

塩類および糖類の混合物が凍結乾燥乳酸菌のコラプスおよび生菌数に及ぼす影響

川井 清司

広島大学大学院生物圏科学研究科

概要 凍結乾燥並びにその後の保存過程で機能低下する不安定な生物材料に対して、二糖などの保護物質が効果的なことは広く知られている。しかし、乳酸菌溶液に二糖を利用した場合、凍結乾燥過程において乾燥物がコラプスし易くなるという問題が発生する。コラプスは凍結乾燥時の材料温度が凍結濃縮ガラス転移温度(T_g')よりも高いときに発生するものと理解されており、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)或いは乳酸菌がトレハロースの T_g' を引き下げたためと考えられるが、その詳細は十分に理解されていなかった。本研究では代表的な二糖としてトレハロースを選定し、PBSおよび乳酸菌の添加がトレハロースの T_g' に及ぼす影響を調べた。また、コラプスが凍結乾燥乳酸菌の安定性に及ぼす影響についても検討した。トレハロースの T_g' は共存するPBSの増加と共に低下することが明らかとなった。一方、乳酸菌にはそのような効果は見られなかった。凍結濃縮によってPBSは共晶したが、トレハロースの添加によって抑制された。その結果、PBSはガラス状トレハロースに対して可塑剤として振る舞い、トレハロースの T_g' が低下したと考えられる。外挿値として求められたPBSの T_g' は -78°C であった。この値と実測したトレハロースの T_g' とを、2成分混合系におけるガラス転移温度を予測する式に適用することで、トレハロース-PBS擬似2成分系における T_g' の予測が可能になった。一方、トレハロースを添加した乳酸菌溶液を様々な温度で凍結乾燥した結果、棚温度が T_g' を大きく上回ったとき、凍結乾燥物はコラプスすることを確認した。この凍結乾燥乳酸菌を 37°C で1週間保存したときの生菌数を調べたが、コラプスの有無が生菌数に及ぼす影響は無かった。コラプスによって乾燥物のハンドリングは悪化するが、トレハロースが非晶質を維持していれば、乳酸菌の安定性への影響はないと考えられる。

1. 研究目的

凍結乾燥は不安定な生物材料を常温で保存可能にするための乾燥技術として広く利用されている。しかし、一部の生物材料は凍結乾燥過程で被るストレスによって機能低下を招く。それを防ぐため、様々な保護剤の利用が検討されている^{1,2)}。

これまでに筆者らは凍結乾燥によって活性が大きく低下する酵素を対象に、二糖をベースとした保護剤の効果について検討してきた³⁻⁵⁾。酵素に二糖を添加して凍結乾燥すると、酵素は二糖が凍結濃縮によって形成したガラス状態のマトリクスに包埋された状態となる。このとき、二糖は酵素と水素結合を形成することで、水の代替品として振舞い、酵素の構造を安定化する(水置換効果)。また、ガラス状態では系の分子運動が著しく制限されるため、各種

劣化速度が停滞し、速度論的に安定化する(ガラス化効果)。こうした知見は乳酸菌の常温安定化にも適用される。しかし、乳酸菌を試料とした研究では、凍結乾燥過程において乾燥物がコラプスするという問題に直面する。ここでコラプスとは乾燥物が多孔質構造を維持できず、水飴様に収縮する現象であり、乾燥効率、乾燥物のハンドリング、保存性に悪影響を及ぼす物理的劣化の一つとして理解されている。

コラプスは凍結乾燥時の材料温度が凍結濃縮ガラス転移温度(T_g')よりも高いときに発生するものと理解されている¹⁾。一般に食品中の水は系全体に分散した状態で存在する。しかし、凍結下では氷結晶相と凍結濃縮相とに相分離した状態となり、凍結濃縮相の固形分量は凝固点降下曲線にしたがって温度の低下と共に高くなる(Fig. 1)。

