

## In-vivo-Untersuchungen der probiotischen Effekte von in Milchproteinen mikroverkapselten probiotischen Keimen

<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. Ulrich Kulozik/Prof. Dr. Petra Först
<b>Forschungsstelle II:</b>	Technische Universität München Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung Abt. Biofunktionalität Prof. Dr. Dirk Haller/Dr. Gabriele Hörmannspenger
<b>Industriegruppe:</b>	Bundesverband der Hersteller von Lebensmitteln für eine besondere Ernährung e.V. - Diätverband, Bonn
	Projektkoordinator: Prof. Dr. Detlef Gölling Organo Balance GmbH, Berlin
<b>Laufzeit:</b>	2010 – 2013
<b>Zuwendungssumme:</b>	€ 593.350,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

### Ausgangssituation:

Das Interesse der Verbraucher an Lebensmitteln mit gesundheitsförderndem Zusatznutzen, sog. „Functional Food“, ist sehr hoch. Die Zugabe von spezifischen gesundheitsfördernden Bakterienstämmen, Probiotika, ist eine weitverbreitete Strategie zur Generierung solcher Functional Foods. Bisher wurden meist fermentierte Produkte mit Probiotika angereichert, die Produktpalette wird aufgrund des hohen Marktpotentials aber kontinuierlich hin zu Non-Dairy-Produkten erweitert. Die Verabreichung von spezifischen reinen Probiotika führte bereits zu guten Erfolgen in der Prävention und Therapie akuter und chronischer Störungen des Gastrointestinaltrakts und des Immunsystems, wie Durchfall, Reizdarm, chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) oder atopischer Dermatitis. Das bedeutendste Einsatzgebiet für Probiotika in funktionellen Lebensmitteln ist in der Reduktion des Risikos für die Entwicklung moderner Zivilisationskrankheiten mit einer hohen Zahl an Betroffenen, wie z.B. Übergewicht, Herz-Kreislaufkrankungen, Reizdarmsyndrom und Diabetes, zu sehen. Die

Verfügbarkeit von funktionellen probiotischen Produkten in Supermärkten erscheint in diesem Zusammenhang als ein erfolgversprechender Ansatzpunkt. Auch diätetische funktionelle Lebensmittel, die auf Verbraucher mit bestimmten bekannten Risikofaktoren oder Erkrankungen zugeschnitten sind, stellen angesichts der Größe der Zielgruppe wirtschaftlich interessante innovative Produkte dar. So sind in Europa und in den USA mehr als 3,5 Mio. Deutsche vom CED betroffen.

Für die Wirksamkeit von Probiotika sind zwei Vorbedingungen entscheidend. Zum einen müssen die Bakterien den Wirkort (im Darm) in ausreichend hoher Anzahl und zum anderen in aktiver Form erreichen. Je nach der Identität der Wirkstruktur und des Wirkmechanismus sind somit zwingend metabolisch aktive, lebende Bakterien notwendig oder aber tote Bakterien mit aktiver Wirkstruktur ausreichend. Entscheidend für die probiotische Funktionalität ist somit die Höhe der probiotischen Aktivität, die wiederum in den meisten Fällen von der Anzahl an lebenden und metabolisch aktiven Bakterien ab-

hängig ist. Diese Vorbedingungen sind durch die Bedingungen in Lebensmitteln schwer zu realisieren. Zahlreiche Probiotika reagieren sensibel gegenüber den suboptimalen Milieueinflüssen während der Produktionskette sowie im Lebensmittel, so dass die Lebendkeimzahl bis zum Ende der Haltbarkeit des Lebensmittels meist drastisch reduziert ist. Die Lebendkeimzahl wird nach oraler Aufnahme durch die Magen/Dünndarmpassage meist weiter stark reduziert, so dass den Zielort im Darm nur noch ein sehr geringer Teil aktiver Probiotika erreicht. Auch aufgrund dieser Problematik besitzen viele der auf dem Markt erhältlichen probiotischen Produkte nur eine geringe Effektivität in Bezug auf ihre gewünschten und potenziell erzielbaren gesundheitsfördernden Eigenschaften. Die Aufrechterhaltung der Vitalität und vor allem der Funktionalität probiotischer Keime stellt daher eine große Herausforderung bei der Verwendung von Probiotika als funktionelles Additiv im Lebensmittel dar.

