

## Mikroverkapselung probiotischer Keime mittels enzymatisch induzierter Gelbildung von Milchproteinen

<b>Koordinierung:</b>	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
<b>Forschungsstelle I:</b>	Technische Universität München Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung Abt. Technologie Prof. Dr. U. Kulozik/Dr. P. Först/Dipl.-Ing. T. Heidebach
<b>Industriegruppe:</b>	Milchindustrie-Verband e.V. (MIV), Bonn
	Projektkoordinator: Dr. K. Hörstmann-Jungemann, Dr. August Oetker Nahrungsmittel KG, Bielefeld
<b>Laufzeit:</b>	2007 – 2009
<b>Zuwendungssumme:</b>	€ 257.500,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

### Ausgangssituation:

Der Einsatz von Probiotika zur Schaffung von Lebensmitteln mit funktionellem Zusatznutzen gewinnt in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung. Da probiotische Keime häufig sehr sensibel auf äußere Milieueinflüsse reagieren, stellt ein Aufrechterhalten der Vitalität und Funktionalität der Mikroorganismen die entscheidende technologische Herausforderung bei einem derartigen Einsatz dar. In diesem Zusammenhang gilt die Mikroverkapselung als viel versprechende Möglichkeit, die Überlebensraten von probiotischen Keimen während der Trocknung, über die gesamte Haltbarkeitsdauer des Produkts und beim Durchgang durch den Gastrointestinaltrakt nach dem Verzehr zu steigern. Die momentan eingesetzten Methoden zur Verkapselung von probiotischen Keimen, wie z.B. durch die Ausbildung von Ionenbrücken mittels Vertropfung von Na-Alginat in eine Ca<sup>2+</sup>-Lösung, weisen jedoch eine Reihe von Schwachstellen auf. Die Entwicklung alternativer Technologien ist daher von großem wirtschaftlichen Interesse.

Eine viel versprechende Strategie ist die Entwicklung von alternativen Mikro kapsel-Typen unter Verwendung von Milchproteinen als Matrixmaterialien anstelle von Polysaccharid-Matrices, da Milchproteine bekanntermaßen geeignete physiko-chemische Eigenschaften besit-

zen, um als Verkapselungsmaterial in der Lebensmittelindustrie eingesetzt werden zu können. Bisher existieren aber nur wenige veröffentlichte Ansätze zur Herstellung von wasserunlöslichen Kapselsystemen auf Milchproteinbasis, die sich für eine Verkapselung von lebenden Mikroorganismen eignen. Die Aggregation von Milchproteinkonzentraten wird in der Regel mittels Hitzebehandlung erzielt. Ein entscheidender Faktor für eine erfolgreiche Entwicklung von neuartigen Verkapselungssystemen auf der Basis von Proteinen, die sich auch für thermisch sensitive Kernmaterialien eignen, liegt somit im Verfestigungsschritt.

Ziel des Forschungsvorhabens war die Entwicklung und Erprobung neuer Technologien zur Mikroverkapselung von sensitiven Inhaltsstoffen mittels enzymatischer Gelbildung von Milchproteinen am Beispiel probiotischer Keime. Ein weiteres Ziel lag darin, mittels neuer Verkapselungstechnologien zu verbesserten Kapsel Eigenschaften in Bezug auf die Schutzfunktion gegenüber herkömmlichen Mikro kapseln zu gelangen.

### Forschungsergebnisse:

Im Rahmen des Projektes wurde die enzymatische Gelbildung als möglicher geeigneter Mechanismus untersucht, da verschiedene lebens-

mitteltaugliche Enzyme in der Lage sind, konzentrierte Proteinlösungen unter milden Prozessbedingungen in Gele umzuwandeln. Der erste Teil des Projektes umfasste somit die Entwicklung von zwei unterschiedlichen Verkapselungsprozessen zur Herstellung von Milchprotein-basierten Mikrokapseln für probiotische Mikroorganismen auf der Basis einer enzymatischen Gelbildung. Das Hauptziel einer Mikroverkapselung von Probiotika liegt in der Abschwächung der Verluste an Lebendkeimzahlen, die von der erstmaligen Zugabe der Keimkonzentrate zum Lebensmittel bis zur Ankunft im Darm unvermeidbar auftreten. Im zweiten Teil des Projektes wurde daher das Schutzpotential der entwickelten Protein-basierten Mikrokapseln gegenüber den wichtigsten schädigenden Einflussfaktoren untersucht.

