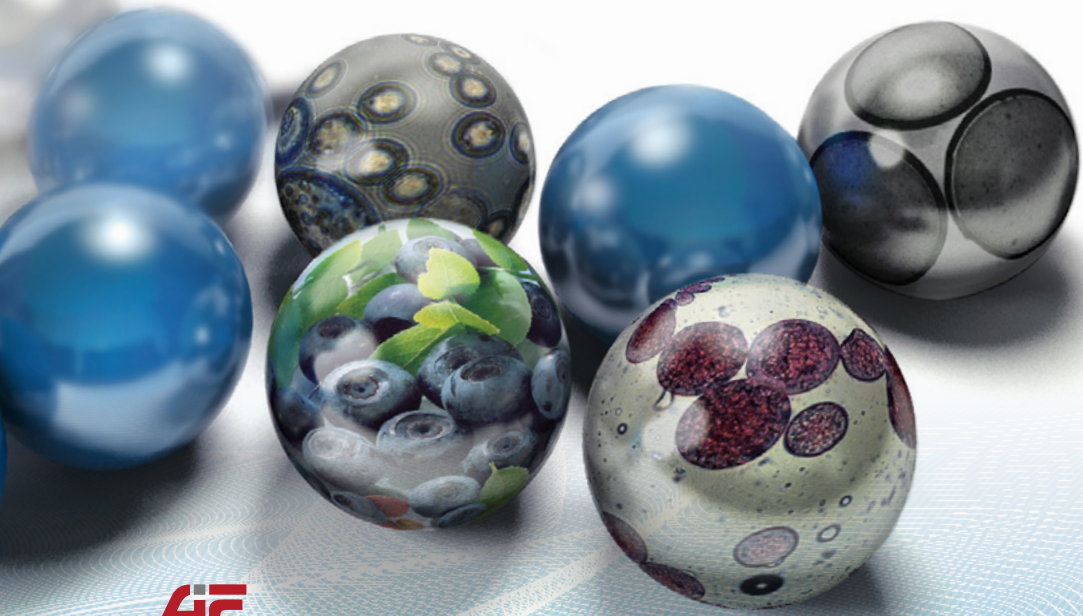




FORSCHUNGSKREIS DER
ERNÄHRUNGSINDUSTRIE E.V.

Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten Multikapselsystemen

**Zentrale Ergebnisse des gleichnamigen
DFG/AiF-Clusterprojektes**



Zentrale Ergebnisse des DFG/AiF-Clusterprojektes

**Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikro-
strukturierten Multikapselsystemen:
Untersuchungen zum Einfluss der
Mikrostruktur und der molekularen
Zusammensetzung auf die
Stabilisierung und kontrollierte
Freisetzung von sekundären Pflan-
zenstoffen und deren Auswirkung
auf biologische Signalparameter**

2008 - 2011

Förderung durch:



DFG



AiF ALLIANZ
INDUSTRIE
FORSCHUNG

Impressum

ISBN 978-3-925032-49-3

Herausgeber

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)
Godesberger Allee 142-148
D-53175 Bonn

Redaktion

Dr. Volker Häusser
Daniela Kinkel

Layout/Gestaltung

freiart gmbh, Königswinter

Druck

Bonner Universitäts-Buchdruckerei, Bonn

© FEI e. V. 2011

Inhalt

Einführung und Motivation	5
Konzeption u. Beteiligte des DFG/AiF-Clusterprojektes	9
Teilprojekt 1 (AiF)	11
Prozessinduzierte Ausbeutesteigerung von wertgebenden sekundären Pflanzeninhaltsstoffen aus Blaubeeren und Vergleich ihrer Stabilität in Multikapselsystemen gegenüber konventionellen Produkten (AiF 15610 N)	
Summary Subproject 1	23
Teilprojekt 2 (DFG)	25
Bildungskinetik, rheologische Eigenschaften und induzierter struktureller Abbau von biofunktionalen Hüllschichten und Mikrokapseln	
Summary Subproject 2	34
Teilprojekt 3 (AiF)	35
Milchproteinhydrogele als Trägerstoffe für bioaktive Substanzen: Wasserunlösliche Mikrokapselsysteme zur Stabilisierung und kontrollierten Freisetzung von bioaktiven Inhaltsstoffen aus der Heidelbeere (AiF 15611 N)	
Summary Subproject 3	44
Teilprojekt 4 (AiF)	47
Mikrostrukturierte multidisperse Hüllkapseln als Träger bioaktiver Substanzen: Untersuchungen zum Einfluss von molekularen Wechselwirkungen und Diffusionsbarrieren auf die Stabilität und die Freisetzung von Inhaltsstoffen aus der Wildheidelbeere (AiF 15612 N)	
Summary Subproject 4	60
Teilprojekt 5 (AiF)	63
Mikroverkapselung von Anthocyanen durch Sprühverfahren unter Ausnutzung von stabilisierenden Prinzipien der natürlichen Zellsaftvakuole und Interaktionen von Inhaltsstoffen (AiF 15613 N)	
Summary Subproject 5	72
Teilprojekt 6 (DFG)	73
Nichtinvasive In-vitro- und In-vivo-Charakterisierung von Multikapselsystemen	
Summary Subproject 6	90

TP
1

TP
2

TP
3

TP
4

TP
5

TP
6

TP
7

Teilprojekt 7 (AiF)	91
Biologische Wirksamkeit von Blaubeer-Anthocyanen im Vergleich zu mikro-/nano-verkapselten Anthocyan-Präparaten: Modulation von intestinaler Verfügbarkeit, Fermentation, antioxidativer Wirksamkeit und Wirkungen auf die DNA-Integrität (AiF 15614 N)	
Summary Subproject 7	101
Ziele und Ergebnisse des Clusterprojektes (Zusammenfassung)	103
Aims and results of the cluster project (Summary)	110
Publikationen aus dem Clusterprojekt (Auswahl)	116

Einführung und Motivation

Pflanzliche Lebensmittel, insbesondere Obst und Gemüse, spielen eine wichtige Rolle in der Gesunderhaltung der Gesellschaft. Der Nachweis der gesundheitsfördernden Wirkungen von Obst und Gemüse beim Menschen beruht heute hauptsächlich auf epidemiologischen Studien. Eindeutig die Gründe belegende Interventionsstudien fehlen leider noch. Neuere, vergleichende Studien zeigen zudem, dass gesundheitsfördernde Wirkungen nur bei den komplex zusammengesetzten Lebensmitteln, wie Säften oder Extrakten aus Obst und Gemüse, nachweisbar sind, während bei daraus isolierten Inhaltsstofffraktionen oder chemisch synthetisierten Einzelmolekülen nur eine deutlich reduzierte oder keine Wirkung zu finden ist. Die Gründe hierfür sind weitgehend unbekannt. Möglich wäre es, dass die in den Studien eingesetzten isolierten Moleküle außerhalb der natürlichen Lebensmittelumgebung instabil sind, oder dass die eigentliche biologische Wirkung erst durch Wechselwirkungen zwischen unterschiedlichen Molekülen des Lebensmittels erzielt wird. Dies führte u. a. dazu, dass die Wirkung von aus Obst und Gemüse isolierten Molekül(fraktion)en als Nahrungsergänzungsmittel oder Zusatzstoffe in funktionellen Lebensmitteln in der Fachwelt sehr kontrovers diskutiert wird.

In diesem aktuellen Spannungsfeld wurde das Clustervorhaben „Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten Multikapselsystemen“ angesiedelt. Die Chance, Grundlagenforschung mit anwendungsorientierten Fragestellungen direkt kombinieren zu können, bot dabei die einmalige Gelegenheit, die sich in einem so komplexen Themengebiet ergebenden Fragen gezielt zu bearbeiten und die Bedeutung der Obst- und Gemüse-basierten Lebensmittel für die menschliche Ernährung besser verstehen zu können.

Hierzu wurden Pflanzenstoffe ausgewählt, von denen bekannt war, dass sie in der natürlichen Matrix – als pflanzliches Produkt – positive physiologische Wirkung zeigen, diese aber verlieren, sobald sie daraus isoliert werden oder als Einzelstoff Lebensmitteln zugesetzt werden. Die Wild Heidelbeere als Quelle natürlicher Anthocyane bot sich hier als Modellstoff an. Die färbende Wirkung der Anthocyane ist eine wichtige zweite Eigenschaft von hohem industriellem Interesse, bedenkt man die aktuelle Diskussion um das Verbot von Azofarbstoffen.

Das Clusterprojekt wurde so angelegt, dass die wissenschaftlichen Fragestellungen um die biologische Wirkung der Anthocyane grundlegend bearbeitet werden konnten. Dazu mussten Formulierungen entwickelt werden, die es ermöglichten, diese Moleküle stabil an einen bestimmten Ort im menschlichen Magen-Darm-Trakt zu bringen und dort freizusetzen. Die Instabilität dieser Stoffklasse außerhalb der natürlichen Matrix hatte bis dahin entsprechende Studien verhindert. Der Charme dieses Ansatzes lag darin, dass damit nicht nur eine Chance zu physiologischer und biochemischer Grundlagenforschung eröffnet wurde, sondern gleichzeitig die Grundlagen geschaffen wurden, um die sich als

geeignet herausstellenden Stabilisierungssysteme zeitnah und zielgerichtet in Produktformulierungen umzusetzen. Da Fragestellungen rund um die Stabilisierung von Wirkstoffen und deren Freisetzung im Gastrointestinaltrakt in der pharmazeutischen Forschung eine grundlegende Rolle spielen, wurden die dort eingesetzten Methoden durch Einbindung einer entsprechenden Forschergruppe übertragen.

Für die Untersuchungen musste zunächst sichergestellt werden, dass die aus der natürlichen Umgebung isolierten Inhaltsstoffe stabil bleiben und am Wirkort ankommen. Hierzu sollten unterschiedliche Verkapselungstechnologien eingesetzt werden. Das Wort „Kapsel“ steht hierbei nicht für eine Formulierungsform in der Größenordnung von mehreren Millimetern bis hin zu Zentimetern, wie man sie aus Medikamenten kennt, sondern für Strukturen im Mikrometermaßstab, die vergleichbare Eigenschaften haben, aber problemlos in Lebensmitteln eingesetzt werden können. Ausgewählt wurden „mikrostrukturierte“ Formulierungen, die aus konventionellen Lebensmittelrohstoffen und lebensmittelzugelassenen Hilfsstoffen hergestellt werden. Voraussetzung für die Entwicklung war, diese so zu strukturieren, dass sie – wie Kapseln – die Inhaltsstoffe vor äußeren, schädigenden Einflüssen schützen, die benötigten Milieubedingungen für eine lange Stabilität anbieten, im Gastrointestinaltrakt aber an der gewünschten Stelle aufgelöst werden und die Inhaltsstoffe freisetzen.

Dazu mussten neue Herstellungsverfahren entwickelt werden, wobei darauf geachtet wurde, auf in der Lebensmittelindustrie bekannte, konventionelle Technologien aufzubauen, um so später eine schnelle Umsetzung zu vereinfachen.

Die „verkapselnd“ wirkenden Formulierungen hatten primär das Ziel, Studien zur (positiven) biologischen Wirkung, aber auch zu (negativen) Nebenwirkungen (z. B. Toxizität bei hohen Konzentrationen) *in vitro* und *in vivo* *) zu ermöglichen. Sie boten aber auch eine Chance, Sinn und Unsinn von verkapselten, isolierten Inhaltsstoffen aus Obst- und Gemüseprodukten zu hinterfragen und Anwendungspotentiale, aber auch Grenzen, aufzuzeigen. Interessant für mögliche spätere Anwendungen war, dass neben konventionellen Verkapselungstechniken auch neue, bislang nicht eingesetzte Technologien Anwendung fanden und Rohstoffe zur Verkapselung eingesetzt wurden, die aus natürlichen Obst- und Gemüseprodukten stammten. Auch wenn in diesem Projektvorhaben nur Daten zu einem einzigen Produkt, der Wildheidelbeere, generiert werden konnten, so waren die Untersuchungen doch so angelegt, dass sie später mit deutlich geringerem Aufwand auf andere Rohstoffe aus dem Bereich Obst und Gemüse übertragbar sein sollten.

Die in dem Cluster untersuchten wissenschaftlich-technischen und wirtschaftlichen Problemstellungen mit den daraus resultierenden wissenschaftlichen

und anwendungsorientierteren Fragestellungen sollten für die Obst- und Gemüseverarbeitende Industrie zukunftsweisend sein. Der gewählte Ansatz, Spezialistenwissen aus den unterschiedlichsten Fachgebieten der Analytischen, Physikalischen und Grenzflächen-Chemie, Lebensmitteltechnologie und -verfahrenstechnik, Ernährungsphysiologie, Lebensmittelchemie und -toxikologie sowie der pharmazeutischen Technologie zusammenzubringen, war die Basis für eine erfolgreiche Bearbeitung eines solch komplexen Themengebietes. Die Bearbeitung der Teilprojekte an mehreren Forschungseinrichtungen, die sich auf ihre jeweilige Kernkompetenz fokussieren, bot eine hohe Gewähr für eine wissenschaftlich und praktisch angemessene Durchführung des Vorhabens und eine hohe Erfolgsaussicht bezüglich der angestrebten Ziele. Die wissenschaftliche Koordinatorin des Clusters, Frau Prof. Schuchmann, und alle anderen beteiligten Projektleiter verfügten bereits über umfangreiche Erfahrungen auf diesem Sektor, wodurch eine kompetente Bearbeitung des Clusters gewährleistet war. Die gewählten Technologieansätze sind innovativ und eröffnen nicht nur die Möglichkeit gezielter grundlegender wissenschaftlicher Untersuchungen, sondern bergen auch neue Marktpotenziale in der späteren Umsetzung.

Die zu erwartenden Ergebnisse sollten die Verarbeiter von Obst und Gemüse primär bei der Darstellung der Bedeutung ihrer Produkte in der Vermarktung unterstützen. Sekundär wurden aber auch Hinweise auf mögliche Verbesserungspotentiale in der Verarbeitung der Rohstoffe erwartet. Daten zur Sinnhaftigkeit einer Anreicherung und Randbedingungen für das Einbringen solcher Formulierungen in die Produkte waren weitere Ergebnisse, die Anwender gezielt in der Produktentwicklung und -vermarktung unterstützen sollten.

Die DFG/AiF-Clusterinitiative, d.h. die Möglichkeit, unter Koordination des FEI ein breit angelegtes Forschungskonzept zu realisieren und damit zeitgleich Fragestellungen sowohl aus der Grundlagen- als auch aus der Industriellen Gemeinschaftsforschung zu bearbeiten und somit Synergien in der Forschungsförderung der DFG und der Mittelstandsförderung (BMW via AiF/FEI) zu nutzen, bot hierbei erstmalig eine Chance, zeitnah wissenschaftlich fundiertes Know-how umsetzen zu können. Dies eröffnet insbesondere kleinen und mittelständischen Unternehmen ohne zeit- und personalaufwändige Forschungs- und Entwicklungseinheiten die Möglichkeit, neue Produkt- und Verfahrenskonzepte auf dem Gebiet der Mikroverkapselung und dem Einsatz von sekundären Pflanzenstoffen umzusetzen und so innovative Produkte erfolgreich im Markt zu platzieren. Dies ist für die mittelständisch geprägte Lebensmittelbranche von höchstem Interesse, da diese Firmen selbst nicht in der Lage sind, die benötigten Kenntnisse zu generieren. Es ist zu erwarten, dass das Projekt auch in andere Produktbereiche, wie den Milch-, Diät-, Essenzen- und Süßwarenereich, ausstrahlt. Ein breitenwirksamer Kenntnistransfer in die Praxis war deshalb Ziel und Bestandteil des Projektmanagementkonzepts, zudem auch diese Dokumentation beitragen soll.

*) Wegen Nichtbewilligung eines entsprechenden In-vivo-Teilprojektes im Rahmen des Clusters sind diese Untersuchungen Gegenstand eines derzeit noch laufenden IGF-Projektes des FEI (AiF 17039 N) unter Beteiligung der Universitäten Kaiserslautern und Wien.

Für die finanzielle Förderung des Clusters durch das Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie (BMWi) und die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) sowie für die nachhaltige Unterstützung, die das Vorhaben seitens zahlreicher Unternehmen und Verbände erhielt, sei an dieser Stelle, auch im Namen des FEI, ebenso herzlich gedankt wie für die gute Zusammenarbeit mit der DFG und der AiF. Ein besonderer Dank gilt Frau Prof. Schuchmann und ihrer Arbeitsgruppe für die professionelle Koordinierung des Vorhabens und die gute und vertrauensvolle Zusammenarbeit mit dem Projektbegleitenden Ausschuss.



Prof. Dr. Hans-Ulrich Endreß
Herbstreith & Fox KG, Neuenbürg

(Leiter des Projektbegleitenden Ausschusses
der Industrie und FEI-Vorstandsmitglied)

Neuenbürg, im November 2011

Konzeption u. Beteiligte des DFG/AiF-Clusterprojektes

Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten Multikapselsystemen: Untersuchungen zum Einfluss der Mikrostruktur und der molekularen Zusammensetzung auf die Stabilisierung und kontrollierte Freisetzung von sekundären Pflanzenstoffen und deren Auswirkung auf biologische Signalparameter

Teilprojekte (TP):

- TP 1 (AiF):** **Prozessinduzierte Ausbeutesteigerung von wertgebenden sekundären Pflanzeninhaltsstoffen aus Blaubeeren und Vergleich ihrer Stabilität in Multikapselsystemen gegenüber konventionellen Produkten**
Technische Universität Braunschweig, Institut für Lebensmittelchemie, Prof. Dr. Peter Winterhalter
Technische Universität Berlin, Institut für Lebensmitteltechnologie und Lebensmittelchemie, Fachgebiet Lebensmittelbiotechnologie und -prozesstechnik, Prof. Dr. Dietrich Knorr
- TP 2 (DFG):** **Bildungskinetik, rheologische Eigenschaften und induzierter struktureller Abbau von biofunktionalen Hüllschichten und Mikrokapseln**
Technische Universität Dortmund, Lehrstuhl für Physikalische Chemie II, Prof. Dr. Heinz Rehage
- TP 3 (AiF):** **Milchproteinhydrogele als Trägerstoffe für bioaktive Substanzen: wasserunlösliche Mikrokapselsysteme zur Stabilisierung und kontrollierten Freisetzung von bioaktiven Inhaltsstoffen aus der Heidelbeere**
Technische Universität München, Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung, Abteilung Technologie, Prof. Dr. Ulrich Kulozik
- TP 4 (AiF):** **Mikrostrukturierte multidisperse Hüllkapseln als Träger bioaktiver Substanzen: Untersuchungen zum Einfluss von molekularen Wechselwirkungen und Diffusionsbarrieren auf die Stabilität und die Freisetzung von Inhaltsstoffen aus der Wildheidelbeere**
Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Institut für Bio- und Lebensmitteltechnik, Bereich I: Lebensmittelverfahrenstechnik, Prof. Dr. Heike P. Schuchmann

TP 5 (AiF): Mikroverkapselung von Anthocyanen durch Sprühverfahren unter Ausnutzung von stabilisierenden Effekten der natürlichen Zellsaftvakuole und Interaktionen von Inhaltsstoffen

Universität Kiel, Institut für Humanernährung und Lebensmittelkunde, Abteilung Lebensmitteltechnologie, Prof. Dr. Karin Schwarz

TP 6 (DFG): Nichtinvasive In-vitro- und In-vivo-Charakterisierung von Multikapselsystemen

Universität Halle-Wittenberg, Institut für Pharmazie, IB Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Prof. Dr. Karsten Mäder

TP 7 (AiF): Biologische Wirksamkeit von Blaubeer-Anthocyanen im Vergleich zu mikro/nano-verkapselten Anthocyan-Präparaten: Modulation von intestinaler Verfügbarkeit, Fermentation, antioxidativer Wirksamkeit und Wirkungen auf die DNA Integrität

Technische Universität Kaiserslautern, Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie, Prof. Dr. Elke Richling

Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung für Lebensmitteltoxikologie, Prof. Dr. Doris Marko

Universität Wien (ab 1.4.2009), Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie, Prof. Dr. Doris Marko

Koordination: Prof. Dr. Heike P. Schuchmann

Karlsruher Institut für Technologie (KIT),
Institut für Bio- und Lebensmitteltechnik,
Bereich I: Lebensmittelverfahrenstechnik

Beteiligte Industriegruppen:

- Verband der deutschen Fruchtsaft-Industrie e.V., Bonn
- Milchindustrie-Verband e.V., Berlin
- Fachverband Pektin e.V., Neuenbürg
- Bundesverband der obst-, gemüse- und kartoffelverarbeitenden Industrie e.V., Bonn
- Deutscher Verband der Aromenindustrie e.V., Brüssel
- Vereinigung zur Förderung der Milchwissenschaftlichen Forschung an der Technischen Universität München

Teilprojekt 1 (AiF)**Prozessinduzierte Ausbeutesteigerung von wertgebenden sekundären Pflanzeninhaltsstoffen aus Blaubeeren und Vergleich ihrer Stabilität in Multikapselsystemen gegenüber konventionellen Produkten (AiF 15610 N)**

Prof. Dr. Peter Winterhalter,
Dr. Gerold Jerz,
Dipl.-LM-Chem. Andreas Juadjur
Technische Universität Braunschweig
Institut für Lebensmittelchemie

Prof. Dr. Dietrich Knorr,
Dipl.-Ing. Henry Jäger
Technische Universität Berlin
Institut für Lebensmitteltechnologie und Lebensmittelchemie
Fachgebiet Lebensmittelbiotechnologie und -prozessechnik

Einführung

Die Freisetzung und Erhaltung von Inhaltsstoffen mit gesundheitsfördernden Eigenschaften stehen als Qualitätsmerkmal im Vordergrund der modernen Lebensmittelproduktion. Bioaktive Komponenten der Pflanze sind Produkte des Sekundärstoffwechsels und ihr Gehalt ist stark von verschiedensten Umweltbedingungen abhängig. Ihre Bildung stellt häufig die Reaktion auf Stressfaktoren, wie z. B. klimatische Einflüsse und UV-Bestrahlung, dar. Das Ausmaß dieser Einflüsse sowie die Pflanzensorte selbst bedingen dabei den Schwankungsbereich der Konzentrationen der einzelnen Verbindungen. Die Extraktion und Isolierung von bioaktiven Komponenten ist ein wesentlicher Prozessschritt, um deren Nutzung in anderen Lebensmitteln zu ermöglichen. Der Anwendung von geeigneten Aufschlussverfahren bei der Verwendung der Früchte zur Gewinnung von Wirkstoffextrakten kommt dabei eine entscheidende Bedeutung zu. Die Ausbeute an den gewünschten Substanzen sowie deren Verhältnis zueinander hängt dabei hauptsächlich von deren Konzentration in der Frucht ab. Technologische Prozessschritte (u.a. die thermische Belastung) beeinflussen zusätzlich die Gehalte bioaktiver Inhaltsstoffe (Polyphenole) und deren Verfügbarkeit. Ziel des Forschungsvorhabens (Teilprojekt 1 im DFG/AiF-Cluster „Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten Multikapselsystemen“) ist es, ausgehend vom Rohstoff Wildheidelbeere durch Stressinduzierung mittels elektrischer Hochspannungsimpulse (HSI), hydrostatischem Hochdruck (HP) sowie Ultraschall (US) die Nach-

Ernte-Biosynthese von funktionellen Inhaltsstoffen anzuregen und durch Membranpermeabilisierung eine Ausbeutesteigerung zu erzielen. Insbesondere bei der Herstellung und Lagerung von Heidelbeerprodukten kommt es weiterhin zu erheblichen Verlusten an wertgebenden Inhaltsstoffen. Die Evaluierung von Prozesskriterien der herkömmlichen Verarbeitung und die Identifizierung von Einflussparametern ist ein wesentlicher Schritt zur Verbesserung des Erhaltes wertvoller Inhaltsstoffe. Zusätzlich kommt neuen, nicht-thermischen Haltbarmachungsverfahren eine wachsende Bedeutung zu. Das Potential dieser Verfahren zur schonenden Haltbarmachung von Heidelbeerprodukten wird untersucht. Auch die Möglichkeit der Mikroverkapselung von Heidelbeerextrakt bzgl. der Stabilität der Kapselsysteme in der Produktmatrix wird analysiert und bewertet.

Ergebnisse (Arbeitsgruppe Prof. Winterhalter)

Zunächst wurde eine HPLC-DAD-Methode zur Charakterisierung und Quantifizierung der Heidelbeerpolyphenole entwickelt sowie die Grundlage zur Erfassung der Ausbeutesteigerung und stressinduzierten Veränderung des Polyphenolprofils bei der Behandlung von Heidelbeeren und Heidelbeertrestern mit Hochspannungsimpulsen, Hochdruck und Ultraschall gelegt. Mit dieser Methode war es möglich, alle in der Heidelbeere enthaltenen Anthocyane zu trennen und zu quantifizieren (**Abb. 1**).

Außerdem erfolgte mit der Methode die Analytik von frischen Heidelbeerproben, Heidelbeerprodukten und verkapselten Heidelbeerinhaltsstoffen. Der im Rahmen der Teilprojekte zur Verkapselung eingesetzte Heidelbeerextrakt wurde ebenfalls charakterisiert (**Abb. 2**). Dieser erwies sich sowohl bei der Lagerung bei Raumtemperatur (25 °C) als auch bei Kühllagerung (-18 °C) unter Feuchtigkeits-, Licht- und Sauerstoff-Ausschluss als stabil.

In dem eingesetzten Heidelbeerextrakt konnte keine Veränderung des Gesamtanthocyangehaltes von 27,6 g/100 g, der antioxidativen Kapazität 3.540 µmol/g (TEAC) sowie des Gesamtpolyphenolgehaltes von 53,5 g/100 g (Folin-Ciocalteu) festgestellt werden. Diese Untersuchung war wichtig, um zu gewährleisten, dass alle kooperierenden Arbeitsgruppen mit dem gleichen stabilen Ausgangsprodukt arbeiten konnten. Das Screening frischer Heidelbeerproben verschiedenster Standorte in Deutschland in den Jahren 2008 und 2009 zeigte hinsichtlich der Anthocyan-Profile und -Gehalte (z.B. durchschnittlich 0,60 mg/100 g Frischgewicht im Jahr 2008) keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Anbauregionen. Für die verarbeitende Industrie konnte so zumindest für Deutschland gezeigt werden, dass es keine bevorzugte Herkunftsregion gibt. Das Anthocyanprofil des kommerziellen Extraktes entsprach dem von frischen Heidelbeeren und den daraus im Labormaßstab hergestellten Vergleichsextrakten. So konnte die europäische Wildheidelbeere als Ausgangsprodukt für die Herstellung des kommerziellen Extraktes und die Anwendung eines schonenden Herstellungsverfahrens bestätigt werden.

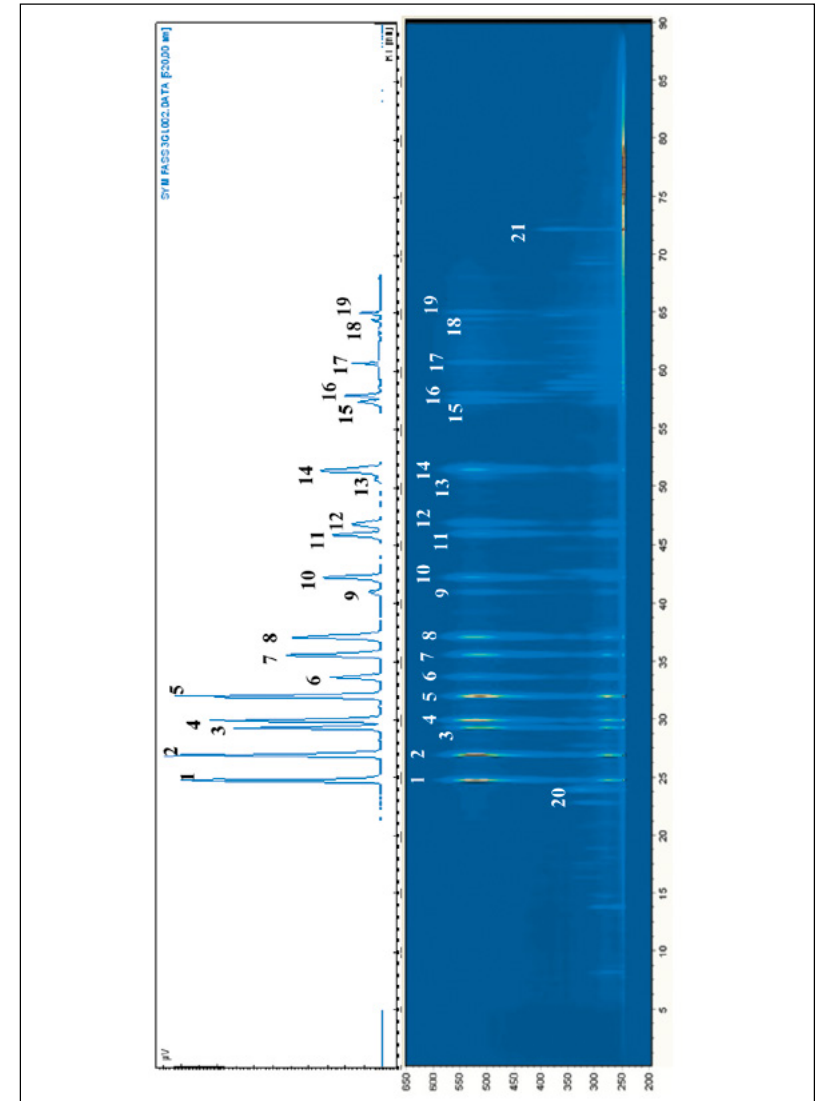


Abb. 1: HPLC-DAD-Chromatogramm des Heidelbeerextraktes (rechts) sowie das zugehörige Chromatogramm bei 520 nm: (Delphinidin-3-galactosid (1), Delphinidin-3-glucosid (2), Cyanidin-3-galactosid (3), Delphinidin-3-arabinosid (4), Cyanidin-3-glucosid (5), Petunidin-3-galactosid (6), Cyanidin-3-arabinosid (7), Petunidin-3-glucosid (8), Peonidin-3-galactosid (9), Petunidin-3-arabinosid (10), Peonidin-3-glucosid (11), Malvidin-3-galactosid (12), Peonidin-3-arabinosid (13), Malvidin-3-glucosid (14), Malvidin-3-arabinosid (15), Anthocyanidine (16-19), Chlorogensäure (20) und Quercetin (21).

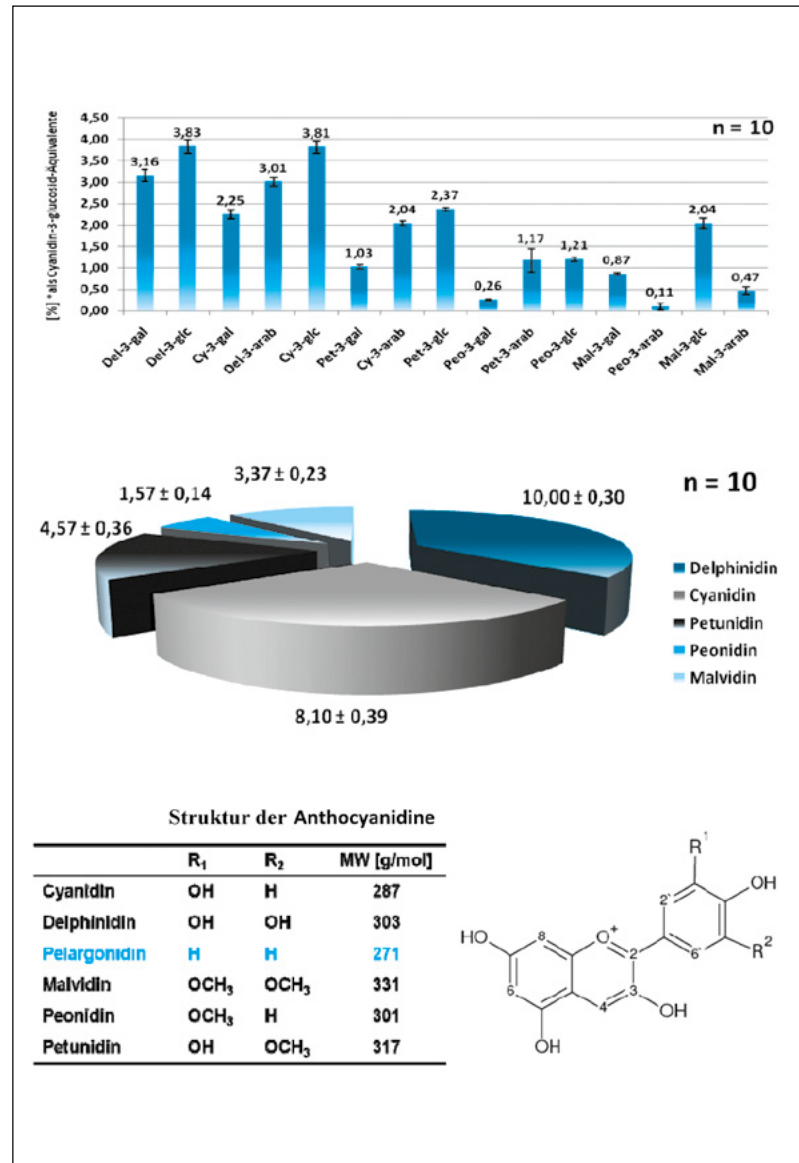


Abb. 2: Anthocyaninprofil und prozentuale Gehalte der Anthocyanglykoside des von den einzelnen Arbeitsgruppen zur Verkapselung eingesetzten kommerziellen Heidelbeerextraktes. In der Heidelbeere enthalten sind die fünf in der Tabelle in schwarz dargestellten Anthocyanidine, die in der Heidelbeere als Anthocyane in Form von Glykosiden vorliegen. Dabei sind die drei Zucker Galactose, Glucose und Arabinose jeweils an der C3-Position des Flavyliumkations gebunden.

Zur Klärung möglicher synergistischer Effekte der bioaktiven Komponenten des Heidelbeerextraktes sollte dieser in die drei Inhaltsstoffgruppen Anthocyane, Copigmente und Polymere aufgetrennt werden. Im Rahmen des Projektes konnte gezeigt werden, dass dies durch herkömmliche Lösungsmittelextraktionen nicht vollständig gelingt. Mittels High-Speed-Countercurrent-Chromatographie (HSCCC) konnte der Extrakt vollständig in die gewünschten Subfraktionen getrennt werden. Allerdings wurden für diese Trennungen Zusätze von Trifluoressigsäure (TFA) benötigt. Da TFA-Rückstände in den Fraktionen nicht ausgeschlossen werden können, eigneten sich diese Fraktionen nicht für die geplanten In-vitro- oder In-vivo-Testungen. Zur vollständigen und TFA-rückstandsfreien Fraktionierung der Extrakte wurde deshalb eine membran chromatographische Methode entwickelt und erfolgreich eingesetzt. Diese Methode beruht auf der Adsorption der nach Ansäuern der Anthocyane erhaltenen positiv geladenen Flavyliumkationen an der Membranoberfläche einer mit negativ geladenen Sulfonsäuregruppen belegten Cellulose-Membran der Firma Sartorius. Diese Membran mit der Bezeichnung Sartobind S besitzt eine netzartige Struktur. Während die Anthocyane auf der Membranoberfläche adsorbiert werden, passieren alle ungeladenen Moleküle und Extraktbestandteile praktisch ungehindert die netzartige Struktur des Membranadsorbers. **Abb. 3** zeigt das Fließschema für die entwickelte membran chromatographische Methode sowie die Aufgabe der Extraktlösung auf den Membranadsorber.

Im oberen Bild (**Abb. 3**) ist Schritt 4 des dargestellten Fließschemas – die Aufgabe der Extraktlösung – zu erkennen. Diese befindet sich in der braunen Glasflasche und wird mittels einer Pumpe auf den durch die adsorbierten Anthocyane bereits stark violett eingefärbten Membranadsorber gepumpt. Zum Schutz des Adsorbers ist ein Filter vorgeschaltet, der Staub und kleine Partikel von der Membran fernhalten soll. Die austretende Lösung ist sichtbar durch die Adsorption eines Großteils der Anthocyane entfärbt und enthält außer den restlichen nicht adsorbierten Anthocyanen noch alle anderen Extraktbestandteile wie Copigmente und Polymere. Das untere Bild zeigt die Elution der Anthocyane (Schritt 6 im Fließschema) mit der NaCl-haltigen farblosen Elutionslösung. Durch zwei in Reihe geschaltete Membranadsorber oder zweimalige Prozedur können so 99,8% der Anthocyane aus dem Extrakt entfernt werden. Nach Eliminierung des aus der Elutionslösung stammenden NaCl mittels XAD-7 werden die Anthocyane nach Gefriertrocknung als hochreine Fraktionen gewonnen. **Abb. 4** zeigt das Fraktionierungsschema und die prozentualen Auswaagen der nach Membran chromatographie und Gefriertrocknung erhaltenen Fraktionen.

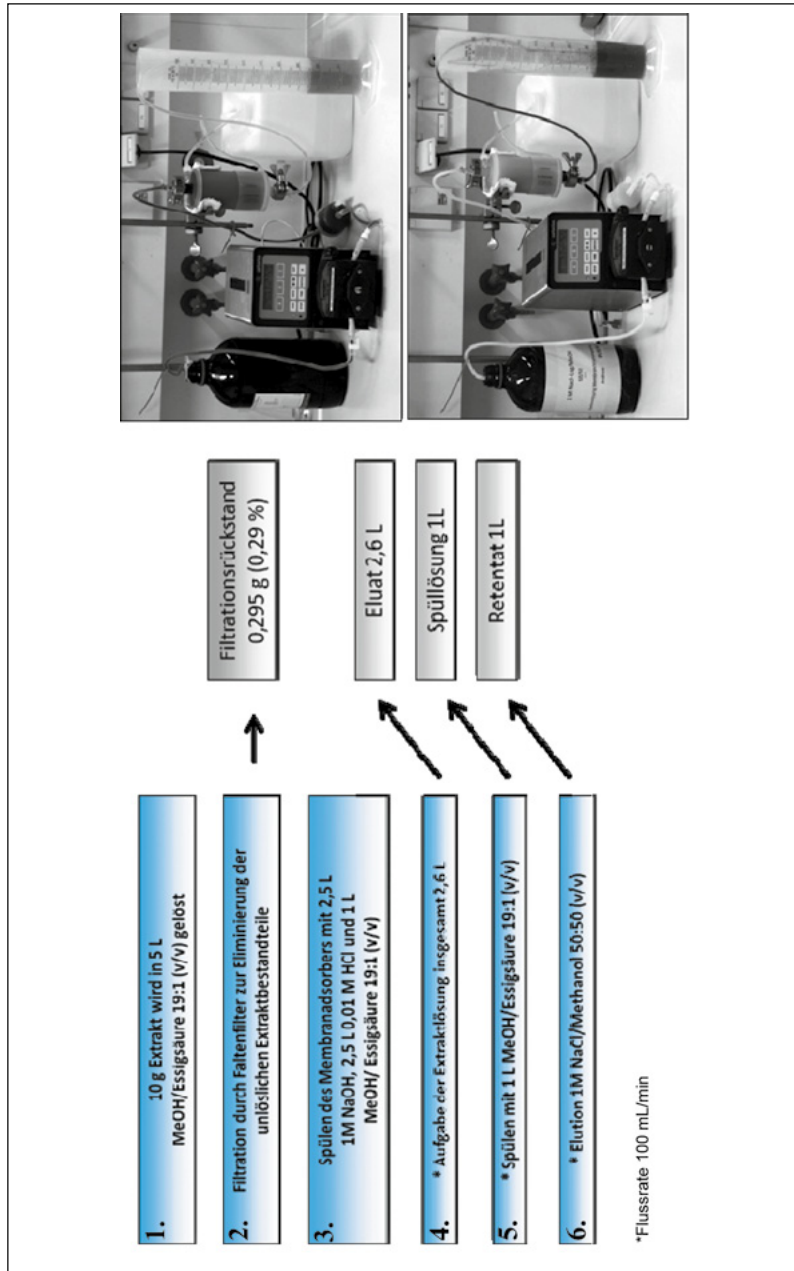


Abb. 3: Fließschema zur Durchführung der Membranchromatographie.