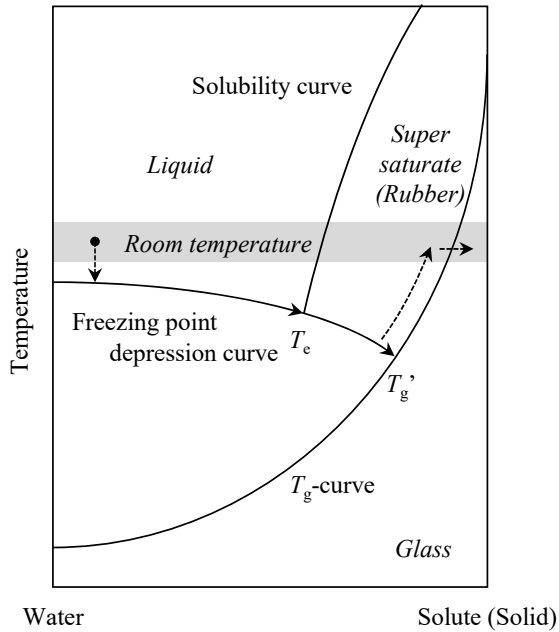


Fig. 1. State diagram of solute-water pseudo binary system

やがて共晶点(T_c)に達したとき、凍結濃縮は停止する。しかし、糖のような粘性の高い溶質の場合、冷却過程で共晶できず、凍結濃縮は更に低温まで進行して粘性が高まる。やがて凍結濃縮ガラス転移温度(T_g')に達したところで凍結濃縮相は分子運動(主に並進運動)を失い、見かけ上固体になる。ガラス状態の凍結濃縮相は分子運動が制限されているため、様々な化学反応速度や物理変化速度(氷結晶の再結晶化や溶質の結晶化など)が停滞する。一方、凍結乾燥では凍結した材料を減圧下に置き、氷を昇華させる。このとき凍結濃縮相が構造的に強固な T_g' 近傍温度にあればコラプスは抑制され、氷が昇華した後の空隙が維持される。

二糖を加えた乳酸菌が凍結乾燥過程でコラプスする理由として、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)および乳酸菌が二糖と相互作用した結果、二糖の T_g' が引き下げられたと考えられる。コラプスは凍結乾燥効率や乾燥物のハンドリングに悪影響を及ぼすだけでなく、試料の保存性を低下させる可能性も指摘されるが、その詳細は十分に理解されていなかった。本研究で二糖としてトレハロースを選定し、PBS および乳酸菌の混合がトレハロースの T_g' に及ぼす影響を解明すると共に、 T_g' が凍結乾燥乳酸菌のコラプスおよび生菌数に及ぼす影響について検討することを目的とした。

2. 方法

2.1 材料

トレハロース(株式会社林原)、PBS(ニッセイ株式会社)、MRS Broth(Merck Millipore Co., Germany)、寒天(和光純薬工業株式会社)を用いた。乳酸菌は *Lactobacillus reuteri* JCM1112^T(国立研究開発法人理化学研究所バイオリソースセンター)を用いた。その他の試薬はナカライテスク株式会社より試薬グレードのものを購入した。

2.2 水溶液試料

PBS 粉末に蒸留水を加え、9.55 mg/ml に調節したものを PBS 溶液とした。PBS 溶液(1 ml)は塩化ナトリウム(8.0 mg)、塩化カリウム(0.2 mg)、リン酸水素二ナトリウム(1.15 mg)、リン酸二水素カリウム(0.2 mg)によって構成されている。この PBS 溶液にトレハロースを加え、50~400 mMトレハロース PBS 溶液を調製した。比較のため、PBS 溶液の代わりに蒸留水を用いて 400 mMトレハロース水溶液を調製した。また、PBS 溶液の濃度を 2 倍(19.1 mg/ml)および 10 倍(95.5 mg/ml)に調製し、そこにトレハロースを加えて 400 mMトレハロース PBS 溶液を調製した。

PBS 溶液を構成する電解質各々の影響を調べるため、塩化ナトリウム-塩化カリウム混合溶液およびリン酸水素二ナトリウム-リン酸二水素カリウム混合溶液を PBS 溶液と同じ混合比で調製した。また、136.9 mM の各種電解質と 400 mMトレハロースとを共存させたトレハロース PBS 溶液を調製した。

乳酸菌溶液を 1 ml 採り、40 ml の MRS 培地を入れた遠沈管に添加し、37°Cで 24 時間培養した。得られた乳酸菌溶液を 3,000 rpm で 10 分間遠心し、上澄みを捨て、PBS 溶液で懸濁した。この操作を 3 回繰り返した。得られた乳酸菌溶液の吸光度を測定し、PBS 溶液を添加することで、乳酸菌の濃度を 2×10^{10} cells/ml に設定した。一方、800 mMトレハロース PBS 溶液を調製し、マイクロフィルターを通した。バイアル瓶に細菌溶液(0.5 ml)と 800 mMトレハロース PBS 溶液(0.5 ml)とを混合し、 1×10^8 cells/ml の乳酸菌を含む 400 mMトレハロース PBS 溶液試料を調製した。