Ein Lösungsansatz zum Schutz der Probiotika und ihrer aktiven Strukturen liegt in der Mikroverkapselung. Während es im Bereich medizinischer Anwendungen für derartige Zwecke bereits maßgeschneiderte Matrices gibt, steht für einen Einsatz im Lebensmittelbereich aufgrund rechtlicher Bestimmungen nur eine begrenzte Anzahl potenzieller Matrixmaterialien für die Mikroverkapselung zur Verfügung. Für die Verkapselung von probiotischen Keimen im Lebensmittelbereich werden momentan meist Gele aus pflanzlichen Hydrokolloiden, wie z.B. Alginat oder  $\kappa$ -Carrageen, verwendet. Im Rahmen des IGF-Projektes AiF 15327 N wurden neuartige Mikrokapseltypen auf der Basis von Milchproteinen entwickelt, die mittels Emulsionstechnik hergestellt wurden. Dabei hat sich gezeigt, dass diese Milchproteingel-basierenden Mikrokapseln eine vielversprechende Alternative zu den meist eingesetzten Polysaccharid-basierenden Kapselmatrices darstellen, da sie neben der Barrierefunktion durch zusätzliche puffernde Eigenschaften der Matrix Schutz bei tiefen pH-Werten im Magen liefern können und sie im Darm aufgeschlossen und verdaut werden, was bei Polysaccharidkapseln nicht immer der Fall ist. Der Schutzeffekt der Mikroverkapselung wurde allerdings bisher, unabhängig vom Kapseltyp, überwiegend *in vitro* und ausschließlich in Bezug auf die Überlebensrate, nicht jedoch auf die eigentlich entscheidende Komponente, die Funktionalität der Probiotika, untersucht. Ziel des Forschungsvorhabens war daher die Etablierung und Optimierung verschiedener Mikroverkapse-

lungen auf Milchproteinbasis sowie die Untersuchung der Effekte dieser Mikroverkapselungen auf die probiotische Funktionalität *in vivo*.

#### Forschungsergebnis:

Zur Mikroverkapselung wurden zwei verschiedene Milchproteinmatrices, Natriumcaseinat (NaCas) und Labgel eingesetzt. Zum einen wurden mittels Emulsionsverfahren Kapseln aus beiden Materialien nach den im IGF-Projekt AiF 15327 N etablierten Methoden untersucht. Zum anderen wurden zwei neue Verfahren zur Mikroverkapselung der Probiotika entwickelt, wobei es sich um ein Sprühtrocknungsverfahren zur Erzeugung wasserunlöslicher Labgelmikrokapseln sowie um einen weiterentwickelten Emulsionsprozess, durch den die NaCas-Kapseln zusätzlich mit einer Fettschicht überzogen werden, handelt. Von diesen Kapseltypen wurde der Einfluss von verschiedenen Prozess- und Produktparametern, wie Temperatur, Kapselgröße, Matrixdichte etc. hinsichtlich der Effekte auf die probiotische Vitalität untersucht. Als Modellsystem für die probiotische Funktionalität wurde die entzündungshemmende Wirkung von *Lactobacillus paracasei* VSL#3 (*L.p* VSL#3) bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) genutzt. Die probiotische Funktionalität hängt in diesem Fall sowohl von der probiotischen Vitalität als auch von der probiotischen Aktivität ab. Im Kontext der in dem vorliegenden Projekt untersuchten Entzündungshemmung durch *L.p* VSL#3 handelt es sich bei der probiotischen Aktivität um den Abbau des entzündungsfördernden Chemokins IP-10 durch die probiotische Protease Lactocepin. Um die Effekte der verschiedenen Verkapselungen auf die probiotische Funktionalität zu untersuchen, wurden zunächst die Effekte der Verkapselungsprozesse auf die Vitalität und Aktivität der Probiotika *per se* untersucht. In einem weiteren Schritt wurde die Schutzwirkung der verschiedenen Verkapselungstypen unter Lagerbedingungen sowie im simulierten Magensaft untersucht. Darauf aufbauend wurde das Auflösungsverhalten der verschiedenen Kapseln sowie die Schutzwirkung dieser Verkapselungstypen auf die bakterielle Vitalität nach der oralen Aufnahme durch einen lebenden Organismus, der Maus, untersucht. Die Effekte der beiden etablierten und optimierten Emulsionskapseltypen (NaCas und Labgel) auf die probiotische Funktionalität von *L.p* VSL#3 wurden in je einem Mausmodell für chronische Dünndarm- sowie für chronische Dickdarm-entzündung untersucht.

Es konnten erfolgreich neue Prozesse zur Verkapselung von Probiotika durch Sprühtrocknung sowie neue Fett-Protein-basierte Emulsionskapseln etabliert werden. Es konnte gezeigt werden, dass es durch diese neu entwickelten sowie durch die bereits etablierten Verkapselungsprozesse per se zu keinen negativen Effekten auf die Vitalität und die Aktivität der Probiotika kommt. Bei den sprühgetrockneten Kapseln konnte der Einfluss von variierender Trocknungstemperatur und Feedtrockenmasse auf die bakterielle Vitalität charakterisiert werden und gleichzeitig nachgewiesen werden, dass bei schonenden Sprühtrocknungsbedingungen keine negativen Effekte auf die Aktivität von *L.p* VSL#3 vorhanden sind. Bei Lagerversuchen zeigte sich eine erhöhte Stabilität der verkapselten Probiotika, wobei die Überlebensrate der durch die Sprühtrocknung stärker vorgestressten Bakterien während der Lagerung höher war als die der bei schonenden Trocknungsbedingungen verkapselten Bakterien. Auch bei NaCas- und Labgelverkapselung durch Emulsionstechnik konnte eine verbesserte Stabilität der verkapselten Bakterien im Vergleich zu der unverkapselten Referenz unter definierten Lagerbedingungen nach einer Gefriertrocknung aufgezeigt werden. Für die Emulsionskapseltypen wurde in vitro eine gute Schutzwirkung im Hinblick auf den Erhalt der Vitalität im simulierten Magensaft festgestellt, obwohl die Stabilität der Kapsel aufgrund des Enzyms Pepsin nicht über die gesamte Inkubationsdauer von 90 min gewährleistet werden konnte. Der beobachtete Schutzeffekt konnte für die NaCas-Emulsionskapseln durch Erhöhung der Matrixdichte verbessert werden. Durch die Weiterentwicklung der NaCas-Kapseln zu Doppemulsionskapseln mit zusätzlicher Fettschicht zeigte sich eine deutlich verbesserte Magensaftstabilität gegenüber den einfachen NaCas-Kapseln. Die anschließenden In-vivo-Untersuchungen des Auflösungsverhaltens der verschiedenen Mikro kapseln im Mausmodell zeigten, dass sich die nicht-gecoateten Kapseltypen bereits im Magen vollständig auflösen, wohingegen ein geringer Anteil der Fett-gecoateten Kapseln den Dünndarm erreicht. Die Untersuchung der Schutzwirkung der verschiedenen Kapseltypen auf die bakterielle Vitalität in kolonisierten Mäusen zeigte, dass es durch die Verkapselung zu keinem verbesserten Überleben gegenüber frei verfütterten Bakterien kommt. Die Untersuchung der Schutzwirkung der NaCas-Verkapselung auf die Vitalität von *L.p* VSL#3 in keimfreien Mäusen zeigt, dass es durch diese Verkapselung zu einer verlangsamten Magenpassage von *L.p* VSL#3, und in der Konsequenz sogar zu einer

reduzierten Keimzahl an *L.p* VSL#3 im Gastrointestinaltrakt der Maus kommt. Die Fütterungsexperimente in den CED-Mausmodellen zeigen, dass es weder durch die NaCas-, noch durch die Labgelverkapselung zu einem positiven Effekt auf die probiotische Funktionalität von *L.p* VSL#3 (Entzündungshemmung) kommt.