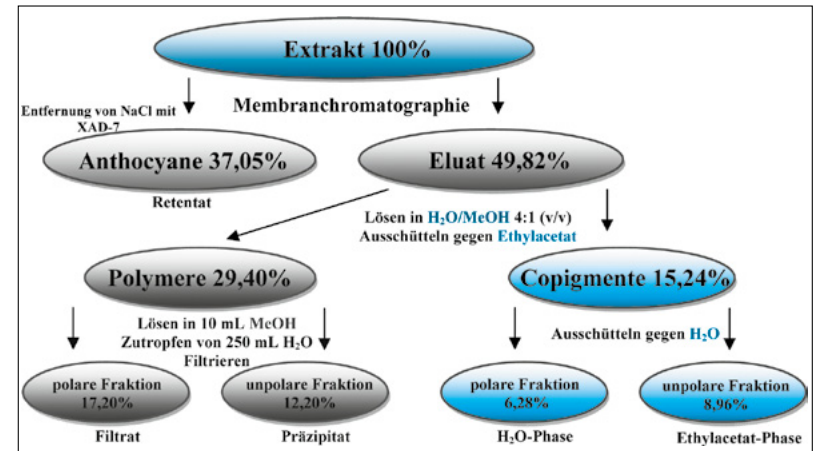


Abb. 4: Fraktionierungsschema und prozentuale Massenanteile der Subfraktionen des Heidelbeerextraktes.

Auf diese Weise konnten aus 10 g des Extraktes 3,7 g der Anthocyanfraktion und 4,98 g der Eluatfraktion erhalten werden. Die Anthocyanfraktion zeigt nach der NaCl-Entfernung einen Anthocyanengehalt von 71,4 % (quantifiziert als Cyanidin-3-glucosid-Äquivalente). Da die Anthocyane als Salze mit einem Gegenion zum positiv geladenen Flavylium-Kation vorliegen und die Quantifizierung über das Cyanidin-3-glucosid für den Gesamtanthocyanengehalt der Heidelbeere etwas zu geringe Werte liefert, liegt die tatsächliche Reinheit der Anthocyanfraktion bei < 90 %. Copigmente konnten in der Anthocyanfraktion nicht detektiert werden. Die Copigmente konnten aus dem nach Abtrennen der Anthocyane erhaltenen Eluat durch Lösungsmittelextraktion und Separation der polareren polymeren Bestandteile des Extraktes erhalten werden. Mittels dieser Vorgehensweise war es erstmals möglich, aus dem Extrakt hochreine Anthocyan-, Polymer- und Copigmentfraktionen im präparativen Maßstab zu isolieren und diese Fraktionen zu Verkapselungszwecken sowie für biologische Studien und Testungen im Rahmen weiterer Teilprojekte des Clusters zu nutzen. Auch die Betrachtung der antioxidativen Kapazität der Fraktionen lieferte Hinweise auf die aktiven und wirksamen Komponenten im Heidelbeerextrakt. Dabei stellte sich heraus, dass die Anthocyanfraktion mit 4,6 mmol Trolox/g und einem Anteil von 37 % am Gesamtextrakt den höchsten Beitrag zur antioxidativen Kapazität des Heidelbeerextraktes (3,5 mmol Trolox/g; 100 %) liefert. Auch die Copigmentfraktion (3,2 mmol Trolox/g bei einem Anteil von 15 %) zeigt gegenüber den restlichen Extraktbestandteilen und den polymeren Verbindungen (2,1 mmol Trolox/g bei 29 % Anteil am Gesamtextrakt) eine hohe antioxidative Aktivität.

Aufgrund der hohen antioxidativen Kapazität der Copigmentfraktion wurde diese detailliert untersucht. Neben Quercetin und Chlorogensäure (5-CQA) als

Hauptkomponenten konnten durch Trennung der Copigmentfraktion mittels HSCCC erstmals drei neue Verbindungen – ein Cumarsäure-Derivat (1), ein Depsid (2) und ein Cumaroyl-Iridoid (3) – aus Heidelbeeren isoliert und mittels NMR-Spektroskopie strukturell aufgeklärt werden (**Abb. 5**).

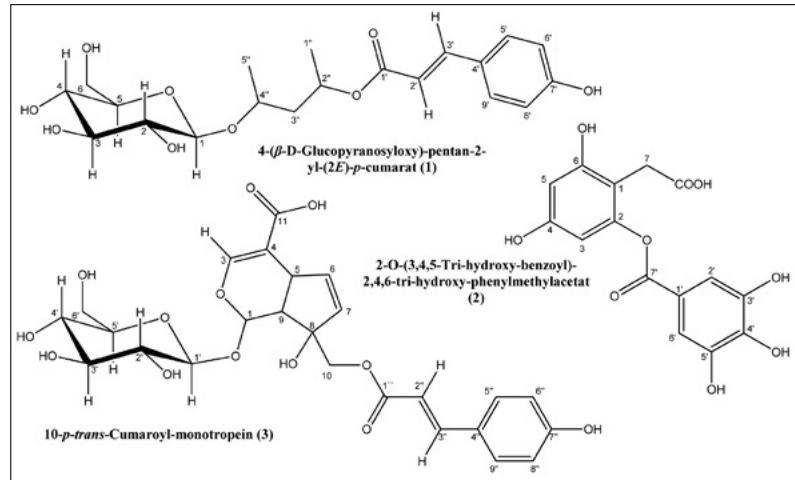


Abb. 5: Strukturformeln der drei aus der Copigmentfraktion isolierten und mittels NMR-Spektroskopie identifizierten Verbindungen.

Ein weiterer wichtiger Punkt war die Erfassung und Isolierung der wertgebenden Komponenten des bei der Safterstellung anfallenden Heidelbeertresters. Dabei konnte gezeigt werden, dass unter den lipophilen Inhaltsstoffen wie den hauptsächlich enthaltenen Triglyceriden auch bioaktive Minorcomponenten wie z.B. β-Amyrin, β-Sitosterol oder die Oleanolsäure enthalten sind. Außerdem ließen sich durch Kombination mit der entwickelten membran chromatographischen Methode durch methanolische Extraktion und Abtrennung der lipophilen und semi-polaren Komponenten sowie einer anschließend durchgeführten Membran chromatographie 2,60 g einer hochreinen Anthocyanfraktion aus insgesamt 120 g gefriergetrocknetem Trester gewinnen.

Ergebnisse (Arbeitsgruppe Prof. Knorr)

Die prozessinduzierte Ausbeutesteigerung wertgebender sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe in Säften und Extrakten von Wildheidelbeeren konnte gezeigt werden. Ein Vergleich der Technologien Ultraschall und Hochspannungsimpulstechnik mit herkömmlichen Verfahren der Maischebehandlung bzw. einer Prozessierung ohne Maischevorbehandlung hinsichtlich des Gehaltes an Ge-

samtpolyphenolen und Anthocyanen konnte eine entsprechende Umsetzung des erzielten Zellaufschlussgrades in einen Übergang der Komponenten in Säfte und Extrakte zeigen (**Abb. 6**). Die nachfolgende Analytik der antioxidativen Aktivität der Presssäfte zeigte insbesondere bei den elektropermeabilisierten Maischen eine Steigerung. Die Bestimmung der Anthocyane mittels HPLC in den Presssäften konnte eine Abhängigkeit von der eingesetzten Maischevorbehandlung aufzeigen. Die Hochspannungsimpulsvorbehandlung führte dabei zu einer über eine Verdopplung hinausgehende Erhöhung des Gesamtanthocyangehaltes, während eine Maischeenzymierung nahezu eine Verdreifachung der Analysenwerte zur Folge hatte. Als Auffälligkeit bei der differenzierten Untersuchung des Anthocyanprofils konnte eine Verschiebung der Freisetzung zugunsten einiger ausgewählter Anthocyane beobachtet werden, während alle anderen angewendeten Maischevorbehandlungsverfahren zu einer gleichmäßigen Erhöhung aller Einzelkomponenten führten. Die wässrige und ethanolisch durchgeführte Extraktion des Tresters konnte durch einen Zellaufschluss mittels Ultraschall bzw. Hochspannungsimpulsen in ähnlicher Weise verbessert werden, wobei eine Ultraschallunterstützung des gesamten Extraktionsvorganges gegenüber eines einmaligen Einsatzes von Ultraschall zum Zellaufschluss eine zusätzliche Steigerung des Gesamtpolyphenolgehaltes und der antioxidativen Kapazität des Extraktes bewirken konnte. Die durchgeführten Behandlungen zur Stressinduktion erforderten eine differenzierte Betrachtung der unterschiedlichen Gewebe von Schale und Fruchtfleisch, die aufgrund unterschiedlicher vorhandener Zellgrößen eine unterschiedliche Empfindlichkeit hinsichtlich der Membranpermeabilisierung durch Hochspannungsimpulse aufweisen.

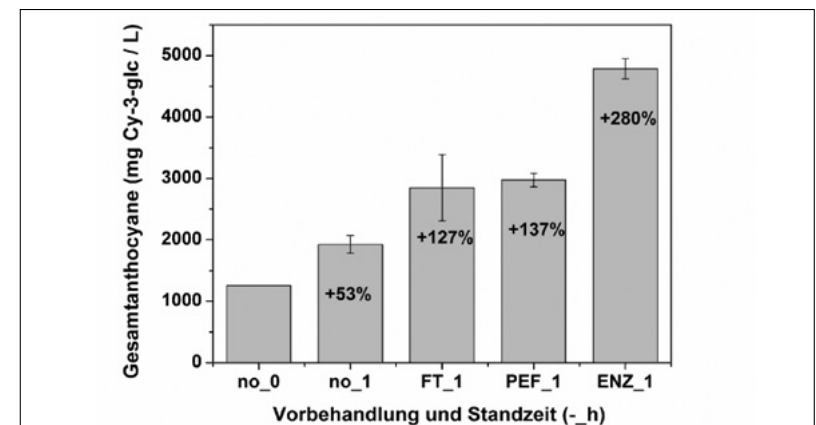


Abb. 6: Gesamtanthocyanengehalt in den Presssäften aus unterschiedlich vorbehandelten Maischen (ohne Vorbehandlung, 'no' mit und ohne Standzeit; Gefrier-Tau-Prozess, 'FT' bei -10 °C für 2 x 2 h; Hochspannungsimpulse, 'PEF' bei 4 kV/cm und 30 kJ/kg; Enzymierung, 'ENZ', Enzymierungstemperatur 45 °C).

Es wurden umfangreiche Stabilitätsuntersuchungen an Heidelbeerprodukten und deren Inhaltsstoffen durchgeführt. Dabei wurden insbesondere thermische Prozessschritte betrachtet und Thermokinetiken für den thermisch bedingten Abbau der Anthocyane erstellt. Für die Produkte Heidelbeerkonfitüre und Heidelbeersaft wurde eine umfassende Prozessanalyse inklusive der Erstellung von Temperatur-Zeit-Profilen des Herstellungsprozesses durchgeführt (**Abb. 7**). Anhand des Parameters Monomerindex sowie der quantitativen Bestimmung von Anthocyanen mittels HPLC durch Forschungsstelle 1 konnte die Stabilität bzw. der prozessbedingte Abbau aussagekräftig evaluiert werden. Es zeigte sich, dass insbesondere die Prozessschritte der Kochung in der Konfitürenherstellung sowie die anschließende Heißabfüllung zu einem Verlust von monomeren Anthocyanen führen. Ein ähnlicher Einfluss wurde für die Pasteurisierungsschritte der Safterstellung festgestellt, wobei hier die Verfahrensweise der Saftlagerung vor der Abfüllung bei erhöhter Temperatur sowie die Heißabfüllung und die allmähliche Abkühlung des Produktes in der Flasche wesentlich zur thermischen Belastung beitragen. Es wurden deutliche Produktveränderungen während der Lagerzeit festgestellt. Heidelbeersaft aus Wildheidelbeeren enthielt rund 9,5-mal mehr Anthocyane als Kulturheidelbeersaft. Die HPLC-Analyse ergab zudem, dass im geschönten Wildheidelbeersaft Anthocyane mit Glucoseresest stabiler als die mit Arabinose gebundenen Anthocyane waren. Die Anthocyane des Kulturheidelbeersaftes zeigten im Vergleich zum Wildheidelbeersaft eine größere Stabilität. Nach rund 90 Tagen Lagerung waren sowohl im Saft aus Kultur- als auch Wildheidelbeeren (beide ungeschönt) noch 33% monomere Anthocyane bezogen auf die Ausgangsmenge im Saft zu Beginn der Lagerung vorhanden. Nach einem Jahr Lagerzeit betrug der Wert für den Kulturheidelbeersaft noch 19%, während im Wildheidelbeersaft nur noch Werte von bis zu 2% gemessen werden konnten. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass in Heidelbeerkonfitüre hohe Anthocyanstabilitäten, vor allem bei Kühlung, im Vergleich zum Saft erreicht werden können. Während der Herstellung gehen ca. 40% der in der Rohware enthaltenen monomeren Anthocyane verloren. Der Gehalt verbleibender Anthocyane sank über einen Lagerzeitraum von 449 Tagen bei Raumtemperatur auf 38% des Ausgangswertes zu Beginn der Lagerung ab. Eine Kühlung konnte diese Reaktionen verlangsamen und die Anthocyanstabilität erhöhen (Erhalt von 57% der Anthocyane nach 449 Tagen Lagerung). Im Vergleich dazu gingen bei der Herstellung der Heidelbeerkonserven mehr als 40% der Anthocyane durch die Kochung verloren und nach 371 Tagen Lagerzeit konnten nur noch 12% Anthocyane gefunden werden. Gefrorene Heidelbeeren zeigten über den Lagerzeitraum von einem Jahr die höchste Stabilität. Gefriergetrocknete Heidelbeeren zeigten eine den gefrorenen Heidelbeeren ähnliche Anthocyanstabilität. Mehr als 92% der monomeren Anthocyane konnten während einer Lagerdauer von rund einem Jahr erhalten werden. Die hohe Stabilität in beiden Fällen war begünstigt durch Lagerung unter Ausschluss von Licht und Sauerstoff sowie durch die geringe Verfügbarkeit an freiem Wasser.

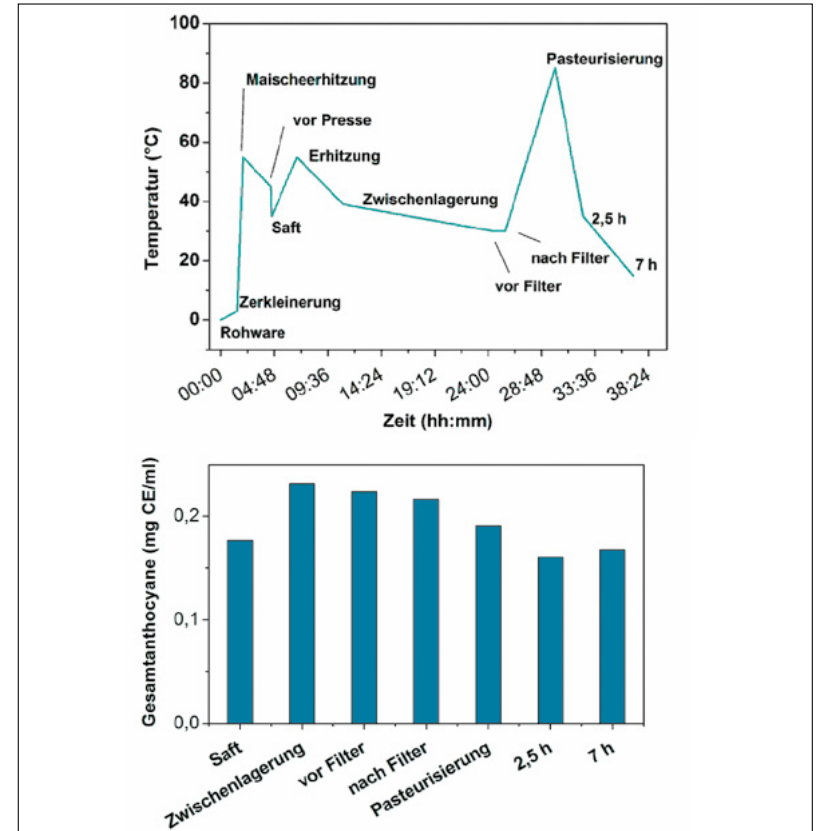


Abb. 7: Temperatur-Zeit-Profil der Herstellung von Heidelbeersaft aus Kulturheidelbeeren in einer kleinen Mosterei (oben). Veränderung des Anthocyanengehaltes in Abhängigkeit der Prozessierungsstufen bei der Safterstellung (unten).

Während der herkömmlichen thermischen Pasteurisierung von Heidelbeersaft war ein Abbau der Anthocyane im Bereich von 20-30% während und direkt nach der Behandlung zu verzeichnen. In weiteren Untersuchungen wurde die Anwendung von isostatischem Hochdruck und gepulsten elektrischen Feldern als nicht-thermische Pasteurisierungsverfahren hinsichtlich ihres Effektes auf ausgewählte Analysenparameter untersucht. Der Einfluss einer Hochdruckbehandlung auf die Saftkomponenten Vitamin C, Gesamtphenolgehalt, Gesamtanthocyanengehalt (photometrische Bestimmung) und antioxidative Kapazität wurde im Druckbereich von 200-600 MPa mit einer Haltezeit im Bereich von 5-15 Minuten bestimmt. Die Hochdruckbehandlung resultierte in einen Vitamin-C-Erhalt von über 92% für alle Behandlungsintensitäten. Ursache für

die Abnahme des Vitamin-C-Gehaltes insbesondere bei Druckstufen von 400 und 600 MPa ist möglicherweise eine druckinduzierte Enzymaktivierung u.a. der Ascorbatoxidase, bevor diese durch die Behandlungen inaktiviert wird. Für eine Behandlung bei 200 MPa trat keine signifikante Veränderung der antioxidativen Kapazität auf. Für die Behandlungsstufen bei 400 und 600 MPa hingegen kam es zu einer Verringerung des TEAC-Wertes im Bereich von 8-16 %. Eine Erhöhung des Gesamtphenolgehaltes, insbesondere bei einer Behandlung bei 200 MPa, sowie eine Erhöhung des Analysenwertes der Gesamtanthocyane bei der Behandlung 400 MPa und 15 min (16 % Erhöhung) sind auf eine Trubpartikelbeeinflussung und eine Erhöhung der freien detektierbaren Menge im Saft zurückzuführen. Zur Herstellung eines lagerstabilen Saftes wird im industriellen Prozess der Hochdruckpasteurisierung eine Behandlung von 600 MPa bei einer Haltezeit von 5 Minuten durchgeführt. Ein so pasteurisierter Frischsaft wurde bei 4 °C über einen Zeitraum von 56 Tagen gelagert. Zudem wurde Saft mittels Hochspannungsimpulsen pasteurisiert und den gleichen Lagerbedingungen unterzogen. Durch die Hochspannungsimpulsbehandlung konnte wie durch die Hochdruckbehandlung eine ausreichende Keimzahlreduzierung erreicht werden. Die Anwendung von Hochspannungsimpulsen führt jedoch im Gegensatz zur Hochdruckbehandlung nur unzureichend zur Inaktivierung von Enzymen, so dass diese in Abhängigkeit der Lagertemperatur und der Sauerstoffverfügbarkeit während der Lagerung entsprechende Aktivität zeigen können. Die Prozessstabilität aller Analysenkomponenten gegenüber der Hochdruckbehandlung bzw. der Hochspannungsimpulsbehandlung war sehr hoch. Vitamin-C-Verluste betragen weniger als 5 % im Vergleich zur unbehandelten Probe und waren genau wie der Gesamtphenolgehalt nicht signifikant von der Kontrollprobe abweichend. Für Gesamtanthocyane und die antioxidative Kapazität konnte durch die Behandlungen eine leichte Erhöhung festgestellt werden, die, wie bereits benannt, durch eine verbesserte Verfügbarkeit nach den Behandlungen begründet ist. Am Ende der Lagerung (nach 56 Tagen) zeigten der unbehandelte und der mittels Hochspannungsimpulsen konservierte Saft ähnlich hohe Verluste an Vitamin C (ca. 50 %), während der Vitamin-C-Erhalt in mit Hochdruck konservierten Säften mit 70 % entsprechend höher lag. Auch die antioxidative Kapazität wurde im Hochdruck-pasteurisierten Saft (79 % Erhalt) besser erhalten als im Vergleich zum unbehandelten (70 % Erhalt) und zum mittels Hochspannungsimpulsen pasteurisierten Saft (52 % Erhalt). Die Anwendung der Hochdruck-Pasteurisierung kann damit als eine erfolgreiche Methode zur Haltbarmachung von Heidelbeersäften bewertet werden, da der Prozesseffekt der Behandlung auf die Saftcharakteristika als gering eingestuft werden kann. Das Produkt behält den Frischsaftcharakter, bedarf jedoch einer Kühlung und weist eine Lagerstabilität im untersuchten Zeitraum von ca. 8 Wochen auf.

Im Rahmen des DFG/AiF-Clusters „Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten Multikapselsystemen“ wurde das Teilprojekt 1 des Forschungskreises der Ernährungsindustrie e.V. (FEI) über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung und -entwicklung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.

Summary Subproject 1

Process-induced increase in the yield of secondary metabolites from bilberry and comparison of their stability in multi-capsules versus conventional products

An HPLC method for the characterization and quantification of the polyphenols of bilberry was developed. This was the basis for determining the yield increase and stress-induced changes in the polyphenolic profile during the treatment of bilberry and bilberry pomace with high voltage pulses, high pressure and ultrasonic. With this method analytics of fresh bilberries, bilberry products and encapsulated bilberry extract as well as monitoring during storage was carried out. The bilberry extract which was used for encapsulation by all research groups was also characterized. It proved to be stable both during storage at room temperature (25 °C) and in cold storage (-18 °C) under exclusion from humidity, light and oxygen. There was no change detected in the total anthocyanin content of 27.6g/100g, the antioxidant capacity of 3,540 µmol/g (TEAC) as well as the content of 53.5 g/100 g of total polyphenols (Folin-Ciocalteu). Therefore it could be guaranteed that all research groups have worked with the same stable product. The screening of fresh bilberry samples from different regions of Germany showed no local dependence regarding the anthocyanin profiles and contents (average 0.60 mg/100 g fresh weight in 2008). It could be shown that the anthocyanin profile of the commercial extract is equivalent to that of the fresh blueberries and the extracts made from the fresh ones. To fractionate the extracts, a membrane chromatographic method was developed and used successfully. For the first time high-purity anthocyanin, polymeric and copigment fractions could be isolated on a preparative scale, making them available for biological studies and for encapsulation. Also for the first time three new compounds from the copigment fraction were isolated and their structures were elucidated by NMR spectroscopy. Another important point was the detection and isolation of value-adding components of the bilberry pomace, generated during the juice production. It was shown that among the lipophilic ingredients like the mainly contained triglycerides, also bioactive minor components as for example β -amyryn, β -sitosterol or oleanolic acid are included. Also 2.60 g of a very pure anthocyanin fraction could be isolated from 120 g of the freeze-dried pomace by the newly developed membrane chromatographic method after removal of the lipophilic and semi-polar components.

A process induced increase in the yield of secondary plant metabolites in juices and extracts recovered from bilberry could be shown by application of ultrasound or pulsed electric field treatment. Treatment of bilberries for stress induction required the consideration of differences of cell characteristics in the skin

and the flesh of the fruit. In addition, the establishment of a bilberry cell culture was investigated in order to create a model system to study stress response in a homogenous raw material.

Bilberry products such as juice, jam, dried, frozen and canned fruits were investigated with regard to the process and storage stability of anthocyanins. Major losses were detected during the thermal processing steps such as cooking or pasteurization. During subsequent storage, bilberry jam proved to be more stable than juice but a reduction of more than 50% during a half year storage time was detected for both products. The application of non-thermal pasteurization by isostatic high pressure was investigated. Shelf stable, fresh juices could be produced by the inactivation of microorganisms and enzymes while maintaining the monomeric anthocyanins. Microencapsulated bilberry extract was investigated in order to evaluate its stability in comparison to the stability of anthocyanins in bilberry products. Microcapsules have been added to bilberry juice and a stabilization of the anthocyanins was found. A protective effect of the capsules was shown during storage of the enriched product.

Teilprojekt 2 (DFG)

Bildungskinetik, rheologische Eigenschaften und induzierter struktureller Abbau von biofunktionalen Hüllschichten und Mikrokapseln

Prof. Dr. Heinz Rehage,

Dr. Sabine Leick

Technische Universität Dortmund

Lehrstuhl für Physikalische Chemie II

Einführung

In Teilprojekt 2 erfolgte die Herstellung eines ausgewählten Kapselmodellsystems über die ionotrope Hydrogelbildung anionischer, natürlicher Polysaccharide mit Calciumionen mittels der Methode des Eintropfens [1]. Zunächst wurden die für die reproduzierbare Herstellung sphärischer Matrix- als auch Kern-Hülle-Kapseln verantwortlichen Parameter – wie Oberflächenspannung, Eintropfhöhe, Rührergeschwindigkeit sowie Viskosität und Dichte der Polymer- und Eintropflösungen – charakterisiert und optimiert (**Abb. 1**). Die Synthese der Matrixkapseln kann hierbei durch einfaches Eintropfen der Polysaccharidlösung in die vorgelegte Vernetzerlösung (Calciumchloridlösung) ohne Rühren aus einem Abstand von 5 cm erfolgen. Zur Herstellung der Kern-Hülle-Kapseln muss die Dichte und Viskosität der eintropfenden Vernetzerlösung durch die Zugabe von Glycerin erhöht werden, um das Einsinken der Tropfen durch die Phasengrenzfläche zu erleichtern. Des Weiteren können nur sphärische Kapseln erhalten werden, wenn das Eintropfen in eine trichterförmige Strömung erfolgt und die Eintropfhöhe etwa 4,5 cm beträgt.

Infolge der notwendigen Modifizierung der Eintropflösung im Falle der Herstellung flüssig-gefüllter Kapseln wurde die Monomer- als auch Polymerkonzentration wässriger Extraktlösungen unter Variation des pH-Wertes, Zugabe von Calciumsalz und Glycerin über einen längeren Zeitraum verfolgt. Es zeigte sich, dass sich die zur Kapselherstellung erforderlichen Zusätze (Calciumsalz und Glycerin) nicht auf die Stabilität der biologisch aktiven Anthocyane auswirkten und dem Extrakt somit ohne Bedenken hinzugefügt werden konnten.

Untersuchungen der biologischen Wirksamkeit des Extraktes auf humane Kolonkarzinomzellen, die in Kooperation mit der Universität Wien (Teilprojekt 7) durchgeführt wurden, bestätigten weiterhin, dass der verkapselte Extrakt ebenso effektiv wie der reine unverkapselte Extrakt in der Lage ist, die EGFR-Aktivität zu unterdrücken und die ATP-Bindungsstellen zu blockieren.

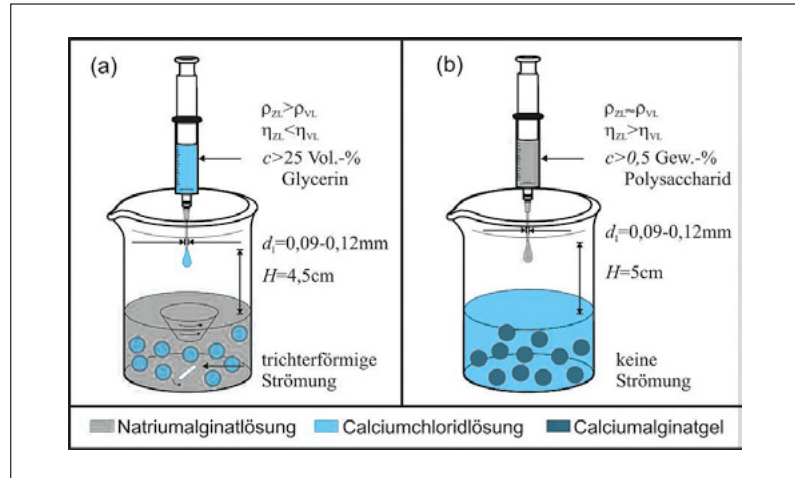


Abb. 1: Übersicht über die optimierten Herstellungsparameter.

Darüber hinaus wurden die zur Kapselherstellung benötigten Hüllmaterialien (Polysaccharide: Alginat und Pektin) und der zu verkapselnde Inhaltsstoff (Heidelbeerextrakt) hinsichtlich der oberflächenaktiven Eigenschaften untersucht. Hierzu wurde neben der Tropfenprofilanalyse [2, 3] (zur Bestimmung der Oberflächenspannung) die Schwingkondensator-Methode [4-6] (zur Bestimmung des Oberflächenpotentials) herangezogen. Es zeigte sich, dass wässrige Lösungen beider Substanzklassen über ein schwaches oberflächenaktives Verhalten verfügen, dass sich in einer zeitlichen Abnahme der Oberflächenspannung und einem Anstieg des Oberflächenpotentials äußert. Im Falle der biologischen Polysaccharide (Alginat, Pektin) kann die Oberflächenaktivität durch Verunreinigungen – wie beispielsweise Enzyme – oder die Moleküle selbst verursacht werden, während im Falle des Heidelbeerextraktes davon auszugehen ist, dass in dem Extrakt vorhandene Gerbstoffe dieses Verhalten hervorrufen.

Nachdem die Rahmenbedingungen zur effektiven Extraktverkapselung geschaffen wurden, konnte anschließend die Charakterisierung der mechanischen Eigenschaften der Hydrogele und Kapseln erfolgen. Neben der Permeabilität der Gelmembranen ist die Deformationsstabilität der Kapseln für die Anwendung in Lebensmitteln von großer Bedeutung. So müssen die mit Bioaktivstoffen gefüllten Kapseln zur gezielten Freisetzung der Inhaltsstoffe die Einbringung in das gewünschte Produkt, die Lagerung und das Durchlaufen des Magentraktes unbeschadet überstehen.

Rheologische Messungen und Berechnungen der zweidimensionalen Elastizitätsmodule zeigten, dass die Matrixkapseln erwartungsgemäß höhere Gelstabilitäten als die vergleichbaren Kern-Hülle-Kapseln aufwiesen. Durch Variation der

Gelierzit sowie Wahl der Polymer- und Calciumionenkonzentration konnten die mechanischen Eigenschaften der flüssig-gefüllten, deformationsempfindlichen Kapseln jedoch in weiten Bereichen variiert und gezielt eingestellt werden (Abb. 2).

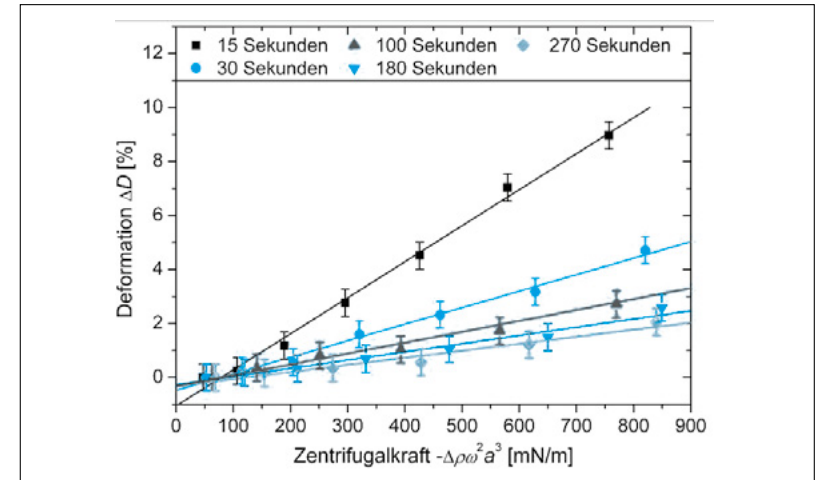


Abb. 2: Deformationsverhalten flüssig-gefüllter Calcium-Pektinat-Kapseln in Abhängigkeit von der Gelierzit.

Zur Analyse der Vernetzungskinetik und der Dynamik der Hüllschichten wurde die Spinning-Capsule-Methode [7, 8] als grenzflächenrheologisches Charakterisierungsverfahren herangezogen (Abb. 3). Unter Variation der Gelierdauer konnten die Kapseldeformationen mittels optischer Konturanalyse für die Synthese flüssig-gefüllter Calciumalginat- als auch Calciumpektinat-Kapseln bestimmt werden. Hierbei zeigte sich, dass in beiden Fällen die Deformierbarkeit mit zunehmender Gelierzit abnimmt und sich nach einer bestimmten Zeit ein Plateau abzeichnet [9]. Dieses kommt dadurch zustande, dass das Tropfeninnere mit der Zeit an den vernetzenden Calciumionen verarmt, wodurch die Membrandicke nach außen hin anwächst. Dieser Vorgang ist abgeschlossen, wenn alle vernetzungsfähigen zweiwertigen Kationen in die Gelmembran eingebaut sind. Im direkten Vergleich zeigen die Pektinat-Kapseln insgesamt bei vergleichbarer Gelierzit höhere Deformationen, sodass hier davon ausgegangen wird, dass die gebildeten Hydrogelmembranen schwächer vernetzt oder dünner sind.

Neben der Kapseldeformation erfolgten Kapselschichtdickemessungen unter Variation der Gelierzit mittels bildgebender NMR in Kooperation mit der Experimentellen Physik III (Technische Universität Dortmund, Prof. Dr. Dieter Suter).

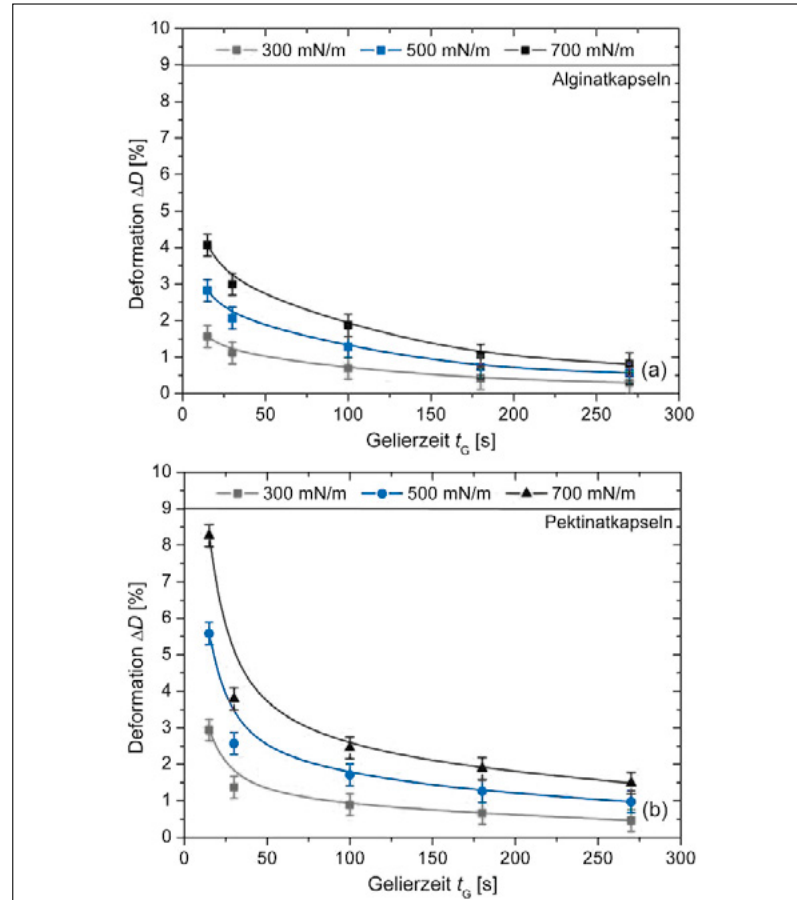


Abb. 3: Kapseldeformation in Abhängigkeit von der Gelierzeit der Tropfen in der Polymerlösung: (a) flüssig-gefüllte Alginate- und (b) Pektinatkapseln.

Nach Anpassen der erhaltenen Kurven mit einer Theorie von YAMAGIWA et al. [10] ergibt sich eine Geschwindigkeitskonstante k_D für die Gelbildungsreaktion von $0,003 \text{ s}^{-1}$ für die Alginatekapseln und $0,009 \text{ s}^{-1}$ für die Pektinatkapseln sowie ein Strukturfaktor von etwa 0,4 für beide Kapselsysteme. Der Strukturfaktor $\neq 1$ deutet darauf hin, dass es sich bei dem Gelbildungsprozess nicht um einen rein diffusionskontrollierten Prozess handelt. Die schnellere Gelbildungsgeschwindigkeit im Falle der Pektinatkapseln kann durch eine ungehindertere Diffusion der vernetzenden Calciumionen und die Ausbildung der dickeren Alginatemembranen durch eine höhere Calciumionenaffinität und Vernetzungsdichte bewirkt werden.

In stofflicher und morphologischer Hinsicht wurde anhand erster Freisetzungsmessungen deutlich, dass die Polysaccharidkapseln, bedingt durch die hochporösen, stark diffusionsdurchlässigen Gelmembranen, zur gewünschten Extraktfreisetzung im Darm gezielt angepasst und modifiziert werden müssten. Da die Verkapselungseffizienz bei der Herstellung der Matrixkapseln mit nur 70 % wesentlich geringer war als die der flüssig-gefüllten Kapseln (ca. 96 %) und auch die Extraktfreigabe ungehinderter erfolgte, wurde der Fokus im Weiteren auf die Herstellung der Kern-Hülle-Kapseln gelegt.

Um das pH-gesteuerte Darm-Targeting zu erreichen, wurde zum einen versucht, die Anthocyanindiffusion durch die Ausbildung von Kompositmembranen unter Zugabe von PLL zur Vernetztlösung bzw. Schellack zur Polymerlösung zu vermindern bzw. zu hemmen. Zum anderen wurden die Kapseln mit externen Coatings durch Aufbringung zusätzlicher Polyelektrolytmultischichten bzw. einer umhüllenden Schellackmembran versehen (**Abb. 4**).



Abb. 4.: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Beschichtungsformen.

Zunächst erfolgte die Untersuchung der Deformationseigenschaften der Hydrogelkapseln unter Zuhilfenahme von Poly-L-Lysin. Im Falle der Ausbildung von Kompositmembranen zeigte sich, dass die Deformationsstabilität der Kapseln abnahm, so dass die Vernetzungsdichte durch den Einbau der Polyelektrolytmoleküle herabgesetzt wurde. Im Falle der Aufbringung zusätzlicher entgegengesetzt geladener Polyelektrolytschichten konnte die Deformationsstabilität mit jeder aufgetragenen Schicht geringfügig erhöht werden [11]. Da jedoch insgesamt beide Variationen keinen signifikant positiven Effekt auf die Freisetzungskinetiken sowie die effektive Steigerung der Extraktückhaltung zeigten, erfolgte im Weiteren die Herstellung und Modifikation von Komposit- sowie extern beschichteten Kapseln unter Verwendung von Schellack.