2.3 示差走査熱量測定

各水溶液試料の T_g' は示差走査熱量測定(DSC120, セイコーインスツル株式会社)によって調べた。DSC 本体の温度およびに熱量校正には水、塩化ナトリウム水溶液、塩化カルシウム水溶液、インジウムを用いた。試料(約 20 mg)

をアルミニウム製 DSC パンに採り、 $-60\sim 25^{\circ}\text{C}$ の温度範囲を $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で昇温走査した。DSC 昇温曲線上に認められる吸熱シフトの開始点から T_g' を読み取った。測定は各 2 回行い、平均値を得た。

2. 4 凍結乾燥乳酸菌の生菌数測定

先述の手順にしたがい、乳酸菌を含む 400 mM トレハロースPBS 溶液試料を調製した。これを -20°C の冷凍庫にて 12 時間予備凍結した。棚温度を予め -35°C 、 -20°C 、 -10°C に設定した凍結乾燥装置に移し、1 時間保持した後、減圧して 70 Pa 以下で 21 時間乾燥した(1 次乾燥)。その後、棚温度を $5^{\circ}\text{C}/\text{h}$ で昇温し、 5°C まで昇温しながら乾燥した(2 次乾燥)。バイアル瓶に蓋をして、 37°C で 7 日間保存した。

保存後、試料に PBS 溶液 (10 ml) を添加し、ボルテックスによって 1 分間攪拌した後、室温で 15 分間保持した。再度攪拌した後、懸濁溶液 (1 ml) を採り、希釈倍率の異なる試料を調製した。それぞれ 0.1 ml を MRS 寒天培地に滴下し、三角ガラス棒で培地表面に塗り広げた。各種培地を 37°C に設定したインキュベーター内で 2 日間培養し、コロニー数をカウントした。凍結乾燥前の \log 生菌数に対する保存後の \log 生菌数を生存率 (%) として求めた。測定は各 3 回行い、平均値を得た。

3. 結果および考察

3. 1 凍結濃縮ガラス転移温度

400 mM トレハロース水溶液、 400 mM トレハロース PBS 溶液、乳酸菌を加えた 400 mM トレハロース PBS 溶液の DSC 昇温曲線を Fig. 2 に示す。いずれの試料もガラス転移を反映した吸熱シフトを示し、その開始点から T_g' を決定することができた。糖溶液の DSC 昇温曲線にはガラス転移様吸熱シフトが二つ検出されることが明らかにされており、一般に低温の吸熱シフトは $T_g'-1$ 、高温の吸熱シフトは $T_g'-2$ と表される⁶⁻¹²⁾。この分類において、本研究では $T_g'-2$ に該当する吸熱シフトを凍結濃縮ガラス転移温度として扱っている。尚、 $T_g'-1$ に該当する吸熱シフトのステップ幅は非常に小さく、Fig. 2 からは確認できない。二つの吸熱シフトの帰属については様々な解釈が与えられており、その中には $T_g'-2$ は凍結濃縮ガラス転移ではないとする解釈もある。しかし、 $T_g'-2$ 以上では氷結晶の成長、溶質の結晶化、コラプス生成などが顕著に認められる事実を

考慮すると^{1, 7, 8, 12)}、 $T_g'-2$ を凍結濃縮ガラス転移温度として扱うことはむしろ妥当といえる。

各試料の DSC 昇温曲線の比較により、トレハロースの T_g' は PBS の添加によって低くなることが明らかとなった。一方、そこに乳酸菌を加えても T_g' は変化しなかった。

3. 2 凍結濃縮に伴う共晶と昇温結晶化

凍結濃縮下における PBS 溶液の物理的性状変化を理解するため、PBS 溶液、塩化ナトリウム-塩化カリウム混合溶液、リン酸水素二ナトリウム-リン酸二水素カリウム混合溶液の DSC 測定を実施した。