Die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen demonstrieren, dass die Emulsionskapseltypen sowie die sprühgetrockneten Kapseln sinnvoll zum Erhalt der probiotischen Vitalität unter Lagerbedingungen eingesetzt werden können. Die schonende Sprühtrocknung von *L.p* VSL#3 führt zudem nachweislich zu keiner Reduktion der probiotischen Aktivität, so dass dieser Verkapselungsprozess in Kombination mit diesem spezifischen probiotischen Keim unproblematisch angewandt werden kann. Für eine Erhöhung der Säure- und Verdauungsenzymresistenz in vitro erwies sich das Fett-Coating von NaCas-Kapseln als gute Möglichkeit. Die durchgeführten Untersuchungen im Mausmodell zeigen klar auf, dass es im Vergleich zu den In-vitro-Experimenten durch die untersuchten Verkapselungen zu keinem positiven Effekt auf die bakterielle Vitalität oder die probiotische Funktionalität im lebenden Organismus kommt. Die hier beobachtete deutliche Diskrepanz zwischen den Ergebnissen unter simulierten Bedingungen und den Ergebnissen im lebenden Organismus ist von entscheidender Bedeutung für die zukünftige Vorgehensweise bei der Untersuchung der Schutzeffekte von Mikroverkapselungen auf die probiotische Vitalität und Funktionalität. Die Ergebnisse des vorliegenden Projekts zeigen klar, dass die Ergebnisse aus Studien mit simulierten Gastrointestinal-Bedingungen grundsätzlich sehr vorsichtig interpretiert werden müssen und dass für eine belastbare Aussage zu den Schutzeffekten von Mikroverkapselungen auf die probiotische Vitalität und Funktionalität in jedem Fall In-vivo-Experimente in einem adäquaten Modellorganismus, wie z. B. dem Schwein, notwendig sind.

#### **Wirtschaftliche Bedeutung:**

Das Forschungsvorhaben lieferte grundlegende, systematische Erkenntnisse zu der technologisch-verfahrenstechnischen Realisierung der Mikroverkapselung auf Milchproteinbasis sowie zu den in vitro und in vivo erzielbaren Schutzeffekten verschiedener Mikroverkapselungen auf Milchproteinmatrices auf die probiotische Vitalität und Aktivität. Die Ergebnisse des Projekts

sind von zentraler Bedeutung für die zukünftige Entwicklung von Probiotika-basiertem Functional Food sowie für die Entwicklung von Mikroverkapselungen für den Lebensmittelbereich.

Der Umsatz funktioneller Lebensmittel wird in Deutschland auf jährlich 2,25 Mrd. € mit stark steigender Tendenz geschätzt. In Deutschland werden ca. 2.000 verschiedene Functional-Food-Produkte aus 60 unterschiedlichen Warengruppen angeboten. Mit probiotischen Keimen angereicherte Milchprodukte stellen hierbei die anteilmäßig bedeutendste Produktgruppe im Bereich Functional Food in Europa dar. Die deutsche Milchindustrie erwirtschaftet mit über 160 Betrieben und ca. 30.000 Mitarbeitern einen Gesamtjahresumsatz von 21,1 Mrd. €. Ein Großteil der Unternehmen dieser Branche sind mittelständische Betriebe, die von den forschungsinintensiven Ergebnissen des vorliegenden Projekts in besonderer Weise profitieren. Die Ergebnisse sind wegweisend für die zukünftige Entwicklung und Untersuchung von pro-biotischen Mikroverkapselungen in der Lebensmittelindustrie.

#### Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2013.
2. Würth, R., Stier, S. und Först, P.: Mikroverkapselung von Probiotika in Milchproteinmatrices mittels Sprühtrocknung. Jahresbericht Milchwiss. Forsch. ZIEL Weihenstephan, ISBN 973-3-939182-43-6, 84-86 (2012).
3. Först, P., Würth, R. und Kulozik, U.: Mikroverkapselung und Trocknung von Probiotika und Starterkulturen. Biospektr. 18 (6), 676–678. (2012).

#### Weiteres Informationsmaterial:

Technische Universität München  
Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittel-  
forschung, Abt. Technologie  
Weihenstephaner Berg 1, 85350 Freising  
Tel.: +49 8161 71-3535  
Fax: +49 8161 71-4384  
E-Mail: ulrich.kulozik@wzw.tum.de

Technische Universität München  
Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittel-  
forschung, Abt. Biofunktionalität  
Am Forum 5, 85350 Freising  
Tel.: +49 8161 71-2026  
Fax: +49 8161 71-2824  
E-Mail: haller@wzw.tum.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)  
Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn  
Tel.: +49 228 3079699-0  
Fax: +49 228 9079699-9  
E-Mail: fei@fei-bonn.de

Der Schlussbericht ist für die interessierte Öffentlichkeit bei den Forschungsstellen abzurufen.

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

gefördert durch/via:

