

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

(Teilprojekt 4 im DFG/AiF Cluster 1)

Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)
Forschungsstelle:	Karlsruher Institut für Technologie (KIT) Institut für Bio- und Lebensmitteltechnik Bereich I: Lebensmittelverfahrenstechnik Prof. Dr. H. P. Schuchmann/Dipl.-Ing. K. Frank
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., Meckenheim Vereinigung zur Förderung der Milchwissenschaftlichen Forschung an der Technischen Universität München
Laufzeit:	2008 – 2011
Zuwendungssumme:	€ 269.650,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

Ausgangssituation:

Viele Früchte und Gemüsesorten enthalten einen hohen Anteil an bioaktiven Inhaltsstoffen, die sich positiv auf die menschliche Gesundheit auswirken. Vor allem Anthocyane und Polyphenole besitzen eine starke antioxidative und antikanzerogene Wirkung. Publierte Studien zeigen jedoch häufig, dass komplexe Lebensmittel eine höhere Wirkung aufweisen als daraus isolierte oder chemisch nachgestellte, einzelne Substanzen. Als mögliche Gründe werden eine ungenügende Stabilität der Moleküle außerhalb der natürlichen Mikroumgebung, unterschiedliche Freisetzungen im Magen-Darm-Trakt und molekulare Wechselwirkungen diskutiert.

Mikrostrukturierte multidisperse Kapselsysteme (sog. ‚smart capsules‘) auf Basis von multiplen Emulsionen ermöglichen es, bioaktive Inhaltsstoffe in unterschiedlichen Konzentrationen und Kombinationen in ein stabilisierendes Mikrokompartiment (Tropfen) einzubringen, mit einer

Schutzkolloidhülle aus Emulgatormolekülen und einer zweiten nicht-mischbaren Phase zu umgeben, und von dort aus wieder gezielt freizusetzen. Zudem können innerhalb einer Mikrokapsel Mikrokompartimente unterschiedlicher Zusammensetzungen und Umgebungsbedingungen realisiert werden. Gründe für die unterschiedliche Wirkung von Pflanzenextrakten und daraus isolierten Inhaltsstoffen können so gezielt systematisch untersucht werden. Der Einfluss der Mikrostruktur der Kapseln und Hüllschichten auf den Freisetzungsort („target release“) und deren Kinetik („controlled release“) müssen dazu bekannt sein.

Ziel des Forschungsvorhabens (Teilprojekt 4 im [DFG/AiF-Cluster „Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten Multikapselsystemen“](#)) war es, Techniken für die Mikroverkapselung bioaktiver sekundärer Pflanzenstoffe (hier am Beispiel von Blaubeerextrakt bzw. Kombinationen von isolierten Inhaltsstoffen daraus) in doppel-emulsionsbasierten, mikrostrukturierten Hüllkapseln

zu entwickeln und zu optimieren. Basierend auf bekannten Verfahren zur Herstellung von Doppemulsionen sollte systematisch untersucht werden, wie sich die Kapselstruktur (Anzahl und Größe der Tropfen), die Milieubedingungen in den inneren Tropfen, und die Mikrostruktur der Schutzkolloidhüllen (Dicke, Zusammensetzung, Vernetzungsgrad) auf die Stabilität und Freisetzung der bioaktiven Inhaltsstoffe auswirken.

Forschungsergebnis:

Im Rahmen des Forschungsvorhabens konnte nachgewiesen werden, dass es möglich ist, Anthocyane als beispielhaft ausgewählte hydrophile Bioaktivstoffe 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.

Während der Verkapselung des anthocyanhaltigen Heidelbeerextraktes sowie beim Einbringen der hydrophilen Farbstoffe Vitamin B12, Poly-R-478 und Brillantblau G 250 in W_1/O - oder $W_1/O/W_2$ -Emulsionen wurde ein Übergang von ursprünglich in der W_1 -Phase gelösten hydrophilen Molekülen in die umgebende Ölphase beobachtet. Dies kann einen entscheidenden Einfluss auf die Einschlusseigenschaften der Doppemulsionen haben. Gleichzeitig bietet dieses Phänomen neue Möglichkeiten bezüglich des Färbens lipophiler Phasen, z.B. in Lebensmittelanwendungen. Daher ist das Verständnis des zugrundeliegenden Mechanismus von großem Interesse. Im Rahmen des Projektes wurden deshalb 4 Hypothesen aufgestellt und untersucht, die eine Erklärung für den Übergang der hydrophilen Farbstoffmoleküle in die Ölphase während des Emulgierprozesses darstellen können. Es konnte schließlich gezeigt werden, dass das Löslichkeitsgleichgewicht bzw. der Verteilungskoeffizient in Zusammenhang mit der Größe der Grenzfläche eine plausible Erklärung für die beobachteten Phänomene darstellt. Begleitende Simulationen des Verteilungskoeffizienten unterschiedlicher Anthocyanidine sowie An-

thocyan glykoside mit COSMO-RS konnten die Versuchsergebnisse bestätigen.

Basierend auf der Kenntnis zur Anthocyanstabilität unter möglichen Prozessbedingungen 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 stabil (Messzeitraum im Projekt).

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 Bioaktivstoffe im Magen oder Dünndarm getriggert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass $W_1/O/W_2$ -Doppemulsionen 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 Bioaktivstoffen untersucht werden, was eine Voraussetzung für chemische, toxikologische und physiologische Untersuchungen oder spätere Zulassungsverfahren darstellt.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Von den Forschungsergebnissen profitieren die Hersteller von Blaubeer- aber auch anderen Pflanzenkonzentraten (Zusatzstoff-, Essenzenhersteller, Fruchtsaftindustrie). Die Inhaltsstoffe können aufgrund der Ergebnisse gezielt bioverfügbar verkapselt werden; erste Daten zur Freisetzung und biologischen Wirkung (*in vitro*) hierzu wurden bereits zur Verfügung gestellt. Davon werden insbesondere Hersteller von Funktionellen Lebensmitteln (Milchprodukten, Cerealien, diätetische Produkte, Nahrungsergänzungsmittel) profitieren. Da insbesondere Milchinhaltstoffe zur Verkapselung eingesetzt werden, öffnen sich hier der Milchverarbeitenden Industrie neue Marktchancen. Die Ergebnisse können prinzipiell auch auf ähnliche Inhaltsstoffe mit Bioaktivität übertragen werden. Damit ist eine übergreifende Ausstrahlung in die Kosmetik- und Pharmabranche denkbar.

Die entwickelten Modellträgersysteme sollten wissenschaftlich dazu dienen, die Fragen der unterschiedlichen Wirkungen bioaktiver Inhaltsstoffe innerhalb und außerhalb natürlicher Umgebung zu hinterfragen. Dazu wurde ein Beispiel aus dem Bereich der sekundären Pflanzenstoffe ausgewählt (Inhaltsstoffe der Wildheidelbeere). Die Ergebnisse sind damit primär natürlich von Herstellern und Nutzern von Heidelbeerextrakten zu nutzen. Die Wildheidelbeere steht dabei aber nur als Beispiel eines anthocyanhaltigen Produktes sowie eines Trägers von hydrophilen, instabilen Farbstoffen. Die Anthocyane, wie andere (meist färbende) sekundäre Pflanzenstoffe, werden von Herstellern konventioneller wie funktioneller Lebensmittel gerne wegen ihrer Farbwirkung eingesetzt. Eine zusätzliche gesundheitsfördernde Wirkung kann hier das Marktpotential deutlich erhöhen.

Verkapselungstechniken für bioaktive Hilfsstoffe für Lebensmittelanwendungen haben im Bereich der Funktionellen Lebensmittel eine hohe wirtschaftliche Bedeutung. In vielen Studien war die aus einem Gesamtextrakt der Pflanze nachgewiesene positive gesundheitliche Wirkung aber für die isolierten Fraktionen nicht mehr nachweisbar. Damit wird die Sinnhaftigkeit einer Zugabe isolierter Molekülfraktionen vermehrt wissenschaftlich kritisch diskutiert. Die Ergebnisse können daher hier grundlegende wissenschaftliche Unterstützung bei der Auswahl und Formulierung von gesundheitsfördernden Zusatzstoffen liefern. Die Verkapselung in mikrostrukturierten Systemen bietet zudem eine Möglichkeit, einer

möglichen Destabilisierung isolierter Inhaltsstoffe vorzubeugen und Einfluss auf deren Freisetzung im Magen-Darm-Trakt zu nehmen. Dies bietet damit eine Chance, Funktionen und Wirkungen sicherzustellen. Die Mikroverkapselung von Wirkstoffen ist daher in der pharmazeutischen Forschung schon weit verbreitet. Aufgrund der relativ hohen Herstellungskosten war sie der Lebensmittelbranche, die mit deutlich kleineren Margen rechnen muss, bislang nicht zugänglich. Sie gewinnt aber zunehmend an wirtschaftlicher Bedeutung. In der Analyse einer Unternehmensberatung über den europäischen Markt wurden für die Mikroverkapselungstechnologie die besten Wachstumsmöglichkeiten im Bereich der Lebensmittelindustrie gesehen. Die gewählte Emulgiertechnologie als Basis für das hier zu entwickelnde Mikroverkapselungsverfahren ist in der Lebensmitteltechnik gut bekannt und eingeführt. Es existieren auf dem Markt viele kommerzielle Hersteller für benötigte Anlagen (wie Hochdruckhomogenisatoren oder Rotor-Stator-Systeme). Viele dieser Anlagen werden bei möglichen Anwendern (Milch- und Fruchtsaftindustrie) bereits jetzt schon genutzt. Eine Umsetzung ist damit technisch und wirtschaftlich realisierbar. Damit können die durchgeführten Untersuchungen einen wichtigen Beitrag zur Nutzung der Mikroverkapselungstechnologie in der Lebensmittelbranche liefern.

Im Sinne einer Vorwettbewerblichkeit wurde ganz bewusst darauf verzichtet, ein breites Spektrum an bioaktiven Inhaltsstoffen oder auf Health Claims ausgelegte Humanstudien in die Untersuchungen mit einzubeziehen. Dies muss in folgenden, auf den Ergebnissen aufbauenden Arbeiten der Industrieunternehmen geleistet werden.

Profitieren werden von den Projektergebnissen Unternehmen, die ihre Produkte mit Blaubeerextrakt im Speziellen und Pflanzenextrakte im Allgemeinen anreichern. Eine nachgewiesene verbesserte Biofunktionalität bei verringerten benötigten Konzentrationen bringt zudem zusätzlichen ökonomischen Nutzen. Wegen der Matrixunabhängigkeit können bioaktive Inhaltsstoffe auch in Produkten eingesetzt werden, die bisher für sensitive Inhaltsstoffe als ungeeignet galten. Hierdurch ergibt sich die Möglichkeit, neue Produkte zu entwickeln. Experten schätzen, dass durch die Aufwertung von Lebensmitteln durch Anreicherung mit funktionellen Zusatzstoffen ein durchschnittlicher, verbraucherakzeptierter Preisaufschlag von 20 % umgesetzt werden kann. Neben den Unternehmen, die die

verkapselten Inhaltsstoffe wegen ihrer sensorischen oder biologischen Wirkung in Produkten als Zusatzstoffe einsetzen können, wird insbesondere die milchverarbeitende Industrie von den entwickelten multidispersen Hüllkapseln profitieren. Die besondere Bedeutung von minderen Milchbestandteilen, wie Milchproteinen, im Verdauungssystem, die mit diesem Vorhaben aufgezeigt und gezielt genutzt werden soll, ermöglicht es, aus einem Massen- ein Nischenprodukt zu erzeugen und neue Marktpotenziale zu eröffnen.

Auf dem deutschen Markt findet man sehr unterschiedliche Anbieter funktioneller Lebensmittel. Zwischen 2001 und 2002 wurde ihre Anzahl nach einem jährlichen Zuwachs von 20 % auf 500 Hersteller geschätzt. Diese boten insgesamt ca. 2.000 unterschiedliche Functional-Food-Produkte aus 60 verschiedenen Warengruppen an. Funktionelle Lebensmittel sind Nischenprodukte mit hohen Gewinnmargen. Vor allem für kleine und mittelständische Unternehmen, die im Bereich von Massenprodukten von Großanbietern zunehmend vom Markt gedrängt werden, ergibt sich hiermit die Chance, mit innovativen Produkten ihre Marktposition zu stärken. Fast 20 % aller Produktinnovationen im Zeitraum von 1999 bis 2001 waren Functional-Food-Produkte. 47 % davon wurden von KMU auf den Markt gebracht. Die neue Health-Claim-Verordnung zwingt die Hersteller jedoch zu sehr aufwändigen Wirkungsnachweisen, die ein KMU alleine nicht tragen kann. Dieses Projekt kann daher die betroffenen KMU bei den sich ergebenden Fragestellungen branchenübergreifend unterstützen. Die Ergebnisse können den Unternehmen die Möglichkeit geben, Wirkungsstudien zielführender und folglich ökonomisch effizienter zu gestalten.

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 kann dieses Forschungsvorhaben auch über die Lebensmittelbranche hinaus zur Wissensmehrung beitragen und von der kosmetischen wie pharmazeutischen Branche mit genutzt werden.

Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2011.
2. Schuch, A., Bernewitz, R., Frank, K., Wolf,

- F., Köhler, K. und Schuchmann, H.P.: Multiple Emulsionen im Buch Emulgiertechnik. Behr's Verlag, Hamburg, ISBN 978-3-89947-869-3, 351-373 (2012).
3. Frank, K.: Formulieren von Anthocyanen in Doppelemulsionen. Verlag Dr. Hut, München, ISBN 978-3-8439-0344-8, 238 (2012).
4. Frank, K., Walz, E., Gräf, V., Greiner, R., Köhler, K. und Schuchmann, H.P.: Stability of anthocyanin-rich W/O/W-emulsions designed for intestinal release in gastrointestinal environment. DOI: 10.1111/j.17509-3841.2012.02982.x, 77 (2), 50-57 (2012).
5. Frank, K., Engel, R., K., Schuchmann, H.P. und Schubert, H.: Emulsionen als Trägersysteme bioaktiver Inhaltsstoffe. 2. Aufl. (eds. Schuchmann, H.P. und Köhler, K.), Behr's Verlag, Hamburg, 978-3-89947-869-3, (2012).
6. Frank, K., Köhler, K. und Schuchmann, H. P.: Stability of anthocyanins in high pressure homogenization. Food Chem. 3, 716-719 (2012).
7. Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierter Multikapselsystemen - Zentrale Ergebnisse des gleichnamigen DFG/AiF-Clusterprojektes. (Hrsg. FEI). ISBN 978-3-925032-49-3 (2011).
8. Frank, K., Köhler, K. und 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).
9. Frank, K., Pietuch, M. und Schuchmann, H. P.: Verkapselung von Anthocyanen in submikronen Emulsionstropfen: Einfluss ausgewählter Emulgatorsysteme auf die Mikrostruktur von anthocyanhaltigen Doppelemulsionen. GVC-Jahrestagung, Aachen, Chem.-Ing. Tech. 82 (9), 1471 (2010).
10. Frank, K., Hirth, M. Schuchmann, H.P., Flore, K., Engel. R., Ribeiro, H.S. und Walz, E.: Erhöhung der Bioverfügbarkeit funktionaler Inhaltsstoffe in Lebensmitteln durch Mikrostrukturierung von Emulsionen. DMZ 4, 24-28 (2009).
11. Frank, K. und 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).

Weiteres Informationsmaterial:

Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
Institut für Bio- und Lebensmitteltechnik
Bereich I: Lebensmittelverfahrenstechnik
Kaiserstr. 12, 76128 Karlsruhe
Tel.: +49 721 608-2497
Fax: +49 721 69 43 20
E-Mail: heike.schuchmann@lvt.uni-karlsruhe.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)
Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn
Tel.: +49 228 3079699-0
Fax: +49 228 3079699-9
E-Mail: fei@fei-bonn.de

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

gefördert durch/via:



Das o. g. IGF-Vorhaben der Forschungsvereinigung Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI), Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn, wird/wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.