各試料の DSC 昇温曲線を Fig. 3 に示す。PBS 溶液は

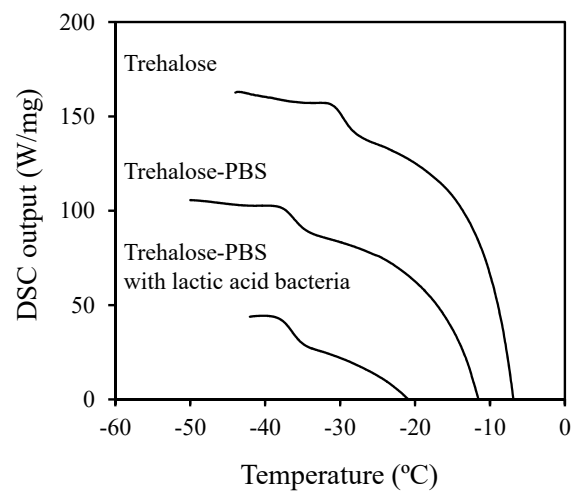


Fig. 2. DSC thermograms for 400 mM trehalose solution, 400 mM trehalose-PBS solution, and 400 mM trehalose-PBS solution containing lactic acid bacteria

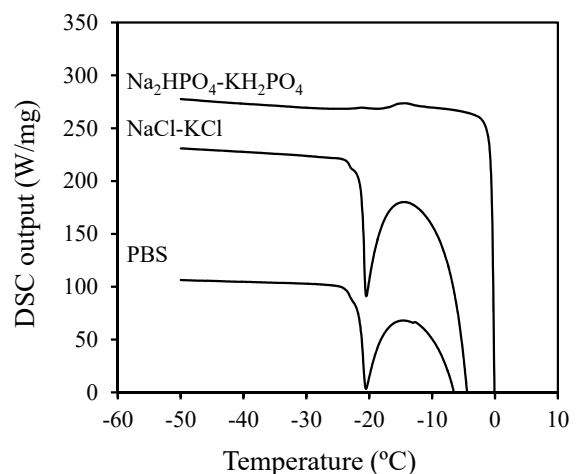


Fig. 3. DSC thermograms for PBS solution, NaCl-KCl solution, and $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ solution

-21°C 付近に吸熱ピークを示した。これは塩化ナトリウムの共融点と一致する。塩化ナトリウム-塩化カリウム混合溶液も PBS 溶液とはほぼ同様の結果を示した。一方、リン酸水素二ナトリウム-リン酸二水素カリウム混合溶液に吸熱ピークは無く、-18°C 付近に小さな発熱ピークが認められた。この発熱ピークは昇温結晶化によるものと考えられる。水溶液が昇温結晶化を示すということは、凍結過程において電解質は共晶していなかったことを意味する。電解質水溶液の凍結濃縮下での物理的性状変化は、中性の pH 緩衝溶液に利用されるリン酸塩において広く調べられている。pH 緩衝溶液は凍結濃縮に伴う pH 変化を抑えるが、共晶すると緩衝効果は失われ、pH は急激に変化する。

したがって、pH 緩衝溶液の共晶点は凍結濃縮下での安定性を確保する上で重要な因子となる。例えば、リン酸カリウム緩衝溶液はリン酸ナトリウム緩衝溶液よりも共晶点が低く^{13, 14)}、凍結濃縮下での pH 緩衝作用に優れる¹⁾。緩衝溶液の溶質濃度が低い場合、凍結濃縮に伴う塩の析出は不完全となり、低温でガラス化する^{13, 14)}。また、共存する物質が緩衝溶液の結晶化を抑制することも知られている。トレハロース PBS 溶液において各種電解質による共融や昇温結晶化が認められなかった理由として、凍結濃縮によってトレハロースが形成するガラスマトリクスに各種電解質が包埋され、塩として析出できなかったためと考えられる。したがって、各種電解質はトレハロースのガラスマトリクスの中で非晶質として存在し、可塑剤として作用するため、 T_g' が低下したと考えられる。

3.3 トレハロース-PBS 疑似二成分系の T_g' 変化

PBS 溶液は凍結濃縮によって共晶するため、その T_g' を含めた非晶質としての特徴を捉えることはできない。しかし、トレハロースマトリクス中で共晶が抑制されるのであれば、トレハロース PBS 溶液の組成と T_g' との関係から、外挿値として T_g' を見積もることができる。

