

## Hochporöse Aerogelpartikel aus Protein als Trägermatrix für sensitive und sensorisch störende Stoffe in Lebensmitteln

<b>Koordinierung:</b>	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
<b>Forschungsstelle I:</b>	Technische Universität München Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung Abt. Technologie, Freising-Weihenstephan Prof. Dr. Ulrich Kulozik/Dipl.-Ing. Christian Kleemann
<b>Forschungsstelle II:</b>	Technische Universität Hamburg-Harburg Institut für Thermische Verfahrenstechnik Prof. Dr. Irina Smirnova/M.Sc. Ilka Selmer
<b>Forschungsstelle III:</b>	Technische Universität Hamburg-Harburg Institut für Feststoffverfahrenstechnik und Partikeltechnologie Prof. Dr. Stefan Heinrich/M.Sc. Monika Goslinska
<b>Industriegruppen:</b>	Bundesverband der Deutschen Eiprodukten-Industrie e.V. (BVEP), Bonn Vereinigung zur Förderung der Milchwissenschaftlichen Forschung an der TUM e. V., Freising
	Projektkoordinator: Dr. Nadja Siegert Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
<b>Laufzeit:</b>	2013 – 2016
<b>Zuwendungssumme:</b>	€ 524.250,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

### Ausgangssituation:

In der Lebensmittelindustrie besteht Bedarf an Transport- bzw. Schutzmatrices für sensitive Substanzen, die vor Umgebungseinflüssen geschützt bzw. für sensorisch störende Stoffe, die maskiert werden müssen. Die Anforderungen an die in diesen Bereichen verwendeten Matrices sind eine hohe Biokompatibilität, eine gute biologische Abbaubarkeit sowie die Tauglichkeit für den humanen Konsum. Diesen Anforderungen werden Gele aus Hydrokolloiden, wie Proteine, in hohem Maße gerecht. Bisher bekannte Verfahren des Verkapselns sensitiver Inhaltsstoffe in Milchprotein-Hydrogelen weisen jedoch eine eingeschränkte Beladungskapazität auf, weil hier die Zugabe des Kernmaterials vor der Gelbildung erfolgt und durch dessen Konzentration stark beeinflusst werden kann. Im Gegensatz dazu können Aerogelsysteme nach

vollständig abgeschlossener Gelbildung beladen werden und die Gelbildung somit uneingeschränkt von Sensitivität und Konzentration des Kernmaterials ablaufen.

Vorarbeiten zeigten, dass Protein-Hydrogele erfolgreich in eine Aerogelform überführt werden können. Während bei Trocknung unter Umgebungsbedingungen sowie bei der Gefriertrocknung der Strukturverlust wegen unvermeidbarer Spannungen (Schrumpfen, Zerbrechen) in der Matrix sowie das Bereitstellen von großen adsorptiven Oberflächen unüberwindbare Limitierungen aufweisen, kann bei der überkritischen Trocknung die Struktur des Gels mit extrem hoher innerer Oberfläche (bis 500 m<sup>2</sup>/g) bewahrt werden. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass die erreichbare Konzentration des Kernmaterials bei einer adsorptiven Beladung wegen der großen inneren Oberfläche in Aerogelsystemen wesentlich höher ist als in Hydro-

gelen oder gefriergetrockneten Proben. Bei der überkritischen Imprägnierung mit einem Modellwirkstoff konnte eine Beladungskapazität von 9,1 % (w/w) festgestellt werden, wohingegen bei gefriergetrockneten Cryogelen maximal 0,4 % (w/w) Ketoprofen adsorptiv gebunden wurden. Die für die Beladung notwendige Stabilität des Kernmaterials in überkritischem CO<sub>2</sub> ist auch für Substanzen wie Fischöl und Coffein gegeben und konnte selbst für solche Stoffe wie Enzyme belegt werden.

Ziel des Forschungsvorhabens war die Entwicklung einer Basistechnologie zur Herstellung von biokompatiblen, lebensmitteltauglichen Aerogelen auf der Basis von Proteinen als Matrices zur Verkapselung sensitiver oder sensorisch störender Stoffe. Als Modellsubstanzen wurden hierbei Fischöl (enthält mehrfach ungesättigte  $\omega$ -3-Fettsäuren) und Ascorbinsäure (Vitamin C) eingesetzt. Es sollten die Verfahrensabläufe in Wechselwirkung mit unterschiedlichen Proteinmatrices soweit verstanden werden, dass Aerogele als Verkapselungssysteme mit unterschiedlichen Eigenschaften für eine Vielzahl unterschiedlicher Stoffe angewendet werden können. Es sollte ein Verfahren entwickelt werden, dass eine Beschichtung dieser besonders leichten und kleinen Partikel zulässt und dabei deren inhärente Eigenschaften erhält sowie den Schutzeffekt und die kontrollierte Freisetzung verbessert.

