





# Stabilisierung von Probiotika durch Fetteinbettung



Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen-Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität  
zu Kiel

vorgelegt von  
**Astrid von Holt**

Kiel 2004

Referent : Prof. Dr. Dr. h.c. B.W. Müller  
Korreferent : Prof. Dr. J. Schrezenmeir  
Mündliche Prüfungen : 29.10., 05.11. und 09.11.2004  
Zum Druck genehmigt : 10. November 2004  
Prof. Dr. J. Grotemeyer  
(Dekan)

Meinen Eltern gewidmet

Das Fehlen einer besonderen Kennzeichnung oder eines entsprechenden Hinweises auf ein Warenzeichen, ein Gebrauchsmuster oder einen Patentschutz lässt nicht den Schluss zu, dass über die in dieser Arbeit angegebenen Dinge frei verfügt werden kann.

## **INHALTSVERZEICHNIS**

<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>1</b>
<b>1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 Einleitung.....	1
1.2 Zielsetzung.....	3
<b>2 THEORETISCHER HINTERGRUND.....</b>	<b>5</b>
2.1 Probiotika.....	5
<b>2.1.1 Definition .....</b>	<b>5</b>
<b>2.1.2 Systematische Eingliederung probiotischer Bakterien .....</b>	<b>6</b>
<b>2.1.3 Wirkung.....</b>	<b>8</b>
2.2 Stabilisierung von probiotischen Bakterien .....	9
<b>2.2.1 Verschiedene Arten der Stabilisierung.....</b>	<b>9</b>
2.2.1.1 Einleitung.....	9
2.2.1.2 Stabilisierung durch Trocknung .....	11
2.2.1.3 Stabilisierung durch Einbettung in Polymere.....	14
<b>2.2.2 Weitergehende Verfahren zur Stabilisierung getrockneter probiotischer Bakterien .....</b>	<b>15</b>
2.2.2.1 Stabilisierung mit Fetten.....	15
2.2.2.2 Sonstige Verfahren .....	17
<b>3 SCHAFFUNG DER VORAUSSETZUNGEN FÜR DIE EINBETTUNG VON BAKTERIEN .....</b>	<b>19</b>

3.1	Einleitung.....	19
3.2	Mikronisierung des Lyophilisates in der Luftstrahlmühle .....	25
3.2.1	<b>Einleitung.....</b>	<b>25</b>
3.2.2	<b>Einfluss des Druckes auf Keimzahl und Partikelgröße .....</b>	<b>28</b>
3.2.2.1	Durchführung.....	28
3.2.2.2	Ergebnisse .....	29
	<i>Einfluss auf die Partikelgröße.....</i>	<i>29</i>
	<i>Einfluss auf die Keimzahl.....</i>	<i>30</i>
3.2.3	<b>Einfluss der Einzeldrücke auf Keimzahl und Partikelgröße ...</b>	<b>30</b>
3.2.3.1	Durchführung.....	30
3.2.3.2	Ergebnisse .....	32
	<i>Einfluss auf die Partikelgröße.....</i>	<i>32</i>
	<i>Einfluss auf die Keimzahl.....</i>	<i>34</i>
3.2.4	<b>Einfluss verschiedener Hilfsstoffe und deren Konzentration auf Partikelgröße und Keimzahl .....</b>	<b>36</b>
3.2.4.1	Durchführung.....	36
3.2.4.2	Ergebnisse .....	37
	<i>Einfluss der Hilfsstoffkonzentration auf die Keimzahl.....</i>	<i>37</i>
	<i>Einfluss der Hilfsstoffkonzentration auf die Partikelgröße .....</i>	<i>37</i>
3.2.5	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>39</b>
3.3	Sprühtrocknung.....	40
3.3.1	<b>Einleitung.....</b>	<b>40</b>
3.3.2	<b>Sprühtrocknung von Lb. casei in Magermilch .....</b>	<b>42</b>
3.3.2.1	Durchführung.....	42
3.3.2.2	Ergebnisse .....	44
3.3.3	<b>Sprühtrocknung von Lb. casei in einer Syloidsuspension .....</b>	<b>46</b>

3.3.3.1	Durchführung.....	46
3.3.3.2	Ergebnisse.....	46
<b>3.3.4</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>49</b>
<b>3.4</b>	<b>Hochdruckhomogenisation .....</b>	<b>50</b>
<b>3.4.1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>50</b>
<b>3.4.2</b>	<b>Einfluss des Druckes auf Partikelgröße und Keimzahl .....</b>	<b>52</b>
3.4.2.1	Durchführung.....	52
3.4.2.2	Ergebnisse.....	52
	<i>Partikelgröße</i> .....	52
	<i>Keimzahl</i> .....	53
<b>3.4.3</b>	<b>Einfluss der Zahl der Zyklen auf Partikelgröße und Keimzahl.....</b>	<b>54</b>
3.4.3.1	Durchführung.....	54
3.4.3.2	Ergebnisse.....	55
	<i>Partikelgröße</i> .....	55
	<i>Keimzahl</i> .....	55
<b>3.4.4</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>56</b>
<b>3.5</b>	<b>Vergleich der entstandenen Bakterienagglomerate.....</b>	<b>57</b>
<b>3.5.1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>57</b>
<b>3.5.2</b>	<b>Bestimmung der Lagerstabilität bei 0 % RH und 100 % RH .</b>	<b>58</b>
3.5.2.1	Durchführung.....	58
3.5.2.2	Ergebnisse.....	58
<b>3.5.3</b>	<b>Bestimmung der Temperaturempfindlichkeit.....</b>	<b>60</b>
3.5.3.1	Durchführung.....	60
3.5.3.2	Ergebnisse.....	60

<b>3.5.4 Vergleich der Salztoleranz von Lyophilisat und gemahlenem Lyophilisat.....</b>	<b>64</b>
3.5.4.1 Durchführung.....	64
3.5.4.2 Ergebnisse.....	64
<b>3.5.5 Vergleich der Morphologie der Partikel .....</b>	<b>67</b>
<b>3.5.6 Zusammenfassung .....</b>	<b>70</b>
<b>4 HERSTELLUNG VON FETTPARTIKELN MITTELS KRYOMAHLUNG .....</b>	<b>72</b>
4.1 Beschreibung der Methode .....	72
4.2 Auswahl der Fette .....	74
4.3 Stabilität von Fettpartikel mit einer Keimbelastung von 10 %..77	
<b>4.3.1 Einleitung.....</b>	<b>77</b>
<b>4.3.2 Vergleich von Fettpartikeln mit mikronisiertem Lyophilisat und sprühgetrockneten Bakterien .....</b>	<b>78</b>
4.3.2.1 Durchführung.....	78
<b>4.3.3 Ergebnisse.....</b>	<b>79</b>
<b>4.3.4 Vergleich verschiedener Herstellungsmethoden .....</b>	<b>81</b>
4.3.4.1 Durchführung.....	81
4.3.4.2 Ergebnisse.....	82
<b>4.3.5 Vergleich verschiedener Fette .....</b>	<b>84</b>
4.3.5.1 Durchführung.....	84
4.3.5.2 Ergebnisse.....	85
<b>4.3.6 Vergleich der Überlebensrate von Lb. casei in Fettpartikeln und in ungemahlenem Fett.....</b>	<b>87</b>
4.3.6.1 Durchführung.....	87

4.3.6.2	Ergebnisse .....	87
<b>4.3.7</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>89</b>
<b>4.4</b>	<b>Stabilität von Fettpartikeln mit einer Keimbelastung von bis zu 1 %.....</b>	<b>90</b>
<b>4.4.1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>90</b>
<b>4.4.2</b>	<b>Vergleich von Fettpartikeln mit mikronisiertem und homogenisiertem Lyophilisat und in RSM und Syloidsuspension sprühgetrockneten Bakterien.....</b>	<b>91</b>
4.4.2.1	Durchführung.....	91
4.4.2.2	Ergebnisse.....	91
<b>4.4.3</b>	<b>Vergleich verschiedener Fette .....</b>	<b>94</b>
4.4.3.1	Durchführung.....	94
4.4.3.2	Ergebnisse.....	94
<b>4.4.4</b>	<b>Vergleich verschiedener Herstellungsmethoden .....</b>	<b>96</b>
4.4.4.1	Durchführung.....	96
4.4.4.2	Ergebnisse.....	97
<b>4.4.5</b>	<b>Vergleich der Einlagerung bei 100 % RH und der Einlagerung in Puffer.....</b>	<b>98</b>
4.4.5.1	Durchführung.....	98
4.4.5.2	Ergebnisse.....	98
<b>4.4.6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>99</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>101</b>
<b>6</b>	<b>ABSTRACT.....</b>	<b>104</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>106</b>

7.1	Verwendete Substanzen .....	106
7.2	Zusammensetzung der Medien .....	107
7.3	Methoden und Geräte.....	108
<b>7.3.1</b>	<b>Präperativ .....</b>	<b>108</b>
7.3.1.1	Sprühtrocknung.....	108
	<i>Sprühtrocknung von Lb. casei in Magermilch.....</i>	<i>108</i>
	<i>Sprühtrocknung von Lb. casei in einer Syloidsuspension.....</i>	<i>109</i>
7.3.1.2	Kryomahlung .....	109
7.3.1.3	Herstellung der Pulvermischungen für die Mikronisierung..	111
7.3.1.4	Mikronisierung des Lyophilisates .....	111
7.3.1.5	Hochdruckhomogenisation .....	112
<b>7.3.2</b>	<b>Analytik .....</b>	<b>112</b>
7.3.2.1	Bestimmung der Wasseraktivität.....	112
7.3.2.2	Keimzahlbestimmung .....	113
7.3.2.3	Laserdiffraktometrie .....	113
7.3.2.4	Siebanalyse .....	114
7.3.2.5	Dynamische Wasserdampfsorption (DVS) .....	115
7.3.2.6	Rasterelektronenmikroskopie (REM).....	116
<b>7.3.3</b>	<b>Weitere Geräte .....</b>	<b>117</b>
7.4	Liste der verwendeten Abkürzungen und Symbole .....	118
<b>8</b>	<b>LITERATURLISTE.....</b>	<b>120</b>

# 1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

## 1.1 Einleitung

Bereits seit 7000 Jahren nehmen Menschen gesundheitsfördernde Bakterien in Form von Lebensmitteln wie Milch und Sauermilchprodukten zu sich. Ihnen wurden im Laufe der Geschichte immer wieder Wirkungen zugeschrieben, die über die Funktion als Grundnahrungsmittel hinausgehen. In vielen Kulturen wird der Milch als Nahrungsmittel religiöse Verehrung entgegengebracht. Schon im alten Testament ist die Rede von einem „Land, wo Milch und Honig fließen“ [Ministerium für Ernährung und Ländlichen Raum Baden Württemberg, 1998].