Durch den Einbau von Schellack in die Hydrogelmembranen konnte die Deformationsstabilität der Kapseln in Abhängigkeit vom pH-Wert maßgeblich gesteigert werden. Die aus den Auftragungen berechneten zweidimensionalen Elastizitätsmoduln [12] stehen in guter Übereinstimmung mit den erhaltenen

Ergebnissen aus vergleichenden gelrheologischen Messungen als auch weiterführenden Squeezing-Capsule-Messungen [13]. Insgesamt konnte jedoch auch mit diesem System keine zufriedenstellende Diffusionshemmung der Anthocyane erreicht werden.

Im Falle der extern mit Schellack beschichteten Kapseln konnten diese – aufgrund ihrer enorm hohen Deformationsstabilität – nicht mehr mit der Spinning-Capsule-Technik deformiert werden. Aus diesem Grund wurde die Squeezing-Capsule-Technik [14, 15] zur Messung herangezogen. Es zeigte sich, dass – in Abhängigkeit vom pH-Wert – die zur Kompression der beschichteten Kapseln erforderlichen Kräfte um ein Vielfaches höher liegen als die zur Kompression der unbeschichteten Kapseln erforderlichen Kräfte. Außerdem zeigte sich bei der Bestimmung der Freisetzungskinetiken nach der UV/VIS-Methode von GIUSTI et al. [16], dass die diffusive Extraktfreigabe durch die Aufbringung einer externen Schellackbeschichtung signifikant verringert und gehemmt werden kann, so dass dieses Kapselsystem für weitere Untersuchungen der Extraktfreigabe herangezogen und bezüglich der pH-Auswahl, Geliertdauer und Zusammensetzung der Beschichtungsformulierung variiert wurde. Hierbei zeigte sich, dass die unter Säure ausgefällten Schellackmembranen mit abnehmendem pH-Wert dichtere und undurchlässigere Membranen ausbildeten, wodurch größere Mengen der Anthocyanmoleküle im Kapselinneren nachhaltig gespeichert blieben. Bei Variation des Plastiziermittels führte insbesondere die Zugabe von PVP (Polyvinylpyrrolidon) als Weichmacher zu der Schellacklösung zu einer Verlangsamung der diffusiven Freisetzung und nachhaltigen Speicherung großer Extraktmengen.

Da die oral mit der Nahrung aufgenommenen Kapseln den pH-Gradienten im Magen-Darm-Trakt durchlaufen, schienen zur Untersuchung des Auflöseverhaltens Magen-Darm-Simulationen unter Änderung des pH-Wertes die sinnvollste Annäherung an den realen Verdauungsvorgang zu sein. Es war zu beobachten, dass die beschichteten Kapseln, je nach Zusammensetzung der Beschichtungsformulierung, der Beschichtungsdauer als auch der Simulationstemperatur ein stark voneinander differenziertes Auflöseverhalten zeigten.

Abb. 5 zeigt die erhaltenen Magen-Darm-Simulationen für extern beschichtete Kapseln unter Variation des eingesetzten Weichmachers. Es ist anhand des sprunghaften Anstiegs der Polyvinylpyrrolidon-Kurve (PVP) zu erkennen, dass sich diese Kapseln binnen der ersten 20 Minuten nach Überführung in das Darmmedium vollständig auflösen. Hierdurch werden die restlichen, nach 2-stündiger Magensimulation verbliebenen 60% der verkapselten Anthocyane schlagartig freigesetzt. Unter Verwendung von Glycerin oder Polyethylenglykol (PEG) bedarf es zum Teil einige Stunden bis hin zu Tagen, bis die im Kapselinneren längerfristig gespeicherten Anthocyane durch die vollständige Lyse der Kapseln freigesetzt werden. Insgesamt zeigen die Simulationen somit deutlich, dass lediglich im Falle der PVP-Kapseln ein schnelles Auflösen der Kapseln binnen weniger Minuten im schwach basischen Darmmedium erfolgt und ein sprunghafter Anstieg, so wie er für die gezielte Darmfreisetzung gewünscht ist, detektiert werden kann.

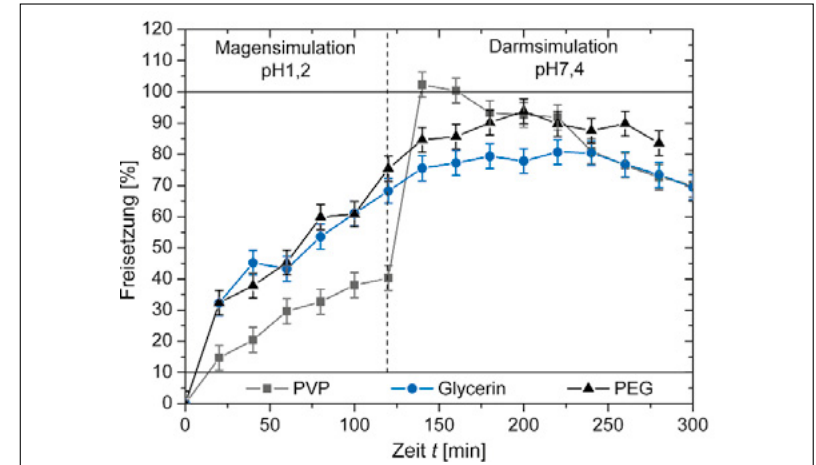


Abb. 5: Magen-Darm-Simulation bei 37 °C unter Variation des Weichmachers.

Weiterhin sind die hohen Elastizitätsmoduln, verursacht durch die externen Schellackbeschichtungen, besonders vorteilhaft, da die Kapseln so von außen einwirkenden Kräften hohe Widerstände entgegensetzen können.

In dieser Arbeit konnte somit ein speziell für die Lebensmittelanwendung zugelassenes Kapselmodellsystem erfolgreich synthetisiert werden. Die vorgestellten, mit Schellack beschichteten Kapseln bieten die Möglichkeit der effektiven Extraktstabilisierung und nachhaltigen Speicherung mit gezielter Darmfreisetzung unter Verwendung einer mit PVP versetzten Schellackformulierung. Die zahlreichen systematischen Deformations- und Freisetzungsuntersuchungen konnten hierbei zur Beschreibung und Förderung des Verständnisses des komplexen Gelbildungsmechanismus und der Anthocyanindiffusion beitragen. Für die erfolgreiche Anwendung in Lebensmitteln wäre es nun noch erforderlich, die Kapselgröße signifikant zu reduzieren ($< 200 \mu\text{m}$) und Lagerversuche in verschiedenen Produkten durchzuführen. Weitere Variationen der Schellackformulierung, die die Permeabilität der Schellackcoatings maßgeblich beeinflussen, könnten zu einer weiteren Verbesserung des Freisetzungsverhaltens beitragen.

Literatur

- [1] E. Graf und W. Bothe: Mikroverkapselung durch Zertropfen, *Pharmazie in unserer Zeit*, 1984, 13, 71-82
- [2] J. Gaydos: The Laplace Equation of capillarity, In: *Studies in Interface Science: Drops and Bubbles in Interfacial Research*, 6. Auflage, Hrsg.: D. Möbius und R. Miller Amsterdam, 1998, 1-59
- [3] A.V. Makievski; G. Loglio; J. Krägel; R. Miller; V.B. Fainerman und A.W. Neumann: Adsorption of Protein Layers at the Water/Air Interface As Studied by Axisymmetric Drop and Bubble Shape Analysis, *Journal of Physical Chemistry B*, 1999, 103(44), 9557-9561
- [4] A.E. Schulman und E.K. Rideal: On the Surface Potentials of Unimolecular Films of Long Chain Fatty Acids. Part I. Experimental Method, *Proceedings of the Royal Society A*, 1931, 130, 259-270
- [5] I.R. Peterson: Kelvin probe liquid-surface potential sensor, *Review of Scientific Instruments*, 1999, 70, 3418-3425
- [6] C.D. Kinloch und A.I. McMullen: Improved equipment for the measurement of interfacial potentials, *Journal of Scientific Instruments*, 1959, 36, 347-349
- [7] G. Pieper; H. Rehage und D. Barthès-Biesel: Deformation of a Capsule in a Spinning Drop Apparatus, *Journal of Colloid and Interface Science*, 1998, 202, 293-300
- [8] D. Barthes-Biesel: Mechanics of encapsulated droplets, *Progress in Colloid and Polymer Science*, 1998, 111, 58-64
- [9] A. Blandino; M. Macias und D. Cantero: Formation of calcium alginate gel capsules: influence of sodium alginate and CaCl_2 concentration on gelation kinetics, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 1999, 88, 686-689
- [10] K. Yamagiwa; Y. Shimizu; T. Kozawa; M. Onodera und A. Ohkawa: Formation of calciumalginate gel coating on biocatalyst immobilization carrier, *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 1992, 25, 723-728
- [11] S. Leick; A. Kemper und H. Rehage: Alginate/Poly-L-Lysine capsules: Mechanical properties and drug release characteristics, *Soft Matter*, 2011, 7, 6684-6694
- [12] S. Leick; P. Degen und H. Rehage: Rheological Properties of Capsule Membranes, *Chemie Ingenieur Technik*, 2011, 83, 1140-1144
- [13] S. Leick; M. Kott; P. Degen; S. Henning; T. Päsler; D. Suter und H. Rehage: Mechanical properties of liquid-filled shellac composite capsules, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2011, 13, 2765-2773
- [14] A. Fery und R. Weinkamer: Mechanical properties of micro-and nanocapsules: Single-capsule measurements, *Polymer*, 2007, 48, 7221-7235
- [15] W.T. Koiter: A spherical shell under point loads at its poles, In: *Progress in Applied Mechanics*, Macmillan, New York, 1963, 155-165
- [16] M.M. Giusti und R.E. Wrolstad: Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy, In: *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, Hrsg: R.E. Wrolstad; T.E. Acree; H. An; E.A. Decker; M.H. Penner; D.S. Reid; S.J. Schwartz; C.F. Shoemaker und P. Sporns, Wiley-VCH Verlag, New-York, 2001

Im Rahmen des DFG/AiF-Clusters „Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten Multikapselsystemen“ wurde das Teilprojekt 2 über die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) gefördert.

Summary Subproject 2

Formation kinetics, rheological properties and induced structural decomposition of biofunctional coverings and microcapsules

In the framework of the collective research program we synthesized a capsule model system by ionic cross-linking of the biopolymers alginate and pectin. After the successful optimization of the process parameters and the examination of the extract stability in the encapsulation system, the mechanical properties of the gel membranes were characterized and the membrane permeability was studied. Rheological measurements and analytical calculations of the Young's moduli showed that the mechanical properties of the liquid filled capsules could be selectively adjusted under variation of the gelation time and the used calcium ion concentration. First tests of the release kinetics showed that an additional coating was necessary to seal the macro pore hydrogel membranes and to keep the anthocyanin molecules stored inside the capsules.

To accomplish the pH-induced colon targeting, two different strategies were pursued: For one thing, we synthesized composite membranes by the incorporation of PLL or shellac. For another thing, we applied external coatings on the capsule surfaces either by using the layer-by-layer technique to obtain polyelectrolyte multilayers or by inducing acid precipitation to form a dense shellac layer. While the formation of composite and multilayer membranes did not significantly prevent the release kinetics, externally shellac coated capsules offered the opportunity of effective extract stabilization, long-lasting storage as well as colon targeting by using PVP as plasticizer for the coating formulation. The capsules, thus synthesized, showed already all desired release and stability properties, but for technical applications their sizes should be reduced to diameters below 200 micrometres.

Teilprojekt 3 (AiF)

Milchproteinhydrogele als Trägerstoffe für bioaktive Substanzen: Wasserunlösliche Mikrokapselsysteme zur Stabilisierung und kontrollierten Freisetzung von bioaktiven Inhaltsstoffen aus der Heidelbeere (AiF 15611 N)

Prof. Dr. Ulrich Kulozik,

Dipl.-Ing. Michael Betz

Technische Universität München

Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung (ZIEL)

Abteilung Technologie

Ausgangssituation und Motivation

Heidelbeeren, insbesondere Wildheidelbeeren, enthalten verschiedene Stoffgruppen, die sich positiv auf die Gesundheit des Menschen auswirken. Sie besitzen aufgrund eines hohen Anteils an Anthocyanen eine sehr hohe antioxidative Kapazität im Vergleich zu anderen Obst- und Gemüsearten und sind daher besonders als bioaktive Zusatzstoffe für Functional-Food-Produkte interessant. Ein wichtiges Aufgabengebiet der modernen Lebensmitteltechnologie ist die Entwicklung und Verbesserung von Verkapselungssystemen zur Einbringung solcher bioaktiver Stoffe in Lebensmittelmatrices. Für diese Systeme müssen pharmazeutische Zielsetzungen, wie der Transport und die gezielte Freisetzung des verkapselten Wirkstoffs im menschlichen Körper, umgesetzt werden, ohne dass die nutritiven und sensorischen Aspekte des Trägerlebensmittels beeinträchtigt werden. Aus diesem Grund greift man auf das Verfahren der Mikroverkapselung zurück. So lassen sich Verkapselungssysteme im μm -Größenbereich erzeugen, die die verkapselten Stoffe im Lebensmittel stabilisieren, bei der Nahrungsaufnahme nicht wahrgenommen werden und gleichzeitig Stofftransport und -freisetzung im Körper ermöglichen.

Im Bereich der wasserunlöslichen Mikroverkapselung von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen als funktionelle Lebensmittelinhaltsstoffe existieren jedoch bisher kaum Erfahrungen. Der Einsatz von thermisch verfestigten Milchproteinen als Matrixmaterial gilt hierbei als vielversprechender Ansatz. Bisher existieren jedoch nur wenige Arbeiten zur Mikroverkapselung mittels hitzeinduzierter Gelbildung von Milchproteinen. Für medizinische Anwendungen hingegen wird der Einsatz von milchproteinbasierten Hydrogelen als Carriermatrix für die Verkapselung von Wirkstoffen seit einigen Jahren untersucht. Demnach bieten Milchproteine neben ihrer gesundheitlichen Unbedenklichkeit ideale techno-

logische Eigenschaften für eine Matrixbildung sowie für die dadurch mögliche Verkapselung von bioaktiven Substanzen.

Zielsetzung des Projektes und Vorgehensweise

Im Rahmen des Forschungsvorhabens (Teilprojekt 3 im DFG/AiF-Cluster) wurden Techniken für die Mikroverkapselung von Heidelbeerextrakt (HBE) mittels thermisch induzierten wasserunlöslichen Milchproteingelen entwickelt und hinsichtlich ihrer Stabilisierungseigenschaften sowie Freisetzungskinetik optimiert. Zunächst wurden für die Mikroverkapselung von Heidelbeerextrakt geeignete Molkenproteingelsysteme identifiziert. Diese dienten im nächsten Schritt als Matrices für die reproduzierbare und steuerbare Herstellung von Mikrokapseln. Dazu wurde die Wasser-in-Öl (W/O)-Emulsionsmethode auf die thermische Gelbildung der Molkenproteine adaptiert. Anschließend wurde untersucht, welchen Einfluss die untersuchten Produkt- und Prozessparameter des Herstellungsverfahrens auf die physikalische Stabilität sowie die Freisetzungseigenschaften der verschiedenen Mikrokapseln *in vitro* haben. Dann wurde der Einfluss der verschiedenen Produkt- und Prozessparameter auf die Freisetzungseigenschaften von Heidelbeerextrakt bzw. auf den verkapselungsbedingten Schutzeffekt geklärt. Daraus resultierend erfolgten Untersuchungen zum Coating der Mikrokapseln, um eine gezielte Freisetzung des verkapselten Heidelbeerextraktes im Darm zu gewährleisten.

Kernergebnisse

Außerhalb ihres natürlichen Milieus weisen Anthocyane im Sauren ihre höchste Stabilität auf. Aus diesem Grund wurden saure Molkenproteinsysteme mit pH 1,5 und pH 3 für die Verkapselung von Heidelbeerextrakt ausgewählt. Dabei stellte sich eine Proteinkonzentration der Gele von 20% als optimal in Bezug auf die Anthocyan-Retention im Proteingelnetzwerk und die technische Umsetzbarkeit heraus. Zur thermischen Gelbildung der Proteinlösungen wurde eine Erhitzung auf 80 °C für 10 min als geeignete Kombination identifiziert. Bei dieser thermischen Belastung konnten wasserunlösliche Gele bei nur geringem Anthocyanabbau erzeugt werden. Die Molkenproteingele mit pH 1,5 und pH 3 wurden zunächst auf ihre Eignung zur Verkapselung und Stabilisierung der Anthocyane untersucht. Dazu wurden Heidelbeerextrakt-Protein-Mischlösungen mit pH 1,5 und pH 3 thermisch geliert und der Anthocyan Gehalt während der Lagerung analysiert (**Abb. 1**).

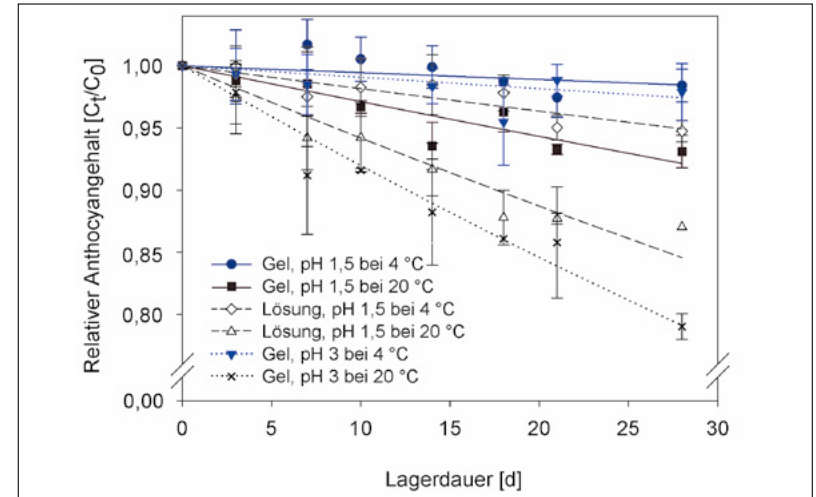


Abb. 1: Relativer Anthocyan Gehalt von Molkenproteingelen mit 5% verkapseltem Heidelbeerextrakt sowie wässrigen 5%-igen Heidelbeerextraktlösungen während der Lagerung im Dunkeln.

Für beide pH-Werte konnte eine verkapselungsbedingte Stabilisierung der Anthocyanfraktion über eine Lagerungsdauer von 28 Tagen im Vergleich zu wässrigen Lösungen festgestellt werden, wobei eine bessere Stabilisierung bei pH 1,5 erreicht wurde. Die höhere Anthocyanstabilität bei pH 1,5 ist auf das Vorliegen der Anthocyane als stabiles Flavyliumkation zurückzuführen. Zur Erzeugung von Mikrokapseln aus den Molkenprotein-Heidelbeerextrakt-Mischlösungen wurde die in **Abb. 2** schematisch dargestellte Wasser-in-Öl (W/O)-Emulsionsmethode auf die thermische Gelbildung der Molkenproteine adaptiert.

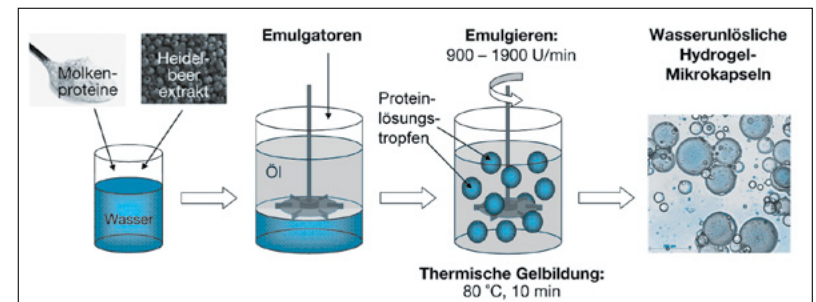


Abb. 2: Schematische Darstellung des W/O-Emulgierprozesses zur Mikrokapselherstellung.

Das W/O-Emulsionsverfahren umfasst die Herstellung einer W/O-Emulsion durch Emulgieren der wässrigen Molkenprotein-Heidelbeerextraktlösung in Pflanzenöl. Bei der anschließenden Erhitzung der Emulsion gelieren die dispergierten Proteinlösungstropfen und es kommt zum physikalischen Einschluss des bioaktiven Stoffes. Die gelierten Proteinlösungstropfen können anschließend als Hydrogel-Mikrokapseln aus der Ölphase abgetrennt werden.

Die Emulsionen wurden in einem Rührkessel mit Strombrechern mittels Scheibenrührer hergestellt. Mit dieser Apparatur konnten bei einem Dispersphasenanteil von 15 % durch Einsatz des Emulgators PCDL (Phosphatidylcholin depleted lecithin) Mikrokapseln mit mittleren Durchmesser von 20-180 µm hergestellt werden. Hierbei zeigte sich, dass bei pH 3 stärkere Wechselwirkungen zwischen Heidelbeerextraktbestandteilen und Molkenproteinen auftraten als bei pH 1,5. Bei der Mikroverkapselung konnte aufgrund dieser pH-Abhängigkeit der Wechselwirkungen in Molkenproteingele mit pH 1,5 bis zu 10% Heidelbeerextrakt, in Gele mit pH 3 maximal 5 % Heidelbeerextrakt verkapselt werden. Ein Heidelbeerextraktanteil von 10% führte bei pH 3 zu starken Aggregationserscheinungen und es konnten, im Gegensatz zu pH 1,5, keine sphärischen Mikrokapseln mehr erzeugt werden. Die Molkenproteingele mit pH 1,5 waren somit sowohl zur Anthocyanstabilisierung als auch in Bezug auf die Mikrokapselherstellung besser geeignet als die Gele mit pH 3. Für weitere Untersuchungen zur Verkapselung von Heidelbeerextrakt wurden daher die Gele mit pH 1,5 eingesetzt. Die Mikrokapseln mit pH 1,5 und einem HBE-Gehalt von 10% sind in **Abb. 3** dargestellt.

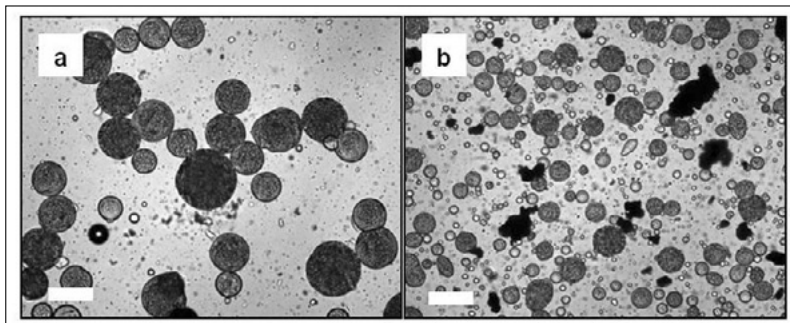


Abb. 3: Mikroskopische Aufnahmen der Mikrokapseln mit einem Heidelbeerextraktgehalt von 10%, hergestellt ohne Emulgator (a) und mit Emulgator PCDL (b). Der weiße Balken entspricht 100 µm.

Bei der Entwicklung eines effektiven Mikroverkapselungssystems muss die Bioaktivität des verkapselten Kernmaterials auch nach der Mikroverkapselung gewährleistet sein. Da es bei der Mikroverkapselung zu Veränderungen des Kernmaterials kommen kann, wurde im nächsten Schritt der prozessbedingte

Verlust der antioxidativen Kapazität des Heidelbeerextrakts während der Mikrokapselherstellung überprüft und quantifiziert. Hierzu wurde die antioxidative Kapazität mit Hilfe des TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)-Assays zu allen Prozessstufen bestimmt und so der Einfluss der einzelnen Prozessschritte voneinander abgegrenzt (**Abb. 4**).

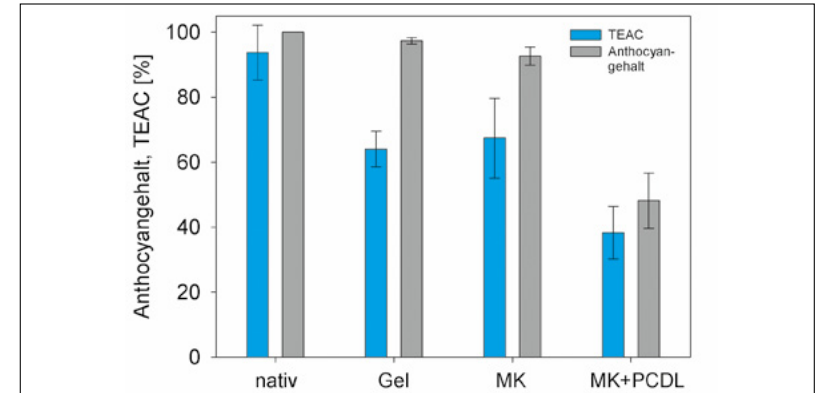


Abb. 4: Relatives antioxidatives Potenzial und relativer Anthocyanengehalt der Molkenprotein-Heidelbeerextraktlösung (nativ) und des daraus erzeugten thermischen Gels (Gel) sowie der Mikrokapseln ohne Emulgator (MK) und mit Emulgator PCDL (MK, PCDL).

Es ist bekannt, dass Phenole mit Proteinen interagieren und Komplexe bilden. Hierbei kommt es auch zu einer Verminderung der antioxidativen Kapazität, welche von der Art des Flavonoids und auch der Art des Proteins abhängig ist. Diese Protein-Polyphenol-Wechselwirkungen sind bei hohen Temperaturen stärker. Dies erklärt den gemessenen ca. 35 %-igen Verlust der antioxidativen Kapazität des Heidelbeerextrakts während der Erhitzung (Gel). Die Anwesenheit von Öl bei der Erhitzung (MK) führte zu keinen signifikanten Veränderungen gegenüber der Erhitzung ohne Ölkontakt. Da der Anthocyanengehalt bei der Erhitzung nahezu konstant blieb, ist die dabei beobachtete verkapselungsbedingte Abnahme des antioxidativen Potenzials auf einen Verlust anderer antioxidativ wirksamer HBE-Komponenten als der Anthocyane zurückzuführen. Nur bei der Mikrokapselherstellung mit Emulgator PCDL kam es aufgrund spezifischer PCDL-Anthocyan-Interaktion zu einem starken Anthocyanverlust und damit zusätzlichem Verlust an antioxidativem Potenzial, weshalb auf den weiteren PCDL-Einsatz verzichtet wurde.

Die Untersuchungen zur antioxidativen Kapazität belegten, dass das Heidelbeerextrakt auch nach der Mikroverkapselung noch antioxidativ wirksam war. Umfangreiche Zellkulturassays im Cluster-Teilprojekt 7 an der TU Kaiserslautern bestätigten zudem die Bioaktivität des mikroverkapselten Heidelbeerextraktes.

Wie anhand von In-vitro- und Ex-vivo-Versuchen (Teilprojekt 6 an der Universität Halle und Teilprojekt 7 an der TU Kaiserslautern sowie eigene Analysen) festgestellt wurde, erfolgt die Freisetzung aus den Molkenproteinmatrices im wässrigen Magen- und Dünndarmmilieu diffusiv und damit zeitabhängig. Durch die zeitverzögerte Freisetzung der verkapselten Anthocyane kann im Dünndarm (Zielort für die Anthocyanfreisetzung) einem kontinuierlichen Anthocyanabbau entgegengewirkt werden. Auf diese Weise ist es möglich, den Zeitraum zu verlängern, in dem eine konstante Konzentration stabiler Anthocyan-Flavylumkationen im Dünndarm vorliegt, was im Hinblick auf die Resorption und damit Bioverfügbarkeit der Anthocyane als positiv zu beurteilen ist.

Zur Vermeidung des diffusiven Anthocyanverlusts vor dem Erreichen des Dünndarms wurden Coatings aus Schellack sowie verschiedenen Lipiden auf die Mikrokapseln aufgebracht. Das Schellackcoating führte zu einer Verlangsamung der Freisetzung, eine Diffusionsbarriere konnte jedoch nicht erzeugt werden. Durch das Coating mit hochschmelzenden Lipiden hingegen konnte die diffusive Freisetzung in simuliertem Magensaft signifikant reduziert werden (**Abb. 5**).

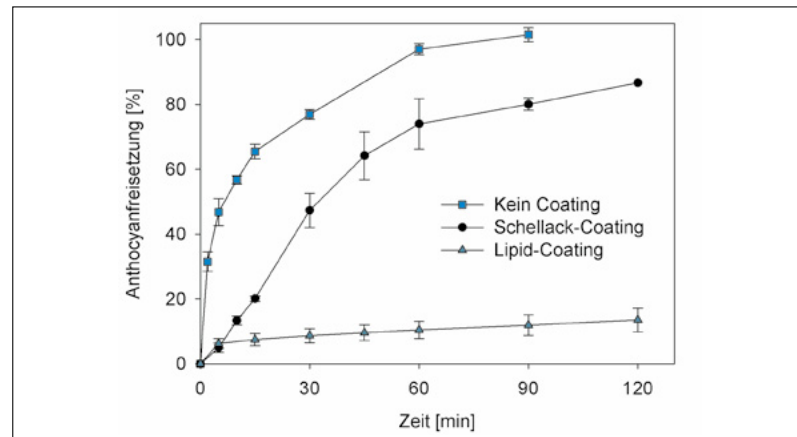


Abb. 5: Anthocyanfreisetzung aus den gecoateten und nicht gecoateten Mikrokapseln in simuliertem Magensaft (pH 1,2, ohne Enzym) bei 37 °C.

Neben der Stabilisierung der Anthocyane durch die Verkapselung in Molkenproteingele wurde auch für die nativen Molkenproteine ein stabilisierender Effekt auf die Anthocyane beobachtet, der einem Anthocyanabbau bei pH-Werten im neutralen Bereich entgegenwirkte (**Abb. 6**).

Es wird deutlich, dass bei einem molaren Anthocyan/Protein-Verhältnis von 1:1 ein deutlicher anthocyanstabilisierender Effekt auftritt. Bei geringeren Proteinkonzentrationen und damit größeren Anthocyan/Protein-Verhältnissen konnte

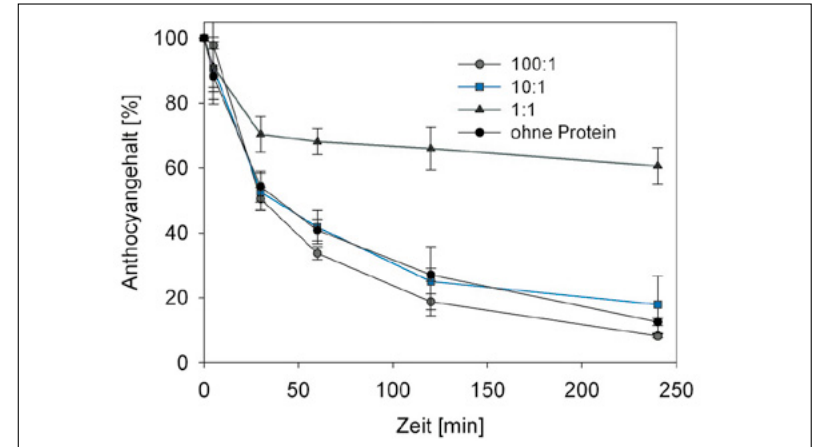


Abb. 6: Anthocyangehalt in Phosphatpuffer mit pH 6,8 nach Inkubation von Heidelbeerextrakt-Molkenprotein-Mischlösungen bei verschiedenen molaren Anthocyan/Molkenprotein-Verhältnissen (T=37 °C).

diese Stabilisierung nicht festgestellt werden. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass zur erfolgreichen Anthocyanstabilisierung mittels nativer Molkenproteine im neutralen Bereich ein äquimolares Anthocyan/Protein-Verhältnisse anzustreben ist. Auf der Basis dieser Ergebnisse wurden zusätzlich zu den Untersuchungen zum Mikrokapsel-Coating daher auch Versuche zur Verkapselung einer nativen Molkenprotein-Heidelbeerextraktlösung und damit zur Ausnutzung dieses Stabilisierungseffektes durchgeführt. Dazu wurde ein auf dem Verfahren der Sprühhühlung basierendes System zur Verkapselung einer nativen Heidelbeerextrakt-Protein-Lösung eingesetzt. Die Sprühhühlung umfasst das Emulgieren der HBE-Protein-Lösung in einer Lipid-Schmelze ($T > T_{\text{Schmelzpunkt}}$) und das Zerstäuben dieser Emulsion in eine Kaltluftkammer ($T < T_{\text{Schmelzpunkt}}$), wo es zum Aushärten der erzeugten Tropfen kommt (**Abb. 7**).

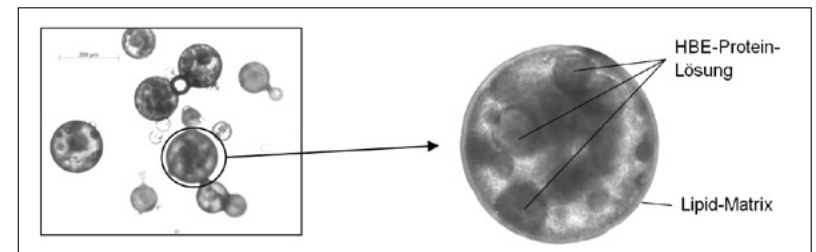


Abb. 7: Mikroskopische Aufnahme der mittels Sprühhühlung erzeugten Mikrokapseln.

Die Untersuchung der Freisetzungseigenschaften der erzeugten Mikrokapselformen verdeutlichte, dass die Sprühkühlung sich prinzipiell eignet, eine flüssige HBE-Protein-Lösung zu verkapseln, um so den beobachteten Schutzeffekt der nativen Molkenproteine auszunutzen zu können. Andererseits konnte aber keine vollständige Diffusionsbarriere im wässrigen Milieu erzeugt werden und es kam aufgrund mechanischer Zerstörung der Fettmatrix sowie osmotischer Effekte zur diffusiven Freisetzung der Anthocyane in die wässrige Umgebung. Weiterführende Versuche zur Verkapselung von ungelöstem Heidelbeerextrakt und Molkenproteinen als Suspension in Fett erwiesen sich als vielversprechend, den Einfluss osmotischer Effekte und damit die Anthocyanfreisetzung im wässrigen Medium zu minimieren.

Im Rahmen des Forschungsvorhabens wurden verschiedenartige protein- und lipidbasierte Systeme zur Verkapselung des Heidelbeerextraktes in gelöstem und ungelöstem Zustand eingesetzt und charakterisiert. Der unterschiedliche Charakter der in diesem Projekt erzeugten Verkapselungssysteme erlaubt es, produktspezifische Anforderungen bei der Auswahl eines geeigneten Kapseltyps zu berücksichtigen und ermöglicht den Einsatz in unterschiedlichen Produktgruppen. Der beobachtete anthocyanstabilisierende Effekt der nativen Molkenproteine kann bei anthocyanhaltigen Milchprodukten durch eine gezielte Rezepturanpassung ausgenutzt werden und daher als Alternative zur Mikroverkapselung betrachtet werden.

Die Ergebnisse dieses Projektes bilden eine gute Basis für die Anwendung und Stabilisierung phenolischer, anthocyanreicher Extrakte in Lebensmitteln. Dies gilt für die Erzeugung funktioneller Lebensmittel und den dafür notwendigen Erhalt der Bioaktivität ebenso wie für eine Anwendung phenolischer Extrakte als natürliche Farbstoffe zur Farbgebung in Lebensmitteln. Die Projektergebnisse sind für zwei wesentliche Trends mit hohem wirtschaftlichem Potenzial, nämlich den der funktionellen Lebensmittel sowie den der natürlichen Zusatzstoffe, von Bedeutung.

Mit der Entwicklung von Technologien zur Verkapselung bioaktiver Inhaltsstoffe wurde in diesem Projekt ein Beitrag zur Entwicklung funktioneller Lebensmittelprodukte geleistet. Die Ergebnisse des Vorhabens sind zur Umsetzung neuer Produkt- und Verfahrenskonzepte nutzbar. Verkapselte Wirkstoffe lassen sich aufgrund der Matrixunabhängigkeit in Produkten einsetzen, die bisher für sensitive Wirkstoffe als nicht geeignet angesehen werden, wodurch neuartige funktionelle Lebensmittel geschaffen werden können.

Literatur

- [1] Betz, M., Kulozik, U.: Whey protein gels for the entrapment of bioactive anthocyanins from bilberry extract. *International Dairy Journal*, 21, 9, 2011, 703-710.
- [2] Betz, M., Kulozik, U.: Microencapsulation of bioactive bilberry anthocyanins by means of whey protein gels. In: *Proceedings of the 11th International Congress on Engineering and Food, ICEF 2011, Athens, Greece, May 22-26.*
- [3] Betz, M., Heidebach, T., Kulozik, U.: Endstation Dickdarm - Neuartige Milchprotein-Mikrokapseln als Wirkstoffvehikel. *Labor&More*, 2, 2010. S. 74-77. ISSN: 1866-5217.
- [4] Betz, M., Heidebach, T., Kulozik, U.: Targeting the gut - Novel milk protein-based microparticles as vehicles for bioactive ingredients. *Lab&More*, 1, 2010. pp. 34-37. ISSN: 1866-5225.
- [5] Betz, M., Tolkach, A., Kulozik, U.: Acidic whey protein gels for encapsulation of bioactive plant compounds. In: *Proceedings of the 5th International Symposium on Food Rheology and Structure, ISFRS 2009, Zürich, Schweiz, ISBN 978-3-905609-43-1, 188-191.*

Im Rahmen des DFG/AiF-Clusters „Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten Multikapselsystemen“ wurde das Teilprojekt 3 des Forschungskreises der Ernährungsindustrie e.V. (FEI) über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung und -entwicklung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.

Summary Subproject 3

Milk protein hydrogels as carriers for bioactive compounds: water-insoluble microcapsule systems for stabilisation and controlled release of bioactive bilberry compounds

The objective of the research project was to develop and optimise techniques for the microencapsulation of bilberry extract by means of thermally induced water-insoluble whey protein hydrogels. Whey protein systems at pH 1.5 were found to be suitable matrices for the encapsulation and stabilisation of the bilberry anthocyanins. The microcapsule production from whey protein solutions was based on the w/o-emulsion method. By addition of the emulsifier PCDL (phosphatidylcholine depleted lecithin) microcapsules with mean diameters of 20-180 µm could be produced. Thereby, microcapsules with a maximum bilberry extract content of 10% could be produced at pH 1.5. The antioxidative potential of the bilberry extract was determined by means of the TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) assay. During the production of microcapsules using the emulsifier PCDL specific PCDL-anthocyanin interactions occurred. These interactions resulted in a strong anthocyanin loss and a decrease of the antioxidative potential of the encapsulated bilberry extract. For this reason the further use of PCDL was avoided. The bilberry extract microencapsulated without the use of an emulsifier showed about 65% of its initial antioxidative potential. Since the anthocyanin degradation during heating was negligible, the observed decrease of antioxidative potential during microencapsulation can be attributed to the loss of other antioxidative bilberry extract components than anthocyanins. Cell culture assays of the subproject 7 at the TU Kaiserslautern furthermore confirmed the bioactivity of the microencapsulated bilberry extract. As demonstrated by in-vitro and ex-vivo experiments (subproject 6 at the Universität Halle and subproject 7 as well as own experiments) the release from the whey protein matrices in an aqueous gastrointestinal environment was driven by diffusion and thus time-dependent. The delayed release of the encapsulated anthocyanins renders it possible to counteract a continuous degradation of the anthocyanins in the small intestine (desired location of anthocyanin release). Thus, the period during which a constant concentration of stable anthocyanin flavylum-cations exists in the small intestine could be extended. This is expected to improve the absorption and bioavailability of anthocyanins. To avoid the diffusive loss of anthocyanins before reaching the location of release, the microcapsules were enterically coated. Shellac as well as low- and high-melting fats were used as coating materials. By this means, the diffusive release in the simulated digestive media could be reduced significantly. In addition to the stabilisation of the anthocyanins due to the encapsulation in thermal whey protein gels also the native whey proteins were found to have a stabilising effect on the anthocyanins, which counteracted

the anthocyanin degradation at neutral pH. Therefore a further system based on the process of spray-congealing for the encapsulation of a non-denatured bilberry extract-whey protein solution was developed to exploit the observed stabilising effect. Furthermore a water-free encapsulation system for encapsulating bilberry extract-whey protein suspensions in lipid matrices was established. The different properties of the varying encapsulation systems allow the consideration of product-specific requirements for the selection of a suitable capsule type for food products. Consequently, the results of the project are a good basis for the application and stabilisation of phenolic, anthocyanin-rich extracts in foods.