一定濃度の PBS 溶液 (9.55 mg/ml) に対してトレハロースの濃度を変化させたときの T_g' を Fig. 4 に示す。トレハロース PBS 水溶液の T_g' はトレハロース濃度の低下と共に低下した。この挙動は対数近似として良好に表すことが可能であり、外挿値として得られた PBS の T_g' は -78°C であった。

様々な濃度の PBS 溶液を用いて調製した 400 mM トレハロース PBS 溶液の T_g' を Fig. 5 に示す。PBS 濃度の増

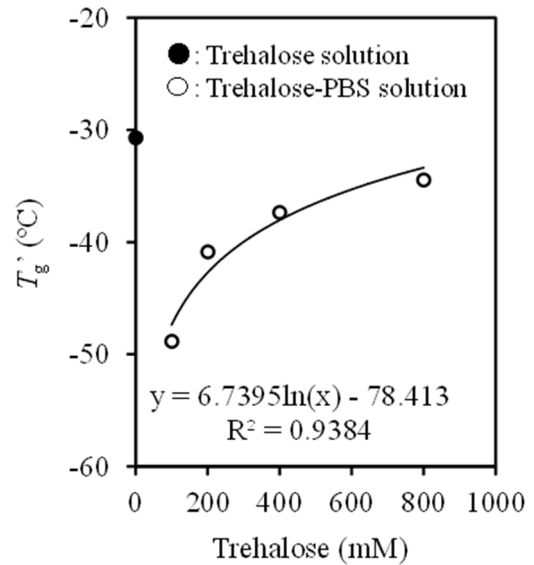


Fig. 4. Effect of trehalose content on the T_g' of trehalose-PBS solution

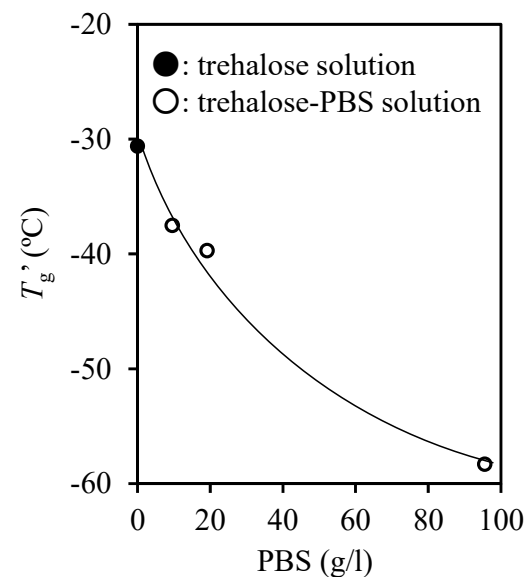


Fig. 5. Effect of PBS content on the T_g' of 400 mM trehalose-PBS solution

加と共に T_g' は低下することが明らかとなった。この傾向から推定される PBS 無限濃度での T_g' はやはり -78°C あたりに見える。

これらの挙動を定量的に整理するため、本研究では合成高分子の混合によるガラス転移温度 (T_g) の変化を表す Gordon-Taylor (GT) 式 (式 1) に着目した^{15, 16)}。

$$T_g = (T_{g1}W_1 + kT_{g2}W_2)/(W_1 + kW_2) \quad (式 1)$$

ここで W_1 および W_2 は成分 1 および成分 2 の質量分率、 T_{g1} および T_{g2} は成分 1 および成分 2 の T_g 、 k は定数である。 T_g と T_g' とは物理的意味が本質的に異なる。本研究で用いた試料はトレハロース、PBS (4 種類の塩の混合物)、水から構成されており、複雑な多成分系である。しかし、 T_g' は凍結濃縮相の T_g であり、溶液の初期濃度に依存しないため、水を無視しても解析上は差し支えない。即ち、本研究で用いた試料はトレハロース-PBS の疑似 2 成分系と位置付けることで、GT 式による解析を採用することができる。

Fig. 4 および 5 に示した各試料の濃度をトレハロースと PBS との質量分率として表し、 T_g' をプロットした結果を Fig. 6 に示す。ここに示す実線は GT 式へのフィッティング解析によって得られたものである。即ち、 T_g を T_g' に置き換えた上で、 $T_{g'1}$ にトレハロースの T_g' (実測値) として 242.5 K を、 $T_{g'2}$ に PBS の T_g' (外挿値) として 194.8 K を与え、未知数である k を実験データにフィットした。決定された k は 2.0 であり、Fig. 6 に示す実線が導かれた。これにより、PBS 添加に伴うトレハロースの T_g' 低下を予測することが可能になった。