Besonders die Griechen schrieben bereits in vorchristlicher Zeit diesen Produkten eine besondere Wirkung zu. Homer beschrieb in seiner Odyssee im 8. Jahrhundert vor Christus die magische Kraft des Käsegenusses, und Hippokrates (460-377 v. Chr.) nahm an, dass Milch, je nachdem von welchem Tier sie stammte, stopfende oder abführende Wirkung hat.

Den Zusammenhang von Milchprodukten und Bakterien stellte erstmals der Franzose Louis Pasteur (1822-1895) her. Der Bakteriologe fand heraus, dass die Säuerung von Milch durch Bakterien verursacht wird, und erfand ein nach ihm benanntes Verfahren zu deren Abtötung.

Der russische Medizinnobelpreisträger Elie Metchnikoff, der am Pasteurinstitut in Paris arbeitete, vermutete als erster, dass der Verzehr von Bakterien aus gesäuerten Milchprodukten einen positiven Effekt auf die Darmflora und damit auf die Alterung hat. Metchnikoff war überzeugt, dass Fäulnisprozesse der Mikroflora im Darm für eine vorzeitige Alterung verantwortlich seien. Er hatte jedoch auch beobachtet, dass die bulgarische Bevölkerung, bei deren Ernährung Sauermilchprodukte eine besonders große Rolle spielten, ein hohes Alter erreichte und vermutete einen Zusammenhang der beiden Beobachtungen. Er schrieb da-

her in seinem Buch „Essais Optimistes“ 1907, dass dieser Zusammenhang genauer untersucht werden müsse [Fuller, 1992]. Obwohl er nie den Beweis für den Zusammenhang von der Aufnahme von Bakterien aus Sauermilchprodukten und positiven gesundheitlichen Wirkungen erbracht hat, wird seine Arbeit heute als *Geburt der Probiotika* bezeichnet. Der Begriff „Probiotikum“ kommt von dem griechischen „pro bios“, was so viel wie „für das Leben“ heißt. Er wurde jedoch erst in den sechziger Jahren geprägt als begonnen wurde, Bakterien als Wachstumsförderer in der Tiermast einzusetzen. Die Wirkung von „probiotischen“ Bakterien wurde jedoch schon nach dem Tod Metchnikoffs 1916 weiter untersucht. Bis zur Einführung des ersten Lebensmittels, dem gesundheitsfördernde Bakterien zugesetzt wurden, dauerte es noch einige Jahre. 1930 gelang es dem japanischen Wissenschaftler Dr. Minoru Shirota ein Bakterium zu isolieren, das gesundheitsunterstützend wirkte. Es wurde nach seinem Entdecker später *Lactobacillus casei shirota* benannt. Shirota brachte 1935 schließlich das erste „probiotische“ Lebensmittel Yakult® auf den Markt [Yakult, 2004; Wigley, 1999]. Im pharmazeutischen Bereich kam das erste Präparat mit lebenden Mikroorganismen zur Behandlung von Durchfallerkrankungen 1953 unter dem Namen Ultra-Levure® (heute: Perenterol®) auf den Markt. Es enthält den Keim *Saccarommyces boulardii*.

Heute sind sowohl im Lebensmittelbereich als auch im pharmazeutischen Bereich viele Produkte auf dem Markt. In der Pharmazie werden probiotische Bakterien nicht nur bei Durchfallerkrankungen, sondern auch bei Störungen der Vaginalflora eingesetzt. Auch in diesem Indikationsgebiet hat der Einsatz von Probiotika eine lange Tradition. Der Gynäkologe Dr. Albert Döderlein (1860-1941) publizierte 1892 eine Monographie, in der er die Bedeutung der *Lactobacillen* für eine gesunde Vaginalflora beschrieb [Englisch, 1993]. Seit 1961 ist ein nach ihm benanntes Arzneimittel zur Stabilisierung der Vaginalflora auf dem Markt. Bei Döderlein Med® handelt es sich um Kapseln, die lyophilisierten *Lb. acidophilus* enthalten.

Im Lebensmittelbereich finden probiotische Bakterien immer größeren Einsatz. Den größten Teil der Produkte stellen hier die Milchprodukte, denen zusätzlich zu den Starterkulturen noch weitere Bakterien zugesetzt werden. Es hat sich jedoch gezeigt, dass die Überlebensfähigkeit der Bakterien in vielen auf dem Markt befindlichen Produkten gering ist [Shah, 2000]. Einige Stämme zeigen in fermentierten Milchprodukten bei Lagerung bei 5°C eine gute Stabilität über vier Wochen [Nighswonger et al., 1996], die Lagerbedingungen schränken den Einsatz dieser Stämme jedoch stark ein. Lyophilisierte Bakterien zeigen eine gute Überlebensrate während der Lagerung. Ihr Einsatz in Lebensmitteln wird jedoch durch die Tatsache beschränkt, dass Lebensmittel im Allgemeinen zu viel Feuchtigkeit enthalten, um eine gute Überlebensrate der Bakterien zu gewährleisten. Um dieses Problem zu umgehen, wird schon seit Anfang der achtziger Jahre versucht, durch Verkapselung von Bakterienlyophilisat in Fett einen Wasserausschluss zu erreichen und die Bakterien länger haltbar zu machen.

## **1.2 Zielsetzung**

Die bisher verwendeten Verfahren zur Verkapselung lyophilisierter probiotischer Bakterien sind mit einem großen apparativen Aufwand verbunden. Die verwendeten Fette haben teilweise sehr hohe Schmelzpunkte [Sozzi, 1982], so dass die Freisetzung der Bakterien im Darm nicht gewährleistet ist.

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung einer neuen Methode zur Herstellung von probiotikahaltigen Partikeln, in der die enthaltenen Bakterien bei Lagerung in feuchter Umgebung gegenüber unbehandelten probiotischen Bakterien eine deutlich erhöhte Überlebensrate aufweisen. Diese Partikel sollten so beschaffen sein, dass sie sich möglichst universell in Lebensmitteln und pharmazeutischen Darreichungsformen einarbeiten lassen. Dieses Ziel sollte durch die Einbettung getrockneter Bakterien in Fett erreicht werden. Die Methode der Partikel herstel-

lung sollte dabei mit einem möglichst kleinen apparativen Aufwand verbunden und dementsprechend kostengünstig sein.

## 2 THEORETISCHER HINTERGRUND

### 2.1 Probiotika

#### 2.1.1 Definition

Der Begriff „Probiotikum“ wurde in den sechziger Jahren geprägt und bezeichnete ursprünglich Substanzen, die von sich gegenseitig stimulierenden Protozoen produziert wurden [Lilly und Stillwell, 1965]. Er änderte sich in den siebziger Jahren, nachdem das Swann Committee den Gebrauch von Antibiotika als Wachstumsbeschleuniger in der Tiermast 1969 einschränkte und man dazu überging, Milchsäurebakterien als Wachstumsfaktoren einzusetzen. Parker beschrieb 1974 Probiotika als Organismen und Substanzen, die zur intestinalen mikrobiellen Balance beitragen [Parker, 1974]. Der Begriff wurde dann 1989 von Fuller nochmals modifiziert. Er beschrieb Probiotika als lebende mikrobielle Nahrungsmittelzusätze, die positive Effekte auf das Wirtstier ausüben, indem sie die mikrobielle Balance seines Intestinaltraktes fördern [Fuller, 1989]. Damit beschrieb er, was man auch heute unter dem Begriff Probiotikum versteht. Zu den probiotischen Bakterien gehören Laktobacillen, Streptokokken, Enterokokken und Bifidobakterien.

Um als probiotisch zu gelten, müssen die Bakterien bestimmte Eigenschaften erfüllen. Das wichtigste Kriterium ist natürlich die Unbedenklichkeit der Bakterien. Viele der Bakterien werden schon seit Jahrzehnten in fermentierten Lebensmitteln eingesetzt, einige Stämme sogar seit Jahrhunderten, ohne dass ein gesundheitliches Risiko bekannt geworden wäre. Starterkulturen haben daher den GRAS-Status („generally recognized as safe“), aber auch fast alle anderen Laktobacillen und Bifidobakterien sind in Deutschland als sicher eingestuft, außerdem sind die meisten probiotischen Mikroorganismen natürliche Bewohner des Darms [de Vrese und Schrezenmeir, 2000]. Probiotika sollten außerdem ei-

nen nachgewiesenen gesundheitsfördernden Effekt haben, sie sollten in ausreichender Menge im Darm vorhanden sein und die Bedingungen, die im Magen-Darm Trakt herrschen, überleben (niedrige pH Werte). Außerdem sollten sie über einen längeren Zeitraum bei Lagerung stabil sein [Fuller, 1989]. Tabelle 2.1 zeigt die heute angewendeten probiotischen Bakterienstämme [Lee et al. 1999, mod.]. Es gibt jedoch noch weitere Stämme, deren probiotisches Potenzial untersucht wird.

*Tabelle 2.1 Mikroorganismen die als Probiotika gebraucht werden*

Lactobacillen	Bifidobakterien	Enterokokken	Streptokokken
L. acidophilus L. delbrueckii subsp. bulgaricus L. helveticus L. casei L. fermentum L. johsonii L. plantarum L. rhamnosus L. salivarius	B. breve B. bifidum B. infantis B. lactis B. longum B. thermophilum	E. faecium	S. salivarius subsp. thermophilus

### **2.1.2 Systematische Eingliederung probiotischer Bakterien**

Probiotische Bakterien sind in Hinblick auf ihre Taxonomie eine inhomogene Gruppe. Abbildung 2.1 zeigt die taxonomische Zuordnung probiotischer Bakterien. Sie verbindet vor allem die Produktion von Milchsäure, so dass sie im Volksmund auch als Milchsäurebakterien zusammengefasst werden.