Teilprojekt 4 (AiF)

Mikrostrukturierte multidisperse Hüllkapseln als Träger bioaktiver Substanzen: Untersuchungen zum Einfluss von molekularen Wechselwirkungen und Diffusionsbarrieren auf die Stabilität und die Freisetzung von Inhaltsstoffen aus der Wildheidelbeere (AiF 15612 N)

Prof. Dr. Heike P. Schuchmann,
Dipl.-Ing. Kerstin Frank

Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
Institut für Bio- und Lebensmitteltechnik
Bereich I: Lebensmittelverfahrenstechnik

1. Motivation

$W_1/O/W_2$ -Emulsionen stellen prinzipiell eine Möglichkeit dar, hydrophile bioaktive Substanzen wie Anthocyane zu verkapseln und dadurch gezielt gegenüber mikrobiologischen Veränderungen, degradierenden Umgebungsbedingungen und Wechselwirkungen mit umgebenden Medien zu schützen. Ziel des Forschungsvorhabens (Teilprojekt 4 im DFG/AiF-Cluster „Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten Multikapselsystemen“) war es daher, mit umgebenden Emulgatorschichten und einer Triglyceridphase eine Art ‚Schutzhülle‘ (siehe **Abb. 1**) zu bilden, die die Bioaktivstoffe bei der Lagerung, beim Transport und bei der Magenpassage vor chemischen Reaktionen schützt und sie dann gezielt an gewünschten Stellen im menschlichen Verdauungssystem freisetzt (‚triggered release‘). Physikalische Eigenschaften der Hüllschichten und ‚Kapseln‘ wurden in Teilprojekt 2, die Aktivität der freigesetzten Inhaltsstoffe sowie eventuelle Wechselwirkungen zwischen dem Formulierungssystem und der Bioaktivität der Anthocyane in den Teilprojekten 6 und 7 untersucht.

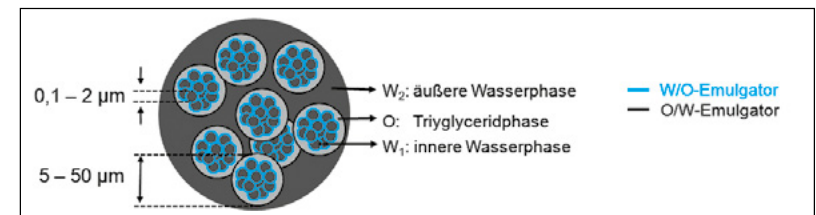


Abb. 1: Prinzip des untersuchten Stabilisierungs- und Freisetzungssystems auf Doppemulsionsbasis.

2. Anthocyanstabilität im Homogenisierprozess

Im Rahmen dieses Forschungsvorhabens konnte zunächst sichergestellt werden, dass es möglich ist, Anthocyane ohne signifikante Verluste in emulsionsbasierte Hüllkapseln einzubringen [1]. Hierfür wurden Untersuchungen bezüglich der Kinetik des thermischen Abbaus von Anthocyanen in einer wässrigen Heidelbeerextraktlösung (600761 Bilberry Extract 25%, Kaden Biochemical GmbH, Deutschland) bei prozesstypischen Temperaturen (60-90 °C) durchgeführt. Der temperaturspezifische Abbau der Inhaltsstoffe kann mit einer Kinetik 1. Ordnung beschrieben werden und liegt in prozesstypischen Zeiten unter 5 % der eingesetzten Menge. Untersucht wurde auch die Stabilität der Anthocyane unter hohen mechanischen und thermischen Beanspruchungen im Emulgierprozess. Bei typischen Hochdruckhomogenisationsbedingungen (Homogenisierdruck $\Delta p = 300 - 1.500$ bar mit entsprechendem Temperaturanstieg um max. 40 °C) konnte kein messbarer Anthocyanabbau beobachtet werden [1]. Damit ist der mechanische Emulgierprozess generell zum Verarbeiten von Anthocyanen geeignet.

3. Verfahren zur Herstellung anthocyanbeladener Doppemulsionen

Dies ermöglichte es, ein Verfahren zur Herstellung anthocyanbeladener Doppemulsionen auszuarbeiten, bei dem Anthocyane alleine oder in Form von konzentrierten Fruchtextrakten stabil in ein Doppemulsionssystem eingebracht werden können. Hierzu wurde ein zweistufiger, mechanischer Emulgierprozess (siehe **Abb. 2**) gewählt.

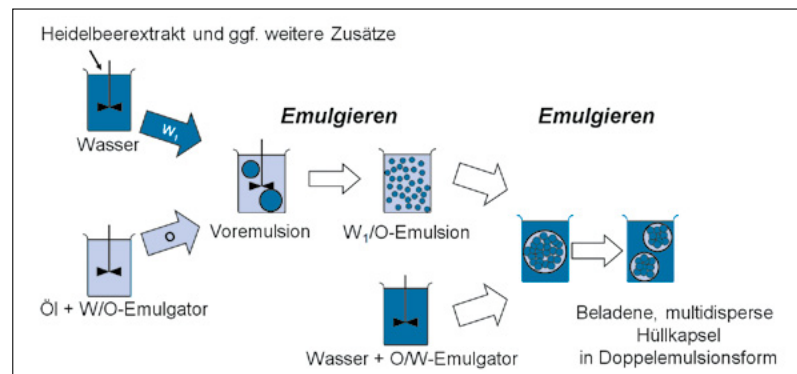


Abb. 2: Zweistufiger Emulgierprozess zur Herstellung von anthocyanbeladenen $W_1/O/W_2$ -Emulsionen.

Im ersten Emulgierschritt wird die innere, heidelbeerextraktthaltige W_1/O -Emulsion hergestellt. Hierfür werden zunächst das Heidelbeerextrakt und gegebenenfalls weitere stabilisierende Zusätze in der hydrophilen Phase (siehe Folgekapitel) unter Rühren gelöst. Müssen wasserlösliche Stabilisierungstoffe wie z. B. Pektine (siehe Kapitel 4.1), die sich erst bei erhöhten Temperaturen lösen, in die W_1 -Phase eingebracht werden, werden zwei separate W_1 -Phasen unter den jeweils benötigten Prozessbedingungen hergestellt und anschließend gemischt. Unlösliche Extraktpartikel werden durch Abnutschen (hier: Rundfilter FT 3-101-090, Grad 388, Sartorius Stedim biotech, Deutschland) unter Verwendung einer Vakuumpumpe entfernt.

Parallel wird die Ölphase durch Einrühren des öllöslichen W/O-Emulgators hergestellt. Nach langsamer Zugabe der hydrophilen zur lipophilen Phase werden diese mit einem Rotor-Stator System (hier: Ultra-Turrax T25, Dispergiereinheit S 25 N - 10 G, IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Deutschland) vordispersiert. Anschließend müssen die Tropfen auf sehr kleine Größen ($< 2 \mu\text{m}$) zerkleinert werden. Hierzu wird ein erhöhter Energieeintrag benötigt. Gezeigt werden konnte, dass die gewünschten Tropfengrößen sowohl mit einem Hochdruckhomogenisator (HDH, hier: Microfluidics MF-110EH-30) oder einem Zahnkranzdispergiersystem (ZKDM, hier: IKA® magicLAB®, IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Deutschland) gut hergestellt werden können.

Diese sogenannte ‚innere Emulsion‘ muss nun ein zweites Mal emulgiert und dabei in die äußere Wasserphase eingebracht werden. Während des zweiten Emulgierschritts wird die W_1/O -Emulsion dazu zunächst langsam unter Rühren (z. B. mit einem Propellerrührer) zur W_2 -Phase zugegeben. Anschließend muss wiederum erhöhte Energie eingebracht werden, um die Tropfen aufzubrechen. Hierbei ist allerdings zu berücksichtigen, dass hohe Scherkräfte, Dehnung sowie Turbulenz zu einem verstärkten Verlust der eingeschlossenen W_1 -Tropfen in die umgebende W_2 -Phase führen können. Daher muss im zweiten Emulgierschritt auf scherarme Verfahren zurückgegriffen werden. Gezeigt werden konnte, dass es möglich ist, diesen Emulgierschritt nicht nur mit den üblicherweise in der Forschung gerne eingesetzten Membranverfahren [2, 3] zu realisieren. Auch mit Kolloidmühlen (hier: IKA® magicLAB®, Module MK) konnten bei hohen Erhaltungsgraden Doppemulsionen hergestellt werden. Hiermit stehen zur Umsetzung einfach skalierfähige, kontinuierliche Herstellverfahren zur Verfügung.

Zur Charakterisierung der Mikrostruktur der W_1/O - sowie der $W_1/O/W_2$ -Emulsionen wurde sowohl die W_1 - sowie die W_1/O -Tropfengröße mittels statischer Lichtstreuung (Beckman Coulter LS 230 sowie Coulter LS 13320, beide Coulter Electronics GmbH, Deutschland) bestimmt.

4. Steuergrößen für die Mikrostruktur und Stabilität der inneren W_1/O -Emulsionen

4.1 Rezepturparameter: Hilfsstoffe

Prinzipiell müssen die W_1 -Tropfen mit einem W/O -Emulgator wie z.B. PGPR stabilisiert werden. Ohne weitere Zusatzstoffe (Salze, Zucker, Hydrokolloide u.a.) kann sowohl mit Hochdruckhomogenisatoren als auch mit Rotor-Stator-Maschinen die W_1 -Tropfengröße zwischen 0,1 und 10 μm variiert werden, wobei es schwierig ist, Tropfen $< 1 \mu\text{m}$ zu erhalten (siehe **Abb. 3**, offene Symbole). Dies liegt daran, dass der Emulgator PGPR die Tropfen nur unzureichend stabilisieren kann, obwohl er einer der am besten für W/O -Emulsionen geeigneten Emulgatoren ist, der für Lebensmittel überhaupt zugelassen ist.

Im Projekt konnte gezeigt werden, dass die Tropfenstabilisierung durch PGPR im Emulgierprozess durch die Zugabe von Salzen, wie Calciumchlorid (CaCl_2), deutlich verbessert werden kann (siehe **Abb. 3**, ohne Salz: Δ , mit Salz: \blacktriangle). Durch molekulare Interaktionen der PGPR-Moleküle mit Calciumchlorid an der W_1/O -Grenzfläche kommt es zur Ausbildung eines stabileren Grenzflächenfilms, der Koaleszenzvorgänge während der Emulsionsherstellung reduziert [4, 5]. So können insbesondere Tropfen $< 1 \mu\text{m}$ gut stabilisiert werden.

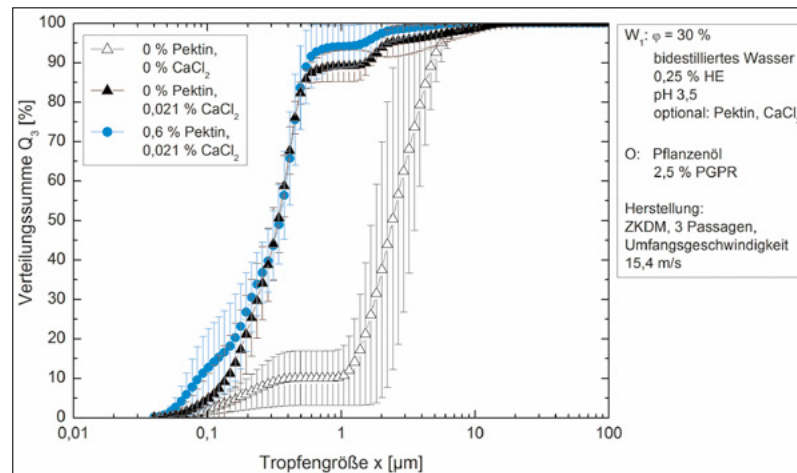


Abb. 3: Einfluss von CaCl_2 sowie Pektin auf die Mikrostruktur von W_1/O -Emulsionen mit einem Dispersphasenanteil φ von 30 %.

Hydrokolloide wie Pektine in der inneren Wasserphase W_1 können sowohl die Stabilität von Anthocyanen [6 - 8], als auch die Stabilität der finalen Doppemulsionen erhöhen. Gut geeignet für das hier untersuchte Stoffsystem ist z. B. das

niederveresterte, amidierete Pektin CU-L 077/10 der Herbstreith und Fox KG, Deutschland: Zur Gelierung der niederveresterten, amidierten Pektine kann geschickterweise deren Komplexbildung mit mehrwertigen Kationen, wie das auch für die Komplexbildung mit PGPR benötigte CaCl_2 , genutzt werden. Es kommt dann nicht nur zur Ausbildung eines viskoelastischen W_1/O -Grenzflächenfilms mit PGPR, sondern auch zum vollständigen Ausgelieren der W_1 -Tropfen. Das reduziert nicht nur Koaleszenz zwischen den W_1 -Tropfen im ersten Emulgierschritt, sondern wirkt insbesondere dem Verlust an W_1 -Tropfen in die W_2 -Phase während des zweiten Emulgierschritts entgegen.

Durch die Zugabe von Pektin verbessert sich das Emulgierergebnis zwar nicht, die Mikrostruktur der W_1/O -Emulsionen wird aber auch nicht negativ beeinflusst (siehe **Abb. 3**, \bullet). Demzufolge ist es möglich, Hydrokolloide zur Erhöhung der Anthocyanstabilität, der Prozessstabilität im zweiten Emulgierschritt sowie der Lagerstabilität der Doppemulsionen zuzugeben, ohne die Mikrostruktur der W_1/O -Emulsion signifikant zu beeinflussen. Durch die Zugabe einer Pektin-Salz-Mischung (hier: standardisierte Pektin-Calcium-Chlorid-Mischung Pektin Amid CB 025 E, Herbstreith und Fox KG, Deutschland) konnte die Lagerstabilität der W_1/O -Emulsionen bei Lagerung bei 4 °C von 3 Tagen auf bis zu 60 Tage (Ende des Messzeitraums) gesteigert werden.

4.2 Rezepturparameter: Bioaktivstoffe

Auch die in der inneren Wasserphase eingebrachten Bioaktivstoffe (hier: Heidelbeerextrakt) beeinflussen die Mikrostruktur der inneren W_1/O -Emulsionen. Ab einem Heidelbeerextraktanteil von $c_{HE} \geq 0,5 \%$ in der inneren Wasserphase kommt es bei der Herstellung von pektinhaltigen W_1/O -Emulsionen zu einer Zunahme großer Wassertropfen und zum Ausfallen von heidelbeerextraktartigen Gelpartikeln. Da ein höherer Extraktanteil eine Erhöhung des Trockenmasseanteils in der inneren Wasserphase bewirkt, können die heidelbeerextraktartigen Gelpartikeln vermutlich auf ein vorzeitiges Ausgelieren des Pektins unter Anwesenheit eines höheren Trockenmasseanteils zurückgeführt werden. Bei der Herstellung von pektinhaltigen Emulsionen ist daher darauf zu achten, dass der Trockenmassegehalt auf den Extraktgehalt angepasst wird.

4.3 Prozessparameter

Wie für langsam stabilisierende Emulgatorsysteme bekannt [9, 10], neigen auch die W_1 -Tropfen bei der Herstellung zu Tropfenkoaleszenz, wenn ein zu hoher Energieeintrag gewählt wird. Optimale Prozessbedingungen für eine ausreichende Tropfenzerkleinerung, ohne eine massive Koaleszenz der Tropfen auszulösen, müssen daher ermittelt werden.

Abb. 4 zeigt dies an einem Beispiel für Hochdruckhomogenisierprozesse (HDH) und das Emulgieren mit einem Zahnkranzsystem (ZKDM). Für die gewählte ZKDM (siehe Kapitel 3) können bei Umfangsgeschwindigkeiten von bis zu 15,4 m/s Emulsionen mit kleinen Tropfendurchmessern hergestellt werden. Bei höheren Umfangsgeschwindigkeiten (hier: 23 m/s) kommt es dagegen zu hohen Koaleszenzraten, die in größeren Tropfen resultieren. Eine effizientere Zerkleinerung kann dann nur noch durch Mehrfachpassagen (in **Abb. 4** bis zu drei Passagen) erreicht werden.

Genauso wie höhere Umfangsgeschwindigkeiten in der ZKDM führte das Emulgieren im Hochdruckhomogenisator, unabhängig vom Homogenisierdruck, zu einem hohen Grobgutanteil aufgrund hoher Koaleszenzraten. Demzufolge ist der Hochdruckhomogenisator nicht geeignet, um pektinhaltige W_1/O -Emulsionen mit geringem Grobgutanteil herzustellen.

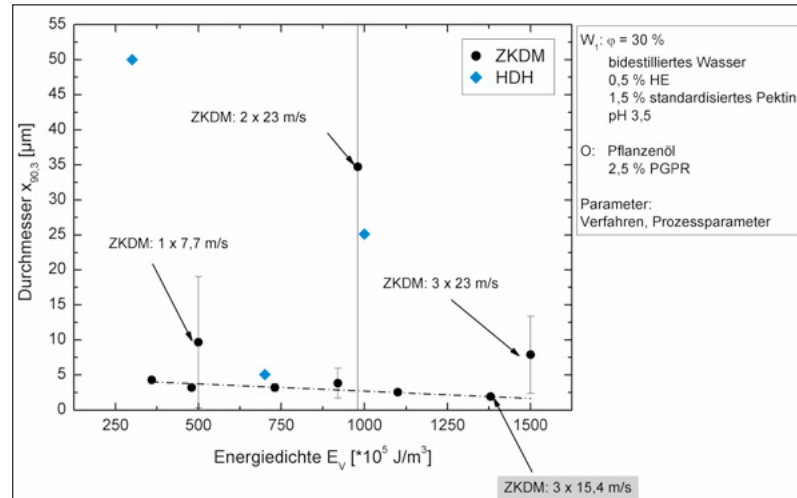


Abb. 4: Einfluss des Energieeintrages auf pektinhaltige W_1/O -Emulsionen.

5. Steuergrößen für die Mikrostruktur und Stabilität der $W_1/O/W_2$ -Emulsionen

Der erste Emulgierschritt, in dem die submikronen gelierten Tropfen hergestellt werden, die die eigentlichen ‚Kapseln‘ bilden, ist koaleszenzdominiert. Das bedeutet für die Prozessauslegung, dass es v.a. darauf ankommt, Koaleszenz der Wassertropfen zu vermeiden. Der zweite Emulgierschritt, in dem die weiteren Schutzhüllen um die ‚Mikrokapseln‘ aufgebaut werden, ist dagegen weitgehend zerkleinerungsdominiert. Dies heißt, dass die äußere Tropfengrößenverteilung

prozessstechnisch insbesondere durch den Energieeintrag (z. B. Spaltbreite zwischen Rotor und Stator oder Rotorumfangsgeschwindigkeit) beeinflusst werden kann.

Dennoch konnte auch im zweiten Emulgierschritt ein Einfluss von Tropfenkoaleszenz nachgewiesen werden. Die Kinetik der Tropfenstabilisierung durch den O/W-Emulgator beeinflusst daher als Rezepturparameter die resultierenden äußeren Tropfengrößenverteilungen. Kurzkettige Emulgatoren wie Tween 20 (CAS 9005-64-5, Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland) oder Gallensäure (CAS 8008-63-7, Produktnummer B8631, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deutschland) führen zu kleineren W_1/O -Tropfen, langkettige Emulgatoren wie Molkenproteinisolat (MPI, BiPRO®, Proteingehalt von 96 %, Davisco Foods International Inc., Schweiz), β -Lactoglobulin (isoliert aus MPI durch Filtrationsprozesse [11] an der TU München, Teilprojekt 3) oder Protein-Polysaccharid-Konjugat [5, 12] zu größeren W_1/O -Tropfen. Die zugrunde liegenden dynamischen Grenzflächeneffekte konnten in Kooperation mit dem Teilprojekt 2 (TU Dortmund) des Clusters durch Bestimmung der Adsorptionskinetiken (Pendant-Drop-Tensiometer) aufgezeigt werden. Die Messungen konnten bestätigen, dass die kurzkettigen Emulgatoren Tween 20 und Gallensäure schneller an der Grenzfläche adsorbieren und somit eine schnellere Stabilisierung der hergestellten Tropfengrenzflächen im Prozess ermöglichen als die beiden Proteine und das Protein-Polysaccharid-Konjugat.

Wie aus typischen Tropfenzerkleinerungsprozessen bekannt, ist auch hier die Viskosität der kontinuierlichen Phase ein wichtiger, die Mikrostruktur beeinflussender Rezepturparameter. Sie kann durch Zugabe von Hydrokolloiden wie Pektin zur W_2 -Phase erhöht werden. Damit kann die W_1/O -Tropfengröße der Doppel-emulsionen gesenkt werden. Das ist zum einen auf das günstigere Viskositätsverhältnis bei der Zerkleinerung zurückzuführen. Zum anderen werden die W_1/O -Tropfen durch die höhere Viskosität der umgebenden Phase in ihrer Bewegung gehemmt, wodurch sich die Kollisionsfrequenz der Tropfen und dadurch auch die Zahl der Koaleszenzereignisse verringern.

Eine weitere Möglichkeit, die Mikrostruktur der Doppel-emulsionen zu verändern, besteht in der Variation des Anteils an innerer W_1/O -Emulsion in der Doppel-emulsion, dem sogenannten äußeren Dispersphasenanteil $\phi_{W_1/O}$. Untersuchungen, bei denen Gallensäure, Molkenproteinisolat sowie ein Protein-Polysaccharid-Konjugat als Emulgator eingesetzt wurden, um Doppel-emulsionen mit einem äußeren Dispersphasenanteil $\phi_{W_1/O}$ von 30, 50 sowie 80% zu stabilisieren, zeigten, dass die W_1/O -Tropfengröße mit steigendem Dispersphasenanteil, unabhängig vom verwendeten Emulgator, abnimmt. Das kann auf die beim Emulgieren eingetragene Energiedichte E_v zurückgeführt werden. Diese hängt stark von der Leistungsdichte und der Verweilzeit ab. Beide nehmen beim Emulgieren mit Rotor-Stator-Systemen mit dem Dispersphasenanteil zu.

Mit dem hier vorgestellten Verfahren ist es somit möglich, Doppelemulsionen mit sehr unterschiedlichen Mikrostrukturen herzustellen. Relevante Einflussparameter sowohl stofflicher als auch prozesstechnischer Art konnten aufgezeigt werden. Alle Emulsionen zeigten eine Stabilität von bis zu 30 Tagen (max. Messdauer).

6. Stabilisierung und Freisetzung von Anthocyanen aus den Doppelemulsionen

Aufgabe der Doppelemulsionsstruktur ist eine Stabilisierung der verkapselten Anthocyane bis zum gewünschten Freisetzungsort (hier: Dünndarm) und dort eine „getriggerte“ Freisetzung. Untersucht wurden daher beide Aspekte.

6.1 Stabilisierung der Anthocyane in den Kapseln (innere Wassertropfen)

Trotz Aufbringen mehrerer Hüllen aus W/O- und O/W-Emulgatoren sowie einer O-Phase konnte eine initiale Freisetzung direkt nach der Herstellung sowie eine zeitabhängige Freisetzung von Anthocyanen aus den inneren Wassertropfen der Doppelemulsionen beobachtet werden. Als wichtigster Einflussparameter auf die Freisetzungskinetik konnte die W_1/O -Tropfengröße in Verbindung mit dem äußeren Dispersphasenanteil und der eingetragenen Energiedichte identifiziert werden. Kleinere Tropfen, die für Emulsionen mit einem höheren Dispersphasenanteil bei höheren Energiedichten hergestellt wurden, führten zu verstärkter Koaleszenz zwischen den W_1 -Tropfen und der umgebenden W_2 -Phase und damit zu einer schnelleren Anthocyanfreisetzung bereits im Prozess. Langkettige Emulgatoren bilden eine effektivere Freisetzungsbarriere gegen die beobachtete initiale Freisetzung (hier: Wert nach 30 Minuten) als kurzkettinge (siehe **Abb. 5**). Die anschließend beobachtete zeitliche Freisetzung dF/dt war unabhängig vom Dispersphasenanteil, der Tropfengröße oder der Art des hydrophilen Emulgators.

Um eine möglichst geringe Freisetzung der eingeschlossenen Anthocyane zu gewährleisten, müssen damit Doppelemulsionen mit möglichst großen W_1/O -Tropfen hergestellt werden, die im zweiten Emulgierschritt mit langkettigen Emulgatoren wie Molkenproteinisolaten oder Polysaccharid-Protein-Konjugaten stabilisiert werden.

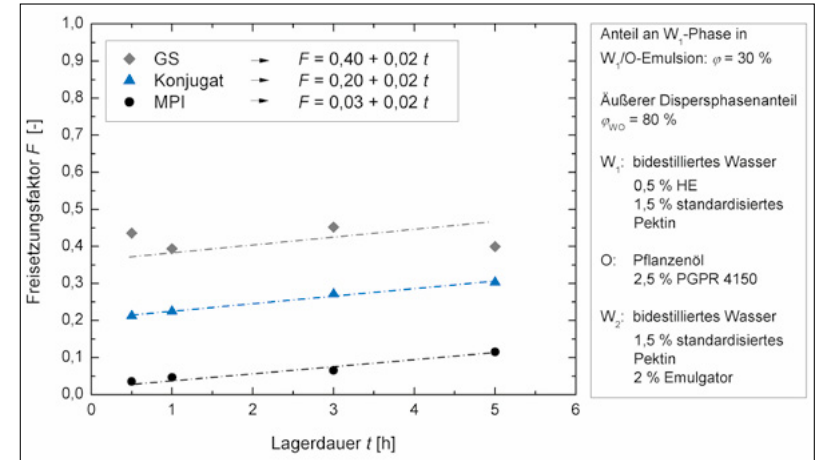


Abb. 5: Freisetzungsfaktor F in Abhängigkeit der Lagerdauer. Im Versuch wurden 15 g Emulsion in 150 g bidestilliertem Wasser als Freisetzungsmedium inkubiert. Der Freisetzungsfaktor beschreibt das Verhältnis der gemessenen Anthocyankonzentration c_A in Bezug zur Gleichgewichtskonzentration $c_{A,GGW}$, die sich für $t \rightarrow \infty$ zwischen der inneren und äußeren Wasserphase einstellen wird.

6.2 Magen-Darm-Stabilität

Untersuchungen der Magen- und Dünndarmstabilität ausgewählter Doppelemulsionen wurden vom zweiten Forschungspartner im Teilprojekt (Walz/Gräf am MRI/ILB) durchgeführt. Hierzu wurden Doppelemulsionen mit den O/W-Emulgatoren Molkenproteinisolat (MPI) und Gallensäure (GS) für 1 Stunde unter Magen- und für weitere 5 Stunden unter Darmbedingungen inkubiert. Die Proben wurden vor und nach der gastrointestinalen Inkubation bezüglich ihrer Tropfengrößenverteilung mittels statischer Lichtstreuung (Malvern Instruments, UK) untersucht. Darüber hinaus wurde eine optische Charakterisierung mittels Flow Particle Image Analyzer (Sysmex FPIA, Malvern Instruments, UK) durchgeführt.

Doppelemulsionen, bei denen Molkenproteinisolat (MPI) als O/W-Emulgator eingesetzt wurde, waren während der Magenpassage stabil (siehe **Abb. 6**, oben). Die Untersuchungen zeigten keine Veränderung der Tropfengrößenverteilung nach der 1-stündigen Mageninkubation. Darüber hinaus zeigten die FPIA-Untersuchungen, dass die Öltropfen auch nach der Magenpassage noch mit Wassertropfen gefüllt sind. Erst nach weiteren 5 Stunden Inkubation unter Darmbedingungen konnte eine Veränderung der Tropfengrößenverteilung der Emulsionen und ein Verlust an inneren Wassertropfen aus den Öltropfen beobachtet werden.

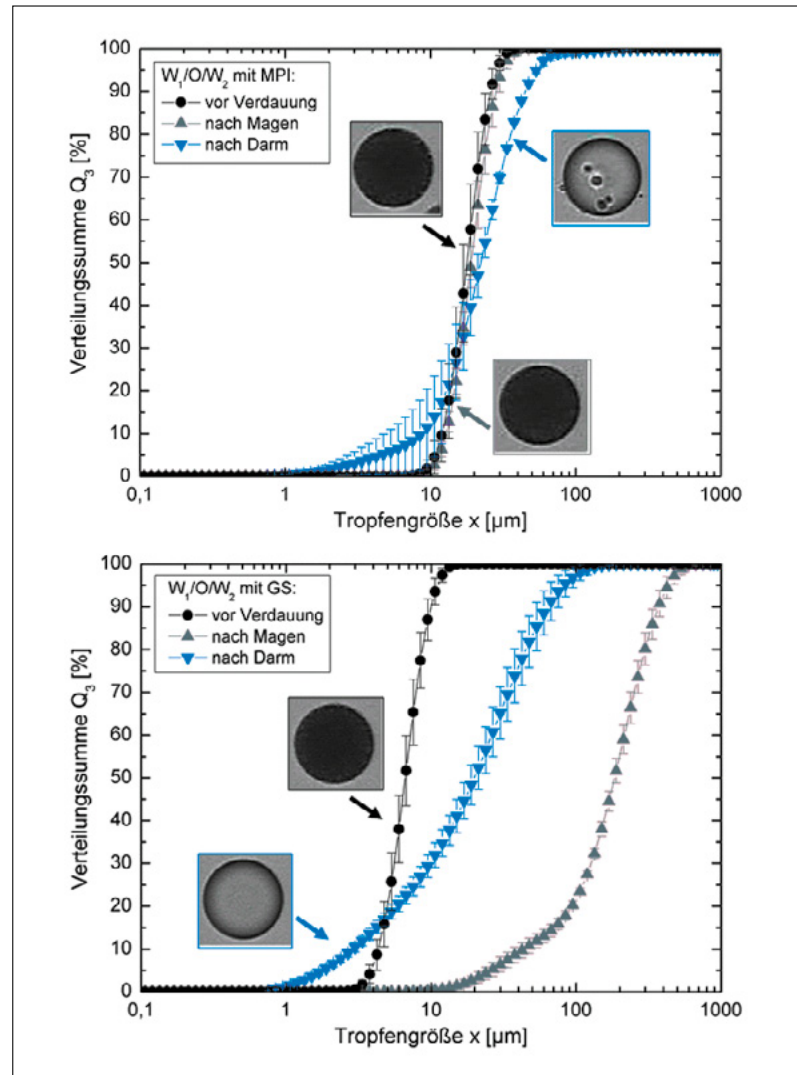


Abb. 6: Verteilungssumme von Doppel-emulsionen stabilisiert durch Molkenproteinisolat (MPI, links) bzw. Gallensäure (GS, rechts) während der gastrointestinalen Inkubation. Bilder: Aufnahmen der Doppel-emulsionen mittels Flow Particle Image Analyzer: umgebende Phase: äußere W_2 -Phase, großer Tropfen; Öltropfen, kleine schwarze Tropfen: innere W_1 -Tropfen. Anteil an innerer W_1 -Phase an der W_1/O -Emulsion $\varphi = 30\%$. Äußerer Dispersphasenanteil $\varphi_{WO} = 80\%$.

W_1 : bidestilliertes Wasser, 0,5% HE, 1,5% standardisiertes Pektin. O: Pflanzenöl, 2,5% PGPR 4150. W_2 : bidestilliertes Wasser, 1,5% standardisiertes Pektin, 2% O/W-Emulgator.

Demzufolge ist es möglich, Doppel-emulsionen, die mittels Molkenproteinisolat stabilisiert sind, stabil in den Dünndarm zu transportieren. Erst dort erfolgt ein Abbau der Emulsionsstruktur. Demgegenüber verändern Doppel-emulsionen, die mittels Gallensäure stabilisiert wurden, bereits während der Magenpassage ihre Struktur (siehe **Abb. 6**, unten). Da reine Gallensäure in Magen-umgebung ausflockt, kann auf eine Instabilität der Gallensäure unter Magenbedingungen geschlossen werden. Dies erklärt die Strukturänderungen der Emulsionen. Folglich ist es möglich, unter Einsatz von Gallensäure oder eines anderen hydrophilen, mageninstabilen Emulgators, eine Veränderung der Emulsionsstruktur und damit verbundene Freisetzung der eingeschlossenen hydrophilen Bioaktivstoffe bereits im Magen auszulösen.

Mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass mit dem äußeren Emulgator die Stabilität der $W_1/O/W_2$ -Emulsionen im Gastrointestinaltrakt entscheidend beeinflusst wird und so die Freisetzung zwischen Magen und Dünndarm gezielt gesteuert werden kann. Langfristig sind mit diesen Ergebnissen gezielte Untersuchungen zur Steuerung der Bioverfügbarkeit möglich.

Literatur

- [1] K. Frank, K. Köhler, H. P. Schuchmann, Food Chemistry, 2011, 10.1016/j.foodchem.2011.07.086
- [2] G. Muschiolik, H. Bunjes, Multiple Emulsionen - Herstellung und Eigenschaften, 1. Auflage, Muschiolik, G. and Bunjes, H., Behr's Verlag, Hamburg, 2007.
- [3] Van Der Graaf, S., Schroen, C. G. P. H., Boom, R. M., Journal of Membrane Science, 2005, 251 (1-2), 7-15.
- [4] Kawashima, Y. et al., Chem. Pharm. Bull., 1992, 40 (5), 1240-1246.
- [5] Knoth, A., Scherze, I., and Fechner, A., in Multiple Emulsionen - Herstellung und Eigenschaften, (Eds: Muschiolik, G. and Bunjes, H.), Behr's Verlag, 2007.
- [6] Hubbermann, E. M. et al., European Food Research and Technology, 2006, 223 (1), 83-90.
- [7] E. M. Hubbermann, Functional Properties of Anthocyanin Concentrates and the Influence of Physicochemical Parameters and Food Additives on the Color and Stability of Isolated Anthocyanins in Food, Dissertation, Institut für Humanernährung und Lebensmittelkunde, Christian-Albrecht-Universität zu Kiel 2005.
- [8] H.-D. Belitz, W. Grosch, Food Chemistry, 2, Belitz, H.-D. and Grosch, W., Springer, Berlin Heidelberg New York, 1999.
- [9] H. Schubert, Emulgiertechnik, 1, Behr's Verlag, Hamburg, 2005.

- [10] Schuchmann, H. P., in Lebensmittelverfahrenstechnik: Rohstoffe - Prozesse - Produkte, (Eds: Schuchmann, H. P. and Schuchmann, H.), Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2005.
- [11] J. L. Maubois et al., Milk microfiltrate, a convenient starting material for fractionation of whey proteins and derivatives, The importance of whey and whey components in food and nutrition, 3rd International Whey Conference (Munich), 59-72., 2001
- [12] S. Flügel, Casein-dextran conjugate. A natural high molecular mass surfactant-function for dispersed food systems, Dissertation, Diplomarbeit, University Leeds und Friedrich-Schiller-Universität Jena 2003.

Zusammenfassung

Ziel des Projektes war es, Anthocyane in Doppemulsionen zu formulieren, so dass sie stabil in Lebensmittel eingebracht und daraus an unterschiedlichen Stellen im Magen-Darm-Trakt freigesetzt werden können. Damit wurde ein Mikroverkapselungssystem für instabile hydrophile Bioaktive Stoffe gefunden, das diese auch außerhalb der natürlichen (Pflanzen-)Umgebung stabilisiert und gezielte Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit ermöglicht.

Im Rahmen des Forschungsvorhabens konnte nachgewiesen werden, dass es möglich ist, Anthocyane als beispielhaft ausgewählte hydrophile Bioaktive Stoffe ohne signifikante Verluste in emulsionsbasierte submikrone Tropfen als ‚Hüllkapseln‘ einzubringen. Selbst bei extremen Prozessbedingungen (Hochdruckhomogenisation bei Drücken von bis zu $\Delta p = 1.500$ bar mit entsprechendem Temperaturanstieg um 40 °C) konnte kein messbarer Anthocyanabbau gefunden werden. Prozesstechnisch muss dazu allerdings sichergestellt werden, dass der durch den Energieeintrag ausgelösten Temperaturerhöhung ausreichend schnell entgegengewirkt wird. Dies kann durch konventionelle kontinuierliche Wärmetauscher realisiert werden.

Basierend auf dieser Kenntnis wurde ein zweistufiges Verfahren zur Herstellung anthocyanbeladener Doppemulsionen erarbeitet. Der Einfluss der Steuergrößen wie Prozessparameter (Emulgierverfahren, Energieeintrag) sowie Stoffparameter (Elektrolyte in W_1 , Viskositätsverhältnis Disperse zur kontinuierlichen Phase, eingesetzte Emulgatoren, Dispersphasenanteil) auf die Einstellung der Emulsionsstruktur wurde aufgezeigt und konnte auf die für Emulgierverfahren bekannten Effekte einer Tropfenzerkleinerung mit überlagerter Koaleszenz zurückgeführt werden. Gezeigt wurde, dass der erste Emulgierschritt weitgehend koaleszenzdominiert ist, während der zweite weitgehend durch die Tropfenzerkleinerung bestimmt wird. Basierend auf diesem Wissen können Prozess- und Stoffparameter zielgerichtet so angepasst werden, dass Doppemulsionen mit sehr unterschiedlichen Mikrostrukturen hergestellt werden können. Alle Formulierungen waren länger als 3 Wochen (Messzeitraum im Projekt) stabil.

Mit diesen Emulsionen konnte anschließend aufgezeigt werden, dass eine ungewünschte frühzeitige Freisetzung der in W_1 eingeschlossenen Anthocyane hauptsächlich über die Einstellung der W_1/O -Tropfengröße bzw. die im Prozess eingetragene Energie und die Wahl des Emulgatorsystems gesteuert werden kann. Geringe Freisetzungsraten erfordern große W_1/O -Tropfen und langkettige W/O -Emulgatoren. Die Magen- und Dünndarmstabilität wird dagegen hauptsächlich durch den äußeren O/W -Emulgator bestimmt. Durch dessen Stabilität unter den Bedingungen im Gastrointestinaltrakt kann eine gezielte Freisetzung der Bioaktive Stoffe im Magen oder Dünndarm getriggert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass $W_1/O/W_2$ -Doppemulsionen prinzipiell ein geeignetes Trägersystem für hydrophile bioaktive Substanzen wie Anthocyane darstellen, in denen sie stabil bis in den Dünndarm transportiert werden können. So kann gezielt die Bioverfügbarkeit und Bioaktivität von instabilen Bioaktive Stoffen untersucht werden, was eine Voraussetzung für chemische, toxikologische und physiologische Untersuchungen oder spätere Zulassungsverfahren darstellt.

Summary Subproject 4

Multidisperse microcapsules as carriers of bioactive substances: Research into the influence of molecular interaction and diffusion barriers on the stability and release of bioactive ingredients from wild blueberries

The aim of this project was to formulate anthocyanins in double emulsions in order to allow their stable incorporation into foods as well as to enable their triggered release at different locations in the human gastrointestinal tract. There-with a system for the microencapsulation of instable hydrophilic bioactive ingredients was found, which enables the stabilization of these ingredients outside of their natural environment (plant cells). Further it allows for selective studies on their bioavailability.

Within this research project it was shown, that the encapsulation of anthocyanins, which were chosen as exemplary hydrophilic phytochemicals, into emulsion-based submicrone droplets is possible without any measurable anthocyanin degradation. Even at extreme process conditions (high pressure homogenization at homogenization pressures Δp up to 1,500 bar with corresponding temperature increase of 40 °C) no measurable anthocyanin degradation was discovered. At this it has to be assured, that the samples are cooled down immediately after emulsification to counteract process induced increases of temperature. This can be realized by using conventional continuous heat exchangers.

Based on this knowledge a two-stage process for the preparation of anthocyanin-loaded double emulsions was developed. The influence of control factors like process parameters (emulsifying process, specific energy input) as well as material parameters (electrolytes in W_1 , viscosity ratio disperse phase to continuous phase, used emulsifiers, disperse phase content) on the adjustment of the emulsion's microstructure were shown. The observed influences could be explained by the effects of droplet disruption with superimposed coalescence. It was shown that the first emulsifying step is largely dominated by coalescence, while the second step is dominated by droplet disruption. Based on this knowledge, process and material parameters can be precisely adapted in order to prepare double emulsions with very different microstructures. All formulations were stable for more than 3 weeks (measuring period during the project).

With these emulsions it could be shown afterwards, that the release of anthocyanins encapsulated in W_1 can be specifically modified by adjusting the W_1/O -droplet size respectively the energy input during the emulsifying process and by precise selection of the emulsifier systems. Low release rates require large W_1/O -droplets and long-chained W/O -emulsifiers. Further, gastrointestinal stability is basically determined by the exterior O/W -emulsifier. By means of the emulsifier's

stability in gastrointestinal environment a triggered release of bioactives in the stomach or small intestine is possible.

Within this studies it could be shown, that $W_1/O/W_2$ -double emulsions represent an appropriate carrier for a stable transport of hydrophilic bioactive ingredients like anthocyanins into the small intestine. Thus, the bioavailability and bioactivity of instable bioactive ingredients can be examined, which is a prerequisite for chemical, toxicologic and physiologic analyses or the subsequent approval.

Teilprojekt 5 (AiF)

Mikroverkapselung von Anthocyanen durch Sprühverfahren unter Ausnutzung von stabilisierenden Prinzipien der natürlichen Zellsaftvakuole und Interaktionen von Inhaltsstoffen (AiF 15613 N)

Prof. Dr. Karin Schwarz,

Dr. Sonja Berg

Universität Kiel

Institut für Humanernährung und Lebensmittelkunde

Abteilung Lebensmitteltechnologie

Einführung

Ziel des Teilprojektes war es, Kenntnisse zur Herstellung von farbstabilen Mikrokapseln aus sprühgetrockneten anthocyanhaltigen Protoplastensuspensionen und Extrakten zu erarbeiten. Durch ein Coating sollte eine modulierte Freisetzung von Anthocyanen *in vivo* erreicht werden. Die Optimierung erfolgte auf der Basis der physiko-chemischen Charakterisierung von Suspensionen und Pulvern sowie der quantitativen Bestimmung von Anthocyanen.

Anthocyane werden in erheblichen Mengen mit dem Konsum an Obst- und Gemüse aufgenommen. Die tägliche Aufnahme liegt je nach Schätzung im Bereich von wenigen Milligramm bis über 200 mg pro Tag (BÖHM et al. 1998; MANACH et al. 2005; KÜHNAU 1976). Aufgrund ihrer antioxidativen Wirksamkeit wird auch eine gesundheitliche Wirkung von Anthocyanen für den Menschen diskutiert. Dabei wird eine protektive Wirkung vor allem gegenüber der Entstehung von Erkrankungen vermutet, in deren Pathogenese das Auftreten von oxidativem Stress eine Rolle spielt (YOUDIM et al. 2000); Prävention von Krebs (ACQUAVIVA et al. 2003; LAZZE et al. 2004; MALIK et al. 2003; DUTHIE et al. 2006) und koronaren Herzerkrankungen (MEYER et al. 1998; XIA et al. 2005), antiinflammatorische Wirkungen, antithrombotische Eigenschaften (RECHNER & KRONER 2005) und Neuroprotektion.

In der Pflanze kommen Anthocyane vor allen Dingen in den äußeren Gewebeschichten in Früchten und Blättern vor (Epidermis und hypodermales Gewebe). Die eurasische Wildblaubeere oder Wildheidelbeere (*Vaccinium myrtillus*) zeichnet sich dadurch aus, dass sich die farbgebenden Anthocyane sowohl in der Schale als auch im Fruchtfleisch befinden. Sie unterscheidet sich damit von der amerikanischen Heidelbeere (*Vaccinium corymbosum*), die ein unpigmentiertes

Fruchtfleisch besitzt. Innerhalb der Zellen befinden sich Anthocyane vorwiegend in der zentralen Zellsaftvakuole (außerhalb der Vakuole bilden sie Anthocyanoplasten) (HENDRY & HOUGHTON 1996). Bei intakter Kompartimentierung der Zelle verfügen Anthocyane über eine ausreichende Stabilität. Hierfür werden die folgenden Faktoren diskutiert: hohe lokale Konzentrationen bis zu 0,1 M (MOSKOWITZ & HRAZDINA 1981), die die Selbstassoziation von Anthocyanen begünstigt, Copigmentierung mit anderen phenolischen Inhaltsstoffen und Assoziationen mit Metallionen (MACHEIX et al. 1990). Des Weiteren bietet der intakte Tonoplast der Vakuole Schutz vor degradierenden Agenzien.

Protoplasten als anthocyanhaltige Container

Die Isolierung von anthocyanhaltigen Protoplasten stellt eine Möglichkeit der Stabilisierung von instabilen Anthocyanen dar. Durch den Einsatz der Enzyme Cellulase und Pektinase wird die pflanzliche Zellwand aufgeschlossen und der Protoplast freigelegt (**Abb. 1**). Die Wahl der Parameter für den enzymatischen Digestionsprozess (pH-Wert, osmotischer Druck, Ionenstärke der Digestionslösung, Digestionsdauer) hat eine entscheidende Auswirkung. Durch die gleichzeitige Variation mehrerer Faktoren lassen sich die Effekte der einzelnen Einflussvariablen sowie deren Interaktionen ermitteln. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihen zeigen, dass der pH-Wert einen signifikanten Einfluss auf die Zielparame-ter Protoplastenausbeute und Anthocyankonzentration hat. Bei einem pH-Wert von 5,5 konnte die höchste Zahl an Protoplasten freigesetzt werden. Tendenziell konnten die höchsten Protoplastenausbeuten mit einer Enzymkombination aus 1 % Pektinase und 3 % Cellulase erzielt werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der osmotische Druck sich signifikant auf die Anzahl isolierter Protoplasten auswirkt. Bei Einsatz von 0,3 mol/l Sorbitol in der Digestionslösung konnten im Vergleich zu 0,7 mol/l mehr Protoplasten freigesetzt werden. Der Anthocyanengehalt wurde von einer Interaktion der Faktoren Zeit, osmotischer Druck und Bewegung signifikant beeinflusst. Die höchsten Anthocyankonzentrationen wurden nach 6 Stunden Digestion bei 20 U/min und 0,3 mol/l Sorbitol erzielt. Es konnte gezeigt werden, dass isolierte Protoplasten ein stabilisierendes Trägersystem für Anthocyane darstellen, insbesondere bei schwach sauren pH-Werten. Die Protoplastenausbeute und der Anthocyanengehalt korrelieren jedoch nicht zwangsläufig miteinander.

Da es sich bei isolierten Protoplasten um ein mechanisch leicht angreifbares System handelt, sind weitere Stabilisierungsschritte erforderlich. Eine Stabilisierung lässt sich unter anderem durch den Einsatz von unterschiedlichen Hydrokolloiden in wässriger Lösung erzielen. Eine Stabilisierung der Protoplastenmembran über 10 Tage (Erhalt von 80 %) ist insbesondere durch den Einsatz von Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) möglich.

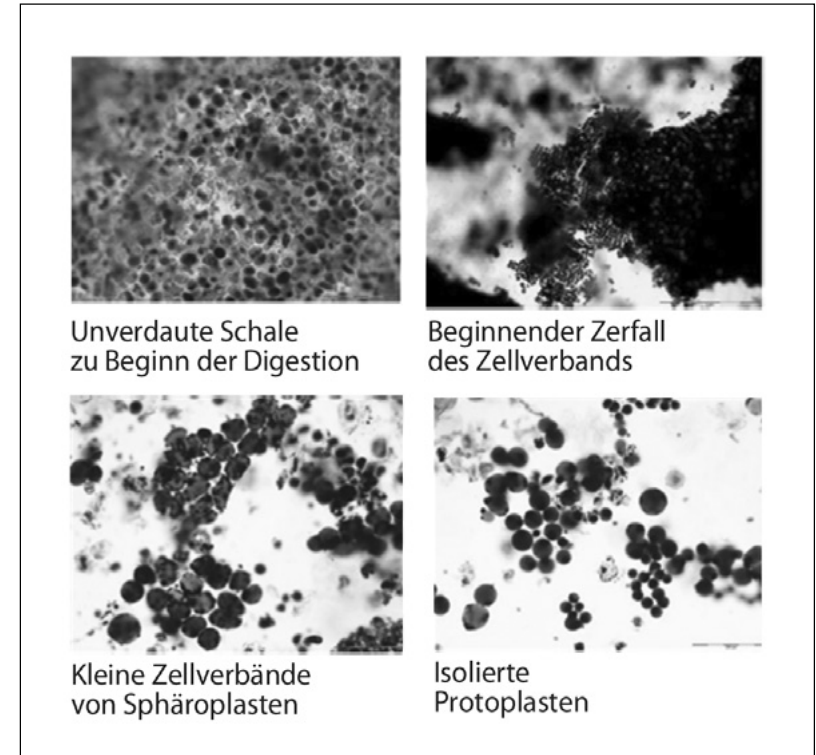


Abb. 1: Unterschiedliche Stadien der enzymatischen Freisetzung isolierter Protoplasten aus Heidelbeer-Epidermis.

Gewinnung von kohlenhydratbasierten Mikrokapiteln mit verzögerter Anthocyanfreisetzung durch Sprühtrocknung

Anthocyane gehören zu den wichtigsten natürlich vorkommenden Farbpigmenten, deren Stabilität durch allgemeine Parameter der Lebensmittelverarbeitung empfindlich beeinflusst wird (Licht, Sauerstoff und Wärme). Auch die Zusammensetzung des Lebensmittels hat einen erheblichen Einfluss auf die Stabilität von Anthocyanen. In wasserhaltigen Lebensmitteln sind Anthocyane wesentlich instabiler als in trockenen Lebensmitteln bzw. bei niedrigen a_w -Werten. Die Mikroverkapselung von anthocyanhaltigen Extrakten durch Sprühtrocknung ist daher vorteilhaft.

Für die Sprühtrocknung von Anthocyanen können verschiedene Trägerstoffe verwendet werden. In der Literatur werden vor allem Maltodextrine mit einem DE-Wert (*dextrose equivalent*) zwischen 18 und 20 als geeignete Trägermaterialien für die Sprühtrocknung bei einer Einlasstemperatur von 160-180 °C beschrieben. Um eine Magensaftresistenz der mikroverkapselten Anthocyane zu erzielen, muss ein wasserunlösliches Coating appliziert werden. Im Lebensmittelbereich sind nur wenige Coatingsubstanzen zugelassen, von denen nur Schellack (E 904) eine vielversprechende Alternative zu pharmazeutischen Coatings darstellt. Schellack gehört zu der Gruppe der pH-sensitiven Coatings. Erst ab einem pH-Wert von 7,2 kommt es zu einem Auflösen der Coatingschicht. Um ein sicheres Auflösen der Coatingschicht *in vivo* zu gewährleisten, werden porenbildende Zusätze wie Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) als Additiv in der Coatinglösung verwendet. Jedoch kommt es durch diese Additive bereits bei pH 1,2 zu einer Quellung des Coatings und damit zu einer Diffusion des solubilisierten Wirkstoffs. Es besteht daher die Notwendigkeit einer Modifikation der Kapselmatrix, um die Wasserlöslichkeit und die damit verbundene Diffusionsneigung der eingeschlossenen Wirkstoffe zu verlangsamen und gleichzeitig die Stabilität der eingeschlossenen Anthocyane zu erhöhen.

Unterschiedliche Pektine wurden hinsichtlich ihrer Eignung als quellende Substanzen, die den Wirkstoffrückhalt verbessern können, untersucht. Neben den gelierenden Eigenschaften dienen Pektine auch als Copigmente und damit als Stabilisatoren für Anthocyane. Die Copigmentierung könnte auf Interaktionen zwischen Pektin und Anthocyanen zurückgeführt werden, indem elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den negativ geladenen Säuregruppen der Pektinmoleküle und den positiv geladenen Flavylumkationen zur Adsorption an das Hydrokolloid führen und so vor einem Abbau schützen (HUBBERMANN et al. 2006).

Die Mikroverkapselung des Heidelbeerextraktes erfolgte durch Sprühtrocknung in einem Sprühturm (Niro Mobile Minor) bei 160/70 °C mit einer Zerstäuberscheibe als Atomisierungseinheit bei 4 bar (23.000 U/min). Als Trägermaterialien wurden zwei unterschiedliche kohlenhydratbasierte Wandmaterialien, Maltodextrin (DE 18,5) und Trehalose, untersucht.

Die erzeugten Mikrokapselfen wiesen einen mittleren Partikeldurchmesser von 15 µm auf und wurden vor dem Coatingprozess einem Granulationsschritt mit ethanolischer Schellack-Lösung (10% w/v) als Binderlösung zur Vergrößerung des Partikeldurchmessers auf 250 - 500 µm unterzogen.

Zur Überprüfung des Wirkstoffrückhaltevermögens wurden In-vitro-Freisetzungsversuche in einem Dissolutionstester (Pharmatest DT 70, Pharma Test Apparatebau AG, Hainburg, Deutschland) bei 37 °C in simuliertem Magensaft (pH 1,2; enzymfrei) durchgeführt.

Die Probenahmen erfolgten in zehnminütigen Abständen für 120 Minuten. Mittels der pH-Differentialmethode nach GIUSTI und WROLSTAD (2001) wurde der

Anthocyanengehalt der entnommenen Proben ermittelt. Zudem wurden von den im Magensaft verbleibenden Partikeln mikroskopische Aufnahmen angefertigt. Zur Beurteilung der Wirkstoffretention während der In-vitro-Freisetzung wurden prozentuale Freisetzungskurven erstellt. Diese basierten auf dem Anfangsgehalt der gecoateten Mikrokapselfen sowie der ermittelten Anthocyanengehalte während der Freisetzungsversuche. Die während der Freisetzung gemessenen Absorptionen wurden nach SINGH et al. (1997) um die jeweils entnommene Probenmenge korrigiert.

Die Ergebnisse dieser In-vitro-Untersuchungen haben gezeigt, dass sich sowohl das verwendete Wandmaterial als auch verschiedene Pektine als Additive auf den Anthocyanrückhalt aus gecoateten Partikeln auswirken.

Der Wirkstoffrückhalt konnte durch den Zusatz von hochveresterten Pektinen verbessert werden. Zwar zeigt der Zusatz von hochverestertem Apfelpektin nur eine geringfügige Verbesserung der Retention, der Zusatz von Rübenpektin zeigt hingegen eine deutliche Verbesserung der Anthocyanretention (**Abb. 2**).

Die Wirkung von Pektin lässt sich auf ein erhöhtes Wasserbindungsvermögen innerhalb der gecoateten Partikel bei einer gleichzeitigen Erhöhung der Viskosität zurückführen (BERG et al. 2011).

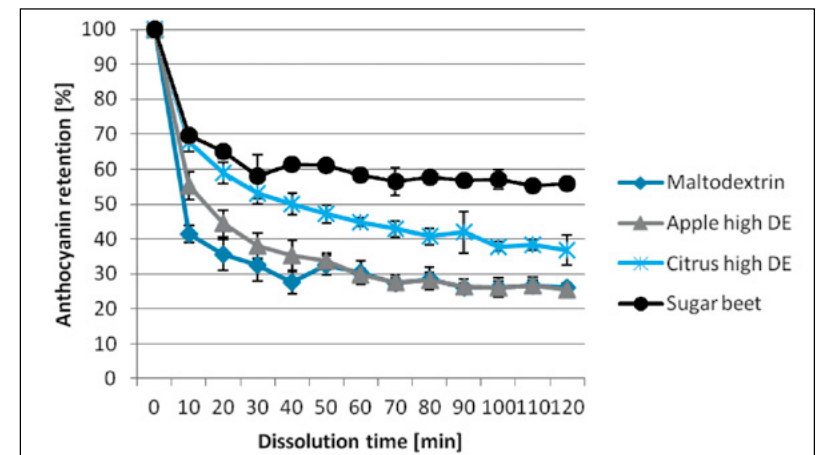


Abb. 2: Einfluss hochveresteter Pektine auf die Anthocyanretention im simulierten Magensaft (enzymfrei), pH 1,2.

Die Untersuchungen haben ebenfalls gezeigt, dass sich auch das verwendete Trägermaterial auf die Freisetzungskinetiken auswirkt. So konnte bei einem kompletten Austausch von Maltodextrin gegen Trehalose ein völlig anderes Retentionsverhalten beobachtet werden (**Abb. 3**).

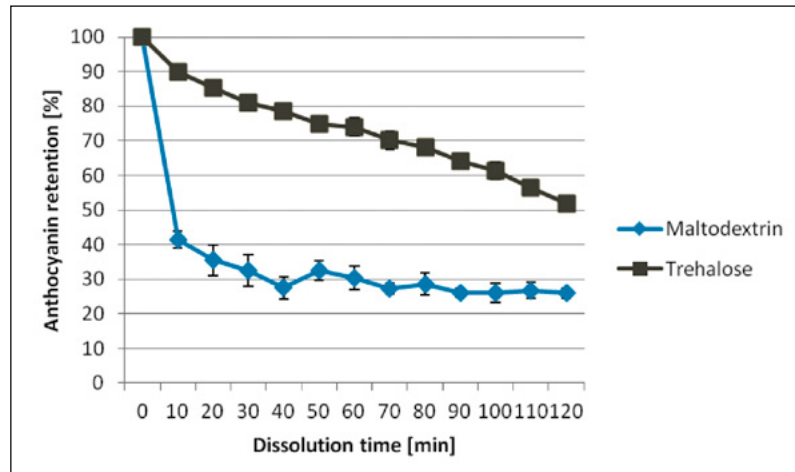


Abb. 3: Einfluss des Trägermaterials auf die Anthocyanretention im simulierten Magensaft (enzymfrei), pH 1,2.

Der starke initiale Abfall der Retention, wie sie bei den maltodextrinhaltigen Proben zu beobachten war, konnte für die Probe mit dem Trägerstoff Trehalose nicht beobachtet werden. Jedoch ist der Abfall der Retention für Trehalose kontinuierlich, während bei den maltodextrinhaltigen Proben nach der hohen initialen Freisetzung ein Freisetzungsplateau erreicht wurde. Diese Unterschiede lassen sich auf eine unterschiedliche Partikelmorphologie nach der Granulation und nach dem Coating zurückführen. Trehalosebasierte Granulate weisen eine glatte und kompakte Struktur nach der Granulation und dem Coating auf. Die Coatingoberfläche ist eben und homogen. Maltodextrinbasierte Granulate erhalten durch den Granulationsprozess eine Brombeerstruktur, welche auch nach dem Coatingprozess erhalten bleibt (**Abb. 4**). Diese Brombeerstruktur lässt sich leicht durch mechanische Belastung wie beispielsweise durch den Coatingprozess in der Wirbelschicht aufbrechen. Staub und Bruchstücke gelangen somit in die Coatingschicht und bedingen eine schnelle Freisetzung durch das Entstehen größerer Poren.

Die Viskosität innerhalb der gecoateten Partikel ist ebenso von Bedeutung. So weist eine 45%ige Trehalose-Lösung mit 11 mPas eine deutlich geringere Viskosität auf als eine vergleichbare Maltodextrin-Lösung mit 55 mPas. Durch ihre kompakte und glatte Struktur weisen Granulate mit Trehalose als Trägermaterial eine initial bessere Wirkstoffretention auf, setzen aber im weiteren Verlauf durch die geringe Viskosität kontinuierlich Anthocyane frei.

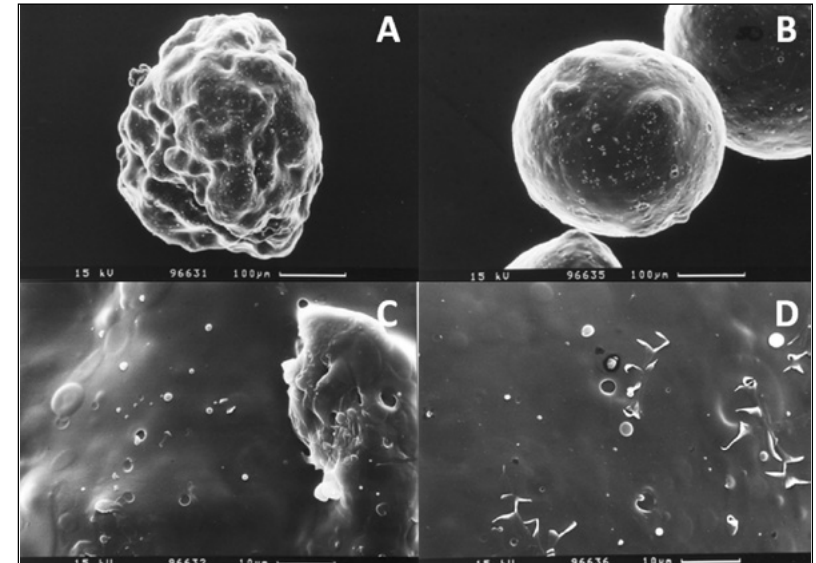


Abb. 4: REM-Aufnahmen mit Schellack gecoateter Granulate mit Maltodextrin (A, C) und Trehalose (B, D) als Trägermaterial; C, D = Coatingoberflächen.

Zusammenfassend konnten innerhalb dieses Projektes ein protoplastenbasiertes und ein mikroverkapseltes Trägersystem für Anthocyane generiert werden. Des Weiteren war es möglich, den Anthocyanrückhalt aus permeablen Coatingsystemen durch eine Modifikation der Kapselmatrix zu verbessern. Mit diesem Kapselsystem ist es möglich, anthocyanhaltige Extrakte durch den Magen trakt zu schleusen, um sie vor einem vorzeitigen Abbau oder Resorption zu schützen.

Literatur

- [1] Acquaviva, R., Russo, A., Galvano, F., Galvano, G., Barcellona, M. L., Li Volti, G., Vanella, A. (2003): Cyanidin and cyanidin 3-O- β -D-glucoside as DNA cleavage protectors and antioxidants. *Cell Biology and Toxicology* 19, 243–252.
- [2] Berg, S., Bretz, M., Hubbermann, E.M., Schwarz, K. (2011): Influence of different pectins on powder characteristics of microencapsulated anthocyanins and their impact on drug retention of shellac coated granulate. *Journal of Food Engineering* doi:10.1016/j.jfoodeng.2011.06.035.
- [3] Böhm, H., Boeing, H., Hempel, J., Raab, B., Kroke, A. (1998): Flavonole, Flavone und Anthocyane als natürliche Antioxidantien der Nahrung und ihre

- mögliche Rolle bei der Prävention chronischer Erkrankungen. Zeitschrift für Ernährungswissenschaft 37, 131–214.
- [4] Duthie, S., Jenkinson, A., Crozier, A., Mullen, W., Pirie, L., Kyle, J., Yap, L., Christen, P., Duthie, G. (2006): The effects of cranberry juice consumption on antioxidant status and biomarkers relating to heart disease and cancer in healthy human volunteers. *Eur J Nutr* 45, 113–122.
- [5] Giusti, M. M., Wrolstad, R. E. (2001): Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. Unit F1. 2. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*.
- [6] Hendry, G. A. F., Houghon, J. D. (Eds.) (1996): *Natural Food Colorants 2*. Blackie Academic & Professional, London, Glasgow.
- [7] Hubbermann, E. M., Heins, A., Stöckmann, H., Schwarz, K. (2006): Influence of acids, salt, sugars and hydrocolloids on the colour stability of anthocyanin rich black currant and elderberry concentrates. *European Food Research and Technology* 223, 83–90.
- [8] Kühnau, J. (1976): The flavonoids. A class of semi-essential food components: Their role in human nutrition. *World review of nutrition and dietetics* 24, 117–191.
- [9] Lazze, M. C., Savio, M., Pizzala, R., Cazzalini, O., Perucca, P., Scovassi, A. I., La Stivala, Bianchi, L. (2004): Anthocyanins induce cell cycle perturbations and apoptosis in different human cell lines. *Carcinogenesis* 25, 1427.
- [10] Macheix, J. J., Fleuriet, A., Billot, J., Macheix, J.-J., Fleuriet, A., Billot, J. (1990): *Fruit phenolics*. CRC Pr., Boca Raton, Fla.
- [11] Malik, M., Zhao, C., Schoene, N., Guisti, M., Moyer, M., Magnuson, B. (2003): Anthocyanin-rich extract from *Aronia meloncarpa* E induces a cell cycle block in colon cancer but not normal colonic cells. *Nutr Cancer* 46, 186–196.
- [12] Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., Rémésy, C. (2005): Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition* 81, 230S-242S.
- [13] Meyer, A. S., Heinonen, M., Frankel, E. N. (1998): Antioxidant interactions of catechin, cyanidin, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation. *Food Chemistry* 61, 71–75.
- [14] Moskowitz, A. H., Hrazdina, G. (1981): Vacuolar Contents of Fruit Subepidermal Cells from *Vitis* Species 1. *Plant Physiology* 68, 686–692.
- [15] Rechner, A. R., Kroner, C. (2005): Anthocyanins and colonic metabolites of dietary polyphenols inhibit platelet function. *Thrombosis Research* 116, 327–334.
- [16] Singh, B., J. Kaur, Singh, S. (1997): Correction of raw dissolution data for loss of drug and volume during sampling. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 59, 196–199.
- [17] Xia, M., Hou, M., Zhu, H., Ma, J., Tang, Z., Wang, Q., Li, Y., Chi, D., Yu, X., Zhao, T., Han, P., Xia, X., Ling, W. (2005): Anthocyanins Induce Cholesterol Efflux from Mouse Peritoneal Macrophages. *Journal of Biological Chemistry* 280, 36792–36801.
- [18] Youdim, K. A., Shukitt-Hale, B., MacKinnon, S., Kalt, W., Joseph, J. A. (2000): Polyphenolics enhance red blood cell resistance to oxidative stress: in vitro and in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1523, 117–122.

Im Rahmen des DFG/AiF-Clusters „Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten Multikapselsystemen“ wurde das Teilprojekt 5 des Forschungskreises der Ernährungsindustrie e.V. (FEI) über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung und -entwicklung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.

Summary Subproject 5

Microencapsulation of anthocyanins by spray drying processes utilising the stabilising effects of natural plant vacuoles and ingredient interactions

Anthocyanins are vulnerable against alkaline pH values, oxygen and light and were fast absorbed in the stomach and the small intestine. Stabilizing carrier systems should be applied.

Protoplasts are natural carrier stabilizing anthocyanins. The protoplast quantity and the anthocyanin content were affected by the parameters of the enzymatic digestion process as single factors as well as in combination. The protoplast yield was not equivalent to the anthocyanin content within the protoplasts. The pH value influenced the yield of protoplasts and the anthocyanin content similarly, whereas osmotic pressure and time, as well as the interaction of osmotic pressure, time and agitation had different effects. High osmotic pressure with high agitation caused membrane damages but not in a membrane rupture which led to anthocyanins degradation within the protoplast. Protoplasts with an intact membrane provided a stabilizing carrier for anthocyanins at pH 5-6.

The release of microencapsulated anthocyanins by spray drying was expected to be altered by the modification of the carrier materials. Spray dried microcapsules based on maltodextrin (DE 18.5) were shrivelled due to inflation and collapsing during spray drying. The use of gelling substances enabled an increase of anthocyanin retention from shellac coated granulates in simulated gastric fluid (SGF). Pectins with a high waterbinding capacity combined with a high viscosity increased the anthocyanin retention during the complete dissolution process significantly.

In comparison to maltodextrin, trehalose based microcapsule and granulates exhibited a more regular shape and an even coating layer. The granulating step caused dissolution of small particles resulting in a more compact structure of trehalose particles in contrast to the raspberry shaped maltodextrin particles. The initial release of anthocyanins from trehalose granulates during dissolution testing was significantly lower than in maltodextrin granulates. However, due to the high viscosity the anthocyanin release of maltodextrin samples stagnated.

Teilprojekt 6 (DFG)

Nichtinvasive In-vitro- und In-vivo-Charakterisierung von Multikapselsystemen

Prof. Dr. Karsten Mäder

Universität Halle-Wittenberg

Institut für Pharmazie

Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie

1. Einführung

Ziel des Teilprojektes 6 des DFG/AiF-Clusterprojektes „Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten Multikapselsystemen“ war die Charakterisierung von entwickelten Kapselsystemen anderer Teilprojekte sowie von verwendeten Hilfsstoffen. Angewendet wurden – neben den nicht invasiven Analysemethoden Benchtop-NMR (BT-NMR) und Elektronen-Spin-Resonanzspektroskopie (ESR) – der Pankreatintest, die Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie (HPTLC) sowie die Asymmetrische Fluss-Feldflussfraktionierung (A4F). **Abb. 1** zeigt die Einbindung des Teilprojektes 6 in das Gesamtprojekt sowie die durchgeführten Kooperationen mit anderen Teilprojekten. Es ist ersichtlich, dass mit jedem einzelnen Teilprojekt Kooperationen durchgeführt wurden.

Projektpartner des Teilprojektes 1 isolierten eine Polyphenolfraktion des Heidelbeerextraktes (HBE). Mittels A4F wurde das Molekulargewicht dieser Polyphenolfraktion untersucht (s. Kapitel 3). In Kooperation mit Teilprojekt 4 wurde der Pankreatintest durchgeführt. Bei diesem Test wurden die zur Verfügung gestellten $W_1/O/W_2$ -Doppelemulsionen *in vitro* in simulierten Darmmedien (fasted state simulated intestinal fluid und fed state simulated intestinal fluid) verdaut. Durch die anschließende Lipidanalytik wurden die Lipidfraktionen mittels HPTLC aufgespalten und quantifiziert (s. Kapitel 5). In einer frühen Phase des Projektes wurden in Anlehnung an das Europäische Arzneibuch Zerfallstests von Kapselsystemen der Teilprojekte 2 und 3 durchgeführt. Diese zeigten, inwieweit die eingesetzten Hilfsstoffe den an sie gestellten Anforderungen gerecht wurden. Hierbei durften die Mikrokapseln nicht im simulierten Magensaft (pH 1,2, ohne Enzym) zerfallen, da sie *in vivo* im Kolon wirken und somit den Magen unbeschadet passieren müssen. Kapselsysteme, die bereits während einer Inkubation im simulierten Magensaft (pH 1,2, ohne Enzym) zerfielen, wurden von den Projektpartnern nicht weiter entwickelt (s. Kapitel 6). In dem größten Netzwerk innerhalb des Clusters wurden die in den Teilprojekten 2, 3 und 5 verkapselten Anthocyane in unserem Labor in die physiologischen Bedingungen nachah-

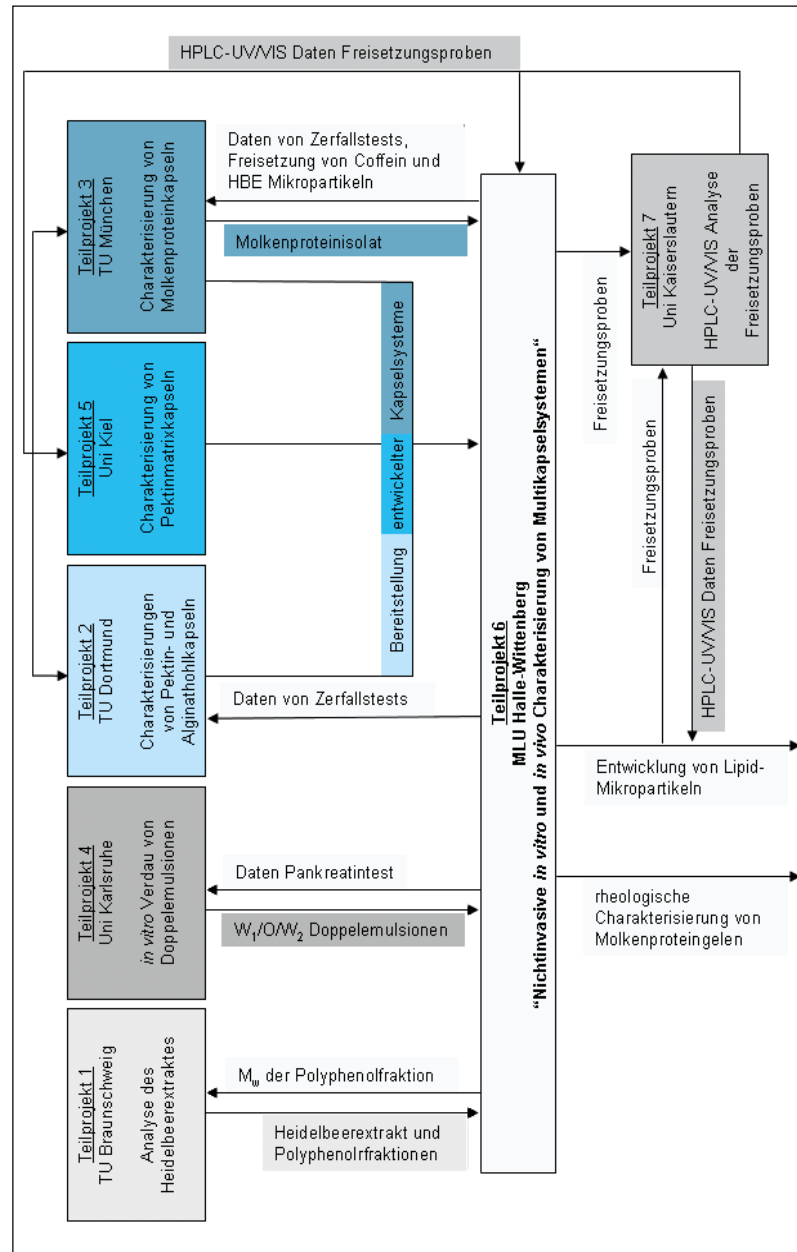


Abb. 1: Einbindung des Teilprojektes 6 in das Gesamtprojekt sowie die durchgeführten Kooperationen mit anderen Teilprojekten.

menden Medien freigesetzt. Teilprojekt 7 quantifizierte die Anthocyane der Freisetzungsprouben mittels HPLC-UV/Vis. Basierend auf diesen Ergebnissen konnten die Projektpartner ihre Kapselsysteme optimieren. Auuerdem zeigten wir, dass eine Verkapselung von HBE einen gewinnbringenden Nutzen hat, da der Gehalt an freien Anthocyanen nach der Inkubation der Kapselsysteme im Dünndarm simulierenden Medium höher war als nach der Inkubation von nicht verkapseltem HBE im gleichen Medium (s. Kapitel 7).

In eigenen Studien wurde mittels ESR das Oxidationspotential des HBE untersucht (s. Kapitel 2). Mit dem zur Verkapselung eingesetztem Hilfsstoff Molkenproteinisolat (WPI) wurden rheologische Tests durchgeführt (s. Kapitel 9).

Zusätzlich wurde ein eigenes Kapselsystem, basierend auf Hartfett, entwickelt (s. Kapitel 8).

Dieser Bericht zeigt Details der Kooperationen mit den anderen Teilprojekten sowie die daraus resultierenden Ergebnisse. Es ist ersichtlich, dass dieser Projektteil eine Schnittstelle in der Analytik der im Cluster entwickelten Kapselsysteme darstellt.

Ein Teil dieser Ergebnisse wurden bereits auf internationalen Konferenzen veröffentlicht (s. Publikationen).

2. Heidelbeerextrakt (HBE)

Der in diesem Projekt verwendete Heidelbeerextrakt (HBE) (Symrise, Holzmin-den) wurde aus Trester der Heidelbeere (*Vaccinium myrtillus* L.) gewonnen. Sein Anthocyanengehalt beträgt 25 % (m/m). Diese wasserlöslichen Anthocyane haben zahlreiche biologische Aktivitäten wie beispielsweise die Wirkung als Antioxidans, die Inhibierung des Tumorwachstums vor allem im Kolon sowie die Induzierung der Apoptose. Das antioxidative Potential des HBE wurde mittels Elektronen-Spin-Resonanzspektroskopie (ESR) untersucht. Mit dieser Methode können freie Radikale oder paramagnetische Verbindungen detektiert werden [1]. Der HBE ist ESR-stumm, da er keine Verbindungen mit derartigen Eigenschaften enthält. Durch die Zugabe von ESR-aktiven Molekülen, sogenannten Spinsonden, in eine HBE-haltige Lösung ist ein Signal detektierbar. Durch die Änderung dieses Signals können Rückschlüsse auf die Aktivität der Anthocyane geschlossen werden.

Der HBE wurde in drei Medien mit unterschiedlichen pH-Werten gelöst: 1. HCl pH 1,5, 2. Trizma®-Puffer pH 7 und 3. Carbonatpuffer pH 10. Der Aufbau des Experimentes war an den in der Literatur beschriebenen Ascorbinsäureassay angelehnt [2]. Hierzu wurden zu jeder HBE-Lösung 5 mM der Spinsonde TEMPOL gegeben, um das antioxidative Potential der Anthocyane zu ermitteln. Der Anthocyanengehalt in den jeweiligen Medien wurde mittels HPLC-UV/Vis quantifiziert (s. **Tab.1**). Die Ergebnisse dieser Studie sind in **Abb. 2** dargestellt.

Tab. 1: Totaler Anthocyanengehalt der verwendeten HBE-Lösungen

Medien	Anthocyanengehalt
HCl pH 1,5	2,1 %
Trizma® Puffer pH 7	1,7 %
Carbonatpuffer pH 10	0,0039 %

Die Stabilität der verwendeten Spinsonde bei den unterschiedlichen pH-Milieus wurde durch die Inkubation der Sonde in dem reinen Inkubationsmedium ohne HBE-Zusatz sichergestellt (s. **Abb. 2** – leere Symbole). Die Signalamplitude blieb über den gesamten Beobachtungszeitraum konstant. Ein Einfluss des pH-Wertes auf die Abnahme des Spinsondensignals wurde daher ausgeschlossen. Durch die Zugabe von HBE in das TEMPOL-haltige Medium nahm die Signalamplitude über den Beobachtungszeitraum ab (s. **Abb. 2** – gefüllte Symbole). Der Signalabnahme liegt eine Reduktion der Nitroxylgruppe zum ESR-stummen Hydroxylamin durch die Anthocyane zugrunde. Im Vergleich mit den Gehaltsangaben in **Tab. 1** ist ersichtlich, dass der Abfall der Amplitude konzentrationsabhängig ist. Der schnellste Abfall der Signalamplitude ist mit dem höchsten Anthocyanengehalt bei pH 1,5 verknüpft. Begründet ist dies mit der strukturellen Stabilität der Anthocyane (Favylium-Kation) im stark sauren pH-Milieu um pH 1 [3].