3. 4 PBS を構成する各種塩類の効果

PBS は 4 つの塩類の混合物である。これら全ての塩類にトレハロースの T_g' を引き下げる効果があるとは限らない。例えばトリポリリン酸ナトリウム-グルコース混合系の T_g' は各々の成分が水と単独で存在するときの T_g' よりも高くなり、グルコースのモル分率が 0.67 あたりで極大を示すことが知られている¹⁷⁾。同様の傾向はその他の少糖-リン酸塩混合溶液においても報告される¹⁸⁾。これらは、リン酸のリン酸基と糖質の水酸基とが水素結合を形成し、ガラスに対して可塑剤として作用する水分子が凍結濃縮相から排除されるためと考えられる。以上の知見より、PBS に含まれる塩類には T_g' を引き下げる塩類と、引き上げる塩類とが混在しており、そのバランスによって T_g' が決まると考えられる。このことについて検証するため、各種塩類を単独で添加した際の影響を調べた。

400 mM トレハロースに各 136.9 mM 塩溶液を共存させた水溶液の DSC 昇温曲線を Fig. 7 に示す。リン酸水素二ナトリウムおよびリン酸二水素カリウムはトレハロースの T_g' を若干低下させる程度に留まったが、塩化ナトリウムおよび塩化カリウムはそれを大きく低下させた。以上の結果よ

り、PBS を構成する各種塩類はいずれもトレハロースの T_g' を低下させること、塩化ナトリウムおよび塩化カリウムの効果が特に顕著なことが明らかとなった。

3. 5 凍結乾燥乳酸菌のコラプスと生菌数

乳酸菌を含めた 400 mM トレハロース-PBS 溶液を様々な棚温度 (-35°C, -20°C, -10°C) で凍結乾燥した。試料の T_g' は -37°C であり、いずれの条件においても 1 次乾燥はラバー状態にあったと考えられる。目視観察において、-35°C での凍結乾燥試料は多孔質構造を維

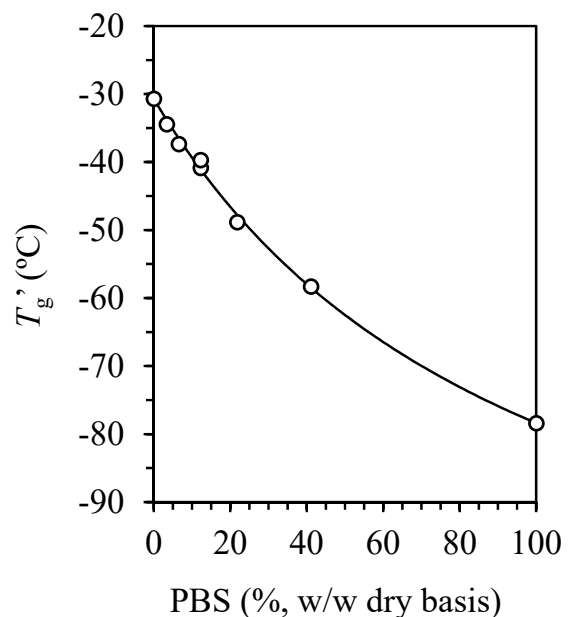


Fig. 6. T_g' for trehalose-PBS pseudo binary system

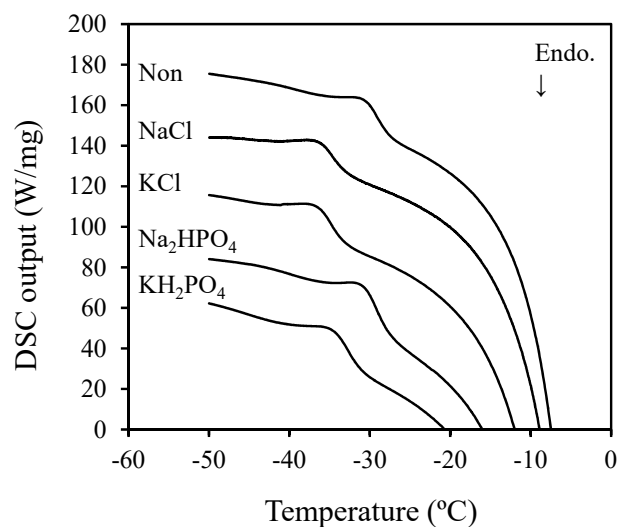


Fig. 7. DSC thermograms for trehalose-electrolyte solutions

持していたが、それよりも高温で凍結乾燥した試料はコラプスしていた。一般に二糖のコラプスは T_g 'よりも十数℃高温で起こるといわれている¹⁾。棚温度が-35℃のとき、 T_g 'と棚温度との温度差は僅か2℃であり、多孔質構造を維持するのに十分な低温であったと考えられる。一方、棚温度-20℃のとき T_g 'と棚温度との温度差は-17℃あり、凍結濃縮相の軟化によって多孔質構造を維持できなかったと考えられる。

各凍結乾燥試料を37℃で1週間保持し、乳酸菌の生存率を調べた。得られた結果を Fig. 8 に示す。本乳酸菌を保護剤無添加で凍結乾燥し、同条件で保存すると、生存率は大幅に低下することを予備検討で確認した。一方、400 mM トレハロースを含む試料はいずれも同程度に高い生存率を示しており、トレハロースによる高い保護効果を確認することができた。また、コラプスの有無が乳酸菌の生存率に及ぼす影響は無いことが明らかとなった。

4. 今後の課題

トレハロースは乳酸菌に対して高い凍結乾燥保護効果を示すが、PBS の共存によって T_g 'が引き下げられるため、コラプスし易くなること、コラプスによって乾燥物のハンドリングは悪化するが、トレハロースが非晶質を維持していれば、乳酸菌の安定性には影響しないことなどを明らかにした。コラプスを防ぐにはトレハロース濃度を上げること、 T_g 'の高い親水性高分子(デキストリンなど)を共存させることなどの対策が有効と考えられるが、こうした対応が乳酸菌の安定性に悪影響をもたらす事例は多い。物理的安定性と生化学的安定性とを両立させた最適凍結乾燥条件を決定することが今後の課題といえる。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成をいただいた公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団に厚く御礼申し上げます。

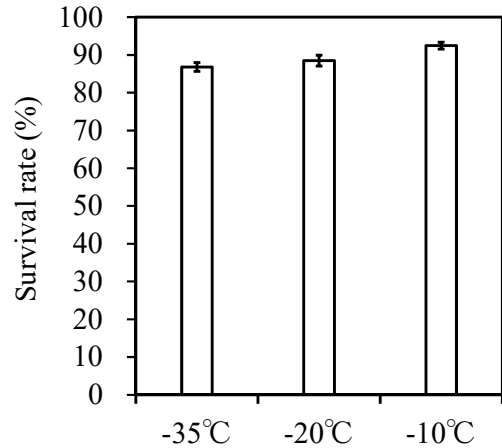


Fig. 8. Effect of drying temperature on the survival rate of freeze-dried lactic acid bacteria

文献

- 1) W. Wang. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *Int. J. Pharm.*, **203**, 1-60 (2000).
- 2) T. Arakawa, S. J. Prestrelski, W. C. Kenney, and J. F. Carpenter. Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **46**, 307-326 (2001).
- 3) K. Kawai and T. Suzuki. Stabilizing effect of four types of disaccharide on the enzymatic activity of freeze-dried lactate dehydrogenase: step by step evaluation from freezing to storage. *Pharm. Res.*, **24**, 1883-1890 (2007).
- 4) P. Srirangsan, K. Kawai, N. Hamada-Sato, M. Watanabe, and T. Suzuki. Improvement in the remaining activity of freeze-dried xanthine oxidase with the addition of a disaccharide-polymer mixture. *Food Chem.*, **119**, 209-213 (2010).
- 5) P. Srirangsan, K. Kawai, N. Hamada-Sato, M. Watanabe, and T. Suzuki. Stabilizing effects of sucrose-polymer formulations on the activity of freeze-dried enzyme mixture of alkaline phosphatase, nucleoside phosphorylase and xanthine oxidase. *Food Chem.*, **125**, 1188-1193 (2011).
- 6) S. Ablett, M. J. Izzard, and P. J. Lillford. Differential scanning calorimetric study of frozen sucrose and glycerol solutions. *J. Chem. Soc. Fara. Trans.*, **88**,