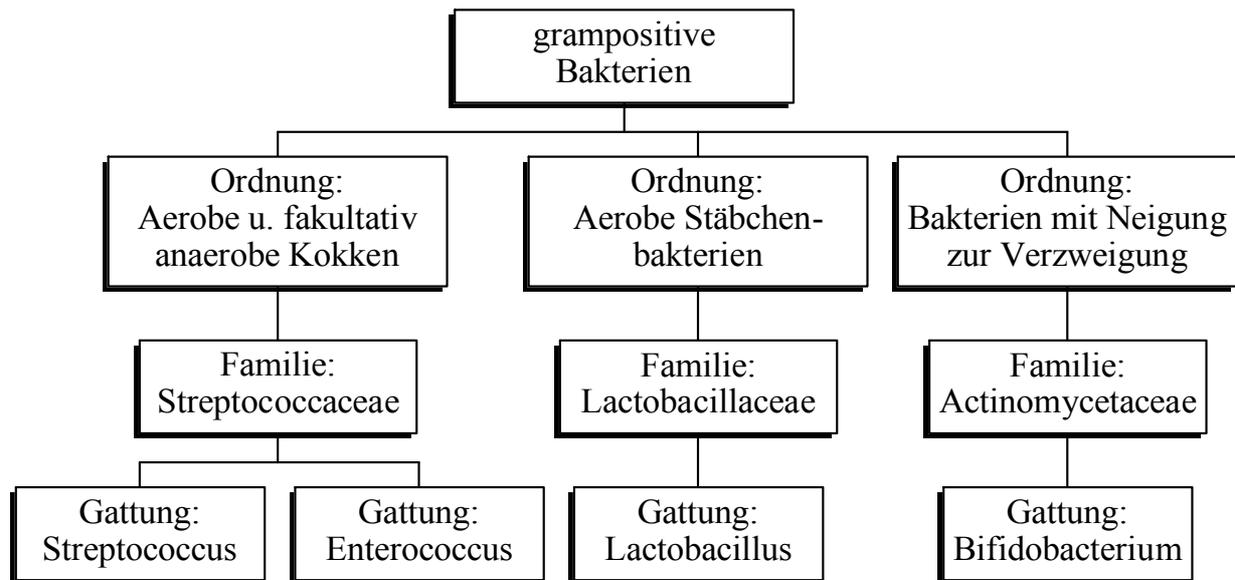


Abbildung 2.1 Klassifikation probiotischer Bakterien [Pschyrembl, mod.]

Auch innerhalb der verschiedenen Gattungen unterscheiden sich die einzelnen Arten und Stämme teilweise erheblich. Die beiden größten Gruppen innerhalb der probiotischen Bakterien sind die Lactobacillen und die Bifidobakterien. Die Lactobacillen, von denen es über 25 Arten gibt, sind fakultative Anaerobier und lassen sich in zwei Gruppen aufteilen: Homofermentative Lactobacillen produzieren zu mehr als 85 % Milchsäure, während heterofermentative nur etwa 50 % Milchsäure produzieren. Der Rest sind u. a. Acetat, Kohlendioxid und Ethanol [Batt, 1999]. Die Bifidobakterien unterscheiden sich auch innerhalb der einzelnen Arten. Von den Lactobacillen unterscheiden sie sich von allem dadurch, dass sie streng anaerob sind und keine Säuretoleranz zeigen. Sie bilden außerdem in großen Mengen Essigsäure.

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Keim handelt es sich um *Lb. casei* ssp. *casei*. *Lb. casei* ist ein stäbchenförmiger, homofermentativer, katalasenegativer Keim, der zu den normalen Mikroflora des Menschen gehört. Er siedelt in der Mundhöhle und im Gastrointestinaltrakt [Tannok, 1995]. Neben *Lb. casei* ssp. *casei* existieren noch drei weitere Subspezies: *Lb. casei* ssp. *pseudoplanarum*,

Lb. casei ssp. rhamnosus und Lb. casei ssp. tolerans. Bis auf Lb. casei ssp. rhamnosus zeigt Lb. casei kein Wachstum oberhalb 45°C.

### **2.1.3 Wirkung**

Probiotische Bakterien haben in mehreren Bereichen einen positiven Effekt auf die Gesundheit. Durch die Bildung von Säuren wie Milch- und Essigsäure sowie die Bildung von Bakteriozinen [Fuller, 1992] beeinflussen sie die Darmflora. Durch ihre bloße Anwesenheit bilden sie eine ökologische Konkurrenz zu pathogenen Keimen. Probiotika mit hoher Bindungsaffinität an die Darmmukosazellen erhöhen deren Barriereeffekt. Einen besonders eindrucksvollen Beleg für die Wichtigkeit einer gesunden Darmflora lieferten Collins und Carter 1987. Sie zeigten, dass 10 Zellen von *Salmonella enteritidis* eine keimfreie gehaltene Maus töten, während man für eine konventionell gehaltene Maus  $10^6$  Zellen benötigt [Collins und Carter, 1978].

Es sind jedoch nicht alle positiven Effekte, die Probiotika auf die Gesundheit haben, mit Sicherheit bewiesen. Tabelle 2.2 zeigt die gesicherten und möglichen Effekte der Probiotika [de Vrese und Schrezenmeir, 2000]

Tabelle 2.2 Effekte von Probiotika

gesicherte Effekte	mögliche Effekte
<ul style="list-style-type: none"> <li>-Geringere Häufigkeit und Dauer verschiedener Durchfallerkrankungen</li> <li>-Senkung der Konzentration gesundheitsschädlicher Stoffwechselprodukte und krebspromovierender Enzyme im Dickdarm</li> <li>-Immunmodulation</li> <li>-Förderung der Laktoseverdauung bei Laktosemalabsorbern</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Förderung oder Erhaltung einer optimalen Darmflora</li> <li>-Motilitätsregulierung bei Obstipation</li> <li>-Einsetzbar bei Vaginitis</li> <li>-Verhinderung von Krebs</li> <li>-Stärkung des Immunsystems,</li> <li>-Verhinderung von Infektionskrankheiten</li> <li>-Reduktion von Allergien und Autoimmunkrankheiten,</li> <li>-Einsatzmöglichkeit als Adjuvans</li> <li>-Senkung des Cholesterolspiegels, Beeinflussung des Lipidstoffwechsels</li> <li>-Steigerung der Mineralstoffresorption, Osteoporoseprävention</li> </ul>

## 2.2 Stabilisierung von probiotischen Bakterien

### 2.2.1 Verschiedene Arten der Stabilisierung

#### 2.2.1.1 Einleitung

Wie alle Bakterien brauchen auch probiotische Bakterien zum Überleben bestimmte Umgebungsbedingungen. Welchen Anspruch ein Bakterium an seine Umwelt stellt, ist von der Art abhängig, zu der es gehört. Die Toleranz gegenüber Extrembedingungen wie hohen oder tiefen Temperaturen, hohen Salzkonzentrationen und niedrigen Feuchtigkeitsgehalten sind in der Regel von Art zu

Art sehr unterschiedlich, aber auch bei den verschiedenen Stämmen einer Art kann es hier zu großen Unterschieden kommen. So zeigt *Lb. rhamnosus* E800 eine höhere Temperaturreistenz als *Lb. rhamnosus* GG und *Lb. salivarius* [Corcoran et al., 2004].

Sollen probiotische Bakterien in eine Arzneiform oder ein Lebensmittel eingearbeitet werden, herrschen in diesem Lebensmittel bzw. dieser Arzneiform in der Regel nicht die Umgebungsbedingungen, die die Bakterien zum Überleben brauchen. Daher müssen die Bakterien stabilisiert werden, so dass sie in der Lage sind, einen längeren Zeitraum in einer für sie lebensfeindlichen Umgebung zu überleben. Der Wasseraktivität kommt hier eine besondere Bedeutung zu. Sie ist ein Maß für das frei verfügbare Wasser in einem Produkt und ist abzugrenzen von dem absoluten Wassergehalt des Produktes, der meist höher liegt, da ein Teil des Wassers zum Beispiel durch Zucker gebunden vorliegt und daher nicht für andere Prozesse zur Verfügung steht. Definiert ist sie als Gleichgewichtsfeuchte, die sich bei konstanter Temperatur über einer festen oder flüssigen Substanz in einem abgeschlossenen Raum ausbildet, dividiert durch 100.

$$a_w = \frac{p}{p_s} = \frac{\text{relative Gleichgewichtsfeuchte (\%)}}{100}$$

$p$  = Wasserdampfdruck oberhalb der Materialoberfläche der Probe (Taupunkt)

$p_s$  = Sättigungsdruck = Wasserdampfdruck oberhalb der Oberfläche von reinem Wasser bei gleicher Temperatur

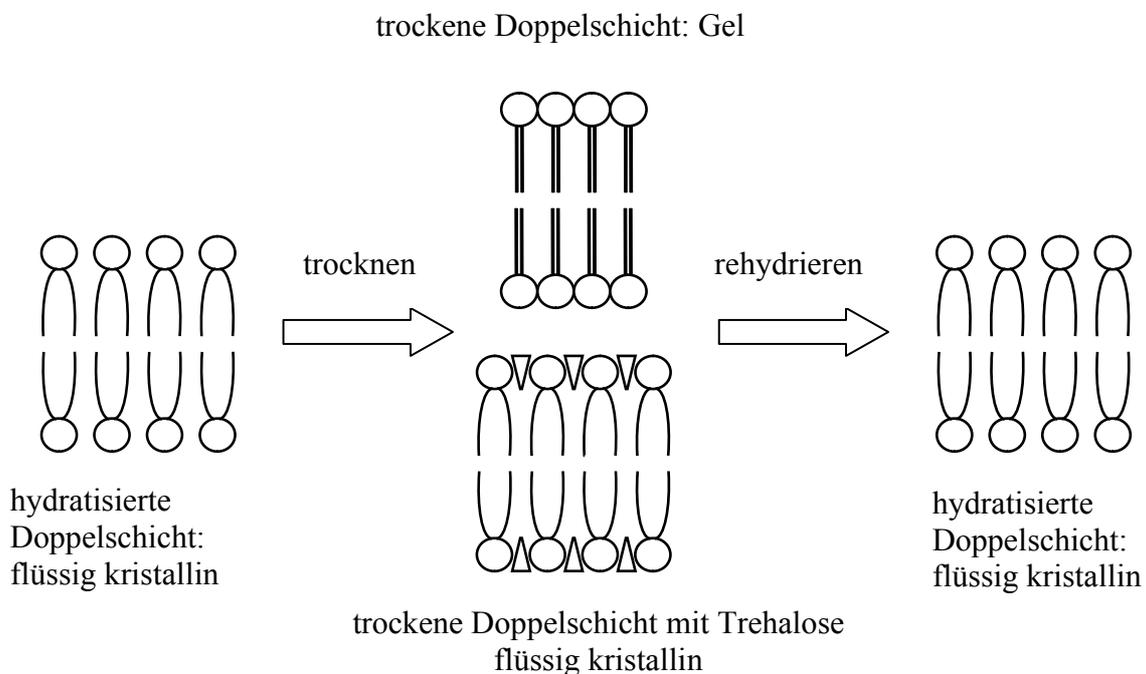
Die Wasseraktivität wird mit einem Wert zwischen 0 und 1,00 angegeben. Die meisten Bakterien benötigen zum Wachsen eine Wasseraktivität von 0,98 [Schlegel, 1992]. Sinkt die Wasseraktivität, wird das Überleben der Bakterien erschwert, und ihre Stoffwechselprozesse werden gestört. Viele Lebensmittel