Zu Beginn des Vorhabens wurde das Gelbildungsverhalten von mit Transglutaminase (Tgase) behandelten Caseinkonzentraten sowie kalt-eingelabten Magermilchkonzentraten mittels rheologischer Methoden mit dem Ziel untersucht, optimale Produkt- und Prozessparameter für die spätere Verkapselung zu finden. Die Ergebnisse zeigten, dass wässrige Na-Caseinat-Konzentrate, die mit probiotischen Zellkonzentraten gemischt wurden, durch Zugabe des Enzyms Tgase bei einer Proteinkonzentration von 13,5 % und 40°C innerhalb von einer Stunde kovalente Gele ausbilden. Ebenso konnte aus Mischungen von 35%igen rekonstituierten Magermilchkonzentraten mit Probiotika nach einem vorangegangenen Kalteinlabungsprozess über eine Stunde bei 4°C durch eine Erwärmung auf 40°C eine thermisch induzierte Gelbildung erzielt werden. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurden erfolgreich zwei auf dem W/O-Emulsionsverfahrenbasierende Verkapselungstechniken entwickelt, mit denen reproduzierbar sphärische Mikrokapseln gezielt mit mittleren Durchmessern im Bereich von 50 µm - 500 µm hergestellt werden können. Die untersuchten probiotischen Modell-Stämme waren *Lactobacillus paracasei* ssp. *Paracasei* F19 bzw. *Bifidobacterium Lactis Bb12*, die jeweils separat mit einer Kernbeladung von etwa  $5 \cdot 10^9$ - $10^{10}$  KBE/g Mikrokapseln verkapselt wurden.

Um den Einfluss des Verkapselungsprozesses auf die Wiederfindungsrate zu bestimmen, wurde eine Methode entwickelt, bei der die Kapseln mechanisch aufgeschlossen werden, ohne dabei die darin enthaltenen probiotischen Keime zu schädigen. Dabei konnte gezeigt werden, dass kein durch den Verkapselungsprozess be-

dingter signifikanter Lebendkeimzahlverlust auftritt, was auf die milde, enzymatische Gelbildung zurückzuführen ist. Im Anschluss an die erfolgreiche Prozessentwicklung wurde das Schutzpotential der Protein-basierten Mikrokapseln während der wichtigsten schädigenden Prozessschritte untersucht. Nach Inkubation im simulierten Magensaft bei pH 2,5 (37°C/90 min) konnte die Überlebensrate durch eine Verkapselung in Labinduzierte Mikrokapseln gegenüber unverkapselten Keimen (zugegeben als Protein-Keim-Mischung) um 0,8 log (F19) bzw. 2,8 log (Bb12) erhöht werden. Auch im Falle von Tgaseinduzierten Mikrokapseln führte eine Verkapselung nach Inkubation bei pH 2,5 bzw. pH 3,6 über 90 min je nach pH-Wert zu 2 log (F19) bzw. 1 - 3 log (Bb12) höheren Überlebensraten.

Während einer 4-wöchigen Lagerung in einem Modell-Sauermilchprodukt wurde die Überlebensrate von *Bifidobacterium Bb12* durch eine Verkapselung in Tgase-induzierte Mikrokapseln um 1 log erhöht und ca. 75 % der anfangs zugegebenen verkapselten Probiotika lagen noch in aktiver Form vor. Im Falle von Lab-induzierten Mikrokapseln konnte die Überlebensrate von *Bifidobacterium Bb12* von ca. 7 % auf ca. 30 % gesteigert werden. Eine zusätzliche Co-Verkapselung mit Stärke führte dabei zu keiner signifikanten Beeinflussung der Lebendkeimzahlen. Aus beiden Kapseltypen wurden nach 4 Wochen Lagerung im Modell-Sauermilchprodukt weniger als 1 % der Keime aus den Kapseln freigesetzt. Diese Ergebnisse waren im Einklang mit mikroskopischen Aufnahmen, die eine hohe physikalische Stabilität beider Kapseltypen auch über längere Lagerzeiten in sauren wässrigen Medien bestätigen.

In Untersuchungen zur Sensorik stellte sich heraus, dass Kapseln mit 110 µm mittlerem Durchmesser nach 1%iger Zugabe zu Joghurt von einem professionellen Panel nicht signifikant erkannt werden. Bei Untersuchungen zur Gefriertrocknung und anschließender Lagerung konnte gezeigt werden, dass bei Tgase-induzierten Mikrokapseln im Falle von *Bifidobacterium Bb12* während einer Lagerdauer von bis zu 4 Monaten generell eine Steigerung der Überlebensrate durch die Mikroverkapselung erzielt wurde. Bei einer Co-Verkapselung mit resistenter Stärke war der Schutzeffekt jedoch reduziert. Im Falle von *Lactobacillus F19* konnte dagegen generell kein verkapselungsbedingter Schutzeffekt gefunden werden. In einem abschließenden Versuch wurde der Einfluss einer

Verkapselung in Tgaseinduzierte Mikroapseln auf das Überleben von *Lactobacillus F19* nach Behandlung bei verschiedenen Temperatur-Zeit-Kombinationen untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass unter Pasteurisationsbedingungen (72°C/30 s) ein Schutzeffekt von ca. 2 Zehnerpotenzen erzielbar war. Allgemein zeigte sich, dass der Schutzeffekt umso geringer ausfällt, je intensiver die thermische Vorbehandlung einer Dauererhitzung ist.