### Forschungsergebnisse:

Die Struktur von hitzedenaturierten Proteingelen aus Molkenproteinisolat (WPI) und Eiklar (EWP) wird insbesondere durch eine Variation des pH-Wertes bei der Gelbildung stark beeinflusst. Untersuchungen der Hydrogele mit einem Oszillationsrheometer und einem Texture Analyzer haben gezeigt, dass dabei entscheidend ist, ob der pH-Wert im sauren oder alkalischen Bereich sowie in der Nähe des isoelektrischen Punktes (IEP) liegt. Am IEP kommt es durch die hydrophoben Wechselwirkungen der elektrisch neutral erscheinenden Proteine zu starker Aggregatbildung. Die Proteine lagern sich schnell und ungeordnet aneinander. Das gebildete Gel ist damit sehr weich, wenig strukturstabil und zeigt starke Synärese. Derselbe Effekt wird beobachtet, wenn die Ionenstärke in der Lösung erhöht wird und damit die Ladungen der Proteine abgeschirmt werden. Im Säuren zeigen die Proteine eine positive Nettoladung. Das Gel bildet sich weniger schnell, dafür aber strukturiert, da elektrostatische Absto-

ßungskräfte eine spontane Aggregation verhindern. Die Gele erscheinen deutlich fester, sind aber ebenfalls wenig strukturstabil. Im Alkalischen führen die negativen Nettoladungen der Proteine ebenfalls zur Bildung geordneter Stranggele. Bei hohen pH-Werten kommt es zudem zu Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen. Die gebildeten Gele sind transparent und können stark deformiert werden, bevor die Struktur irreversibel zerstört wird. Natrium-Caseinatlösungen (NaCas) wurden zur Herstellung von Aerogelen enzymatisch quervernetzt. Eine Erhöhung der Proteinkonzentration führte dabei zu einer höheren Ruhestrukturstärke und Gelfestigkeit.

Eine an Forschungsstelle 1 etablierte Methode wurde genutzt, um Protein-Mikropartikel herzustellen. Durch Emulgieren der wässrigen Phase (Proteinlösung) in eine Ölphase (Sonnenblumenöl) werden kleine Tropfen gebildet, die durch Erhitzen oder enzymatische Quervernetzung in den Gelzustand überführt werden. Der Versuchsaufbau konnte so angepasst werden, dass über 60 % der Partikel in dem für die Aerogelpartikel angestrebten Partikelgrößenbereich von 50 bis 100  $\mu$ m lagen. Das erforderliche Abtrennen der Mikrokapseln aus der Ölphase der Emulsion erfolgt durch Zentrifugation. Durch Zugabe einer wässrigen Phase und erneutes Zentrifugieren können die Mikropartikel als ölfreies Sediment gewonnen werden. Salzlösungen mit NaCl oder CaCl<sub>2</sub> als wässrige Phase reduzieren zwar eine eventuell auftretende Quellung, führen aber zur Aggregatbildung. Die Abtrennung mit Wasser zeigt zudem keine nachteiligen Effekte auf die Eigenschaften der Aerogele. Ein Scale-up der Emulsionsmethode wurde entwickelt und ermöglicht das Herstellen größerer Probenmengen.

Um eine überkritische Trocknung der Hydrogele durchführen zu können, muss das in den Gelen enthaltene Lösungsmittel Wasser gegen Ethanol, das in CO<sub>2</sub> löslich ist, ausgetauscht werden. Durch Ethanol werden bei Proteinen Veränderungen der Sekundärstruktur hervorgerufen. Eine Untersuchung der Härte (TPA-Messung) sowie der Bruchfestigkeit der resultierenden Alcogele am Texture Analyzer hat gezeigt, dass auch die Proteinhydrogele durch Ethanol verändert werden. Unabhängig von Proteinart und Gelbildungsparametern wurden die Gele deutlich härter, zugleich wurde ein Schrumpfen beobachtet. Es wird angenommen, dass die Struktur der Gele grundsätzlich erhalten bleibt, diese aber komprimiert wird.

Alle aufgeführten Gelvarianten wurden erfolgreich je nach Größe der Gele innerhalb von 2-24 h überkritisch getrocknet. Bei der Gelierung von EWP nahe des IEP ergeben sich makroporöse Strukturen, die geringe Oberflächen aufweisen. Bei sehr hohen und niedrigen pH-Werten ergeben sich mesoporöse Strukturen mit Oberflächen von bis zu 380 m<sup>2</sup>/g. Die Zugabe von NaCl führt zu einer Verminderung der Oberfläche. Mit steigendem pH-Wert bei der Gelierung verbessert sich die mechanische Stabilität der Eiklaraerogele. Bei sehr hohen pH-Werten ergeben sich bei WPI ebenfalls mesoporöse Strukturen mit Oberflächen von bis zu 460 m<sup>2</sup>/g. Die mechanische Stabilität ist deutlich höher als bei niedrigeren pH-Werten. Die NaCas-Aerogele wiesen mit 150 m<sup>2</sup>/g die kleinsten Oberflächen im Vergleich auf. Eine Änderung der Proteinkonzentration von 10 auf 12,5 % hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Oberfläche. Mit der Emulsionsmethode konnten von allen drei Proteinen Aerogelpartikel im µm-Bereich mit vergleichbaren Eigenschaften der Monolithe hergestellt werden. Zur Bestimmung der Trocknungskinetik konnte die Ethanol detektion während der überkritischen Trocknung wesentlich verbessert werden, so dass für die Gelpartikel aus Molkenproteinen, Eiklar und Na-Caseinat Trocknungskinetiken bestimmt werden konnten. Diese ähneln sich sehr. Innerhalb von 30 min kann 80 Gew.-% des Ethanols um und in den Partikeln entfernt werden. Die Entfernung der restlichen 20 Gew.-% Ethanol ist diffusionslimitiert und somit zeitintensiver. Insgesamt wurden Trocknungen im Festbett (Partikelschüttung) bis max. 7 h Trocknungsdauer durchgeführt. Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass eine Trocknungsdauer von 2 h die gewünschten Aerogeleigenschaften erzielt und eine zusätzliche Nachtrocknung während der Lagerung bei geringen Luftfeuchtigkeiten erfolgt.

Als Vergleichsproben zu den Aerogelen wurden gefriergetrocknete Cryogele hergestellt. Es wurde ein Prozess entwickelt, der reproduzierbar das Trocknen von Gelen ermöglichte. Versuche mit unterschiedlichen pH-Werten bei der Gelbildung zeigten eine pH-Abhängigkeit des Trocknungsprozesses, da trotz der Zuverlässigkeit des Prozesses bei nativen pH-Werten und im sauren Bereich, die Gele bei hohen pH-Werten kollabierten. Alle getrockneten Gelvarianten waren spröde und brüchig und mit spezifischen Oberflächen von unter 10 m<sup>2</sup>/g deutlich unter den Oberflächen von Aerogelen und damit in den technofunktionellen Eigenschaften nicht vergleichbar.

Die Adsorption von Fischöl aus überkritischem CO<sub>2</sub> zeigt eine positive Abhängigkeit zwischen einer Fischölbeladung und der spezifischen Oberfläche der Aerogele. Für Eiklar- und Molkenproteinaerogele können Beladungen von bis zu 0,74 g Fischöl/g Aerogel erzielt werden, für Na-Caseinaterogele Beladungen von bis zu 0,17 g Fischöl/g Aerogel. Die Adsorption von Ascorbinsäure aus überkritischem CO<sub>2</sub> auf den Proteinaerogelen erzielt wesentlich geringere Beladungen (< 5 mg Ascorbinsäure/g Aerogel) im Vergleich zum Fischöl. Dies ist u.a. auf die wesentlich geringere Löslichkeit im überkritischen CO<sub>2</sub> zurückzuführen. Mit steigendem Druck und damit einhergehender Löslichkeitssteigerung des Fischöls und der Ascorbinsäure im überkritischen CO<sub>2</sub> kann ein Anstieg der Beladung auf den Aerogelen beobachtet werden. Nach der Beladung liegen die Partikel unverändert im rieselfähigen Zustand vor.

Bei 12wöchiger Lagerung der unbeladenen und mit Fischöl beladenen Aerogelpartikel bei geringen Luftfeuchtigkeiten (0,11 und 0,33 r.F.) konnten keine negativen Produktveränderungen beobachtet werden. Die Rieselfähigkeit blieb erhalten, das Fischöl wurde adsorptiv gebunden und es konnten nur geringe Änderungen im Geruch detektiert werden. Die Partikel sind jedoch geschrumpft, wobei die Wasseraufnahme max. 1 % (w/w) betrug.

Für die Beschichtung der Aerogelpartikel wurden die Prozessparameter für die Eindüsung einer 15 Gew.-% Schellack-Ethanol-Lösung ermittelt. Hierfür waren geringe Sprühdichten von 0,5-1,5 ml/min und der Einsatz einer Spritzenpumpe entscheidend. Um die Bildung von Agglomeraten zu minimieren, wurden während der Beschichtung Trocknungsintervalle eingeführt. Nach der Beschichtung lagen die verbleibenden Partikel überwiegend in Form einer Schüttung von Einzelpartikeln vor. Die Untersuchungen mit dem Rasterelektronenmikroskop zeigten, dass die Oberfläche der Aerogel-Mikropartikel mit einer Schellackschicht überzogen wurde. Die Dicke der aufgetragenen Schellack-Schicht lag bei ca. 1 µm.

Für die Untersuchung der Gas- und Partikeldynamik in der verwendeten Strahlschichtanlage wurde eine gekoppelte CFD-DEM-Simulation durchgeführt. Für die Minimierung der Rechenzeit wurde ein Skalierungsansatz verwendet. Durch diese Untersuchung wurde der Austragspunkt der Partikel aus dem Strahlschichtapparat ermittelt.

Die Freisetzung des Fischöls aus den beladenen Aerogelpartikeln wurde in In-vitro-Verdauungsversuchen untersucht. Dabei zeigte sich bei den ungecoateten Partikeln, dass in der oralen und gastrischen Phase maximal 10 % des beladenen Fischöls freigesetzt wurden. In der anschließenden intestinalen Phase wurden bei den hitzenaturierten Proteinsystemen MPI und EWP anschließend bis zu 56 % bzw. 78 % des beladenen Fischöls freigesetzt. Bei NaCas wurden die Kapseln nahezu vollständig zersetzt und das gesamte Fischöl freigesetzt. Nach der Freisetzung konnten im Fischöl vergleichbare Anteile an  $\omega$ -3-Fettsäuren wie im Ausgangsprodukt nachgewiesen werden. Die zusätzlich mit Schellack beschichteten mit Fischöl beladenen Aerogelpartikel zeigten ein ähnliches Freisetzungsverhalten wie die nicht beschichteten Aerogelpartikel. Die Beschichtung kann also den Schutzeffekt verstärken, verhindert jedoch nicht die spätere Freisetzung des Fischöls im Darm.

#### Wirtschaftliche Bedeutung:

Die im Rahmen des Vorhabens gewonnenen nanoporösen Strukturen können in erster Linie als Trägermaterialien für sensitive oder sensorisch störende Substanzen (Fischöl (ungesättigte Fettsäuren), Coffein, Vitamine, Anthocyane, Xanthohumol), aber auch für andere niedermolekulare, z.T. auch bioaktive Substanzen fungieren. Von den Ergebnissen profitieren vor allem die Hersteller von Nahrungsergänzungsmitteln sowie die Produzenten spezieller funktioneller Lebensmittel.

Aerogelmikrokapseln sind in verschiedensten Produkten, wie Joghurt, Buttermilch/Molke-drinks, Getränkepulvern (z.B. im Sportbereich) oder auch in Backwaren und Cerealien einsetzbar. Genauso kann die Technologie auch neue Absatzmärkte für die Zulieferer der Lebensmittelindustrie schaffen. Die Resultate sind außerdem für Unternehmen des Maschinen- und Anlagenbaus von Relevanz, da diese die Ergebnisse in die Weiterentwicklung von CO<sub>2</sub>-Hochdruck-anlagen und Strahlschichtbeschichtungsanlagen einfließen lassen können. Das Verwenden der hochporösen, wasserunlöslichen Aerogele auf Basis von Proteinen ermöglicht neuartige Einsatzgebiete oder verbesserte Eigenschaften im Vergleich zu den bisher bekannten hydrogelbasierten Verkapselungssystemen. Hieraus ergibt sich ein breites Anwendungsspektrum für Mikroverkapselungssysteme

sowohl in Bezug auf die Kernmaterialien als auch für Lebensmittel, in denen Mikrokapseln zum Einsatz kommen.

#### Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2016.
2. Goslinska, M., Selmer, I., Kleemann, C., Kulozik, U., Smirnova, I. & Heinrich, S.: Novel technique for measurement of coating layer thickness of fine and porous particles using focused ion beam. *Particuol.* 42, 190–198 (2019).
3. Kleemann, C., Selmer, I., Smirnova, I. & Kulozik, U.: Tailor made protein based aerogel particles from egg white protein, whey protein isolate and sodium caseinate: Influence of the preceding hydrogel characteristics. *Food Hydrocoll.* 83, 365-374 (2018).
4. Kleemann, C., Rosenecker, E. & Selmer, I.: Quellungsverhalten von Eiklar- und Molkenproteinaerogelen in Quellmedien mit unterschiedlichen pH-Werten. *Jahresb. 2015 Milchwiss. Forsch. ZIEL*, ISBN 978-3-939182-93-1 (2016).
5. Goslinska, M., Heinrich, S., Selmer, I., Smirnova, I., Kleemann, C. & Kulozik, U.: Coating of Protein-Based Aerogels Using Spouted-Bed Technology. *Chem. Ing. Techn.* 88 (9), 1370, (2016)
6. Kleemann, C., Selmer, I., Goslinska, M., Smirnova, I., Heinrich, S. & Kulozik, U.: Protein hydrogel micro particles as precursor for supercritically dried aerogels to encapsulate sensitive substances. *PARTEC 2016, Proc.* (2016).
7. Kleemann, C., Selmer, I., Rosenecker, L. & Kulozik, U.: Untersuchung des Wasserhaltevermögens von Eiklar- und Molkenproteinhydrogelen in Abhängigkeit des pH-Wertes. *Jahresb. 2015 Milchwiss. Forsch. ZIEL*, ISBN 978-3-939182-89-4, 83-84 (2016).
8. Kleemann, C., Selmer, I., Loy, P., Bosch, M. & Kulozik, U.: Natrium-Caseinat Hydrogele als Vorstufe überkritisch getrockneter Aerogele und deren Nutzbarkeit als Schutz- und Transportmatrix. *Jahresb. 2014 Milchwiss. Forsch. ZIEL*, ISBN 978-3-939182-75-7, 81-83 (2015).
9. Kleemann, C., Selmer, I., Dobiasch, C., Heinrich, S., Kulozik, U. & Smirnova, I.: Aerogele aus Protein als neue Schutzsysteme für sensi-

- tive Wirkstoffe. In: Produktgestaltung in der Partikeltechnologie (eds. Teipel, U.), Fraunhofer ICT 7. 103-109 (2015).
10. Kleemann, C., Selmer, I., Loy, P. & Bosch, M.: Natrium-Caseinat Hydrogele als Vorstufe überkritisch getrockneter Aerogele und deren Nutzbarkeit als Schutz- und Transportmatrix. Jahrb. 2014 Milchwiss. Forsch. ZIEL, ISBN 978-3-939182-75-7 (2015).
  11. Selmer, I., Kleemann, C., Kulozik, U., Heinrich, S. & Smirnova, I.: Development of egg white protein aerogels as new matrix material for microencapsulation in food. J. Supercrit. Fluids. 106, 42-49 (2015).
  12. Kleemann, C., Selmer, I., Hofbeck, T., Zink, J., Kulozik, U. & Smirnova, I.: Modification of egg white protein hydrogels by treatment with salt and ethanol solutions in the production process of highly porous protein aerogels. XVI Europ. Symp. Qual. Eggs Egg Prod., Proc., EISSN 1743-4777, Nantes, Frankreich, (2015).
  13. Kleemann, C. & Kulozik, U.; Einfluss von Hydrogel - Eigenschaften auf die Charakteristika der daraus hergestellten Aerogele. Jahrb. 2013 Milchw. Forsch. ZIEL, ISBN 978-3-939182-63-4 (2014).

Technische Universität Hamburg-Harburg  
 Institut für Thermische Verfahrenstechnik  
 Arbeitsgruppe Smirnova  
 Eißendorfer Straße 38  
 21073 Hamburg  
 Tel.: +49 40 42878-3240  
 Fax: +49 40 42878-4072  
 E-Mail: irina.smirnova@tu-harburg.de

Technische Universität Hamburg-Harburg  
 Institut für Feststoffverfahrenstechnik und Partikeltechnologie  
 Denickestr. 15, 21073 Hamburg  
 Tel.: +49 40 42878-3750  
 Fax: +49 40 42878-2678  
 E-Mail: stefan.heinrich@tu-harburg.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)  
 Godesberger Allee 125, 53175 Bonn  
 Tel.: +49 228 3079699-0  
 Fax: +49 228 3079699-9  
 E-Mail: fei@fei-bonn.de

#### Weiteres Informationsmaterial:

Technische Universität München  
 Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittel-  
 forschung, Abt. Technologie  
 Weihenstephaner Berg 1  
 85350 Freising-Weihenstephan  
 Tel.: +49 8161 71-4205  
 Fax: +49 8161 71-4384  
 E-Mail: ulrich.kulozik@wzw.tum.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 125, 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.