enthalten Zusatzstoffe wie z. B. Zucker, die die Wasseraktivität herabsetzen. Zuckerzusätze verlangsamen zum Beispiel den Säuerungsprozess in Milch [Shah und Ravula, 2000]. Um das Überleben von Bakterien über einen längeren Zeitraum in Produkten zu gewährleisten, müssen diese entweder eine so hohe Wasseraktivität besitzen, dass die Bakterien in ihrem Stoffwechsel nicht gestört werden, oder aber sie müssen so eine niedrige Wasseraktivität aufweisen, dass sich die Bakterien in einem inaktiven Zustand befinden. Das Überleben von getrockneten Bakterien ist abhängig von ihrem Restwassergehalt [de Valdez et al., 1985]. Es darf allerdings nie zu einem vollständigen Entzug von Wasser kommen, da dies zu einer Denaturierung von Proteinen führt, indem ihre Tertiärstruktur geschädigt wird, und es damit zum Zelltod kommt [Raffalt, 1999].

### ***2.2.1.2 Stabilisierung durch Trocknung***

Ziel der Trocknungsverfahren ist es, die Bakterien in einen Zustand zu versetzen, in dem sie in stoffwechsellinaktiver Form vorliegen. In dieser inaktiven Form sollen die Bakterien über einen längeren Zeitraum haltbar sein und keine großen Keimzahlverluste zeigen. Die beiden wichtigsten Verfahren sind die Gefriertrocknung und die Sprühtrocknung, wobei es sich bei den meisten auf dem Markt befindlichen getrockneten Bakterien um Lyophilisate handelt. Eine besondere Bedeutung kommt den Trocknungsverfahren und den aus ihr resultierenden Schädigungen der Bakterien in dieser Arbeit zu, da getrocknete Bakterien das Ausgangsprodukt für die Mikroverkapselung von probiotischen Bakterien in Fetten darstellen. Eine große Rolle bei beiden Trocknungsverfahren spielen stabilisierende Zusatzstoffe, da der Trocknungsprozess selber die Bakterien schädigt und diese daher während des Prozesses geschützt werden müssen. Es treten verschieden Arten von Schäden bei der Trocknung von Bakterien auf: Durch die Trocknung kommt es zu einer Destabilisierung und der teilweisen Ablösung von Proteinen von der Zelloberfläche [Brennan et al., 1986].

Die bedeutendsten Schäden treten an der Zellmembran auf, die unter der Zellwand sitzt. Sie besteht aus einer Phospholipid-Doppelschicht und ist mit zahlreichen Proteinen durchzogen. Wenn das Wasser aus der Phospholipid-Doppelschicht entfernt wird, nähern sich die hydrophilen Köpfe der Phospholipide an. Daraus resultiert ein Ansteigen der van der Waals-Kräfte zwischen den Molekülen [Crowe et al., 1985; Crowe et al. 1986; Leslie et al., 1995] (Abbildung 2.2).



*Abbildung 2.2 Schematisch Darstellung des Stabilisierungsmechanismus von Trehalose [Oliver et al., 1998, mod.]*

Durch das engere Zusammenrücken der Moleküle geht die Membran in einen Gelzustand über und es kommt zu einer Phasenseparation der Membranbestandteile [Leslie et al., 1995]. Bei der Rehydratation kommt es wieder zu einer Phasenumwandlung von der Gel-Phase zurück in die flüssig kristalline Phase. Wäh-

rend der Phasenumwandlung liegen Gel-Phase und flüssig kristalline Phase nebeneinander vor. In diesem Stadium büßt die Membran ihre Barriereeigenschaften ein, und es kann zu einer Leckage der Zelle kommen [Crowe et al, 1988; Oliver et al, 1998]. Außerdem kommt es bei der Rehydratation zu einem Zusammenfließen von Vesikeln, die in der Membran sitzen, und so zu einem gestörten Stofftransport [Crowe et al, 2001]. Der Zusatz von Zuckern kann die Membran während der Phasenumwandlung stabilisieren, indem sich die Zuckermoleküle als Platzhalter an die Membran anlagern. Die Phasenübergangstemperatur der trockenen Zellen wird dadurch auf einen Wert unter Raumtemperatur herabgesetzt [Leslie et al., 1995]. Auch im trockenen Zustand liegt die Membran nun in einer flüssig kristallinen Form vor. Dadurch kommt es während der Rehydratation nicht zu einem Phasenübergang und damit zu einer undicht werdenden Membran.

Während der Lagerung der trockenen Produkte kann es zu weiteren Membranschäden kommen. Die Lipidperoxidation von ungesättigten Fettsäuren ist ebenfalls von der Wasseraktivität abhängig [Castro et al., 1996] und hat bei niedrigen Wasseraktivitätswerten ein Maximum.

Bei gleichen Kultivierungsbedingungen und gleichen Hilfsstoffzusätzen ist das Überleben der Bakterien nach der Gefriertrocknung höher als bei der Sprühtrocknung. Bei der Sprühtrocknung kommt es zu Schäden, die durch den Trocknungsprozess verursacht werden, wobei durch den Temperaturstress noch besondere Schäden verursacht werden [To und Etzel, 1997]. Die Gefriertrocknung ist somit das schonendere Verfahren. Allerdings hat es den Nachteil, dass man kein fließfähiges Pulver als Produkt erhält, sondern einen Block, der noch weiter zerkleinert werden muss. Bei diesen zerkleinerten Partikeln liegt immer ein Anteil der Bakterien ungeschützt an der Oberfläche. Je kleiner die Partikel sind, desto mehr Bakterien sind ungeschützt. Bei sprühgetrockneten Bakterien ist der Teil der ungeschützten Bakterien gering, da sich beim Trocknen des Tropfens der schützende Hilfsstoff um das Bakterium legt und dieses einschließt.

### ***2.2.1.3 Stabilisierung durch Einbettung in Polymere***

Die Stabilisierung von Bakterien durch Einbettung in eine Gel Matrix unterscheidet sich grundlegend von der Stabilisierung durch Trocknung, da in diesem Fall stoffwechselaktive Bakterien verkapselt werden. Es werden dabei zwei Ziele verfolgt. Durch die Verkapselung sind die Bakterien leichter wieder aus Produkten zu entfernen, und sie sind während ihres Einsatzes vor äußeren Einflüssen wie Scherstress geschützt. Im fertigen Produkt werden die Bakterien durch die sie umgebende Matrix vor extremen pH-Werten geschützt. Auch in Produkten, die eingefroren werden, zeigt die Einbettung einen gewissen Schutz. Shah und Ravula zeigten, dass verkapselter *Lb. acidophilus* nach 12 Wochen Lagerung in gefrorenem Dessert eine größere Überlebensrate aufzeigt als unverkapselter *Lb. acidophilus* [Shah und Ravula, 2000]. Sheu und Marshal haben gezeigt, dass die Einbettung von Bakterien das Überleben in gefrorener Milch fördert und dass auch bei anschließender Gefriertrocknung das Überleben der Bakterien gefördert wird [Sheu und Marschal, 1993]. Dagegen haben Godward und Kailasapathy keinen positiven Effekt der Verkapselung von *Lb. acidophilus* in Alginat während einer 24-wöchigen Einlagerung in Eiskrem zeigen können [Godward und Kailasapathy, 2003].

Für probiotische Bakterien ist es wichtig, in ausreichender Anzahl die Magen-Darm-Passage zu überstehen. Die Verkapselung mit Alginat erhöht deutlich die Toleranz gegenüber der Magensäure und gegenüber Gallensalzen [Shah und Ravula, 2000].

Zur Einbettung von stoffwechselaktiven Bakterien werden vor allem Carrageenan, Alginat und Chitosan verwendet [Groboillot et al., 1994]. In Einzelfällen kommen auch Materialien wie Acrylsäure und Methacrylsäure zum Einsatz [Bykov et al., 2001]. Im Falle von Alginat können die Kapseln noch mit einem Film aus Chitosan überzogen werden [Koo et al, 2001]. Bei der Verkapselung kommen vor allem zwei Verfahren zur Anwendung. Die Bakterien enthaltende wäss-

rige Polymerlösung wird entweder in einem Öl emulgiert und durch Zugabe einer Lösung mit mehrwertigen Ionen ausgehärtet, oder die Polymerlösung wird direkt in ein Ionenbad zur Aushärtung eingetropf. Dies kann durch eine Vibrationsdüse, einer Düse mit coaxialem Luftstrom oder einer piezoelektrischen Düse erfolgen [Groboillot et al., 1994]. Die Verkapselung mit Acrylsäure/Methacrylsäure erfolgt über Coazervation.

## **2.2.2 Weitergehende Verfahren zur Stabilisierung getrockneter probiotischer Bakterien**

### ***2.2.2.1 Stabilisierung mit Fetten***

Der Einsatz von probiotischen Bakterien im Lebensmittel ist in der praktischen Anwendung mit einigen Problemen behaftet, da die Bakterien sowohl während der Herstellung als auch während der Lagerung und des Verzehrs Stressbedingungen ausgesetzt sind, die zu einer Abnahme der Keimzahl führen können.

Durch das Einbetten der getrockneten Bakterien in Fetten wird versucht, die größten Probleme beim Einsatz von Probiotika zu umgehen. Die Einbettung in Fett bietet:

- Schutz der getrockneten Bakterien vor Feuchtigkeit bei der Lagerung
- Schutz vor Oxidation durch Luftsauerstoff während der Lagerung
- Schutz der Bakterien vor Magensaft und Gallensalzen beim Verzehr
- Schutz des Produktes vor den Stoffwechselprodukten der Bakterien (Nachsäuerung von Milchprodukten)
- Schutz der Bakterien vor hohen Salz- oder Säuregehalten im Produkt

Nicht nur in der Nahrungsmittelindustrie sondern auch in der pharmazeutischen Industrie und der Futtermittelherstellung wird dieser Ansatz schon seit den siebziger Jahren verfolgt. Bis heute haben sich aber nur vereinzelt Produkte auf den Markt durchgesetzt. Im Pharmazeutischen Bereich ist hier das einzige Produkt Vagiflor<sup>®</sup>. Es handelt sich hierbei um ein Vaginalsuppositorium zur Behandlung von Störungen der Vaginalflora und der Nachbehandlung bei Antibiotika-Therapie [Rote Liste, 2004]. Die bis jetzt beschriebenen Ansätze in der Lebensmittel- und Futtermittelindustrie lassen sich in zwei Gruppen aufteilen: Die getrockneten Bakterien werden in einer flüssigen oder halbfesten Zubereitung auf Ölbasis suspendiert [Runeman, 2003; Lewenstein, 1986; Porubcan, 1985; Sokhey, 2003], oder sie werden in ein bei Raumtemperatur festes Fett eingearbeitet. Bei der Einbettung von trockenen probiotischen Bakterien zur Erzeugung von Pulvern und Granulaten kommen zwei Techniken zum Einsatz. Das Bakterienpulver wird im Fließbett mit aufgeschmolzenen Fett überzogen [Durand, 2001; Pacifico, 2001] oder eine Suspension aus aufgescholzenem Fett und Bakterienpulver wird sprüherstartt [Rutherford, 199; Sozzi, 1982]. Die Bakteriensuspension kann aber auch direkt auf das Nahrungsmittel aufgesprüht werden [Kneifel, 1996]. In Tabelle 2.3 sind die Patente zu den jeweilig beschriebenen Prinzipien aufgeführt.

Bei allen Ansätzen handelt es sich bei den getrockneten Bakterien um Lyophilisate. Lyophilisate haben gegenüber sprühgetrockneten Bakterien den Nachteil, dass sie nach der Lyophilisation noch weiter zerkleinert werden müssen (siehe 2.2.1.2).

Den Beweis, dass die Einbettung in Fetten tatsächlich einen Schutz vor hoher Feuchtigkeit während der Lagerung bietet, hat 2001 die Balchem Corporation angetreten [Suita-Cruce, Goulet, 2001]. Die von ihnen hergestellten Partikel sind jedoch sehr groß (> 1mm) und daher nicht in allen Lebensmitteln universell einsetzbar.

*Tabelle 2.3 Patente zur Stabilisierung von Bakterien in Fetten.*

Jahr	Patentnummer	Inhalt
1982	US4332790	Sprüherstarrte Partikel als Nahrungsmittelzusatz [Sozzi et al., 1982]
1985	US4518696	Bakteriensuspension für Tierfutter [Porubcan, Gehrman, 1985]
1986	EP0180743	Bakteriensuspension für Tierfutter [Lewenstein, 1986]
1992	WO9212234	Sprüherstarrte Partikel für Tierfutter [Rutherford et Al., 1992]
1995	EP0666031	Creme für Nahrungsmittel [Lauro, 1995]
1996	EP0704164	Konfekt [Baba et al., 1996]
1996	WO9716077	Müsli [Kneifel et al., 1997]
2001	US6251478	Granulat aus der Wirbelschicht [Pacifico et al., 2001]
2001	WO2001068808	Granulat aus der Wirbelschicht [Durand und Panes, 2001]
2003	WO03053397A1	mit Ölsuspension getränkte Hygienetücher [Runeman et al., 2003]
2003	WO03009710A1	Bakteriensuspension für Tierfutter [Sokhey et al., 2003]

### **2.2.2.2 Sonstige Verfahren**

Um trockene probiotische Bakterien zu stabilisieren, kommen noch weitere Ansatzmöglichkeiten in Frage. Diese berücksichtigen allerdings jeweils nur eines der Probleme, die bei der Lagerung bzw. dem Verzehr probiotischer Produkte auftreten. Viernstein beschrieb die Mischung von lyophilisierten probiotischen Bakterien mit Puffersubstanzen, um das Überleben der Bakterien während der Magenpassage zu gewährleisten, indem die Puffersubstanzen das saure Milieu des Magensaftes abpuffern [Viernstein, 2000]. Er beschrieb ebenfalls die Tro-

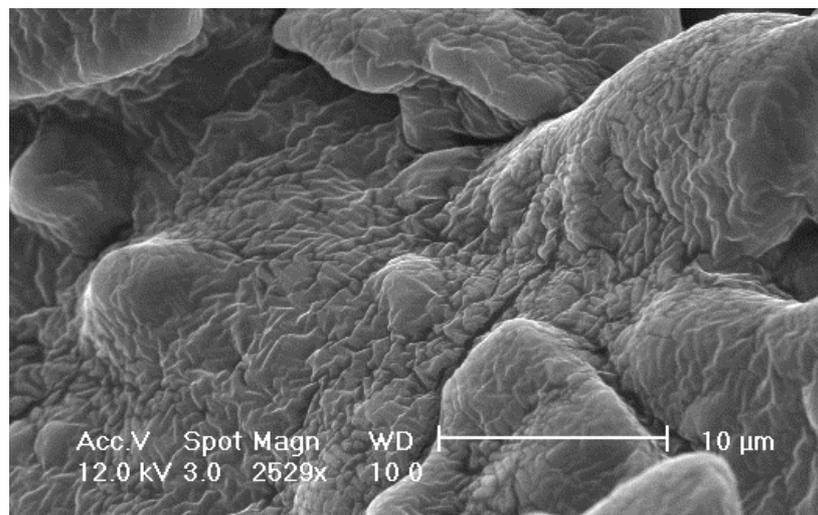
ckengranulation von Lyophilisaten mit magensaftresistenten Polymeren, um eine sichere Magenpassage der Bakterien zu gewährleisten [Viernstein et al, 1997]. Der Ansatz eines magensaftresistenten Überzugs wird auch von Bug beschrieben [Bug et al., 2001]. Allerdings beschrieb er den Überzug von Tabletten, Dragees, Granulaten und Pulvern mit magensaftresistenten Polymeren aus wässrigen bzw. organischen Lösungen. Joly beschrieb die Einbettung von getrockneten Bakterien in Pellets, die durch Extrudation und anschließende Sphäronisation hergestellt werden. Nach einem Trocknungsschritt werden dann diese Pellets mit üblichen magensaftresistenten Polymeren überzogen [Joly et al, 2004].

Eine andere Möglichkeit ist, die getrockneten Bakterien mit Laktulose mit niedrigem Wassergehalt zu mischen, um die Überlebensfähigkeit der Bakterien während der Lagerung zu gewährleisten [Katsuhiro, 1979]. Engel und Brocker stabilisieren gefriergetrocknete Bakterien, indem sie sie mit Füllmitteln verschiedener Art wie zum Beispiel Oligosacchariden, mikrokristalliner Cellulose oder Polyvinylpyrrolidon mischen und dann die Mischung in spezielle Hartkapseln mit besonders niedrigem Wassergehalt abfüllen [Engel und Brocker, 2001].

### 3 SCHAFFUNG DER VORAUSSETZUNGEN FÜR DIE EINBETTUNG VON BAKTERIEN

#### 3.1 Einleitung

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Keim handelt es sich um gefriergetrockneten, grob gemahlene Lb. casei 163 der Firma Danisco (Niebüll).



*Abbildung 3.1 REM Aufnahme des Lyophilisates*

Abbildung 3.1 zeigt eine REM Aufnahme der Oberfläche des Lyophilisates. Die einzelnen Bakterien sind auf der Oberfläche des Lyophilisatpartikels gut zu erkennen. Im Laufe der Arbeit hat sich jedoch herausgestellt, dass die Einbettung von handelsüblichem Lyophilisat in Fett ohne weitere Zerkleinerung des Lyophilisates nicht die gewünschte Stabilität der Bakterien bewirkt. Das Lyophilisat wurde dazu in einem Verhältnis von 1:10 mit dem Fett (Witepsol<sup>®</sup> E 85) gemischt und vermahlen. Das Verhältnis von Lyophilisat zu Fett war im Vergleich zu anderen Arbeiten relativ klein, wie die Auflistung in Tabelle 3.1 belegt.

*Tabelle 3.1 Literaturangaben zur Keimbelastung von Fettpartikeln*

Referenz	Anteil an Lyophilisat
Kneifel et al., 1997	10 % - 25 %
Pacifico et al., 2001	1 % - 70 %
Rutherford et al., 1992	10 % - 50 %

Das bei der Mahlung erhaltene Lyophilisat enthaltende Fettpulver wurde bei 0 % RH, 33 % RH und 100 % RH über sechs Wochen bei Raumtemperatur eingelagert und die Keimzahl des Fettpulvers in regelmäßigen Abständen bestimmt. Die Abbildung 3.2, Abbildung 3.3 und Abbildung 3.4 zeigen den Verlauf der Keimzahl der Fettpartikel während der Einlagerung im Vergleich zu unverkapseltem Lyophilisat. Während der Einlagerung bei 0 % RH (Abbildung 3.2) findet über einen Zeitraum von sechs Wochen weder bei dem Lyophilisat noch bei dem eingebetteten Lyophilisat eine Abnahme der Keimzahl statt. Bei der Einlagerung bei 33 % RH (Abbildung 3.3) und 100 % RH (Abbildung 3.4) sieht man jedoch deutliche Unterschiede zwischen eingebettetem und nicht eingebettetem Lyophilisat. Bei 33 % RH sinkt die Keimzahl des Lyophilisates erwartungsgemäß, da das Lyophilisat auf Grund seiner Zusammensetzung Wasser aufnimmt. Die Wasseraktivität steigt an, was ein Absterben der Bakterien zur Folge hat. Die Einbettung in Fett zeigt hier keinen Schutz. Die Bakterien sterben sogar schneller ab, als es bei dem unverkapselten Lyophilisat der Fall ist.

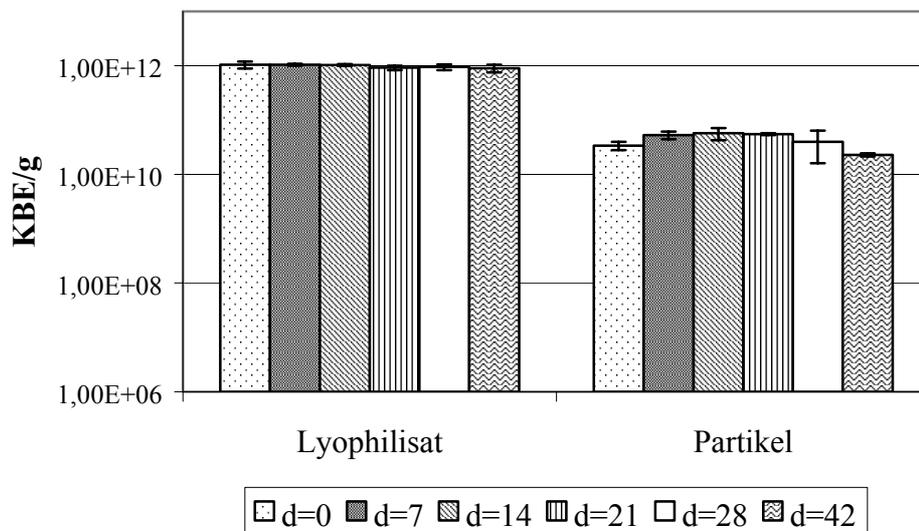


Abbildung 3.2 Vergleich der Keimzahl von Lyophilisat enthaltenden Fettpartikeln und freiem Lyophilisat während der Einlagerung bei 0 % RH über 6 Wochen

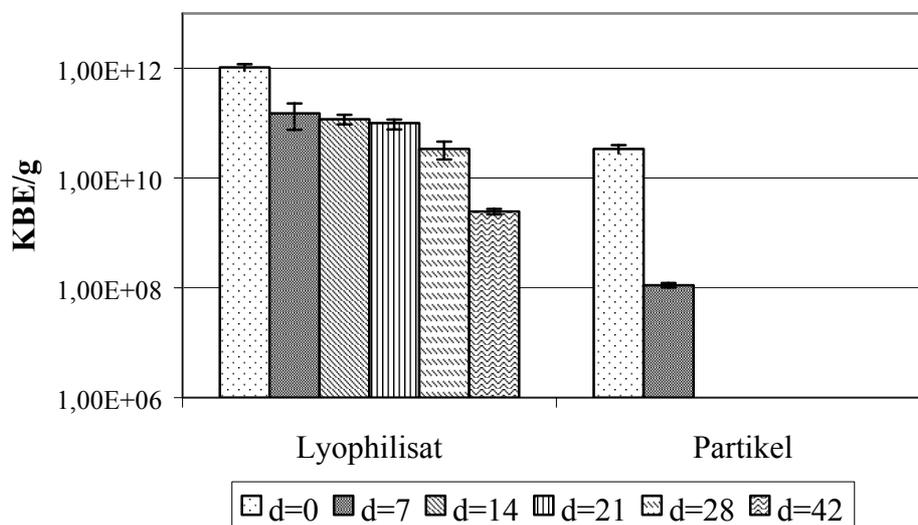
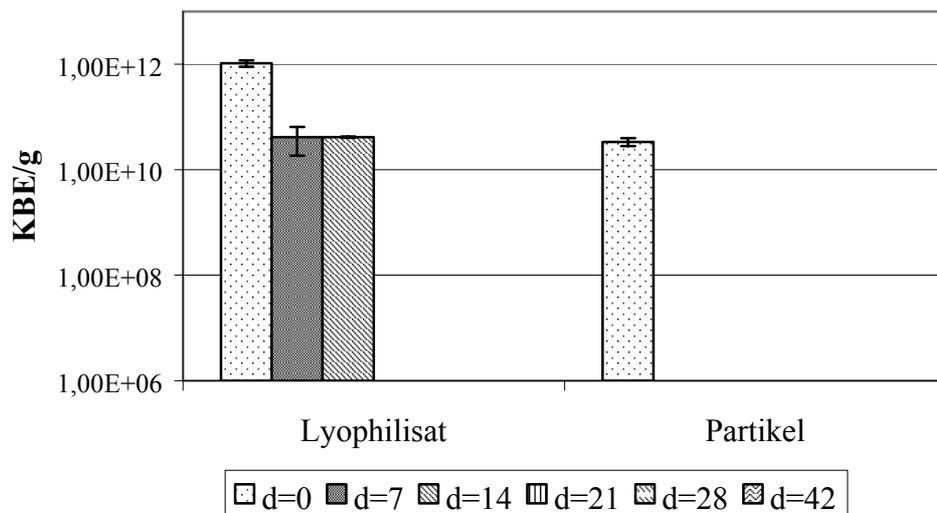


Abbildung 3.3 Vergleich der Keimzahl von Lyophilisat enthaltenden Fettpartikeln und freiem Lyophilisat während der Einlagerung bei 33 % RH über 6 Wochen



*Abbildung 3.4 Vergleich der Keimzahl von Lyophilisat enthaltenden Fettpartikeln und freiem Lyophilisat während der Einlagerung bei 100 % RH über 6 Wochen*

Die Tatsache, dass die eingebetteten Bakterien in einem so großen Maße in kurzer Zeit absterben, zeigt, dass sie durch das Fett nicht vor Feuchtigkeit geschützt werden. Es muss festgestellt werden, dass sie sogar schneller absterben als die nicht eingebetteten Partikel. Dies kann damit begründet werden, dass die Bakterien bei der Einbettung in Fett durch Kryomahlung Stressbedingungen wie erhöhter Temperatur und Scherkräften ausgesetzt sind, durch die sie geschädigt werden. Die Erhöhung der Wasseraktivität wirkt sich demzufolge auf die vorgeschädigten eingebetteten Bakterien stärker aus als auf die nicht eingebetteten Bakterien.

Dasselbe Phänomen zeigt sich auch bei der Einlagerung bei 100 % RH. Erwartungsgemäß sinkt die Keimzahl bei dem nicht eingebetteten Lyophilisat stärker ab als bei der Einlagerung bei 33 % RH. Auch hier lässt sich kein schützender Effekt durch das Fett erzielen.

Die Entwicklung der Wasseraktivität während der Einlagerung bei den drei verschiedenen Luftfeuchten wird durch die Ergebnisse der Einlagerungsversuche

widergespiegelt (Abbildung 3.5). Am Tag der Herstellung ist die Wasseraktivität mit 0,317 noch in einem Bereich, der für das Überleben der Bakterien zu hoch ist. Der Wert kommt dadurch zustande, dass sich während der Mahlung auf Grund der Kühlung der Mühle mit flüssigem Stickstoff Kondenswasser auf den Partikeln niederschlägt. Im Verlauf der Lagerung bei 0% RH sinkt der Wert jedoch schnell in einen Bereich unter 0,2, in dem die Bakterien gut überleben können. Bei Lagerung bei 33 % RH und 100 % RH steigt der Wert jedoch auf Werte, bei denen die Bakterien nicht über längere Zeit überleben können. Bei der Probe, die bei 33 % RH gelagert wurde, sieht man, dass sich über 2 Wochen ein Gleichgewicht zwischen Probe und Umgebung einstellt. Da das Fett selbst keine Wechselwirkungen mit der umgebenden Luftfeuchte eingeht, wird die Wasseraktivität der Probe offensichtlich nur von dem Lyophilisat bestimmt. Dies ist ein Beweis dafür, dass das Lyophilisat nicht von dem Fett umschlossen ist.

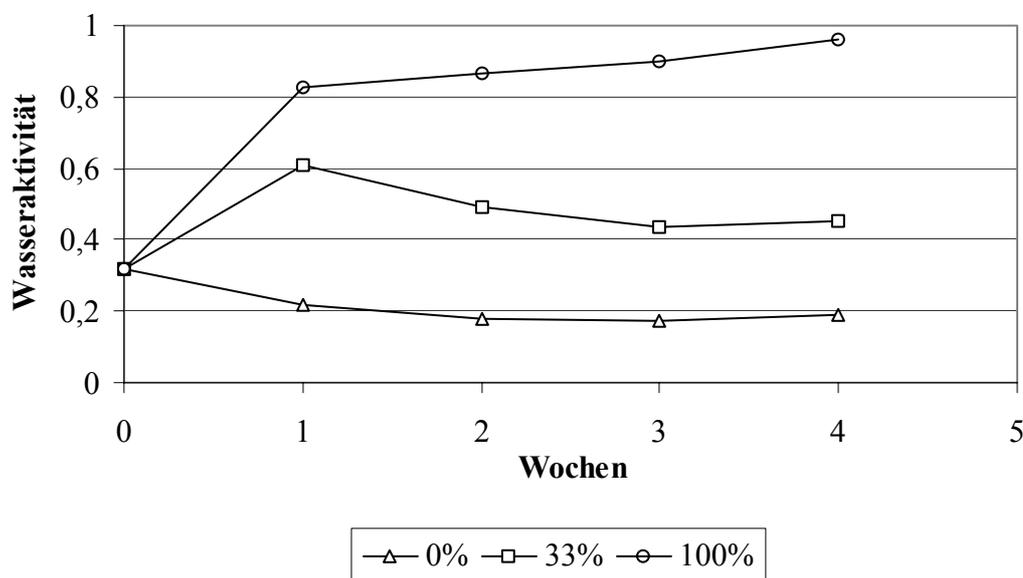


Abbildung 3.5 Wasseraktivität von in Fettpartikeln eingebetteten Lyophilisat bei Einlagerung bei verschiedenen Luftfeuchten über 4 Wochen

Bei dem Vergleich der Gewichtszunahme von Partikeln, die Lyophilisat enthalten, und reinen Fettpartikeln während der Lagerung bei verschiedenen Luftfeuchten kann man sehen, dass der Einschluss des Lyophilisates in das Fett nicht gelungen ist (Abbildung 3.6). Die gestrichelten Linien stellen die Gewichtszunahme der reinen Fettpartikel dar. Sie nehmen während der Lagerung nicht an Gewicht zu. Wäre das Lyophilisat vollständig von dem Fett umschlossen, würden die Partikel mit dem Lyophilisat (schwarze Linien) auch nicht an Gewicht zunehmen.

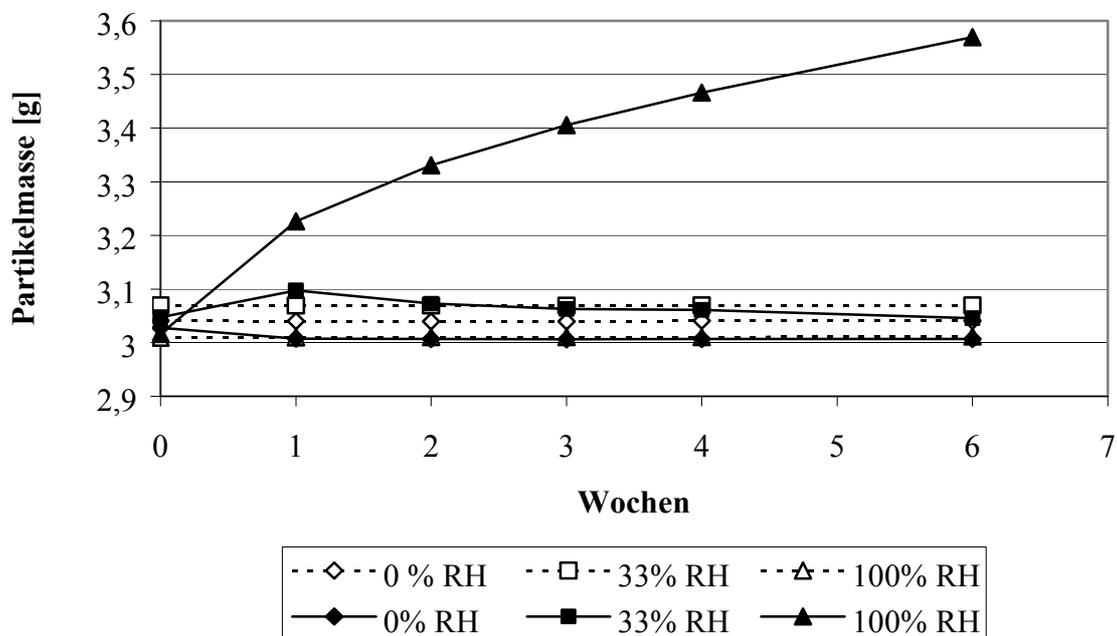


Abbildung 3.6 Wasseraufnahme von in Fettpartikeln eingebettetem Lyophilisat bei Einlagerung bei verschiedenen Luftfeuchten über 6 Wochen (gestrichelt: Fettpartikel ohne Bakterien, schwarz: Fettpartikel mit Bakterien)

Sie zeigen aber bei Einlagerung über sechs Wochen bei 100 % RH eine deutliche Gewichtszunahme von 18,3 %. Vergleicht man die Wasseraufnahme der Partikel mit ihrer Wasseraktivität, kann man weiterhin feststellen, dass die Was-

seraktivität nicht mit dem Wassergehalt korreliert. Die Wasseraktivität steigt bei der Einlagerung bei 33 % RH deutlich an, während das Gewicht der Probe sich kaum verändert. Der Grund für die schlechte Einbettung liegt in der Partikelgröße des Lyophilisates. Die Lyophilisatpartikel haben eine sehr breite Partikelgrößenverteilung wobei die größten Partikel eine Größe von ca. 400 µm haben. Werden die Partikel in dem Fett suspendiert und dann gemahlen, ist die Wahrscheinlichkeit sehr groß, dass bei der Mahlung ein Bruch in der Art erfolgt, dass das Lyophilisat an der Oberfläche der entstehenden Partikeln liegt. Das Fett bietet für die Lyophilisatpartikel aber nur dann einen Schutz, wenn es sie vollständig umschließt. Das verwendete handelsübliche Lyophilisat ist daher nicht für die Einbettung per Kryomahlung geeignet.

Um das Problem des freiliegenden Lyophilisates zu umgehen, müssen die Lyophilisatpartikel verkleinert werden. Dies kann auf zwei verschiedene Arten geschehen. Das Lyophilisat kann durch weitere Mahlschritte oder durch Hochdruckhomogenisation in einem Öl stärker zerkleinert werden. Eine weitere Möglichkeit wäre, die gefriergetrockneten Bakterien zu resuspendieren, um sie anschließend einer Sprühtrocknung zu unterziehen. Bei der Sprühtrocknung entsteht im Gegensatz zur Lyophilisation ein Pulver, das nicht weiter zerkleinert werden muss.

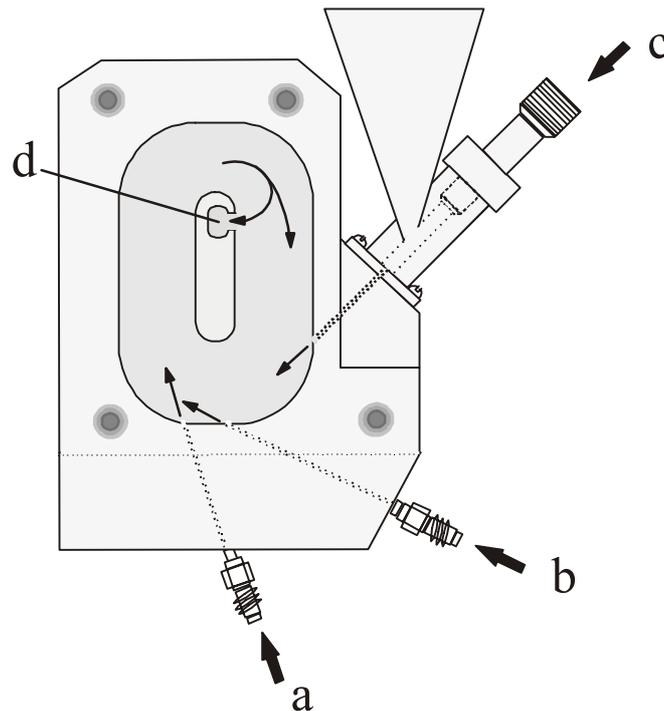
## **3.2 Mikronisierung des Lyophilisates in der Luftstrahlmühle**

### **3.2.1 Einleitung**

Die einfachste Möglichkeit das Lyophilisat weiter zu zerkleinern besteht darin, einen weiteren Mahlschritt durchzuführen. Die angestrebte Partikelgröße sollte dabei die Größe der Bakterien überschreiten. Sie sollte aber mindestens um ein Zehntel kleiner als die Partikelgröße der später herzustellenden Fettpartikel sein. Bei dem verwendeten Lyophilisat handelt es sich um eine Starterkultur, die

normalerweise in der Lebensmittelproduktion zur Ansäuerung von Milchprodukten eingesetzt wird. Bei dem Einsatz als Starterkultur wird das Lyophilisat wieder aufgelöst. Die Partikelgrößenverteilung des Lyophilisatpulvers ist daher von geringer Bedeutung, sodass sie weder standardisiert noch sehr homogen ist. Die Ausgangspartikelgröße des Lyophilisates lässt sich auf Grund dessen nur schlecht genau bestimmen. Die größten Partikel liegen bei ca. 400  $\mu\text{m}$ .

Die Auswahl der Mühle für die weitere Zerkleinerung des Lyophilisates hängt von den Eigenschaften des zu vermahlenden Gutes und von dem angestrebten Zerkleinerungsgrad ab [Bauer et al, 1999]. Für eine Zerkleinerung, die eine Partikelgröße von unter 30  $\mu\text{m}$  anstrebt, kommen Luftstrahlmühlen und Kugelmühlen in Frage. Das für die Feinstzerkleinerung ( $< 20 \mu\text{m}$ ) am häufigsten eingesetzte Verfahren ist die Trockenmahlung in der Luftstrahlmühle [Rasenack, 2003]. Der Vorteil dieser Methode beruht auf der im Vergleich zum Energieeintrag niedrigen thermischen Belastung des Mahlgutes. Als Trägergas für die Mahlung wird Stickstoff verwendet. Dieser wird mit hohem Druck in den Mahlraum gepresst, wobei das Gas expandiert und seine kinetische Energie auf die Partikel überträgt [Fluid Energy, 2004]. Die Zerkleinerung erfolgt im unteren Teil des Ovals vor allem durch Reibung und Stoß der Partikel untereinander. Die Partikel werden durch den Gasstrom in den Sichtungsbereich der Mühle getragen. Auf Grund von Zentrifugalkräften schichten sich die Partikel so, dass die Partikelgröße von innen nach außen zunimmt. Im Sichter ändert sich nun die Strömungsrichtung des Gases. Kleine Partikel werden mit dem Gas aus der Mühle ausgetragen, während größere Partikel auf Grund ihrer Trägheit wieder in den Mahlbereich getragen werden [Fluid Energy, 2004]. Die resultierende Partikelgröße ist also weniger von der Ausgangspartikelgröße als von dem angelegten Druck und damit der Strömungsgeschwindigkeit des Gases abhängig. Durch die schnelle Expansion des Trägergases wird die thermische Belastung für die Bakterien niedrig gehalten.



*Abbildung 3.7 Schematische Darstellung der Luftstrahlmühle (a) Düse a, (b) Düse b, (c) Düse für den Einlass, (d) Sichter*

Für die folgenden Versuche wurde eine Ovalrohrstrahlmühle (Abbildung 3.7) verwendet. Am Boden der Mühle befinden sich zwei Mahldüsen, die im Folgenden als Düse a und Düse b bezeichnet werden. Der dort angelegte Druck ist für die Zerkleinerung der Partikel verantwortlich. Seitlich am Einlass befindet sich eine dritte Düse. Der an ihr angelegte Druck muss immer höher sein als der Druck der anderen Düsen. So entsteht am Einlass ein Unterdruck, der das zu mahlende Gut in die Mühle saugt. Da das Lyophilisat neben den Bakterien vor allem Zucker zur Stabilisierung enthält, ist die Oberfläche eher hydrophil und so von dem Fett, in dem es später eingeschlossen werden soll, schlecht benetzbar. Durch die Mahlung und der daraus resultierenden Oberflächenvergrößerung wird dieses Problem noch verstärkt. Die Co-Mahlung mit einem hydrophoben Hilfsstoff kleiner Partikelgröße kann hier Abhilfe schaffen, indem sich die Partikel des Hilfsstoffes auf die Oberfläche der Lyophilisatpartikel anlagern und diese hydrophober machen.

### 3.2.2 Einfluss des Druckes auf Keimzahl und Partikelgröße

#### 3.2.2.1 Durchführung

Um zu untersuchen, welchen Einfluss der Druck auf die Keimzahl und die Partikelgröße hat, wurde das Lyophilisat und eine Mischung aus Lyophilisat und 5 % Magnesiumstearat nach dem in Tabelle 3.2 angegebenen Mahlschema vermahlen. Pro Mahlgang wurden zwei bis drei g des Pulvers mit Hilfe einer Vibrationsrinne langsam in die Mühle gegeben. Auf Grund der schlechten Fließfähigkeit des Lyophilisates konnte die pro Zeit eingebrachte Menge nicht genau bestimmt werden. Dies war aber auch nicht nötig, da sie keinen Einfluss auf die Partikelgröße ausübt und der Einfluss auf die Keimzahl stammabhängig ist [Picot & Lacroix, 2003]. Die Mischung von Lyophilisat und Magnesiumstearat ließ sich jedoch deutlich besser dosieren. Das Lyophilisat ist auf Grund der zugesetzten Stabilisatoren hygroskopisch. Durch den Zusatz von 5 % Magnesiumstearat wird es hydrophobisiert und dadurch erlangt das Pulver bessere Fließeigenschaften. Von dem gemahlen Gut wurden dann jeweils Partikelgröße und Keimzahl bestimmt.

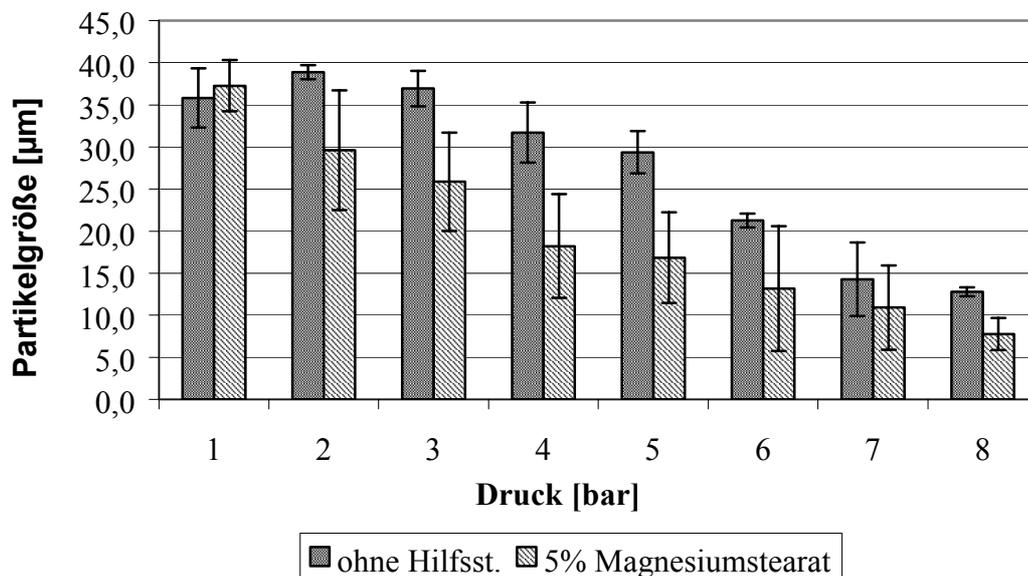
*Tabelle 3.2 Mahlschema*

Druck Düse a [bar]	Druck Düse b [bar]	Zahl der Zyklen
1	1	1
2	2	1
3	3	1
4	4	1
5	5	1
6	6	1
7	7	1
8	8	1

### 3.2.2.2 Ergebnisse

#### *Einfluss auf die Partikelgröße*

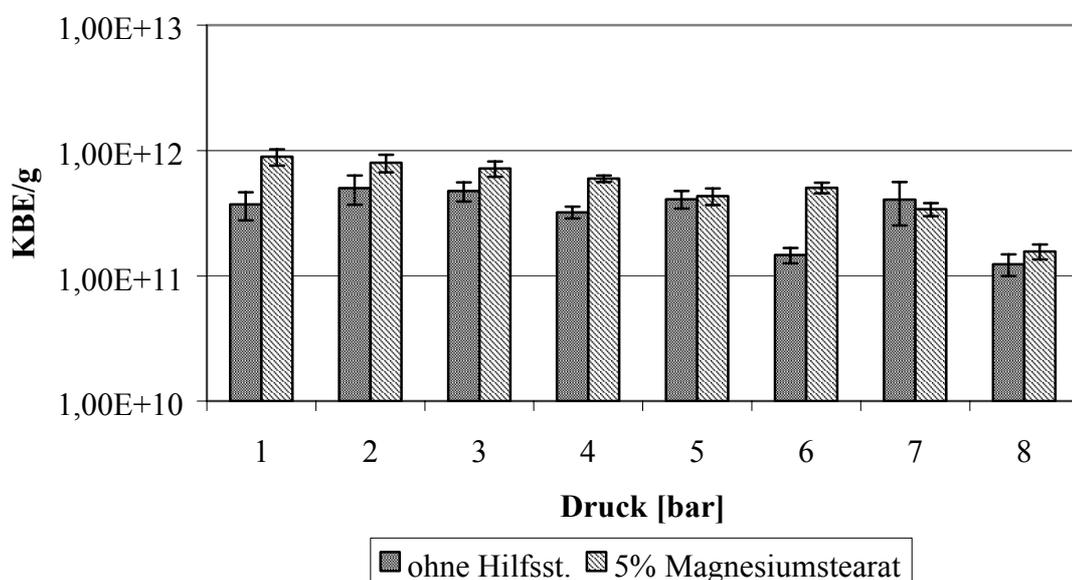
Die Partikelgröße des Lyophilisates nimmt erwartungsgemäß mit steigendem Druck ab. Man kann jedoch einen deutlichen Unterschied zwischen dem reinen Lyophilisat und der Mischung mit 5 % Magnesiumstearat erkennen (Abbildung 3.8). Die Partikel der Mischung sind bei Drücken von 3 bar bis 5 bar deutlich kleiner. Magnesiumstearat wird in der pharmazeutischen Technologie als Gleit-, Schmier- und Formtrennmittel bei der Tablettierung und Kapselfüllung eingesetzt [Hunnius, 1998]. Durch den Zusatz von Magnesiumstearat wird die kinetische Energie des Gases besser auf die Partikel übertragen und dadurch werden sie kleiner.



*Abbildung 3.8 Abnahme der Partikelgröße in Abhängigkeit vom angelegten Druck*

*Einfluss auf die Keimzahl*

Anders als erwartet nimmt die Keimzahl bei steigendem Druck nur wenig ab, wobei dieser Effekt bei der Mischung von Lyophilisat und Magnesiumstearat deutlicher zutage tritt als bei dem reinen Lyophilisat. Tendenziell liegt die Keimzahl der Mischung über der des reinen Lyophilisates, trotz geringerer Partikelgröße. Der Zusatz von Magnesiumstearat zeigt auch in Bezug auf die Keimzahl einen positiven Effekt.



*Abbildung 3.9 Abnahme der Keimzahl in Abhängigkeit vom angelegten Druck*

**3.2.3 Einfluss der Einzeldrücke auf Keimzahl und Partikelgröße**

**3.2.3.1 Durchführung**

Da sich bei dem vorangegangenen Versuch die Mischung aus Lyophilisat und Magnesiumstearat als günstig erwiesen hat, wurden auch in den folgenden Versuchen jeweils 5 % Magnesiumstearat dem Lyophilisat zugemischt.

Die Durchführung der Mahlung erfolgte wie in 3.2.2.1 beschrieben, allerdings mit anderen Drücken (Tabelle 3.3 und Tabelle 3.4). Da es durch den hohen Energieeintrag zu einer Abnahme der Keimzahl kommt, wurde versucht, den Energieeintrag zu senken, indem der Druck jeweils bei einer der beiden Mahldüsen konstant niedrig gehalten wurde. Außerdem wurde der Einfluss der Zyklenzahl untersucht. Die Proben wurden nach den folgenden Mahlschemata vermahlen.

*Tabelle 3.3 Mahlschema a: Konstanter Druck auf Düse a*

Druck Düse a [bar]	Druck Düse b [bar]	Zahl der Zyklen
1	2	1
1	2	2
1	2	3
1	5	1
1	5	2
1	5	3
1	8	1
1	8	2
1	8	3

*Tabelle 3.4 Mahlschema b: Konstanter Druck auf Düse b*

Druck Düse a [bar]	Druck Düse b [bar]	Zahl der Zyklen
2	1	1
2	1	2
2	1	3
5	1	1
5	1	2
5	1	3
8	1	1
8	1	2
8	1	3

### **3.2.3.2 Ergebnisse**

#### *Einfluss auf die Partikelgröße*

Beim Vergleich der Abbildungen Abbildung 3.10 und Abbildung 3.11 fällt auf, dass ein konstant niedriger Druck auf Düse a (Abbildung 3.10) zu einer kleineren Partikelgröße führt als bei einem konstant niedrigen Druck auf Düse b (Abbildung 3.11). Das lässt sich durch die Anordnung der beiden Düsen zueinander erklären. Die Düsen sind so angeordnet, dass bei gleichem Druck auf beiden Düsen es nur zu einem minimalen Kontakt von Wand und Partikeln kommt. Die Düse a ist so ausgerichtet, dass der aus ihr kommende Gasstrom die Partikel auf der Geraden beschleunigt. Die Düse b ist so ausgerichtet, dass bei einem vollständigen Wegfall des Druckes auf Düse a die Partikel gegen die Wand der Mahlkammer geschossen werden. Liegt nun auf beiden Düsen ein Druck an, werden die Partikel auf der Kreisbahn gehalten, indem die Partikel, wenn sie von Düse b in Richtung Wand beschleunigt werden, durch den Druck auf Düse a

umgelenkt werden. