

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

(Teilprojekt 7 im DFG/AiF-Cluster 1)

Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
Forschungsstelle:	Technische Universität Kaiserslautern Fachbereich Chemie Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie Prof. Dr. E. Richling/Dr. M. Baum
Forschungsstelle II: (bis 31.03.2009)	Karlsruher Institut für Technologie (KIT) Institut für Angewandte Biowissenschaften Abt. Lebensmitteltoxikologie Prof. Dr. D. Marko
Forschungsstelle III: (ab 01.04.2009)	Universität Wien Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie Prof. Dr. D. Marko
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
	Projektkoordinator: Prof. Dr. H.-U. Endreß Herbstreith & Fox KG, Neuenbürg
Laufzeit:	2008 – 2011
Zuwendungssumme:	€ 213.770,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

Ausgangssituation:

In den letzten Jahren stieg aufgrund eines erhöhten Ernährungsbewusstseins die Frage nach Lebensmittelinhaltsstoffen mit chemoprotektivem Potential. Wildheidelbeeren (*Vaccinium myrtillus L.*) besitzen aufgrund des hohen Anteils bioaktiver Inhaltsstoffe eine im Vergleich zu anderen Obst- und Gemüsearten sehr hohe anti-oxidative Kapazität. Daher sind sie für den Einsatz in funktionellen Lebensmitteln besonders geeignet. Den roten Beerenfarbstoffen

(Anthocyane) werden des Weiteren 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 und somit die zelluläre Verfügbarkeit auch unter Zellkulturbedingungen limitiert. In den vergangenen Jahren hat die Verkapselung von Wirkstoffen – vorwiegend im Pharmabereich – dazu geführt, dass Substanzen gezielt

am Wirkort freigesetzt werden können. Von besonderem Interesse hierbei ist der Einsatz von Verkapselungstechniken für Anthocyane. Damit könnte die Bioverfügbarkeit soweit 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 in Hinblick auf die Prävention verbessert wird.

Ziel des Forschungsvorhabens (Teilprojekt 7 im [DFG/AiF-Cluster „Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten Multikapselsystemen“](#)) war es, die präventiven und möglichen ungünstigen Wirkungen der Verkapselung des Heidelbeerextraktes (HBE) im Vergleich zum unverkapselten HBE im biologischen System *in vitro* zu erfassen. Des Weiteren sollten Stabilität, Freisetzung und Verfügbarkeit der unterschiedlichen HBE beladenen Kapselpräparaten vergleichend mit unverkapseltem HBE in Modellen des Gastrointestinaltraktes (GIT) charakterisiert werden.

Forschungsergebnis:

Die Untersuchungen von Forschungsstelle 1 in Kooperation mit der AG Prof. Mäder (Cluster-teilprojekt (TP) 6) mittels In-Vitro-Freisetzung- und Stabilitätsuntersuchungen legen nahe, dass die vorliegenden Verkapselungstechniken (Pektin-amidhohl- (vgl. TP 2), Molkenprotein- (vgl. TP 3) und Apfelpektinkapseln mit Schelllack-coating (vgl. TP 5)) zu einer unerwünschten Freisetzung der Anthocyane während der Magenpassage führen. Weiterhin zeigte sich, dass diese HBE-beladenen Kapselsysteme zu einer kontinuierlichen Freisetzung und höheren Wirkstoffkonzentrationen in simuliertem Dünndarmmilieu beitragen können. Bei weiteren Inkubationen mit humanem Dünndarminhalt (näher an der In-Vivo-Situation) wurde deutlich, dass der Abbau/Zerfall der Anthocyane durch unterschiedliche Verkapselungstechniken (Pektinamidhohl-, Molkenprotein- und Apfelpektinkapseln) beeinflusst wird. Durch eine verzögerte Freisetzung durch Verkapselung konnte über einen gewissen Zeitraum der Anthocyanabbau kompensiert werden.

Um eine Aussage über Wirkkomponenten im HBE treffen zu können, wurden die HBE-Subfraktionen (vgl. TP 1) ihrem mengenmäßigen Anteil im HBE entsprechend eingesetzt. Da bei Inkubationen mit Anthocyan- und Polymerfraktion keine antioxidativen Effekte in den Zellsystemen detektiert wurden, konnte die Phenolcarbonsäurefraktion als wirksamste Subfraktion

des HBE identifiziert werden.

Es stellte sich heraus, dass die multidispersen Hüllkapseln (TP4), aufgrund der äußeren Ölphase in dieser Formulierung nicht für die verwendeten In-Vitro-Zellkulturexperimente geeignet waren. Bei Inkubationen mit anderen HBE-beladenen Kapselsystemen wurde lediglich im Konzentrationsbereich 50 - 500 µg/ml bei den Molkenprotein- und Apfelpektinkapseln ein signifikanter Einfluss auf die Zellvitalität beobachtet. Eine tendenzielle Erhöhung des Glutathiongehaltes der Zelle (100 - 500 µg/ml), eine Kompensation der Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) mit steigender Konzentration (100 - 500 µg/ml) und ein positiver Einfluss auf die Bildung von DANN-Strangbrüchen (5 - 10 µg/ml) wurde nach Inkubation mit Kapselsystemen (Pektinamidhohl-, Molkenprotein- und Apfelpektinkapseln) nachgewiesen. Generell waren die biologischen Wirkungen der mit HBE-beladenen Pektinamidhohl-, Molkenprotein- und Apfelpektinkapsel mit denen des nicht verkapselten HBE vergleichbar.

In den Untersuchungen der Forschungsstelle 3 konnte gezeigt werden, dass der unverkapselte HBE sowie die meisten der isolierten Subfraktionen (vgl. TP 1) als hochpotente Inhibitoren der Aktivität des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) im zellfreien System (ELISA) wie auch in humanen Kolonkarzinomzellen (Western Blot Analyse) 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, verringerten die Verkapselungen, insbesondere in die lipid- und proteinbasierten Systeme (vgl. TP 4 und TP 3), 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 (vgl. TP 2), nicht. Langzeituntersuchungen (Sulforhodamin B Assay über 72 h) zur Tumorzellwachstumshemmung zeigten, dass die Verkapselung in die Protein- und Lipidsysteme hinsichtlich dieses Endpunktes zu keiner

Verringerung der Bioaktivität des HBE führte. Die Ex-Vivo-Verdauung mit Ileostomahalt führte zu einer Abnahme der biologischen Aktivität des HBEs hinsichtlich der EGFR-Phosphorylierung, die mit der Anthocyanabnahme, gemessen von Forschungsstelle¹, 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.

Eine Induktion anwendungslimitierender Effekte kann anhand dieser 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 identifiziert.

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 Systeme nicht substantiell vermindert wird. 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, nicht vollständig abgebildet werden können, sollten diese Ergebnisse zu den Verkapselungssystemen in einer humanen Interventionsstudie bestätigt werden.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Lebensmittel mit gesundheitsfördernden Aspekten sind nicht nur aus ernährungswissenschaftlicher Sicht, sondern vor allem aus ökonomischer Sicht von hoher Bedeutung. In Deutschland werden Wachstumsraten für funktionelle Milch- und Milchprodukte, Getränke, Backwaren, Getreideprodukte, Süßwaren und Brotaufstriche von 15 – 20 % pro Jahr publiziert. So war alleine für probiotische Milchgetränke eine Steigerungsrate von 17 % in 2005

zu verzeichnen, obwohl die Preise im Vergleich zu konventionellen Milchgetränken um bis zu 100 % erhöht sein können. Laut der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE) wächst auch der Markt für Nahrungsergänzungsmittel stetig. Der gesamte Bereich Nahrungsergänzungsmittel umfasst ca. 1 Mrd. €. In den letzten Jahren kommen immer mehr Nahrungsergänzungsmittel auf der Basis sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe auf den Markt.

Das Forschungsvorhaben lieferte insbesondere für kleinere Unternehmen wertvolle Hinweise in Hinblick auf die wissenschaftliche Untermauerung gesundheitsbezogener Produktaussagen, sog. „Health Claims“. Sowohl die positive Wirksamkeit des verwendeten HBE als auch die Auslobung weiterer enthaltener bioaktiver HBE-Subfraktionen stärken die Position der Herstellerbetriebe, da dies dem Verlangen des Verbrauchers nach möglichst gesundheitsfördernden Lebensmitteln nachkommt.

Die im Vorhaben gewonnenen ersten Erkenntnisse von HBE-beladenen Verkapselungssystemen (Pektinamidhohl-, Molkenprotein- und Apfelpektinkapseln) müssen noch mit einer humanen Interventionsstudie verifiziert werden. Dennoch ergeben sich bereits durch die erzielten Ergebnisse wichtige Erkenntnisse hinsichtlich potentiell gesundheitsfördernder Eigenschaften von unverkapseltem und verkapseltem HBE, die von den Betrieben der Fruchtsaftindustrie zur Imagesteigerung und zur Stärkung der Wettbewerbsfähigkeit im Rahmen des expandierenden Marktes an funktionellen Lebensmitteln genutzt werden kann.

Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2011.
2. Betz, M., Steiner, B., Schantz, M., Oidtmann, J., Mäder, K., Richling, E. und Kulozik, U.: Antioxidant capacity of bilberry extract microencapsulated in whey protein hydrogels. *Food Res. Int.* 47, 51 (2012).
3. Müller, D., Schantz, M. und Richling, E.: HPLC analysis of anthocyanins in bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.), blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) and corresponding juices. *J. Food Sci.* 4, 333-339 (2012).
4. Oidtmann, J., Schantz, M., Mäder, K., Baum, M., Berg, S., Betz, M., Kulozik, U., Leick, S., Rehage, H., Schwarz, K. und Richling, E.: Preparation and Comparative Release Characteristics of Three Anthocya-

- nin Encapsulation Systems. J. Agric. Food Chem. 3, 844-851 (2012).
5. Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturieren Multikapselsystemen - Zentrale Ergebnisse des gleichnamigen DFG/AiF-Clusterprojektes. (Hrsg. FEI). ISBN 978-3-925032-49-3 (2011).
 6. Weidel, E., Schantz, M. und Richling, E.: Anthocyanin contents in blackcurrant (*Ribes nigrum L.*) juices and fruit drinks. Fruit Proc. 3, 102-107 (2011).
 7. Schantz, M., Mohn, C., Baum, M. und 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).
 8. Schantz, M., Mohn, C., Baum, M. und 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).
 9. Schantz, M. und Richling, E.: Anthocyane mit gesundheitlicher Wirkung. HighChem: Aktuelles aus der Lebensmittelchemie. Kap. 3, 50-51 (2010).
 10. Baum, M., Schantz, M. und Richling, E.: Rote Farbpigmente mit gesundheitlicher Wirkung. GDCH, Aktuelle Wochenschau der Lebensmittelchemie, Woche 52 (2009).

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

Weiteres Informationsmaterial:

Technische Universität Braunschweig
Institut für Lebensmittelchemie
Schleinitzstr. 20, 38106 Braunschweig
Tel.: +49 531 391-7202
Fax: +49 531 391-4577
E-Mail: p.winterhalter@tu-bs.de

Technische Universität Berlin
Institut für Lebensmitteltechnologie und Lebensmittelchemie
FG Lebensmittelbiotechnologie und -prozessertechnik
Königin-Luise-Straße 22, 14195 Berlin
Tel.: +49 30 314-71250
Fax: +49 30 8327-663
E-Mail: Dietrich.Knorr@TU-Berlin.de

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

gefördert durch/via:



Bundesministerium
für Wirtschaft
und Technologie

AiF ALLIANZ
INDUSTRIE
FORSCHUNG



FORSCHUNGSKREIS
DER ERNÄHRUNGSINDUSTRIE E.V.