen gut mit den Ergebnissen der Integration der Peaks übereinstimmen. Ferner ist deutlich, dass es durch die partielle Integration möglich ist, auch den Gefrierpunkt des Wassers bei hohen Feststoffkonzentrationen zu bestimmen. Die Zellsuspension mit der höchsten gemessenen Ausgangskonzentration betrug 69 %. Dabei konnte eine Gefrieretemperatur von  $-18\text{ °C}$  ermittelt werden (vgl. Abbildung 32). Durch die Peakintegration kann festgestellt werden, dass bei weiterer Temperaturabsenkung noch mehr Wasser ausgefroren werden kann.

Im Folgenden wird die Gefrierkurve von Zellsuspensionen mit unterschiedlicher Zusammensetzung (ohne Schutzstoff in PBS, Magermilch/PBS) dargestellt. Die Ermittlung der Gefrierkurve erfolgte für die Formulierungen nach Methode (2) durch  $\Delta H_{m,P}(T)$  (siehe Kapitel 6.1.1).

Abbildung 34 zeigt den Wärmestrom  $q$  in Abhängigkeit von der Temperatur  $T$  von aufgereinigten Zellsuspensionen ohne Schutzstoff (PBS), sowie mit Magermilch 0,5 g/g<sub>Zelltrockenmasse</sub> (PBS) und zum Vergleich zusätzlich den Wärmestrom der Zellsuspension mit Laktose 0,25 g/g<sub>Zelltrockenmasse</sub> (PBS).



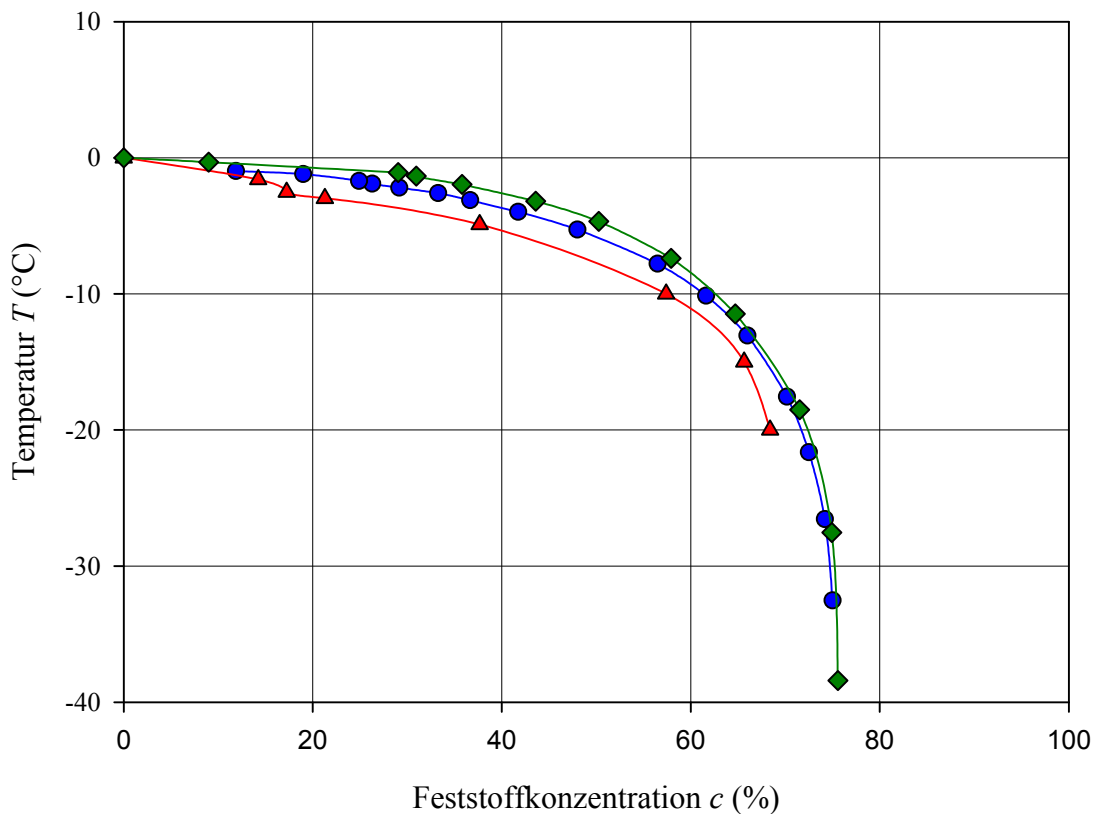
**Abbildung 34: Wärmestrom  $q$  in Abhängigkeit von der Temperatur  $T$  für Zellen ohne Schutzstoff, mit Laktose (0,25 g/g<sub>Zelltrockenmasse</sub>) oder mit Magermilchpulver (0,5 g/g<sub>Zelltrockenmasse</sub>) jeweils in PBS direkt nach der Aufreinigungsprozedur.**

Wie erwartet führt der Zusatz von Schutzstoffen zu einer Gefriertemperaturabsenkung bzw. zu einer Absenkung des Peakmaximums des Wärmestroms  $q$ . Für Magermilchpulver ist die Gefriertemperaturerniedrigung am stärksten ausgeprägt.

Abbildung 35 zeigt den Verlauf der Gefriertemperatur in Abhängigkeit von der Feststoffkonzentration in der nicht gefrorenen Phase für Zellen ohne Schutzstoff, mit Laktose (0,25 g/g<sub>Zelltrockenmasse</sub>) und mit Magermilch (0,5 g/g<sub>Zelltrockenmasse</sub>) jeweils in PBS. Für Mager-



milch war das Gefrieren von Wasser bei einer Temperatur von  $-19\text{ °C}$  beendet. Unterhalb dieser Temperatur konnte ein Glasübergang bei einer Midpoint Temperatur von  $-25,8 \pm 2,4\text{ °C}$  festgestellt werden. Die Integration des Schmelzpeaks kann erst bei Temperaturen oberhalb des Glasübergangs stattfinden, weshalb als Anfangstemperatur  $T_A$  des Schmelzpeaks für die Zellsuspensionen mit Magermilch der Wert  $-19\text{ °C}$  ausgewählt wurde.



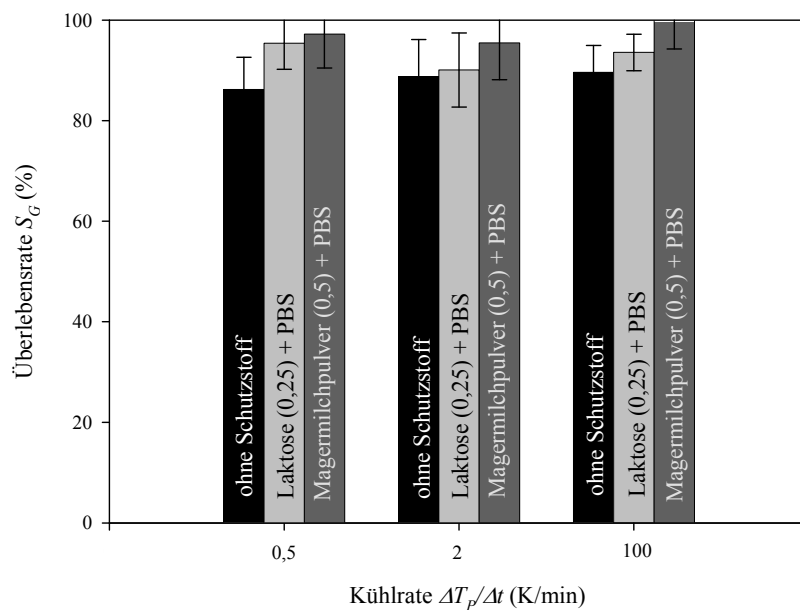
**Abbildung 35:** Gefriertemperatur  $T$  in Abhängigkeit von der Feststoffkonzentration  $c$  von Zellsuspensionen bestehend aus *Lb paracasei* ssp. *paracasei* ohne Schutzstoff (◆), mit Laktose ( $0,25\text{ g/g}_{\text{Zelltrockennasse}}$ ) (●) oder mit Magermilchpulver ( $0,5\text{ g/g}_{\text{Zelltrockennasse}}$ ) (▲), jeweils in PBS.

Wie aus Abbildung 35 zu ersehen, verläuft die Gefriertemperatur der Zellsuspension ohne Schutzstoff tendenziell auf dem höchsten Temperaturniveau. Zellen mit Laktose weisen tendenziell einen etwas niedrigeren Verlauf auf. Werden die Zellen mit Magermilch versetzt, so verläuft die Kurve auf dem niedrigsten Temperaturniveau. Aus diesen Gefriertemperaturverläufen folgt, dass bei gleicher Temperatur die Zellsuspension mit Magermilch den höchsten Anteil an nicht ausgefrorenem Wasser aufweist. So nimmt bei einer Temperatur von  $-20\text{ °C}$  der Anteil an nicht ausgefrorenem Wasser für Magermilch, Laktose bzw. PBS Werte von  $34\%$  (w/w),  $28\%$  (w/w) bzw.  $29\%$  (w/w) (vgl. Abbildung 35) an.

### 6.1.2 Einfluss der Kühlrate und der Gefriertemperatur auf die Überlebensrate von *Lb. paracasei* ssp. *paracasei*

*Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* wurde in Phosphatpufferlösung ohne Schutzstoff, mit Laktose (0,25 g/g<sub>Zelltrockenmasse</sub>) sowie mit Magermilch (0,5 g/g<sub>Zelltrockenmasse</sub>) bei verschiedenen Kühlraten auf eine Temperatur von -20 °C gekühlt. Diese Temperatur wurde ausgewählt, da sie während der Trocknungsversuche die höchste Produkttemperatur während des ersten Trocknungsabschnittes darstellte, wie im weiteren Verlauf in Kapitel 6.2 noch dargestellt wird. Es wurde angestrebt, dass die Zellen nach dem Gefrieren beim Übergang zur Haupttrocknung im gefrorenen Zustand nicht wieder erwärmt und aufgetaut wurden.

Abbildung 36 zeigt die Überlebensrate von *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* in Phosphatpufferlösung ohne Schutzstoff, Laktose (0,25 g/g<sub>Zelltrockenmasse</sub>) oder Magermilchpulver (0,5 g/g<sub>Zelltrockenmasse</sub>), nachdem die Zellen mit unterschiedlichen Kühlraten auf -20 °C eingefroren und wieder aufgetaut wurden.



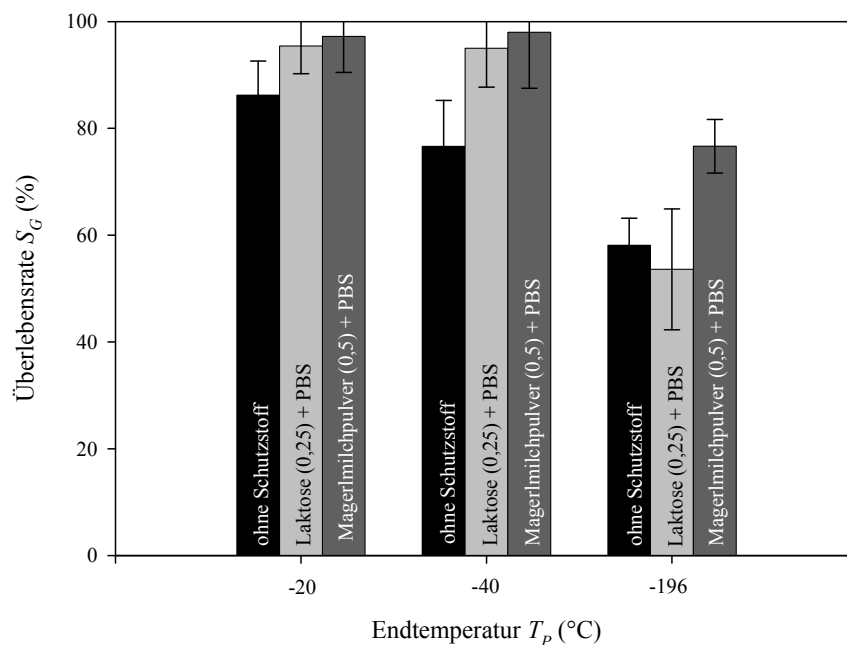
**Abbildung 36:** Überlebensrate  $S_G$  von *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* nach dem Gefrieren auf eine Temperatur von -20 °C mit unterschiedlichen Kühlraten und Schutzstoffen. (Mittelwerte ± Standardabweichung).

In Phosphatpuffer ohne Schutzstoffe werden für die verschiedenen Kühlraten (0,5 K/min, 2K/min, bzw. 100 K/min) etwas niedrigere Überlebensraten (86±6 %, 89±7 % bzw. 90±5 %) erzielt als mit Laktose (95±5 %, 90±7 % bzw. 93±3 %) oder Magermilch (97±7 %, 95±7 % bzw. 100 % (101±7 %)). Es wird deutlich, dass die Überlebensrate der Zellen zu einem gewissen Grad davon abhängig ist, ob die Schutzstoffe Laktose oder Magermilch im Gefrierme-

dium beim Gefrieren/Auftauen vorhanden sind. Des Weiteren ist deutlich, dass die Überlebensrate kaum von der Gefriertrate abhängig ist, wenn die gleiche Endtemperatur von  $-20\text{ °C}$  erreicht wird.

Es wurde ferner untersucht, welchen Einfluss die Endtemperatur auf die Überlebensrate der Zellen besitzt. Deshalb wurden die Zellen mit den Gefriereschwindigkeiten  $0,5\text{ K/min}$ ,  $2\text{ K/min}$  bzw.  $100\text{ K/min}$  auf die Temperaturen  $T_P$  von  $-20\text{ °C}$ ,  $-40\text{ °C}$  bzw.  $-196\text{ °C}$  abgekühlt.

Abbildung 37 zeigt die Überlebensrate von *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* ohne Schutzstoff sowie mit Laktose ( $0,25\text{ g/g}_{\text{Zelltrockenmasse}}$ ) oder mit Magermilchpulver ( $0,5\text{ g/g}_{\text{Zelltrockenmasse}}$ ) in PBS nach dem Abkühlen auf unterschiedliche Endtemperaturen  $T_P$  und anschließendem Auftauen.



**Abbildung 37: Überlebensrate  $S_G$  von *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* in unterschiedlichen Medien nach dem Gefrieren bis zu unterschiedlichen Endtemperaturen und anschließendem Auftauen. (Mittelwerte ± Standardabweichung)**

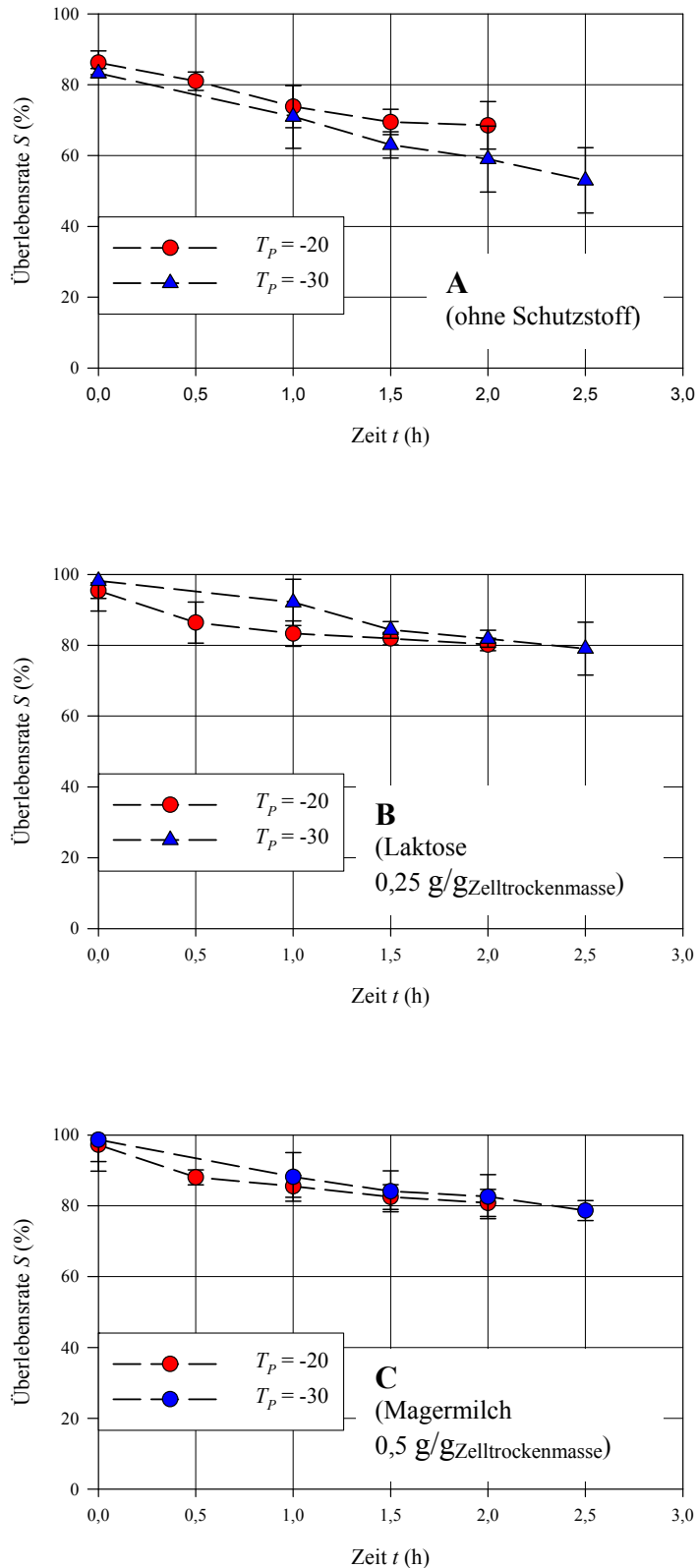
Für die Temperaturen  $-20\text{ °C}$ ,  $-40\text{ °C}$  bzw.  $-196\text{ °C}$  werden ohne Schutzstoffe Überlebensraten von  $86\pm 6\%$ ,  $77\pm 9\%$  bzw.  $58\pm 5\%$  erzielt. Für die Temperaturen  $-20\text{ °C}$  und  $-40\text{ °C}$  werden in Laktose oder Magermilch höhere Überlebensraten erzielt (Laktose:  $95\pm 5\%$  und  $95\pm 7\%$ , Magermilch:  $97\pm 7\%$  und  $98\pm 11\%$ ). Für eine Endtemperatur von  $-196\text{ °C}$  konnte nur für Magermilch eine höhere Überlebensrate ( $77\pm 5\%$ ) erzielt werden als ohne Schutzstoff. Bei einem Zusatz von Laktose war die Überlebensrate ( $54\pm 11\%$ ) nicht signifikant unterschiedlich von

der Überlebensrate im Gefriermedium ohne Schutzstoff. Die Inaktivierung ist bei der Anwesenheit von Schutzstoffen also weniger stark von der erreichten Endtemperatur abhängig.

### **6.1.3 Zeitlicher Verlauf der Überlebensrate von *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* im gefrorenen Zustand bei Einsatz unterschiedlicher Schutzstoffe**

Für die Haupttrocknung wurden bei den Produkttemperaturen  $-20\text{ °C}$  und  $-30\text{ °C}$  unterschiedliche Trocknungsgeschwindigkeiten (eingestellt durch unterschiedliche Stellflächentemperaturen  $T_{St}$ ) eingestellt und hinsichtlich der Entwicklung der Überlebensrate im gefrorenen Zustand in Abhängigkeit von der Verweilzeit analysiert.

Abbildung 38 zeigt den Verlauf der Überlebensrate von *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* im gefrorenen Zustand bei den Temperaturen  $-20\text{ °C}$  und  $-30\text{ °C}$  in Phosphatpuffer ohne Schutzstoff (A), mit Laktose (0,25) (B) oder mit Magermilchpulver (0,5) (C) als Schutzstoffe. Dabei stellt die Überlebensrate beim Zeitpunkt 0 den Wert dar, der nach dem Gefrieren auf die entsprechende Endtemperatur erreicht wurde.



**Abbildung 38:** Überlebensrate  $S_G$  von *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* in Abhängigkeit von der Verweildauer im gefrorenen Zustand bei unterschiedlichen Produkttemperaturen  $T_p$ . Die Zellen befinden sich in einer Matrix (A) ohne Schutzstoffe, (B) mit Laktose (0,25 g/gZelltrockenmasse) oder (C) mit Magermilch (0,5 g/gZelltrockenmasse) (Mittelwerte  $\pm$  Maximal- und Minimalwert).

Abbildung 38 zeigt, dass die Überlebensrate während des Verweilens im gefrorenen Zustand abnimmt. Wenn die Zellen im gefrorenen Zustand ohne Schutzstoff gehalten werden, so ist die Abnahme am stärksten ausgeprägt. Der Zusatz der Schutzstoffe Laktose und Magermilch führt zu einer verminderten zeitlichen Abnahme der Überlebensrate. Bei den Zellen ohne Schutzstoff zeigt sich bei der Temperatur von  $-20\text{ °C}$  eine langsamere Abnahme der Überlebensrate als bei der Temperatur  $-30\text{ °C}$ . Wird den Zellen Magermilch und Laktose als Schutzstoffe zugegeben, so zeigt der Verlauf der Überlebensrate nur eine geringe Abhängigkeit von der Temperatur.

#### **6.1.4 Diskussion der Prozesseinflüsse des Gefrierens auf die Überlebensrate der Zellen mit und ohne Schutzstoffe**

Wie aus Abbildung 36 und Abbildung 37 ersichtlich, beeinträchtigt der Gefrierprozess die Lebensfähigkeit von *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* in einem gewissen, jedoch nicht sehr ausgeprägten Maße, solange eine Gefriertemperatur von  $-40\text{ °C}$  nicht unterschritten wird. Durch die Zugabe von Magermilchpulver oder Laktose wird die Überlebensrate bei fast allen Prozessbedingungen erhöht. Ferner ist die Überlebensrate nicht signifikant von der Kühlrate abhängig (vgl. Abbildung 36) und nur in geringem Maße von der Gefrierendtemperatur (vgl. Abbildung 37). Im Hinblick auf die Endtemperatur (vgl. Abbildung 37) konnte ermittelt werden, dass beim Gefrieren ohne Schutzstoff die Temperatur von  $-20\text{ °C}$  zur höchsten Überlebensrate führte. Für die Formulierungen mit Schutzstoff führten die Temperaturen  $-20\text{ °C}$  und  $-40\text{ °C}$  zur höchsten, nicht signifikant unterschiedlichen Überlebensrate. Bei einer Endtemperatur von  $-196\text{ °C}$  wurde für alle Formulierungen die niedrigste Überlebensrate festgestellt. Der Einfluss der Temperatur zeigte sich für die Zellen ohne Schutzstoff am deutlichsten. Werden den Zellen Schutzstoffe zugesetzt, so zeigt sich zwischen  $-20\text{ °C}$  und  $-40\text{ °C}$  nur eine geringe Abnahme der Überlebensrate bei der niedrigeren Endtemperatur. Die Messungen des geschmolzenen Anteils an Wasser in Abhängigkeit von der Temperatur zeigen, dass durch das Gefrieren ohne Schutzstoff bei einer Temperatur von  $-20\text{ °C}$  ein etwas höherer Anteil an Wasser kristallin vorliegt als mit den Schutzstoffen Laktose oder Magermilch. Dies führt zu der Vermutung, dass eine Ursache für das Absterben von Zellen während des Gefriervorgangs ohne Schutzstoff der Dehydrierungseffekt ist. Die Dehydrierung ist umso höher, je niedriger die Temperatur ist. Diese Vermutung wird erhärtet durch die Erkenntnisse zum Inaktivierungsverhalten von Erythrozyten (Mazur, 1984). Für Erythrozyten ist ebenfalls bekannt, dass mit abnehmender Temperatur die Überlebensrate abnimmt. Wenn ein Schutzstoff in der Suspension vorhanden ist, so wird die Überlebensrate zu niedrigeren Temperaturen verschoben. Dies

ist in dem höheren Anteil an nicht ausgefrorenem Wasser beim Zusatz von Glycerin begründet. Je höher der Anteil an ausgefrorenem Wasser umso niedriger ist die Überlebensrate.

Es wurde beobachtet, dass die Zellen während des Verweilens im gefrorenen Zustand vor allem in einer Lösung ohne Schutzstoff innerhalb der untersuchten Zeiten fortlaufend inaktiviert werden. Deshalb kann der Dehydrierungseffekt nicht der einzige Grund für die Abnahme der Überlebensrate sein. Für Proteine ist eine schädigende Wirkung des Phosphatpuffers aufgrund der Konzentrierung im gefrorenen Zustand bekannt. Bei den hier gezeigten Ergebnissen wurden Suspensionen aus *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* in Phosphatpuffer mit einer Konzentration von 0,01 M PBS / 0,15 M NaCl eingefroren. Man weiß, dass die Funktionalität von Biomolekülen in Pufferlösungen während des Gefrierens und im gefrorenen Zustand aufgrund von pH-Verschiebungen und aufgrund erhöhter Salzkonzentrationen in der nicht ausgefrorenen, konzentrierten Restlösung beeinträchtigt werden kann. Beispielsweise konnten Anchoroquy und Carpenter (1996) für das System Laktatdehydrogenase in einer Phosphatpufferlösung aus 0,01 M PBS / 0,1 M NaCl einen pH-Shift von 7,5 auf 4,5 ermitteln. Sie stellten ferner fest, dass die Dissoziation von Laktatdehydrogenase während des Gefrierens mit der Aktivität des Enzyms nach der Gefriertrocknung korreliert. Sie kamen zu der Schlussfolgerung, dass die Dissoziation des Enzyms aus dem ermittelten pH-Shift durch das Gefrieren des Puffers resultiert. Durch den Zusatz des Schutzstoffes Polyvinylpyrolidon konnte nämlich sowohl der pH-Shift als auch die Dissoziation des Proteins vermieden werden.

Für das in der vorliegenden Arbeit untersuchte System kann vermutet werden, dass Oberflächenproteine durch den pH-Shift aus der Membran entfernt bzw. nicht mehr mit ihr assoziiert sind, wodurch die Proteine auch ihre Funktionalität verlieren (vgl. Alberts et al., 1990). Ferner kann auch die Konzentrierung des Elektrolyten NaCl im Phosphatpuffer und/oder die Konzentrierung von Puffersalzen einen schädlichen Effekt auf Proteine bewirken (Lovelock, 1953; Pikal-Cleland et al., 2000). Des Weiteren können die niedrigen Temperaturen an sich die Energie von Wasserstoffbrückenbindungen herabsetzen, wodurch die Abstoßungskräfte zwischen hydrophoben Gruppen im Inneren von Proteinen und der Proteinoberfläche herabgesetzt werden. Als Folge treten die hydrophoben Gruppen aus dem Molekülinneren an die Grenzfläche zum Wasser, der gefaltete Zustand wird instabil und Untereinheiten können dissoziieren (Franks, 1985). Diese Schädigungsmechanismen liegen vermutlich auch bei dem hier untersuchten System vor, weshalb die Überlebensrate der Zellen während des Verweilens im gefrorenen Zustand abnimmt und die Abnahme für die Suspension ohne Schutzstoffe am stärksten ist.

Für die Abhängigkeit der Überlebensrate der Mikroorganismen von der Kühlrate kann das in Kapitel 3.1 beschriebene Modell herangezogen werden. Demnach bildet sich durch die extrazelluläre Eiskristallbildung ein Wasserdampfdruckunterschied zwischen Zellinnen- und -außenraum. Um diesen auszugleichen, gibt das Cytoplasma Wasser an die Umgebung ab (osmotischer Stress), was eine Konzentrierung der intrazellulären Lösung und ein weiteres Anwachsen der extrazellulären Eismasse zur Folge hat. Durch die Konzentrationsänderung kann es im Intrazellulärraum zu Veränderungen des pH-Werts und der Ionenkonzentration kommen, was zu Proteindenaturierung oder Zellmembranschädigung führen kann.

Wie bereits in Kapitel 3.1 dargestellt, kann sowohl eine hohe als auch eine niedrige Gefrierate die Zelle zerstören. Für den hier verwendeten Organismus wurde kein Einfluss der Gefrierate ermittelt, was vermutlich auf das mehrschichtige Mureinnetz von gram-positiven Mikroorganismen zurückzuführen ist, wodurch die Wasserabgabe vom intra- in den extrazellulären Raum gehemmt wird. Dabei erhebt sich jedoch die Frage, ob bei einer Temperatur von  $-20\text{ °C}$ , bis zu der die Zellen in der hier vorliegenden Arbeit eingefrorenen wurden, das Cytoplasma überhaupt gefriert, was vermutlich nicht der Fall ist. (Mazur, 1984). Folglich würden die hier verwendeten Mikroorganismen durch Diffusion des Wassers aus der Zelle geschädigt. Dies wird allerdings durch das mehrschichtige Mureinnetzwerk verhindert, weshalb der hier verwendete Stamm nicht sensibel auf die Gefrierate reagiert. Werden die Zellen mit einer hohen Gefrierate auf  $-196\text{ °C}$  gekühlt, so wird die Gefriertemperatur des Cytoplasma sicher unterschritten. Aufgrund der hohen Gefrierate und des Widerstands der Mureinschicht wird die Wasserabgabe aus dem Zellinneren verhindert und es verbleibt vermutlich ein großer Anteil des Wassers im Zellinneren, das intrazellulär gefriert und aufgrund der Dichteanomalie des Wassers durch die Volumenvergrößerung mechanische Schäden bewirkt. Darauf lässt sich die niedrigere Überlebensrate bei einer Endtemperatur von  $-196\text{ °C}$  zurückführen.

Die höheren Überlebensraten der Proben, denen Magermilch ( $0,5\text{ g/g}_{\text{Zelltrockenmasse}}$ ) oder Laktose ( $0,25\text{ g/g}_{\text{Zelltrockenmasse}}$ ) zugesetzt wurden, lassen darauf schließen, dass die beiden Additive als Cryoprotektoren wirksam sind, indem sie die Biomoleküle bei niedrigen Temperaturen und mäßigem Wasserverlust sowohl durch Absenkung der Gefriertemperatur und durch die bevorzugte Anlagerung von Wassermolekülen an der Grenzfläche zwischen Protein und umgebender Schutzstofflösung (preferential hydration) in ihrer Konformation stabilisieren. Die Schutzmechanismen „water replacement“ und „Glaszustand“ kommen während des Gefrierprozesses noch nicht zum Tragen, da die Biomoleküle zu diesem Zeitpunkt noch in ausreichendem Maße hydriert sind.



## 6.2 Gefriertrocknung von Mikroorganismenpräparationen

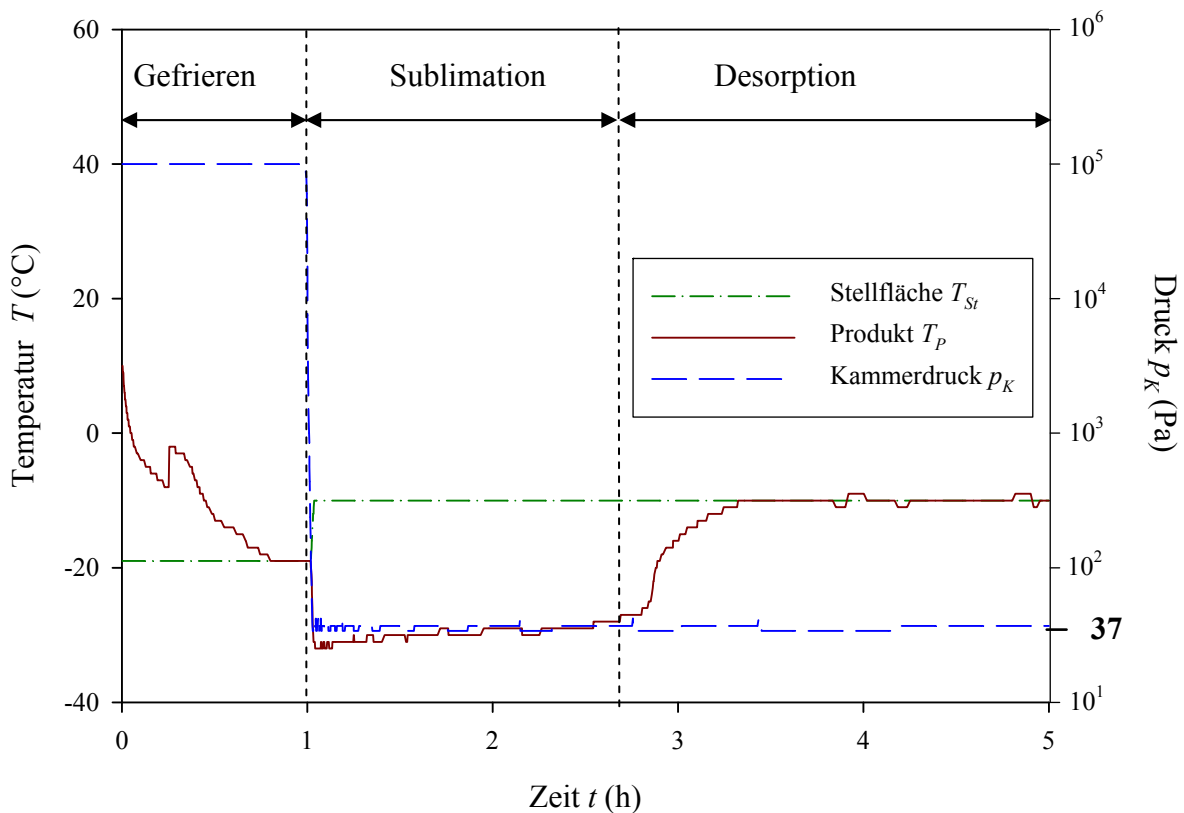
Im Rahmen der Arbeit wurden die Einflüsse der entscheidenden Betriebsparameter der Gefriertrocknung, nämlich der Kammerdruck  $p_K$  und die Stellflächentemperatur  $T_{St}$ , den Trocknungsverlauf und die Überlebensrate von *Lb. paracasei* ssp *paracasei* während des Wasserentzugs untersucht. Des Weiteren wurde ermittelt, ob und in welchem Maße die Trocknungsgeschwindigkeit durch die Probenzusammensetzung verändert und die Überlebensrate der Mikroorganismen gesteigert wird.

### 6.2.1 Trocknungsverlauf und Überlebensrate für *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* ohne Schutzstoffe für verschiedene Prozessbedingungen

Im Folgenden werden die Ergebnisse des Trocknungsverlaufs und der Entwicklung der Überlebensrate von Zellen zunächst in Phosphatpufferlösung (PBS) ohne Schutzstoff in Abhängigkeit von Kammerdruck und Stellflächentemperatur dargestellt.

#### *Produkttemperatur und Wasserentzug*

Abbildung 39 zeigt den Verlauf der Produkttemperatur  $T_P$ , der Stellflächentemperatur  $T_{St}$  und des Kammerdrucks  $p_K$  während des Gefrierens und der Gefriertrocknung von *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* in PBS ohne Schutzstoff. Als Beispiel sind  $T_P$ ,  $T_{St}$  und  $p_K$  für die Trocknungsbedingung 4 (37/-30/-10) dargestellt.



**Abbildung 39:** Verlauf der Produkttemperatur  $T_P$ , der Stellflächentemperatur  $T_{St}$  und des Kammerdrucks  $p_K$  während der Gefriertrocknung von *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* ohne Schutzstoff in PBS. Für die Haupttrocknung wurde ein Kammerdruck  $p_K$  von 37 Pa gewählt, was einer Sublimationstemperatur des Wassers von  $-30\text{ °C}$  entspricht. Die Stellflächentemperatur  $T_{St}$  wurde während des Gefrierens auf einen konstanten Wert von  $-20\text{ °C}$  eingestellt. Für die Haupttrocknung wurde für  $T_{St}$  ein Wert von  $-10\text{ °C}$  gewählt.

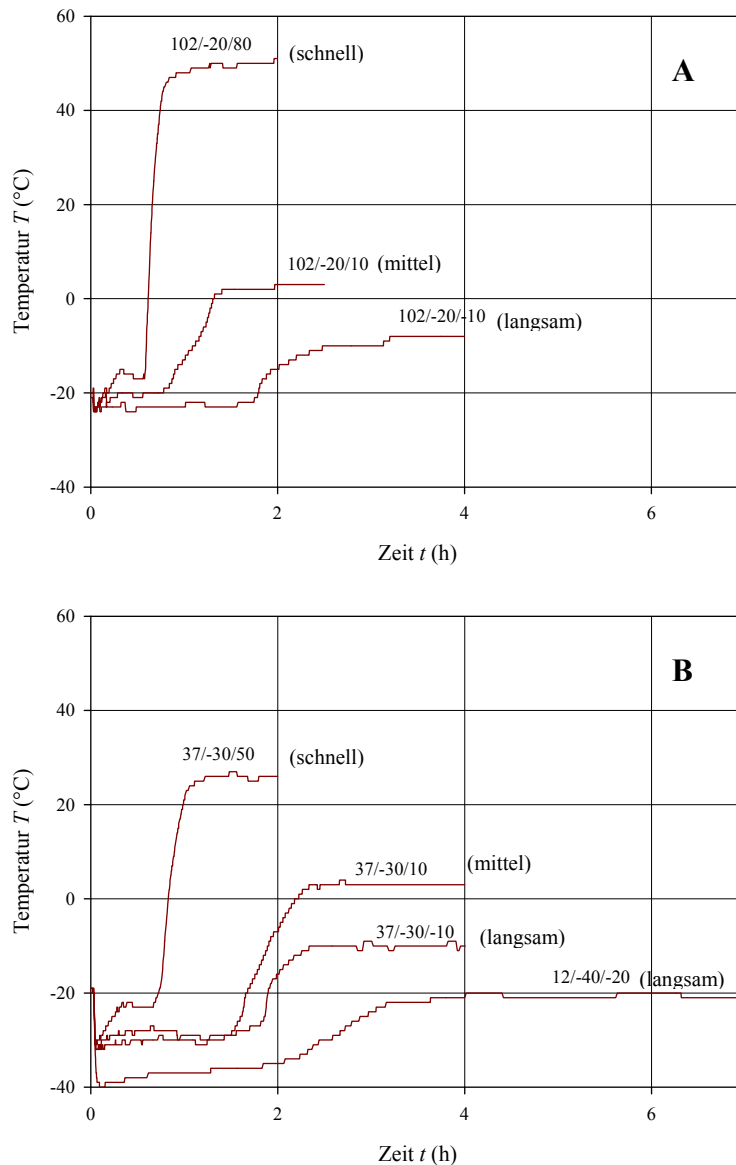
In Abbildung 39 stellt sich der Verlauf der Produkttemperatur  $T_P$ , der Stellflächentemperatur  $T_{St}$  und des Druckes  $p_K$  während des Gefrierens und der Gefriertrocknung folgendermaßen dar. Das Gefrieren wird bei einem konstanten Druck  $p_K$  von  $1,013 \cdot 10^5$  Pa durchgeführt. Die Stellflächentemperatur  $T_{St}$  weist während des Gefrierprozesses einen konstanten Wert von  $-20\text{ °C}$  auf. Die Ausgangstemperatur der Zellsuspension  $T_P$  war zu Beginn des Prozesses  $10\text{ °C}$ . Auf Grund des Kontaktes zwischen der Zellsuspension und der gekühlten Stellfläche wird der Zellsuspension Wärme entzogen und die Temperatur nimmt ab. Die Zellsuspension wird bis zu einem Temperaturbereich von  $-7\text{ °C}$  bis  $-10\text{ °C}$  unterkühlt. In diesem Temperaturbereich setzt die Kristallisation des Wassers ein. Durch die freiwerdende Kristallisationswärme wird das Produkt erwärmt und die Temperatur steigt auf ca.  $-2\text{ °C}$  an. Im weiteren Verlauf wird dem teilweise gefrorenen Produkt wieder Wärme entzogen, die Temperatur nimmt wieder ab. Nach einer Zeit von ca. 50 min erreicht die Produkttemperatur den Wert der Stellflä-

chentemperatur  $T_{St}$  von  $-20\text{ °C}$ . Die Bedingungen des Gefrierprozesses wurden für alle Trocknungsprozesse als Parameter konstant gehalten. Nach einer Gesamtzeit des Gefrierprozesses von 1 h wird der Gefriertrocknungsprozess eingeleitet, der, wie später gezeigt wird, je nach Kammerdruck und Stellflächentemperatur unterschiedliche Verläufe aufweist. Im dargestellten Beispiel wird der Druck  $p_K$  von  $1,013 \cdot 10^5\text{ Pa}$  auf  $37\text{ Pa}$  innerhalb von 3 min abgesenkt. Die Stellflächentemperatur  $T_{St}$  wird von  $-20\text{ °C}$  auf  $-10\text{ °C}$  erhöht. Die Produkttemperatur  $T_P$  weist zu Beginn der Druckabsenkung einen Wert von  $-20\text{ °C}$  auf. Entsprechend des Phasendiagramms von Wasser befindet sich Wasser bei einer Temperatur von  $-20\text{ °C}$  und einem Druck von  $37\text{ Pa}$  im gasförmigen Aggregatzustand. Folglich setzt bei der Probe mit dieser Temperatur bei  $37\text{ Pa}$  Sublimation von Wasser ein, wodurch der Probe wiederum Sublimationswärme entzogen wird. Durch den Entzug der Sublimationswärme nimmt die Temperatur der Probe auf Sublimationstemperatur von  $-30\text{ °C}$  (Wasserdampf tafel, Anhang) ab. Durch das Beheizen der Stellfläche wird der Probe ständig Wärme zugeführt, wodurch der Sublimationsprozess bei einer Temperatur von  $-30\text{ °C}$  aufrechterhalten wird. Während der Sublimation besitzt die Probe also eine konstante Temperatur von  $-29\text{ °C}$  bis  $-30\text{ °C}$  für eine Trocknungsdauer von fast 2 h. Die konstante Temperatur zeigt, dass die über die Stellfläche zugeführte Energie vollständig durch Sublimation verbraucht wird. Nach 2 h ist ein rascher Anstieg der Produkttemperatur  $T_P$  von  $-30\text{ °C}$  auf Stellflächentemperatur  $T_{St}$  von  $-10\text{ °C}$  zu verzeichnen. Bis zu diesem Zeitpunkt ist das freie Wasser aus der Probe entzogen. Weitere Zufuhr von Energie wird also ab diesem Zeitpunkt nicht mehr in Sublimationswärme umgewandelt sondern wirkt sich in Form einer Temperaturerhöhung des Produktes aus bzw. bewirkt die Desorption von nicht gefrorenem Wasser. Während der Desorption bleibt die Produkttemperatur konstant auf Stellflächentemperatur. Der Druck  $p_K$  wird während der Gefriertrocknung nicht verändert sondern bleibt konstant auf einem Wert von  $37\text{ Pa}$ .

Der Verlauf der Betriebsparameter  $p_K$  und  $T_{St}$  sowie die Produkttemperatur  $T_P$  wurden für alle untersuchten Prozessbedingungen während des Gefrierens und der Trocknung gemessen. Der jeweilige Druck  $p_K$  und die Stellflächentemperatur  $T_{St}$  wurden dabei während der kompletten Trocknungsdauer vorgegeben, es änderte sich lediglich die Produkttemperatur  $T_P$  aufgrund der oben erläuterten Vorgänge. Der Verlauf der Produkttemperatur, der aus den verschiedenen Einstellungen resultiert, wird in Abbildung 40 dargestellt. Die Beschriftungen der Kurven zeigen:

**Druck  $p_K$ /Sublimationstemperatur von Wasser  $T_{sub,w}$ /Stellflächentemperatur  $T_{St}$  (Klassifizierung der Trocknungsgeschwindigkeit in schnell, mittel, langsam).**

Die Ergebnisse sind zur besseren Übersicht in zwei Darstellungen aufgeteilt, wobei Diagramm A die Produkttemperatur der Proben bei einem Druck von 102 Pa ( $T_{Sub,W} = -20\text{ °C}$ ) und unterschiedlichen Stellflächentemperaturen zeigt. Diagramm B zeigt den Verlauf für die Drücke 37 ( $T_{Sub,W} = -30\text{ °C}$ ) und 12 Pa ( $T_{Sub,W} = -40\text{ °C}$ ) für unterschiedliche Stellflächentemperaturen.