- 789-794 (1992).
- 7) E. Y. Shalaev and F. Franks. Structural glass transitions and thermophysical processes in amorphous carbohydrates and their supersaturated solutions. *J. Chem. Soc. Fara. Trans.*, **91**, 1511-1517 (1995).
 - 8) H. Levine and L. Slade. Principles of "cryostabilization" technology from structure/property relationships of carbohydrate/water system -a review. *Cryo-Lett.*, **9**, 21-63 (1988).
 - 9) A. Pyne, R. Surana, and R. Suryanarayanan. Enthalpic relaxation in frozen aqueous trehalose solutions, *Thermochim. Acta.* **405**, 225-234 (2003).
 - 10) G. Blond. Water-galactose system: supplemented state diagram and unfrozen water. *Cryolett.*, **10**, 299-308 (1989).
 - 11) G. Blond and D. Simatos. Optimal thermal treatments to obtain reproducible DSC thermograms with sucrose + dextran frozen solutions. *Food Hydrocol.*, **12**, 133-139 (1998).
 - 12) B. S. Chang and C. S. Randall. Use of subambient thermal analysis to optimize protein lyophilization. *Cryobiol.*, **29**, 632-656 (1992).
 - 13) N. Murase and F. Franks. Salt precipitation during the freeze-concentration of phosphate buffer solution. *Biophys. Chem.*, **34**, 293-300 (1989).
 - 14) N. Murase, P. Echlin, and F. Franks. The structure states of freezing-concentrated and freeze-dried phosphates studied by scanning electron microscopy and differential scanning calorimetry. *Cryobiol.*, **28**, 364-375 (1991).
 - 15) K. Kawai, K. Fukami, P. Thanatuksorn, C. Viriyarattanasak, and K. Kajiwara. Effects of moisture content, molecular weight, and crystallinity on the glass transition temperature of inulin. *Carbohydr. Polym.*, **83**, 934-939 (2011).
 - 16) K. Fukami, K. Kawai, S. Takeuchi, Y. Harada, and Y. Hagura. Effect of water content on the glass transition temperature of calcium maltobionate and its application to the characterization of non-Arrhenius viscosity behavior. *Food Biophys.*, **11**, 410-416 (2016).
 - 17) K. Kawai and T. Suzuki. Effect of sodium tripolyphosphate on the freeze-concentrated glass-like transition temperature of sugar aqueous solutions. *Cryo-Lett.*, **27**, 107-114 (2006).
 - 18) N. Harnkarnsujarit, M. Nakajima, K. Kawai, M. Watanabe, and T. Suzuki. Thermal properties of freeze-concentrated phosphate-sugar solutions. *Food Biophys.*, **9**, 213-2181 (2014).

Effects of Salt, Carbohydrate, and Their Mixture on the Collapse and Viable Cell Count of Freeze-Dried Lactic Acid Bacteria

Kiyoshi Kawai

Hiroshima University

Summary

It is known that structural collapse occurs when freeze-drying temperature is higher than freeze-concentrated glass transition temperature (T_g'). Trehalose is a good protectant for freeze-dried lactic acid bacteria (LAB), but structural collapse occurs readily during freeze-drying in spite of relatively high T_g' . As the reason, it was suggested that co-existed materials such as phosphate buffered saline (PBS) and LAB reduced the T_g' of trehalose. The purpose of this study was to understand effects of PBS and LAB on the T_g' of trehalose. In addition, effect of structural collapse on the survival rate of freeze-dried lactic acid bacteria was investigated. The T_g' of sample was investigated using a differential scanning calorimetry. Trehalose and PBS aqueous solution samples showed freeze-concentrated glass transition and eutectic, respectively. In the case of trehalose-PBS aqueous solution sample, eutectic of PBS was prevented by trehalose, and the T_g' decrease with increase in PBS content. There was no effect of LAB on the T_g' of trehalose. The T_g' change was summarized as a T_g' -curve in trehalose-PBS pseudo binary system. The T_g' of PBS was predicted to be -78 °C. On the other hand, structural collapse occurred when the sample was freeze-died at much higher temperature than T_g' . There was negligible effect of structural collapse on the survival rate of freeze-dried LAB. From these results, it was suggested that biological stability of LAB could be maintained if there was no re-crystallization of trehalose induced by structural collapse.