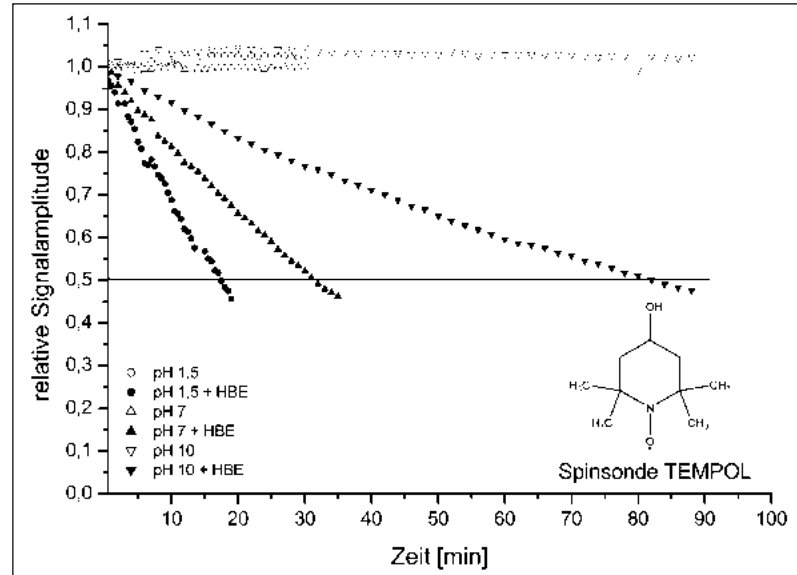


Abb. 2: Abfall der relativen Signalamplitude der Spinsonde TEMPOL während der Inkubation in drei Medien mit unterschiedlichen pH-Werten.

Diese Daten zeigen das antioxidative Potential des verwendeten Heidelbeerextraktes. Überraschend wurde in dieser Studie festgestellt, dass der HBE die Pufferkapazität der Medien ausschöpft und teilweise überschreitet. Der pH-Wert einer 10%igen HBE-Lösung in Trizma®-Puffer pH 7 bzw. Carbonatpuffer pH 10 sank um etwa 5 Einheiten (s. **Tab. 2**).

Tab. 2: Änderung des pH-Wertes von verschiedenen Medien mit 10 % HBE-Zusatz

System	pH-Wert	pH mit 10 % (m/m) HBE
HCL	1,50	1,34
TRIZMA®-Puffer	7,00	1,76
Carbonatpuffer	10,00	4,60

Begründet wird dies mit dem Herstellungsverfahren des Heidelbeerextraktes. Dabei wird der Heidelbeertrester mit einer methanolischen Citronensäurelösung pH 1-3 behandelt, um die Anthocyane zu isolieren. Beim Trocknen bleibt die Citronensäure im Anthocyanextrakt zurück. Gestützt wird diese These durch das Lösen von HBE in destilliertem Wasser. Eine 10%ige Lösung hat einen pH-Wert von 1,8.

3. Asymmetrische Fluss-Feldflussfraktionierung (A4F)

In dem zur Verfügung stehenden Heidelbeerextrakt traten Anthocyanpolymere auf. In Kooperation mit Teilprojekt 1 (TU Braunschweig) wurde das Molekulargewicht einer dort isolierten Polymerfraktion ermittelt.

Die Asymmetrische Fluss-Feldflussfraktionierung (A4F) ist eine Methode, um Partikelgrößen und Molekulargewichte zu bestimmen. Die Proben wurden in den Trennkanal mit Distanzscheibe (Eclipse-A4F-Trennsystem - Wyatt Technology Europe, Dernbach) injiziert und aufgetrennt [4]. Für die Auftrennung wurde eine Cellulosemembran (Vortrennung: 10 kDa) (Microdyn-Nadir, Wiesbaden) sowie bidestilliertes Wasser als Eluent, konserviert mit 0,02 % (m/v) Natriumazid, verwendet. Bei der A4F werden zuerst kleine Partikel und am Ende große Partikel eluiert. Nach der Auftrennung im Trennkanal wurden die Proben mittels eines 18-Winkel-Mehrwinkellichtstredetektors (MALLS) „Dawn EOS“ (Wyatt Technology Europe, Dernbach) bei $\lambda = 690$ nm und einem Brechungsindex (RI)-Detektor RI-101 (Showa Denko Europe GmbH, München) vermessen. Die Auswertung der Proben wurde unter Anwendung der Astra-Software 4.90 (Wyatt Technology Europe, Dernbach) durchgeführt. Hierbei wurde der Debye-Plot zugrunde gelegt. Das ermittelte Molekulargewicht der analysierten Polyphenolfraktion lag bei 68 kDa.

4. Übersicht über die analysierten Kapselsysteme aus den Teilprojekten 2, 3, 4 und 5

Die in diesem Teilprojekt untersuchten Kapselsysteme anderer Projektpartner sind in **Abb. 3** graphisch dargestellt. Die Zusammensetzung sowie die Angaben über den HBE-Gehalt, die pH-Werte in den Kapseln sowie die mittleren Partikelgrößen sind in **Tab. 3** zusammengefasst. Die Analyse dieser Kapselsysteme ist in den Kapiteln 5, 6 und 7 beschrieben.

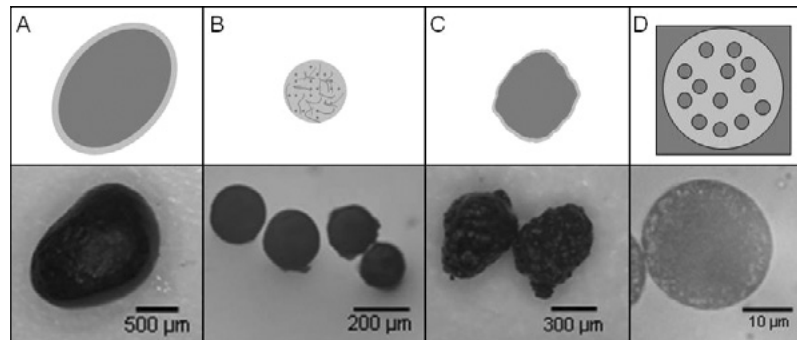


Abb. 3: Schematische und mikroskopische Darstellung der untersuchten Kapselsysteme aus dem Cluster; A: Teilprojekt 2, B: Teilprojekt 5, C: Teilprojekt 3, D: Teilprojekt 4.

Tab. 3: Detaillierte Übersicht über die Zusammensetzung der untersuchten Kapselsysteme

System Typ	Hilfsstoffe	HBE [%]	mittlerer pH	Ø [µm]
PA Kern-Hülle	Pektin-Amid ^a , CaCl ₂ , Glycerol	10 (m/m)	1500	3 (Stammlösung mit HBE) 1 (Quervernetzungs-lösung mit CaCl ₂)
MPI Matrix	Molkenproteinisolat	10 (m/m)	180	1,5 (vor der Verkapselung)
SL Matrix	Pektin-Amid ^b , Zitronensäure, Maltodextrin, Schellack	20 (m/m)	250-500	2 (vor der Sprühtrocknung)
DE W ₁ /O/W ₂ -Doppel-emulsion	Pflanzenöl, Pektin-Amid ^c , PGPR 90+, Konjugatemulgator	0,12 (m/m)	30	3,5 (Stammlösung mit HBE)

^a Veresterungsgrad: 31,9 %, Amidierungsgrad: 21,1 %

^b Veresterungsgrad: 29 %, Amidierungsgrad: 21 %

^c Veresterungsgrad: 23-27 %, Amidierungsgrad: 23-25 %

5. Pankreatintest (In-vitro-Verdau von W₁/O/W₂-Doppelmulsionen)

In Kooperation mit Teilprojekt 4 (Uni Karlsruhe) wurde der Verdau der dort entwickelten W₁/O/W₂-Doppelmulsion (s. **Abb. 3 D** und **Tab. 4**) *in vitro* unter Anwendung des Pankreatintests simuliert. Der Verdau der lipophilen Phase (O) ist von großem Interesse, da dadurch die in der inneren hydrophilen Phase (W₁) verkapselten Anthocyane freigesetzt werden können.

Tab. 4: Zusammensetzung der W₁/O/W₂-Doppelmulsion (alle Konzentrationen sind auf das Gesamtsystem bezogen)

innere Wasserphase (W ₁) 24 % (m/m)	Ölphase (O) 56 % (m/m)	äußere Wasserphase (W ₂) 20 % (m/m)
bidestilliertes Wasser	Pflanzenöl	bidestilliertes Wasser
	1,4 % (m/V) PGPR 90+	0,4 % (m/V) Konjugatemulgator
	0,36 % (m/V) Pektin-Amid CB 025-E	0,3 % (m/V) Pektin-Amid CB 025-E
	0,12 % (m/V) HBE	

Die Emulsion wurde in simulierten Darmmedien vor (fasted state simulated intestinal fluid - FaSSIF) und nach der Nahrungsaufnahme (fed state simulated intestinal fluid - FeSSIF) inkubiert.

Grundlage der Inkubationsmedien bildete ein Phosphatpuffer nach SÖRENSEN pH 6,8 (53,4 % Kaliumdihydrogenphosphat 1/15 M und 46,6 % Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat 1/15 M). Dazu wurden 5 mM Gallensalze und 1,25 mM Phospholipide für FaSSIF bzw. 15 mM Gallensalze und 3,75 mM Phospholipide für FeSSIF sowie jeweils 150 mM Natriumchlorid, 5 mM Calciumchlorid und 450 U/ml Pankreatin (Enzymquelle) zugegeben.

Der Verdau wurde in einem End-over-End-Mischer, der sich permanent mit 10 U/min um die eigene, horizontale Achse dreht, bei 37 ± 1 °C durchgeführt. Die Emulsionen und die Inkubationsmedien wurden auf 37 °C vorgeheizt. Jeder Ansatz enthielt 1 % (m/V) Lipid.

Zu bestimmten Zeitpunkten (0, 5, 10, 20, 30, 60, 120, 150 min) wurde der pH-Wert der Ansätze auf den Ausgangswert von pH 6,8 korrigiert. Anschließend wurden 100 µl Probe gezogen und mit 900 µl eines Gemisches aus Chloroform/Methanol (50/50 V/V) verdünnt. Dadurch wurde die Enzymreaktion gestoppt und die Lipidfragmente in die organische Phase extrahiert. Die Aufspaltung der Lipidfragmente wurde mittels HPTLC (AMD 2, CAMAG, Muttenz, Schweiz) unter Anwendung eines elfstufigen Gradienten, basierend auf Hexan und Ethylacetat, durchgeführt. Für die Visualisierung der Lipidfraktionen wurden die Platten mit einer wässrigen Kupfersulfatlösung behandelt (15 % Kupfersulfat, 8 % Phosphorsäure und 5 % Methanol) und anschließend für 50 Minuten bei 150 °C erhitzt.

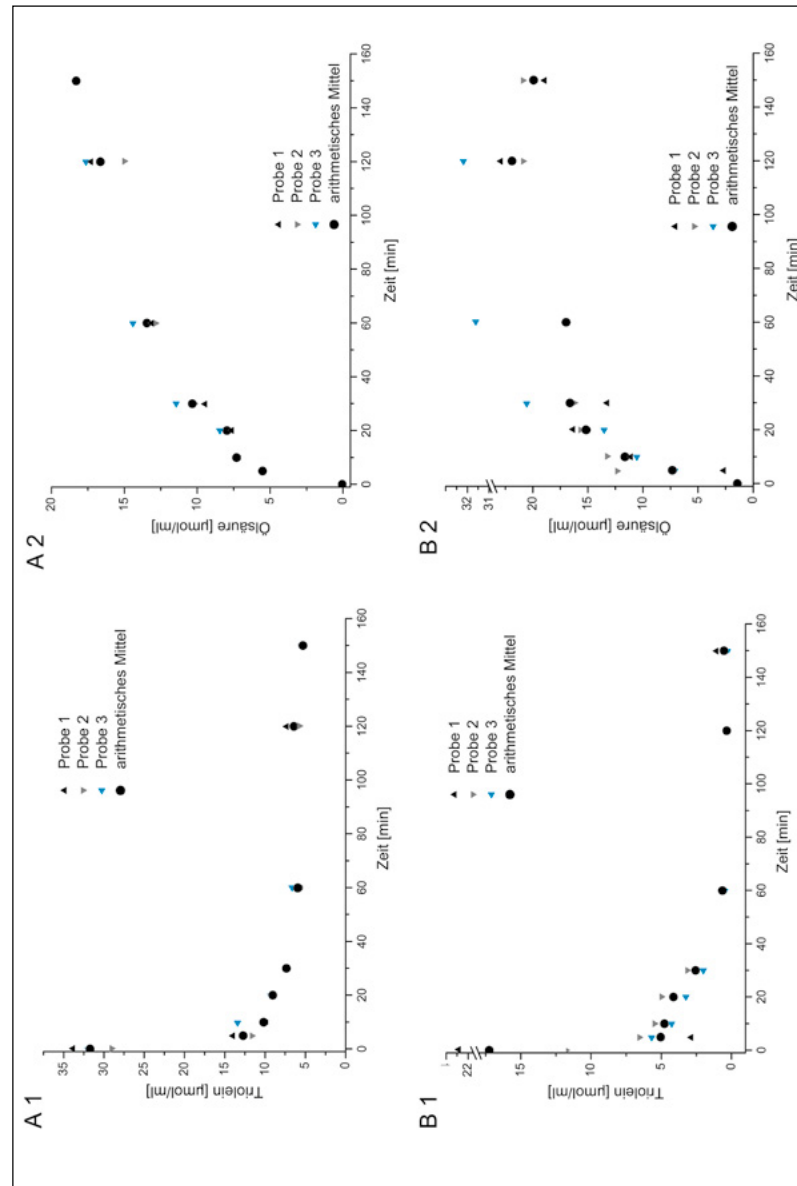


Abb. 4: Ergebnisse des Verdauers der $W_1/O/W_2$ -Doppelemulsion:
 A 1: Triolein FaSSIF, A 2: Ölsäure FaSSIF, B 1: Triolein FeSSIF, B 2: Ölsäure FeSSIF.
 Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte mit der Streuung der Einzelmesswerte.

Die Quantifizierung erfolgte mittels eines Plattenscanners bei $\lambda = 675 \text{ nm}$ (CAMAG-TLC-Scanner 3) [5]. Aufgrund des hohen Ölsäureanteils im Lipid wurden alle Lipidfragmente als Ölsäurederivate quantifiziert. Alle Versuche wurde dreifach ($n = 3$) durchgeführt.

Während des Lipidverdauers *in vitro* wird Triolein über die Zwischenstufen Diolein und Monoolein zu Ölsäure und Glycerin abgebaut. Der Abbau des Trioleins *in vivo* geht nur bis zur Stufe des Monooleins. **Abb. 4** (A 1 (FaSSIF) und B 1 (FeSSIF)) zeigt den Abfall der Trioleinkonzentration. Innerhalb von 5 Minuten ist der Anteil des Lipids um mehr als 50 % seines Ausgangswertes reduziert. Nach einer Inkubation von 60 Minuten bleibt der Gehalt an Triolein nahezu konstant. Dies zeigt das Ende der Abbaureaktion des Trioleins an. Im FeSSIF-Medium ist dieser Prozess vollständiger, da hier ein höherer Anteil an Gallensalzen und Phospholipiden vorliegt. Dies liegt darin begründet, dass die Galle während der Verdauung mehr Verdauungssekret sezerniert. Durch die erhöhte Konzentration dieser beiden Mediumbestandteile werden mehr Mischmicellen, bestehend aus Phospholipiden, Gallensalzen, Monoglyceriden und Fettsäuren, gebildet, wodurch der Lipidverdau beschleunigt wird.

Durch den Abbau des Trioleins entsteht Ölsäure. **Abb. 4** (A 2 (FaSSIF) und B 2 (FeSSIF)) stellt den Konzentrationsanstieg der Ölsäure dar. Im Gegensatz zur Ölsäure steigt der Anteil des Trioleins über den gesamten Inkubationszeitraum. Dies liegt an dem fortschreitenden enzymatischen Abbau des Dioleins und des Monooleins (Daten nicht gezeigt).

Diese Resultate illustrieren den Abbau der Doppelemulsion durch enzymatischen Verdau. Der eingeschlossene HBE kann somit freigesetzt werden. Eine zeitgleiche Analyse des aus der Doppelemulsion freigesetzten HBE wurde nicht durchgeführt. Die Anthocyankonzentration in der internen W_2 -Phase war für das experimentelle Design zu gering dosiert.

6. Zerfallstests

Zu Beginn der Entwicklungsphase der Teilprojekte 2 (TU Dortmund) und 3 (TU München) wurden Zerfallstests von aus den Projekten zur Verfügung gestellten unbeladenen Kapselsystemen durchgeführt. Basierend auf Monographien des Europäischen Arzneibuches (Ph. Eur.) für magensaftresistente Arzneiformen wurden die Mikrokapseln bei $37 \pm 1 \text{ °C}$ in Medien mit unterschiedlichen pH-Werten inkubiert. Nach einer zweistündigen Inkubation im simulierten Magensaft (SGF) ohne Enzym folgte eine einstündige Inkubation in drei unterschiedlichen Puffersystemen. Die zu untersuchenden Kapseln wurden vom SGF direkt in die Folgemedien übertragen.

Tab. 5: Ergebnisse der Zerfallstests von verschiedenen Kapselsystemen aus dem Cluster in den aufgelisteten Medien (+ = nicht zerfallen, - = zerfallen; Ø = nicht durchgeführt)

Teilprojektnummer	2		3		
Kapselsystem Inkubationsmedien	1 Alginat- kapseln	2 Pektin Classic AU-L 026/09	3 Pektin-Amid AU-L 027/0	4 MPI pH 1,5 ohne Emulgator*	5 MPI pH 1,5 mit Emulgator*
SGF pH 1,2 (USP 2008 - ohne Enzymzusatz)	+	-	+	+	+
Acetatpuffer pH 4,5 Ph.Eur.	-	Ø	-	+	+
Phosphatpuffer pH 6,8	-	Ø	-	+	+
Phosphatpuffer pH 7,4	-	Ø	-	+	+

* (der Emulgator wurde nur für den Produktionsprozess der Kapseln verwendet)

Die Zerfallsdaten sind in **Tab. 5** dargestellt. Während der Inkubation in SGF war nur System 2 instabil. Dieses Kapselsystem wurde nicht weiter untersucht, da die Kapseln das saure Milieu des Magens passieren müssen, um in den Darm zu gelangen. Wenn diese schon davor zerfallen, wie Kapselsystem 2, erfüllen sie ihre Funktion nicht mehr und können nicht in das Kolon gelangen.

Die Kapseln aus Alginat, amidiertem Pektin und Molkenproteinisolat waren im simulierten Magenmilieu stabil. Bei der anschließenden Inkubation in schwach saurem bis neutralem Milieu waren nur die Kapseln aus Molkenproteinisolat stabil.

Diese Studie zeigt lediglich die Stabilität der Kapselsysteme in unterschiedlichen pH-Milieus. Mit diesen Daten können keine Aussagen bezüglich der Freisetzung aus den Kapselsystemen gemacht werden, da die inkorporierten Anthocyane nicht nur nach dem Mechanismus der Diffusion, sondern auch nach dem des Zerfalls liberiert werden können.

7. Freisetzungsscharakterisierungen

Das Ziel dieser Studie war die Charakterisierung der Freisetzung von drei mit HBE beladenen Kapselsystemen. Diese wurden von den Teilprojekten 2, 3 und 5 bereitgestellt. Zwei Systeme basierten auf dem Pektin-Amid (System PA und System SL). Das dritte System basierte auf Molkenproteinisolat (System MPI) (vgl. **Abb. 3** und **Tab. 3**).

In Anlehnung an den Zerfallstest für feste Arzneiformen des Europäischen Arzneibuchs wurde ein zweistufiger In-vitro-Freisetzungstest durchgeführt. Unverkapselter Extrakt (als Referenz) und die Kapselsysteme wurden in simuliertem Magensaft pH 1,2 (ohne Enzymzusatz) (SGF - USP 2008) und in dem FeSSIF-Medium inkubiert. Dieses Medium wurde für die Simulation des Dünndarms ausgewählt, da die Kapseln als Nahrungsergänzungsmittel mit Nahrung verabreicht werden sollen.

Die Studie wurde in Anlehnung an den Pankreatintest (siehe Kapitel 4) in einem End-over-End-Mischer bei permanenter Umdrehung um die eigene horizontale Achse bei 37 ± 1 °C durchgeführt. Die Inkubationszeit betrug 120 Minuten für das SGF-Medium und 150 Minuten für das FeSSIF-Medium. Die Messungen wurden durch die Zugabe vom Inkubationsmedium zu den Kapselsystemen gestartet. Zu bestimmten Zeitpunkten (SGF: 0, 10, 20, 30, 45, 60, 120 min; FeSSIF: 0, 10, 20, 30, 60, 120, 150 min) wurden die pH-Werte der Ansätze auf den Ausgangs-pH-Wert 6,8 korrigiert und 100 µl Probe genommen. Diese wurde in einem Gemisch aus Chloroform, Methanol und bidestilliertem Wasser (10/50/40 v/v/v) verdünnt, zentrifugiert, um korpuläre Anteile zu separieren, und anschließend mittels HPLC-UV/VIS quantifiziert (durchgeführt in Teilprojekt 7).

Detaillierte Freisetzungsscharakterisierungen werden im Bericht von Teilprojekt 7 veröffentlicht. Zusammengefasst bleibt die Konzentration des unverkapselten HBE in SGF konstant. Im FeSSIF-Medium sinkt diese jedoch auf etwa 20 % des Ausgangswertes ab. Während der Inkubation der Kapselsysteme im SGF zeigen alle Kapselsysteme eine Freisetzung innerhalb weniger Minuten. Anschließend bleibt die Konzentration über den Inkubationszeitraum konstant. Im FeSSIF-Medium zeigt sich eine schnelle Freisetzung der Anthocyane binnen der ersten 20 Minuten. Trotzdem ist der Gehalt an freien Anthocyanen am Ende der Inkubationszeit doppelt so hoch wie bei dem unverkapselten HBE.

Die Resultate wurden jedem Projektpartner zur Verfügung gestellt, um deren Kapselsysteme zu optimieren.

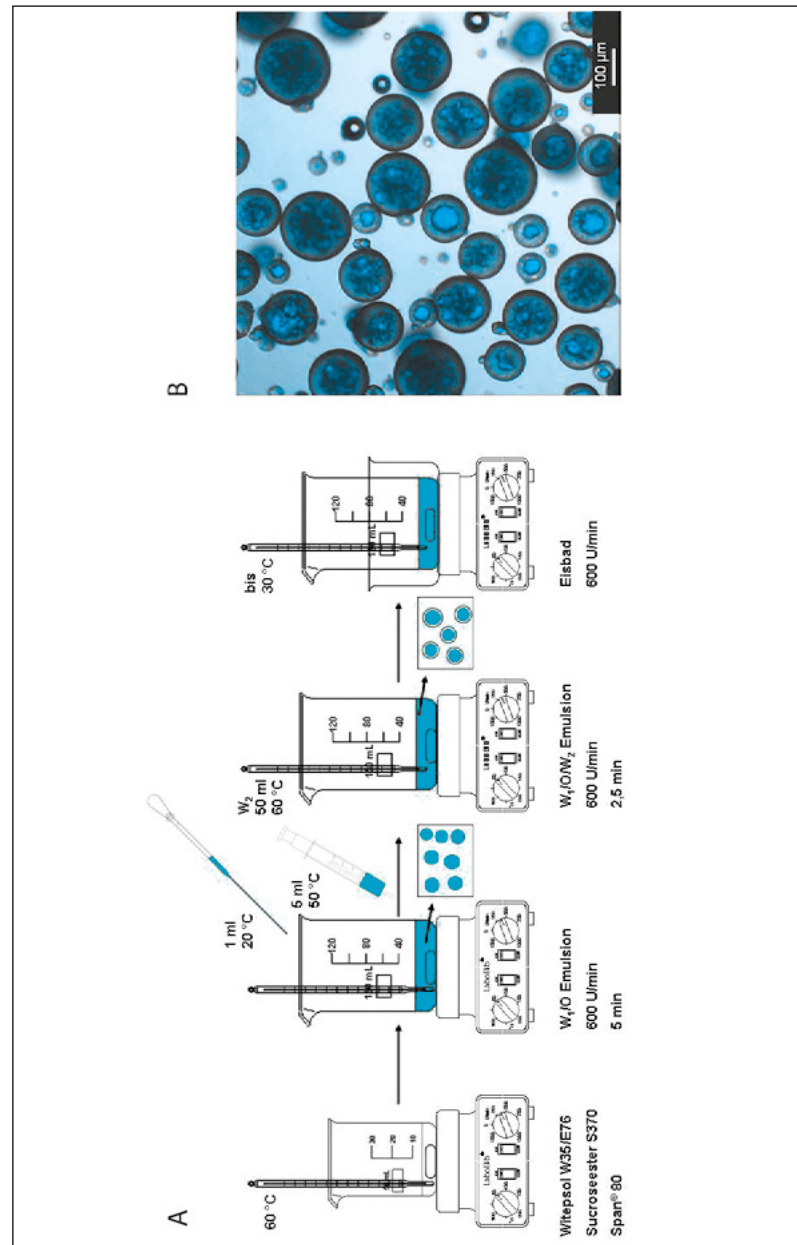


Abb. 5: A: Herstellung der Lipid-Mikrokapseln unter Anwendung der W/O/W-Emulsionsmethode; B: Lichtmikroskopische Darstellung der entwickelten Lipid-Mikrokapseln.

8. Entwicklung und Charakterisierung von Lipid-Mikropartikeln

Neben den Versuchen in Kooperation mit den Projektpartnern wurden eigene Kern-Hülle-Lipid-Mikropartikel entwickelt. Die Lipidhülle besteht aus Witepsol® W 35 (Sasol, Hamburg) und schützt die inkorporierte Anthocyanlösung (pH 2) im Kern (siehe **Tab. 6**). Der Herstellungsprozess ist in **Abb. 5 A** beschrieben.

Tab. 6: Zusammensetzung der Lipid-Mikropartikel

Sucroseester S-370	5 % (m/m)
Span® 80	5 % (m/m)
Witepsol® W 35	ad 100 % (m/m)
Anthocyanlösung (pH 2)	20 % (m/m)

Lichtmikroskopische Bilder (**Abb. 5 B**) zeigen einen erfolgreichen Verkapselungsprozess. Die Anthocyane sind im Kern der Partikel lokalisiert (blau). Der mittlere Partikeldurchmesser (d_{50}) liegt bei 180 µm (bestimmt mittels Laserdiffraktometrie). Die Freisetzungsuntersuchungen wurden wie in Kapitel 6 beschrieben durchgeführt. **Abb. 6** zeigt die Freisetzungsprofile der Mikrokapseln (■) im Vergleich zu unverkapseltem Extrakt (●). Im – den Magen simulierenden – Medium SGF bleibt der Gehalt des unverkapselten HBE konstant. Der Gehalt an freigesetzten Anthocyanen steigt bis 60 Minuten an und bleibt konstant bis zum Ende der Inkubation. Diese Daten sind vergleichbar mit Literaturangaben, da die Anthocyane bei einem niedrigen pH-Wert ihre größte Stabilität aufweisen (Flavylium-Kation) [6].

Das Zeit-Konzentrationsprofil von unverkapselten HBE-Anthocyanen in – dem Dünndarm simulierenden – FeSSIF-Medium ist in **Abb. 6 B** dargestellt. Zu Beginn werden ca. 60 % der theoretisch eingesetzten Anthocyane detektiert. Dieser Gehalt bleibt bis zu einer Inkubationszeit von 30 Minuten nahezu konstant. Danach sinkt der Anthocyanengehalt bis zum Ende der Inkubation auf etwa 19 %. Dieser Abbau der Anthocyane ist vermutet worden, da Anthocyane bei annähernd neutralen pH-Werten um pH 6,8 instabil sind [3]. Während der Inkubation im FeSSIF-Medium setzen die Kapseln die Anthocyane zu Beginn der Inkubation frei. Ein Anstieg der Anthocyankonzentration ist die Folge. Nach 10 Minuten ist ein Maximum der Anthocyankonzentration erreicht. Im weiteren Verlauf der Inkubation sinkt der Gehalt bis zum Ende der Inkubation auf 33 %. Überlagerte Prozesse von Freisetzung und Abbau der Anthocyane müssen in Betracht gezogen werden. Trotzdem zeigen die Kapseln einen Schutz für die eingeschlossenen Anthocyane, da am Ende der Inkubationszeit der Anteil an freien, detektierbaren Anthocyanen etwa 14 % höher ist als bei unverkapseltem HBE.

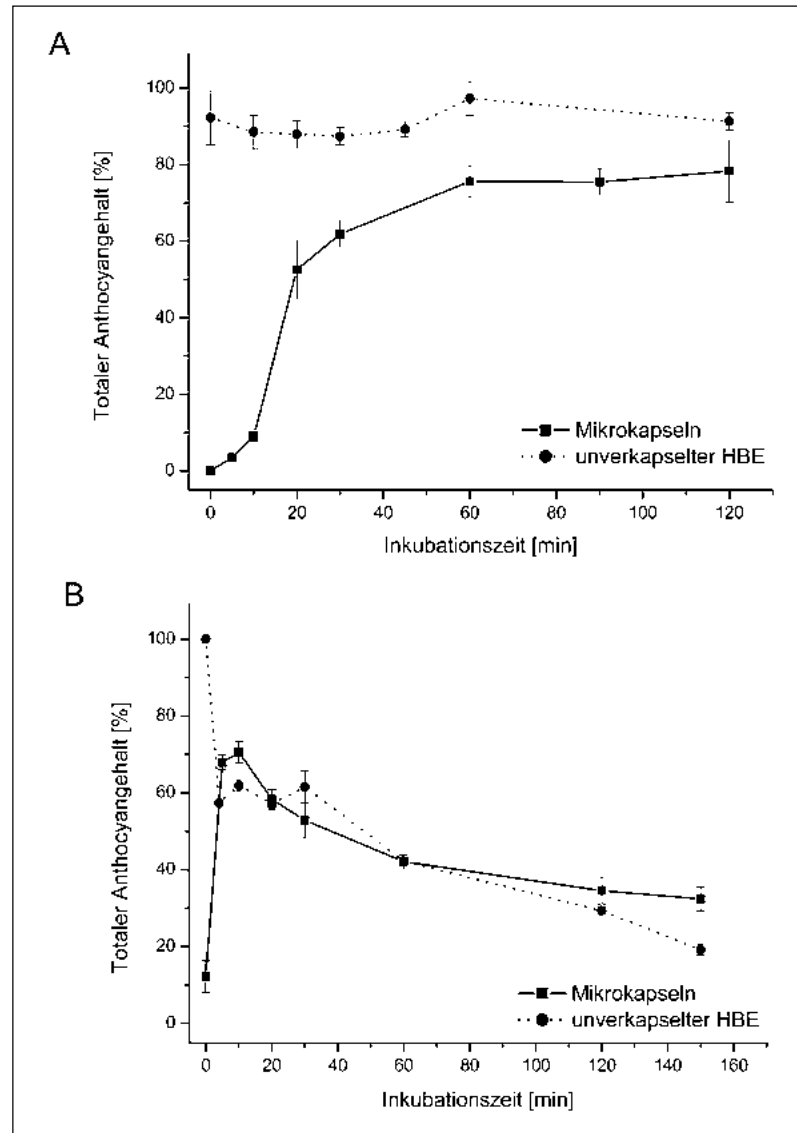


Abb. 6: Freisetzungsprofile der Lipid-Mikrokapseln: A: Inkubation in SGF pH 1,2 (ohne Enzymzusatz); B: Inkubation in FeSSIF (mit Pankreatin).

9. Rheologische Charakterisation von Molkenproteinisolate-Gelen

Molkenproteinisolat (MPI) ist ein wasserlöslicher Proteinmix aus Albuminen und Globulinen. Der Hauptinhaltsstoff (~ 50 %) ist β -Lactoglobulin (β -lg) (IEP 5,2). Dieses ist für die Gelbildung verantwortlich. Zur Charakterisierung von temperaturabhängigen Sol/Gel-Übergängen wurden MPI-Sole mit verschiedenen Konzentrationen und pH-Werten untersucht. Drei verschiedene Methoden wurden angewendet: Benchtop-NMR, Oszillierende Rheologie und die Gefäß-Wasserbad-Methode. Bei allen Methoden wurde eine Temperaturrampe von 2 K angewendet. Bei der Benchtop-NMR wurden T_2 - (spin-spin)-Relaxationszeiten des Wassersignals der Probe bestimmt. T_2 beruht auf der Mobilität der in der Probe enthaltenen Moleküle. Die Relaxationszeit sinkt mit steigender Viskosität der Probe [7]. Durch die Untersuchungen am Rotationsviskosimeter wurden Speicher- (G') und Verlustmodule (G'') der Proben bestimmt. Bei der Anwendung der Gefäß-Wasserbad-Methode wurden transparente Glasgefäße mit der flüssigen Probe gefüllt. Dieses Gefäß wurde im Wasserbad inkubiert und bei bestimmten Temperaturen entnommen. Dabei wurden die Gefäße horizontal um 180 ° gedreht und umgekehrt, um den Sol/Gel-Übergang zu visualisieren.

Tab. 7: Sol/Gel-Übergangstemperaturen der untersuchten Molkenproteinisolate-Gele

	Benchtop-NMR	Oszillierende Rheologie	Gefäß-Wasserbad-Methode
15 % (m/m) MPI pH 1,5	74 °C	57 °C	61 °C
15 % (m/m) MPI pH 7	70 °C	71 °C	69 °C
20 % (m/m) MPI pH 1,5	nicht bestimmt*	nicht bestimmt*	nicht bestimmt*
20 % (m/m) MPI pH 7	70 °C	68 °C	67 °C

*(Probe war bei RT bereits gelartig fest)

Die Ergebnisse der drei verschiedenen Methoden sind vergleichbar (s. **Tab. 7**). Die Sol/Gel-Übergangstemperatur von MPI-Gelen bei pH 7 liegt bei 70 °C. Die Gelbildung bei Proben mit neutralen pH-Werten läuft nach folgendem Mechanismus ab: Entfaltung und folgend die Aggregation der Proteine. Dabei ändert sich die Anzahl der zugänglichen Sulfhydrylgruppen und damit die Reaktivität der Aggregate. Dadurch ist die Tendenz zur Inter-Aggregat-Bindung erhöht [8].

Bei angesäuerten Solen (pH 1,5) liegt der Übergang darunter. Auffällig ist, dass der mittels Benchtop-NMR bestimmte Sol/Gel-Übergang höher liegt als der durch die anderen beiden Methoden ermittelte. Dies liegt darin begründet, dass mit diesem Verfahren Mikroviskositäten bestimmt werden. Das Sol ist optisch ab ca. 61 °C ein Gel. Die inneren Strukturen, die mit dieser Methode bestimmt werden, sind jedoch noch nicht vollständig vom Sol- in den Gelzustand übergegangen. Der Gelbildungsmechanismus der angesäuerten Proben unterscheidet sich von den Proben mit nativen pH-Werten. Die Reaktivität der funktionellen

Gruppen ist verändert. Daraus resultierend unterscheidet sich die Sol/Gel-Übergangstemperatur zu den Proben mit neutralem pH-Wert von pH 7.

Durch das Ansäuern der Gele auf pH 1,5 ist neben der mikrobiellen Stabilität auch eine Stabilität der bei einer Verkapselung inkorporierten Anthocyane gewährleistet (s. MPI-Partikel **Tab. 3**).

Literatur

- [1] D.J. Lurie, K. Mäder, Monitoring drug delivery processes by EPR and related techniques-principles and applications, *Advanced Drug Delivery Reviews* 57(2005) 1171-1190.
- [2] K. Jores, W. Mehnert, K. Mäder, Physicochemical investigations on solid lipid nanoparticles and on oil-loaded solid lipid nanoparticles: a nuclear magnetic resonance and electron spin resonance study, *Pharmaceutical Research* 20(2003) 1274-1283.
- [3] S. Thomasset, N. Teller, H. Cai, D. Marko, D.P. Berry, W.P. Steward, A.J. Gescher, Do anthocyanins and anthocyanidins, cancer chemopreventive pigments in the diet, merit development as potential drugs?, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 64(2009) 201-211.
- [4] J. Kuntsche, K. Klaus, F. Steiniger, Size determinations of colloidal fat emulsions: a comparative study, *J Biomed.Nanotechnol.* 5 (2009) 384-395.
- [5] A. Rübe, S. Klein, K. Mäder, Monitoring of *In Vitro* Fat Digestion by Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy, *Pharmaceutical Research* 23(2006) 2024-2029.
- [6] M.J. Bermúdez-Soto, F.A. Tomás-Barberán, M.T. García-Conesa, Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to *in vitro* gastric and pancreatic digestion, *Food Chem.* 102(2007) 865-874.
- [7] H. Metz, K. Mäder, Benchtop-NMR and MRI-A new analytical tool in drug delivery research, *Int. J. Pharm.* 364(2008) 170-175.
- [8] N. Purwanti, M. Smiddy, A.J. van der Goot, R. de Vries, A. Alting, R. Boom, Modulation of rheological properties by heat-induced aggregation of whey protein solution, *Food Hydrocolloids* 25(2011) 1482-1489.

Veröffentlichungen

- J. Oidtmann, H. Metz, A. Reichert, K. Mäder, Non-Invasive Benchtop-NMR – A Versatile Tool for Monitoring Sol-Gel-Transitions, *Controlled Release Society German Chapter Annual Meeting, Halle* (2009) (Poster).
- J. Oidtmann, H. Metz, A. Reichert, K. Mäder, Non-Invasive Benchtop-NMR Monitoring of Heat Induced Gelation from Whey-Protein-Isolate and Isolated beta-Lactoglobulin, *36th Controlled Release Society Annual Meeting, Kopenhagen (Dänemark)* (2009) (Poster).
- J. Oidtmann, H. Metz and K. Mäder, Whey Proteins as interesting excipient – a non invasive Benchtop-NMR study, *7th World Meeting on Pharmaceutics and Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Valetta (Malta)* (2010) (Poster).
- J. Oidtmann, S. Gedrich, F. Syrowatka and K. Mäder, Development and Characterisation of Lipid Shell Anthocyanin Microcapsules, *Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft Jahrestagung 2010, Braunschweig* (2010) (Poster).

Summary Subproject 6

Non invasive *in vitro* and *in vivo* characterisation of multicapsule systems

Subproject 6 was part of the DFG/AiF cluster "Bioactive ingredients of micro-structured multicapsule systems". Aim of subproject 6 was to characterise developed capsule systems and used excipients of other subprojects with non invasive methods like Benchtop-NMR (BT-NMR) and electron paramagnetic resonance spectroscopy (EPR) as well as pancreatic-assay, high performance thin layer chromatography (HPTLC) and asymmetrically flow-field-flow fractionation (A4F). Figure 1 (**Abb. 1**) shows the networking of our subproject with other subprojects. Our subproject was connected with each subproject for cooperation.

In cooperation with subproject 1 we examined a polyphenol fraction isolated from bilberry extract (BE). By means of A4F we determined the molecular weight of the isolated polyphenol fraction (s. chapter 2). To simulate *in vivo* digestion we performed *in vitro* pancreatic assay of a $W_1/O/W_2$ double emulsion provided by subproject 4. Within the following digestion the lipid fractions were split up and quantified by HPTLC (s. chapter 4). At the beginning of the project we investigated the disintegration of the formulations according to the European Pharmacopoeia. Capsules of subprojects 2 and 3 were incubated in media with different pH-values. Capsules which disintegrated in simulated gastric fluid pH 1.2 (without enzyme) were not subjected for further development (s. chapter 5). Within release studies of capsule systems of subprojects 2, 3 and 5 the main network of the project was found. These three groups provided different capsule formulations. Release studies were performed in our lab. Quantification of anthocyanin content was done by subproject 7 using HPTLC-UV/Vis. The results were discussed with all partners to optimize the capsule systems. We showed that encapsulation of BE compared to not encapsulated anthocyanins protects BE from early degradation and rises the free anthocyanin concentrations (s. chapter 6).

In addition we examined the anti-oxidative potential of BE by an EPR study (s. chapter 1). To characterise sol/gel transition temperatures of different concentrated WPI sols rheological experiments were investigated (s. chapter 8). Supplementary an own core-shell particle system was developed (s. chapter 7).

This report shows cooperation details and results with all subprojects. It is evident that our project has a key position in the analysis of the developed capsule systems. Parts of this work were already presented on international conferences (s. publications).

Teilprojekt 7 (AiF)

Biologische Wirksamkeit von Blaubeer-Anthocyanen im Vergleich zu mikro-/nano-verkapselten Anthocyan-Präparaten: Modulation von intestinaler Verfügbarkeit, Fermentation, antioxidativer Wirksamkeit und Wirkungen auf die DNA-Integrität (AiF 15614 N)

Prof. Dr. Elke Richling,
Dr. Matthias Baum

Technische Universität Kaiserslautern
Fachbereich Chemie
Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie

Prof. Dr. Doris Marko,
Dr. Gudrun Pahlke

Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
Institut für Angewandte Biowissenschaften
Abteilung für Lebensmitteltoxikologie

(ab 01.4.2009 Fortführung des Projektes an der Universität Wien)
Universität Wien
Institut für Analytische Chemie und Lebensmittelchemie
Lehrstuhl für Lebensmittelchemie

Einführung

In den letzten Jahren stieg aufgrund eines erhöhten Ernährungsbewusstseins die Frage nach Lebensmitteln mit möglichem chemoprotektiven Potential. Wildheidelbeeren (*Vaccinium myrtillus* L.) besitzen aufgrund des hohen Anteils bioaktiver Inhaltsstoffe eine im Vergleich zu anderen Obst- und Gemüsearten sehr hohe antioxidative Kapazität. Daher sind sie für den Einsatz in funktionellen Lebensmitteln besonders geeignet. Den roten Beerenfarbstoffen (Anthocyane) werden antikanzerogene und antiinflammatorische Eigenschaften zugesprochen. Im Organismus wird die Wirksamkeit der Anthocyane wesentlich durch deren pharmakokinetische Eigenschaften (Bioverfügbarkeit, Stoffwechsel, Ausscheidung) beeinflusst. Zusätzlich ist die Stabilität der Anthocyane unter physiologischen und Zellkultur-Bedingungen limitiert. In den vergangenen Jahren hat die Verkapselung von Wirkstoffen – vorwiegend im Pharmabereich – dazu geführt, dass Substanzen gezielt am Wirkort freigesetzt werden können. Damit

könnte auch die Bioverfügbarkeit von Anthocyanen so moduliert werden, dass durch die Beständigkeit der verkapselten Anthocyane bei der Magen-Darm-Passage das Erreichen des potentiellen Wirkortes und somit auch die biologische Wirksamkeit im Hinblick auf die Prävention verbessert wird.

Ziel des Teilprojektes 7 im DFG/AiF-Cluster „Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten Multikapselsystemen“ war es, mittels In-vitro-Experimenten an humanen Darmkrebszellen zu prüfen, ob die verwendeten Verkapselungssysteme einen Einfluss auf die biologische Wirksamkeit der Anthocyane ausüben. Zusätzlich wurde in Zusammenarbeit mit dem Teilprojekt 6 (Universität Halle) die Stabilität und Freisetzung von Anthocyanen aus Heidelbeerextrakt (HBE) und den HBE-beladenen Kapselsystemen unter den Bedingungen des Gastrointestinaltrakts untersucht (siehe Teilprojekt 6).

Für die Untersuchungen zur biologischen Wirksamkeit wurden von der Technischen Universität Kaiserslautern (Forschungsstelle 1 dieses Teilprojektes) Biomarker ausgewählt, die in direktem Zusammenhang mit oxidativen Zellschäden stehen. Um eine Aussage über potentielle zytotoxische Effekte des HBE und der HBE-beladenen Kapselsysteme auf humane Darmkrebszellen treffen zu können, wurde der Farbreaktionstest „Alamar blue Assay“, in dem die mitochondriale Aktivität als Maß für die Vitalität der Zelle bestimmt wird, durchgeführt. Die antioxidative Wirksamkeit wurde als Modulation unterschiedlicher Biomarker – wie die Reduktion oxidativer DNA-Schäden, die Erhöhung des Gehalts an zellulärem Glutathion (Antioxidans und Entgiftungsagens) und die Reduktion intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) – in Kurz- und Langzeitinkubationen mit einem Versuchsprotokoll nach Schäfer et al. untersucht [SCHAEFER et al., 2006 a; SCHAEFER et al., 2006 b].

Der Einsatz des HBE und der HBE-beladenen Kapselsysteme erfolgte im physiologisch relevanten Konzentrationsbereich von 1 - 500 µg/ml HBE, welcher im Gastrointestinaltrakt des Menschen erreicht werden kann. Berücksichtigt werden muss jedoch, dass die tägliche Aufnahmemenge an Anthocyanen stark von den Ernährungsgewohnheiten abhängig ist. So können beispielsweise durch den Verzehr einer Portion Heidelbeeren 500 mg Anthocyane aufgenommen werden, wohingegen eine Portion Holunderbeeren 2.000 mg Anthocyane enthalten kann [HE et al., 2010]. Es ist weiterhin bekannt, dass 40% der oral aufgenommenen Menge an Anthocyanen den Dickdarm unmetabolisiert erreichen [GONZALEZ-BARRIO et al., 2010]. Bei Untersuchungen des unverkapselten HBE auf die Modulation der gewählten Biomarker zeigten sich in Darmkrebszellen (Caco-2) keine zytotoxischen Effekte auf die Zellen über den gesamten Konzentrationsbereich (1 - 500 µg/ml). Weiterhin wurde eine signifikante Abnahme tert-Butylhydroperoxid (TBH)-induzierter intrazellulärer ROS > 50 µg/ml HBE (siehe **Abb. 1**), eine tendenzielle Erhöhung des Glutathiongehalts der Zellen und eine signifikante Reduktion Menadion (Md)-induzierter DNA-Schäden im niedrigen Konzentrationsbereich (5 µg/ml HBE, siehe **Abb. 2**) festgestellt [SCHANTZ et al., 2011]. Dass In-vitro-Untersuchungen auch für die In-vivo-Situation relevant sein

können, wurde von WEISEL et al. gezeigt. In dieser Humanstudie konsumierten gesunde Probanden einen roten anthocyanhaltigen Mehrfruchtsaft (700 ml pro Tag) über einen Zeitraum von vier Wochen. Dabei wurde eine Verringerung der oxidativen DNA-Schäden und eine signifikante Erhöhung des Glutathiongehalts im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet [WEISEL et al., 2006].

Um zusätzlich eine Aussage über Wirkkomponenten im HBE treffen zu können, wurden HBE-Subfraktionen – Anthocyan-, Polymer- und Phenolcarbonsäurefraktionen, die von der TU Braunschweig (Teilprojekt 1) zur Verfügung gestellt wurden – ihrem mengenmäßigen Anteil im HBE entsprechend eingesetzt. Dabei zeigte sich, dass bei Inkubationen mit Anthocyan- und Polymerfraktion keine Effekte auf die untersuchten Biomarker in Caco-2-Zellen beobachtet wurden. Lediglich für die Phenolcarbonsäurefraktion wurde ein positiver Einfluss nachgewiesen. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da aus der Literatur bekannt ist, dass Quercetin (in der Phenolcarbonsäurefraktion enthalten) schon in geringen Konzentrationen (30 µM) eine Wirksamkeit auf die untersuchten Biomarker zeigt [BELLION et al., 2008; SCHAEFER et al., 2006 b]. Die beobachtete Wirksamkeit entsprach nicht der des unverkapselten HBE. Dies führte zu der Vermutung, dass für dessen potente Wirksamkeit vermutlich ein Zusammenspiel der einzelnen Fraktionen verantwortlich ist.

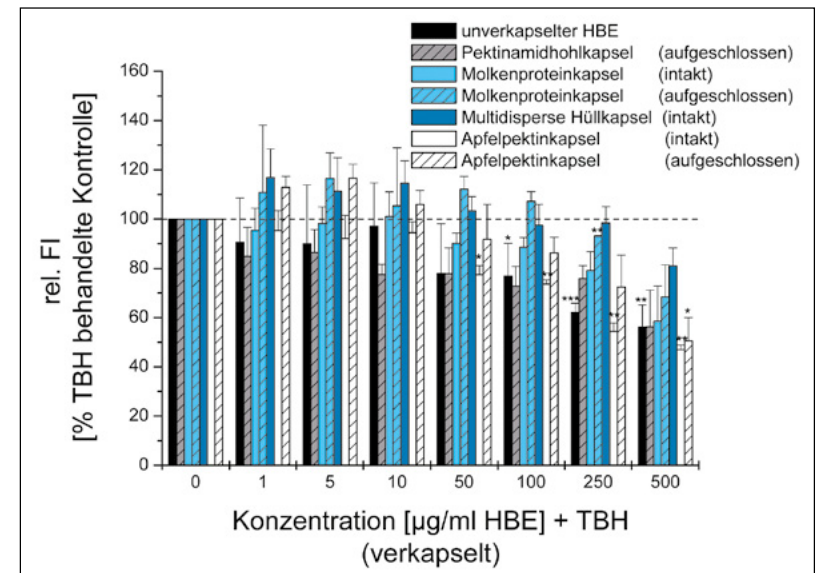


Abb. 1: Modulation der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)-Level in Caco-2-Zellen nach 24 h Inkubation mit unverkapseltem Heidelbeerextrakt (HBE) im Vergleich zu HBE-beladenen Kapselpräparationen (mechanisch aufgeschlossen bzw. intakt) (Nachbehandlung mit TBH; 250 µM; 40 min); n=3; mean ± SD; student's t-test: *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

Um eine bessere Vergleichbarkeit der In-vitro-Ergebnisse (DNA-Schäden: Comet Assay, intrazelluläre ROS: DCF Assay) der Inkubationen des HBE mit den eingesetzten HBE-beladenen Kapselsystemen (Pektinamidhohl-, Molkenprotein-, multidisperse Hüll- und Apfelpektinkapseln) zu gewährleisten, wurden diese in **Abb. 1** und **Abb. 2** gegenübergestellt. Bei den Molkenprotein- und Apfelpektinkapseln sollte zusätzlich untersucht werden, inwieweit ein vor der Inkubation durchgeführter Aufschluss der Kapseln die Wirksamkeit verändert.

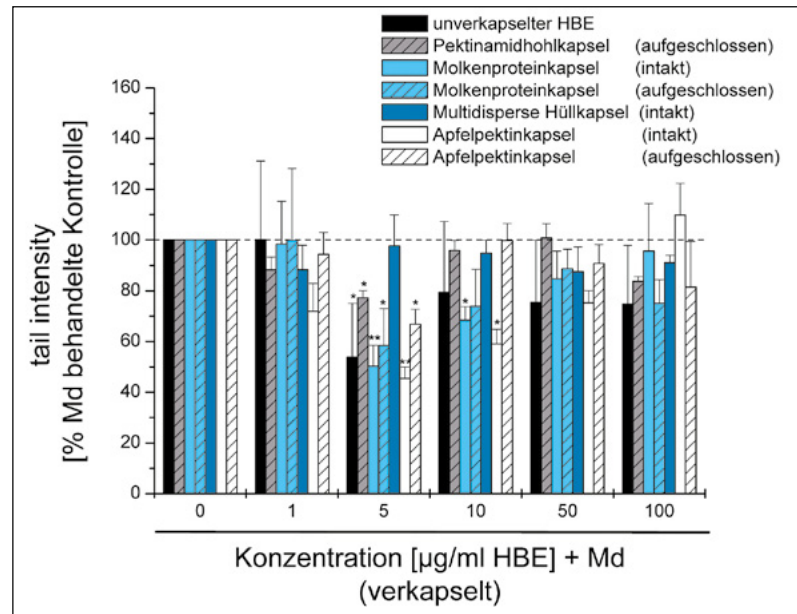


Abb. 2: Modulation Menadion-induzierter oxidativer DNA-Schäden in Caco-2-Zellen nach und 24 h Vorinkubation mit unverkapseltem HBE im Vergleich zu HBE-beladenen Kapselpräparationen (mechanisch aufgeschlossen bzw. intakt) (Nachbehandlung mit Menadion; 6 µM; 1h); nur Inkubationen mit Formamidopyrimidinyglykosylase (FPG) Behandlung; n=3-5; mean ± SD; student's t-test: *p < 0,05; **p < 0,01.

Es stellte sich heraus, dass die multidispersen Hüllkapseln (Teilprojekt 4; Karlsruher Institut für Technologie) aufgrund der äußeren Ölphase in dieser Formulierung nicht für die verwendeten In-vitro-Zellkulturexperimente geeignet waren. Es kam zu einem Aufschwimmen der Kapseln im Zellkulturmedium, wodurch die Freisetzung der wirksamen Komponenten des HBE verhindert wurde. Dieser Effekt muss jedoch nur bei In-vitro-Testsystemen beachtet werden, da *in vivo* die Ölphase der Kapsel durch unterschiedliche Enzyme (Lipasen) während der Magen-Darm-Passage abgebaut wird und der enthaltene Wirkstoff freigesetzt

werden kann. Aus der Literatur ist bekannt, dass solche Wasser-in-Öl-Emulsionen schon seit längerem verwendet werden, um Substanzen erstens zu stabilisieren und zweitens deren Transport durch den Magen-Darm-Trakt zu kontrollieren [SINGH et al., 2011].

In Inkubationen mit den anderen HBE-beladenen Kapselsystemen (Molkenprotein, Pektinamidhohl- und Apfelpektinkapseln) wurde eine Erhöhung des Glutathiongehalts der Zelle (100 - 500 µg/ml), eine Reduzierung der TBH-induzierten ROS mit steigender Konzentration (100 - 500 µg/ml) und eine Reduzierung TBH-induzierter DNA-Strangbrüche (5 - 10 µg/ml) beobachtet. Des Weiteren wurde im Vergleich der Inkubationen mit aufgeschlossenen bzw. intakten Kapseln gezeigt, dass die Ergebnisse von aufgeschlossenen Kapseln mit denen der intakten Kapseln vergleichbar waren (siehe **Abb. 1** und **Abb. 2**). Die erzielten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass der Einsatz dieser drei Verkapselungstechniken zu keiner Reduzierung der biologischen Wirksamkeit der Wirkkomponenten auf die untersuchten Biomarker *in vitro* führte.

In den Untersuchungen der Forschungsstelle 3 (Universität Wien, ehemals Forschungsstelle 2 (Karlsruher Institut für Technologie)) wurde der Fokus auf die Modulation der Rezeptortyrosinkinase (RTK)-EGFR (Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor) im zellulären System als eines der Schlüsselemente der Regulation des Tumorzellwachstums gelegt. Der EGFR stellt das erste Signalkettenelement einer Reihe wichtiger intrazellulärer Signaltransduktionskaskaden dar und ist so in der Lage, elementare Funktionen wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose zu regulieren.

Im zellulären System der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 wurde daher die Modulation der Phosphorylierung des EGFR als Maß für dessen Aktivität mittels Western-Blot-Assay untersucht.

- Um eine mögliche Modulation der antiproliferativen Wirkung des HBE durch die Verkapselungstechniken zu untersuchen, wurde der unverkapselte HBE im Vergleich zu den von Teilprojekt 4 hergestellten Extrakt in Emulsion sowie den von den Teilprojekten 2 und 3 hergestellten Extrakt in Kapselsystemen auf Basis von Pektinamid bzw. Molkenprotein untersucht.
- Des Weiteren wurde die Modulation der RTK-EGFR im zellulären System durch unterschiedliche, von Teilprojekt 1 aufgetrennte Subfraktionen des HBE, ausgewählte Einzelsubstanzen (Extraktinhaltsstoffe) sowie den durch Forschungsstelle 1 mit Ileostomaflüssigkeit fermentierten HBE untersucht. Damit konnte der Frage nachgegangen werden, welche Substanzklassen bzw. welche Einzelsubstanzen für eine potente Hemmung der Aktivität des EGFR verantwortlich sein könnten und ob metabolische Prozesse im Dünndarm lumen zu einer Modulation der Hemmqualität führen.

Beeinflussung der DNA-Integrität

In vorausgegangenen Bearbeitungszeiträumen wurde von Forschungsstelle 3 (Universität Wien) als möglicher anwendungslimitierender Effekt die Hemmung humaner Topoisomerasen und deren Einfluss auf die DNA-Integrität am isolierten System mittels Relaxations- (Topoisomerase I) und Dekatenierungsassay (Topoisomerase II) untersucht. Es soll nun geklärt werden, ob durch Verkapselung des HBE und einer daraus möglicherweise resultierenden Potenzierung der biologischen Aktivität eine giftige Wirkung hinsichtlich der Topoisomerasen auftreten kann. Diese Untersuchungen wurden im ICE-Assay durchgeführt, wobei Veränderungen der Menge an Topoisomerase erfasst werden, die im Laufe des katalytischen Zyklus intermediär kovalent an die DNA gebunden ist. Sogenannte „Topoisomerasegifte“ erhöhen den Anteil dieser DNA-Topoisomerasekomplexe, was nach Kollision mit der Replikationsgabel zu DNA-Strangbrüchen führen kann.

Es konnte gezeigt werden, dass der unverkapselte HBE sowie die meisten der isolierten Subfraktionen (Teilprojekt 1) als potente Inhibitoren der Aktivität des EGFR im zellfreien System (ELISA) wie auch in humanen Kolonkarzinomzellen (Western-Blot-Analyse, siehe **Abb. 3 A**) wirken. Dabei zeigte sich, dass die biologische Wirksamkeit des Extraktes nicht ausschließlich auf die enthaltenen Anthocyane zurückzuführen ist.

Im Vergleich zur EGFR-hemmenden Wirkung des nativen HBE nach Kurzzeitinkubation verringerte die Verkapselung, insbesondere in die lipid- und proteinbasierten Systeme (Teilprojekte 4 und 3, **Abb. 3 B**), die biologische Aktivität an diesem Messparameter. Ein Grund für die Verringerung dieser biologischen Aktivität ist eine mögliche Interaktion des Kapselproteins mit Inhaltsstoffen des HBE. Dies konnte durch Koinkubationsansätze bestätigt werden, bei denen der unverkapselte Extrakt sowohl mit unbeladenen Kapseln als auch mit Serumalbumin inkubiert wurde, was in beiden Ansätzen zu einer deutlichen Unterdrückung der EGFR-hemmenden Aktivität des HBE führte. Im Gegensatz zu den Formulierungen auf Lipid- und Proteinbasis verringerte sich die Bioaktivität des HBEs, der in Pektinhohlkugeln verkapselt wurde (Teilprojekt 2), nach deren Aufschluss nicht (**Abb. 4 A**). Nach Inkubation mit den intakten Kapseln konnte jedoch auch hier eine Verringerung der biologischen Aktivität festgestellt werden (**Abb. 4**).

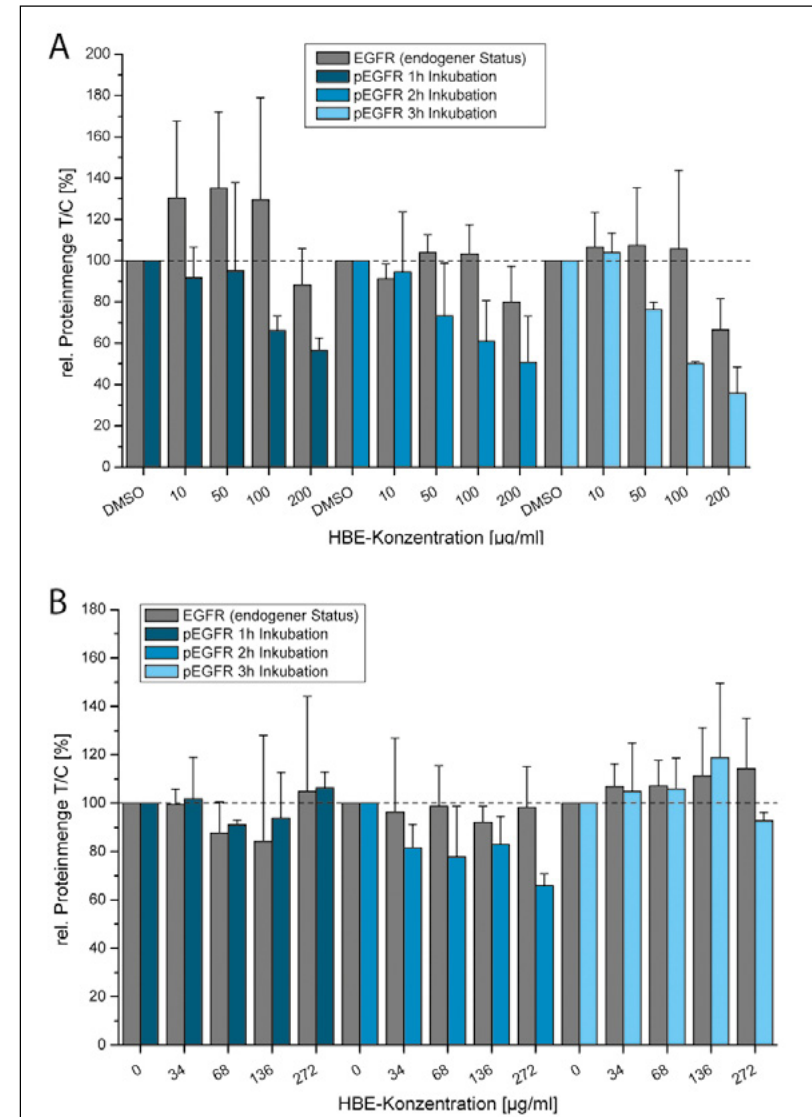


Abb. 3: Modulation der EGF-Rezeptorphosphorylierung (Western-Blot-Analyse) durch den unverkapselten (A) und in Molkenproteinmatrixkapseln eingearbeiteten HBE (B) nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten. Die Konzentration des Proteinkapselmaterials wurde durch Ausgleich unbeladener Referenzkapseln konstant auf 5 mg/ml gehalten. HT29-Zellen wurden serumfrei mit unterschiedlichen Konzentrationen an HBE und 100 U/ml Katalase (zur Unterdrückung artifizieller Bildung von Wasserstoffperoxid im Zellkulturmedium) inkubiert. MW \pm SD von n = 3 bezogen auf die Negativkontrolle.

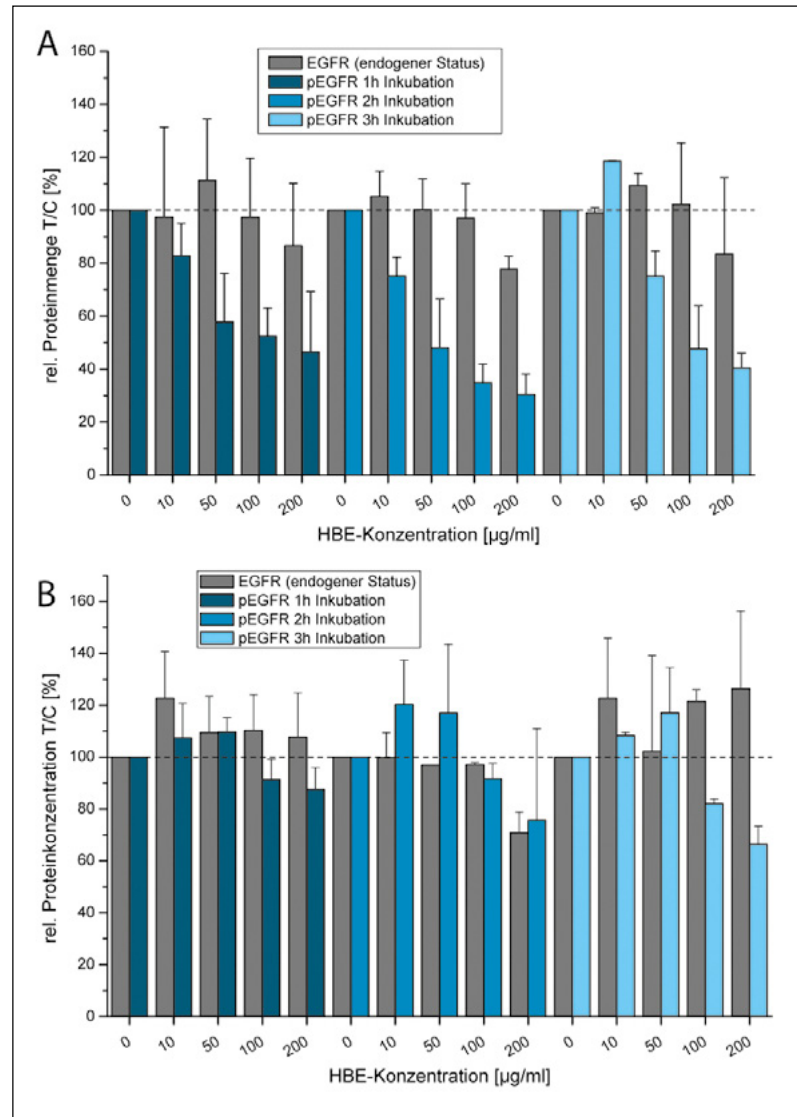


Abb. 4: Modulation der EGF-Rezeptorphosphorylierung (Western-Blot-Analyse) durch aufgeschlossene (A) und intakte Pektinamidkapseln (B) nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten. Die Konzentration des Pektinamidkapselmateriale wurde durch Ausgleich unbelasteter Referenzkapseln konstant gehalten. HT29-Zellen wurden serumfrei mit unterschiedlichen Konzentrationen an HBE und 100 U/ml Katalase inkubiert. MW \pm SD von n = 3 bezogen auf die Negativkontrolle.

Langzeituntersuchungen (Sulforhodamin-B-Assay über 72 h) zur Tumorzellwachstumshemmung zeigten, dass die Verkapselung in die Protein- und Lipidsysteme hinsichtlich dieses Endpunktes zu keiner substanziellen Verringerung der Bioaktivität des HBE führte. Die Ex-vivo-Fermentation mit Ileostomahalt führte hingegen zu einer Abnahme der biologischen Aktivität des HBE hinsichtlich der EGFR-Phosphorylierung, die mit der Anthocyanabnahme (gemessen von Forschungsstelle 1) assoziiert werden konnte.

Obwohl eine Hemmung der katalytischen Topoisomeraseaktivität im Relaxations- und Dekatenierungsassay durch den HBE messbar war, konnte eine Beeinträchtigung der DNA-Integrität durch Giftung humaner Topoisomerasen (ICE-Bioassay) sowohl im unverkapselten als auch in verkapselten Systemen ausgeschlossen werden (ohne Abbildung). Eine Induktion entsprechender anwendungslimitierender Effekte kann für diese untersuchten Endpunkte ausgeschlossen werden.

Schließlich wurde in Abhängigkeit der Verkapselung in den untersuchten Struktursystemen eine unterschiedlich verzögerte Freisetzung und Stabilität der Leitverbindungen des Extraktes unter Zellkulturbedingungen mittels HPLC-Analyse erfasst. Hier zeigte sich, dass der Extrakt aus den Proteinmatrixkapseln bereits nach 5 min nahezu quantitativ freigesetzt wurde. Aus den Pektinamidhohlkapseln benötigten die erfassten Anthocyane jedoch ca. 1 h bis zur vollständigen Freisetzung. Der Abbau der enthaltenen Anthocyane erfolgte beim Pektinamidsystem deutlich schneller als bei den Proteinkapseln. Beide Systeme konnten jedoch nicht die hohen Anthocyankonzentrationen erreichen, wie sie nach Inkubation mit unverkapseltem Extrakt vorlagen.

Fazit

Die Untersuchungen der beiden Forschungsstellen zeigen, dass die Freisetzung des HBE und dessen biologische Wirkung durch Verkapselung moduliert werden kann. Abgesehen von der Wirkung auf den EGFR zeigten die meisten der untersuchten Endpunkte, dass die biologische Wirksamkeit des Extraktes durch die Einbringung in die strukturierten Kapselsysteme nicht substantiell vermindert wurde. Damit stellen diese Kapselsysteme eine Möglichkeit dar, bioaktive Stoffe zu verkapseln, um den Zielort zu erreichen, ohne dass die Wirksamkeit maßgeblich beeinflusst wird.

Da mit diesen In-vitro-Systemen komplexe Mechanismen wie Aufschluss und Bioverfügbarkeit im Organismus nicht vollständig abgebildet werden können, sollten die Ergebnisse zu den Verkapselungssystemen in einer „Proof of concept“-Studie an humanen Probanden verifiziert werden.

Ein Nachfolgeprojekt mit dem Titel „Pilotstudie zur Bioverfügbarkeit und biologischen Aktivität von anthocyanreichen Heidelbeerextrakten in verkapselter und unverkapselter Form im Menschen“ (AiF 17039 N) wird von beiden Forschungsstellen seit Mai 2011 bearbeitet.

Literatur

- [1] Bellion, P., Hofmann, T., Pool-Zobel, B. L., Will, F., Dietrich, H., Knaup, B., Richling, E., Baum, M., Eisenbrand, G. & Janzowski, C. (2008) Antioxidant effectiveness of phenolic apple juice extracts and their gut fermentation products in the human colon carcinoma cell line caco-2. *Journal of agricultural and food chemistry*. 56, 6310-6317.
- [2] Gonzalez-Barrio, R., Borges, G., Mullen, W. & Crozier, A. (2010) Bioavailability of anthocyanins and ellagitannins following consumption of raspberries by healthy humans and subjects with an ileostomy. *Journal of agricultural and food chemistry*. 58, 3933-3939.
- [3] He & Giusti, M. M. (2010) Anthocyanins: Natural colorants with health-promoting properties. *Annual review of food science and technology*. 1, 163-186.
- [4] Schaefer, S., Baum, M., Eisenbrand, G., Dietrich, H., Will, F. & Janzowski, C. (2006 a) Polyphenolic apple juice extracts and their major constituents reduce oxidative damage in human colon cell lines. *Molecular nutrition and food research*. 50, 24-33.
- [5] Schaefer, S., Baum, M., Eisenbrand, G. & Janzowski, C. (2006 b) Modulation of oxidative cell damage by reconstituted mixtures of phenolic apple juice extracts in human colon cell lines. *Molecular nutrition and food research*. 50, 413-417.
- [6] Schantz, M., Baum, M. & Richling, E. (2011) Antioxidative efficiency of an anthocyanin rich bilberry extract in vitro. *Journal of Berry Research*. 383, 92-92.
- [7] Singh, H. & Sarkar, A. (2011) Behaviour of protein-stabilised emulsions under various physiological conditions. *Advances in colloid and interface science*. 165, 47-57.
- [8] Weisel, T., Baum, M., Eisenbrand, G., Dietrich, H., Will, F., Stockis, J. P., Kulling, S., Rufer, C., Johannes, C. & Janzowski, C. (2006) An anthocyanin/polyphenolic-rich fruit juice reduces oxidative DNA damage and increases glutathione level in healthy probands. *Biotechnology journal*. 1, 388-397.

Im Rahmen des DFG/AiF-Clusters „Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten Multikapselsystemen“ wurde das Teilprojekt 7 des Forschungskreises der Ernährungsindustrie e.V. (FEI) über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung und -entwicklung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.

Summary Subproject 7

Biological activity of bilberry anthocyanins in comparison to encapsulated anthocyanin preparations: Modulation of bioavailability, fermentation, antioxidative and antiproliferative properties as well as the impact on DNA integrity

The aim of this subproject was to verify *in vitro* the preventive and adverse effects of encapsulated BE (bilberry extract) in comparison to not encapsulated BE. Furthermore the stability, release and bioavailability of BE and different BE loaded capsule systems were characterized in the gastrointestinal tract.

Research institution 1 (Technische Universität Kaiserslautern)

The *in vitro* release and stability studies in cooperation with subproject 6 (Universität Halle-Wittenberg) suggest that the present techniques of encapsulation (pectin amide concave-, whey protein- and apple pectin capsules with shellac coating) lead to an undesirable release of the anthocyanins during the passage of the stomach.

Furthermore the results demonstrate that BE loaded capsule systems induce a continuous release and an increased level of active agent in the simulated milieu of the small intestine. Additional incubations using content of the human small intestine (provided by ileostomists) revealed that the encapsulation (pectin amide concave-, whey protein- and apple pectin capsules) compensate the degradation of anthocyanins due to a delayed release over time.

To investigate the active agent of BE the BE subfractions were used in their quantitative proportions. By incubations with anthocyanin- and polymer-fractions no antioxidative effects were detectable, whereas the phenylcarbonic acid fraction was identified as the potent one.

Multidisperse cladding capsules were not qualified for the use in *in vitro* cell culture assays due to their outer phase of oil. Whereas incubations with other BE loaded capsule systems, a significant effect on the cell vitality was observed with whey protein- and apple pectin capsules in concentrations of 50-500 µg/ml. A tendentious increase of the cellular glutathione levels (100-500 µg/ml), a compensation of ROS with raising concentrations (100 - 500 µg/ml) and a positive effect on the formation of DNA strand breaks (5-10 µg/ml) were detected through incubation with capsule systems (pectin amide concave-, whey protein- and apple pectin capsules). The biological properties of the BE loaded pectin amide concave-, whey protein- and apple pectin capsules were comparable to them of the original BE.

Research institution 3 (Universität Wien)

We demonstrated that the unencapsulated BE as well as most of the isolated subfractions of the BE act as potent inhibitors of the EGFR under cell-free conditions (ELISA) as well as in human colon carcinoma cells (Western blot analysis). The data indicate that this effect is not exclusively due to anthocyanins. Cytotoxic effects of the BE could be excluded by the WST1 assay. Encapsulation in lipid- (subproject 4) and protein-based systems (subproject 3) completely diminished the bioactivity regarding the EGFR phosphorylation *in vitro*, whereas BE activity was conserved in the pectin-based capsules (subproject 2). The loss of bioactivity in the matrix capsules appeared to be due to interaction between BE constituents and proteins. In contrast to the results on EGFR phosphorylation, the BE from lipid- and protein-based systems did inhibit cell growth after 72 h of incubation comparable to the unencapsulated extract. Therefore it might be considered that a time delayed release of components with EGFR-inhibiting properties out of these capsules might occur. However, it cannot be excluded that the observed growth inhibitory properties are due to the modulation of additional cellular targets. *Ex vivo* ileostomy fermentation of the BE led in a suppression of its bioactivity regarding the EGFR system, associated with a loss of anthocyanins, measured by research institution 1.

The unencapsulated extract revealed a moderate inhibiting potential on the catalytic activity of topoisomerases in the cell-free decatenation and relaxation assays. Furthermore we demonstrated that this inhibiting properties are not due to topoisomerase poisoning in the ICE bioassay and that encapsulation does not lead to enhanced levels of DNA/topoisomerase intermediates. HPLC analysis after incubation of BE and encapsulated extract revealed a time-retarded release of anthocyanins depending on the encapsulation method followed by a fast degradation due to their low stability at neutral pH.

The results of both institutions show that release and bioactivity of the BE can be modulated by encapsulation. Apart from the effect on the EGFR system most parameters exhibited that there is no substantial loss of bioactivity after embedding into various capsules. Hence, these systems provide an option to encapsulate bioactive compounds in order to reach their site of action without loss of their activity. Anyhow, these results have to be verified in a human intervention study because the examined *in vitro* systems cannot completely reflect the actual *in vivo* situation.

Ziele und Ergebnisse des Clusterprojektes (Zusammenfassung)

Hintergrund

Zahlreiche Studien zeigen, dass durch die tägliche Auswahl der Lebensmittel nicht nur alle lebensnotwendigen Stoffwechselfvorgänge ermöglicht werden, sondern auch das Risiko für die Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen und von bestimmten Krebsarten beeinflusst werden kann. Da diese Krankheitsbilder in unserer Gesellschaft die häufigsten Todesursachen darstellen und auch schon im Vorfeld erheblich zum Verlust von Lebensqualität und zur Kostenentstehung im Gesundheitssystem beitragen, ist das Verständnis der Krankheitsentstehung und deren Prävention von zentraler gesellschaftlicher Bedeutung.

Ein verringertes Krankheitsrisiko wird in erster Linie über eine Ernährung erreicht, die einen hohen Anteil pflanzlicher Lebensmittel aufweist. Zahlreiche epidemiologische Studien mit sowohl retrospektiver als auch prospektiver Anlage konnten u.a. „Gemüse und Obst“ als die Lebensmittelgruppe identifizieren, deren Verzehr besonders stark invers mit dem Erkrankungsrisiko korreliert. Bei der Identifizierung der präventiv wirkenden Inhaltsstoffe dieser Lebensmittelgruppe wurden neben den essenziellen Nährstoffen und Ballaststoffen vor allem die sekundären Pflanzenstoffe, bioaktive Substanzen aus pflanzlichen Rohstoffen (engl. *phytochemicals*), als wichtige Substanzklasse erkannt.

Sekundäre Pflanzenstoffe lassen sich aufgrund ihrer chemischen Struktur in unterschiedliche Klassen einteilen, wobei Carotinoide und Flavonoide besonders intensiv untersucht wurden. Die physiologischen Wirkungen der sekundären Pflanzenstoffe, vor allem als komplexe Gemische in Form von Lebensmitteln, sind bisher nur ansatzweise bekannt. Aus unterschiedlichen experimentellen Systemen (*in vitro*, Tierexperiment, Interventionsstudien am Menschen) wurde für isolierte sekundäre Pflanzenstoffe eine Reihe von Wirkungen beschrieben. Hierzu zählen u.a. antioxidative, antikanzerogene, cholesterinsenkende sowie immunmodulierende Wirkungen. Inwieweit die sekundären Pflanzenstoffe durch die Lebensmittelverarbeitung in ihrer präventiven Wirkung (Hitzestabilität, matrixspezifische Bioverfügbarkeit, Bioaktivität) beeinflusst werden, ist nur teilweise erforscht.

Ein erhöhter Verzehr von Gemüse und Obst wird von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) sowie von weiteren internationalen und nationalen Institutionen im Bereich Gesundheit/Ernährung an erster Stelle der Ernährungsempfehlungen genannt. Für Deutschland liegt die Empfehlung der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE) für den täglichen Verzehr von Gemüse und Obst bei etwa 650 g. In der Praxis werden jedoch höchstens 2/3 davon erreicht. Vor diesem Hintergrund stellt die Formulierung neuer Lebensmittel (konventioneller wie funktioneller Lebensmittel) auf der Basis von Gemüse und Obst eine aktuelle

Entwicklung in der Lebensmittelindustrie dar, die zu einer Verbesserung der Ernährungssituation beitragen kann. Dabei stehen Convenience sowie ein nachweisbarer gesundheitlicher Zusatznutzen („Health Claim“) im Mittelpunkt der Produktentwicklung.

Lebensmittel mit Zusatznutzen sind nicht nur aus ernährungswissenschaftlicher Sicht, sondern auch aus ökonomischer Sicht von hoher Bedeutung. In den USA werden Wachstumsraten von 15-20% pro Jahr veröffentlicht. Die Zahlen in Deutschland sind vergleichbar.

Ziele und Projektübersicht

Ziel des Clusterprojektes „Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten Multikapselsystemen“ war es, in diesem innovativen Umfeld von hoher gesellschaftlicher Relevanz grundlegende Fragen zur Wirkung von pflanzenbasierten Lebensmittelextrakten im Vergleich zu daraus isolierten Inhaltsstoffgruppen aufzugreifen und ausgewählte, in der Literatur zurzeit diskutierte grundsätzliche Fragen zur biologischen Verfügbarkeit und Wirkung an einem Modell-Pflanzenextrakt exemplarisch zu bearbeiten.

Im Rahmen des Clusterprojektes wurde untersucht, ob es möglich ist, pflanzenbasierte bioaktive Stoffe, die außerhalb der natürlichen Milieubedingungen instabil sind, durch Mikroverkapselung zu stabilisieren und an gewünschten Stellen im Magen-Darm-Trakt wieder freizusetzen. Von Interesse war hierbei, ob es möglich ist, durch die Mikrostruktur des Verkapselungssystems den Freisetzungsort, die Freisetzungsrate und die Bioaktivität der Aktivstoffe zu beeinflussen.

Dazu wurde beispielhaft ein anthocyanhaltiger Wildheidelbeerenextrakt ausgewählt, der in vier unterschiedlichen Verkapselungssystemen eingebracht wurde. Die dafür entwickelten Formulierungen unterschieden sich im Aggregatzustand (fest/flüssig) sowie in der Löslichkeit, in der Größe und im Aufbau der schützenden Kompartimente (Hüll- bzw. Matrixkapsel, eine oder mehrere Hüllen, Hüllstruktur). Der darin eingebrachte Wildheidelbeerenextrakt sowie daraus isolierte biologisch aktive Fraktionen wurden zuvor ausführlich chemisch analysiert. Einflussfaktoren auf die Zusammensetzung des Extrakts wurden ebenfalls aufgezeigt. Für jede sich in der Strukturierungsart und Formulierungsform unterscheidenden Verkapselungstechnik wurde zunächst das Herstellungsverfahren erarbeitet und Strukturierungsmöglichkeiten aufgezeigt. Die Parameter zur Steuerung der Stabilität und der Auflösung (Ort, Rate) der Hüllen und des Matrixmaterials konnten identifiziert werden. Darüber hinaus wurden die Potenziale und die Grenzen der jeweiligen Mikroverkapselungssysteme und der Trägermaterialien aufgezeigt. Anschließend wurden die Bioverfügbarkeit sowie die biologische Wirkung des eingesetzten Extrakts und der Teilfraktionen – un- verkapselt sowie unterschiedlich verkapselt – biochemisch, physiologisch und toxikologisch *in vitro* untersucht.

Die Ergebnisse in der Übersicht

Im Rahmen von **Teilprojekt 1** konnten ausgewählte Teilfraktionen (Anthocyan-, Polymer- und Copigmentfraktionen) aus dem verwendeten, kommerziell erhältlichen Heidelbeerextrakt mittels einer neu entwickelten membranchromatographischen Methode erstmals hochrein isoliert und analytisch mittels HPLC-DAD-ESI-MS vollständig charakterisiert werden. Unbekannte Verbindungen in diesen Fraktionen wurden mittels HSCCC und präparativer HPLC isoliert und mittels NMR-Spektroskopie strukturell aufgeklärt. Die Teilfraktionen konnten zu Verkapselungszwecken sowie für biologische Studien und Untersuchungen im Rahmen der anderen Teilprojekte des Clusters genutzt werden. Ferner konnte die prozessinduzierte Ausbeutesteigerung wertgebender sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe bei der Herstellung von Säften und Extrakten von Wildheidelbeeren gezeigt werden. Die Anwendung der Technologien Ultraschall und gepulster elektrischer Felder führte sowohl bei einer Maischebehandlung als auch bei der Anwendung zum Aufschluss verbleibender Trester zu einer verbesserten Freisetzung sekundärer Pflanzenstoffe in Säften und Extrakten. Ein weiterer Schwerpunkt war die Untersuchung der Prozess- und Lagerstabilität von Anthocyanen in herkömmlichen Heidelbeerprodukten. Hierbei wurden insbesondere thermische Prozessschritte betrachtet und Thermokinetiken für den thermisch bedingten Abbau der Anthocyane erstellt. Für die Produkte Heidelbeerkonfitüre und Heidelbeersaft wurde beispielhaft eine umfassende Prozessanalyse inklusive der Erstellung von Temperatur-Zeit-Profilen des industriellen Herstellungsprozesses durchgeführt. Hierzu arbeiteten eine lebensmittelchemische und eine lebensmitteltechnologische Arbeitsgruppe eng mit Industriepartnern zusammen.

Erhaltene Extrakte und Fraktionen wurden in den **Teilprojekten 2 bis 5** in unterschiedliche Verkapselungssysteme eingebracht.

Hierzu wurden zunächst die kinetischen Parameter der Vernetzung von zur Verkapselung geeigneten, lebensmittelzugelassenen Träger- oder Grenzschichtmaterialien bestimmt. Zudem wurden die daraus resultierenden Strukturen sowie deren Auflösungsmechanismen und -kinetiken unter gastrointestinalen Bedingungen mittels moderner, dynamischer, physikalisch/mechanischer und kolloidchemischer Messmethoden analysiert (**Teilprojekt 2**). Diese Daten bildeten die Basis für die Auslegung der Verkapselungstechnologien. Stoff- und Prozessparameter zur Steuerung der Mikrostruktur der Kapselsysteme (Matrix- und Hüllkapseln) wurden von den technologischen/verfahrenstechnischen Arbeitsgruppen – basierend auf dem jeweiligen, unterschiedlichen Know-how der entsprechenden Arbeitsgruppen – erarbeitet (**Teilprojekte 2 bis 5**).

In **Teilprojekt 2** wurde ein speziell für die Lebensmittelanwendung zugelassenes Kapselmodellsystem im Größenbereich > 500 µm über die ionotrope Hydrogelbildung anionischer, natürlicher Polysaccharide mit Calciumionen mittels der Methode des Eintropfens entwickelt. Dieses Kapselsystem wurde hinsichtlich der mechanischen und elastischen Eigenschaften sowie der Membranper-

meabilität intensiv charakterisiert und optimiert. Bei externer Beschichtung mit Schellack mittels säureinduzierter Ausfällung bieten die Kapseln die Möglichkeit der effektiven Extraktstabilisierung und nachhaltigen Speicherung mit gezielter Darmfreisetzung durch die vollständige Lyse der Kapseln im schwach basischen pH-Bereich.

Im Rahmen des **Teilprojektes 3** wurde das Emulsionsverfahren zur Herstellung von Matrixkapseln im Größenbereich von 20-200 µm eingesetzt. Als Verkapselungsmatrix wurden thermisch induzierte, wasserunlösliche Hydrogele auf der Basis von Molkenproteinen eingesetzt. Zusätzlich wurde die Eignung lipidbasierter Matrices untersucht. Durch Ausnutzung des auf der Erzeugung einer W/O-Emulsion basierenden Herstellungsverfahrens konnte die Herstellung von Mikrokapseln in einem breiten Größenbereich gezielt gesteuert werden. Durch die Mikrokapseln konnte eine zeitabhängige Anthocyanfreisetzung und damit -stabilisierung im simulierten Intestinal-Milieu erreicht werden. Der dabei beobachtete anthocyanstabilisierende Effekt von nativen Molkenproteinen kann auch bei anthocyanhaltigen Milchprodukten durch eine gezielte Rezepturanpassung ausgenutzt werden und daher als Alternative zur Mikroverkapselung betrachtet werden.

Ein Stabilisierungssystem auf Basis von Doppelemulsionen wurde in **Teilprojekt 4** entwickelt. Die dabei entstehenden „Kapseln“ sind zum einen flüssig, zum anderen deutlich kleiner als typische „Kapseln“ und würden daher von Verbrauchern sensorisch nicht als Kapseln wahrgenommen werden. Der Extrakt wurde dabei in submikrone Tropfen eingebracht, die durch einen diese umgebenden und stabilisierenden Öltropfen „verkapselt“ wurden. Gezeigt wurde, unter welchen prozesstechnischen Voraussetzungen die Bioaktivstoffe ohne Verluste in das Stabilisierungssystem eingebracht und gelagert werden können. Als Parameter, die die Freisetzung der Aktivstoffe aus dem Formulierungssystem beeinflussen, wurde neben der Mikrostruktur (innere und äußere Tropfengrößenverteilungen) v.a. die Wahl des Emulgatorsystems identifiziert. Gezeigt werden konnte, dass W1/O/W2-Doppelemulsionen prinzipiell ein geeignetes Trägersystem für hydrophile bioaktive Substanzen wie Anthocyane darstellen, da diese Substanzen mittels des Trägersystems stabil bis in den Dünndarm transportiert und dort gezielt daraus freigesetzt werden können.

Im Rahmen von **Teilprojekt 5** wurden Verfahren zur Gewinnung anthocyanreicher Protoplasten als natürliche Farbcontainer entwickelt. Durch den Erhalt des Protoplasten konnten natürliche stabilisierende Mechanismen wie die Copigmentierung aufrecht erhalten werden. Des Weiteren wurden mikroverkapselte Carriersysteme für Anthocyane durch Sprühtrocknung und Granulation hergestellt. Diese festen Formulierungen wurden zum Schutz gegen eine frühzeitige Freisetzung *in vitro* und *in vivo* mit permeablen Coatingsystemen versehen. Die Stabilisierung der Bioaktivstoffe sowie die Freisetzungskinetik konnte durch eine Modifikation der Kapselmatrix mit wasserbindenden Hydrokolloiden verbessert

werden. Dieses Kapselsystem schützt die anthocyanhaltigen Extrakte vor einem vorzeitigen Abbau oder Resorption und ermöglicht eine Magenpassage.

Demzufolge war es möglich, einen weiten Bereich an Mikrostrukturen, Zusammensetzungen und Zugabe- bzw. Verabreichungsformen herzustellen, die einen stabilen Transport der hydrophilen bioaktiven Substanzen in den Darm ermöglichen. Der unterschiedliche Charakter der erzeugten Verkapselungssysteme und der modellhafte Ansatz erlaubt es, produktspezifische Anforderungen bei der Auswahl eines geeigneten Kapseltyps zu berücksichtigen und ermöglicht den Einsatz in unterschiedlichen Produktgruppen. Darüber hinaus bilden diese Systeme eine Grundlage für die gezielte Untersuchung von Bioverfügbarkeit und Bioaktivität hydrophiler, instabiler Bioaktivstoffe, welche eine Voraussetzung für chemische, toxikologische und physiologische Untersuchungen oder spätere Zulassungsverfahren ist. Am Beispiel des gewählten anthocyanhaltigen Extrakts konnte so die biologische Wirkung von in den Dünndarm transportierten Bioaktivstoffen untersucht werden. Dabei wurden auch die Wechselwirkungen zwischen dem Verkapselungssystem und den Bioaktivstoffen sowie deren Auswirkung auf die biologische Wirksamkeit betrachtet.

Dazu wurden die Freisetzung (Ort, Mechanismus und Rate) der bioaktiven Substanzen aus den unterschiedlichen Kapselsystemen sowie die biologische Wirkung der bioaktiven Inhaltsstoffe *in vitro* bestimmt (**Teilprojekt 4** (Max-Rubner-Institut), **Teilprojekte 6 und 7**). Zur Bestimmung der Freisetzung kamen neben konventionellen Testverfahren, wie dem Pankreatintest, auch neueste Messmethoden, wie Elektronen-Spin-Resonanzspektroskopie (ESR), die Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie (HPTLC) sowie die Asymmetrische Fluss-Feldflussfraktionierung (A4F) zum Einsatz, die bislang nur in der pharmazeutischen Forschung genutzt wurden (**Teilprojekt 6**). Basierend auf den Ergebnissen dieser Untersuchungen konnten die Projektpartner ihre Kapselsysteme optimieren.

In **Teilprojekt 7** konnte die stabilisierende Wirkung der Verkapselungssysteme nachgewiesen werden. Weitere Daten zur biologischen Wirkung wurden anhand ausgewählter zellulärer Signalparameter *in vitro* (oxidative DNA-Schäden, Glutathion-Status, Gehalt an reaktiven Sauerstoffspezies, Effekte auf Rezeptortyrosinkinasen und Topoisomerasen) gemessen. Die Untersuchungen zeigten, dass die Freisetzung des Heidelbeerextraktes und dessen biologische Wirkung durch Verkapselung moduliert werden kann. Abgesehen von der Wirkung auf den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) zeigten die meisten der untersuchten Endpunkte, dass die biologische Wirksamkeit des Extraktes durch die Einbringung in die strukturierten Kapselsysteme nicht substantiell vermindert wurde. Damit stellen diese Kapselsysteme eine Möglichkeit dar, bioaktive Stoffe zu stabilisieren, diese ohne Verluste durch die Magenpassage zu bringen und am Zielort – dem Dünndarm – mit gewünschter Kinetik freizusetzen, ohne dass die biologische Wirkung durch die Verkapselungsmaterialien maßgeblich beeinflusst wird.

Da mit diesen In-vitro-Systemen komplexe Mechanismen, wie Aufschluss und Bioverfügbarkeit im Organismus, nicht vollständig abgebildet werden können, sollen die Ergebnisse zu den Verkapselungssystemen in einer „Proof of concept“-Studie an humanen Probanden verifiziert werden. Daher wird ein Folgeprojekt mit dem Titel „Pilotstudie zur Bioverfügbarkeit und biologischen Aktivität von anthocyanreichen Heidelbeerextrakten in verkapselter und unverkapselter Form im Menschen“ (AiF 17039 N) von den beiden Forschungsgruppen des **Teilprojektes 7** seit Mai 2011 bearbeitet.

Wirtschaftliche Bedeutung

Die entwickelten Modellträgersysteme können wissenschaftlich dazu dienen, die Fragen der unterschiedlichen Wirkungen bioaktiver Inhaltsstoffe innerhalb und außerhalb natürlicher Umgebung gezielt zu hinterfragen. Ausgewählt wurde hierzu eine Stoffklasse aus dem Bereich der sekundären Pflanzenstoffe, die sowohl wegen ihres färbenden Charakters (Farbtöne im rot-blauen Spektralbereich) als auch ihrer bekannten positiven biologischen Wirkung von industriellem Interesse ist. Die grundsätzlichen Fragen, die sich dabei ergaben und die hier untersucht wurden, sind jedoch von allgemeingültiger Natur und können auch auf andere hydrophile Bioaktivstoffe übertragen werden.

Die entwickelten Formulierungen ermöglichten es damit erstmals, anthocyanhaltige Pflanzenextrakte stabil zu formulieren und in den Dünndarm zu bringen, um dort ihre biologische Wirkung zu untersuchen. So können nicht nur Daten zur Bioaktivität solcher Inhaltsstoffe überhaupt generiert, sondern auch unterschiedliche Formulierungssysteme hinsichtlich ihrer Sinnhaftigkeit beurteilt werden.

Die zur Beantwortung der wissenschaftlichen Fragen für die biologischen Wirkungsstudien entwickelten Trägersysteme stellen Prototypen von Modellträgerstoffen für bioaktive Inhaltsstoffe mit gezielt einstellbarer molekularer Struktur und modulierbarem Freisetzungverhalten (*smart capsules for triggered and controlled release*) dar. Alle eingesetzten Hilfsstoffe sind für den Einsatz in Lebensmitteln zugelassen und die technologischen Verfahren sind in der Lebensmittelindustrie eingeführt. Damit können die Ergebnisse von unterschiedlichen Branchen vor allem als Basis für die Entwicklung von funktionellen Produkten genutzt werden. Zielgruppen im Lebensmittelbereich sind damit primär die Entwickler von funktionellen Lebensmitteln; insbesondere – für die hier gewählten Inhaltsstoffe – die fruchtverarbeitende Industrie. Sekundäre Pflanzenstoffe sind sehr farbintensiv, so dass sich hier die Chance bietet, neben einem teilweise schon genutzten koloristischen Effekt auch einen belegbaren Zusatznutzen zu erzeugen. Vor dem Hintergrund der Diskussion über ein Zulassungsverbot für Azofarbstoffe ist die hier gewählte Stoffklasse von besonderem Interesse. Daneben werden aber auch die Hilfsstoffindustrie, und z. B. die Milchverarbeitende Industrie davon profitieren. Die besondere Bedeutung von minoren Milchbe-

standteilen – wie Milchproteinen – im Verdauungssystem, die mit diesem Clustervorhaben auch aufgezeigt wurde, bietet hier beispielsweise die Chance, ein innovatives Nischenprodukt zu erzeugen. Vertreter aller hier genannten Branchen fanden sich entsprechend im Projektbegleitenden Ausschuss.

Die Lebensmittelindustrie ist prinzipiell stark geprägt von kleinen und mittelständischen Unternehmen (KMU). 2010 wurde ein Umsatz von 150 Mrd. € von 5.900 Betrieben mit 544.000 Mitarbeitern erzielt, wobei 55 % der Betriebe weniger als 50 und 98 % der Betriebe weniger als 500 Mitarbeiter haben [BVE, FEI]. Dabei nimmt der Anteil an KMU bei Herstellern von Massenprodukten aufgrund der kleinen Deckungsbeiträge stetig ab, da diese nur unzureichend von ‚Economies of Scale‘ profitieren können. Stellvertretend soll hier das Beispiel der Milchwirtschaft aufgezeigt werden: Von 360 Unternehmen (1990) ging die Anzahl der Molkereien auf 135 (1999) bzw. 99 (2010) zurück. Gerade kleine und mittelständische Unternehmen sind daher verstärkt auf Nischenmärkte angewiesen. Der Bereich der funktionellen Lebensmittel mit höheren Deckungsbeiträgen und innovativen, nicht leicht zu kopierbaren Technologien bietet für diese Unternehmen eine besondere Chance. Dies spiegelte auch der hohe Anteil an projektunterstützten KMU im Projektbegleitenden Ausschuss wider. Die neue Health-Claim-Verordnung zwingt die Hersteller zu sehr aufwändigen Wirkungsnachweisen, die ein KMU alleine nicht tragen kann. Dieses Clustervorhaben konnte damit branchenübergreifend die betroffenen KMU bei den sich daraus ergebenden Fragestellungen unterstützen. Die Ergebnisse können den Unternehmen eine Chance geben, Wirkungsstudien zielführender und damit ökonomisch effizienter anlegen zu können.

Verkapselte bioaktive Inhaltsstoffe finden sich aber nicht nur in Lebensmitteln, sondern auch in kosmetischen und pharmazeutischen Produkten. Gründe für eine Verkapselung und ihre Auswirkung bei der Applikation am Menschen sind dabei die gleichen wie bei Lebensmitteln. Daher konnte dieses Clustervorhaben auch über die Lebensmittelbranche hinaus zur Wissensmehrung beitragen und von anderen Branchen im Bereich der Life Sciences genutzt werden. Auch dies spiegelte sich in der Zusammensetzung des Projektbegleitenden Ausschusses wider.

Aims and results of the cluster project (Summary)

Background

Numerous studies show that the selection of foods being consumed daily has a great impact on all essential metabolic processes. Further, it can decrease the risk for cardiovascular diseases and specific kinds of cancer. Being the most frequent causes of death, these clinical pictures involve a significant loss of quality of life and an increase of costs in the health care system. Therefore, the understanding of the pathogenesis and their prevention are of central social impact.

A reduced risk of illness is predominantly achieved through a diet that is rich in plant-based foods. Many epidemiological studies with both retrospective and prospective orientation identified 'vegetables and fruits' as a group of food whose consumption is highly correlated with a reduction of the risk of illness. Besides essential nutrients and fibers especially phytochemicals, which are bioactive ingredients from plant-based materials, were indicated as important preventive ingredients.

Due to their chemical structure phytochemicals can be divided into different classes in which carotenoids and flavonoids were intensively analyzed. Up to now, the physiological effects of phytochemicals, especially as complex mixtures occurring in foods, are only known to some extent. From different experimental systems (*in vitro*, animal experiment, human intervention studies) a series of effects was described. This includes amongst others antioxidative, anticarcinogenic, cholesterol-lowering as well as immune modulation effects. However, it is only partially researched to what extent the preventive effects of phytochemicals are influenced during food processing (heat stability, matrix-specific bioavailability and bioactivity).

An increased consumption of vegetables and fruits is the first priority of dietary recommendations by the World Health Organization (WHO) as well as by further international and national institutions in the health/nutrition sector. The German Nutrition Society (DGE) recommends a daily intake of 650 g of vegetables and fruits for Germany. However, in practice only 2/3 is achieved. In this context, the formulation of new foods (conventional as well as functional foods) based on vegetables and fruits constitutes a development in the food industry that can contribute to an improvement of the nutrition situation. Hereby, the focus of product development is on convenience as well as on a verifiable additional health benefit ('health claim').

Foods with additional health benefits are very important, not only from a nutritional but also from an economical point of view. In the USA, growth rates of 15-20 % per year are published. Figures in Germany are comparable.

Aims and project overview

In this innovative environment of high social relevance the focus of the cluster project 'Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten Multikapselsystemen/ Bioactive ingredients from micro-structured multiple capsule-formulations' was set on the effects of encapsulated plant-based food extracts in comparison to isolated/non encapsulated ones. Further, selected issues on the bioavailability and the biological effect – presently under discussion in literature – were investigated using a model plant extract.

For this purpose the otherwise labile plant-based bioactive substances had to be first stabilized by microencapsulation in order to allow for their stable incorporation into foods as well as to enable their triggered release at different locations in the human gastrointestinal tract. In this part, focus was set on influencing the release location and rate as well as the bioactivity of the active ingredients by the microstructure of the capsules.

Therefore, an anthocyanin-containing bilberry extract was chosen as exemplary active agent. The extract was formulated in four different encapsulation systems. The formulations evolved differed in their phase state (solid/liquid), solubility and in the size and composition of the protective compartments (core-shell capsules respectively matrix capsules, one or more cladding layers). Prior to this, the bilberry extract chosen as model plant extract as well as isolated bioactive fractions out of it were chemically analyzed extensively. Influencing factors on the extract composition were identified. The manufacturing process and structuring capabilities were shown for the different encapsulation techniques. Parameters governing the stability and dissolution (location, rate) of the cladding layers and the matrix materials could be identified. Moreover, the opportunities and limitations of the particular microencapsulation systems and carriers were shown. Afterwards, the bioavailability and biological effects of the non-encapsulated and differently encapsulated extracts and sub-fractions were analyzed biochemically, physiologically and toxicologically *in vitro*.

Overview of the results

In the context of **subproject 1**, high purity anthocyanin-, polymer- and copigment-fractions could be isolated from the used commercially available bilberry extract by a newly developed membrane chromatographic method for the first time. Further, they could be fully characterized by HPLC-DAD-ESI-MS. Unknown compounds from these fractions were isolated via HSCCC and preparative HPLC and their structures were elucidated via NMR spectroscopy. The sub-fractions could be used for encapsulation as well as for biological studies within the other partial projects of the cluster. In addition, a process induced increase in the yield of secondary plant metabolites in juices and extracts recovered from bilberry could be shown by application of ultrasound or pulsed electric field treatment.

A further focus was the investigation of the process and storage stability of anthocyanins in conventional bilberry products such as juice, jam, dried, frozen and canned fruits. Here, especially thermal processing steps such as cooking or pasteurization were evaluated and thermal kinetics for the thermal degradation of anthocyanins were generated. For the exemplary chosen products bilberry jam and juice a comprehensive process analysis was conducted, including the determination of temperature-time-profiles of the industrial production process. For this, a group of food chemists and food technologists cooperated closely.

Extracts and fractions received from **subproject 1** were incorporated into different encapsulation systems within **subprojects 2 to 5**.

Therefore, critical parameters for the cross-linking of food-grade carriers or interfacial materials, which are appropriate for encapsulation purposes, were determined at first. Further, resulting structures as well as their dissolution mechanisms and kinetics in gastrointestinal environment were analyzed by means of modern, dynamic, physical/mechanic and colloid chemical measuring methods (**subproject 2**). These data formed the basis for the design of the encapsulation technologies. Material and process parameters governing the microstructure of the capsule systems (matrix and core-shell) were developed by the technological/process engineering work groups, based on the individual, different know-how of the respective groups (**subprojects 2 to 5**).

In **subproject 2** a food-grade capsule model system in the size range $> 500 \mu\text{m}$ was developed by ionic cross-linking of anionic polysaccharides with calcium ions using the dropping method. These capsule systems were intensively characterized and optimized regarding the mechanical and elastic properties as well as the membrane permeability. Capsules that were externally coated with shellac via acid-induced precipitation offer the opportunity of effective extract stabilization, long-lasting storage as well as colon targeting by the complete lysis of the capsules at weakly alkaline pH.

Within the framework of **subproject 3** an emulsion method was used to prepare matrix capsules in the size range of $20\text{-}200 \mu\text{m}$. As matrix materials thermally induced water-insoluble whey protein hydrogels were used. Further, the suitability of lipid-based matrices was investigated. By utilization of the manufacturing processes based on the preparation of a W/O-emulsion the production of microcapsules in a broad size range could be specifically controlled. The microcapsules allowed for a time-dependent anthocyanin release and thus stabilization in simulated intestinal environment. The observed anthocyanin-stabilizing effect of native whey proteins can also be used in anthocyanin-containing milk products via a selected adjustment of recipe parameters. Thus, this can be seen as an alternative to microencapsulation.

A stabilization system on basis of double emulsions was developed in **subproject 4**. On the one hand the prepared 'capsules' are liquid, on the other hand they are considerably smaller than typical 'capsules'. Therefore, the consumer

wouldn't percept them sensorial. Thereby, the extract was incorporated into sub-micron droplets which were 'encapsulated' by a surrounding and stabilizing oil droplet. Process conditions were shown under which the bioactive ingredients can be incorporated into the stabilizing system and be stored without any measurable loss. Next to the microstructure (inner and outer droplet size distribution) especially the emulsifier systems were identified as parameters influencing the release of active substances from the formulation. It could be shown that $W_1/O/W_2$ -double emulsions represent an appropriate carrier for a stable transport of hydrophilic bioactive ingredients like anthocyanins into the small intestine where a targeted release is possible.

In the context of **subproject 5** processes for extracting anthocyanin-containing protoplasts as natural color containers were developed. Via the preservation of the protoplast natural stabilizing mechanisms like copigmentation could be maintained. Moreover, microencapsulated carrier systems for anthocyanins were prepared by means of spray drying and granulation. These solid formulations were covered with a permeable coating system in order to avoid an early release *in vitro* and *in vivo*. The stabilization of bioactive ingredients as well as the release kinetics could be improved by a modification of the matrix material with water retaining hydrocolloids. This capsule system protects the anthocyanin-containing extracts against an early degradation or resorption and enables for stomach passage.

Consequently, it was possible to prepare a broad range of microstructures, compositions and modes of application that allow for a stable transport of the hydrophilic bioactive substances to the intestine. Due to the different characteristics of the generated encapsulation systems and the exemplary approach it is possible to consider product specific requirements when choosing an appropriate capsule type. That enables the use in different product groups. Moreover, these systems are a basis for targeted bioavailability and bioactivity studies of hydrophilic, instable bioactive ingredients, which is a prerequisite for chemical, toxicological and physiological examinations or subsequent approval procedures. Using the example of the chosen bilberry extract the biological effect of bioactives transported to the small intestine could be analyzed. Thereby, interactions between the encapsulation system and the bioactive ingredients as well as their effects on the biological activity were examined. Therefore, the release (location, mechanism and rate) of the bioactive substance from different capsule systems as well as the biological effect of the bioactive ingredients *in vitro* was identified (**subproject 4** (Max-Rubner-Institut), **subprojects 6 and 7**).

Next to conventional test methods like the pancreatin test the release was determined by the newest analytical methods such as electron spin resonance (ESR), high performance thin layer chromatography (HPTLC) as well as asymmetrical flow field-flow fractionation (A4F) which were only used in pharmaceutical research up to now (**subproject 6**). Based on the results of these examinations the project partners could optimize their capsule systems.

In **subproject 7** the stabilizing effect of the encapsulation systems could be demonstrated. Further data on the biological effect were measured by selected cellular signal parameters *in vitro* (oxidative DNA damage, glutathione status, amount of reactive oxygen species, effect on receptor tyrosine kinases and topoisomerases). Analyses showed that the release of bilberry extract and its biological effect can be modulated by encapsulation. Apart from the effect on the epidermal growth factor receptor (EGFR) most of the analyzed endpoints showed that the biological effect of the extract is not substantially reduced by the incorporation into structured capsule systems. Thus, these systems represent an option to stabilize bioactive substances, transport them through the gastric passage and release them at the effective location in the small intestine with a desired kinetic. Herewith, the biological effects are not influenced by the encapsulation materials.

Since these *in vitro* systems cannot fully reflect complex mechanisms like pulsing and bioavailability in the organism the results of the encapsulation systems are to be verified in a 'proof of concept'-study at human subjects. Therefore, a follow-up project entitled '*Pilotstudie zur Bioverfügbarkeit und biologischen Aktivität von anthocyanreichen Heidelbeerextrakten in verkapselter und unverkapselter Form im Menschen*' has been carried out by the research groups of **subproject 7** since May 2011.

Economic significance

Scientifically the developed model carrier systems can be used to selectively analyze the different effects of bioactive ingredients within and outside of their natural environment. In this project, a substance class from the field of phytochemicals was chosen which is of industrial interest due to its coloring characteristics (colors in the red-blue spectral range) as well as its known positive biological effects. However, the basic questions analyzed in the frame of this project are general and can be adapted to other hydrophilic bioactive substances.

For the first time a stable formulation of anthocyanin-containing plant extracts and their stable transport to the small intestine was possible by means of the developed encapsulation systems. This offers the opportunity not only to generate data on the bioactivity but also to evaluate the different formulation systems with regard to their reasonability.

The carriers developed to enable systematic studies on the biological activity are prototypes of model carrier systems for bioactive ingredients with selectively adjustable molecular structure and modulated release kinetics ('smart capsules for triggered and controlled release'). All additives used are food grade and the technological processes are adapted in the food industry. Thus, the results can be used as basis for the development of functional products by different indus-

trial sectors. At first they are certainly interesting for additives used in the field of beverages and dairy products.

Consequently, potential target groups in the food sector are primarily the developers of functional food, especially the fruit processing industry for the ingredients chosen here. Phytochemicals are very color intensive allowing for the possibility to generate a provable additional effect next to the coloristic effect, which is already used. Against the background of a prohibition of azo dyes, the substance group chosen here is of great interest. Besides, industries producing additives and e.g. the dairy industry will benefit. The special significance of minor milk components like whey proteins in the digestive system, which have also been shown within this cluster project, offers the opportunity to produce an innovative niche product. Representatives of all named industrial sectors were part of the cooperating industry board.

The food industry is strongly influenced by small and medium-sized enterprises (SME). In Germany, 2010 a turnover of 150 billion euros was generated by 5,900 companies with 544,000 employees, at which 55 % of the companies had less than 50 and 98 % of the companies less than 500 employees [BVE, FEI]. However, the amount of SME in the field of mass products decreases steadily as they can insufficiently benefit from the 'economies of scale'. Here, the example of dairy farming will be shown. From 360 dairies (1990) the amount decreased to 135 (1999) respectively 99 (2010). Thus, especially SME rely on niche markets. The field of functional foods with higher profit contributions and innovative and unique technologies offers a special chance to SME. This is reflected in the high amount of project-supporting sme in the cooperating industry board. The new health claims regulation forces the producers to very extensive effect verifications which a SME cannot bear on its own. Hence, this project can support these companies efficiently. It enables them to design product-specific biological effect studies more purposeful and therefore economically more efficiently.

However, bioactive ingredients can not only be found in foods but also in cosmetic or pharmaceutical products. Reasons for an encapsulation and its effects on the application on humans are the same as for foods. Therefore, this cluster project could contribute to a knowledge enhancement beyond the food industry and could be used from other branches of life sciences. This can also be seen in the composition of the cooperating industry board.

Publikationen aus dem Clusterprojekt (Auswahl)*

- [1] Oidtmann, J., Schantz, M., Mäder, K., Baum, M., Berg, S., Betz, M., Kulozik, U., Leick, S., Rehage, H., Schwarz, K. & Richling, E.: Development and release characteristics of encapsulation systems for anthocyanins – a comparative study. *J. Agric. Food Chem.* (submitted).
- [2] Oidtmann, J., Frank, K., Noack, A., Schuchmann, H. P. & Mäder, K.: Pancreatic assay - in vitro digestion of W₁/O/W₂-Double emulsions. *Intern. Dairy J.* (in preparation).
- [3] Betz, M., Steiner, B., Schantz, M., Oidtmann, J., Mäder, K., Richling, E. & Kulozik, U.: Antioxidant capacity of bilberry extract microencapsulated in whey protein hydrogels. *Food Res. Intern.* (submitted).
- [4] Schantz, M., Mohn, C., Baum, M. & Richling, E.: Antioxidative efficiency of an anthocyanin rich bilberry extract in the human colon tumor cell lines Caco-2 and HT-29. *J. Berry Res.* 1, 25-33 (2010).
- [5] Schantz, M. & Richling, E., Anthocyane mit gesundheitlicher Wirkung. *High-Chem: Aktuelles aus der Lebensmittelchemie*, Kap. 3, 50-51 (2010).
- [6] Weidel, E., Schantz, M. & Richling, E.: Anthocyanin contents in blackcurrant (*Ribes nigrum L.*) juices and fruit drinks. *Fruit Proc.* 3, 102-107 (2011).
- [7] Müller, D., Schantz, M. & Richling, E.: HPLC analysis of anthocyanins in bilberries (*Vaccinium myrtillus L.*), blueberries (*Vaccinium corymbosum L.*) and corresponding juices. *J. Food Sci.* (2011) (in press).
- [8] Kropat, C., Schantz, M., Betz, M., Kulozik, U., Leick, S., Rehage, H., Marko, D. & Richling, E.: Impact of microformulation on the bioactivity of an anthocyanin rich bilberry extract in vitro. *J. Agric. Food Chem.* (in preparation).
- [9] Juadjur, A., Kropat, C., Schantz, M., Marko, D., Richling, E. & Winterhalter, P.: Fractionation and in vitro bioactivity study of an anthocyanin rich bilberry extract. *J. Agric. Food Chem.* (in preparation).
- [10] Schantz, M., Berg, S., Betz, M., Kulozik, U., Leick, S., Rehage, H., Schwarz, K. & Richling, E.: Studies investigating the intestinal release of anthocyanins from capsules loaded with a bilberry extract. *Gastroenterology Res. & Practice* (in preparation).
- [11] Frank, K., Engel, R., K., Schuchmann, H.P. & Schubert, H.: Emulsionen als Trägersysteme bioaktiver Inhaltsstoffe. 2. Aufl. (eds. Schuchmann, H.P. and Köhler, K.), Behr's Verlag, Hamburg (2012) (in press).
- [12] Frank, K., Köhler, K. & Schuchmann, H. P.: Stability of anthocyanins in high pressure homogenization. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.07.086, (2011); *Food Chem.* 130 (3), 716-719 (2012) (in press).
- [13] Frank, K., Köhler, K. & Schuchmann, H. P.: Formulation of labile hydrophilic ingredients in multiple emulsions: Influence of the formulation's composition on the emulsion's stability and on the stability of entrapped bioactives. *J. Disp. Sci. Technol.* 32, 1-6 (2011).
- [14] Frank, K., Leick, S., Skrebek, S., Köhler, K., Rehage, H. & Schuchmann, H. P.: Transfer of hydrophilic dyes from the water to the oil-phase of W/O-emulsions during emulsification. *Coll. Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* (2011) (submitted).
- [15] Frank, K., Walz, E., Gräf, V., Greiner, R., Köhler, K. & Schuchmann, H. P.: Stability of anthocyanin-rich W/O/W-emulsions in gastrointestinal environment. *J. Controll. Rel.* (in preparation).
- [16] Frank, K. & Schuchmann, H.P.: Verkapselung von Anthocyanen in submikronen Emulsionstropfen: Wechselwirkungen zwischen bioaktiven Inhaltsstoffen und Hilfsstoffen der Formulierung. *GVC-Jahrestagung, Mannheim, Chem.-Ing. Tech.* 81 (8), 1164 (2009).
- [17] Frank, K., Pietuch, M. & Schuchmann, H. P.: Verkapselung von Anthocyanen in submikronen Emulsionstropfen: Einfluss ausgewählter Emulgatorsysteme auf die Mikrostruktur von anthocyanhaltigen Doppemulsionen. *GVC-Jahrestagung, Aachen, Chem.-Ing. Tech.* 82 (9), 1471 (2010).
- [18] Betz, M. & Kulozik, U.: Microencapsulation of bioactive bilberry anthocyanins by means of whey protein gels. In: *Proc. 11th Intern. Congr. Engin. Food, ICEF 2011, Athens, Greece, 22.-26.05.2011*, 675-676 (2011).
- [19] Betz, M., Heidebach T. & Kulozik, U.: Endstation Dickdarm - Neuartige Milchprotein-Mikrokapseln als Wirkstoffvehikel. *Lab. & More* 2, 74-77 (2010).
- [20] Betz, M., Heidebach, T. & Kulozik, U.: Targeting the gut - Novel milk protein-based microparticles as vehicles for bioactive ingredients. *Lab. & More* 1, 34-37 (2010).
- [21] Betz, M. & Kulozik U.: Whey Protein Based Microparticles as Delivery Systems for Bioactive Compounds. *Proc. 13th Food Coll., Granada, Spain, 21.-24.3.2010*, 121 (2010).
- [22] Betz, M., Tolkach, A. & Kulozik, U.: Acidic whey protein gels for encapsulation of bioactive plant compounds. *5th Intern. Symp. Food Rheol. Structure, ISFRS 2009, Zürich, Schweiz, ISBN 978-3-905609-43-1*, 188-191 (2009).
- [23] Betz, M. & Kulozik, U.: Whey protein gels for the entrapment of bioactive anthocyanins from bilberry extract. *Intern. Dairy J.*, 21 (9), 703-710 (2011).

* Stand: November 2011

- [24] Berg, S., Bretz, M., Hubbermann, E.M. & Schwarz, K.: Influence of different pectins on powder characteristics of microencapsulated anthocyanins and their impact on drug retention of shellac coated granulate. *J. Food Engin.* Doi:10.1016/j.jfoodeng.2011.06.035 (2011).
- [25] Leick, S., Kemper, A. & Rehage, H.: Alginate/Poly-L-Lysine capsules: Mechanical properties and drug release characteristics. *Soft Matter* 7, 6684-6694 (2011).
- [26] Leick, S., Degen, P. & Rehage, H.: Rheological Properties of Capsule Membranes, *Chemie Ingenieur Technik* 83, 1140-1144 (2011).
- [27] Leick, S., Kott, M., Degen, P., Henning, S., Päsler, T., Suter, D. & Rehage, H.: Mechanical properties of liquid-filled shellac composite capsules. *Phys. Chemistry Chem. Phys.* 13, 2765-2773 (2011).
- [28] Frank, K., Hirth, M., Schuchmann, H.P., Flore, K., Engel, R., Ribeiro, H.S. & Walz, E.: Erhöhung der Bioverfügbarkeit funktionaler Inhaltsstoffe in Lebensmitteln durch Mikrostrukturierung von Emulsionen. *DMZ* 4, 24-28 (2009).
- [29] Schwarz, K.: Technologische Konzepte zur Anreicherung bioaktiver Lebensmittelinhaltsstoffe. Tagungsband 67. FEI-Jahrestagung 2009, 57-66 (2010).
- [30] Juadjur, A. & Winterhalter, P.: Development of a new membrane chromatographic method for fractionation and isolation of bilberry anthocyanins and polyphenols of other fruits. *J. Agric. Food Chem.* (submitted).

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)
Godesberger Allee 142-148 · 53175 Bonn
Telefon: 0228 – 37 20 31
Telefax: 0228 – 37 61 50
E-Mail: fei@fei-bonn.de

Weiterführende Informationen:
www.fei-bonn.de

Copyright ©2011
Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn

ISBN 978-3-925032-49-3