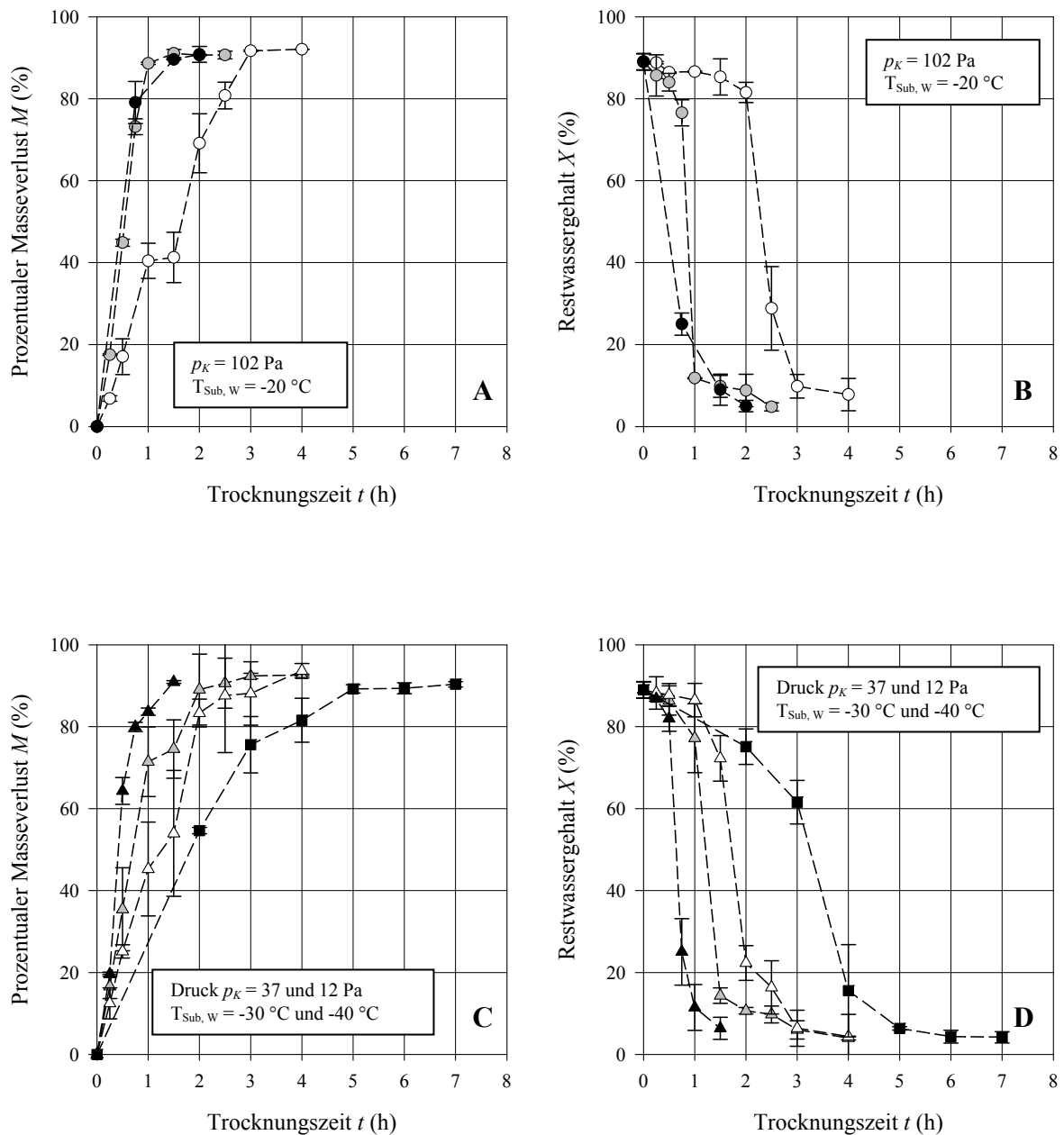


**Abbildung 40:** Verlauf der Produkttemperatur  $T_p$  während der Gefriertrocknung von *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* in PBS ohne Schutzstoff bei unterschiedlichen Prozessbedingungen. Die Prozessbedingungen werden in den Kurvebeschriftungen entsprechend „Kammerdruck  $p_K$ /Sublimationstemperatur von Wasser  $T_{Sub,W}$ /Stellflächentemperatur  $T_{St}$ “ wiedergegeben. In Diagramm A sind die Temperaturverläufe für einen Druck von 102 Pa ( $T_{Sub,W} = -20\text{ °C}$ ) und unterschiedlichen Stellflächentemperaturen  $T_{St}$  dargestellt. Das Diagramm B stellt die Verläufe für die Kammerdrücke 37 Pa ( $T_{Sub,W} = -30\text{ °C}$ ) und 12 Pa ( $T_{Sub,W} = -40\text{ °C}$ ) dar.

Aus Abbildung 40 wird deutlich, dass die Produkttemperatur der Zellsuspensionen zu Beginn der Trocknungen jeweils annähernd ( $\pm 2$  K) den Wert der Sublimationstemperatur von reinem Wasser aufweist. Nach unterschiedlichen Zeiten steigt die Produkttemperatur relativ rasch an und nähert sich dem Wert der Stellflächentemperatur. Ausnahmen stellen die Trocknungen bei hohen Stellflächentemperaturen mit den Prozessbedingungen (37/-30/50, schnelle Trocknung) und (102/-20/80, schnelle Trocknung) dar. Bei diesen Prozessbedingungen nimmt die Produkttemperatur während des ersten Abschnittes der Trocknung, der Sublimation, Werte von  $-20$  bzw.  $-10$  °C an. Bei dieser Heizleistung wird die Wärme folglich nicht nur in Sublimationswärme umgewandelt, sondern zusätzliche thermische Energie zugeführt, was sich in einem Anstieg der Produkttemperatur bemerkbar macht. Auch nach dem Temperaturanstieg wird bei diesen Bedingungen nicht die Stellflächentemperatur erreicht, sondern niedrigere Werte von  $26$  °C bzw.  $56$  °C. Begründet ist dies in einer Abfuhr der Wärme durch den Eiskondensator, der eine Temperatur von  $-60$  °C aufweist. Aufgrund der niedrigen Temperatur wird dadurch die komplette Vakuumkammer gekühlt. Auch wenn die Wärmeleitung und Konvektion im Vakuum sehr gering ist, stellt sich infolgedessen bei den Proben eine resultierende Temperatur ein, die zwar höher ist als die Temperatur der Vakuumkammer, aber niedriger als die Temperatur der Stellfläche.

Für die unterschiedlichen Prozessbedingungen wurde der Verlauf des Wasserentzugs ermittelt.

Abbildung 41 zeigt den zeitlichen Verlauf des prozentualen Masseverlustes  $M(t)$  und des Restwassergehaltes  $X(t)$  während der Gefriertrocknung für die unterschiedlichen Prozessbedingungen. Die Zellen wurden ohne Schutzstoff in Phosphatpuffer getrocknet. Die Ergebnisse wurden entsprechend der Kammerdrücke  $p_K$  zur besseren Übersicht in getrennten Diagrammen dargestellt. So zeigen die Diagramme A und B die Trocknungsverläufe ( $X(t)$  und  $M(t)$ ) für einen Kammerdruck  $102$  mbar ( $-20$  °C) und den jeweiligen unterschiedlichen Stellflächentemperaturen  $T_{St}$ . Die Diagramme C und D zeigen die Trocknungsverläufe für die Kammerdrücke  $37$  mbar ( $-30$  °C) und  $12$  mbar ( $-40$  °C) mit den jeweiligen unterschiedlichen Stellflächentemperaturen.



**Abbildung 41:** Verlauf des Masseverlustes  $M$ , bezogen auf die Anfangsmasse  $m_{p_vT}$ , und des Restwassergehalts  $X$  während der Trocknung von *Lb. paracasei ssp. paracasei* ohne Schutzstoff bei verschiedenen Prozessbedingungen (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung).

**A:**  $M(t)$  für Prozessbedingungen 102/-20/80 (schnelle Trocknung) ( $\bullet$ ), 102/-20/10 (mittlere Trocknungsgeschwindigkeit) ( $\circ$ ), 102/-20/-10 (langsame Trocknung) ( $\circ$ );

**B:**  $X(t)$  für Prozessbedingungen 102/-20/80 (schnelle Trocknung) ( $\bullet$ ), 102/-20/10 (mittlere Trocknungsgeschwindigkeit) ( $\circ$ ), 102/-20/-10 (langsame Trocknung) ( $\circ$ );

**C:**  $M(t)$  für Prozessbedingungen 12/-40/-20 (langsame Trocknung) ( $\blacksquare$ ), 37/-30/50 (schnelle Trocknung) ( $\blacktriangle$ ), 37/-30/10 (mittlere Trocknungsgeschwindigkeit) ( $\blacktriangle$ ), 37/-30/-10 (langsame Trocknung) ( $\triangle$ );

**D:**  $X(t)$  für Prozessbedingungen 12/-40/-20 (langsame Trocknung) ( $\blacksquare$ ), 37/-30/50 (schnelle Trocknung) ( $\blacktriangle$ ), 37/-30/10 (mittlere Trocknungsgeschwindigkeit) ( $\blacktriangle$ ), 37/-30/-10 (langsame Trocknung) ( $\triangle$ ).

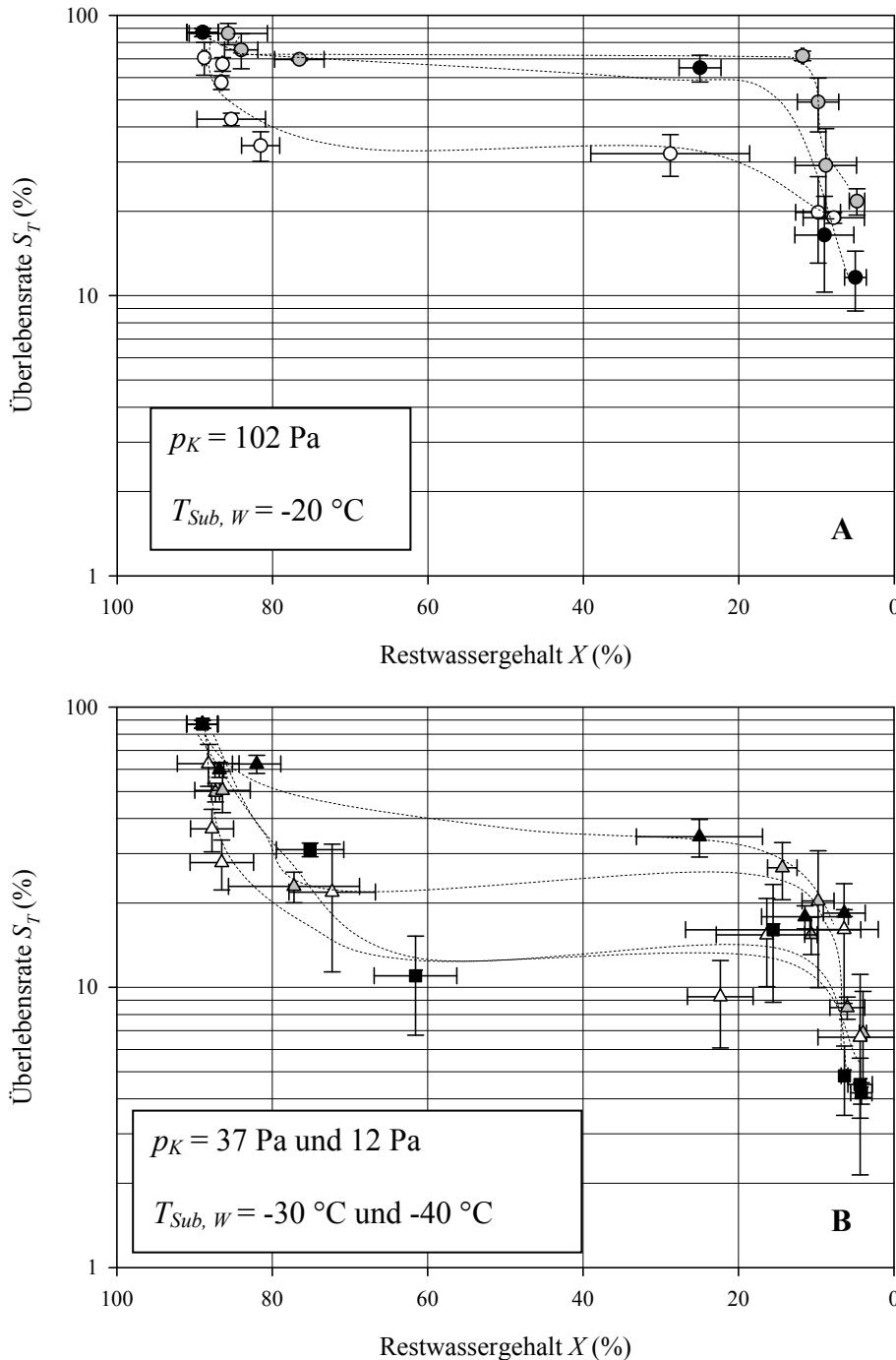
Abbildung 41 zeigt, dass die Trocknungsgeschwindigkeit von den Prozessbedingungen abhängig ist. Die Trocknungsgeschwindigkeit ist bei den höchsten Stellflächentemperaturen (50 °C und 80 °C) bei Kammerdrücken von 102 Pa und 37 Pa am höchsten. Ein Kammerdruck von 12 Pa und eine Stellflächentemperatur von -20 °C führen zur langsamsten Trocknung. Generell steigt die Trocknungsgeschwindigkeit mit steigender Temperaturdifferenz zwischen der Proben- und der Stellflächentemperatur. Bei gleicher Temperaturdifferenz ist die Trocknungsgeschwindigkeit bei höherer Produkttemperatur bzw. höherem Kammerdruck größer. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit Ergebnissen an Modellsystemen (Glaskugeln) und Proteinen aus der Literatur (Chan und Fisher, 1995; Kessler, 1961; Overcashier et al., 1999). Des Weiteren können die Ergebnisse auch durch den Verlauf der Produkttemperatur bestätigt werden. So kann bei Vergleich der Abbildung 40 mit Abbildung 41 festgestellt werden, dass bei einer schnelleren Trocknung die Produkttemperatur zu einem früheren Zeitpunkt ansteigt, da das Produkt bereits zu diesem Zeitpunkt einen niedrigeren Restwassergehalt aufweist. Es wird des Weiteren deutlich, dass der Restwassergehalt des Produktes, an dem die Produkttemperatur für verschiedene Prozessbedingungen von Sublimationstemperatur auf Stellflächentemperatur ansteigt, einen Wert von 25 % - 15 % aufweist. Dieser Wert stimmt wiederum mit dem Anteil an nicht ausgefrorenem Wasser überein (vgl. Abbildung 33). Für die Trocknung der Präparate konnte festgestellt werden, dass ab einem Restwassergehalt von unter 20 % ein poröses Produkt erhalten wurde. Oberhalb dieses Restwassergehalts wurden die Präparate nach der Trocknung aufgrund der anschließenden Temperaturerhöhung wieder flüssig. Als Endrestwassergehalt wurde ein Wert von 5 % angestrebt.

Bei Untersuchung der Überlebensrate in Abhängigkeit von den Prozessbedingungen muss berücksichtigt werden, dass bei unterschiedlichen Trocknungsgeschwindigkeiten der Restwassergehalt nach gleicher Trocknungszeit unterschiedlich ist. Aus diesem Grund sind Überlebensraten, die für unterschiedliche Prozessbedingungen nach der gleichen Trocknungsdauer untersucht wurden, nicht ohne Einschränkungen miteinander vergleichbar. Zum aussagefähigen Vergleich der erzielten Überlebensrate während der Trocknung unter verschiedenen Prozessbedingungen ist es erforderlich, diese zunächst in Abhängigkeit vom Restwassergehalt ( $X$ ) zu betrachten.

*Verlauf der Überlebensrate von *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* während der Gefriertrocknung ohne Schutzstoff in Phosphatpufferlösung*

Abbildung 42 zeigt die Überlebensrate von *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* für verschiedene Prozessbedingungen in Abhängigkeit vom Restwassergehalt. Analog zu Abbildung 40 sind

die Überlebensraten zur besseren Übersicht auch hier in zwei Diagrammen dargestellt, differenziert nach dem Kammerdruck. Anfangswert für die Überlebensrate ist der Wert nach dem Gefrieren.



**Abbildung 42:** Überlebensrate von *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* in Abhängigkeit vom Restwassergehalt für verschiedene Prozessbedingungen. (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung für  $S_T$  und  $X$ )

**A:**  $S_T(X)$  für Prozessbedingungen 102/-20/80 (schnelle Trocknung) (●), 102/-20/10 (mittlere Trocknungsgeschwindigkeit) (◐), 102/-20/-10 (langsame Trocknung) (○);

**B:**  $S_T(X)$  für Prozessbedingungen 12/-40/-20 (langsame Trocknung) (■), 37/-30/50 (schnelle Trocknung) (▲), 37/-30/10 (mittlere Trocknungsgeschwindigkeit) (◐), 37/-30/-10 (langsame Trocknung) (△).



Aus Abbildung 42 und Abbildung 41 wird deutlich, dass die Überlebensrate vom Restwassergehalt abhängig ist und mit zunehmendem Wasserentzug abnimmt. Außerdem zeigen Abbildung 42 und Abbildung 40, dass der Verlauf der Überlebensrate in Abhängigkeit von den Prozessbedingungen Produkttemperatur  $T_P$  und Temperaturdifferenz zwischen  $T_P$  und  $T_{St}$  eine unterschiedliche Charakteristik zeigt. Für die Prozessbedingungen mit einem Kammerdruck von 102 Pa liegt die Überlebensrate bei einer hohen Trocknungsgeschwindigkeit (Stellflächentemperaturen 10 °C und 80 °C, vgl. Abbildung 41) für hohe Restwassergehalte bei 60 – 70 %. Diese Überlebensrate wird erreicht, solange der Restwassergehalt einen Wert von 15 – 20 % nicht unterschreitet. Nimmt der Restwassergehalt weiter ab, so sinkt auch die Überlebensrate stark ab. Bei Restwassergehalten von ca. 5 % nimmt die Überlebensrate für einen Kammerdruck  $p_K = 102$  Pa Werte von 10 – 20 % an.

Erfolgt die Trocknung bei gleichem Kammerdruck  $p_K$  von 102 Pa mit einer geringeren Trocknungsgeschwindigkeit (Stellfläche -10 °C), so nimmt die Überlebensrate bereits bei Restwassergehalten von 90% - 80 % bis auf einen Wert von 35 % ab. Auf diesem Niveau bleibt die Überlebensrate bis zu einem Restwassergehalt von 15 % konstant. Bei weiterem Wasserentzug unter 15 % erfolgt wiederum eine Abnahme vermehrungsfähiger Zellen. Auch für die Prozessbedingung 102/-20/-10 stellt sich bei einem Restwassergehalt von 5 % eine Überlebensrate von 15 % ein. Dieser Wert ist also vergleichbar mit der Überlebensrate nach einer Trocknung mit hoher Trocknungsgeschwindigkeit bei einem Restwassergehalt von 5 %. Für den Kammerdruck 102 Pa werden also am Ende der Trocknung vergleichbare Überlebensraten von 10 -20 % erreicht, unabhängig von der Trocknungsgeschwindigkeit. Unterschiedliche Trocknungsgeschwindigkeiten führen lediglich zu unterschiedlichen Verläufen der Überlebensrate  $S_T$  in Abhängigkeit vom Restwassergehalt  $X$ .

Werden die Zellen ohne Schutzstoff bei niedrigerem Druck und damit einhergehender niedrigerer Sublimations- und Produkttemperatur  $T_P$  getrocknet, so ist der Verlauf der Überlebensrate in Abhängigkeit vom Restwassergehalt im Vergleich zu einem Druck von 102 Pa verändert. Zu Beginn der Trocknung, also bei hohen Wassergehalten, nimmt die Überlebensrate bei einer Trocknung mit hoher Trocknungsgeschwindigkeit (37/-30/50) stärker ab, als bei einem Druck von 102 Pa mit vergleichbar hohen Trocknungsgeschwindigkeiten (vgl. Abbildung 41). Dabei nimmt die Überlebensrate bis zu einem Wert von 35 % bei einem Restwassergehalt von 35 % ab. Im Gegensatz dazu nimmt die Überlebensrate bei 102/-20/80 (schnelle Trocknung) Werte von 60 % bei gleichem Restwassergehalt an. Nach weiterem Wasserentzug erreicht die Überlebensrate ca. 15 % bei einem Restwassergehalt von 5 %. Die Überlebensrate erreicht also ein vergleichbares Niveau wie nach Trocknungen bei höherem Druck (102 Pa) und dar-

aus folgender höherer Produkttemperatur (-20 °C). Allerdings muss hier beachtet werden, dass für die Prozessbedingung 37/-30/50 (schnelle Trocknung) während der Sublimation nicht die Sublimationstemperatur erreicht wurde, sondern eine höhere Temperatur von -20 °C. Wird die Trocknung bei einem Druck von 37 Pa (-30 °C) langsamer durchgeführt (Stellfläche 10 °C), so sinkt die Überlebensrate bereits bei einem hohen Restwassergehalt von  $X = 80\%$  auf einen Wert von 20 % ab. Dieses Niveau wird beibehalten, bis wieder ein Restwassergehalt von 15 % erreicht wird. Ab diesem Restwassergehalt nimmt die Überlebensrate wieder ab und erreicht Werte von ca. 5 – 7 %. Bei einer Trocknung mit niedrigerer Stellflächentemperatur von -10 °C und somit geringerer Trocknungsgeschwindigkeit ergibt sich ein ähnlicher Verlauf. Allerdings verläuft die Überlebensrate tendenziell auf einem noch niedrigeren Niveau als bei 37/-30/10 (mittlere Trocknungsgeschwindigkeit).

Wird die Trocknung bei einem noch niedrigeren Druck von 12 Pa mit einer Produkttemperatur von -37 °C und sehr niedriger Trocknungsgeschwindigkeit während der Sublimation durchgeführt, nimmt die Überlebensrate ebenfalls bereits bei hohen Restwassergehalten niedrige Werte von 30 % an, bleibt auf diesem Niveau konstant und nimmt bei Restwassergehaltswerten unter 15 % noch weiter ab. Bei einem Restwassergehalt von 5 % wird eine Überlebensrate von 4 % erreicht.

Bei den niedrigeren Temperaturen von -30 °C und -40 °C werden am Ende der Trocknung niedrigere Überlebensraten erreicht als bei einer Temperatur von -20 °C.

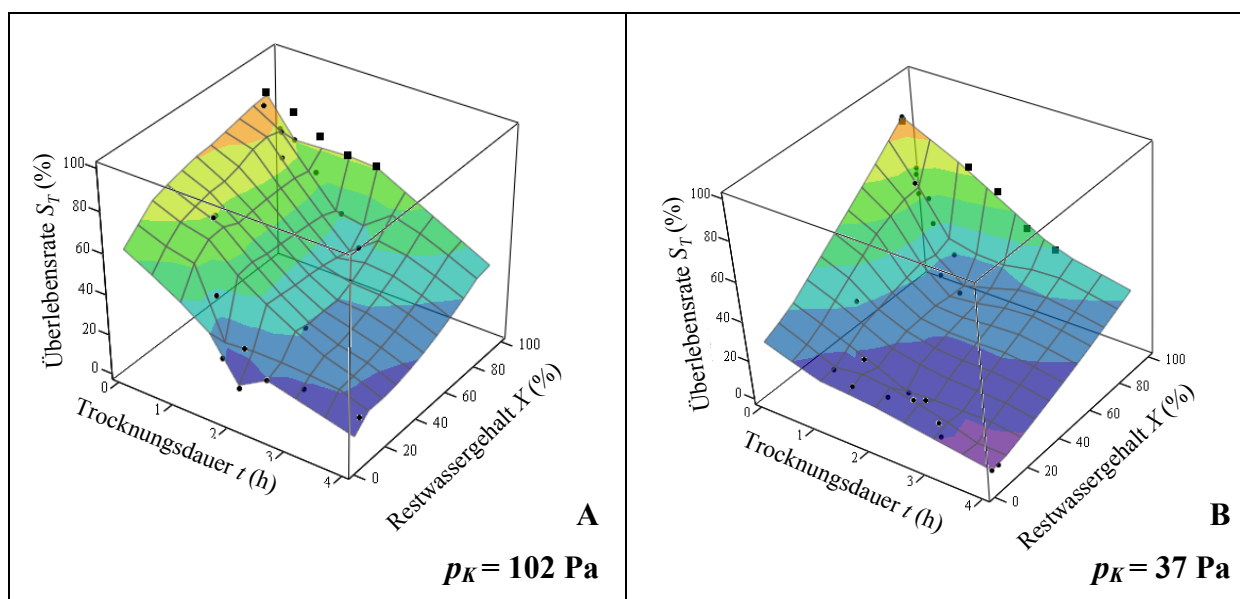
### **6.2.2 Diskussion und Modellierung der Einflüsse verfahrenstechnischer Bedingungen auf die Überlebensrate der Zellen in einer Matrix ohne Schutzstoffe**

Es ist deutlich, dass die Überlebensrate während der Trocknung ohne Schutzstoffe von den Prozessbedingungen abhängig ist. Sie wird beeinflusst von Produkttemperatur und Trocknungszeit. Eine höhere Produkttemperatur (-20 °C) während der Sublimation wirkt sich schonender auf die Zellen während der Trocknung aus, die Überlebensrate nimmt bei gleichem Restwassergehalt schwächer ab als bei einer Temperatur von -30 °C. Ferner ist deutlich, dass während der Sublimation eine höhere Trocknungsgeschwindigkeit bzw. niedrigere Verweilzeit zu einer höheren Überlebensrate bei gleichem Restwassergehalt führt. Schädlich wirkt sich sowohl der Wasserentzug als auch eine zeitabhängige chemische/physikalische Reaktion aus.

*Summarische Bedeutung von Verweilzeit und Restwassergehalt für die Entwicklung der Überlebensrate bei unterschiedliche Prozessbedingungen*

Im Folgenden soll diskutiert werden, aus welchen Gründen sich der Verlauf der Überlebensrate während der Trocknung bei den unterschiedlichen Trocknungsbedingungen in Abhängigkeit von Restwassergehalt und Verweilzeit auf diese Weise entwickelt. Im weiteren Verlauf wird die Bedeutung von Restwassergehalt und Verweilzeit jeweils separat betrachtet.

Um den Zusammenhang zwischen Überlebensrate von *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*, Restwassergehalt und Trocknungsdauer bzw. Verweilzeit zu verdeutlichen, ist der Verlauf dieser Größen in Abbildung 43 dargestellt. In Abbildung 43A ist der Zusammenhang für einen Kammerdruck  $p_K$  von 102 Pa ( $T_{sub, W} = -20\text{ °C}$ ) dargestellt und Abbildung 43B zeigt diesen Zusammenhang für einen Kammerdruck  $p_K$  von 37 Pa ( $T_{sub, W} = -30\text{ °C}$ ). In den beiden Diagrammen ist auch der Verlauf der Überlebensrate während des Verweilens im gefrorenen Zustand für die Temperaturen  $-20\text{ °C}$  und  $-30\text{ °C}$  unter Normaldruck, wenn kein Wasser entfernt wird, dargestellt.



**Abbildung 43:** Überlebensrate  $S_T$  von *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* in Abhängigkeit vom Restwassergehalt  $X$  und von der Trocknungsdauer  $t$  für Prozessbedingungen bei einem Kammerdruck von 102 Pa (A) und 37 Pa (B) mit jeweils unterschiedlichen Stellflächentemperaturen. (●) Messwerte Überlebensrate nach Gefriertrocknung, (■) Messwerte Überlebensrate während des Verweilens im gefrorenen Zustand (vgl. Abbildung 38).

Abbildung 43A zeigt für einen Kammerdruck von 102 Pa, dass die Überlebensrate bei hohen Restwassergehalten (bis ca. 20 %) stärker von der Verweilzeit als vom Restwassergehalt abhängig ist. Allerdings ist die Abnahme der Überlebensrate  $dS/dt$  im Bereich von Restwasser-

gehaltswerten von 90 % - 20 % niedriger als bei einem Druck von 37 Pa (vgl. Abbildung 43B). Beim Vergleich der Steigung  $dS/dt$  bei einem Kammdruck von 102 Pa mit der Abnahme der Überlebensrate im gefrorenen Zustand bei  $-20\text{ °C}$  stellt man fest, dass der Unterschied im Verlauf der Überlebensrate mit oder ohne Sublimation relativ gering ist. Der Unterschied wird umso geringer, je schneller die Trocknung verläuft. Auffällig ist bei einem Kammerdruck von 102 Pa zudem der Knick der Fläche bei einem Restwassergehalt von 20 %. Ab diesem Restwassergehalt verändert sich auch der Zusammenhang zwischen den Einflussgrößen Restwassergehalt und Verweilzeit. Besitzt bei den höheren Restwassergehaltswerten die Verweilzeit eindeutig den stärkeren Einfluss, so ist es ab einem Restwassergehalt von 20 % die Wasserentfernung.

Abbildung 43B zeigt, dass die Überlebensrate bei einem Kammerdruck von 37 Pa zu Beginn der Trocknung sowohl durch den Restwassergehalt  $X$  als auch durch die Verweilzeit  $t$  beeinflusst wird. Je schneller ein bestimmter Restwassergehalt erreicht wird, umso höher ist die Überlebensrate. Gleichzeitig wird nach einer bestimmten Zeit eine höhere Überlebensrate erreicht, wenn der Restwassergehalt höher ist. Ferner ist deutlich, dass die Überlebensrate zu Beginn der Trocknung verhältnismäßig stark abnimmt. Im weiteren Verlauf des Wasserentzugs ist die Abnahme schwächer ausgeprägt. Vergleicht man die Inaktivierung in Abhängigkeit von der Zeit während der Dehydrierung mit der Inaktivierung im gefrorenen Zustand (ohne Wasserentzug, vgl. auch Abbildung 38), so kann festgestellt werden, dass bei Dehydrierung die zeitliche Abhängigkeit der Überlebensrate stärker ist.

Gehrke (1991) stellte einen Verlauf der Überlebensrate von *Lactobacillus plantarum* während der Gefriertrocknung bei einem Druck von 18 Pa (Produkttemperatur  $-30\text{ °C}$  bis  $-25\text{ °C}$ ) fest, der mit dem hier ermittelten Verlauf bei niedrigem Druck vergleichbar ist. Während einer Sublimationsdauer von ca. 17 h konnte Gehrke (1991) ermitteln, dass aufgrund der Verringerung der Temperatur zu Beginn der Trocknung eine starke Abnahme der Überlebensrate erfolgte. Während der eigentlichen Reduktion des Restwassergehalts blieb die Überlebensrate relativ konstant. Während der Desorption am Ende der Trocknung stellte Gehrke (1991) nochmals eine Abnahme der Überlebensrate fest. Dieser Verlauf kann auch durch die hier ermittelten Ergebnisse bei einer niedrigeren Sublimationstemperatur bestätigt werden. Bei diesen Prozessbedingungen nimmt die Überlebensrate ebenfalls zu Beginn der Trocknung stark ab, bleibt während des Wasserentzugs konstant und erfährt bei niedrigen Restwassergehalten nochmals eine Abnahme. Gehrke (1991) ermittelte den Verlauf der Überlebensrate nur bei den niedrigen Temperaturen und nicht bei Prozessbedingungen mit höherer Temperatur,

so dass aus seinen Untersuchungen keine Aussage über den Einfluss unterschiedlicher Prozessbedingungen auf die Entwicklung der Überlebensrate getroffen werden kann.

#### *Bedeutung des Restwassergehalts für die Entwicklung der Überlebensrate*

Der Restwassergehalt von 20 % stellt für das hier untersuchte System einen kritischen Wert dar. Gerade bei der höheren Temperatur von  $-20\text{ °C}$  und den hohen Trocknungsgeschwindigkeiten, bei denen die Überlebensrate während der Sublimation hohe Werte aufweist, nimmt  $S_T$  unterhalb dieses Restwassergehalts sehr stark ab. Für die niedrigen Temperaturen und niedrigen Trocknungsgeschwindigkeiten ist die Abnahme geringerer. Ab einem Restwassergehalt von 20 % wird vermutlich das stärker gebundene, nicht ausgefrorene Wasser entfernt, zu dem auch das strukturierte Wasser in direkter Umgebung der Biomoleküle gehört. Dies wird auch durch die Ergebnisse zum Einfluss der Trocknungsgeschwindigkeit bestätigt, die ab einem Restwassergehalt von 20 % aufgrund des stärker gebundenen Wassers verlangsamt wird. Durch dieses Strukturwasser werden Proteine und Phospholipide in ihrer nativen Struktur durch hydrophobe Wechselwirkungen, van der Waals Kräfte sowie Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert. Wird dieses Wasser entfernt, treten Konformationsänderungen der Zellkomponenten auf, wodurch diese ihre Funktion verlieren. Die Existenz eines kritischen Restwassergehalts, ab dem die Stabilität/Vitalität von Mikroorganismen stark abnimmt, ist für die Vakuumtrocknung und Lufttrocknung, allerdings nicht für die Gefriertrocknung bekannt. Friesen et al. (2005) ermittelten einen Restwassergehalt von 30 % bei der Lufttrocknung von *Penicillium bilaiae* Sporen. Bei der Wirbelschichttrocknung konnten Bayrock und Ingledew (1997) für eine Bäckerhefe einen kritischen Restwassergehalt von 10 % ermitteln. Jiang und Nail (1998) untersuchten den Einfluss der Gefriertrocknungsbedingungen auf die Enzymstabilität von Laktatdehydrogenase. Der kritische Restwassergehalt war bei diesem System ebenfalls 10 %, ab dem die Aktivität mit weiterem Wasserentzug stark vermindert wurde. Betrachtet man das physikalische Verhalten von Phospholipiden in Doppelschichten, so zeigt sich auch hier ein Restwassergehalt im Bereich von 20 – 30 %, ab dem verschiedene physikalische Veränderungen stattfinden. Beispielsweise steigt die Phasenübergangstemperatur von Liposomen im Bereich zwischen 30 und 20 % Restwassergehalt stark an, während sie bei höheren Restwassergehalten konstant bleibt. Ferner wurde ermittelt, dass die Diffusion von Wasser zwischen Phospholipiddoppelschichten bis zu einem Restwassergehalt von 24 % stark ansteigt und oberhalb dieses Wertes um den Faktor 4 abnimmt und mit zunehmendem Restwassergehalt konstant bleibt (Jain, 1988).

Aus den hier ermittelten Ergebnissen und deren Vergleich mit anderen Arbeiten kann also abgeleitet werden, dass es verallgemeinerbare Erkenntnisse zu den Verläufen der Überlebensrate für die Trocknung bei unterschiedlichen Temperaturen gibt. Bei höheren Temperaturen bleibt die Überlebensrate bei hohen Restwassergehalten auf einem hohen Niveau und nimmt ab einem kritischen Restwassergehalt stark ab. Bei der Gefriertrocknung ohne Schutzstoff bei niedrigen Temperaturen nimmt die Überlebensrate zu Beginn der Trocknung stark ab, am Ende nur noch geringfügig.

#### *Bedeutung der Verweilzeit der Mikroorganismen in einer gefrierkonzentrierten Matrix*

Abgesehen von der Dehydrierung werden die Zellen während der Gefriertrocknung durch das Verweilen in einer gefrorenen Matrix, in der aufkonzentrierte Puffersalze vorliegen, geschädigt. Die dargestellten Ergebnisse zeigen den Verlauf der Überlebensrate von *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* in Phosphatpuffer mit einer Konzentration von 0,01 M PBS / 0,15 M NaCl. Wie bereits in Kapitel 6.1 erläutert, nimmt die Funktionalität von Biomolekülen in Pufferlösungen während des Gefrierens und während des Verweilens im gefrorenen Zustand aufgrund von pH-Shifts, erhöhter Salzkonzentrationen und aufgrund der niedrigen Temperaturen, ab. Anchordoquy und Carpenter (1996) konnten für das System Laktatdehydrogenase in einer Phosphatpufferlösung aus 0,01 M PBS / 0,1 M NaCl feststellen, dass die Dissoziation der Laktatdehydrogenase in Untereinheiten während des Gefrierens mit der Aktivität des Enzyms nach der Lyophilisation korreliert. Der Erhalt der Quartärstruktur des Proteins während des Gefrierens ist also ein kritischer Faktor für den Erhalt der Aktivität nach der Gefriertrocknung. Dieser Schädigungsmechanismus liegt vermutlich auch bei dem hier untersuchten System während der Gefriertrocknung vor. Durch diese Schädigung kann die etwas niedrigere Überlebensrate der Zellen nach der Trocknung bei den niedrigeren Temperaturen und längeren Verweilzeiten erklärt werden. Die umgebende aufkonzentrierte Lösung sowie die niedrige Temperatur bewirkt vermutlich eine Schädigung der Zellen, wodurch bei einem Restwassergehalt von 5 % die Überlebensrate bei den niedrigen Temperaturen (-30 °C und -40 °C) niedriger ist, als bei der höheren Temperatur (-20 °C).

#### *Modellierung der Überlebensrate während der Gefriertrocknung*

Im Folgenden soll ein Modell zum Verlauf der Überlebensrate unter Berücksichtigung von Restwassergehalt und Verweilzeit in einer gefrierkonzentrierten Matrix entwickelt werden.

Wie soeben dargestellt, resultiert die Überlebensrate also aus einer Schädigung im gefrorenen Zustand aufgrund der niedrigen Temperaturen und des Verweilens in einer Umgebung mit einer erhöhten Konzentration an Puffersalzen und einem pH Shift. Gleichzeitig oder zeitlich

versetzt findet die Entfernung des Strukturwassers durch tiefes Gefrieren und/oder durch Desorption des nicht gefrorenen, stärker gebundenen Wassers in der eisfreien, porösen Schicht statt. Beide Prozesse besitzen bei unterschiedlichen Restwassergehalten ein unterschiedliches Gewicht bei der Gesamtinaktivierung bzw. bei der Abnahme der Überlebensrate. So findet bei hohen Restwassergehalten eine Inaktivierung aufgrund der umgebenden aufkonzentrierten Pufferlösung (osmotischer Stress) und aufgrund geringer Dehydrierungsschäden statt. Bei niedrigen Restwassergehalten findet Desorption des nicht ausgefrorenen Wassers und somit auch Entfernung des stärker gebundenen Strukturwassers statt, wodurch die Zellen geschädigt werden. Dabei kommt zum Tragen, dass während der Gefriertrocknung ein System vorliegt, das im oberen Teil aus einer porösen, eisfreien Schicht mit einem Volumenanteil  $f_{ef}(t)$ , und im unteren Teil aus einer gefrorenen, eishaltigen Schicht mit einem volumenbezogenen Anteil  $f_{eis}(t)$  besteht (vgl. Abbildung 4). Diese beiden Anteile verändern sich in Abhängigkeit von der Prozesszeit. So verringert sich während der Gefriertrocknung der eisenthaltende Anteil, und der eisfreie Anteil nimmt zu. Folglich ändern sich auch anteilig die Schädigungsmechanismen während der Gefriertrocknung. Daraus ergibt sich, dass sich der Inaktivierungseffekt aus den inaktivierenden Prozessen im getrockneten Teil und im gefrorenen Teil zusammensetzt. Dabei kann die Abnahme der Überlebensrate in der gefrorenen, eishaltigen Fraktion  $f_{eis}(t)$  mit der Geschwindigkeit  $dS_G/dt$  bei konstanter Temperatur  $T$  und konstanter Masse  $m$  beschrieben werden. Die Inaktivierung in der porösen, eisfreien Fraktion  $f_{ef}(t)$  verläuft mit der Geschwindigkeit  $dS_{ef}/dt$ . Die Abnahme der Überlebensrate  $S_T$  nach unterschiedlichen Trocknungszeiten resultiert also summarisch aus den Vorgängen, deren Gesamtgeschwindigkeit  $dS_T/dt$  nach Gleichung (26) beschrieben wird.

$$\frac{dS_T}{dt} = \frac{dS_{ef}}{dt} \cdot f_{ef}(t) + \left( \frac{dS_G}{dt} \right)_{T,m} \cdot f_{eis}(t) \quad (26)$$

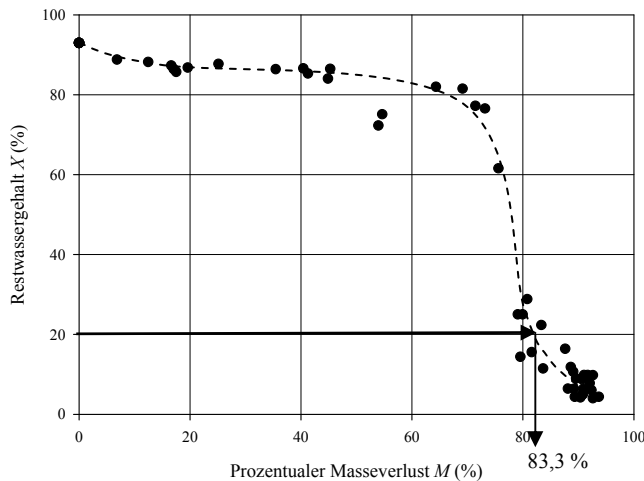
Wie soeben erläutert, wird die Hypothese zugrunde gelegt, dass im gefrorenen Anteil die Gefrierschädigung mit der Geschwindigkeit  $dS_G/dt$  stattfindet. Im eisfreien, porösen Anteil setzt entweder bereits während der Sublimation des Eises (in der unteren Produktschicht) die Desorption der adsorptiv an den Porenwänden gebundenen Restfeuchte ein. Somit würden die Zellen in der eisfreien Schicht durch die Entfernung von Strukturwasser geschädigt, was zu einer starken Abnahme der Überlebensrate im getrockneten Teil führt. Falls dies nicht der Fall ist bleibt die Restfeuchte im porösen, eisfreien Anteil zunächst konstant, bis die Sublimation des Eises beendet ist und die Menge an vorbeiströmendem Dampf abnimmt. In diesem Fall würden die Zellen in der getrockneten Schicht nicht weiter geschädigt bis Desorption einsetzt.  $dS_{ef}/dt$  wäre also null. In der gefrorenen Schicht würde die Überlebensrate entsprechend der

ermittelten zeitlichen Abhängigkeit im gefrorenen Zustand abnehmen. Deren Anteil an der Abnahme der Überlebensrate im gesamten Produkt wird durch die zeitliche Änderung des eishaltigen Abschnittes  $f_{eis}(t)$  berücksichtigt

Dabei berechnet man  $f_{eis}(t)$  nach Gleichung (27) aus dem zeitlichen Verlauf des prozentualen Masseverlustes  $M(t)$  (vgl. Abbildung 41) und dem prozentualen Masseverlust bei Erreichen eines Restwassergehaltes von 20 %,  $M(t_{X=20\%})$ , da das Präparat ab einem Restwassergehalt  $X$  von 20 % eisfrei ist.

$$f_{eis}(t) = 1 - \frac{M(t)}{M(t_{X=20\%})} \quad (27)$$

$M(t_{X=20\%})$  wird aus dem Zusammenhang zwischen prozentualen Masseverlust  $M$  und dem Restwassergehalt  $X$  ermittelt (vgl. Abbildung 41A, B). Dieser Zusammenhang ist in Abbildung 44 für alle Prozessbedingungen und für alle untersuchten Zeiten dargestellt.



**Abbildung 44: Restwassergehalt  $X$  in Abhängigkeit vom prozentualen Masseverlust  $M$  für die Trocknung von Zellsuspensionen in PBS ohne Schutzstoff.**

Durch Interpolation im Bereich von  $X = 20$  % kann  $M(t_{X=20\%})$  zu 83,3 % ermittelt werden.

Der eisfreie Anteil  $f_{ef}(t)$  berechnet sich nach Gleichung (28).

$$f_{ef}(t) = 1 - f_{eis}(t) \quad (28)$$

Der zeitliche Verlauf des Aktivitätsverlustes der Zellen im gefrorenen Zustand  $S_G(t)$  (vgl. Abbildung 38) kann für  $-20$  °C und  $-30$  °C in guter Näherung mit einer Reaktion 1. Ordnung beschrieben werden. Die zeitliche Abhängigkeit  $S_G(t)$  wird für die Temperaturen  $-20$  °C bzw.



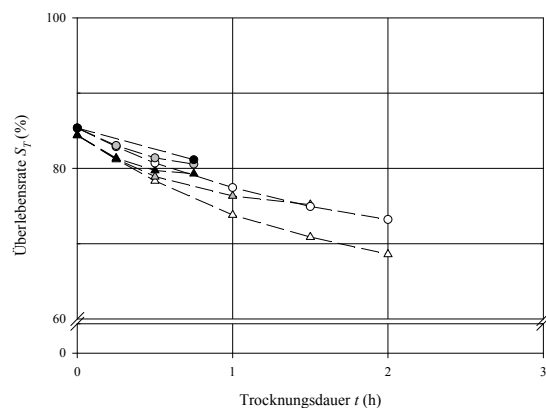
-30 °C nach Gleichung (29) beschrieben. Die Koeffizienten, die sich aus der Anpassung an die Messwerte ergeben, sind in Tabelle 7 aufgelistet.

$$S_{GT}(t) = S_{G0} \cdot e^{-k \cdot t} \quad (29)$$

**Tabelle 7: Koeffizienten entsprechend Anpassung der Gleichung (29) an die Messwerte von Abbildung 38 (ohne Schutzstoffe)**

$T$ (°C)	$S_{G0}$ (%)	$k$ (h <sup>-1</sup> )
-20	85,3	0,123
-30	84,4	0,167

In Abbildung 45 ist der für  $f_{eis}(t)$  aus Gleichung (29) und Gleichung (30) berechnete Verlauf der Überlebensrate in Abhängigkeit von der Trocknungsdauer  $S_T(t)$  bis zu der Zeit dargestellt, bei der ein Restwassergehalt von 20 % erreicht wird. Dieser Verlauf würde sich ergeben, wenn die Überlebensrate nur aufgrund der schädlichen Effekte in der gefrorenen Schicht (2. Term aus Gleichung (26)) abnehmen würde ( $dS_{ef}/dt = 0$ ). Der Restwassergehalt von 20 % wurde mit den verschiedenen Prozessbedingungen nach unterschiedlichen Zeiten erreicht. Aus diesem Grund sind die hier dargestellten Überlebensraten bis zu unterschiedlichen Zeiten dargestellt, ab denen das Präparat eisfrei ist.



**Abbildung 45: Berechnete Überlebensrate  $S$  in Abhängigkeit von der Trocknungsdauer  $t$  unter der Annahme, dass die Zellen während der Trocknung bis zu einem Restwassergehalt von 20 % nur durch chemische/physikalische Reaktionen im gefrorenen Anteil geschädigt werden. Prozessbedingungen 102/-20/80 (schnelle Trocknung) (●), 102/-20/10 (mittlere Trocknungsgeschwindigkeit) (◐), 102/-20/-10 (langsame Trocknung) (○), 37/-30/50 (schnelle Trocknung) (▲), 37/-30/10 (mittlere Trocknungsgeschwindigkeit) (◑), 37/-30/-10 (langsame Trocknung) (△);**

Aus Abbildung 45 ist ersichtlich, dass das Modell mit der Annahme für die Trocknung bei hohen Temperaturen bei Erreichen eines Restwassergehaltes von 20 % folgende Überlebensraten für die unterschiedlichen Trocknungsgeschwindigkeiten liefert:

- 81 % für Prozessbedingung 102/-20/80 (höchste Trocknungsgeschwindigkeit),
- 81 % für Prozessbedingung 102/-20/10 (mittlere Trocknungsgeschwindigkeit),
- 73 % für Prozessbedingung 102/-20/-10 (niedrige Trocknungsgeschwindigkeit).

Die tatsächlich gemessenen Überlebensraten nach der Trocknung in einem Restwassergehaltsbereich von 20 % betragen ca. 70 %, 70 % und 35 % (vgl. Abbildung 42).

Bei einer Temperatur von -30 °C liefert das entwickelte Modell folgende Werte:

- 79 % für Prozessbedingung 37/-30/50 (höchste Trocknungsgeschwindigkeit),
- 75 % für Prozessbedingung 37/-30/10 (mittlere Trocknungsgeschwindigkeit),
- 69 % für Prozessbedingung 37/-30/-10 (niedrige Trocknungsgeschwindigkeit).

Die Überlebensrate nach der Trocknung bei  $X \approx 20$  % nimmt allerdings Werte von ca. 35 %, 25 % bzw. 15 % an (vgl. Abbildung 43). Folglich werden bei allen Prozessbedingungen bei einem Restwassergehalt von 20 % niedrigere Überlebensraten gemessen, als das hier entwickelte Modell bei schädlichen Prozessen ausschließlich im gefrorenen Zustand liefert. Die Zellen werden also während des Wasserentzugs zusätzlich geschädigt, auch wenn überwiegend nur Eis entfernt wird, das bereits während des Gefrierens aus der Suspension ausgefroren wurde. Die Inaktivierung kann nicht nur durch die Schädigung im gefrorenen Zustand begründet werden.

Daraus können zwei Schlussfolgerungen abgeleitet werden. Entweder werden die Zellen durch das Gefrieren vorgeschädigt, wodurch die Bakterien sensibler auf die Dehydrierung reagieren und diese schlechter tolerieren, oder es findet neben der Sublimation bereits Desorption des Strukturwassers in der oberen eisfreien Schicht statt, in der somit ein nicht zu vernachlässigender Feuchtegradient vorliegt. Beim Vorliegen eines Feuchtegradienten sollte die Überlebensrate am Ende der Trocknung allerdings für alle Prozessbedingungen wieder den gleichen Wert annehmen, was aber gemäß Abbildung 43 nicht der Fall ist. Die Überlebensrate nimmt am Ende der Trocknung bei Temperaturen von -30 °C und -40 °C niedrigere Werte an als bei einer Temperatur von -20 °C. Diese Ergebnisse bestätigen eher die erste Schlussfolgerung, nach der die Zellen aufgrund des Gefrierens zu niedrigen Temperaturen den Wasserentzug schlechter tolerieren. Wenn kein Schutzstoff vorliegt, scheinen also die Mikroorganismen

bei höheren Temperaturen resistenter gegenüber dem Wasserentzug zu sein. Ein zugesetzter Schutzstoff sollte demnach dazu in der Lage sein, die Vorschädigung aufgrund des Verweilens in einer gefrierkonzentrierten Matrix bei niedrigen Temperaturen zu verhindern.

### 6.2.3 Phasenzustandsdiagramm und Trocknungsverlauf von *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* in einer Laktosematrix

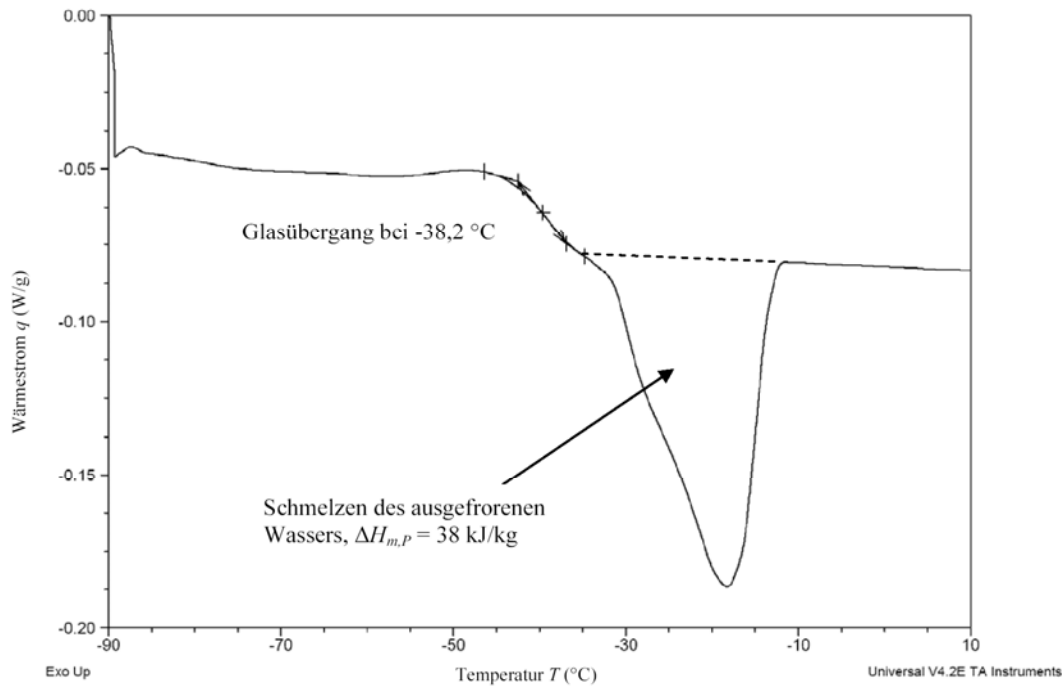
#### *Phasen-Zustandsdiagramm*

Im Vergleich zur Gefriertrocknung ohne Schutzstoff werden im Folgenden die Ergebnisse der Gefriertrocknungen mit Laktose als Schutzstoff für die gleichen Prozessbedingungen dargestellt und erläutert. Dabei wird die Bedeutung des Glaszustands für die Gefriertrocknung und die Schutzwirkung untersucht.

Die Zellsuspensionen, die mit Schutzstoff versetzt werden, durchlaufen während eines Gefriertrocknungsprozesses verschiedene physikalische Zustände. Zunächst wird aus der Suspension Wasser ausgefroren, was zu einer Gefriertemperaturabsenkung mit zunehmendem Gehalt an Eiskristallen und gleichzeitiger Abnahme des Wassergehaltes in der nicht gefrorenen Lösung führt. Bei Erreichen einer bestimmten Temperatur liegt also ein System vor, das neben Eiskristallen eine aufkonzentrierte, amorphe Phase beinhaltet. Nach dem Gefrieren wird zunächst das ausgefrorene Wasser durch Sublimation entfernt. Somit ändert sich der Restwassergehalt des nicht ausgefrorenen, aufkonzentrierten Anteils nicht. Während der Sublimation verringert sich nur der Restwassergehalt bezogen auf die gesamte Probe (Eiskristalle + aufkonzentrierte Suspension). Erst nach Entfernung der Eiskristalle wird das nicht ausgefrorene Wasser aus der amorphen Phase mittels Desorption entfernt und der Restwassergehalt des amorphen Anteils der Probe wird reduziert. Je nach Produkttemperatur und Restwassergehalt befindet sich der amorphe Anteil während der Gefriertrocknung entweder im Glaszustand oder im Nicht-Glaszustand. Um diesbezüglich einen definierten physikalischen Zustand während der Trocknung einstellen zu können, müssen zunächst die Zusammenhänge zwischen Glasübergangstemperatur und Restwassergehalt für das jeweilige Zell-Schutzstoffsystem ermittelt werden. Diese Zusammenhänge werden in einem Phasen-Zustandsdiagramm dargestellt. Im Folgenden wird die Vorgehensweise für die Erstellung des Phasen-Zustandsdiagramms ( $T_m(c)$  und  $T_g(c)$ ) erläutert.

Zunächst wurden die Glasübergangstemperatur und die Konzentration der maximal gefrierkonzentrierten Suspension ermittelt.

Abbildung 46 zeigt den mit Hilfe von thermischer Analyse (vgl. Kapitel 5.3.1) gemessenen Wärmestrom  $q$  in Abhängigkeit von der Temperatur  $T$  einer Präparation aus *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* mit Laktose (0,25 g/g<sub>Zelltrockenmasse</sub>) in Phosphatpufferlösung (vgl. Abbildung 32). Das Produkt weist eine Feststoffkonzentration von 69 % auf und wurde für die Analyse zunächst auf -90 °C in einem ersten Zyklus der DSC-Messung eingefroren und anschließend wieder erwärmt. Der Gefrierzyklus ist in Abbildung 46 nicht dargestellt.



**Abbildung 46: Wärmestrom  $q$  in Abhängigkeit von der Temperatur  $T$  für eine Suspension aus *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* mit Laktose (0,25 g/g<sub>Zelltrockenmasse</sub>) in Phosphatpufferlösung.**

Abbildung 46 zeigt eine stufenförmige Änderung von  $q$  bei einer Midpoint Temperatur von 38,2 °C. Diese stufenförmige Änderung stellt den Glasübergang der gefrierkonzentrierten Mikroorganismensuspension mit der entsprechenden Glasübergangstemperatur dar. Bei Temperaturen oberhalb der Glasübergangstemperatur ist der Schmelzpeak des ausgefrorenen Wassers sichtbar.

Für eine Feststoffkonzentration von weniger als 60 % konnte die in Abbildung 46 beispielhaft dargestellte stufenförmige Änderung nicht gefunden werden. Es ist nahe liegend, dass dieser Phasenübergang in der amorphen nicht-angefrorenen Suspension stattfindet, da der Vorgang bei höherer Feststoffkonzentration deutlicher ausgeprägt ist. Bei Proben mit geringem Feststoffanteil ist die Änderung im Wärmestrom bezogen auf die Probenmasse sehr gering, möglicherweise zu gering, um detektiert werden zu können.

Die stufenförmige Änderung wurde in dieser Arbeit, entsprechend Ablett et al. (1992) sowie Roos und Karel (1991), als  $T_g'$  festgesetzt. Dabei wurde aus den Messungen der Proben mit den Feststoffkonzentrationen 60 % und 70 % ein Mittelwert mit einer Standardabweichung von  $-37,2 \pm 2,2$  °C für  $T_g'$  ermittelt. Bei der Temperatur  $T_g'$  wird maximale Gefrierkonzentrierung bei der Konzentration  $c_g'$  erreicht.

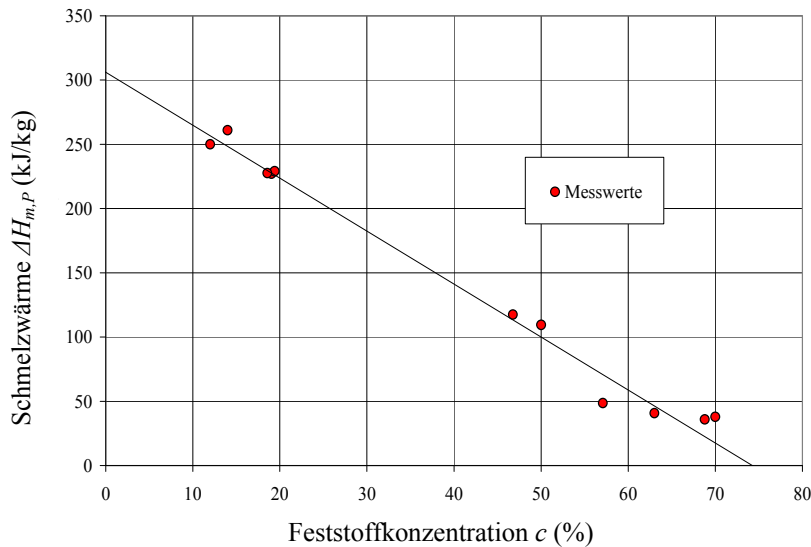
Zur Erstellung eines Phasendiagramms muss zusätzlich zu  $T_g'$  die entsprechende Konzentration  $c_g'$  der maximal aufkonzentrierten Lösung ermittelt werden. Zur Ermittlung von  $c_g'$  gibt es folgende Möglichkeiten, die im Weiteren näher erläutert werden:

- (a) Ermittlung der Konzentration  $c_g'$  aus der Peakfläche des Schmelzpeaks von Wasser (Levine und Slade, 1988),
- (b) Extrapolation des linearen Zusammenhangs zwischen der Schmelzwärme  $\Delta H_{m,P}$  und dem Feststoffgehalt der flüssigen Probe zu  $\Delta H_{m,P}=0$  (Simatos et al., 1975),

Im Rahmen dieser Arbeit wurde  $c_g'$  zur Erhärtung der Ergebnisse entsprechend beider Methoden ermittelt.

Für Methode (a) berechnet man den Anteil an nicht ausgefrorenem Wasser nach den Gleichungen (10) – (14) aus Kapitel 4.3.1 Für diese Berechnungen wurden die Messungen der Proben mit einer Ausgangsfeststoffkonzentration von 68,8 %, 63,2 % sowie 59,2 % verwendet. Das Ergebnis aus diesen Berechnungen ist ein Wert von  $77,3 \pm 3,9$  % für  $c_g'$ .

Entsprechend Methode (b) kann  $c_g'$  aus dem Zusammenhang zwischen latenter Schmelzwärme der Zellsuspension mit Laktose  $\Delta H_{m,P}$  und Feststoffgehalt der flüssigen Probe  $c$  berechnet werden. Zur Ermittlung von  $c_g'$  wird dieser Zusammenhang zu  $\Delta H_{m,P} = 0$  extrapoliert. Abbildung 47 stellt die Abhängigkeit zwischen der gemessenen Schmelzwärme  $\Delta H_{m,P}$  und der Feststoffkonzentration  $c$  der flüssigen, nicht gefrorenen Proben dar.



**Abbildung 47: Schmelzwärme  $\Delta H_{m,P}$  in Abhängigkeit von der Feststoffkonzentration  $c$  der flüssigen, nicht gefrorenen Probe.**

Abbildung 47 zeigt, dass  $\Delta H_{m,P}$  mit zunehmender Feststoffkonzentration  $c$  abnimmt und die beiden Größen einen linearen Zusammenhang aufweisen. Aus diesen Messungen kann  $\Delta H_{m,P}(c)$  nach Gleichung (30) mit einer Korrelation  $R^2 = 0,98$  ermittelt werden.

$$\Delta H_{m,P}(c) = -4,121 \cdot c + 306,1 \quad (30)$$

Für  $\Delta H_{m,P}(c_g') = 0$  erhält man eine Konzentration  $c_g'$  von  $74,2 \pm 4,5$  % (Standardabweichung der Steigung 0,21).

Ermittelt man  $T_g'$  und  $c_g'$  nach Methoden (a) und (b) so erhält man die in Tabelle 8 zusammengefassten Werte.

**Tabelle 8: Mittelwerte und Standardabweichung  $SA$  für  $T_g'$  und  $c_g'$  ermittelt nach den Methoden von Levine und Slade (1988) (a) und Simatos et al. (1975) (b).**

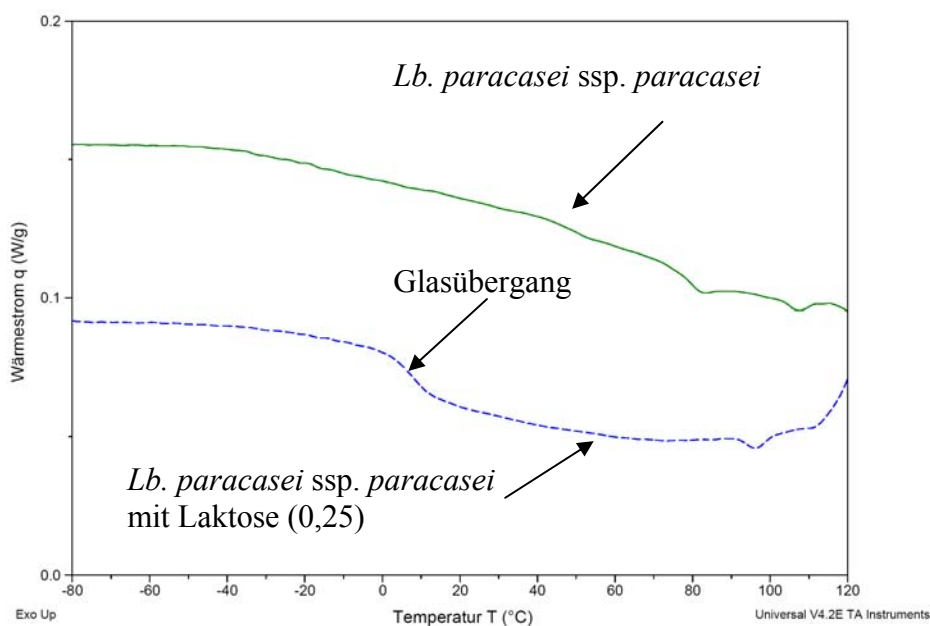
Methode	$T_g'$ (°C)	$c_g'$ (%)	$SA T_g'$ (°C)	$SA c_g'$ (%)
a	-37,2	77,3	2,2	3,9
b	-37,2	74,2	2,2	4,5

Es ist deutlich, dass das über Methode (a) ermittelte Ergebnis für  $c_g'$  etwas höher liegt als das Ergebnis aus Methode (b). Allerdings sind die Unterschiede relativ gering.

Es ist unklar, ob der Glasübergang nur auf der Anwesenheit von Laktose beruht, oder ob auch Bestandteile der Zellen in den Glaszustand überführt werden. Aus diesem Grund wurden zu-

sätzlich zu den Präparaten aus Zellen mit Laktose (0,25 g/g<sub>Zelltrockenmasse</sub>) auch Zellen in Wasser ohne Phosphatpuffer und ohne Laktose getrocknet und das thermische Verhalten dieser Suspensionen ermittelt.

Abbildung 48 zeigt das thermische Verhalten von Zellpräparationen ohne Zusatz von Schutzstoffen und im Vergleich das thermische Verhalten von Zellpräparationen mit Laktose. Beide Präparationen wurden für 1,5 Stunden gefriergetrocknet (Wassergehalt Zellen ohne Zusätze 6 %, Wassergehalt Zellen mit Laktose 11 %) Die Proben wurden auf -90 °C gekühlt und im Anschluss erwärmt. Abbildung 48 zeigt nur den Erwärmungszyklus.



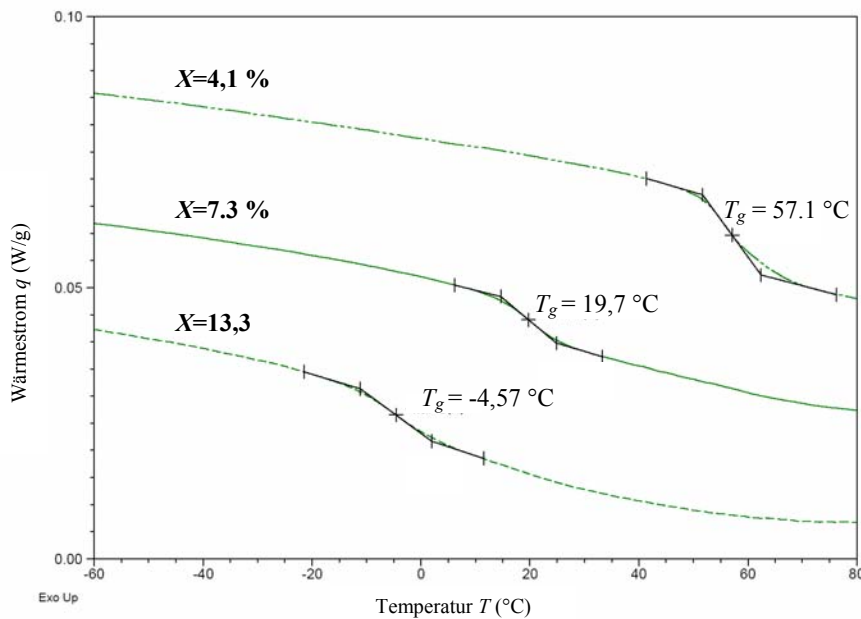
**Abbildung 48:** Wärmestrom  $q$  in Abhängigkeit von der Temperatur  $T$  für eine getrocknete Suspension bestehend aus *Lb. paracasei ssp. paracasei* mit Laktose (0,25 g/g<sub>Zelltrockenmasse</sub>) und getrocknetem *Lb. paracasei ssp. paracasei* ohne Schutzstoff. Trocknungsbedingungen: 37/-30/10, Trocknungsdauer 1,5 h

Die getrockneten Zellen ohne Laktose zeigen keinen Glasübergang. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Komponenten der Zellen selbst nicht in den Glaszustand übergehen. Die Zellen mit Laktose zeigen einen Glasübergang bei 4,7 °C.

Wie bereits erwähnt, konnten Schmelzpeaks nur für Proben mit einem Restwassergehalt von mindestens 30 % ermittelt werden. Bei niedrigen Restwassergehalten wird offenbar kein Wasser mehr ausgefroren. Für die Proben, die im flüssigen Zustand einen Restwassergehalt in diesem Bereich aufweisen, zeigte sich ein Mittelwert der Glasübergangstemperatur der maximal gefrierkonzentrierten Lösung von -37,2 °C bei einer Feststoffkonzentration der maximal aufkonzentrierten Lösung von 74,2 – 77,3 %. Dies war die niedrigste Glasübergangstempera-

tur, die bei dem hier verwendeten System erreicht werden konnte. Mit abnehmendem Restwassergehalt nimmt die Glasübergangstemperatur zu, was im Folgenden dargestellt wird.

Abbildung 49 zeigt den Wärmestrom  $q$  in Abhängigkeit von der Temperatur  $T$  für Präparationen mit Mikroorganismen und Laktose ( $0,25 \text{ g/g}_{\text{Zelltrockenmasse}}$ ) in PBS, die zu unterschiedlichen Restwassergehalten getrocknet wurden (Trocknungsbedingungen 0,37/-30/10). Die Restwassergehalte dieser Proben liegen, wie aus Abbildung 50 ersichtlich, bei niedrigeren Werten als 30 %. Es findet also keine Kristallisation des Wassers mehr statt.



**Abbildung 49:** Wärmestrom  $q$  in Abhängigkeit von der Temperatur  $T$  von Zellsuspensionen mit Laktose ( $0,25 \text{ g/g}_{\text{Zelltrockenmasse}}$ ) in Phosphatpufferlösung getrocknet auf unterschiedliche Restwassergehalte  $X$ . Trocknungsbedingungen 37/-30/+10.

Es ist deutlich, dass die Glasübergangstemperatur  $T_g$  mit abnehmendem Restwassergehalt  $X$  zunimmt.

Es fehlen Informationen darüber, inwieweit die Prozessbedingungen des Trocknungsvorganges einen Einfluss auf die Glasübergangstemperatur von Mikroorganismus/Schutzstoffpräparate besitzen. Beispielsweise könnte bei Trocknungsprozessen mit langen Verweilzeiten im übersättigten Nicht-Glaszustand die amorphe Komponente auskristallisieren. Dies hätte zur Folge, dass kein Glasübergang mehr messbar ist. Aus diesem Grund wurde die Glasübergangstemperatur für Proben ermittelt, die unter den folgenden unterschiedlichen Trocknungsbedingungen getrocknet wurden. Wie im weiteren Verlauf noch gezeigt wird, führen diese Trocknungsbedingungen zu unterschiedlichen Trocknungszeiten bzw.



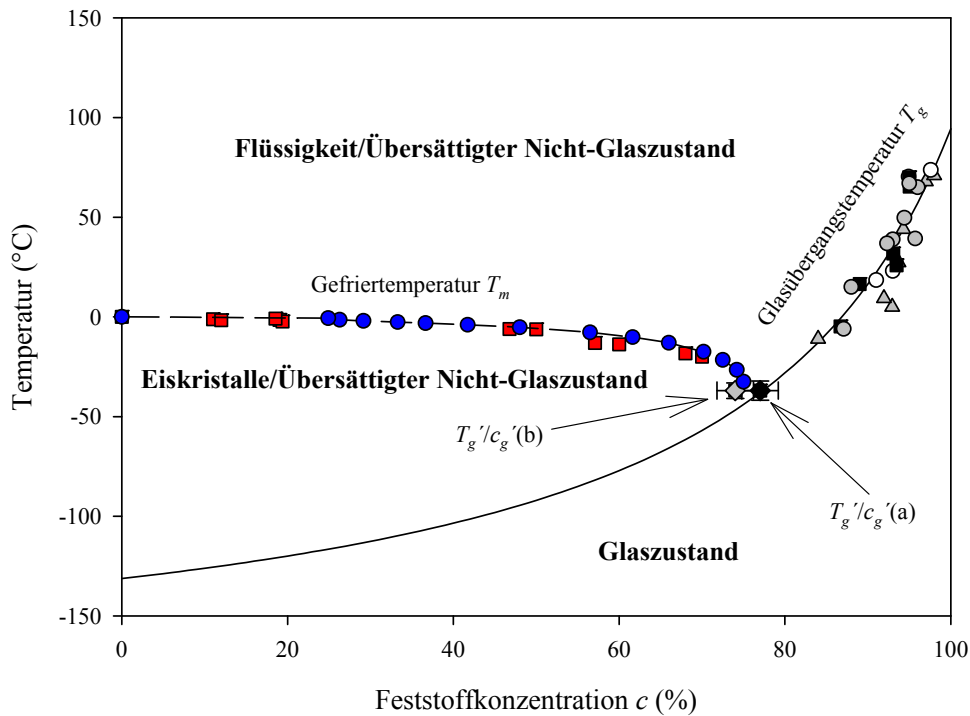
Verweilzeiten im Rubberzustand und zu unterschiedlichen Temperaturdifferenzen zwischen Produkttemperatur  $T_P$  und Glasübergangstemperatur  $T_g$ .

- 102/-20/80 (schnelle Trocknung bei hoher Temperatur)
- 102/-20/-10 (langsame Trocknung bei hoher Temperatur)
- 37/-30/10 (mittlere Trocknungsgeschwindigkeit bei niedriger Temperatur)
- 12/-40/-20 (langsame Trocknung bei niedriger Temperatur)

Die Glasübergangstemperatur der Präparate wurde nach unterschiedlichen Trocknungszeiten ermittelt. Daraus resultieren Proben mit unterschiedlichen Wassergehalten  $X$  und unterschiedlichen Glasübergangstemperaturen  $T_g$ .

Aus dem ermittelten Zusammenhang zwischen Glasübergangstemperatur und Restwassergehalt  $X$  bzw. Feststoffkonzentration  $c$  wird das Zustandsdiagramm ermittelt.

Abbildung 50 zeigt den Zusammenhang zwischen der Gefriertemperatur (vgl. Kapitel 6.1), der Glasübergangstemperatur  $T_g$  und Feststoffkonzentration  $c$  im nicht gefrorenen Anteil einer Suspension bestehend aus *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* mit Laktose (0,25 g/g<sub>Zelltrockenmasse</sub>) in Phosphatpufferlösung. Des Weiteren ist in Abbildung 50 der Punkt  $T_g'/c_g'$  dargestellt, der nach den Methoden (a) und (b) (vgl. S. 109) bestimmt wurde.



**Abbildung 50:** Phasenzustandsdiagramm von *Lb. paracasei* ssp *paracasei* mit Laktose (0,25 g/g<sub>Zelltrockenmasse</sub>). Glasübergangstemperatur für Gefriertrocknungsbedingungen: 37/ -30 °C/+10 °C (▲), 102/-20 °C/+80 °C (●), 102/-20 °C/-10 °C (○), 12/-40 °C/-20 °C (■). In dem Diagramm ist auch die Gefrierkurve dargestellt (vgl. Abbildung 35), sowie die Messwerte nach dem Vorgehen gemäß der partiellen Integration der Schmelzpeaks ( $H_{m,p}(T)$ ) (●) und die Messwerte der Temperatur des Schmelzpeakmaximums der Suspensionen mit unterschiedlichen Konzentrationen (■)  $T_{max,c}$ . Außerdem zeigt das Diagramm den Punkt  $T_g'/c_g'$  aus der Extrapolation der Schmelzenthalpie  $\Delta H_{m,p}$  zu  $\Delta H_{m,p}=0$  (■) und aus der Integration des Schmelzpeaks (◆) mit den entsprechenden Standardabweichungen.

Die  $T_g$ -Kurve (durchgezogene Linie) wurde durch Anpassung der experimentellen Werte an die Gleichung (1) nach Gordon und Taylor (1952) ermittelt.

Da die Glasübergangstemperatur des wasserfreien Feststoffes experimentell schwierig zu ermitteln ist, wurde die Kurve durch Regression angepasst und die Koeffizienten dadurch berechnet. Die ermittelten Werte der Koeffizienten sowie der Regressionskoeffizient der Gordon-Taylor-Gleichung sind in Tabelle 9 dargestellt.

**Tabelle 9:** Koeffizienten der Gleichung (1) nach Gordon und Taylor (1952)

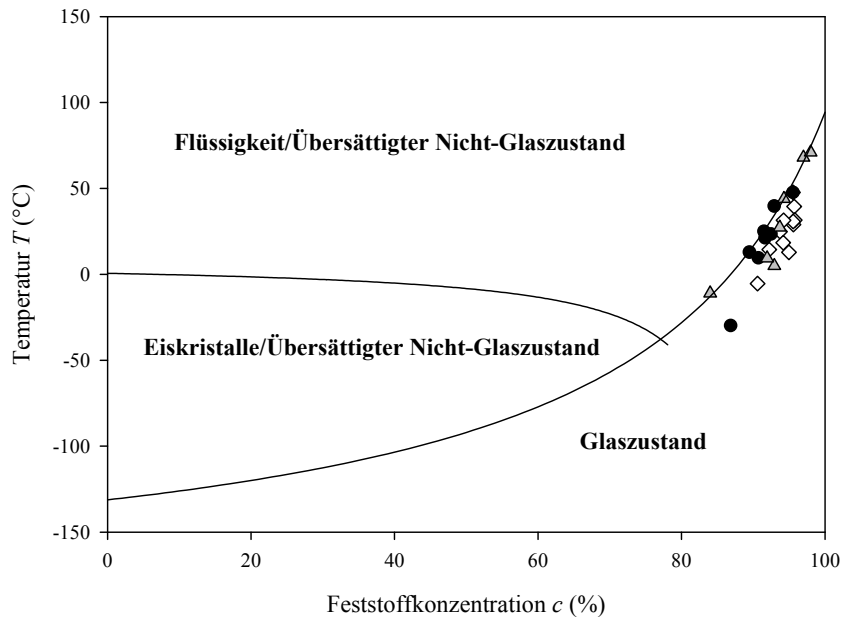
$T_{gFeststoff}$ (°C)	$k$ (-)	$R^2$
95,0	4,75	0,77

Das erstellte Phasendiagramm (vgl. Abbildung 50) gilt für Zellpräpartionen aus *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* mit einer Laktosekonzentration von 0,25 g/g<sub>Zelltrockenmasse</sub>. Es sollte ermittelt werden, welchen Einfluss unterschiedliche Mischungen zwischen Zellen und Schutzstoff auf den Verlauf der Glasübergangstemperatur besitzen, da diese Größe auch vom Gewichtsanteil der im amorphen Zustand vorliegenden Substanzen abhängt (vgl. Kapitel 2.2). Zu diesem Zweck wurden folgende Konzentrationen von Laktose, bezogen auf die Zelltrockenmasse (g/g<sub>Zelltrockenmasse</sub>), bzw. Probenzusammensetzungen untersucht.

- *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* mit Laktose (0,01 g/g<sub>Zelltrockenmasse</sub>) in Phosphatpufferlösung
- *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* mit Laktose (0,25 g/g<sub>Zelltrockenmasse</sub>) in Phosphatpufferlösung
- *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* mit Laktose (0,5 g/g<sub>Zelltrockenmasse</sub>) Phosphatpufferlösung

Durch die Ermittlung des thermischen Verhaltens sollte zum einen untersucht werden, inwieweit das Zustandsdiagramm vom Mischungsverhältnis zwischen Laktose und Zellen beeinflusst wird.

Abbildung 51 zeigt die Glasübergangstemperatur  $T_g$  für Zellen in einer Laktose-Phosphatpuffer-Lösung für verschiedene Laktosekonzentrationen, 0,01, 0,25 und 0,5 (g/g<sub>Zelltrockenmasse</sub>). Ferner sind die Gefrierkurve für ein Laktose/Zelltrockenmasse-Verhältnis von 0,25 g/g<sub>Zelltrockenmasse</sub> und die nach (1) ermittelte Glasübergangskurve dargestellt.



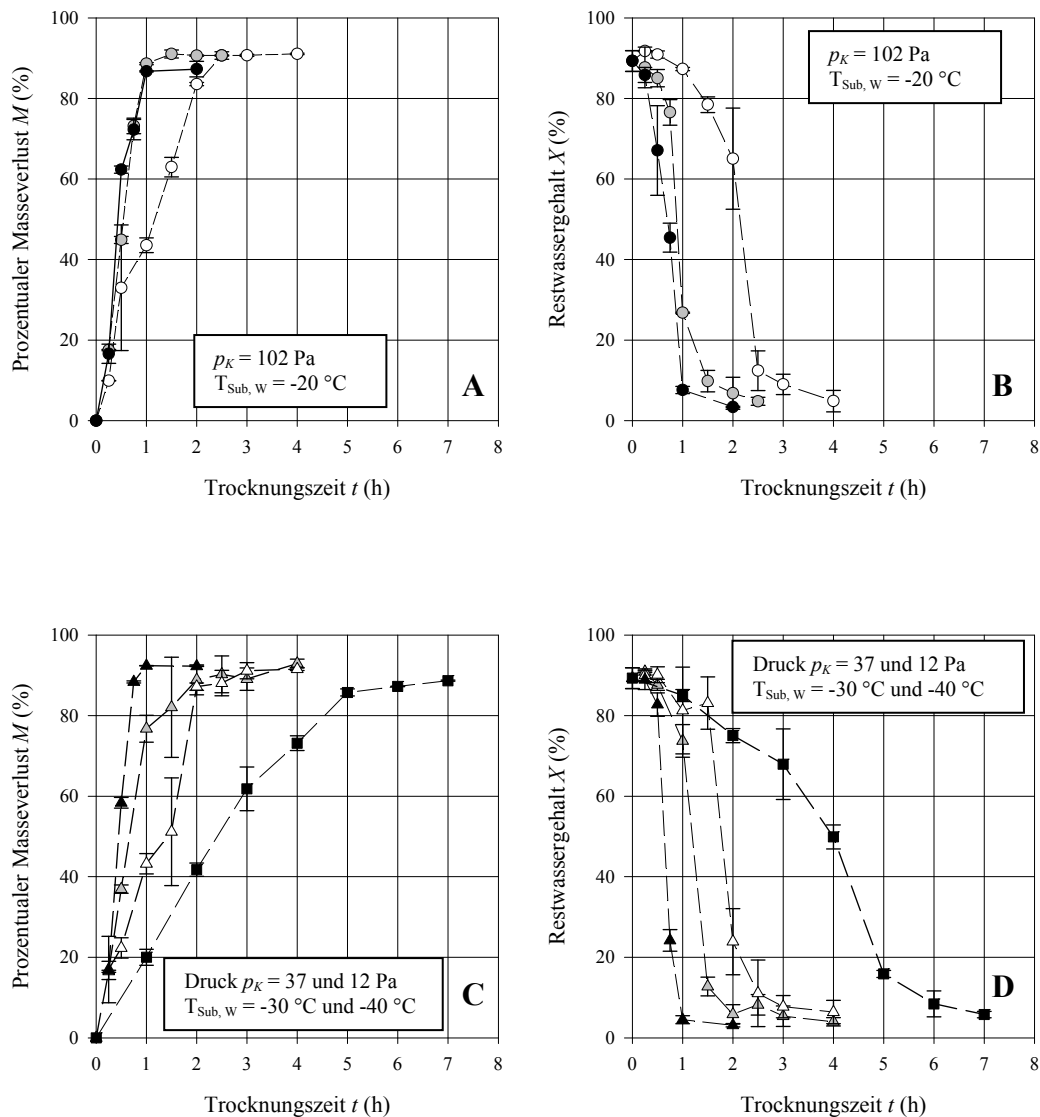
**Abbildung 51:** Glasübergangstemperatur  $T_g$  in Abhängigkeit vom Restwassergehalt für Schutzstoffkonzentrationen  $0,01 \text{ g/g}_{\text{Zellrockenmasse}}$  ( $\diamond$ ),  $0,25 \text{ g/g}_{\text{Zellrockenmasse}}$  ( $\blacktriangle$ ) und  $0,5 \text{ g/g}_{\text{Zellrockenmasse}}$  ( $\bullet$ ). Trocknungsbedingungen 37/-30/10.

Es ist deutlich, dass der Verlauf der Glasübergangstemperatur weitestgehend unabhängig vom Mischungsverhältnis zwischen Mikroorganismen und Laktose ist. Das erstellte Zustandsdiagramm gilt also für alle untersuchten Prozessbedingungen sowie für alle untersuchten Mischungsverhältnisse von Mikroorganismen und Laktose in Phosphatpufferlösung.

#### *Trocknungsverlauf der Suspensionen aus *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* und Laktose in Phosphatpufferlösung*

Für die Präparationen aus Zellen mit Laktose mit einem Mischungsverhältnis von  $0,25 \text{ g/g}_{\text{Trocknemasse}}$  wurde der Verlauf des Restwassergehalts und des entfernten Wassers sowie der Temperaturverlauf während der Gefriertrocknung ermittelt.

Abbildung 52 zeigt den zeitlichen Verlauf von Restwassergehalt  $X$  und vom prozentualen Masseverlust  $M$  für die untersuchten Prozessbedingungen. Zur besseren Übersicht sind die Ergebnisse von  $X(t)$  und  $M(t)$  jeweils auf zwei Diagramm aufgeteilt. Die Diagramme A und B zeigen die jeweils die Größen für einen Druck von 102 Pa und unterschiedlichen Stellflächentemperaturen, die Diagramme C und D stellen die Ergebnisse bei den Kammerdrücken 37 Pa und 12 Pa dar.



**Abbildung 52:** Restwassergehalt und entfernter Massenanteil während der Gefriertrocknung von *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* mit Lactose  $0,25 \text{ g/g}_{\text{Zelltrockenmasse}}$  für verschiedene Prozessbedingungen. (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung)

**A:**  $M(t)$  für Prozessbedingungen 102/-20/80 (schnelle Trocknung) ( $\bullet$ ), 102/-20/10 (mittlere Trocknungsgeschwindigkeit) ( $\circ$ ), 102/-20/-10 (langsame Trocknung) ( $\circ$ );

**B:**  $X(t)$  für Prozessbedingungen 102/-20/80 (schnelle Trocknung) ( $\bullet$ ), 102/-20/10 (mittlere Trocknungsgeschwindigkeit) ( $\circ$ ), 102/-20/-10 (langsame Trocknung) ( $\circ$ );

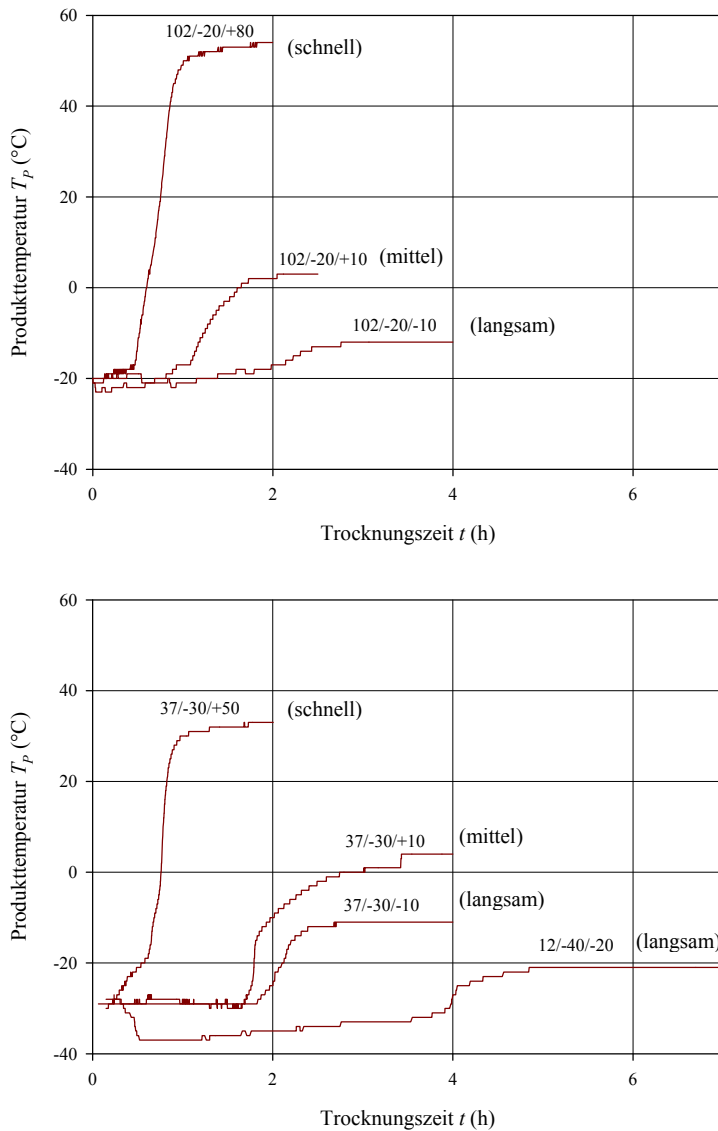
**C:**  $M(t)$  für Prozessbedingungen 12/-40/-20 (langsame Trocknung) ( $\blacksquare$ ), 37/-30/50 (schnelle Trocknung) ( $\blacktriangle$ ), 37/-30/10 (mittlere Trocknungsgeschwindigkeit) ( $\blacktriangle$ ), 37/-30/-10 (langsame Trocknung) ( $\triangle$ );

**D:**  $X(t)$  für Prozessbedingungen 12/-40/-20 (langsame Trocknung) ( $\blacksquare$ ), 37/-30/50 (schnelle Trocknung) ( $\blacktriangle$ ), 37/-30/10 (mittlere Trocknungsgeschwindigkeit) ( $\blacktriangle$ ), 37/-30/-10 (langsame Trocknung) ( $\triangle$ ).

Aus Abbildung 52 ist analog zu Abbildung 41 (Trocknungsverlauf von Zellpräparationen ohne Schutzstoff) zu ersehen, dass die Trocknungsgeschwindigkeit sowohl von Kammerdruck als auch von der Stellflächentemperatur abhängig ist. Bei gleichem Kammerdruck ist die Trocknungsgeschwindigkeit umso höher, je höher die Stellflächentemperatur ist. Bei gleicher Tem-

peraturdifferenz zwischen Produkttemperatur und Stellflächentemperatur ist die Trocknungsgeschwindigkeit bei höherem Kammerdruck höher.

Abbildung 53 zeigt den Verlauf der Produkttemperatur für die unterschiedlichen Prozessbedingungen.

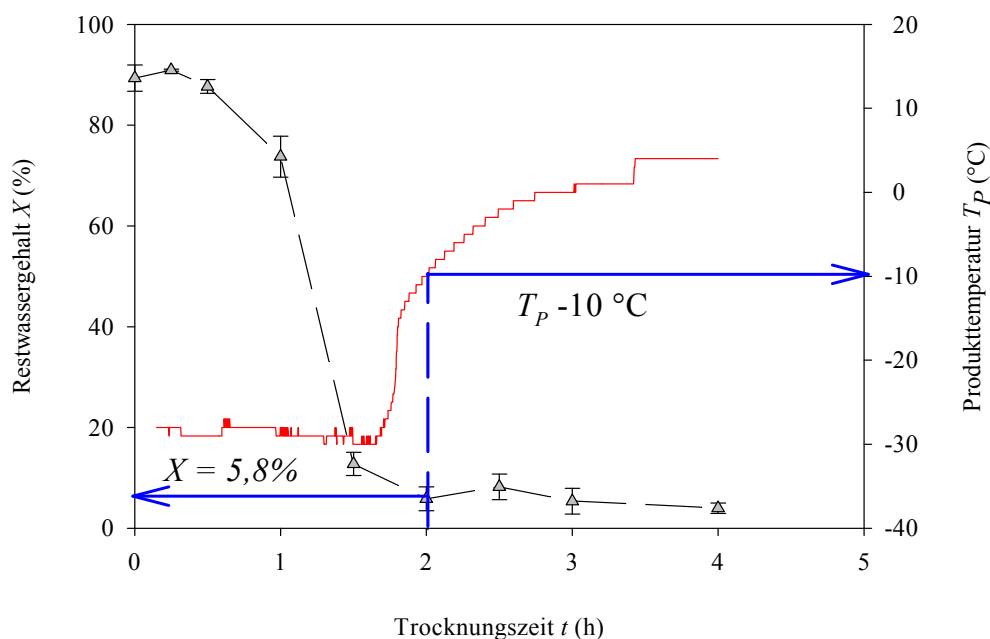


**Abbildung 53:** Verlauf der Produkttemperatur von *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* mit Laktose (0,25 g/g Zelltrockenmasse) während der Gefriertrocknung bei unterschiedlichen Prozessbedingungen.

Abbildung 53 zeigt analog zu Abbildung 40 (Produkttemperatur während der Gefriertrocknung von Zellpräparationen ohne Schutzstoff), dass die Produkttemperatur zu Beginn der Gefriertrocknung annähernd den Wert der Sublimationstemperatur von Wasser aufweist. Je nach Trocknungsgeschwindigkeit steigt die Produkttemperatur nach unterschiedlichen Zeiten an und nähert sich dem Wert der Stellflächentemperatur. Es können wiederum (vgl. Abbildung 40)

für die Trocknungsbedingungen mit hohen Stellflächentemperaturen (Prozessbedingungen 37/-30/50 sowie 102/-20/80, hohe Trocknungsgeschwindigkeiten) Abweichungen von dieser pauschalen Aussage festgestellt werden. Bei diesen Prozessbedingungen nimmt die Produkttemperatur auch während der Sublimation höhere Werte als Wassersublimationstemperatur mit einem  $\Delta T$  von 10 K an. Bei diesen Bedingungen werden nach der Sublimation niedrigere Werte als Stellflächentemperatur erreicht, was in einer Abfuhr der Wärme durch den Eiskondensator ( $-60\text{ °C}$ ) begründet ist.

Aus den getrennten Messungen von Produkttemperatur und Restwassergehalt in Abhängigkeit von der Trocknungszeit ist es möglich, Produkttemperatur  $T_P$  und Restwassergehalt  $X$  für den gleichen Zeitpunkt zu ermitteln. Auf diese Weise wird der Zusammenhang  $T_P(X)$  bzw.  $T_P(c)$  erstellt. Abbildung 54 zeigt die Vorgehensweise, mit der die Produkttemperatur  $T_P$  für einen entsprechenden Restwassergehalt ermittelt werden kann.

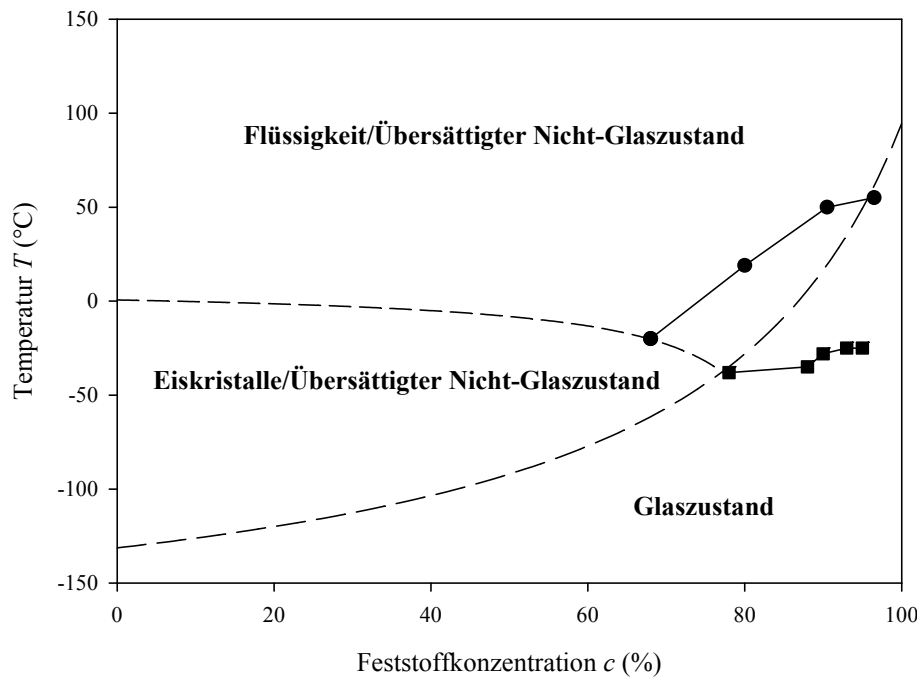


**Abbildung 54:** Produkttemperatur  $T_P$  und Restwassergehalt  $X$  während der Trocknung von *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* für die Prozessbedingung 37/-30/-10 (mittlere Trocknungsgeschwindigkeit). Die Pfeile markieren sowohl die Produkttemperatur als auch den Restwassergehalt  $X$ , die nach einer Trocknungszeit  $t$  von 2 Stunden erreicht wird.

Im gezeigten Beispiel (Abbildung 54) beträgt die Produkttemperatur  $T_P$  für eine Trocknungsdauer von 2 h  $-10\text{ °C}$  und der Restwassergehalt  $X = 5,8\%$ .

Die für bestimmte Restwassergehalte ermittelten Produkttemperaturen werden dann mit den Glasübergangstemperaturen bei den gleichen Restwassergehalten verglichen. Abbildung 55 zeigt das erstellte Phasenzustandsdiagramm. Zur Verdeutlichung sind die Produkttemperatur

$T_P$  in Abhängigkeit von der Feststoffkonzentration  $c$  eingetragen. Für den Verlauf der Produkttemperatur sind in diesem Diagramm zur besseren Übersicht nur die beiden Prozessbedingungen 12/-40/-20 (langsame Trocknung bei niedriger Temperatur) und 102/-20/80 (schnelle Trocknung bei hoher Temperatur) als niedrigster (unterhalb von  $T_g$ ) und höchster (oberhalb von  $T_g$ ) Verlauf der Produkttemperatur, die erreicht wurden, dargestellt. Alle anderen Prozessbedingungen verlaufen zwischen diesen Grenzlinien.



**Abbildung 55:** Phasenzustandsdiagramm und Verlauf der Produkttemperatur  $T_P$  für die Prozessbedingungen der Gefriertrocknung 102/-20/+80 (schnelle Trocknung bei hoher Temperatur) (●) sowie 12/-40/-20 (langsame Trocknung bei niedriger Temperatur) (■).

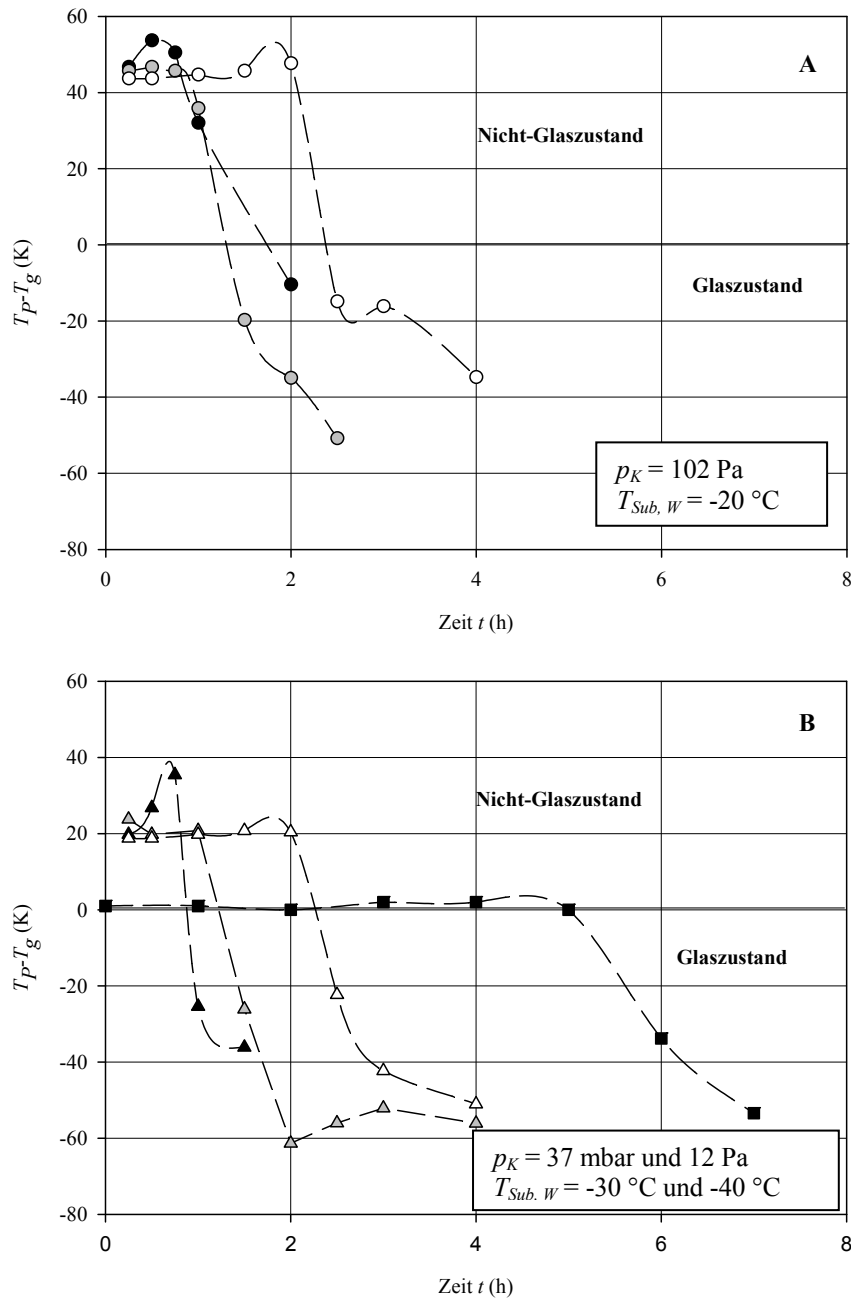
Es ist deutlich, dass durch die Wahl der Prozessparameter unterschiedliche Trocknungsbedingungen im Hinblick auf den physikalischen Zustand erreicht werden. Die Produkttemperatur  $T_P$  verläuft für die Prozessbedingung 102/-20/+80 (schnelle Trocknung bei hoher Temperatur) oberhalb und für 12/-40/-20 (langsame Trocknung bei niedriger Temperatur) unterhalb der Glasübergangstemperatur  $T_g$ .

Wie aus der Literatur hervorgeht, wird die Stabilität einer amorphen Substanz von der Differenz zwischen der Produkttemperatur  $T_P$  und der Glasübergangstemperatur  $T_g$  bestimmt. Je größere Temperaturdifferenzen oberhalb der Glasübergangstemperatur erreicht werden, umso geringer ist die Viskosität und umso höher ist die molekulare Mobilität. Infolgedessen müssten die Zellen bei einem größeren Abstand zwischen  $T_P$  und  $T_g$  schneller destabilisiert werden.

In Abbildung 56 ist der zeitliche Verlauf der Temperaturdifferenz ( $T_P - T_g$ ) für die verschiedenen Prozessbedingungen dargestellt. Die Diagramme sind wieder entsprechend dem Kam-



merdruck in zwei Einzeldarstellungen aufgeteilt. Diagramm A zeigt den Verlauf der Temperaturdifferenz für einen Kammerdruck 102 Pa mit unterschiedlichen Stellflächentemperaturen und Diagramm B die Verläufe für die Kammerdrücke 37 Pa und 12 Pa mit unterschiedlichen Stellflächentemperaturen.

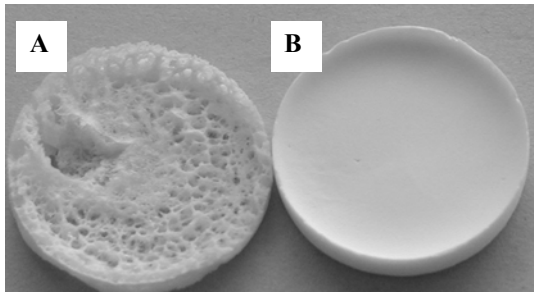


**Abbildung 56:** Verlauf der Temperaturdifferenz  $T_P - T_g$  für *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* mit Laktose (0,25 g/g<sub>Zelltrockenmasse</sub>) in Abhängigkeit von der Trocknungsdauer. Es wurden verschiedene Trocknungsbedingungen analysiert: 12/-40/-20 (langsame Trocknung) (■); 37/-30/50 (schnelle Trocknung) (▲); 37/-30/10 (mittlere Trocknungsgeschwindigkeit) (▲); 37/-30/-10 (langsame Trocknung) (△); 102/-20/80 (schnelle Trocknung) (●); 102/-20/10 (mittlere Trocknungsgeschwindigkeit) (◐); 102/-20/-10 (langsame Trocknung) (◑)

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Prozessbedingungen mit einem Druck von 102 Pa während der Haupttrocknung die größte Differenz zur Glasübergangstemperatur aufweisen. Dies liegt zum Einen an der höheren absoluten Temperatur aber auch an der dem Restwassergehalt entsprechend niedrigen Glasübergangstemperatur  $T_g$ , die bei dieser Feststoffkonzentration von 71 % in der nicht gefrorenen Phase rechnerisch bei  $-73\text{ °C}$  liegt. Je nach Stellflächentemperatur wird die Zeit, während der das Produkt im Nicht-Glaszustand verweilt, verändert. So tritt die Probe für die Prozessbedingung 102/-20/80 (schnelle Trocknung) nach 1,5 Stunden in den Glaszustand ein. Für die Bedingung 102/-20/10 (mittlere Trocknungsgeschwindigkeit) befindet sich die Probe für 1 h im Nicht-Glaszustand und für die Bedingung 102/-20/-10 (langsame Trocknung) verläuft die Trocknung für 2,5 h im Nicht-Glaszustand. Bei der Prozessbedingung 37/-30/50 (schnelle Trocknung) befindet sich die Probe für 1 h im Nicht-Glaszustand, allerdings mit einer geringeren Temperaturdifferenz ( $T_P - T_g$ ) als für den Kammerdruck 102 Pa. Die Trocknungsbedingung 37/-30/10 (mittlere Trocknungsgeschwindigkeit) führt zu einer Trocknung im Nicht-Glaszustand für 1,5 h mit einer noch geringeren Temperaturdifferenz von 20 K. Die Bedingung 37/-30/-10 (langsame Trocknung) führt ebenfalls zu einer Temperaturdifferenz von 20 K. Dabei verweilt die Probe allerdings 2,5 h lang im Nicht-Glaszustand. Die Bedingung 12/-40/-20 (langsame Trocknung) erlaubt eine Trocknung bei  $T_g'$ . Aufgrund der geringen Temperaturdifferenz zwischen Proben- und Stellflächentemperatur verläuft die Trocknung hier sehr langsam. Die Proben- und Stellflächentemperatur  $T_P$  ist nach einer Trocknung von 5 h geringer als die Glasübergangstemperatur  $T_g$ .

Mit den verschiedenen Trocknungsbedingungen konnten also unterschiedliche Temperaturdifferenzen, kombiniert mit gleichen Zeiten im Nicht-Glaszustand, und auch unterschiedliche Zeiten im Nicht-Glaszustand, kombiniert mit gleichen Temperaturdifferenzen, erreicht werden.

Abbildung 57 zeigt das makroskopische Erscheinungsbild von getrockneten Zellen, die entweder bei  $T_P > T_g$  (A) oder  $T_P$  nahe  $T_g$  (B) getrocknet wurden.



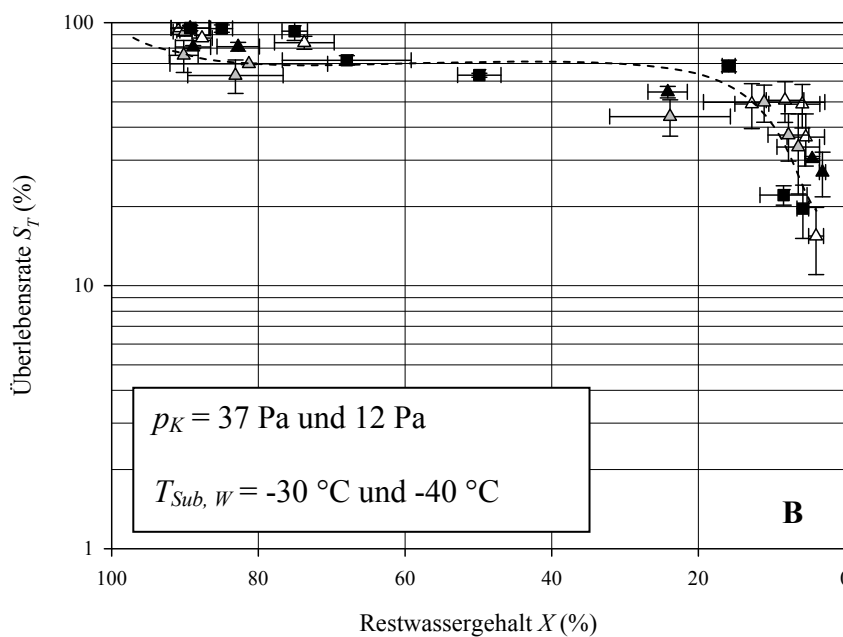
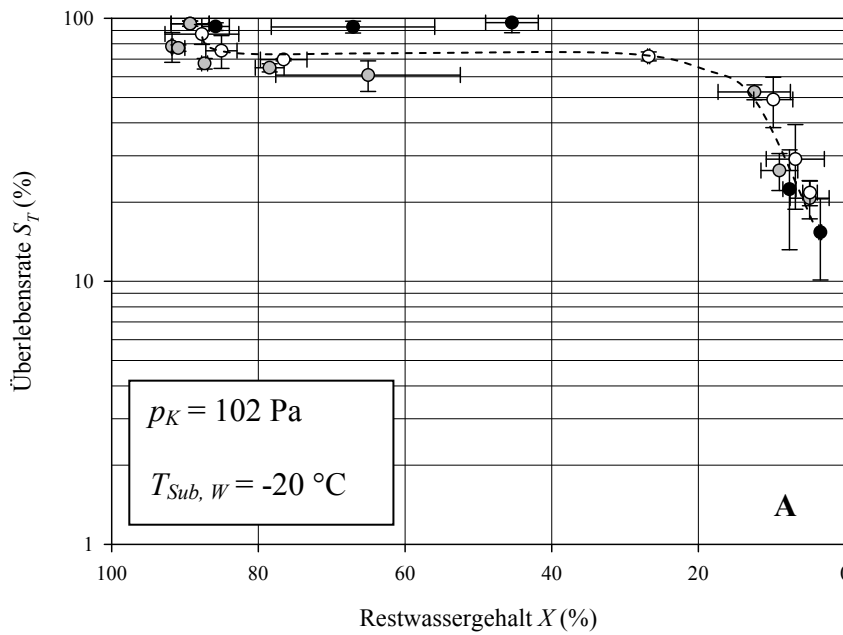
**Abbildung 57:** Gefriergetrocknete Präparationen von *Lb. paracasei ssp. paracasei* mit Laktose (0,25 g/g<sub>Zelltrockenmasse</sub>) in Phosphatpuffer. Die beiden Pellets wurden bei unterschiedlichen Prozessbedingungen getrocknet. A: Trocknung mit 102/20/80 (schnelle Trocknung) im Nicht-Glaszustand; B: Trocknung mit 37/-30/10 (mittlere Trocknungsgeschwindigkeit) nahe bei  $T_g$ .

Abbildung 57 zeigt, dass der physikalische Zustand die Produktstruktur der Präparate stark beeinflusst. Eine Trocknung oberhalb von  $T_g$  resultiert in einem Produkt mit einer inhomogenen Oberfläche, in der große Poren vorhanden sind. Diese Poren entstehen aufgrund der reduzierten Viskosität im Nicht-Glaszustand, wodurch die Probe ihr Eigengewicht nicht mehr halten kann, zu fließen beginnt und kollabiert (vgl. Roos, 1995). Werden die Zellen bei Temperaturen nahe der Glasübergangstemperatur getrocknet, so wird ein Präparat mit einer glatten Oberfläche und kleinen Poren erhalten.

#### 6.2.4 Überlebensrate von *Lb. paracasei ssp. paracasei* mit Laktose für unterschiedliche Trocknungsbedingungen

Auf Basis der physikalischen Charakteristik während der Trocknung wurde nunmehr die Überlebensrate der Mikroorganismen mit Laktose als Schutzstoff während der Trocknungen mit unterschiedlichen Prozessbedingungen ermittelt. Dabei sollte die Überlebensrate mit den Bedingungen oberhalb bzw. unterhalb von  $T_g$  korreliert werden.

Abbildung 58 zeigt den Verlauf der Überlebensrate in Abhängigkeit vom Restwassergehalt  $X$ . Die Ergebnisse sind zur besseren Übersicht in zwei Darstellungen aufgeteilt. Diagramm A zeigt die Überlebensrate bei einem Druck von 102 Pa ( $T_{Sub,W} = -20$  °C) und unterschiedlichen Stellflächentemperaturen. Diagramm B zeigt den Verlauf für die Drücke 37 Pa ( $T_{Sub,W} = -30$  °C) und 12 Pa ( $T_{Sub,W} = -40$  °C).



**Abbildung 58:** Überlebensrate  $S$  von *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* mit Laktose (0,25 g/gZelltrockenmasse) in Abhängigkeit vom Restwassergehalt  $X$  für verschiedene Prozessbedingungen. (Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung für  $S$  und  $X$ ).

**A:**  $S(X)$  für Prozessbedingungen 102/-20/80 (schnelle Trocknung) ( $\bullet$ ), 102/-20/10 (mittlere Trocknungsgeschwindigkeit) ( $\circ$ ), 102/-20/-10 (langsame Trocknung) ( $\circ$ );

**B:**  $S(X)$  für Prozessbedingungen 12/-40/-20 (langsame Trocknung) ( $\blacksquare$ ), 37/-30/50 (schnelle Trocknung) ( $\blacktriangle$ ), 37/-30/10 (mittlere Trocknungsgeschwindigkeit) ( $\blacktriangle$ ), 37/-30/-10 (langsame Trocknung) ( $\triangle$ ).

Die Ergebnisse zeigen, dass die Überlebensrate für alle Prozessbedingungen annähernd auf gleichem Niveau verläuft. Bei Restwassergehalten von 90 % - 20 % werden für alle Prozessbedingungen Überlebensraten von 50 % erreicht. Erst ab einem Restwassergehalt von 20 % nimmt die Überlebensrate stark ab. Bei einem Restwassergehalt von ca. 5 % wird für alle Prozessbedingungen eine Überlebensrate von ca. 15 % erreicht.

### 6.2.5 Diskussion der Bedeutung des Glaszustands und Einfluss der Prozessbedingungen $T_P > T_g$ und $T_P \leq T_g$

Das Phasenzustandsdiagramm für Zellsuspensionen mit Laktose als Schutzstoff entspricht annähernd dem Phasenzustandsdiagramm der reinen Laktose in Wasser. Die Zellen beeinflussen diesen Zusammenhang nur geringfügig. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit den Ergebnissen von Fonseca et al. (2001a). Die Autoren konnten ebenfalls ermitteln, dass der Zusatz von *Lactobacillus bulgaricus* zum Trocknungsmedium den Zusammenhang zwischen Glasübergangstemperatur und Restwassergehalt nicht beeinflusst. Allerdings ermittelten diese Autoren lediglich ein Phasen-Zustandsdiagramm für Zellpräparationen und nicht die Bedeutung des Glaszustands für die Stabilisierung während der Trocknung und Lagerung.

Das Phasenzustandsdiagramm diente in der hier vorliegenden Arbeit als Grundlage zur Auswahl von Gefriertrocknungsbedingungen, die zur Trocknung im Glaszustand und im Nicht-Glaszustand führten. Es konnte gezeigt werden, dass die Zellpräparationen bei einer Trocknung im Nicht-Glaszustand aufgrund der niedrigen Viskosität ihr Eigengewicht nicht mehr halten können und während der Trocknung kollabieren. Im Gegensatz dazu konnte eine glatte Oberfläche der Zellpräparation erreicht werden, wenn die Trocknung nahe bei der Glasübergangstemperatur durchgeführt wurde.

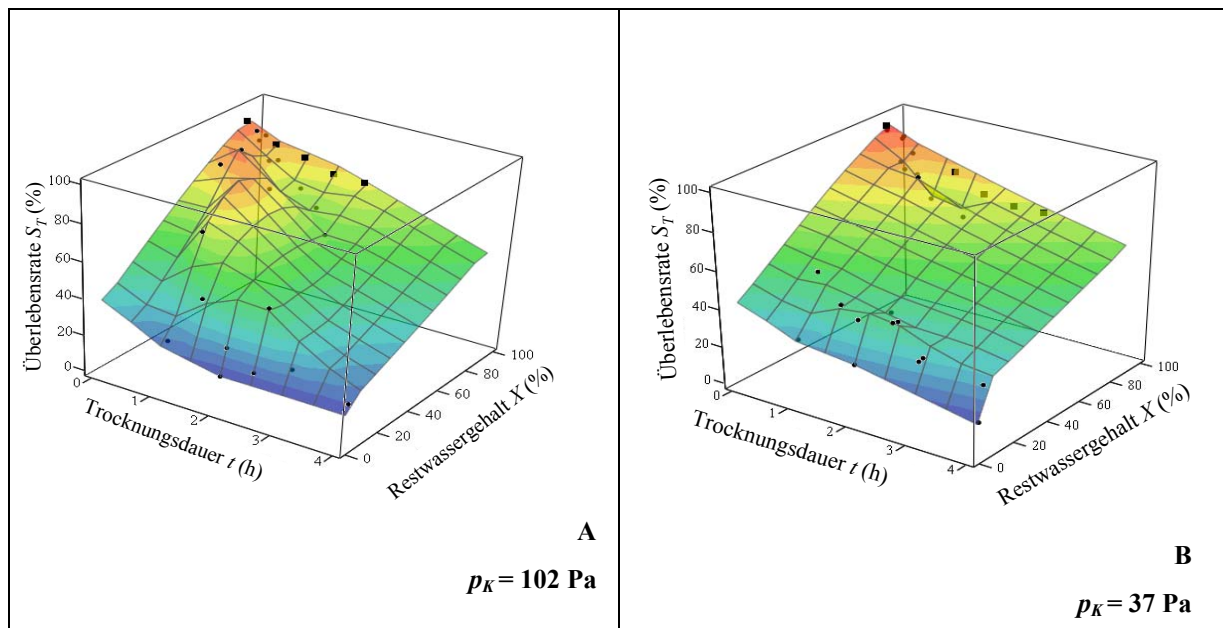
Im Hinblick auf die Überlebensrate wurde als Ergebnis erwartet, dass diese bei den Prozessbedingungen unterhalb von  $T_g$  (12/-40/-20 ( $T_P \leq T_g$ )) am höchsten ist. Die Zellen sollten also bei diesen Prozessbedingungen besser geschützt werden als bei den Prozessbedingungen, die zur Trocknung im Nicht-Glaszustand ( $T_P \geq T_g$ ) führten. Allerdings zeigten die Ergebnisse, dass sich die Überlebensrate für die unterschiedlichen Prozessbedingungen nicht signifikant unterscheidet. Es kann gefolgert werden, dass eine Trocknung im Glaszustand nicht zu einer besseren Stabilisierung führt als eine Trocknung im Nicht-Glaszustand. Die Überlebensrate verweilt für alle Prozessbedingungen auf einem hohen Niveau zu Beginn der Trocknung und nimmt bei niedrigen Restwassergehalten stark ab. Es muss allerdings beachtet werden, dass die hier betrachteten Trocknungszeiten im Vergleich zur Lagerung über mehrere Wochen und Monate relativ kurz ist. Folglich verweilen die Zellen nur eine kurze Zeit im instabilen Nicht-

Glaszustand. Möglicherweise ist die Zeit zu kurz, um Unterschiede in der Überlebensrate zu detektieren, die aus dem physikalischen Zustand resultieren. Wenn berücksichtigt wird, dass Abbaureaktionen im Nicht-Glaszustand zeitabhängig und zusätzlich von der Temperaturdifferenz zwischen Glasübergangstemperatur und Produkttemperatur abhängig sind, so kann gefolgert werden, dass die Trocknungszeit zu kurz war, um eine Schädigung im Nicht-Glaszustand hervorzurufen. Eine Verlängerung der Verweilzeit im Nicht-Glaszustand bei unterschiedlichen Temperaturdifferenzen wird im weiteren Verlauf der Arbeit in Kapitel 6.3 (Lagerung) behandelt.

Nachfolgend werden Überlegungen geschildert, die erläutern sollen, welche Erklärung für dieses unerwartete Ergebnis in Betracht kommt.

Die Gefriertrocknung wurde bei Temperaturen durchgeführt, die normalerweise unterhalb der Phasenübergangstemperatur der voll hydratisierten Zellmembran von Mikroorganismen liegen. Für die Phasenübergangstemperatur der Zellmembran von Bakterien lassen sich Werte im Bereich von 5 - 10 °C finden (Leslie et al., 1995). Das heißt, dass die Membran im hydratisierten Zustand in den Gelzustand überführt wurde, bevor der Schutzstoff das Wasser um die Phosphatreste ersetzen konnte. Des Weiteren ist der Ersatz von Wasser durch einen Schutzstoff in einer Matrix mit niedriger Temperatur möglicherweise ebenfalls durch die verminderte molekulare Mobilität erschwert. Das könnte ebenfalls ein Grund dafür sein, dass der Glaszustand nicht das bestimmende Stabilitätskriterium während der Gefriertrocknung ist.

Um den Zusammenhang zwischen Verweildauer, Restwassergehalt und Überlebensrate weiter zu verdeutlichen, zeigt Abbildung 59 die Überlebensrate von *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* mit Laktose (0,25 g/g<sub>Zellrockenmasse</sub>) in Abhängigkeit vom Restwassergehalt  $X$  und Trocknungsdauer  $t$  in einem dreidimensionalen Bild. In Abbildung 59A ist der Zusammenhang für einen Kammerdruck  $p_K$  von 102 Pa ( $T_{sub, W} = -20$  °C) dargestellt und Abbildung 59B zeigt diesen Zusammenhang für einen Kammerdruck  $p_K$  von 37 Pa ( $T_{sub, W} = -30$  °C). In den beiden Diagrammen ist auch der Verlauf der Überlebensrate während des Verweilens im gefrorenen Zustand für die Temperaturen -20 °C und -30 °C dargestellt.



**Abbildung 59:** Überlebensrate  $S$  von *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* mit Laktose (0,25 g/g<sub>Zelltrockenmasse</sub>) als Schutzstoff in Abhängigkeit vom Restwassergehalt  $X$  und von der Trocknungsdauer  $t$  für Prozessbedingungen bei einem Kammerdruck von 102 Pa (A) und 37 Pa (B) mit jeweils unterschiedlichen Stellflächentemperaturen. (●) Messwerte Überlebensrate  $S$  nach Gefriertrocknung, (■) Messwerte Überlebensrate nach Gefrierlagerung.

Abbildung 59A zeigt eine relativ geringe Abhängigkeit der Überlebensrate vom Restwassergehalt bei hohen Restwassergehalten. Die Steigung  $dS_T/dt$  im Bereich des Restwassergehalts  $>20$  % ist bei einem Zusatz von Laktose verhältnismäßig niedrig. Der Knick der Fläche bei einem Restwassergehalt von 20 % ist ebenfalls wieder deutlich ausgeprägt. Damit zeigt sich wiederum die Veränderung in der Ausprägung der Einflüsse. Im Bereich von hohen Restwassergehalten besitzt die Zeit einen großen Einfluss auf die Überlebensrate, im Bereich von niedrigen Restwassergehalten besitzt der Restwassergehalt den größten Einfluss auf die Überlebensrate. Hier verhalten sich die Zellen sehr sensitiv im Hinblick auf die Entfernung von sehr geringen Wassermengen. Es existiert also auch bei Anwesenheit eines Schutzstoffes ein kritischer Restwassergehalt, ab dem die Zellen sehr stark geschädigt werden. Ein kritischer Restwassergehalt konnte bereits für die Trocknung der Zellen ohne Schutzstoff detektiert werden. Allerdings würde man bei einem Zusatz von Zuckern erwarten, dass die Überlebensrate ab dem Wassergehalt, bei dem das Strukturwasser entfernt wird, nicht so stark abnimmt, denn für Zucker im Glaszustand wird vermutet, dass sie das Strukturwasser um die Membran nach der Trocknung ersetzen können. Folglich müsste die Überlebensrate gerade am Ende der Trocknung auf einem höheren Niveau bleiben, wenn das Strukturwasser entfernt wird. Vor allem bei einer Trocknung bei der Glasübergangstemperatur  $T_g$ , bei welcher der Schutzstoff

im Glaszustand vorliegt, sollte die Überlebensrate an diesem Punkt nicht abknicken. Das war für das untersuchte System allerdings nicht der Fall. Der Zustand der absoluten Trockenheit verursacht trotz Schutzstoff eine irreversible Schädigung.

Vergleicht man den Verlauf der Überlebensrate im gefrorenen Zustand ohne Dehydrierung mit dem Verlauf während der Dehydrierung, so ist deutlich, dass der Unterschied zwischen beiden Zuständen nur gering ist. Wird den Zellen Laktose zugesetzt, so findet im eisfreien Abschnitt keine starke Inaktivierung statt. Auch für eine niedrigere Temperatur und niedrige Gefrierate nimmt die Überlebensrate nicht so stark ab wie bei der Trocknung ohne Schutzstoff in Phosphatpuffer. Der Zusatz von Zucker bewirkt also überwiegend bei hohen Restwassergehalten und bei niedrigen Temperaturen einen Schutzeffekt. Möglicherweise ist dies darin begründet, dass durch die hygroskopische Wirkung der Laktose die Desorption in der bereits eisfreien Schicht verzögert ist und das Strukturwasser erst entfernt wird, wenn die Probe komplett eisfrei ist. Eine weitere Schutzwirkung könnte darin bestehen, dass die Laktose einen pH-Shift des Puffers verhindert und sich infolgedessen die umgebende Lösung weniger schädlich auf die Mikroorganismen auswirkt. Ferner ist es auch möglich, dass die schädlichen Einflüsse der niedrigen Temperatur an sich durch eine günstige Verteilung von Wasser und Schutzstoffmolekülen an der Grenzfläche der Biomoleküle verringert werden und somit die Zellen eine verbesserte Dehydrierungstoleranz zeigen.

Aus den dargestellten Ergebnissen kann geschlossen werden, dass der Schutzmechanismus der Laktose für das untersuchte System nicht „Water Replacement“ ist, da dieser Schutzmechanismus nur ab Restwassergehalten unterhalb von 0,3g/gH<sub>2</sub>O (hier bezogen auf die Trockenmasse) zum Tragen kommt (Hoekstra et al. (2001)). Dieser Wassergehalt entspricht einem Restwassergehalt bezogen auf die feuchte Probenmasse von 25 %, wie er nach Gleichung (15) berechnet wurde. Da die hohe Überlebensrate nur für Restwassergehalte oberhalb von 15 % gefunden wurde, interagiert Laktose vermutlich nicht direkt mit den Zellen. Stattdessen kann die Aussage getroffen werden, dass Laktose Zellkomponenten im nativen Zustand bei hohen Restwassergehalten im gefrorenen Zustand stabilisiert, indem der Zucker vorzugsweise ausgeschlossen wird. Mit der Entfernung von gebundenem Wasser werden die Zellen dann so stark geschädigt, dass sie nicht mehr dazu in der Lage sind, sich nach der Trocknung wieder zu vermehren. Der verwendete Schutzstoff schützt die physiologischen Funktionen nur, wenn eine minimale Menge an Wasser zur Verfügung steht, durch die sowohl Schutzstoff als auch die Biomoleküle hydriert werden. Die Laktose verhindert also eine Vorschädigung der Zellen aufgrund der niedrigen Temperaturen. Deshalb ist die Überlebens-



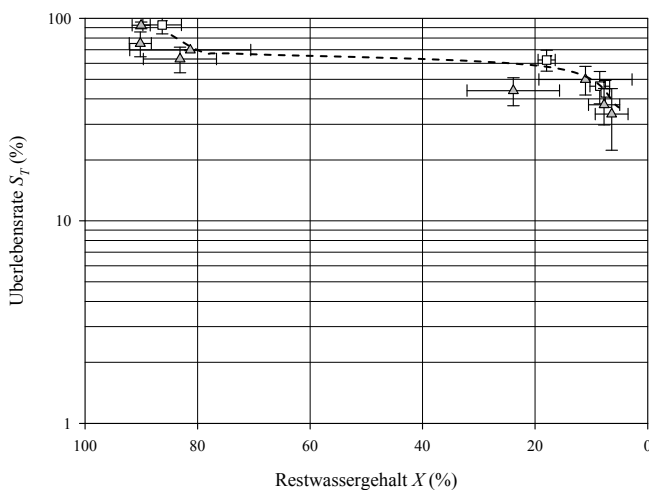
rate auch bei niedrigen Temperaturen vergleichbar mit den höheren und im Gegensatz zur Trocknung ohne Schutzstoffe verbessert.

### 6.2.6 Überlebensrate in Abhängigkeit vom Restwassergehalt für verschiedene Trocknungsbedingungen und verschiedene Formulierungen

Die Überlebensrate von *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* wurde neben verschiedenen Prozessbedingungen auch im Hinblick auf die stoffliche Zusammensetzung der zu trocknenden Suspension untersucht. Damit sollte der für Laktose ermittelte Schutzeffekt mit dem Schutzpotential von anderen Schutzstoffen bei unterschiedlichen Prozessbedingungen verglichen werden. Für die Untersuchungen wurden die Prozessbedingungen verwendet, die bereits für die Trocknung der Zellen ohne und mit Laktose Anwendung fanden. Im Hinblick auf die Formulierung wurde eine höhere Laktosekonzentration von  $0,5 \text{ g/g}_{\text{Zelltrocknmasse}}$  untersucht sowie das Schutzpotential der Schutzstoffe Magermilchpulver und Trehalose, die laut Literatur als sehr effektiver Schutzstoff gilt. Magermilchpulver enthält neben Laktose Proteine und eine Reihe weiterer minorer Komponenten, so dass der Effekt eines komplexen Mediums gegenüber einfachen Schutzstoffen untersucht werden konnte.

*Relativer Massenanteil von Laktose  $0,5 \text{ g/g}_{\text{Zelltrocknmasse}}$*

Abbildung 60 zeigt die Überlebensrate von *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* mit einem relativen Massenanteil an Laktose von  $0,25 \text{ g/g}_{\text{Zelltrocknmasse}}$  und  $0,5 \text{ g/g}_{\text{Zelltrocknmasse}}$  für die Prozessbedingungen 37/-30/10.



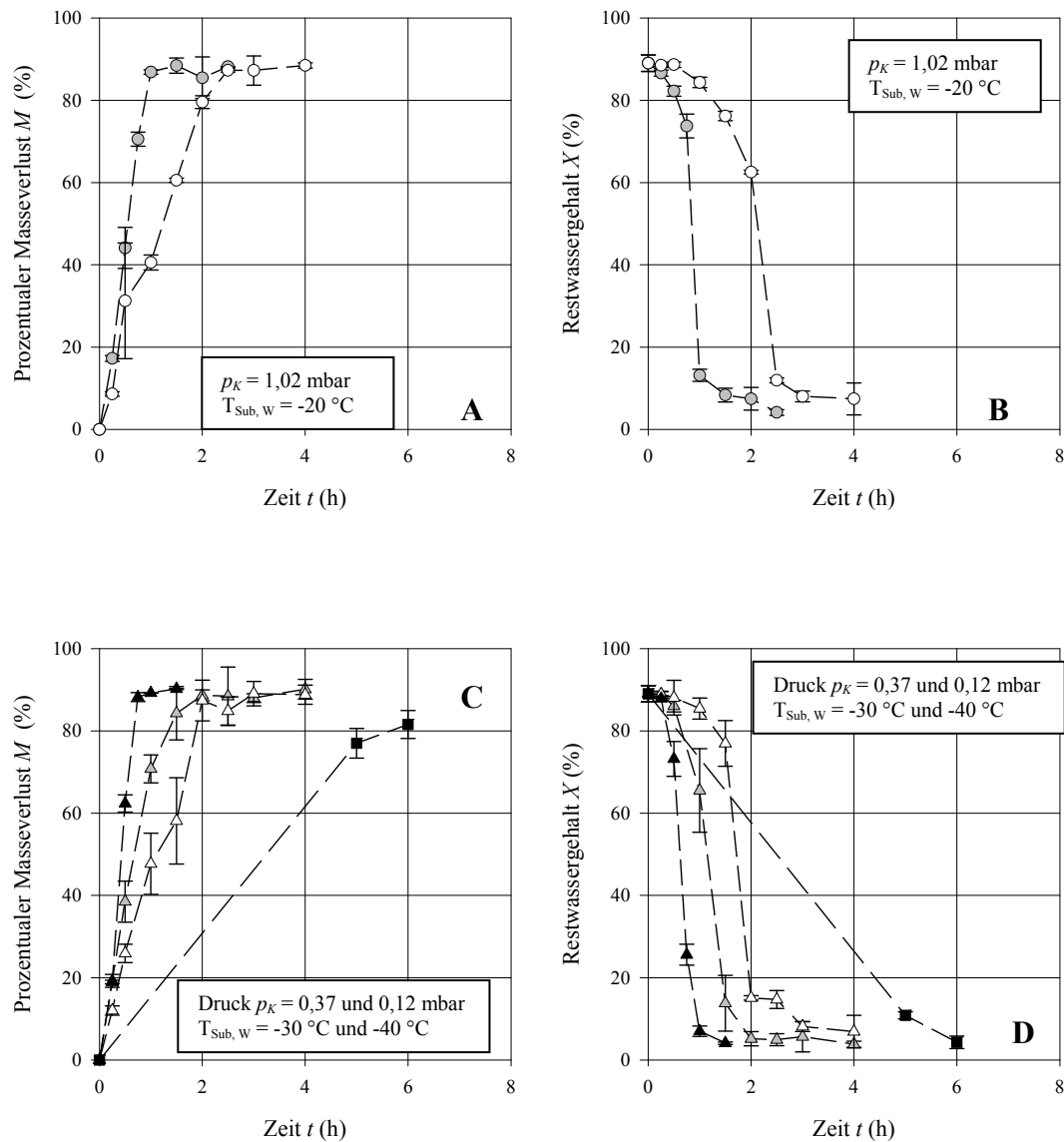
**Abbildung 60:** Überlebensrate  $S$  in Abhängigkeit vom Restwassergehalt  $X$  während der Gefriertrocknung von *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* mit einem relativen Massenanteil an Laktose von  $0,25 \text{ g/g}_{\text{Zelltrocknmasse}}$  (▲) und  $0,5 \text{ g/g}_{\text{Zelltrocknmasse}}$  (□) für die Prozessbedingung 37/-30/10 (mittlere Trocknungsgeschwindigkeit).

Abbildung 60 zeigt, dass eine höhere Laktosekonzentration keine Erhöhung der Überlebensrate bewirkt. Es konnte lediglich festgestellt werden, dass die Erhöhung der Schutzstoffkonzentration auch einen etwas höheren Restwassergehalt nach der gleichen Trocknungsdauer zur Folge hat. Deshalb liegt die niedrigste Überlebensrate, die mit einem relativen Massenanteil von  $0,5 \text{ g/g}_{\text{Zelltrocknenmasse}}$  Laktose ermittelt werden konnte bei einem höheren Wert. Auch bei einem relativen Laktosemassenanteil von  $0,5 \text{ g/g}_{\text{Zelltrocknenmasse}}$  zeigt sich eine Abnahme der Überlebensrate ab einem Restwassergehalt unter 20 %.

### *Magermilchpulver*

Für ein 50 % (w/w) Laktose enthaltendes Magermilchpulver wurde ein relativer Massenanteil von  $0,5 \text{ g/g}_{\text{Zelltrocknenmasse}}$  bezogen auf die Biotrocknenmasse verwendet. Folglich war der auf die Zelltrocknenmasse bezogene Massenanteil der Laktose gleich dem relativen Massenanteil in den Proben, die nur Laktose mit  $0,25 \text{ g/g}_{\text{Zelltrocknenmasse}}$  als Schutzstoff enthielten.

Abbildung 61 zeigt den Verlauf des prozentualen Masseverlustes  $M$  und des Restwassergehalts  $X$  während der Trocknung von *Lactobacillus paracasei* ssp *paracasei* mit Magermilchpulver (0,5) in Phosphatpufferlösung. Die Ergebnisse sind zur besseren Übersicht in vier Darstellungen aufgeteilt. Diagramme A und B zeigen  $X(t)$  und  $M(t)$  jeweils bei einem Druck von 102 Pa ( $T_{\text{Sub},W} = -20 \text{ °C}$ ) und unterschiedlichen Stellflächentemperaturen. Diagramme C und D zeigen die Verläufe für die Drücke 37 Pa ( $T_{\text{Sub},W} = -30 \text{ °C}$ ) und 12 Pa ( $T_{\text{Sub},W} = -40 \text{ °C}$ )



**Abbildung 61:** Restwassergehalt und entfernter Massenanteil während der Gefriertrocknung von *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* mit Magermilchpulver 0,5g/g<sub>Zelltrockenmasse</sub> für verschiedene Prozessbedingungen:

**A:**  $M(t)$  für Prozessbedingungen 102/-20/10 (mittlere Trocknungsgeschwindigkeit) (●), 102/-20/-10 (langsame Trocknung) (○);

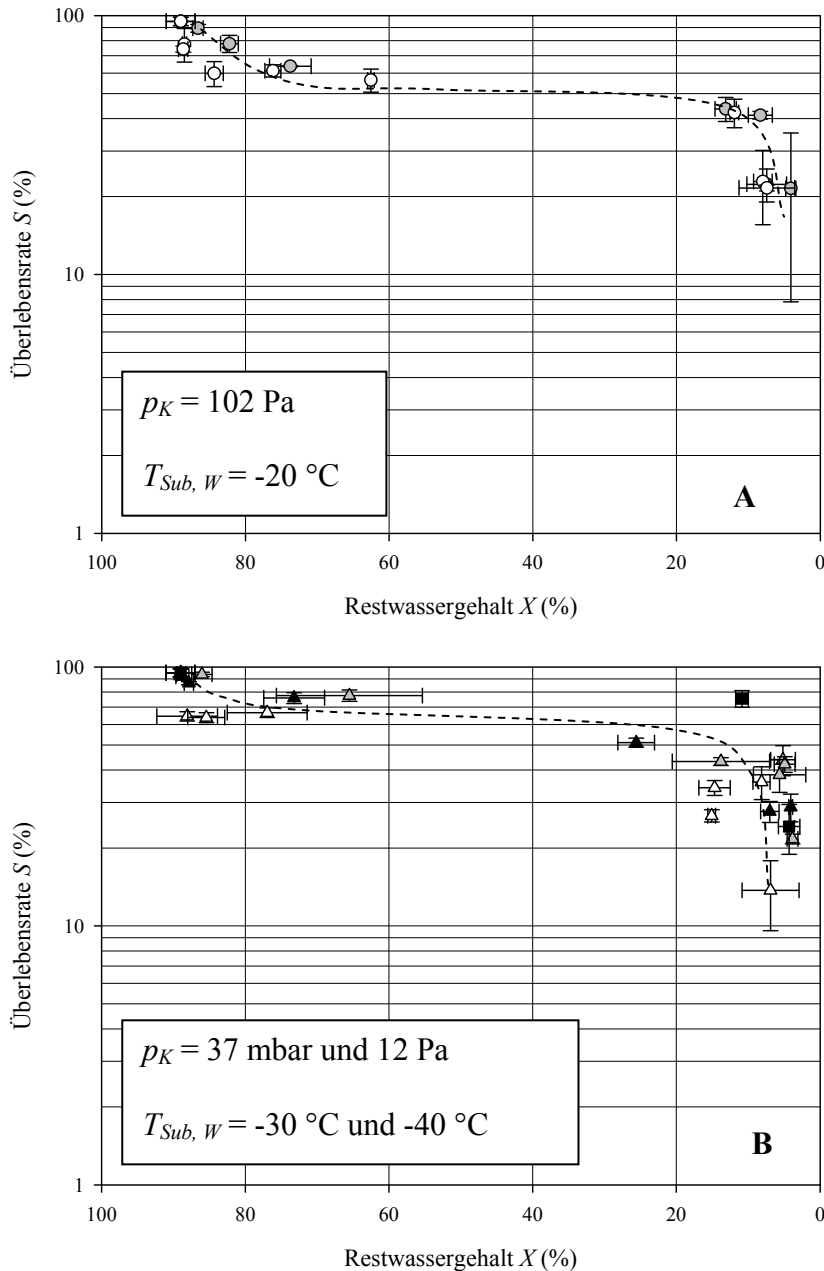
**B:**  $X(t)$  für Prozessbedingungen 102/-20/10 (mittlere Trocknungsgeschwindigkeit) (●), 102/-20/-10 (langsame Trocknung) (○);

**C:**  $M(t)$  für Prozessbedingungen 12/-40/-20 (langsame Trocknung) (■), 37/-30/50 (schnelle Trocknung) (▲), 37/-30/10 (mittlere Trocknungsgeschwindigkeit) (▲), 37/-30/-10 (langsame Trocknung) (Δ);

**D:**  $X(t)$  für Prozessbedingungen 12/-40/-20 (langsame Trocknung) (■), 37/-30/50 (schnelle Trocknung) (▲), 37/-30/10 (mittlere Trocknungsgeschwindigkeit) (▲), 37/-30/-10 (langsame Trocknung) (Δ).

Abbildung 61 zeigt, dass die Trocknungsgeschwindigkeit von den Prozessbedingungen Stellflächentemperatur und Kammerdruck abhängig ist.

Abbildung 62 zeigt den Verlauf der Überlebensrate von *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* in Abhängigkeit vom Restwassergehalt  $X$  während der Trocknung mit Magermilchpulver (0,5 g/gZelltrockenmasse) für unterschiedliche Prozessbedingungen.



**Abbildung 62:** Überlebensrate  $S$  von *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* mit Magermilchpulver (0,5 g/gZelltrockenmasse) in Abhängigkeit vom Restwassergehalt  $X$  für verschiedene Prozessbedingungen. (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung für  $S$  und  $X$ ).

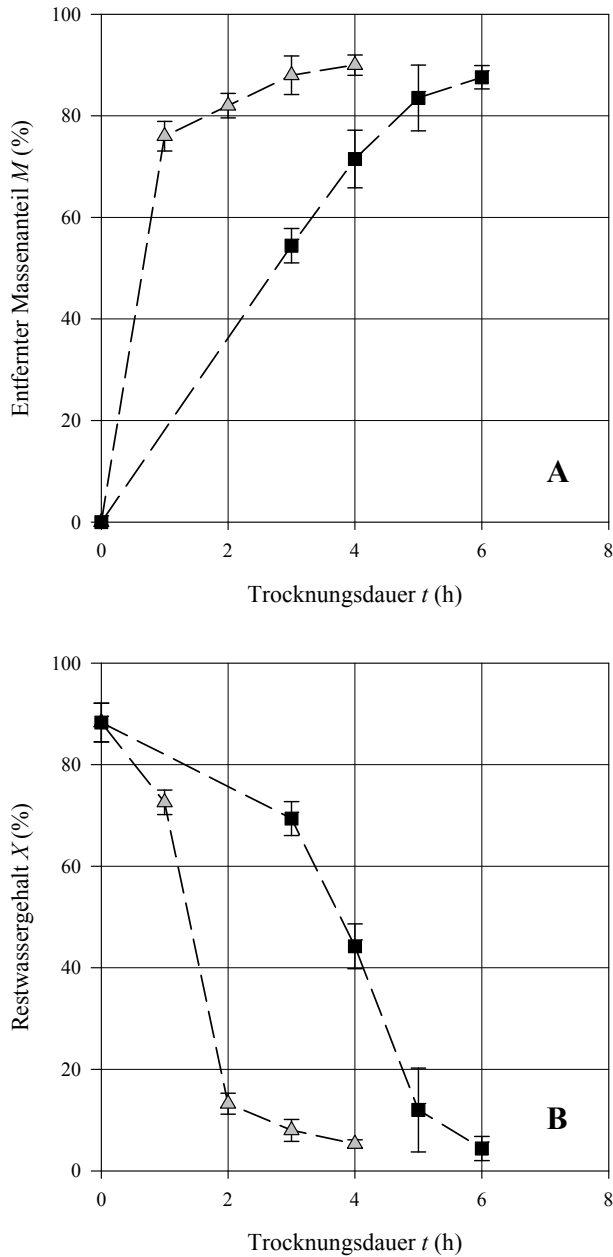
**A:**  $S(X)$  für Prozessbedingungen 102/-20/10 (mittlere Trocknungsgeschwindigkeit) ( $\bullet$ ), 102/-20/-10 (langsame Trocknung) ( $\circ$ );

**B:**  $S(X)$  für Prozessbedingungen 12/-40/-20 (langsame Trocknung) ( $\blacksquare$ ), 37/-30/50 (schnelle Trocknung) ( $\blacktriangle$ ), 37/-30/10 (mittlere Trocknungsgeschwindigkeit) ( $\blacktriangle$ ), 37/-30/-10 (langsame Trocknung) ( $\triangle$ );

Die Gefriertrocknung mit unterschiedlichen Prozessparametern beeinflusst den Verlauf der Überlebensraten von mit Magermilchzugabe getrockneten Zellsuspensionen weniger als dies bei den Zellen in Phosphatpuffer der Fall war. Die Überlebensrate zeigt für alle Prozessbedingungen den gleichen Verlauf und erreicht bei einem Restwassergehalt von 5 % annähernd gleiche Werte im Bereich zwischen 15 und 25 %.

### *Trehalose*

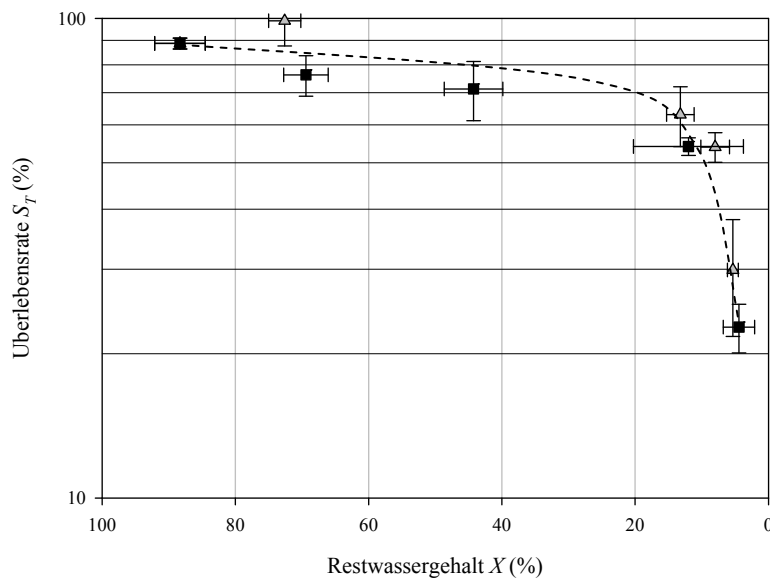
Die Entwicklung der Überlebensrate von *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* wurde auch mit Trehalose als Schutzstoff untersucht. Für diesen Schutzstoff wurden die Prozessbedingungen verwendet, die bereits für Laktose verwendet wurden, die zu einer Trocknung oberhalb von  $T_g$  und unterhalb von  $T_g$  führten. Abbildung 63 zeigt den Verlauf des Restwassergehalts und des entfernten Wassers von *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* mit Trehalose als Schutzstoff für verschiedene Prozessbedingungen.



**Abbildung 63:** Entfernter prozentualer Massenanteil  $M(t)$  (A) und Restwassergehalt  $X(t)$  (B) während der Gefriertrocknung von *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* mit Trehalose 0,25 g/g<sub>Zell trockenmasse</sub> für verschiedene Prozessbedingungen: 12/-40/-20 (langsame Trocknung) (■), 37-30/10 (mittlere Trocknungsgeschwindigkeit) (▲).

Aus Abbildung 63 ist zu erkennen, dass  $X$  bei der schnellen Trocknung bereits nach 2 h am Ziel von 5 % angekommen ist, während der Vorgang bei der langsamen Trocknung 6 h dauert.

Für die Prozessbedingungen wurde auch die Überlebensrate in Abhängigkeit vom Restwassergehalt ermittelt. Der Verlauf der Überlebensrate in Abhängigkeit vom Restwassergehalt ist in Abbildung 64 dargestellt.



**Abbildung 64:** Überlebensrate  $S$  von *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* mit Trehalose (0,25 g/gZelltrockenmasse) in Abhängigkeit vom Restwassergehalt  $X$  für verschiedene Prozessbedingungen: 12/-40/-20 (langsame Trocknung) (■), 37-30/10 (mittlere Trocknungsgeschwindigkeit) (▲) (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung für  $S_T$  und  $X$ )

Abbildung 64 zeigt, dass auch beim Zusatz von Trehalose die Überlebensrate in Abhängigkeit vom Restwassergehalt für die unterschiedlichen Prozessbedingungen den gleichen Verlauf aufweist. Auch mit diesem Additiv ist die Inaktivierung geringer von den Prozessbedingungen abhängig.

### 6.2.7 Diskussion des Schutzpotentials unterschiedlicher Schutzstoffe und Konzentrationen

Die erhöhte Laktosekonzentration besitzt keinen zusätzlichen Schutzeffekt. Es wird bei gleicher Trocknungsdauer lediglich ein etwas erhöhter Restwassergehalt erreicht, aus dem vermutlich die etwas erhöhte Überlebensrate resultiert. Diese Ergebnisse scheinen nicht in Einklang mit den Ergebnissen von Abadias et al. (2001) zu stehen, die bei einer höheren Konzentration an Laktose auch eine höhere Überlebensrate gefunden haben. Allerdings wurde bei Abadias et al. (2001) der Restwassergehalt der Proben, die alle gleich lange getrocknet wurden, nicht bestimmt. Insofern ist es möglich, dass auch bei deren Arbeit die höhere Überlebensrate aus einem höheren Restwassergehalt resultiert.

Die Vitalität während des Gefriertrocknungsverlaufs mit Magermilchpulver oder mit Laktose kann als gleich hoch angesehen werden. Demzufolge besitzen die zusätzlichen Komponenten der Magermilch neben Laktose keinen zusätzlichen Schutzeffekt auf die Überlebensfähigkeit

von gefriergetrocknetem *Lb. paracasei* ssp. *paracasei*. Diese Ergebnisse stehen nicht in Einklang mit den Ergebnissen von Palmfeldt et al. (2003), der für die Magermilch sogar niedrigere Überlebensraten ermittelte als für die gleiche Konzentration an Laktose. Palmfeldt et al. (2003) ermittelten die Überlebensrate für unterschiedliche Zusammensetzungen der Trocknungsmedien für *Pseudomonas chlororaphis* jeweils nach einer Gefriertrocknungsdauer von 17 h. Angaben zum Restwassergehalt sind in deren Arbeit lediglich für Saccharose und Magermilchpulver, nicht jedoch für Laktose gegeben. Der Zusatz von Saccharose führte dabei zu einem höheren Restwassergehalt als der Zusatz von Magermilchpulver (6,4 % für Saccharose, 3,3 % für Magermilch). Ebenso war die Überlebensrate für Saccharose höher als für Magermilchpulver. Möglicherweise liegt auch bei einem Zusatz von Laktose ein höherer Restwassergehalt nach der Trocknung vor, weshalb auch die Überlebensrate höhere Werte annimmt. Aufgrund fehlender Angaben bei Palmfeldt et al. (2003) kann diesbezüglich jedoch keine klare Aussage über den Vergleich der Schutzpotenziale von unterschiedlichen Schutzstoffen relativ zur vorliegenden Arbeit getroffen werden. Allerdings ist es sehr wahrscheinlich, dass auch die hier vorliegenden Unterschiede auf die Unterschiede im Restwassergehalt zurückzuführen sind.

In verschiedenen Arbeiten wurde Trehalose als effektiver Schutzstoff für verschiedene Biomaterialien ermittelt (Allison et al., 1999; Conrad et al., 2000; Zhou et al., 2006). Für das in dieser Arbeit untersuchte System erwies sich Trehalose jedoch nicht als besserer Schutzstoff als Laktose oder Magermilch. Obwohl Trehalose in der Natur von trockenheitstoleranten Systemen akkumuliert wird, um biologische Komponenten zu schützen, existieren Informationen, die zeigen, dass die Zugabe von Trehalose nicht notwendigerweise zum besten Schutzeffekt nach der Trocknung von Zellen führt. Linders et al. (1997) zeigten, dass Trehalose zwar extrahierte Phospholipide von *Lactobacillus plantarum* während der Trocknung schützt. Allerdings konnte die Funktionalität der ganzen Zelle während der Dehydrierung in Anwesenheit von Trehalose nicht besser erhalten werden als von anderen Zuckern. Trehalose zeigt in wässriger Lösung das gleiche Glasbildungsverhalten wie Laktose (vgl. Tabelle 1). Nachdem sich in dieser Arbeit herausgestellt hat, dass die Zellen die Glasübergangstemperatur nicht verändern, kann für die Trehalose mit den Zellen ebenfalls das bekannte Zustandsdiagramm zugrunde gelegt werden. Demnach müssten bei der Trehalose die Prozessbedingungen 12/40/20 (langsame Trocknung bei niedriger Temperatur) zu einer verbesserten Stabilität der Mikroorganismen führen. Dies konnte allerdings nicht gefunden werden, was mit der bereits getroffenen Schlussfolgerung bei der Diskussion der Laktoseversuchsreihe übereinstimmt.



Die Vitalität der Mikroorganismen nimmt unabhängig von der Schutzstoffzugabe durch den fortschreitenden Wasserentzug und die vermutlich damit verbundenen Schädigungen an Zellmembranen und -proteinen im Trocknungsverlauf immer weiter ab. Die Überlebensfähigkeit von *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* in einem Trocknungsmedium mit Laktose, Trehalose oder Magermilchpulver ist allerdings bei gleichen Restwassergehalten für ungünstige Prozessbedingungen (im Hinblick auf die Temperatur) vergleichsweise höher als ohne diese Substanzen (vgl. Abbildung 42). Da im Trocknungsverlauf die Vitalität der Zellen, welche Magermilch enthalten, mit den unter Laktose- und Trehalosezusatz getrockneten Proben vergleichbar ist, kann die Schutzwirkung der verschiedenen Stoffe als gleich hoch eingeschätzt werden. Der positive Einfluss der Magermilch auf die Überlebensfähigkeit von gefriergetrocknetem *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* kann demzufolge vor allem auf die Schutzwirkung der Laktose zurückgeführt werden, zumal Laktose den Proben in der gleichen Menge zugesetzt wurde, in der sie im Magermilchpulver vorhanden ist.

Der Zusatz des Schutzstoffes setzt die Vorschädigung der Zellen durch die niedrigen Temperaturen, was zu einer verringerten Dehydrierungstoleranz der Zellen ohne Schutzstoffe führt, herab. Dadurch werden während der Gefriertrocknung und am Ende der Trocknung bei ungünstigen Prozessbedingungen bei Anwesenheit von Schutzstoffen höhere Überlebensraten erreicht, als ohne Schutzstoffe. Der Schutzeffekt von Laktose, Trehalose und Magermilchpulver während der Gefriertrocknung ist also auf eine verminderte Vorschädigung und eine daraus folgende erhöhte Dehydrierungstoleranz verbunden.

### **6.3 Lagerung von gefriergetrockneten Mikroorganismen in einer Laktose- und einer Trehalosematrix bei Bedingungen $T > T_g$ und $T < T_g$**

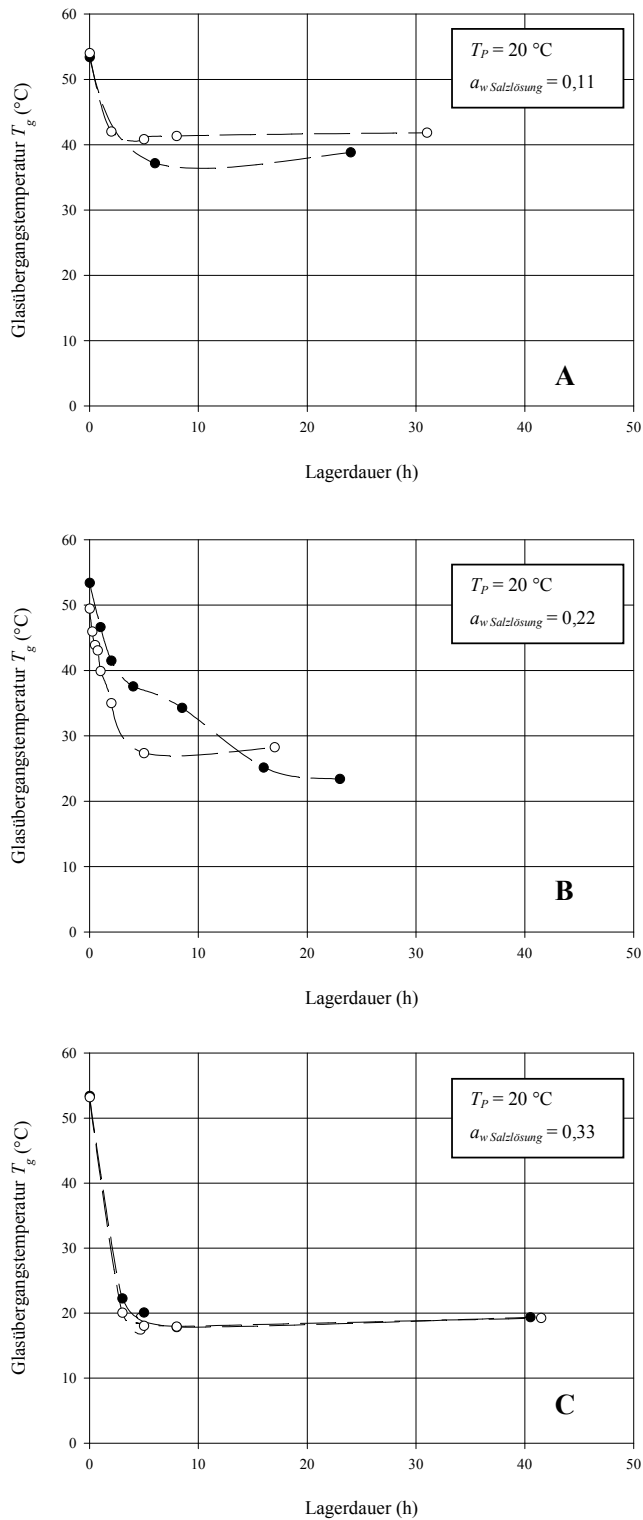
Im Hinblick auf eine erfolgreiche Gefriertrocknung von Starterkulturen ist nicht nur die Überlebensrate nach der Trocknung, sondern auch die Lagerstabilität der getrockneten Produkte von Bedeutung. Die Lagerstabilität hängt von den Lagerbedingungen Temperatur, Atmosphäre und Restwassergehalt im Produkt ab, der mit zunehmendem Trocknungsgewicht abnimmt.

Es geht aus der Literatur hervor, dass der Nicht-Glaszustand einen metastabilen Zustand darstellt, in dem chemische und physikalische Reaktionen beschleunigt ablaufen. Für den Nicht-Glaszustand sind mathematische Modelle bekannt, die eine Temperaturabhängigkeit physikalischer Vorgänge, wie beispielsweise der Diffusion, beschreiben. Entsprechend einer Diffusionslimitierung chemischer Reaktionen im Glaszustand würde das für die Lagerung von getrockneten Mikroorganismenpräparaten bedeuten, dass für Lagerbedingungen unterhalb der Glasübergangstemperatur die Lagerstabilität erhöht sein sollte. Bei einer Lagerung oberhalb der Glasübergangstemperatur sollte demnach die Inaktivierung der Mikroorganismen beschleunigt ablaufen. Ob diese Hypothese für die Lagerstabilität von Mikroorganismen in einer Schutzstoffmatrix zutrifft und inwieweit die Temperaturabhängigkeit der Inaktivierung mit den Modellen nach Arrhenius (vgl. Gleichung (5)) oder Williams-Landel-Ferry (WLF) (vgl. Gleichung (6)) beschrieben werden kann, wurde im Rahmen dieser Arbeit ermittelt.

#### **6.3.1 Sorptionsisothermen $X(a_w)$ und Zustandsdiagramm $T_g(a_w)$ für getrocknete Mikroorganismenpräparationen in einer Laktosematrix**

Die in dieser Arbeit für die Lagerung verwendeten Proben wurden alle der gleichen Trocknungsprozedur unterzogen (Prozessbedingung 37/-30/10, mittlere Trocknungsgeschwindigkeit bei niedriger Temperatur, für 3 h). Anschließend wurden die Proben bei konstanten Temperaturen und Luftfeuchten gelagert. Dabei stellte sich je nach Gleichgewichtsfeuchte eine entsprechende Glasübergangstemperatur in den Proben ein. Es war nicht bekannt, ob die Glasübergangstemperatur ein konstantes Niveau erreicht und wie lange es dauern würde, bis ein konstanter Wert erreicht ist. Aus diesem Grund wurde von Beginn der Konditionierung an der Verlauf der Glasübergangstemperatur während der Lagerung untersucht.

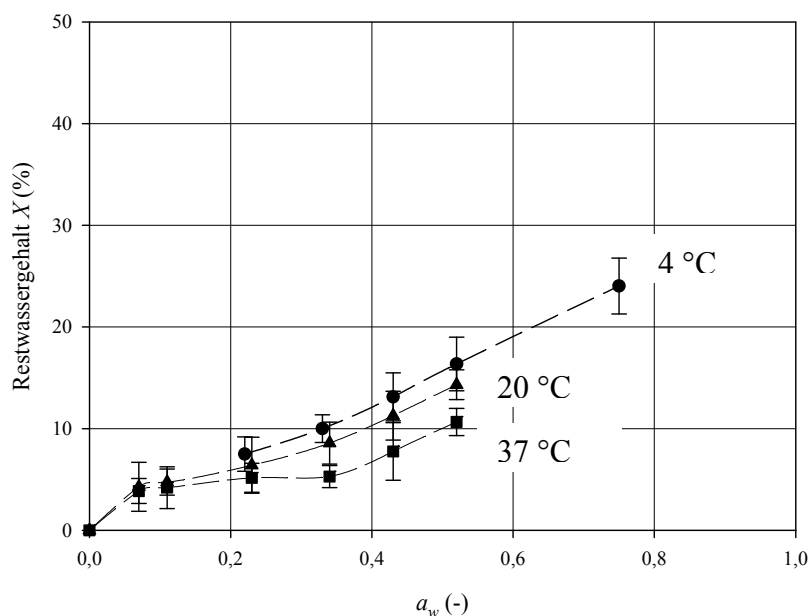
Abbildung 65 zeigt die zeitliche Entwicklung der Glasübergangstemperatur beispielhaft für die Wasseraktivitäten 0,11, 0,22 und 0,33. Die Lagertemperatur betrug 20 °C.



**Abbildung 65. Zeitlicher Verlauf der Glasübergangstemperatur der getrockneten Präparationen aus *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* mit Laktose (0,25 g/g<sub>Zelltrockenmasse</sub>) von Beginn der Lagerung für eine Lagertemperatur von 20 °C und unterschiedliche Wasseraktivitäten der Salzlösungen  $a_{w\text{Salzlösung}}$ : (A) 0,11, (B) 0,22, (C) 0,33. (○) Bestimmung 1, (●) wiederholte Bestimmung 2). Die Ausgangswasseraktivität direkt nach der Trocknung vor der Lagerung beträgt 0,09.**

Abbildung 65 zeigt, dass zu Beginn der Lagerung die Glasübergangstemperatur bei ca. 55 °C liegt. Wird eine Probe mit einer Wasseraktivität  $a_w$  einer Atmosphäre ausgesetzt, in der eine höhere relative Luftfeuchte vorliegt, so erfolgt aufgrund des Wasserdampfpartialdruckgefälles zwischen Luft und Probe eine Wasseraufnahme der Probe. Je nach Luftvolumen und Luftbefeuchtung nimmt der Wassergehalt der Luft ab. Aufgrund der Zunahme des Restwassergehalts in der amorphen Matrix erfolgt eine Abnahme der Glasübergangstemperatur. Die Abnahme der Glasübergangstemperatur bis zum Erreichen eines konstanten Wertes erfolgt in einem Zeitraum von 5 – 8 h.

Analog zur Änderung der Wasseraktivität ändert sich auch der Restwassergehalt  $X$ . Der Zusammenhang  $X(a_w)$  wird für eine jeweils konstante Temperatur in Form von Sorptionsisothermen dargestellt. Abbildung 66 zeigt die Sorptionsisotherme für getrocknete Präparationen von Zellen mit Laktose für die Temperaturen 4 °C, 20 °C und 37 °C.

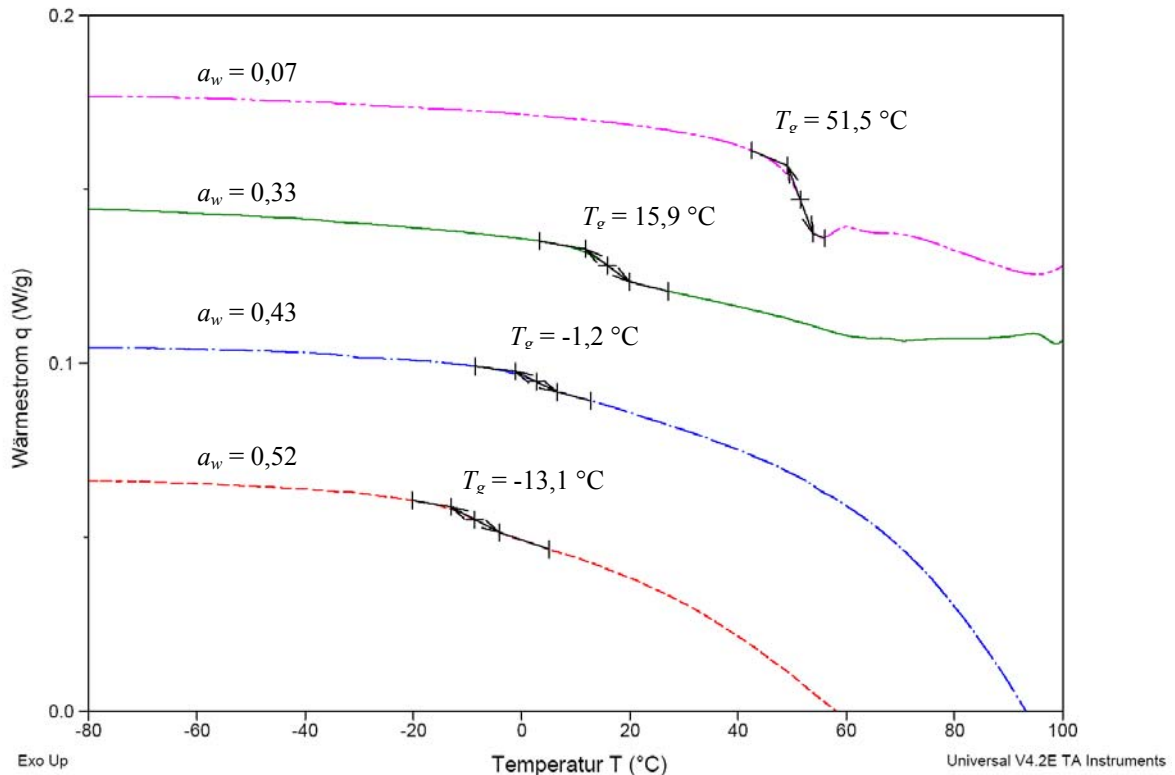


**Abbildung 66:** Wasseraktivität in Abhängigkeit vom Restwassergehalt  $X$  für gefriergetrocknete Zellen mit einer Laktosekonzentration von 0,25 g/g<sub>Zell trockenmasse</sub> bei einer Temperatur von (●) 4 °C, (▲) 20 °C und (■) 37 °C.

Abbildung 66 zeigt, dass für eine konstante Wasseraktivität der Restwassergehalt umso höher ist, je niedriger die Temperatur ist.

Entsprechend der ermittelten Zeit für die Veränderung der Glasübergangstemperatur aufgrund der Befeuchtung bei Beginn der Lagerung wurde festgelegt, dass die Glasübergangstemperatur  $T_g$  für die Erstellung des Zustandsdiagramms  $T_g(a_w)$  nach 25 Tagen Lagerung bestimmt wird.

Abbildung 67 zeigt den Wärmestrom  $q$  in Abhängigkeit von der Temperatur  $T$  für getrocknete Präparate aus *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* mit Laktose nach 25 Tagen Lagerung bei einer Temperatur von 20 °C und unterschiedlichen Wasseraktivitäten.



**Abbildung 67: Wärmestrom  $q$  in Abhängigkeit von der Temperatur  $T$  für Zellen mit Laktose nach einer Lagerdauer von 25 Tagen bei 20 °C bei unterschiedlichen Wasseraktivitäten.**

Abbildung 68 zeigt, dass die Glasübergangstemperatur mit zunehmender Wasseraktivität niedrigere Werte annimmt. Aus diesen Messungen kann der Zusammenhang  $T_g(a_w)$  ermittelt werden, der als Grundlage für die Auswahl von Lagerbedingungen im Hinblick auf Produkttemperatur  $T_P$  und Wasseraktivität  $a_w$  für die Lagerung entweder im Glaszustand oder im Nicht-Glaszustand dienen soll.

Abbildung 68 zeigt die gemessene Glasübergangstemperatur von Präparationen bestehend aus Mikroorganismen mit Laktose (0,25 g/gZelltrockenmasse) für die Temperaturen 4 °C, 20 °C und 37 °C in Abhängigkeit von der Wasseraktivität. In Abbildung 68 sind auch die ausgewählten Lagerungsbedingungen ( $T_P$  und  $a_w$ ) für die Lagerung im Glaszustand oder im Nicht-Glaszustand dargestellt, für welche die Überlebensrate der Zellen untersucht wurde.

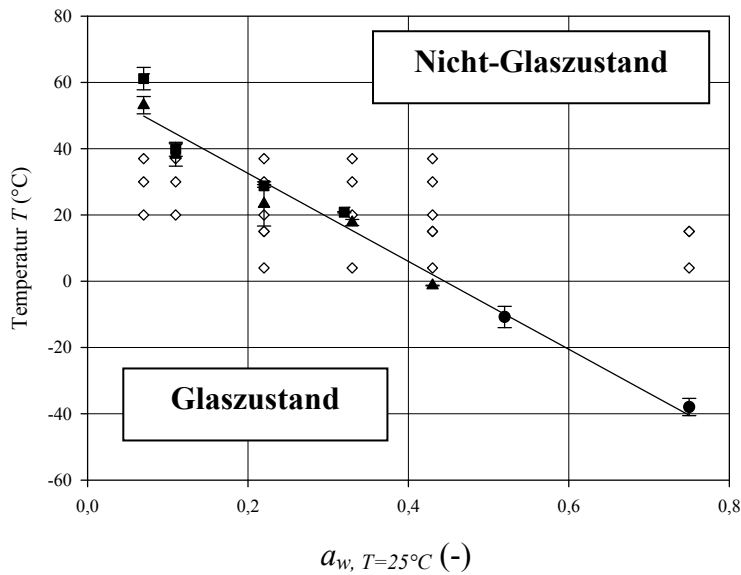


Abbildung 68: Gemessene Glasübergangstemperatur  $T_g$  in Abhängigkeit von der Wasseraktivität nach 25 Tagen Lagerung. Außerdem sind die Lagerungsbedingungen Temperatur/Wasseraktivität dargestellt, bei denen die Zellen gelagert wurden. (●) Lagertemperatur 4 °C, (▲) Lagertemperatur 20 °C, (■) Lagertemperatur 37 °C. (◇) Lagerbedingungen  $T_p/a_w$  (Mittelwerte ± Maximal- und Minimalwert). Koeffizienten der linearen Anpassung Gleichung (31):  $T_{g0} = 59,1$  °C, Steigung  $dT_g/da_w = -132,7$  °C.

Abbildung 68 zeigt, dass aufgrund der Abhängigkeit  $T_g(a_w)$  durch die Einstellung von  $a_w$  die Einstellung von  $T_g$  möglich ist. Durch die Auswahl verschiedener Lagertemperaturen  $T_p$  bei verschiedenen Glasübergangstemperaturen  $T_g$  ist es möglich, eine Lagerung im Glaszustand oder im Nicht-Glaszustand auf einem Temperaturniveau aber auch vergleichbare physikalische Zustände auf unterschiedlichen Temperaturniveaus zu realisieren.

Abbildung 68 zeigt, dass der Zusammenhang zwischen  $T_g$  und  $a_w$  für unterschiedliche Temperaturen (4 °C, 20 °C, 37 °C) keinen signifikant unterschiedlichen Verlauf aufweist (Konfidenz 0,95).

Abbildung 68 zeigt, dass  $T_g$  mit zunehmendem  $a_w$  abnimmt. Die Glasübergangstemperatur  $T_g$  zeigt eine lineare Abhängigkeit von der Wasseraktivität ( $R^2=0,99$ ). Gleichung (31) beschreibt den linearen Zusammenhang  $T_g(a_w)$  für alle untersuchten Temperaturen.

$$T(a_w) = \frac{dT_g}{da_w} \cdot a_w + T_{g0} \quad (31)$$

mit

$T_{g0} = 59,1$  °C und  $dT_g/da_w = -132,7$  °C für *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* in einer Laktosematrix.

Eine lineare Abhängigkeit von  $T_g(a_w)$  steht in Einklang mit anderen Untersuchungen von Lebensmitteln und Polysacchariden (Ahmed et al., 2005; Moraga et al., 2006; Roos und Himber, 1994). Auch für diese biologischen Materialien konnte ein linearer Zusammenhang zwischen  $T_g$  und  $a_w$  ermittelt werden.

Aus Abbildung 68 können nun für unterschiedliche Temperaturen die Wasseraktivitäten ermittelt werden, die eine Grenze zwischen dem Glaszustand und dem Nicht-Glaszustand darstellen. Das bedeutet, dass bei diesen Wasseraktivitäten die Lagertemperatur  $T_P$  der Glasübergangstemperatur  $T_g$  entspricht. Bei einer konstanten Lagertemperatur  $T_P$  befindet sich das Präparat oberhalb dieser Grenzwasseraktivitäten im Nicht-Glaszustand und unterhalb der entsprechenden Wasseraktivitäten befindet sich das Präparat im Glaszustand.

Tabelle 10 zeigt die nach Gleichung (32) berechneten Grenzwasseraktivitäten  $a_{wg}$ , für die die hier untersuchten Lagertemperaturen  $T_P$  und die Glasübergangstemperatur  $T_g$  gleich sind.

**Tabelle 10: Interpolierte Grenzwasseraktivität  $a_{wg}$  für  $T_P=T_g$  nach Gleichung (32).**

Lagertemperatur $T_P$ (°C)	Grenzwasseraktivität $a_{wg}$ (-)
4	0,42
15	0,33
20	0,29
30	0,21
37	0,17

Diese Wasseraktivitäten markieren also eine Grenzlinie zwischen dem Glaszustand und dem Nicht-Glaszustand. Die Grenzwasseraktivität für eine Lagertemperatur von 37 °C ist 0,17 und für 4 °C beträgt sie 0,42. Folglich muss also eine erhöhte Temperatur durch eine verringerte Wasseraktivität kompensiert werden um den Glaszustand zu erhalten. Dieser Effekt steht qualitativ im Einklang mit dem Zustandsdiagramm von reiner amorpher Laktose (Thomsen et al. (2005)). Für reine Laktose ist bei einer Temperatur von 20 °C die Grenzwasseraktivität 0,40. Der Unterschied zwischen diesen Werten und den Werten des Zellsystems ist wohl hauptsächlich auf die Anwesenheit der Salze aus dem Phosphatpuffer zurückzuführen ( $K_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$ , NaCl). Der spezifische Effekt eines Salzes in einem Glassystem ist allerdings noch unbekannt. Möglich ist ein erhöhter Absorptionseffekt von Wasser oder ein rein spezifischer weichmachender Effekt.

In Abbildung 68 sind die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Lagerungsbedingungen eingetragen. Die Bedingungen wurden so gewählt, dass verschiedene physikalische Zustände während der Lagerung erreicht wurden. Die Mikroorganismen wurden also für alle untersuchten Temperaturen im Glaszustand oder im Nicht-Glaszustand, je nach Wasseraktivität, gelagert. Dabei wurde die Temperaturdifferenz  $T_p-T_g$  durch die Veränderung unterschiedlicher Größen variiert:

1. Beeinflussung der Temperaturdifferenz  $T_p-T_g$  durch die Änderung der Lagertemperatur  $T_p$
2. Beeinflussung der Temperaturdifferenz  $T_p-T_g$  durch die Änderung der Wasseraktivität  $a_w$  und dadurch Änderung von  $T_g$

Im Folgenden wird untersucht, welche Bedeutung die Lagertemperatur *per se*, die Temperaturdifferenz zwischen Produkttemperatur und Glasübergangstemperatur  $T_p-T_g$  sowie die Wasseraktivität  $a_w$  für die Lagerstabilität des verwendeten Testmikroorganismus besitzt.

### **6.3.2 Überlebensrate von *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* in einer Laktosematrix während der Lagerung im Glaszustand und im Nicht-Glaszustand**

Für die unterschiedlichen Lagerbedingungen wurde die Überlebensrate während der Lagerdauer von 30-60 Tagen gemessen. Für jede Lagerbedingung ist zur besseren Übersicht jeweils eine Einzelbestimmung dargestellt. Dabei wurden die Proben für eine einzelne Kurve aus demselben Fermentationsansatz gewonnen. Zur Quantifizierung der Streuung der Überlebensrate ist im Weiteren Verlauf die Geschwindigkeitskonstante  $k_{T,a_w}$  mit der entsprechenden Standardabweichung dargestellt.

Als Referenz für die Überlebensrate bei den Temperaturen 4 °C - 37 °C wurde der Verlauf der Überlebensrate während der Lagerung bei der Temperatur -40 °C ermittelt.

Abbildung 69 zeigt den Verlauf der Überlebensrate von *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* bei -40 °C. In den folgenden Darstellungen ist jeweils die Keimzahl  $N$  nach einer bestimmten Lagerdauer auf die Keimzahl  $N_0$ , die direkt nach der Gefriertrocknung ermittelt wurde, bezogen.



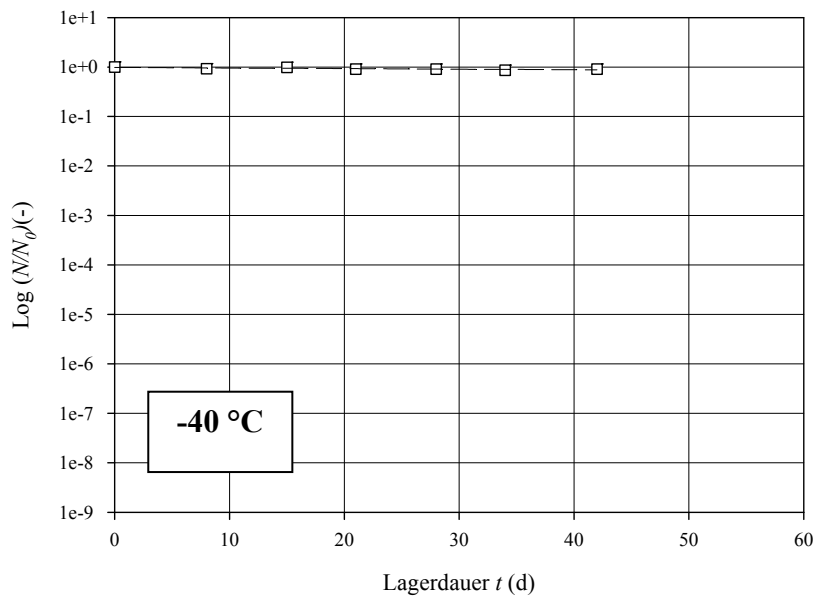


Abbildung 69: Keimzahl  $N/N_0$  während der Lagerung bei einer Lagertemperatur von  $-40\text{ °C}$

Abbildung 69 zeigt, dass die Keimzahl  $N/N_0$  bei einer Temperatur von  $-40\text{ °C}$  während eines Lagerzeitraumes von 42 Tagen konstant bleibt, also kein Verlust eintritt

Abbildungen 70 – 74 zeigen den Verlauf der Keimzahlreduktion  $N/N_0$  für die Lagertemperaturen  $4\text{ °C}$ ,  $15\text{ °C}$ ,  $20\text{ °C}$ ,  $30\text{ °C}$  und  $37\text{ °C}$  für unterschiedliche Wasseraktivitäten.

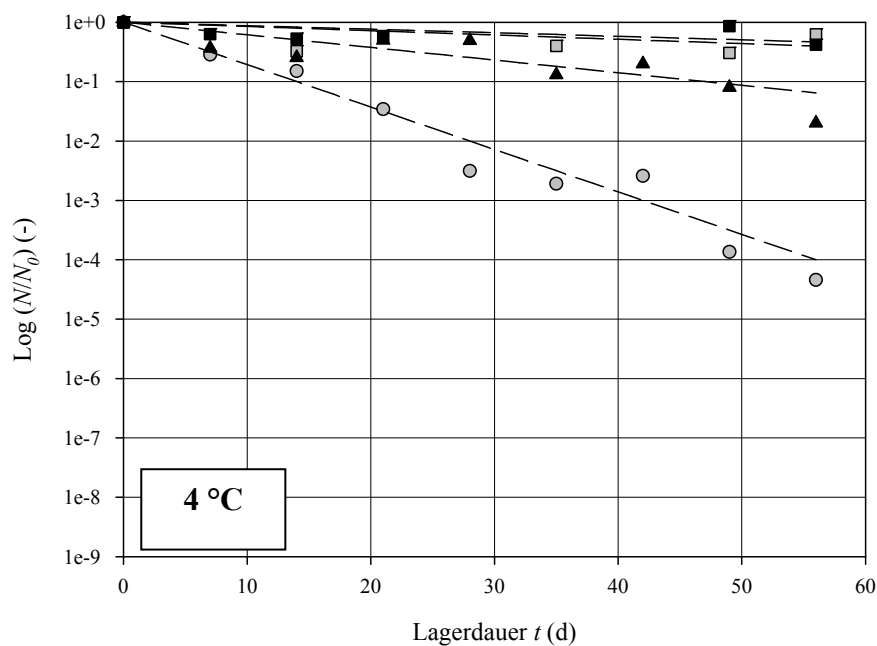


Abbildung 70: Keimzahl  $N/N_0$  während der Lagerung bei einer Lagertemperatur von  $4\text{ °C}$  und unterschiedlichen Wasseraktivitäten  $a_w$ : (■) 0,22; (▣) 0,33; (▲) 0,43 und (●) 0,75.

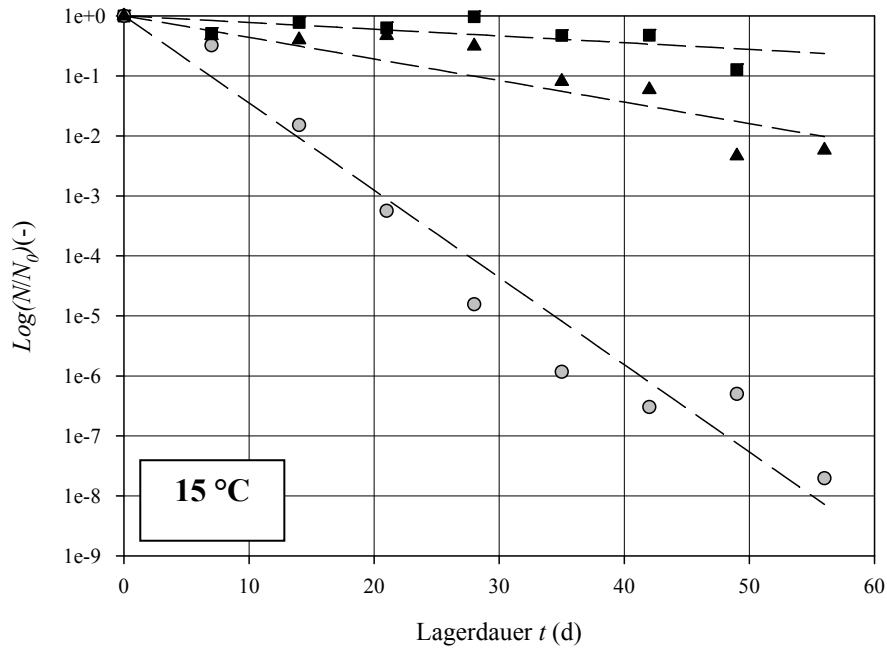


Abbildung 71: Keimzahl  $N/N_0$  während der Lagerung bei einer Lagertemperatur von 15 °C und unterschiedlichen Wasseraktivitäten  $a_w$ : (■) 0,22; (▲) 0,43 und (●) 0,75

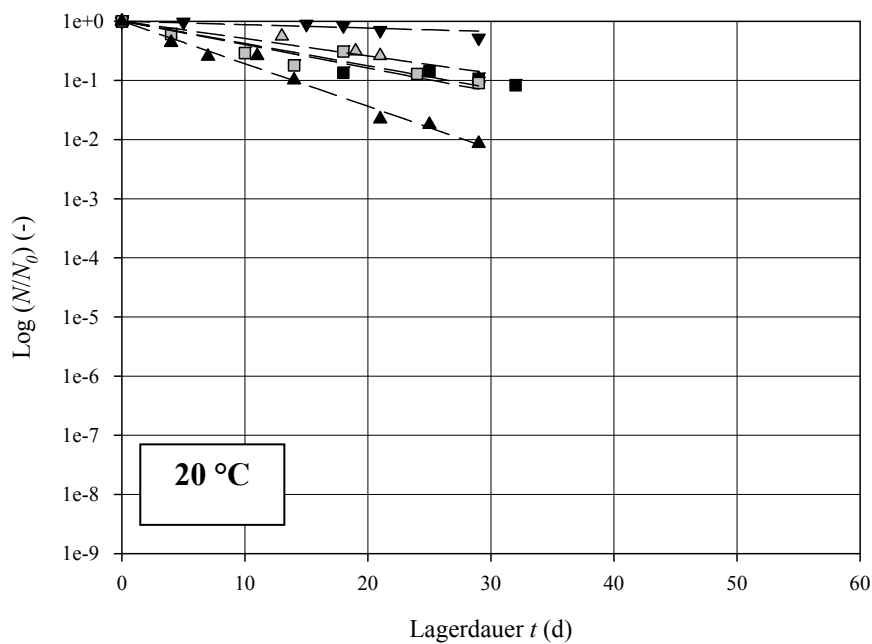


Abbildung 72: Keimzahl  $N/N_0$  während der Lagerung bei einer Lagertemperatur von 20 °C und unterschiedlichen Wasseraktivitäten  $a_w$ : (▼) 0,07; (▲) 0,11; (■) 0,22; (◻) 0,33; (▲) 0,43.

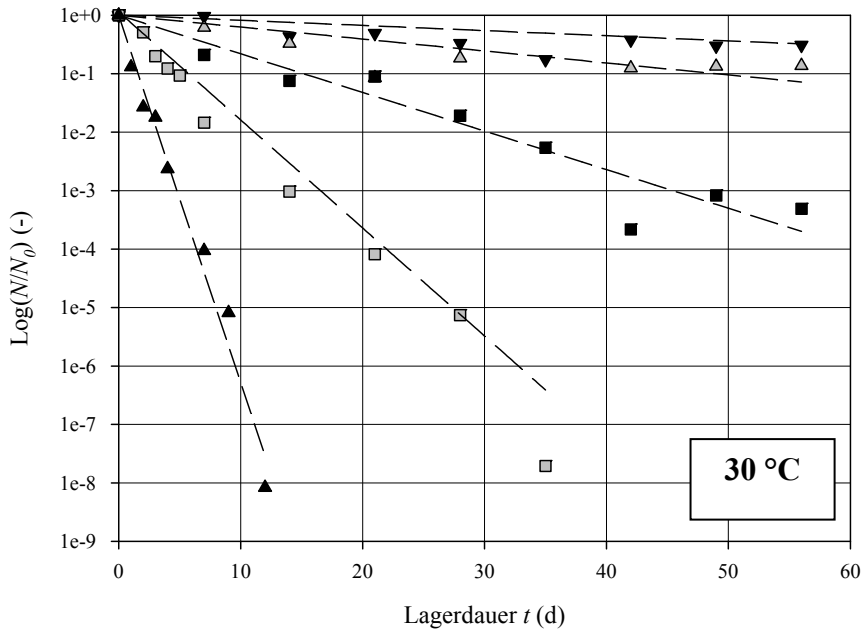


Abbildung 73: Keimzahl  $N/N_0$  während der Lagerung bei einer Lagertemperatur von  $30\text{ °C}$  und unterschiedlichen Wasseraktivitäten  $a_w$ : (▼)  $0,07$ ; (▲)  $0,11$ ; (■)  $0,22$ ; (◻)  $0,33$ ; (▲)  $0,43$ .

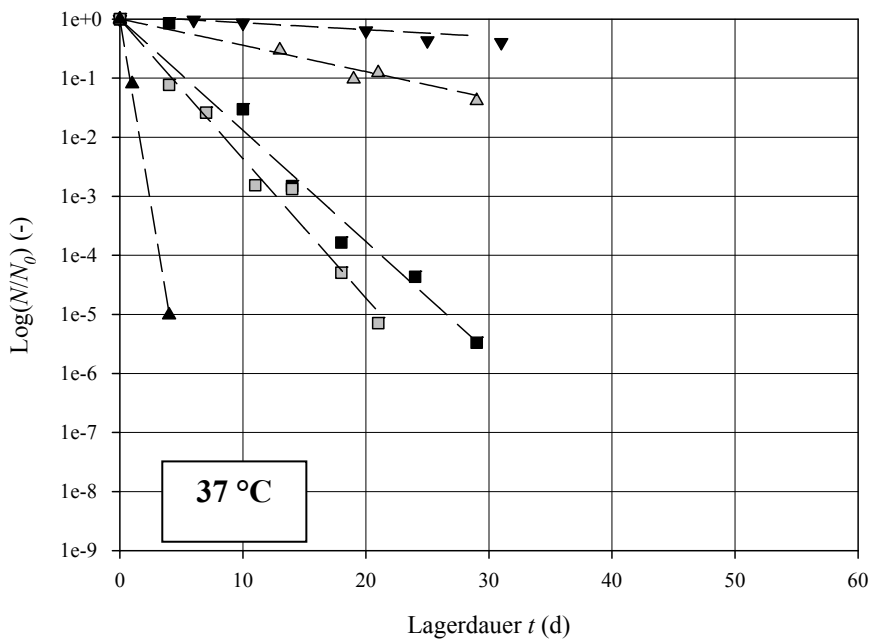


Abbildung 74: Keimzahl  $N/N_0$  während der Lagerung bei einer Lagertemperatur von  $37\text{ °C}$  und unterschiedlichen Wasseraktivitäten  $a_w$ : (▼)  $0,07$ ; (▲)  $0,11$ ; (■)  $0,22$ ; (◻)  $0,33$ ; (▲)  $0,43$ .

Abbildungen 70 – 74 zeigen, dass die Überlebensrate mit zunehmender Wasseraktivität und zunehmender Temperatur schneller abnimmt. Außerdem ist deutlich, dass die Abnahme der Keimzahl mit einer Reaktion 1. Ordnung in guter Näherung beschrieben werden kann.

Im Folgenden wird die Bedeutung der Lagerbedingungen im Bezug zur Glasübergangstemperatur diskutiert.

### 6.3.3 Diskussion der Bedeutung von Lagerbedingungen im Glaszustand und im Nicht-Glaszustand

Es wurde gezeigt, dass die Keimzahl für eine Lagerung bei höherer Temperatur und höherer Wasseraktivität schneller abnimmt. Der kombinierte Effekt von Wasseraktivität und Temperatur steht in Einklang mit Ergebnissen von anderen Autoren und anderen Stämmen (Andersen et al., 1999; Castro et al., 1996; King et al., 1998).

Zum besseren Vergleich und zur Beschreibung der Temperaturabhängigkeit der Inaktivierung wurde entsprechend einer Reaktion 1. Ordnung die Geschwindigkeitskonstante  $k_{T,aw}$  berechnet.

Die berechnete Geschwindigkeitskonstante  $k_{T,aw}$  ist für die unterschiedlichen Temperaturen in Abhängigkeit von der Wasseraktivität der Salzlösung in Abbildung 78 dargestellt. Die Zahlenwerte sind im Anhang in Tabelle 15 dargestellt. Außerdem zeigt Abbildung 78 die Grenzlinie zwischen Glaszustand und Nicht-Glaszustand bei den entsprechenden Produkttemperaturen bzw. die interpolierte Grenzwasseraktivität (vgl. Tabelle 10).

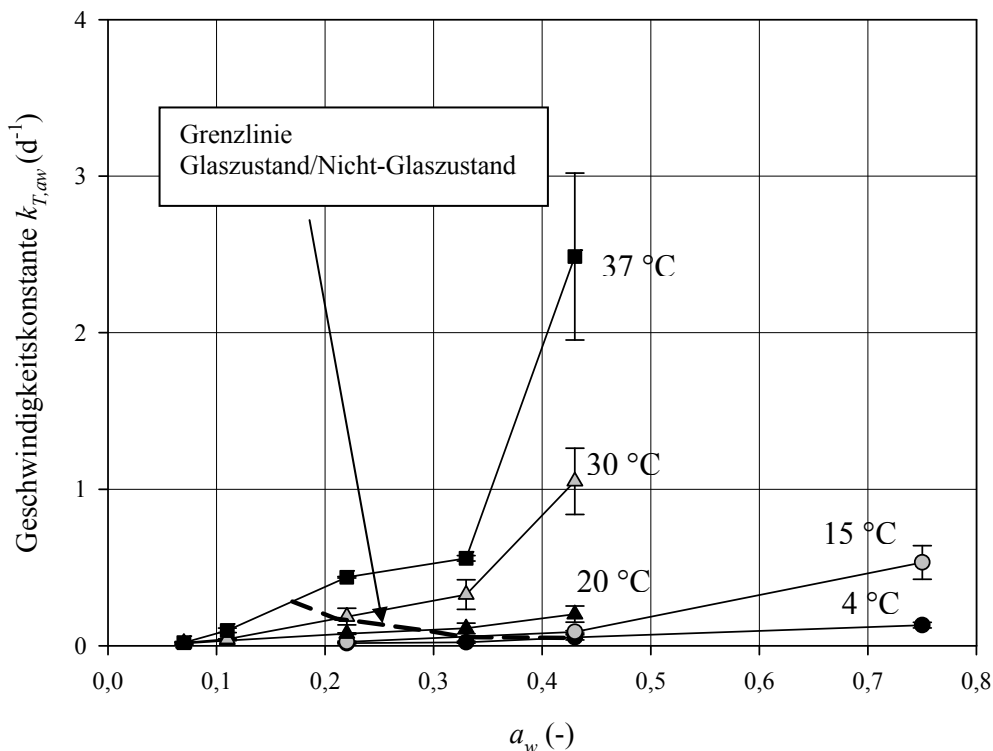
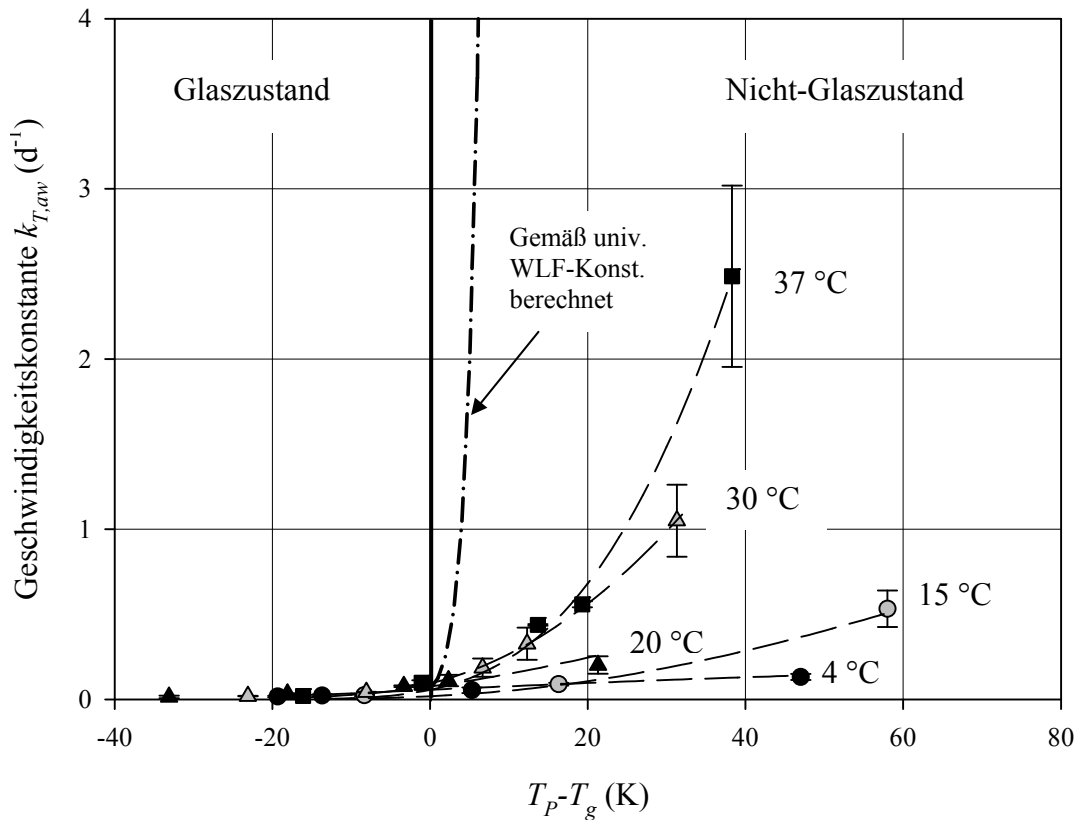


Abbildung 75: Geschwindigkeitskonstante  $k_{T,aw}$  für die Inaktivierung von *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* in einer Laktosematrix in Abhängigkeit von der Wasseraktivität  $a_w$  für unterschiedliche Temperaturen *per se*: (●) 4 °C; (◐) 15 °C; (▲) 20 °C; (◑) 30 °C; (■) 37 °C.

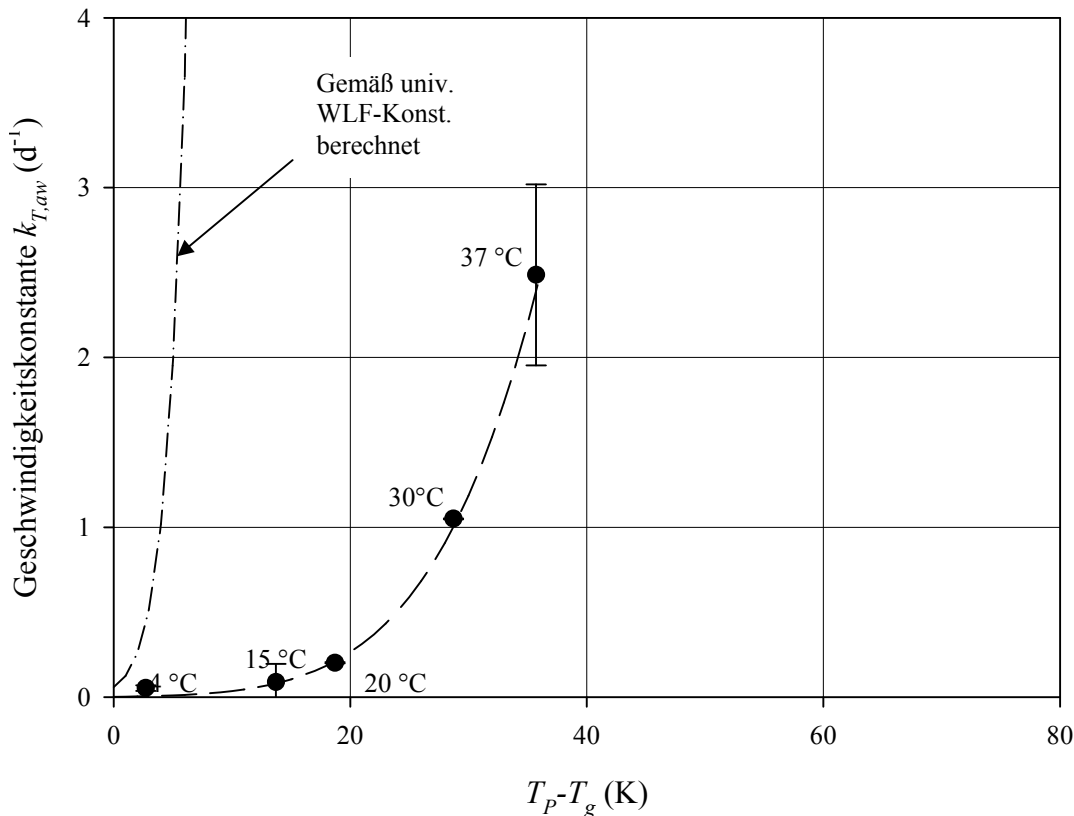
Abbildung 75 zeigt, dass die Geschwindigkeitskonstante  $k_{T,aw}$  für alle Temperaturen in Abhängigkeit von der Wasseraktivität ansteigt. Für Wasseraktivitäten von 0,07 und 0,11 konnten nur geringe Unterschiede zwischen den Geschwindigkeitskonstanten  $k_{T,aw}$  für die unterschiedlichen Temperaturen gefunden werden. Für diese Bedingungen wird das gefriergetrocknete Kulturenpräparat bei allen Temperaturen im Glaszustand gelagert (vgl. Tabelle 10). Für Bedingungen im Glaszustand ist somit nur ein geringer Effekt der Temperatur ersichtlich. Im Gegensatz dazu steigt die Geschwindigkeitskonstante bei einer Lagerung im Nicht-Glaszustand (vgl. Tabelle 10) für die Temperaturen 30 °C ( $a_w > 0,2$ ) und 37 °C ( $a_w > 0,17$ ) stark an. Für die Lagertemperaturen 4 °C, 15 °C und 20 °C ist die Geschwindigkeitskonstante in geringerem Maße von der Wasseraktivität abhängig. Die Feuchtigkeit, die in zunehmendem Maße eine stärkere Inaktivierung bewirkt, besitzt also einen schädigenderen Effekt bei höheren Temperaturen.

Zur Ermittlung, ob die Einflüsse von Wasseraktivität und Temperatur in Einklang mit  $k = f(T_P - T_g)$  stehen, sind die berechneten Geschwindigkeitskonstanten in Abbildung 76 in Abhängigkeit von  $(T_P - T_g)$  dargestellt. Zusätzlich ist auch der mathematische Zusammenhang nach Williams-Landel-Ferry (WLF, Gleichung (6)) für die universellen Konstanten ( $C_1=17,4$  und  $C_2=51,6$  K) dargestellt. Die gezeigten Kurven wurden entsprechend WLF an die ermittelten Werte angepasst. Die berechneten Koeffizienten der WLF-Gleichung sind im weiteren Verlauf in Tabelle 11 dargestellt und werden an späterer Stelle diskutiert.



**Abbildung 76:** Geschwindigkeitskonstante  $k$  für die Inaktivierung von *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* in einer Laktosematrix mit unterschiedlichem  $a_w$  in Abhängigkeit von  $(T_P - T_g)$  für unterschiedliche Temperaturen *per se*. Die an die Messwerte angepassten Kurven entsprechen der WLF mit den Konstanten aus Tabelle 11.

In Abbildung 76 bezieht sich eine Kurve jeweils auf eine konstante Produkttemperatur  $T_P$  *per se*. Je nach Wasseraktivität werden die Zellen dabei im Glas- ( $(T_P - T_g) < 0$ ) oder im Nicht-Glaszustand ( $(T_P - T_g) > 0$ ) gelagert. Die Veränderung von  $T_P - T_g$  erfolgt bei dieser Auftragung durch die Veränderung von  $T_g$ . In Ergänzung dazu sollte auch der Zusammenhang von  $k_{T,a_w}$  und  $T_P - T_g$  für eine konstante Glasübergangstemperatur und unterschiedliche Produkttemperatur *per se* im Nicht-Glaszustand verdeutlicht werden. Deshalb ist in Abbildung 77 der Verlauf für eine konstante Wasseraktivität von 0,43, für die die Präparate bei allen Temperaturen im Nicht-Glaszustand gelagert wurden, dargestellt.



**Abbildung 77:** Geschwindigkeitskonstante  $k_{T,aw}$  in Abhängigkeit von  $T_P - T_g$  für die Inaktivierung von *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* während der Lagerung bei einer Wasseraktivität von 0,43 und unterschiedlichen Temperaturen  $T_P$  (Alle Temperaturen führen zur Lagerung im Nicht-Glaszustand). Die an die Messpunkte angepasste Kurve entspricht der WLF mit den Konstanten in Tabelle 11.

Abbildung 76 zeigt, dass die Geschwindigkeitskonstante  $k_{T,aw}$  für Bedingungen im Glaszustand ( $T_P - T_g < 0$ ) für alle Lagertemperaturen  $T_P$  und Wasseraktivitäten sehr niedrige Werte annimmt. Die Geschwindigkeitskonstante  $k_{T,aw}$  ist für Bedingungen im Glaszustand ( $T_P - T_g < 0$ ) niedriger als für Bedingungen im Nicht-Glaszustand ( $T_P - T_g > 0$ ). Im Glaszustand wird die Reaktion also verlangsamt. Es ist auch deutlich, dass  $k_{T,aw}$  für Lagertemperaturen von 30 °C und 37 °C bei Überschreitung der Glasübergangstemperatur sehr stark mit zunehmender Differenz zur Glasübergangstemperatur  $T_g$  ansteigt. Dieser Anstieg ist für Lagertemperaturen von 4 °C, 15 °C sowie 20 °C vergleichsweise gering ausgeprägt. Die Geschwindigkeitskonstante  $k_{T,aw}$  besitzt für diese Temperaturen eine niedrigere Abhängigkeit von der Differenz zwischen der Produkttemperatur  $T_P$  und der Glasübergangstemperatur  $T_g$ .

Wenn die der Inaktivierung zugrunde liegende Reaktion ausschließlich diffusionslimitiert wäre, könnte die Temperaturabhängigkeit von  $k_{T,aw}$  entsprechend WLF (Gleichung 6) mit  $k_{T,aw} = f(T_P - T_g)$  dargestellt werden (vgl. Kapitel 2.3). Dabei würden die Kurven theoretisch in einer einzigen Masterkurve zusammenfallen. Abbildung 76 zeigt jedoch deutlich, dass dies nicht der Fall ist. Die auf den Glaszustand zurückgeführte Diffusionslimitierung ist somit

nicht der einzige Einfluss auf die Geschwindigkeitskonstante  $k_{T,aw}$ . Obwohl deutlich zu erkennen ist, dass die Geschwindigkeitskonstante  $k_{T,aw}$  unterhalb der Glasübergangstemperatur  $T_g$  für die Temperaturen 30 °C und 37 °C sehr viel niedriger ist als im Nicht-Glaszustand, wird die Inaktivierungsreaktion in der hochviskosen Matrix nicht nur durch die abnehmende Viskosität beschleunigt, sondern auch noch durch andere Faktoren begünstigt. Für die Inaktivierung im Nicht-Glaszustand müssen somit zusätzliche Effekte von Temperatur und Wasseraktivität berücksichtigt werden, was nachfolgend diskutiert wird.

Es ist bekannt, dass die Geschwindigkeitskonstante im Nicht-Glaszustand sehr stark mit zunehmender Differenz zur Glasübergangstemperatur ansteigt. Dieser Anstieg wird durch die universellen Konstanten der WLF-Gleichung von  $C_1 = 17,4$  und  $C_2 = 51,6$  K ausgedrückt. Im Gegensatz dazu ist aus Abbildung 76 ersichtlich, dass durch eine Änderung von  $T_P - T_g$  nur mäßige Änderungen in der Geschwindigkeitskonstante  $k_{T,aw}$  für die Inaktivierung der Mikroorganismen hervorgerufen werden, die viel niedriger sind, als man aus den entsprechenden Viskositätsänderungen vermuten würde. Für die einzelnen Temperaturen wurden zur Beschreibung der Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten  $k_{T,aw}$  von  $T_P - T_g$  für die WLF-Gleichung (6) die in Tabelle 11 aufgelisteten Konstanten ermittelt. Dabei wurde  $C_{2TP}$  zum besseren Vergleich zu den universellen Konstanten konstant bei 50,0 K gehalten und  $C_{1TP}$  wurde angepasst.



**Tabelle 11: Produkttemperatur  $T_p$ , Geschwindigkeitskonstante  $k_{Tg,aw}$  bei  $T_p-T_g=0$  und Konstanten der WLF-Gleichung  $C_{1TP}$  und  $C_{2TP}$  für die einzelnen Produkttemperaturen  $T_p$  für die Inaktivierung von *Lb. paracasei ssp. paracasei* in einer Laktosematrix.**

$T_p$ (°C) bzw. $a_w$ (-) konstant	$k_{Tg,aw}$ (d <sup>-1</sup> ) (bei $T_p-T_g=0$ )	$C_{1TP}$ (-)	$C_{2TP}$ (K)
4	0,056	0,824	50,0
15	0,018	2,7	50,0
20	0,075	1,8	50,0
30	0,093	2,7	50,0
37	0,056	3,8	50,0
0,43	0,002	7,3	50,0

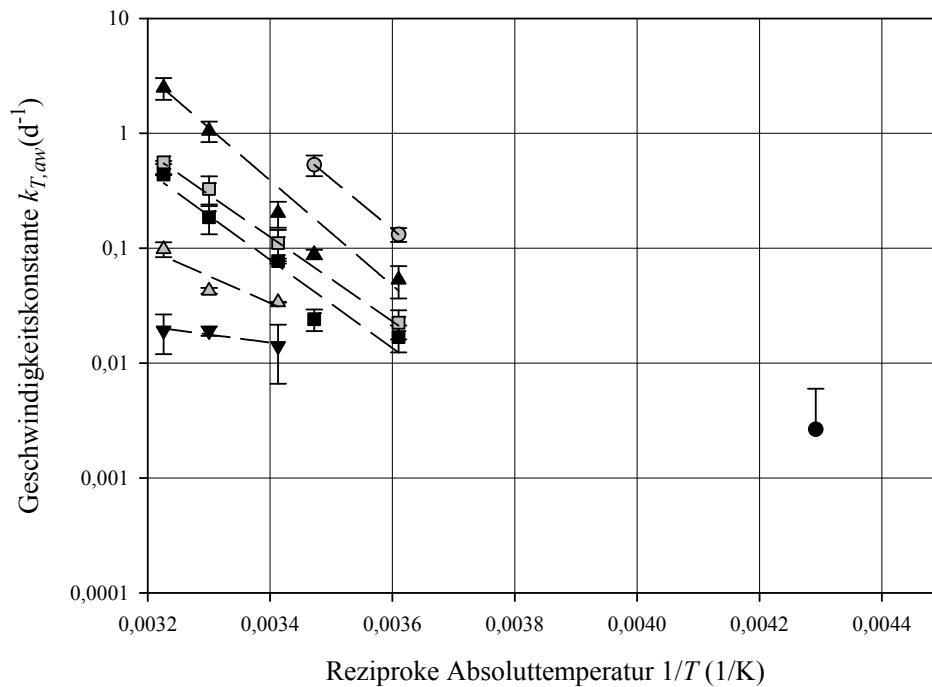
Tabelle 11 zeigt, dass die Konstanten  $C_{1TP}$  wesentlich niedriger liegen als der Wert für die universelle Konstante  $C_1$  (17,6) der WLF-Gleichung.

Die WLF-Koeffizienten wurden auch von Sun (1997) für die Stabilität unterschiedlicher pflanzlicher Samenarten während der Lagerung bei konstantem  $a_w$  und unterschiedlichen Temperaturen ermittelt. Sun (1997) erhielt dabei Werte für  $C_{1Samen}$  von 37,5 – 22,3 und für  $C_{2Samen}$  Werte von 179,2 – 269,8 K. Die von Sun (1997) ermittelten Konstanten waren ebenfalls nicht gleich der universellen Konstanten. Allerdings argumentierte der Autor, dass diese Werte für unterschiedliche Systeme separat ermittelt werden müssen. Vergleicht man jedoch die von Sun (1997) ermittelten Konstanten mit den hier erhaltenen und mit den universellen WLF-Konstanten, so stellt man fest, dass die hier ermittelten trotzdem noch sehr viel niedriger sind als die für bisher bekannte Systeme. Folglich würde man eine Temperaturabhängigkeit der Aktivierungsenergie  $E_a$  im Nicht-Glaszustand und eine viel stärkere Änderung von  $k_{T,aw}$  auf der Grundlage der klassischen Theorie des Glaszustands erwarten. Die experimentellen Ergebnisse stimmen nicht mit der WLF Theorie überein, wenn nur die Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten  $k_{T,aw}$  betrachtet wird. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass diese Theorie für die Viskosität und die Relaxation von Polymersystemen erstellt und erfolgreich angewandt wurde. Reine Polymere bestehen aus sich wiederholenden

Einheiten von gut charakterisierten Molekülen, und die Faktoren, die Stabilität und Reaktivität beeinflussen sind viel weniger komplex für reine Polymere als für biologische Systeme wie Mikroorganismen.

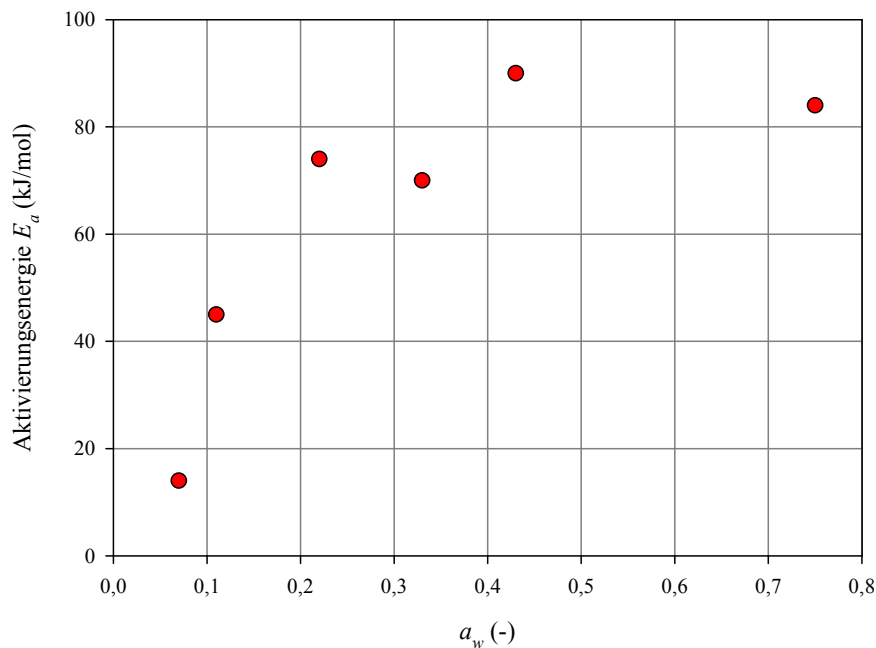
Für das hier untersuchte System wurde eine endliche und von Null verschiedene Geschwindigkeitskonstante  $k_{T,aw}$  der Inaktivierung im Glaszustand gefunden. Auch wenn die Inaktivierung der Mikroorganismen im Glaszustand langsamer verläuft als im Nicht-Glaszustand, wird sie aufgrund der reduzierten molekularen Mobilität nicht komplett unterbunden, wie es zunächst entsprechend der Theorie vermutet wurde. Inaktivierung tritt im Glaszustand auf und die Geschwindigkeitskonstante  $k_{T,aw}$  hängt von der Wasseraktivität ab. Mit anderen Worten kann gesagt werden, dass die Glasübergangstemperatur nicht der absolute Grenzwert für die Stabilität der gefriergetrockneten Bakterien darstellt. Im Hinblick auf die geringe Zunahme der Geschwindigkeitskonstanten  $k_{T,aw}$  für das hier untersuchte System liegt die Vermutung nahe, dass die Inaktivierung mit einer konstanten Aktivierungsenergie  $E_a$  über den kompletten Temperaturbereich nach Arrhenius beschrieben werden kann. Wie bereits in Kapitel 2.3 erläutert, kann die Geschwindigkeitskonstante  $k_{T,aw}$  von Reaktionen, in einem sogenannten stabilen System (vgl. Kapitel 2.3) mit Hilfe der Arrheniusgleichung (Gleichung 5) als  $k = f(1/T)$  beschrieben werden. Dieser Zusammenhang wurde auch für das hier vorliegende getrocknete System untersucht.

Die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten  $k_{T,aw}$  der Zelinaktivierung bei Lagertemperaturen von 4 °C, 15 °C, 20 °C, 30 °C sowie 37 °C sind in Abbildung 78 für die unterschiedlichen Wasseraktivitäten als Funktion von reziproker Absoluttemperatur dargestellt. Des Weiteren ist in dem integrierten Diagramm auch die Geschwindigkeitskonstante  $k_{T,aw}$  bei einer Lagerung der getrockneten Zellen bei -40 °C als Referenz dargestellt.



**Abbildung 78:** Geschwindigkeitskonstante  $k_{T,aw}$  für die Inaktivierung von *Lb. paracasei ssp. paracasei* (PBS+Laktose 0,25 g/gZelltrockenmasse) in Abhängigkeit von der reziproken Absolute Temperatur  $1/T$  für unterschiedliche Wasseraktivitäten  $a_w$ : (▼) 0,07 (▲) 0,11; (■) 0,22, (▣) 0,33, (▲) 0,43; (●) 0,75. Außerdem ist die Inaktivierungsgeschwindigkeit bei einer Lagertemperatur von  $-40\text{ °C}$  dargestellt (●).

Abbildung 78 zeigt, dass die Geschwindigkeitskonstante  $k_{T,aw}$  eine logarithmische Abhängigkeit von der reziproken Temperatur aufweist und mit zunehmender Temperatur ansteigt. Außerdem ist deutlich, dass die Steigung von  $k_{T,aw}(1/T)$  mit zunehmender Wasseraktivität steigt. Die Steigung ist ein Maß für die Aktivierungsenergie  $E_a$  der Inaktivierung. Die Aktivierungsenergie  $E_a$  sowie  $k_0$  (für  $(1/T) \rightarrow 0$ ) wurden nach Arrhenius entsprechend Gleichung (5) für die unterschiedlichen Wasseraktivitäten berechnet (vgl. Abbildung 79 sowie Zahlenwerte Tabelle 17 im Anhang).



**Abbildung 79:** Aktivierungsenergie  $E_a$  für die Inaktivierungsreaktion von *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* während der Lagerung in Abhängigkeit von der Wasseraktivität  $a_w$ .

Es ist deutlich, dass die Aktivierungsenergie bei einer Wasseraktivität von 0,07 einen Wert aufweist, der typisch für diffusionslimitierte Reaktionen ist, nämlich 14 kJ/mol. Bei einer Wasseraktivität von 0,11 beträgt die Aktivierungsenergie 45 kJ/mol. Dieser Wert befindet sich an der Grenze zwischen diffusionslimitierten Reaktionen und chemischen Reaktionen (vgl. Tabelle 18 im Anhang). Für die Wasseraktivitäten 0,11 und 0,07 befindet sich das System bei den untersuchten Temperaturen im Glaszustand, in dem theoretisch eine Diffusionslimitierung der Reaktion vorliegt.

Für Wasseraktivitäten von 0,22 und 0,33 ergeben sich Aktivierungsenergien von 70 – 75 kJ/mol. Für Wasseraktivitäten von 0,43 und 0,75 steigt die Aktivierungsenergie nur noch geringfügig an und erreicht Werte von 85 – 90 kJ/mol. Aufgrund der strukturellen Relaxationen im übersättigten Nicht-Glaszustand würde man nahe der Glasübergangstemperatur für diffusionslimitierte Reaktionen jedoch höhere Werte von 200 – 400 kJ/mol, vermuten. Allerdings gelten diese Werte nur für fragile Systeme. Für eine stabile Matrix steigt die Aktivierungsenergie schwächer an (Angell et al., 1994).

Bei näherer tiefgehender Betrachtung der Messwerte zeigt sich, dass für das hier verwendete getrocknete System die Aktivierungsenergie im Nicht-Glaszustand nicht temperaturabhängig ist. Bei einer Wasseraktivität von 0,22 befindet sich das System bei den Lagertemperaturen von 30 °C und 37 °C im Nicht-Glaszustand, bei den Temperaturen darunter im Glaszustand.

Man würde also vermuten, dass an dieser Stelle eine Änderung der Aktivierungsenergie der Reaktion zu verzeichnen ist. Bei einer Wasseraktivität von 0,22 sollte der Anstieg zwischen 30 °C und 20 °C erfolgen und bei 0,33 zwischen 20 °C und 15 °C. Stattdessen bleibt die Steigung bzw. die Aktivierungsenergie  $E_a$  über den gesamten Temperaturbereich konstant.

Daher stellt sich die Frage, welche Reaktionen im Nicht-Glaszustand ablaufen und welche Reaktionen im Glaszustand bzw. bei niedrigen Wasseraktivitäten limitiert werden. Die hier ermittelten Aktivierungsenergien bei Wasseraktivitätswerten ab 0,22 bis 0,75 von 74-90 kJ/mol sind vergleichbar mit den Werten für die Lipidoxidation (50 – 150 kJ/mol) Kessler (1996). Die Lagerung wurde unter Sauerstoffatmosphäre durchgeführt, weshalb für die bei den Wasseraktivitäten von 0,22 bis 0,75 auftretende Inaktivierungsreaktion „Oxidation von Membranlipiden“ verantwortlich gemacht werden können.

Für die Bedingungen im Glaszustand ist eine verringerte Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante zu verzeichnen, es wurden Aktivierungsenergien von 14 und 45 kJ/mol ermittelt. Dies kann auf eine Diffusionslimitierung der Reaktanden aufgrund der hohen Viskosität zurückgeführt werden. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Reaktion unterhalb der Glasübergangstemperatur nicht durch die hohe Viskosität limitiert ist, sondern aufgrund der chemisch limitierten Verfügbarkeit von Wasser. Im Rahmen weiterer Untersuchungen sollte eine erhöhte Wasserverfügbarkeit bei gleichzeitiger Limitierung durch die hohe Viskosität im Glaszustand untersucht werden. Dazu müsste ein Polymer mit einer höheren Glasübergangstemperatur verwendet werden, bei dem sich das Produkt auch bei stärkerer Hydrierung noch im diffusionslimitierenden Glaszustand befindet.

Bei der Inaktivierung von Mikroorganismen muss berücksichtigt werden, dass diese heterogenen Systemen aus multiplen Phasen bestehen und somit die Koexistenz von vielen unterschiedlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften möglich ist. Somit können unterschiedliche Inaktivierungsmechanismen mit unterschiedlichen Geschwindigkeitskonstanten zu einer Inaktivierung der Zellen führen. Es muss berücksichtigt werden, dass in dem getrockneten Präparat möglicherweise Bereiche vorliegen, die sich nicht im Glaszustand befinden, aber auch Bereiche, die durch einen Zucker im Glaszustand kinetisch stabilisiert werden. Aufgrund der Komplexität der Inaktivierungsreaktionen ist keine sprunghafte bzw. „scharfe“ Änderung von  $k_{T,aw}$  bzw. eine starke Temperaturabhängigkeit von  $E_a$  zu erkennen. Stattdessen sind mehrere verschiedene Mechanismen für die Zellinaktivierung verantwortlich. Ein Mechanismus dominiert bei niedrigen Wasseraktivitäten. Dieser Mechanismus ist scheinbar weniger temperaturabhängig, und ein anderer dominiert bei höheren Wasseraktivitäten.

### 6.3.4 Lagerung der Zellen in einer Trehalosematrix

Zusätzlich zur Untersuchung der Lagerstabilität in einer Laktosematrix wurde die Lagerstabilität in einer Trehalosematrix untersucht. Der Trehalose wird ein ausgezeichneter Schutzeffekt zugeschrieben. Allerdings besitzt der Zucker die gleichen Glasbildungseigenschaften wie Laktose. Es sollte ermittelt werden, ob Trehalose trotzdem eine chemisch begründete höhere Lagerstabilität bewirkt. Für die Untersuchungen der Lagerstabilität in einer Trehalosematrix wurden ausgewählte Lagerbedingungen untersucht und dabei mit der Laktosematrix verglichen.

Abbildungen 80 - 82 zeigen die ermittelten  $k_{T,aw}$ -Werte für die Lagerung von *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* mit Trehalose im direkten Vergleich mit den bereits dargestellten Messwerten für Laktose.

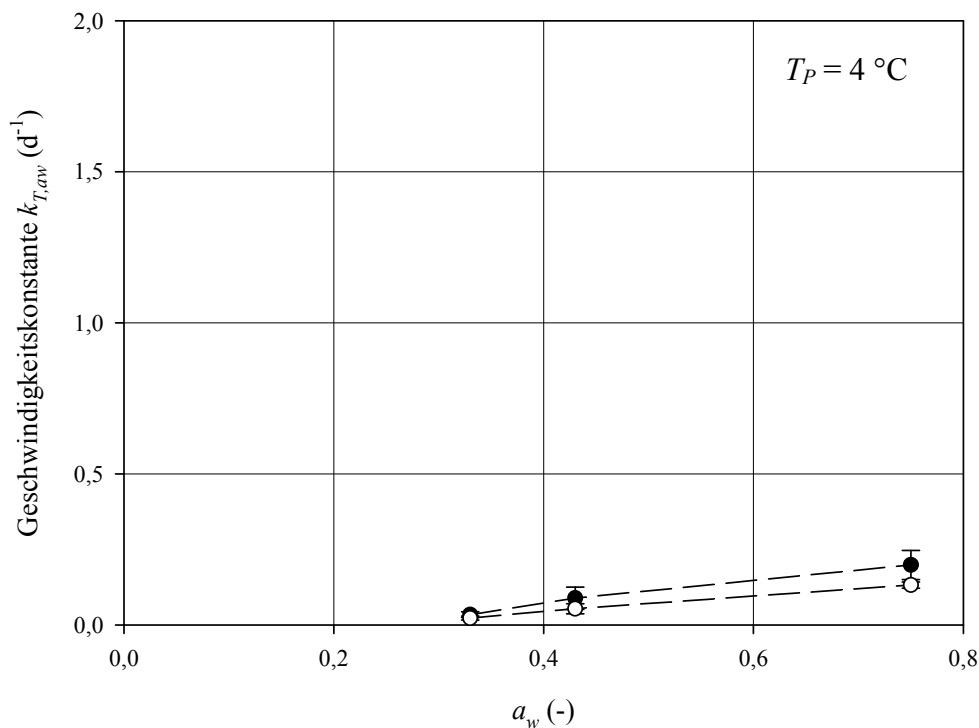


Abbildung 80: Geschwindigkeitskonstante  $k_{T,aw}$  für die Inaktivierung von *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* in einer Laktosematrix (0,25 g/g<sub>Zelltrockenmasse</sub>) (○) und in einer Trehalosematrix (0,25 g/g<sub>Zelltrockenmasse</sub>) (●) für eine Lagertemperatur  $T_p$  von 4 °C.

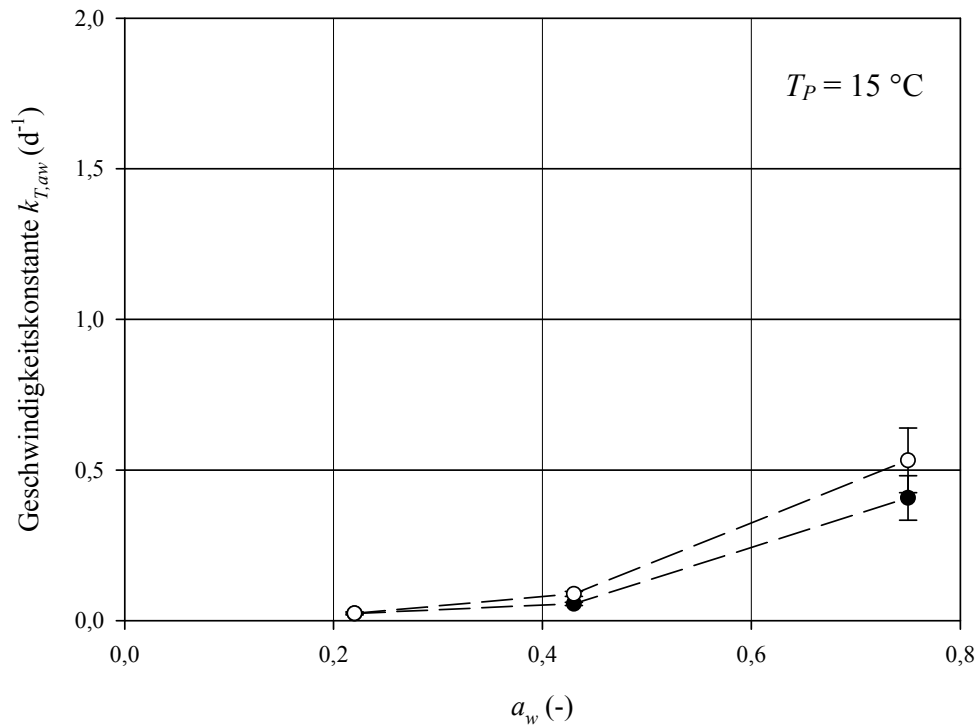


Abbildung 81: Geschwindigkeitskonstante  $k_{T,aw}$  für die Inaktivierung von *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* in einer Laktosematrix (0,25 g/g<sub>Zelltrocknenmasse</sub>) (○) und in einer Trehalosematrix (0,25 g/g<sub>Zelltrocknenmasse</sub>) (●) für eine Lagertemperatur  $T_P$  von 15 °C.

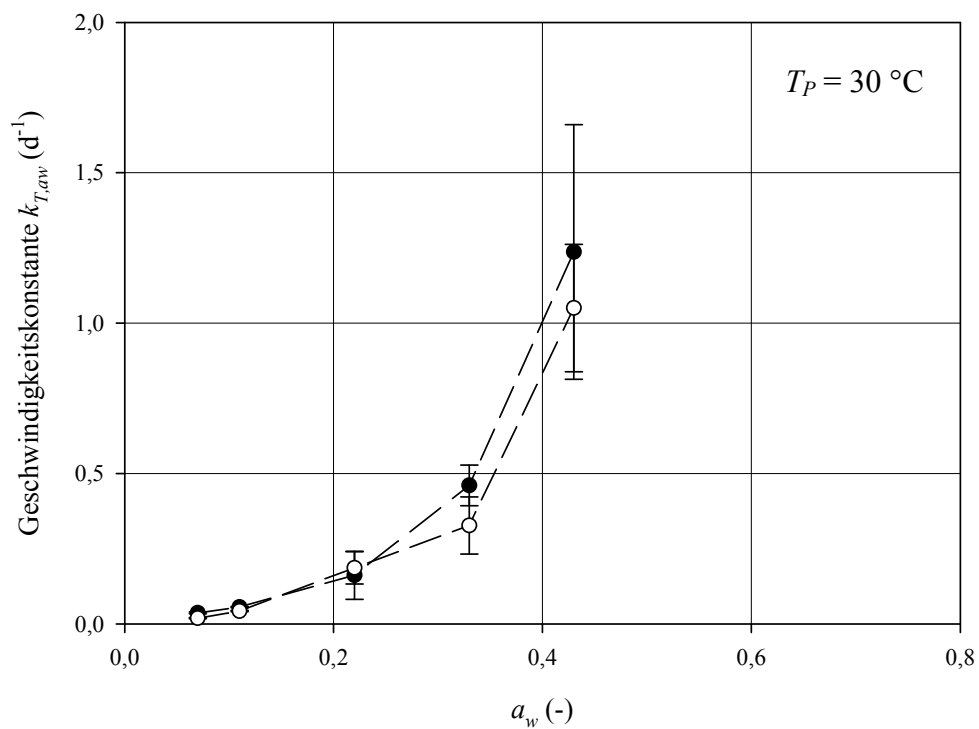


Abbildung 82: Geschwindigkeitskonstante  $k_{T,aw}$  für die Inaktivierung von *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* in einer Laktosematrix (0,25 g/g<sub>Zelltrocknenmasse</sub>) (○) und in einer Trehalosematrix (0,25 g/g<sub>Zelltrocknenmasse</sub>) (●) für eine Lagertemperatur  $T_P$  von 30 °C.

Aus Abbildung 80 - Abbildung 82 wird deutlich, dass die  $k$ -Werte für die Inaktivierung in einer Trehalosematrix vergleichbar sind mit den  $k_{T,aw}$ -Werten in einer Laktosematrix. Trehalose erhöht die Stabilität während der Lagerung wie auch während der Gefriertrocknung (vgl Kapitel 6.2.7) also nicht. Die erhöhte Stabilisierungswirkung der Trehalose wird auf ihre Fähigkeit zurückgeführt,

#### *Diskussion*

Werden die Mikroorganismen in einer Trehalosematrix gelagert, so ergibt sich die gleiche Inaktivierungsgeschwindigkeit wie in einer Laktosematrix. Bei einer Lagerung im Glaszustand ist die Inaktivierung in einer Trehalosematrix ebenso verzögert im Vergleich zum Nicht-Glaszustand. Für den hier untersuchten Stamm kann festgestellt werden, dass Zucker mit gleichen Glasbildungseigenschaften eine vergleichbare Lagerstabilität der Mikroorganismen bewirken. Aus dem Vergleich der Ergebnisse der Inaktivierungsgeschwindigkeit in einer Laktosematrix mit der in einer Trehalosematrix kann gefolgert werden, dass es ein universeller Stabilisierungsmechanismus, wie beispielsweise der Glaszustand, ist, der von den Zuckern ausgeübt wird und nicht auf die chemischen Eigenschaften der Zucker zurückzuführen ist.



## 7 SCHLUSSFOLGERUNG

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Inaktivierung von *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* während des Gefrierens, der Lyophilisation und während der Lagerung untersucht. Dabei sollte ermittelt werden, welche Rolle die verfahrenstechnischen Bedingungen und der Zusatz von Schutzstoffen spielen, um den Verlust lebensfähiger Zellen während dieser Prozesse so gering wie möglich zu halten. Ferner sollten der Prozessabschnitt und die Prozessbedingungen ermittelt werden, für die die Überlebensrate am stärksten abnimmt und unter welchen Bedingungen der Zusatz von Schutzstoffen notwendig ist. Als Schutzstoffe wurden im Rahmen dieser Arbeit Disaccharide (Laktose und Trehalose) sowie ein laktoseenthaltendes Magermilchpulver verwendet. Dabei sollte zum Einen die Schutzwirkung generell im Vergleich zur Trocknung ohne Schutzstoffe ermittelt werden. Des Weiteren sollte mit Hilfe der Laktose beispielhaft der Glaszustand als Schutzmechanismus, der für isolierte Systeme, wie Proteine und Liposomen teilweise erforscht ist, während der Trocknung und Lagerung auf seine Bedeutung für die Stabilität von getrockneten Mikroorganismen überprüft werden. Die Schlussfolgerungen der Ergebnisse werden im Folgenden dargestellt.

### *Bedeutung der Verfahrenstechnik während des Gefrierens und der Gefriertrocknung mit und ohne Schutzstoffe*

Generell wird die Vermehrungsfähigkeit von *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* durch das Gefrieren an sich verhältnismäßig wenig beeinträchtigt, wenn die Zellen unmittelbar nach dem Gefrieren wieder aufgetaut werden. Der Gefrierprozess ist also nicht der schädlichste Prozessabschnitt bei der Gefriertrocknung. Dennoch wirkt sich die niedrige Temperatur im Verlauf der Gefriertrocknung negativ auf die Stabilität der Zellen aus. Vor allem wenn die Zellen ohne Schutzstoffe gefroren und getrocknet werden, erfolgt eine schnellere und stärkere Inaktivierung bei niedrigeren Temperaturen.

Während des Gefrierens hat sich herausgestellt, dass die Kühlrate, unabhängig davon, ob diese sehr niedrig oder sehr hoch gewählt wird, keinen Einfluss auf die Überlebensrate nach dem Gefrieren besitzt. Dies konnte sowohl für Zellsuspensionen mit als auch ohne Schutzstoffe ermittelt werden. Dabei kann das von Mazur (1984) erstellte und von Gehrke (1991) erweiterte Modell, das den Einfluss der Kühlrate in den Unterschieden im intrazellulären Wassergehalt begründet, mit dem hier verwendeten System zusätzlich bestätigt werden. Gram positive Mikroorganismen sind unempfindlicher gegenüber Unterschieden in der Kühlrate, weil das intrazellulär vorliegende Wasser am Austritt aus der Zelle aufgrund des mehrschichtigen Membrannetzwerkes gehindert wird. Somit weisen die Zellen bei unterschiedlichen Kühlraten nur

geringe Unterschiede im intrazellulären Wassergehalt und folglich auch bei der Überlebensrate auf.

Während die Kühlrate keinen Einfluss auf die Überlebensrate besitzt, erweist sich der verwendete Mikroorganismus als verhältnismäßig empfindlich im Hinblick auf eine Verringerung der Temperatur, wenn keine Schutzstoffe vorhanden sind. Die Inaktivierung während des Verweilens in einer gefrierkonzentrierten Matrix bei niedriger Temperatur kann in einer Zellsuspension mit Phosphatpuffer und ohne Schutzstoffe durch einen pH Shift, eine erhöhte Salzkonzentration und/oder durch abgeschwächte Abstoßungskräfte hydrophober Gruppen von Proteinen aufgrund abgeschwächter Wasserstoffbrückenbindung verursacht werden. Durch diese Vorgänge werden die Zellen im Hinblick auf die Lyophilisation vorgeschädigt. Aufgrund dessen wirkt sich die Dehydrierung noch negativer aus als ohne diese Vorschädigung, weshalb bei einer Trocknung bei niedrigerer Temperatur die Überlebensrate auf einem niedrigeren Niveau verläuft und auch am Ende niedrigere Werte annimmt.

Durch den Zusatz von Schutzstoffen kann die Überlebensrate nach dem Gefrieren für alle Bedingungen gesteigert werden. Ferner kann auch die Vorschädigung durch die niedrigen Temperaturen, was zu einer verringerten Dehydrierungstoleranz der Zellen ohne Schutzstoffe führt, herabgesetzt werden. Dadurch wird am Ende der Trocknung mit sehr niedrigen Produkttemperaturen bei Anwesenheit von Schutzstoffen eine höhere Überlebensrate erreicht, als ohne Schutzstoffe. In der Arbeit hat sich gezeigt, dass Laktose und Magermilch als Cryoprotektoren fungieren. Der Schutzeffekt ist sowohl in einer Absenkung der Gefriertemperatur begründet als auch in der Eigenschaft von Disacchariden, in einer wässrigen Lösung mit Biomolekülen eine bevorzugte Anlagerung von Wassermolekülen an der Grenzfläche zwischen Biomolekül und umgebender Schutzstofflösung (preferential hydration) zu bewirken. Dadurch werden die Zellkomponenten stabilisiert. Die Schutzstoffe sind während der Gefrier-trocknung also dafür notwendig, um die Vorschädigung der Zellen aufgrund des Verweilens in einer gefrierkonzentrierten Matrix bei niedrigen Temperaturen zu verhindern, damit die Zellen auf diese Weise trocknungsresistenter werden.

Neben der Tatsache, dass durch den Zusatz von Schutzstoffen die Überlebensrate nach dem Gefrieren und auch nach der Trocknung bei niedrigen Temperaturen erhöht wird, führt deren Zusatz auch dazu, dass der Einfluss unterschiedlicher Prozessbedingungen für beide Prozesse reduziert wird. Der Zusatz von Schutzstoffen ist folglich bei ungünstigen Prozessbedingungen erforderlich.

Ferner hat sich gezeigt, dass es durch eine Trocknung bei hohen Produkttemperaturen sogar ohne Schutzstoffe möglich ist, gleiche Überlebensraten zu erreichen wie bei einer Trocknung

mit Schutzstoffen. Die optimale Prozessführung bei der Gefriertrocknung ohne Schutzstoff ist folglich eine „schnelle“ Trocknung mit hohen Sublimationsraten und hohen Produkttemperaturen. Hohe Trocknungsraten werden durch große Differenzen zwischen Stellflächen- und Produkttemperatur sowie höheren Kammerdrücken erreicht. Durch schnellen Wasserentzug wird die Überlebensrate weniger beeinträchtigt, da die schädigenden Produkteinflüsse kürzer einwirken. Zudem ist eine Zeit- und Kostenersparnis bei Trocknungen mit hohen Temperaturen und hohen Sublimationsraten möglich. „Schnelle“ Trocknungen sind deshalb als wirtschaftlicher einzuschätzen.

Im Hinblick auf den Verlauf der Überlebensrate der Zellen in Abhängigkeit vom Restwassergehalt konnte ermittelt werden, dass diese in unterschiedlichen Abschnitten der Trocknung unterschiedlich stark abnimmt. Es existiert für alle Prozessbedingungen und alle Formulierungen ein kritischer Restwassergehalt, ab dem die Überlebensrate mit zunehmendem Wasserentzug stark abnimmt. Dieser kritische Restwassergehalt liegt im Bereich von 15 - 20 %. Die starke Inaktivierung wird auch durch den Zusatz von Schutzstoffen (Laktose, Trehalose, Magermilch) nicht mehr verhindert. Ab diesem Restwassergehalt findet vermutlich die Entfernung des Strukturwassers der Biomoleküle statt. Die verwendeten Schutzstoffe können bei der Gefriertrocknung dieses Wasser nicht ersetzen und als Folge tritt eine irreversible, starke Schädigung der Zellkomponenten auf. Aus diesem Grund sollte im Hinblick auf die Überlebensrate unabhängig von Prozessparametern oder Schutzstoffzugabe nur soweit getrocknet werden, wie es für den Stabilitätserhalt des Produkts während der Lagerung unbedingt nötig ist.

#### *Bedeutung des Glaszustands während der Gefriertrocknung und Lagerung für die Stabilität der Mikroorganismen*

Bei getrockneten Zellen ohne Schutzstoff ist kein Glasübergang messbar. Die Komponenten der Mikroorganismen selbst gehen also während der Dehydrierung nicht in den Glaszustand über.

Für Mikroorganismen in einer Laktosematrix konnte ein Phasen-Zustandsdiagramm erstellt werden und anhand dieses Diagramms Prozessbedingungen ausgewählt werden, die zur Trocknung im Glaszustand und im Nicht-Glaszustand führten. Das erstellte Zustandsdiagramm kann mit Hilfe der Gordon-Taylor Gleichung mathematisch beschrieben werden und unterscheidet sich nicht vom Zustandsdiagramm von Laktose in wässriger Lösung. Die Mikroorganismen beeinflussen den Zusammenhang zwischen der Glasübergangstemperatur und dem Restwassergehalt folglich nicht.

Die Hypothese, dass die Überlebensrate während der Trocknung bei Prozessbedingungen, die zum Glaszustand der extrazellulären Matrix führen, am Ende der Trocknung höher ist, konnte nicht bestätigt werden. Es hat sich gezeigt, dass die Überlebensrate für alle Prozessbedingungen die gleiche Abhängigkeit vom Restwassergehalt besitzt. Der Glaszustand ist also nicht der Schutzmechanismus, der von der Laktose während der Trocknung ausgeübt wird. Das bedeutet, dass die Trocknung auch bei höheren Temperaturen durchgeführt werden kann, und die Glasübergangstemperatur nicht den absoluten Grenzwert darstellt. Hier ergibt sich ein großes Potential für alternative Trocknungsverfahren zur Gefriertrocknung, bei denen das Präparat nicht erst einem energie-, zeit- und kostenintensiven Gefrierprozess unterzogen werden muss, damit die Trocknung mit einer möglichst geringen Temperaturdifferenz zwischen Glasübergangstemperatur und Produkttemperatur durchgeführt wird.

Zwischen Glasübergangstemperatur und der Wasseraktivität für gefriergetrocknete Präparate aus *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* konnte ein linearer Zusammenhang ermittelt werden. Der ermittelte Zusammenhang war von der Lagertemperatur unabhängig.

Die Abnahme der Überlebensrate während der Lagerung kann in guter Näherung mit einer Reaktion 1. Ordnung sowohl im Glaszustand als auch im Nicht-Glaszustand beschrieben werden. Die Abnahme der Überlebensrate erfolgt schneller bei höheren Temperaturen und höheren Restwassergehalten. Bei Lagerbedingungen im Glaszustand ist die Geschwindigkeitskonstante  $k_{T,aw}$  für alle untersuchten Lagerbedingungen am niedrigsten. Somit wird die Schädigungsreaktion im Glaszustand limitiert. Im Gegensatz zur Vorhersage auf Basis der klassischen Glastheorie ist  $k_{T,aw}$  im Nicht-Glaszustand jedoch nicht nur von der Temperaturdifferenz  $T_P - T_g$ , wie durch die WLF Gleichung postuliert wird, abhängig. Stattdessen ist eine deutliche Abhängigkeit von  $k_{T,aw}$  von der Temperatur *per se* als auch von der Wasseraktivität zu finden. Es ist keine sprunghafte Zunahme von  $k_{T,aw}$  bei Überschreitung der Glasübergangstemperatur im Nicht-Glaszustand und keine Temperaturabhängigkeit der Aktivierungsenergie deutlich. Diese Tatsache ist entweder darin begründet, dass die Mikroorganismen in einer stabilen Matrix vorliegen, die auch im Nicht-Glaszustand eine Temperaturabhängigkeit der Viskosität entsprechend Arrhenius aufweist. Oder das Ausbleiben einer sprunghaften Änderung bei  $T_g$  ist in der Komplexität der Inaktivierungsreaktionen von Mikroorganismen begründet, die in dem untersuchten Temperaturbereich sehr wahrscheinlich unterschiedliche Geschwindigkeitskonstanten und unterschiedliche Sensitivitäten für die Änderung der viskositätsbedingten Diffusionslimitierung aufweisen.

Die Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante  $k_{T,aw}$  kann im Nicht-Glaszustand sowohl mit dem Ansatz von Williams-Landel-Ferry als auch mit dem Arrhenius-Ansatz beschrieben werden. Allerdings liefert die WLF-Gleichung verhältnismäßig niedrige Konstanten. Theoretisch müsste die Geschwindigkeitskonstante  $k_{T,aw}$  mit zunehmender Temperatur viel stärker ansteigen, wenn die klassische Glastheorie zugrunde gelegt wird.

Generell kann ausgesagt werden, dass eine Lagerung im Glaszustand angestrebt werden soll, da hier die niedrigsten Inaktivierungsgeschwindigkeiten vorliegen. Bei einer Lagerung im Nicht-Glaszustand muss eine niedrige Lagertemperatur angestrebt werden, da in diesem Bereich eine stärkere Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten vorliegt.

Bezieht man diese Ergebnisse auf die Ergebnisse der Trocknung, so wird auch verständlich, warum bei der Gefriertrocknung bei niedrigen Temperaturen und relativ kurzen Verweilzeiten kein schädlicher Einfluss des Nicht-Glaszustands ermittelt werden konnte. Die Koeffizienten der WLF Gleichung sind relativ niedrig und beschreiben eine geringe Temperaturabhängigkeit von  $k_{T,aw}$  im Nicht-Glaszustand. Folglich ist es nicht möglich, innerhalb der kurzen Trocknungszeit einen Einfluss von Glas- und Nicht-Glaszustand während der Trocknung zu detektieren. Außerdem wird die Haupttrocknung bei niedrigen Temperaturen durchgeführt und aufgrund des Temperatureinflusses *per se* im Nicht-Glaszustand, der bei niedrigen Temperaturen auch zu einer niedrigen Geschwindigkeitskonstanten  $k_{T,aw}$  führt, konnte kein Effekt des Glas-bzw. Nicht-Glaszustands detektiert werden.

## 8 ZUSAMMENFASSUNG

Zur Minimierung destabilisierender Einflüsse auf Mikroorganismen während der Trocknung und Lagerung werden vor der Trocknung Schutzstoffe wie z.B. Disaccharide zum Trocknungsmedium gegeben. Bisherige Ergebnisse zeigen zwar eine höhere Aktivität der Zellen nach der Trocknung und Lagerung bei Anwesenheit von Schutzstoffen. Es ist jedoch nicht möglich, die experimentell ermittelten Ergebnisse zu generalisieren. Es fehlt das Verständnis über die grundlegenden Schutzmechanismen für diese komplexen Systeme und über das Zusammenspiel zwischen verfahrenstechnischen Parametern, dem Potential von Schutzstoffen und der Inaktivierung der Mikroorganismen. Ferner liegen keine Informationen vor, in welchem Abschnitt der Gefriertrocknung und Lagerung der größte Vitalitätsverlust der Zellen stattfindet. Die Kenntnis über diese Zusammenhänge ist für eine zielgerichtete Verfahrensführung der Trocknung und Lagerung allerdings erforderlich.

Ein theoretisch vorgeschlagener, jedoch für Mikroorganismen bisher nicht erforschter Schutzmechanismus von Zuckern ist die Ausbildung einer Glasmatrix. Dabei liegt die Hypothese zugrunde, dass in einem amorphen, übersättigten System diffusionslimitierte destabilisierende Reaktionen mit den strukturellen Relaxationsprozessen der Matrix gekoppelt sind. Demnach werden sie in einer Glasmatrix aufgrund der extrem hohen Viskosität sehr stark verzögert, dagegen im Nicht-Glaszustand mit zunehmender Temperatur sehr stark beschleunigt. Die Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten im Nicht-Glaszustand wird dabei nicht nach Arrhenius, sondern nach einem von Williams et al. (1958) empirisch ermittelten mathematischen Modell (WLF) beschrieben. Ob diese Hypothese des Glaszustands als Stabilisierungskriterium auch für die Inaktivierung von Mikroorganismen gilt, ist bisher nicht bekannt. Jedoch würde unter dieser Annahme den verfahrenstechnischen Parametern während der Trocknung und Lagerung eine entscheidende Rolle zukommen. Denn diese müssen demnach so gewählt werden, dass die Matrix schnell in den Glaszustand überführt wird und während der Trocknung und Lagerung in diesem verweilt.

Die wesentlichen Ziele dieser Arbeit waren die Ermittlung der schädigenden Einflüsse der Prozessführung während der Gefriertrocknung auf die Vitalität der Mikroorganismen in Matrices mit und ohne Schutzstoff. Ferner sollte untersucht werden, ob die Schutzwirkung eines zugesetzten Schutzstoffes auf seiner Glasbildung beruht und die Zellen somit bei Trocknungsbedingungen im Glaszustand besser geschützt werden. Des Weiteren sollte die Bedeutung des Glaszustands für die Stabilität der Mikroorganismen während der Lagerung ermittelt werden. Dabei war das Ziel, die Inaktivierung der Zellen im Glaszustand und im Nicht-

Glaszustand mit bekannten Modellen für die Temperaturabhängigkeit struktureller Relaxationprozesse des Präparates vorhersagen zu können (WLF oder Arrhenius).

Zu diesem Zweck wurde der Zusammenhang zwischen Glasübergangstemperatur, Zusammensetzung, Restwassergehalt und Wasseraktivität (Zustandsdiagramme) von Zellschutzstoff-Präparationen erstellt. Die erstellten Zustandsdiagramme dienen als Grundlage für die Auswahl geeigneter Prozessparameter sowie zur Kenntnis des physikalischen Zustands bei den ausgewählten Bedingungen für Trocknung und Lagerung. Es hat sich gezeigt, dass die Abhängigkeit der Glasübergangstemperatur vom Restwassergehalt für Zellschutzstoffpräparationen gleich der für wässrige Schutzstoffpräparationen ist. Die Glasübergangstemperatur der Mikroorganismenpräparate wird folglich durch die Glasübergangstemperatur des zugesetzten Schutzstoffes bestimmt. Ferner hat sich bei der thermischen Analyse von getrockneten Zellen ohne Schutzstoff gezeigt, dass bei dieser Zusammensetzung kein Glasübergang stattfindet. Die Zellkomponenten selbst gehen also nicht in den Glaszustand über.

Beim Gefrieren, als erstem Schritt der Lyophilisation, hat sich gezeigt, dass die Überlebensrate mit und ohne Schutzstoffe im Allgemeinen nur geringfügig abnimmt, wenn die Zellen direkt im Anschluss wieder aufgetaut werden. Der Gefrierprozess ist also nicht der schädlichste Prozessabschnitt bei der Gefriertrocknung. Dennoch erwies sich die niedrige Temperatur und das Verweilen in einer gefrierkonzentrierten Matrix im Verlauf des Trocknungsprozesses als negativ im Hinblick auf die Stabilität der Zellen, vor allem wenn die Zellen ohne Schutzstoffe gefroren und getrocknet wurden. So nahm die Überlebensrate mit abnehmender Endtemperatur sowohl nach dem Gefrieren, während des Verweilens im gefrorenen Zustand und während der Gefriertrocknung ab, wenn keine Schutzstoffe im umgebenden Medium vorhanden waren. Dagegen konnte ein größerer Anteil an Zellen seine Vermehrungsfähigkeit erhalten, wenn die Prozesse bei höheren Temperaturen durchgeführt wurden. Bei der Anwesenheit eines Schutzstoffes im Gefrier- und Trocknungsmedium konnte die Abnahme der Überlebensrate ebenfalls verlangsamt und auch der Einfluss der Temperatur reduziert werden. Zudem zeigte sich, dass bei hohen Trocknungstemperaturen ( $-20\text{ °C}$ ) und hohen Trocknungsgeschwindigkeiten die Überlebensrate ohne Schutzstoff sogar gleich hohe Werte annimmt, wie bei einer Trocknung mit Schutzstoff. Durch günstige Prozessbedingungen bei der Gefriertrocknung kann die Überlebensrate ohne Schutzstoffe also soweit gesteigert werden, dass Schutzstoffe für die Stabilität während der Trocknung unnötig wären.

Der Zusatz von Schutzstoffen ist folglich dann wichtig, wenn die Zellen bei niedrigen Temperaturen mit niedrigen Trocknungsraten getrocknet werden. Dabei werden die Zellen in einem gefrierkonzentrierten Medium bei niedrigeren Temperaturen während der Trocknung vorgeschädigt, was in einer verringerten Dehydrierungstoleranz resultiert. Durch den Zusatz von Schutzstoffen werden diese Vorschädigungen vermindert und die Zellen somit trockenungsresistenter.

Im Hinblick auf den Verlauf der Überlebensrate in Abhängigkeit vom Restwassergehalt konnte ermittelt werden, dass ein kritischer Restwassergehalt von 15 – 20 % für alle Formulierungen existiert, ab dem die Überlebensrate sowohl mit als auch ohne Schutzstoff mit zunehmendem Wasserentzug stark abnahm. Durch den Zusatz von Schutzstoffen kann also nur die Vorschädigung aufgrund des Verweilens in einer gefrierkonzentrierten Matrix bei niedrigen Temperaturen herabgesetzt werden. Der Dehydrierungsschaden an sich kann bei der Gefrier-trocknung durch den Zusatz von Schutzstoffen und auch durch entsprechende Wahl von Prozessbedingungen nicht verhindert werden. Aus diesem Grund ist der Zusatz von Schutzstoffen für die Stabilisierung während der Trocknung nur bei ungünstigen Prozessbedingungen notwendig, um die Dehydrierungstoleranz der Zellen zu erhöhen.

Der Glaszustand des Schutzstoffes besitzt bei der Gefrier-trocknung für die Überlebensrate keine Bedeutung. Der Verlauf der Überlebensrate zeigte sich für alle Prozessbedingungen in gleicher Weise, unabhängig davon, ob die Trocknung im Glaszustand oder im Nicht-Glaszustand verlief.

Während der Lagerung hat sich herausgestellt, dass die Stabilität der Mikroorganismen mit abnehmender Temperatur und abnehmender Wasseraktivität gesteigert wird. Für die Lagerstabilität ist der Glaszustand von Bedeutung. Es hat sich gezeigt, dass die Lagerstabilität bei allen Bedingungen, die zu einer Lagerung im Glaszustand führten, am höchsten war. Bei einer Lagerung im Nicht-Glaszustand nahm die Überlebensrate schneller ab. Bei der Analyse der Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten konnte jedoch festgestellt werden, dass diese nicht auf Basis der klassischen Glastheorie beschrieben werden kann. Die Geschwindigkeitskonstante konnte sowohl im Glaszustand als auch im Nicht-Glaszustand nach Arrhenius und auch nach WLF beschrieben werden. Allerdings wurden für die WLF-Gleichung sehr niedrige Konstanten ermittelt, die wiederum zeigen, dass die Aktivierungsenergie im Nicht-Glaszustand nicht temperaturabhängig ist. Die Zunahme der Geschwindigkeitskonstanten  $k_{T,aw}$  der Inaktivierungsreaktion mit zunehmender Temperatur im Nicht-Glaszustand ist also nicht mit strukturellen Relaxationsprozessen gekoppelt. Ferner war die



Geschwindigkeitskonstante  $k_{T,aw}$  im Nicht-Glaszustand nicht nur von der Temperaturdifferenz zwischen Produkttemperatur und Glasübergangstemperatur abhängig sondern auch von der Temperatur *per se*. Die komplexen chemischen und physikalischen Vorgänge bei der Schädigung von Mikroorganismen während der Lagerung im Nicht-Glaszustand können also nicht mit der Temperaturabhängigkeit struktureller Relaxationsprozesse gekoppelt werden, sondern es muss ein komplexes Zusammenspiel zwischen verschiedenen Reaktionen mit unterschiedlichen Geschwindigkeitskonstanten berücksichtigt sowie deren Sensitivität im Hinblick auf die Temperatur und auf die Änderung der viskositätsbedingten Diffusionslimitierung der Reaktanden mit einbezogen werden.

## 9 SUMMARY

Protective solutes, such as disaccharides, are added to cell suspensions in order to minimise inactivation of microorganisms during drying and storage. Indeed, results from literature show that stability of microorganisms can be improved by adding protective solutes. However, general conclusions about the deteriorative and protective mechanisms of such substances can not be drawn. Furthermore, there is a lack of knowledge in terms of interaction between process conditions, protective potential of protective solutes and the inactivation of microorganisms. There is no information about the drying stage in which cell vitality is lost maximally. However, the knowledge about these interactions is important for a precise drying process and storage in order to keep cells viable during the processing steps.

A theoretic protective mechanism is the embedding of biomolecules in a vitrified (glassy) sugar matrix. This protective mechanism is verified for isolated biomolecules, such as proteins or liposomes. The hypothesis of this theory is the coupling of reaction rates of diffusion limited reactions with the molecular mobility of the system. In a supersaturated glassy matrix molecular mobility and reaction rates are strongly reduced, whereas they are increased in the supersaturated non glassy state. For the supersaturated non glassy state the temperature dependence of the reaction rate can be theoretically calculated by using the empirical equation of Williams et al. (1955) (WLF). However, it is not known whether the glass theory is valid for the stability of microorganisms and whether it is possible to predict their stability in the non glassy state with WLF. Provided that this theory is valid, the choice of appropriate process conditions becomes very important to achieve maximum stability. The process conditions need to be adjusted to reach the glassy state very fast and keep the sample in the glassy state during the process.

The main objectives of this work were the determination of deteriorative influences of the process conditions on cell viability along the whole freeze drying process using matrices with and without protective solutes. Especially, it should be determined whether the protective effect of a protective solute depends on its glass forming ability and whether cells are protected best when process conditions were adjusted leading to the glassy state of the matrix. In the same way, the importance of the glassy state for cell stability during storage should be investigated.

For this purpose the relationship between glass transition temperature, composition, residual water content and water activity of cell-sugar-preparations was established. The established

state diagrams served as basis for choosing appropriate process conditions leading to the supersaturated glassy or non glassy state. The following results were obtained:

- *Influence of process conditions on survival of bacteria during freeze drying with and without protective solutes*

Inactivation of cells during freeze drying proceeds faster at low temperatures when the cells are dried without protective solutes. Low temperature during freeze drying is detrimental for cell stability. Accordingly, the optimal freeze drying process of cells without protective solutes exhibits a high drying rate and relatively high product temperatures. Inactivation of cells at low temperatures without protective solutes added can be due to a pH shift, an increased salt concentration and/or due to alleviated repulsive forces of hydrophobic groups of cell proteins. Accordingly, the cells are damaged partly previous to water removal. Therefore, dehydration has a more detrimental effect to cells at low temperatures ( $< -20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) compared to higher temperatures.

The addition of lactose as protective solute leads to a reduced influence of drying conditions and a slightly higher survival at the end of drying but only for low product temperatures and low drying rates. The protective effect consists in a reduced premature damage of the cells and stabilisation of hydrated cell components (preferential hydration) at low temperatures and therefore in an increased dehydration tolerance of the cells.

With regard to the course of survival during drying with dependence on residual water content it was determined that the degree of cell loss is dependent on the drying stages. When the residual water content falls below a critical value cell survival decreases very strong with continuous removal of water. This critical water content is in the range of 15 -20 (w/w%). The strong inactivation below this value occurs both with and without protective solutes. At this water content the structured water of biomolecules is probably removed, which causes irreversible damage, and can not be replaced by the protective solute used.

- *Importance of the glassy state during freeze drying and storage on cell stability*

It was possible to establish a phase-state diagram for microorganisms in a lactose matrix. On the basis of this diagram process conditions for freeze drying and storage

could be chosen which lead to drying and storage in the glassy or in the non glassy state.

The hypothesis that freeze drying conditions below the glass transition temperature lead to a higher survival of the cells at the end of drying can not be confirmed by the results from these studies. It was shown that freeze drying of cells in a lactose matrix leads to identical curves of survival during freeze drying at different process conditions, independent from a product temperature above or below the glass transition temperature. The protective effect of lactose does not rely on the glassy state.

During storage it was determined that survival decreases faster with higher storage temperature and higher relative humidity. For storage conditions which lead to the glassy state the inactivation rate constant  $k_{T,aw}$  was lowest. That means that the glassy state is important for cell stability during storage. However, in contrast to the classical glass theory the rate constant  $k_{T,aw}$  is not only dependent on the temperature difference between product temperature and glass transition temperature,  $T_p - T_g$ , in the non glassy state according to the Williams Landel Ferry equation. A clear dependence of  $k_{T,aw}$  on temperature *per se* as well as on relative humidity was found. Accordingly, the glassy state is not the unifying mechanism as explanation of the effect of water activity and temperature. Separate effects of temperature and water activity *per se* have to be considered.

## 10 LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Abadias, M., Benabarre, A., Teixido, N., Usall, J., Vinas, I. (2001a) Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. *International Journal of Food Microbiology*, 65, S. 173 - 182.
- (2) Abadias, M., Teixido, N., Usall, J., Benabarre, A., Vinas, I. (2001b) Viability, efficacy, and storage stability of freeze-dried biocontrol agent *Candida sake* using different protective and rehydration media. *Journal of Food Protection*, 64, S. 856 - 861.
- (3) Ablett, S., Izzard, M. J., Lillford, P. J. (1992) Differential scanning calorimetric study of frozen sucrose and glycerol solutions. *Journal of the Chemical Society. Faraday Transactions*, 88, S. 789 - 794.
- (4) Ahmed, J., Ramaswamy, H. S., Khan, A. R. (2005) Effect of water activity on glass transitions of date pastes. *Journal of Food Engineering*, 66, S. 253 - 258.
- (5) Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D. (1990) *Molekularbiologie der Zelle 2*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- (6) Ananta, E. (2005) Impact of environmental factors on viability and stability and high pressure pretreatment on stress tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103) during spray drying. Dissertation, Technische Universität Berlin.
- (7) Anchordoquy, T. J., Carpenter, J. F. (1996) Polymers Protect Lactate Dehydrogenase during Freeze-Drying by Inhibiting Dissociation in the Frozen State. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 332, S. 231 - 238.
- (8) Andersen, A. B., Fog-Petersen, M. S., Larsen, H., Skibsted, L. H. (1999) Storage Stability of Freeze-dried Starter Cultures (*Streptococcus thermophilus*) as Related to Physical State of Freezing Matrix. *Food Science and Technology*, 32, S. 540 - 547.
- (9) Angell, C. A., Bressel, R. D., Green, J. L., Kanno, H., Oguni, M., Sare, E. J. (1994) Liquid fragility and the glass transition in water and aqueous solutions. *Journal of Food Engineering*, 22, S. 115 - 142.
- (10) Bai, Y., Rahman, M. S., Perera, C. O., Smith, B., Melton, L. D. (2001) State diagram of apple slices: glass transition and freezing curves. *Food Research International*, 34, S. 89 - 95.
- (11) Bayrock, D., Ingledew, W. M. (1997) Mechanism of viability loss during fluidized bed drying of baker's yeast. *Food Research International*, 30, S. 417 - 425.
- (12) Beal, C., Fonseca, F., Corrieu, G. (2001) Resistance to Freezing and Frozen Storage of *Streptococcus thermophilus* is Related to Membrane Fatty Acid Composition. *Journal of Dairy Science*, 84, S. 2347 - 2356.

- (13) Billi, D., Wright, D. J., Helm, R. F., Prickett, T., Potts, M., Crowe, J. H. (2000) Engineering desiccation tolerance in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, S. 1680 - 1684.
- (14) Brennan, M., Wanismail, B., Johnson, M. C., Ray, B. (1986) Cellular-Damage in Dried *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Food Protection*, 49, S. 47 - 53.
- (15) Broadbent, J. R. , Lin, C. (1999) Effect of heat shock or cold shock treatment on the resistance of *Lactococcus lactis* to freezing and lyophilization. *Cryobiology*, 39, S. 88 - 102.
- (16) Carvalho, A. S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F. X., Gibbs, P. (2002) Survival of freeze-dried *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* during storage in the presence of protectants. *Biotechnology Letters*, 24, S. 1587 - 1591.
- (17) Carvalho, A., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F. X., Gibbs, P. (2003) Protective effect of sorbitol and monosodium glutamate during storage of freeze dried lactic acid bacteria. *Lait*, 83, S. 203 – 210.
- (18) Carvalho, A. S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F. X., Gibbs, P. (2004) Effects of various sugars added to growth and drying media upon thermotolerance and survival throughout storage of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus*. *Biotechnology Progress*, 20, S. 248 - 254.
- (19) Castro, H. P., Teixeira, P. M., Kirby, R. (1995) Storage of Lyophilized Cultures of *Lactobacillus bulgaricus* under different relative humidities and atmospheres. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44, S. 172 - 176.
- (20) Castro, H. P., Teixeira, P. M., Kirby, R. (1996) Changes in the cell membrane of *Lactobacillus bulgaricus* during storage following freeze-drying. *Biotechnology Letters*, 18, S. 99 - 104.
- (21) Champion, D., Le Meste, M., Simatos, D. (2000) Towards an improved understanding of glass transition and relaxations in foods: molecular mobility in the glass transition range. *Trends in Food Science & Technology*, 11, S. 41 - 55.
- (22) Chang, B. S., Fischer, N. L. (1995) Development of an Efficient Single-Step Freeze-Drying Cycle for Protein Formulations. *Pharmaceutical Research*, 12, S. 831 - 837.
- (23) Chang, B. S., Beauvais, R. M., Dong, A., Carpenter, J. F. (1996) Physical Factors Affecting the Storage Stability of Freeze-Dried Interleukin-1 Receptor Antagonist: Glass Transition and Protein Conformation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 331, S. 249 - 258.
- (24) Chen, T., Fowler, A., Toner, M. (2000) Literature Review: Supplemented Phase Diagram of the Trehalose-Water Binary Mixture. *Cryobiology*, 40, S. 277 - 282.

- (25) Chen, Y. H., Aull, J. L., Bell, L. N. (1999) Solid-state tyrosinase stability as affected by water activity and glass transition. *Food Research International*, 32, S. 467 - 472.
- (26) Cioci, F., Lavecchia, R. (1997) Molecular Thermodynamics of Heat-Induced Protein Unfolding in Aqueous Media. *AIChE Journal*, 43, S. 525 - 534.
- (27) Clementi, F., Rossi, J. (1984) Effect of Drying and Storage Conditions on Survival of *Leuconostoc oenos*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 35, S. 183 - 186.
- (28) Conrad, P. B., Miller, D. P., Cielenski, P. R., de Pablo, J. J. (2000) Stabilization and preservation of *Lactobacillus acidophilus* in saccharide matrices. *Cryobiology*, 41, S. 17 - 24.
- (29) Costa, E., Usall, J., Teixido, N., Garcia, N., Vinas, I. (2000) Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze-drying. *Journal of Applied Microbiology*, 89, S. 793 - 800.
- (30) Crowe, J. H., Carpenter, J. F., Crowe, L. M. (1998) The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology*, 60, S. 73 - 103.
- (31) Crowe, J. H., Crowe, L. M., Hoekstra, F. A. (1989) Phase transitions and permeability changes in dry membranes during rehydration. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 21, S. 77 - 91.
- (32) de Antoni, G. L., Perez, P., Abraham, A., Anon, M. C. (1989) Trehalose, a cryoprotectant for *Lactobacillus bulgaricus*. *Cryobiology*, 26, S. 149 - 153.
- (33) de Valdez, G. F., Degiori, G. S., Holgado, A. P. D., Oliver, G. (1983) Comparative-Study of the Efficiency of Some Additives in Protecting Lactic-Acid Bacteria Against Freeze-Drying. *Cryobiology*, 20, S. 560 - 566.
- (34) de Valdez, G. F., de Giori, G. S., de Ruiz Holgado, A. P., Oliver, G. (1985a) Effect of Drying Medium on Residual Moisture Content and Viability of Freeze-Dried Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 49, S. 413 - 415.
- (35) de Valdez, G. F., Degiori, G. S., Holgado, A. A. P. D., Oliver, G. (1983) Protective Effect of Adonitol on Lactic-Acid Bacteria Subjected to Freeze-Drying. *Applied and Environmental Microbiology*, 45, S. 302 - 304.
- (36) de Valdez, G. F., Degiori, G. S., Holgado, A. P. D., Oliver, G. (1985b) Effect of the Rehydration Medium on the Recovery of Freeze-Dried Lactic-Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 50, S. 1339 - 1341.
- (37) de Valdez, G. F., Diekmann, H. (1993) Freeze-Drying Conditions of Starter Cultures for Sourdoughs. *Cryobiology*, 30, S. 185 - 190.

- (38) Demain, A. L. (2000) Microbial biotechnology. Trends in Biotechnology, 18, S. 26 - 31.
- (39) Ehrenfest, P. (1933) Phasenumwandlungen im ueblichen und erweiterten Sinn, clas-sifiziert nach den entsprechenden Singularitaeten des thermodynamischen Potentia-les. Proceedings, 36, S. 153 -
- (40) Einsele, A., Finn, R. K., Samhaber, W. (1985) Bioprozeßkinetik, S. 37 - 68, Mikro-biologische und biochemische Verfahrenstechnik, 1, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- (41) Einstein, A. (1905) Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme ge-forderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen. Annalen der Physik, 17, S. 549 - 560.
- (42) Ekdawi-Sever, N., Geontoro, L. A., de Pablo, J. J. (2003) Effects of Annealing on Freeze-Dried *Lactobacillus acidophilus*. Journal of Food Science, 68, S. 2504 - 2511.
- (43) Elmonsef Omar, A. M. , Roos, Y. H. (2007) Glass transition and crystallization be-haviour of freeze-dried lactose-salt mixtures. Food Science and Technology, 40, S. 536 - 543.
- (44) Fennema, O. R.(1996) Water and Ice, S. 17 - 94, Food Chemistry, 3, Marcel Dekker, New York, Basel, Hong Kong.
- (45) Fennema, O. R., Powrie, W. D., Marth, E. H.(1973) Low-Temperature Preservation of Foods and Living Matter 1,Marcel Dekker, Inc., New York.
- (46) Fonseca, F., Obert, J. P., Beal, C., Marin, M. (2001a) State diagrams and sorption isotherms of bacterial suspensions and fermented medium. Thermochimica Acta, 366, S. 167 - 182.
- (47) Fonseca, F., Beal, C., Corrieu, G. (2001b) Operating Conditions That Affect the Resistance of Lactic Acid Bacteria to Freezing and Frozen Storage. Cryobiology, 43, S. 189 - 198.
- (48) Franks, F. (1990) Freeze Drying: From empiricism to predictability. Cryo-Letters, 11, S. 93 - 110.
- (49) Franks, F. (1985) Complex aqueous systems at subzero temperatures, S. 497 - Properties of Water in Foods, Martinus Nijhoff, Dordrecht.
- (50) Friesen, T., Hill, G., Pugsley, T., Holloway, G., Zimmerman, D. (2005) Experimen-tal determination of viability loss of *Penicillium bilaiae* conidia during convective air-drying. Applied Microbiology and Biotechnology, 68, S. 397 - 404.



- 
- (51) Frisch, D., Eyring, H., Kincaid, J. F. (1940) Pressure and Temperature Effects on the Viscosity of liquids. *Journal of Applied Physics*, 11, S. 75 - 80.
- (52) Gehrke, H.-H. (1991) Untersuchungen zur Gefriertrocknung von Mikroorganismen, Dissertation, Universität Braunschweig, VDI-Verlag GmbH, Düsseldorf.
- (53) Gordon, M., Taylor, J. S. (1952) Ideal copolymers and the second-order transitions of synthetic rubbers. *Journal of Applied Chemistry*, 2, S. 493 - 500.
- (54) Gou, Y., Byrn, S. R., Zografí, G. (2000) Physical characteristics and chemical degradation of amorphous quinapril hydrochloride. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 89, S. 128 - 143.
- (55) Greenspan, L. (1977) Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. *Journal of Research of the National Bureau of Standards*, 81A, S. 89 - 96.
- (56) Hammes, W. P., Vogel, R. F. (1995) The genus *Lactobacillus*, S. 19 - 49, *The Genera of Lactic Acid Bacteria*, Blackie Academic and Professional, Glasgow.
- (57) Hoekstra, F. A., Golovina, E. A., Buitink, J. (2001) Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science*, 6, S. 431 - 438.
- (58) Höhne, G. W., Hemminger, W. F., Flammersheim, H.-J. (2003) Applications of differential Scanning calorimetry, S. 147 - 244, *Differential Scanning Calorimetry*, 2. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- (59) Ibach, A., Kind, M. (2007) Crystallization kinetics of amorphous lactose, whey-permeate and whey powders. *Carbohydrate Research*, 342, S. 1357 - 1365.
- (60) Izutsu, K., Yoshioka, S., Terao, T. (1994) Effect of mannitol crystallinity on the stabilization of enzymes during freeze-drying. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 42, S. 5 - 8.
- (61) Jagerstad, M., Piironen, V., Walker, C., Ros, G., Carnovale, E., Holasova, M., Nau, H. (2005) Increasing natural food folates through bioprocessing and biotechnology. *Trends in Food Science & Technology*, 16, S. 298 - 306.
- (62) Jain, M. K. (1988) *Introduction to Biological Membranes*, 2. Auflage, John Wiley & Sons, New York.
- (63) Jiang, S., Nail, S. L. (1998) Effect of process conditions on recovery of protein activity after freezing and freeze-drying. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 45, S. 249 - 257.
- (64) Karlsson, J. O. M. (2001) A Theoretical Model of Intracellular Devitrification. *Cryobiology*, 42, S. 154 - 169.

- (65) Karmas, R., Buera, P. M., Karel, M. (1992) Effect of Glass Transition on Rates of Nonenzymatic Browning in Food Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, S. 873 - 879.
- (66) Kawaguti, H. Y., Buzzato, M. F., Orsi, D. C., Suzuki, G. T., Sato, H. H. (2006) Effect of the additives polyethylenimine and glutaraldehyde on the immobilization of *Erwinia* sp. D12 cells in calcium alginate for isomaltulose production. *Process Biochemistry*, 41, S. 2035 - 2040.
- (67) Kawai, K., Fukami, K., Yamamoto, K. (2007) State diagram of potato starch-water mixtures treated with high hydrostatic pressure. *Carbohydrate Polymers*, 67, S. 530 - 535.
- (68) Kessler, H. G. (1961) Über die Einzelvorgänge des Wärme- und Stoffaustausches bei der Sublimationstrocknung und deren Verknüpfungen, Dissertation, Technische Hochschule Darmstadt.
- (69) Kessler, H. G. (1996) Wärmebehandlung und Effekte - Sterilprozesstechnik - Proteindenaturierung und -strukturierung, *in* Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik, 4. Auflage, S. 127 - 216, Verlag A. Kessler, München.
- (70) King, V. A. E., Lin, H. J., Liu, C. F. (1998) Accelerated storage testing of freeze-dried and controlled low-temperature vacuum dehydrated *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of General and Applied Microbiology*, 44, S. 161 - 165.
- (71) Kreyszig, E. (1979) Statistische Methoden und ihre Anwendungen, 7. Auflage, Vandenhoeck & Ruprecht, Göttingen.
- (72) Leslie, S. B., Israeli, E., Lighthart, B., Crowe, J. H., Crowe, L. M. (1995) Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, S. 3592 - 3597.
- (73) Leslie, S. B., Teter, S. A., Crowe, L. M., Crowe, J. H. (1994) Trehalose lowers membrane phase transitions in dry yeast cells. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1192, S. 7 - 13.
- (74) Levine, H., Slade, L. (1988) Thermomechanical properties of small-carbohydrate-water glasses and rubbers. Kinetically metastable systems at sub-zero temperatures. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, 84, S. 2619 - 2633.
- (75) Lilly, M., Lambrechts, M. G., Pretorius, I. S. (2000) Effect of Increased Yeast Alcohol Acetyltransferase Activity on Flavor Profiles of Wine and Distillates. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, S. 744 - 753.
- (76) Linders, L. J. M., Wolkers, W. F., Hoekstra, F. A., Vantriet, K. (1997) Effect of added carbohydrates on membrane phase behavior and survival of dried *Lactobacillus plantarum*. *Cryobiology*, 35, S. 31 - 40.

- (77) Ljungh, A., Jिंगgang, L., Yanagisawa, N. (2002) Isolation, Selection and Characteristics of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* F19. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 3, S. 4 - 6.
- (78) Lovelock, J. E. (1953) The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing. *Biochimica et Biophysica Acta*, 10, S. 414 - 426.
- (79) Maltini, E., Anese, M. (1995) Evaluation of viscosities of amorphous phases in partially frozen systems by WLF kinetics and glass transition temperatures. *Food Research International*, 28, S. 367 - 372.
- (80) Mazur, P. (1984) Freezing of living cells: mechanisms and implications. *AJP - Cell Physiology*, 247, S. C125 - C142.
- (81) Meryman, H. T. (1971) Cryoprotective Agents. *Cryobiology*, 8, 173 - 183.
- (82) Moraga, G., Martinez-Navarrete, N., Chiralt, A. (2006) Water sorption isotherms and phase transitions in kiwifruit. *Journal of Food Engineering*, 72, S. 147 - 156.
- (83) Morelli, L., Campominosi, E. (2002) Genetic stability of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* F19. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 3, S. 14 - 16.
- (84) Morice, M., Bracquart, P., Linden, G. (1992) Colonial Variation and Freeze-Thaw Resistance of *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Dairy Science*, 75, S. 1197 - 1203.
- (85) Nakheli, A., Eljazouli, A., Elmorabit, M., Ballouki, E., Fornazero, J., Huck, J. (1999) The viscosity of maltitol. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 11, S. 7977 - 7994.
- (86) Oetjen, G. W., Haseley, P. (2004) *Freeze Drying*, VILEY-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA, Weinheim.
- (87) Ohkuma, C., Kawai, K., Viriyarattanasak, C., Mahawanich, T., Tantratian, S., Takai, R., Suzuki, T. (2008) Glass transition properties of frozen and freeze-dried surimi products: Effects of sugar and moisture on the glass transition temperature. *Food Hydrocolloids*, 22, S. 255 - 262.
- (88) Ohlsen, K., Björneholm, S., Fonden, R., Svensson, U. (2002) *Lactobacillus* F19-a probiotic strain suitable for consumer products. *Microbial Ecology in health and disease*, 3, S. 27 - 32.
- (89) Omar, A. M. E., Roos, Y. H. (2007) Glass Transition and crystallization behaviour of freeze-dried lactose-salt mixtures. *Food Science and Technology*, 40, 536 - 543.
- (90) Palmfeldt, J., Radstrom, P., Hahn-Hagerdal, B. (2003) Optimisation of initial cell concentration enhances freeze-drying tolerance of *Pseudomonas chlororaphis*. *Cryobiology*, 47, S. 21 - 29.

- (91) Peleg, M. (1992) On the Use of the WLF Model in Polymers and Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32, S. 59 - 66.
- (92) Pèter, G., Reichart, O. (2001) The effect of growth phase, cryoprotectants and freezing rates on the survival of selected microorganisms during freezing and thawing. *Acta Alimentaria*, 30, S. 89 - 97.
- (93) Pikal, M. J. , Rigsbee, D. R. (1997) The Stability of Insulin in Crystalline and Amorphous Solids: Observation of Greater Stability for the Amorphous Form. *Pharmaceutical Research*, 14, S. 1379 - 1387.
- (94) Pikal-Cleland, K. A., Rodriguez-Hornedo, N., Amidon, G. L., Carpenter, J. F. (2000) Protein Denaturation during Freezing and Thawing in Phosphate Buffer Systems: Monomeric and Tetrameric [beta]-Galactosidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 384, S. 398 - 406.
- (95) Roos, Y. H. , Karel, M. (1991) Amorphous state and delayed ice formation in sucrose solutions. *International Journal of Food Science and Technology*, 26, S. 553 - 566.
- (96) Roos, Y. H. (1995) Water and Phase Transitions, *in* Phase Transitions in Foods, Academic Press, S. 73 - 107, San Diego.
- (97) Roos, Y. H., Himber, M.-J. (1994) Nonenzymatic Browning Behavior as related to Glass Transition of a Food Model at Chilling Temperatures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, S. 893 - 898.
- (98) Sablani, S. S., Kasapis, S., Rahman, M. S., Al-Jabri, A., Al-Habsi, N. (2004) Sorption isotherms and the state diagram for evaluating stability criteria of abalone. *Food Research International*, 37, S. 915 - 924.
- (99) Santivarangkna, C., Wenning, M., Foerst, P., Kulozik, U. (2007) Damage of cell envelope of *Lactobacillus helveticus* during vacuum drying. *Journal of Applied Microbiology*, 102, S. 748 - 756.
- (100) Schebor, C., Galvagno, M., del Pilar Buera, M., Chirife, J. (2000) Glass Transition Temperatures and Fermentative Activity of Heat-Treated Commercial Active Dry Yeasts. *Biotechnology Progress*, 16, S. 163 - 168.
- (101) Schebor, C., Buera, M. d. P., Chirife, J. (1996) Glassy State in Relation to the Thermal Inactivation of the Enzyme Invertase in Amorphous Dried Matrices of Trehalose, Maltodextrin and PVP. *Journal of Food Engineering*, 30, S. 269 - 282.
- (102) Schebor, C., Burin, L., Buera, M. d. P., Aguilera, J. M., Chirife, J. (1997) Glassy State and Thermal Inactivation of Invertase and Lactase in Dried Amorphous Matrices. *Biotechnology Progress*, 13, S. 857 - 863.

- 
- (103) Schwister, K. (1996) Taschenbuch der Chemie, 2. Auflage, Carl Hanser Verlag, München Wien.
- (104) Scott, W. J. (1958) The Effect of Residual Water on the Survival of Dried Bacteria During Storage. *Journal of General Microbiology*, 19, S. 624 - 633.
- (105) Shafiur Rahman, M., Kasapis, S., Guizani, N., Saud Al-Amri, O. (2003) State diagram of tuna meat: freezing curve and glass transition. *Journal of Food Engineering*, 57, S. 321 - 326.
- (106) Shah, N. P. (2007) Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal*, 17, S. 1262 - 1277.
- (107) Shamblin, S. L., Hancock, B. C., Pikal, M. J. (2006) Coupling Between Chemical Reactivity and Structural Relaxation in Pharmaceutical Glasses. *Pharmaceutical Research*, 23, S. 2254 – 2268.
- (108) Shuryo, N. , Eunice, L.-C.(1988) *Hydrophobic Interactions in Food Systems*, CRC Press, Inc., Boca Raton.
- (109) Simatos, D., Faure, M., Bonjour, E., Couach, M. (1975) The physical state of water at low temperatures in plasma with different water contents as studied by differential thermal analysis and differential scanning calorimetry. *Cryobiology*, 12, S. 202 - 208.
- (110) Singh, K. J., Roos, Y. H. (2006) State transitions and freeze concentration in trehalose-protein-cornstarch mixtures. *Food Science and Technology*, 39, S. 930 - 938.
- (111) Slade, L., Levine, H. (1991) Beyond water activity: Recent advances based on an alternative approach to the assessment of food quality and safety. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 30, S. 115 - 360.
- (112) Sperling, L. H.(1986) *Introduction to Physical Polymer Science 4*, John Wiley & Sons, New York.
- (113) Stiles, M. E. (1996) Biopreservation by Lactic Acid Bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70, S. 331 - 345.
- (114) Sullivan, A., Bennet, R., Viitanen, M., Palmgren, A.-C., Nord, C. E. (2002) Influence of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* F19 on intestinal microflora in children and elderly persons and impact on *Helicobacter pylori* infections. *Microbial Ecology in health and disease*, 3, S. 17 - 21.
- (115) Sun, W. Q. (1997) Glassy State and Seed Storage Stability: The WLF Kinetics of Seed Viability Loss at  $T > T_g$  and the Plasticization Effect of Water on Storage Stability. *Annals of Botany*, 79, S. 291 - 297.

- (116) Sun, W. Q. (1998) Stability of frozen and dehydrated cells and membranes in the amorphous carbohydrate matrices: The Williams-Landel-Ferry Kinetics. *Cryo-Letters*, 19, S. 105 - 114.
- (117) Sun, W. Q., Davidson, P., Chan, H. S. O. (1998) Protein stability in the amorphous carbohydrate matrix: relevance to anhydrobiosis. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1425, S. 245 - 254.
- (118) Sun, W. Q., Leopold, A. C., Crowe Lois M., Crowe, J. H. (1996) Stability of Dry Liposomes in Sugar Glasses. *Biophysical Journal*, 70, S. 1769 - 1776.
- (119) Taragano, V. M., Pilosof, A. M. R. (2001) Calorimetric Studies on Dry Pectinlyase Preparations: Impact of Glass Transition on Inactivation Kinetics. *Biotechnology Progress*, 17, S. 777 -
- (120) Teixeira, P. C., Castro, M. H., Malcata, F. X., Kirby, R. M. (1995) Survival of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* Following Spray-Drying. *Journal of Dairy Science*, 78, S. 1025 - 1031.
- (121) Telis, V. R. N., Sobral, P. J. A. (2001) Glass Transitions and State Diagram for Freeze-dried Pineapple. *Food Science and Technology*, 34, S. 199 - 205.
- (122) Thomsen, M. K., Jespersen, L., Sjostrom, K., Risbo, J., Skibsted, L. H. (2005) Water Activity-Temperature State Diagram of Amorphous Lactose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, S. 9182 - 9185.
- (123) Timasheff, S. N. (1992) Stabilization of Protein Structure by Solvent Additives, *in* Stability of Protein Pharmaceuticals, Part B: In Vivo Pathways of Degradation and Strategies for Protein Stabilization, S. 265 - 285, Plenum Press, New York.
- (124) Timasheff, S. N. (2002) Protein-solvent preferential interactions, protein hydration, and the modulation of biochemical reactions by solvent components. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, S. 9721 - 9726.
- (125) Timasheff, S. N., Arakawa, T. (1989) Stabilization of protein structure by solvents, *in* Protein structure, a practical approach, S. 331 - 345, IRL, Oxford.
- (126) To, B. C. S., Etzel, M. R. (1997) Spray drying, freeze drying, or freezing of three different lactic acid bacteria species. *Journal of Food Science*, 62, S. 576 - 585.
- (127) Tsvetkov, T., Brankova, R. (1983) Viability of micrococci and lactobacilli upon freezing and freeze drying in the presence of different cryoprotectants. *Cryobiology*, 20, S. 318 - 323.
- (128) Van Hook, A. (1961) Crystallisation. Theory and Practice, Reihnhold, New York.

- 
- (129) Villadsen, J. (2007) Innovative technology to meet the demands of the white biotechnology revolution of chemical production. *Chemical Engineering Science*, 62, S. 6957 - 6968.
- (130) Vuataz, G. (2002) Impact of the glass transition concept on the manufacturing of milk powders. Vortrag Ideenbörse Forschung, Technologien für die Zukunft, Fulda 2002.
- (131) Williams, M. L., Landel, R. F., Ferry, J. D. (1955) The Temperature Dependence of Relaxation Mechanisms in Amorphous Polymers and Other Glass-forming Liquids. *Journal of the American Chemical Society*, 77, S. 3701 - 3707.
- (132) Wiseman, A. (2004) Novel food-proteomics by control of bioprocess-enzymology outcomes, *Trends in Food Science & Technology*, 15, S. 44 - 45.
- (133) Zhao, G. , Zhang, G. (2005) Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying. *Journal of Applied Microbiology*, 99, S. 333 - 338.
- (134) [http://www.heraeusensortechnology.de/downloads/datenblaetter/M-416\\_d.pdf](http://www.heraeusensortechnology.de/downloads/datenblaetter/M-416_d.pdf)  
(10.01.08)

## 11 ANHANG

**Tabelle 12: Verwendete Chemikalien**

<b>Substanz</b>	<b>Anwendung</b>	<b>Hersteller</b>
Agar-Agar, 1.01614	Für Oberflächenkultur	Merck, Darmstadt, Deutschland
Anaerogen®	Sauerstoffbindendes Agens für anaerobe Inkubation	Oxoid, Hampshire, UK
Hydranal®-Composite, 5, 34805 (Riedel-de Haën)	Agens für Karl Fischer Titration	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Hydranal®-Formamid dry, 34724 (Riedel-de Haën)	Agens für Karl Fischer Titration	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Hydranal®-Methanol Rapid, 37817 (Riedel-de Haën)	Agens für Karl Fischer Titration	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Hydranal®-Water Standard, 10.0 (Riedel-de Haën)	Kalibration Karl Fischer	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Indium, G10M24	Temperaturkalibration DSC Q1000	TA Instruments, Eschborn, Deutschland
Kaliumacetat, 1.04820	Salz für gesättigte Lösung zur Einstellung definierter Luftfeuchten während der Lagerung	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumcarbonat, 1.10614	Salz für gesättigte Lösung zur Einstellung definierter Luftfeuchten während der Lagerung	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumfluorid, 1.05030	Salz für gesättigte Lösung zur Einstellung definierter Luftfeuchten während der Lagerung	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydroxid, 1.05033	Salz für gesättigte Lösung zur Einstellung definierter Luftfeuchten während der Lagerung	Merck, Darmstadt, Deutschland
Laktosemonohydrat, 1.07657	Verwendung als Schutzstoff	Merck, Darmstadt, Deutschland
Lithiumchlorid, 00621 (Fluka)	Salz für gesättigte Lösung zur Einstellung definierter Luftfeuchten während der Lagerung	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Magermilchpulver, 1.15363	Verwendung als Schutzstoff	Merck, Darmstadt, Deutschland



Magnesiumchlorid, 8.14733	Salz für gesättigte Lösung zur Einstellung definierter Luftfeuchten während der Lagerung	Merck, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumnitrat Hexahydrat, 1.05853	Salz für gesättigte Lösung zur Einstellung definierter Luftfeuchten während der Lagerung	Merck, Darmstadt, Deutschland
MRS-Boullion, 1.10661, pH 5,7±0,2	Nährmedium für Fermentation und Oberflächenkultur	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid, 1.06404	Salz für gesättigte Lösung zur Einstellung definierter Luftfeuchten während der Lagerung; Phosphatpuffer	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid, 30620 (Riedel-de Haën)	Salz für gesättigte Lösung zur Einstellung definierter Luftfeuchten während der Lagerung	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Phosphatpufferlösung (PBS) (0.10 M, 0.15 M NaCl, pH 7.0) K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1.05104  KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1.04873	Wasch- und Trocknungsmedium	Merck, Darmstadt, Deutschland;  Merck, Darmstadt, Deutschland
Ringerlösung, 1.15525	Verdünnung der Zellsuspensionen für Oberflächenkultur	Merck, Darmstadt, Deutschland
Stickstoff (flüssig)	Kältemittel für das Gefrieren der Zellsuspensionen	Linde, München, Deutschland
Trehalose, 1.08353	Verwendung als Schutzstoff	Merck, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 13: Verwendete Geräte

Gerät	Verwendung	Hersteller
Alkoholbad	Verweilen der Zellsuspensionen bei -30 °C	Haake,
Analysenwaage AP 250 D, Ablesbarkeit 0,00001g	Bestimmung der Einwage für DSC-Messungen	Ohaus, Pine Brook New Jersey, USA
Analysenwaage AE 200, Ablesbarkeit 0,0001g	Alle Einwagen außer DSC	Mettler Toledo, Greifensee, Schweiz
Differential Scanning Calorimeter, DSC Q1000	Thermische Analyse	TA Instruments, Eschborn, Deutschland
Drehschieber Vakuumpumpe RZ 2 (Evakuierungsgeschwindigkeit 2,2m <sup>3</sup> /h, Minimaldruck 0,04 Pa)	Kammerdruck Gefriertrockner	Vacuubrand, Wertheim, Deutschland
Gefriertrockner, Martin Christ Alpha 1-4	Gefriertrocknung von Mikroorganismensuspensionen	Martin Christ, Osterode, Deutschland
Glasflaschen 2 l, 4 l	Fermentation	Schott, Mainz, Deutschland
Glasvials 10R, 127580	Gefriertrocknung der Zellsuspensionen	Martin Christ, Osterode, Deutschland
Gummistopfen, geriffelt, 127651	Abdecken und Verschließen der Glasvials	Martin Christ, Osterode, Deutschland
Hermetisch verschließbare Aluminiumtiegel, ELC 001077 (Tiegel), ELC001078 (Deckel)	Thermische Analyse	TA Instruments, Eschborn, Deutschland
Karl-Fischer Titrator, Titro Line KF	Bestimmung Wassergehalt	Schott, Mainz, Deutschland
Magnetrührer, Variomag Biomodul 40B	Rühren der Fermentationssuspension	H+P Labortechnik München, München, Deutschland
Petrischalen 633180	Oberflächenkultur	Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich
Spektralphotometer, Lambda 25	Messung der optischen Dichte der Fermentationssuspension	Perkin Elmer, Wellesley, USA
Vortex Mischer, Vortex Genie 2	Mischen der Zellsuspensionen für Verdünnungsreihen und Mischen der Schutzstoffe in Zellsuspensionen	Scientific Industries, Bohemia, USA
Wasseraktivitätsmessung, Novasina Sprint	Messung der Wasseraktivität	Novasina, Lachen, Schweiz
Widerstandstemperatursensor Pt 100, M-416	Messung Temperaturverlauf während des Gefrierens und während der Gefriertrocknung	Heraeus Sensor Technology, Kleinostheim, Deutschland
Zentrifuge, Multifuge 1S-R	Zellernte und -aufreinigung	Kendro, Langenselbold, Deutschland

Tabelle 14: Wasserdampftafel (Kessler, 1996)

$\vartheta$ °C	P Pa	$v''$ m <sup>3</sup> /kg	$h''$ kJ/kg	r kJ/kg	$\vartheta$ °C	P Pa	$v''$ m <sup>3</sup> /kg	$h''$ kJ/kg	r kJ/kg
-50	3,980	25880	2402	2845	+60	19917	7,682	2609,2	2358,4
-45	7,226	14571	2411	2844	62	21839	7,046	2612,6	2353,4
-40	12,28	8764	2421	2843	64	23909	6,473	2615,9	2348,4
-35	22,46	4895	2432	2841	66	26145	5,951	2619,3	2343,4
-30	38,13	2944	2441	2839	68	28557	5,478	2622,6	2338,3
-25	63,49	1804	2451	2838	70	31156	5,049	2626,4	2333,7
-20	103,5	1138	2460	2837	72	33960	4,658	2629,7	2328,7
-15	165,5	721	2471	2836	74	36961	4,302	2633,1	2323,7
-10	260,1	467	2480	2834	76	40188	3,977	2636,4	2318,6
-5	401,9	309	2490	2833	78	43649	3,681	2639,8	2313,2
0	610,8	206,3	2500,4	2500,4	80	47356	3,410	2643,1	2308,2
2	705,4	180,0	2503,7	2495,3	82	51328	3,162	2646,5	2303,2
4	812,9	157,3	2507,9	2491,1	84	55574	2,936	2649,4	2297,7
6	934,6	137,8	2511,2	2486,1	86	60105	2,728	2652,8	2292,7
8	1072	121,0	2515,0	2481,5	88	64949	2,537	2656,1	2287,6
10	1227	106,4	2518,8	2476,9	90	70108	2,361	2659,0	2282,2
12	1401	93,85	2522,5	2472,3	92	75609	2,200	2662,4	2277,2
14	1597	82,81	2526,3	2467,7	94	81464	2,051	2665,7	2272,2
16	1817	73,39	2530,1	2463,1	96	87691	1,914	2668,7	2266,7
18	2062	65,10	2533,4	2458,1	98	94301	1,789	2672,0	2261,7
20	2337	57,84	2537,2	2453,5	100	101325	1,673	2674,9	2256,3
22	2642	51,49	2541,0	2448,9	105	120800	1,419	2682,5	2242,5
24	2982	45,94	2544,7	2444,3	110	143270	1,210	2690,0	2229,1
26	3360	41,04	2548,1	2439,2	115	169060	1,036	2697,6	2215,2
28	3779	36,73	2551,9	2434,6	120	198540	0,8914	2704,7	2201,0
30	4241	32,93	2555,6	2430,0	125	232080	0,7701	2711,8	2187,2
32	4753	29,58	2559,4	2425,4	130	270110	0,6680	2718,5	2172,5
34	5318	26,61	2562,7	2420,4	135	313030	0,5817	2724,8	2157,5
36	5940	23,97	2566,5	2415,8	140	361380	0,5084	2731,9	2143,2
38	6624	21,63	2570,3	2411,2	145	415510	0,4459	2738,2	2127,7
40	7375	19,55	2573,6	2406,2	150	476020	0,3924	2744,4	2112,7
42	8198	17,70	2577,4	2401,5	155	543290	0,3464	2750,3	2096,7
44	9100	16,04	2580,7	2396,5	160	618020	0,3068	2756,2	2080,8
46	10085	14,56	2584,1	2391,5	165	700780	0,2724	2761,6	2064,5
48	11162	13,24	2587,9	2386,9	170	791990	0,2426	2767,1	2048,2
50	12335	12,05	2591,6	2382,3					
52	13613	10,98	2595,0	2377,3					
54	15002	10,02	2598,3	2372,7					
56	16509	9,164	2602,1	2368,1					
58	18146	8,385	2605,4	2363,0					

**Tabelle 15: Mittelwert der Geschwindigkeitskonstante  $k_{T,aw}$  und Standardabweichung  $\Delta k_{T,aw}$  für die Inaktivierung von *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* in einer Laktosematrix bei unterschiedlichen Temperaturen  $T_P$  und unterschiedlichen Wasseraktivitäten  $a_w$ .**

Temperatur $T_P$ (°C)	$a_w$ (-)	Geschwindigkeitskonstante $k_{T,aw}$ (d <sup>-1</sup> )	Standardabweichung $\Delta k_{T,aw}$ (d <sup>-1</sup> )
4	0,22	0,017	$4,5 \times 10^{-3}$
	0,33	0,023	$6,4 \times 10^{-3}$
	0,43	0,053	0,017
	0,75	0,13	0,018
15	0,22	0,024	$5,2 \times 10^{-3}$
	0,43	0,089	$8,3 \times 10^{-3}$
	0,75	0,53	0,11
20	0,07	0,014	$7,5 \times 10^{-3}$
	0,11	0,034	$2,5 \times 10^{-4}$
	0,22	0,077	$4,1 \times 10^{-3}$
	0,33	0,11	0,034
	0,43	0,20	0,051
30	0,07	0,019	$1,8 \times 10^{-3}$
	0,11	0,043	$2,5 \times 10^{-3}$
	0,22	0,19	0,054
	0,33	0,33	0,095
	0,43	1,05	0,21
37	0,07	0,019	$7,3 \times 10^{-3}$
	0,11	0,098	0,015
	0,22	0,44	$4,8 \times 10^{-3}$
	0,33	0,56	0,017
	0,43	2,49	0,53
-40	Gefr.	$4,0 \times 10^{-3}$	$3,3 \times 10^{-3}$

**Tabelle 16: Mittelwert der Geschwindigkeitskonstante  $k_{T,aw}$  und Standardabweichung  $\Delta k_{T,aw}$  für die Inaktivierung von *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* in einer Trehalosematrix bei unterschiedlichen Temperaturen  $T_P$  und unterschiedlichen Wasseraktivitäten  $a_w$ .**

Temperatur $T_P$ (°C)	$a_w$ (-)	Geschwindigkeitskonstante $k_{T,aw}$ (d <sup>-1</sup> )	Standardabweichung $\Delta k_{T,aw}$ (d <sup>-1</sup> )
4	0,33	0,034	$9,4 \times 10^{-3}$
	0,43	0,088	0,037
	0,75	0,20	0,048
15	0,22	0,023	$2,2 \times 10^{-3}$
	0,43	0,056	$5,3 \times 10^{-3}$
	0,75	0,41	0,074
30	0,07	0,037	$2,9 \times 10^{-3}$
	0,11	0,056	$1,7 \times 10^{-3}$
	0,22	0,16	0,08
	0,33	0,46	0,068

**Tabelle 17: Wasseraktivität, Aktivierungsenergie  $E_a$  und Stoßfaktor  $k_0$  für die Beschreibung der Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten  $k$  der Inaktivierung von *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* nach Arrhenius (Gleichung 5).**

Wasseraktivität $a_w$ (-)	$k_0$ (d <sup>-1</sup> )	Aktivierungsenergie $E_a$ (kJ/mol)
0,07	5,6	14
0,11	$3 \cdot 10^6$	45
0,22	$9 \cdot 10^{11}$	74
0,33	$4 \cdot 10^{11}$	70
0,42	$2 \cdot 10^{15}$	90
0,75	$10^{15}$	84

**Tabelle 18: Größenordnung der Aktivierungsenergie  $E_a$  für verschiedene Vorgänge Kessler (1996).**

<b>Bereich Aktivierungsenergie <math>E_a</math></b>	<b>Vorgang</b>
10 – 20 kJ/mol	Diffusion
50 – 150 kJ/mol	Chemische Reaktionen wie Vitaminabbau, Bräunungsreaktionen, Serumproteinaggregation, Lysinblockierung, Oxidation, Bildung von Hydroxymethylfurfural, Enzyminaktivierung
250 – 400 kJ/mol	Abtötung von Mikroorganismen, Enzyminaktivierung, Proteinauffaltung

## Lebenslauf

### Angaben zur Person

Bettina Higl  
geboren am 26.06.1979 in Aichach  
deutsche Staatsangehörigkeit

### Aktuelle Tätigkeit

seit Januar 2008 Ingenieurin bei der Firma Intervet International, Unterschleißheim

### Promotionsstudium

Juli 2003 – Dez. 2007 Wissenschaftliche Angestellte am Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung, TU München  
Dissertation am Lehrstuhl für Lebensmittelverfahrenstechnik und Molkereitechnologie, TU München  
*Thema:*  
*Bedeutung der Verfahrenstechnik und des Glaszustands für die Stabilität von Mikroorganismen während der Lyophilisation und der Lagerung*  
Angestrebter Akademischer Grad: Doktor-Ingenieur

### Diplomarbeit und Auslandsaufenthalt

Okt. 2002 – April 2003 Diplomarbeit bei Stable Micro Systems, Godalming, England  
Betreuung: Lehrstuhl für Maschinen- und Apparatekunde, TU München  
*Thema:*  
*Experimenteller Vergleich einer innovativen mit einer klassischen Methode zur Ermittlung der Fließfähigkeit von Schüttgütern am Beispiel pulverförmiger Lebensmittel*

### Studium

Nov. 1998 – April 2003 Technologie und Biotechnologie der Lebensmittel  
Technische Universität München  
*Abschluss: Diplom Ingenieurin (Univ.); Note 1,6*

### Schullaufbahn

Sept. 1989 – Juli 1998 Maria-Ward-Gymnasium, Augsburg  
*Abschluss: Allgemeine Hochschulreife*  
Sept. 1985 – Juli 1989 Grundschule Aindling