Insgesamt konnte mit dem Projekt gezeigt werden, dass die enzymatische Gelbildung eine vielversprechende Methode darstellt, um Milchproteine für die Verkapselung von Probiotika verfügbar zu machen. Das Ziel einer Verkapselung von Probiotika ist, die sensitiven Zellen durch Schaffung einer physikalischen Barriere vor schädigenden Einflüssen zu schützen. Die Herstellung von Mikroapseln aus Milchprotein-konzentraten bietet die Möglichkeit zur Schaffung eines dichten Proteingelnetzwerkes, welches ein günstiges Mikromilieu für die darin verkapselten Keime darstellt und in einer Steigerung der Überlebensraten unter ungünstigen Bedingungen resultiert. Die Mikroverkapselung von Probiotika in Milchprotein-basierten Mikroapseln bietet somit einen vielversprechenden Ansatz für einen effektiveren Einsatz von Probiotika in Funktionellen Lebensmitteln.

#### Wirtschaftliche Bedeutung:

Der Umsatz Funktioneller Lebensmittel wird allein für Deutschland auf ca. 2,25 Mrd. € geschätzt. Bereits 2002 wurden ca. 2.000 verschiedene Funktionelle Lebensmittelprodukte aus 60 unterschiedlichen Warengruppen angeboten. Mit probiotischen Keimen angereicherte Milchprodukte stellen hierbei die anteilmäßig bedeutendste Produktgruppe in Europa dar. Der Umsatz im Bereich probiotischer Joghurts liegt bei ca. 250 Mio. €.

Der Einsatz mikroverkapselter Probiotika anstelle von gewöhnlichen Probiotika-Konzentraten kann einen wichtigen Beitrag liefern, um probiotische Produkte generell wirksamer zu machen und gleichzeitig ein größeres Verbrauchervertrauen in diese Produkte zu generieren. Die im Rahmen des Projektes entwickelten Mikroapseln eignen sich für einen direkten Einsatz in

Milchprodukten, da sie alle hierfür notwendigen Eigenschaften, wie ausreichend kleine Kapseln, Schutzpotential und Verdaubarkeit, aufweisen.

Eine direkte Umsetzung der entwickelten Herstellungsverfahren für Milchprotein-Mikroapseln im industriellen Maßstab dürfte realisierbar sein. Hierfür ist in etwa ein vergleichbarer prozesstechnischer und maschineller Aufwand erforderlich wie bei Standard-Fermentationsprozessen, d.h. aseptische, definierte Rührprozesse mit anschließendem Separationsprozess, was eine relativ gute Abschätzung von Kapazitäten und Kosten für eine industrielle Umsetzung ermöglicht.

#### Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2010.
2. Betz, M., Heidebach, T. und Kulozik, U.: Endstation Dickdarm – Neuartige Milchprotein-Mikroapseln als Wirkstoffvehikel. *Labor & More* 2, 74-77 (2010).
3. Heidebach, T., Först, P. und Kulozik, U.: Influence of casein-based microencapsulation on freeze drying and storage of probiotic cells. *J. Food Eng.* 98, 309-316 (2010).
4. Heidebach, T., Först, P. und Kulozik, U.: Microencapsulation of probiotic cells by means of rennet gelation of milk proteins. *Food Hydrocoll.* 7, 1670-1677 (2009).
5. Heidebach, T., Först, P. und Kulozik, U.: Mikroverkapselung von probiotischen Keimen. *Dt. Milchwirt.* 22, 864-866 (2009).
6. Kreuz, M., Kulozik, U.: Separation of glycosylated caseinomacropeptide at pilot scale using membrane adsorption in directcapture mode. *J. Chromat. A*, 12 (19) 50, 8771-8777 (2009).

#### Weiteres Informationsmaterial:

Technische Universität München  
Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittel-forschung, Abt. Technologie  
Weißenstephaner Berg 1, 85350 Freising  
Tel.: 08161/71-3535, Fax: 08161/71-4384  
E-Mail: ulrich.kulozik@wzw.tum.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)  
Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn  
Tel.: 0228/372031, Fax: 0228/376150  
E-Mail: fei@fei-bonn.de

... ein Projekt der **Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF)**

gefördert durch/via:

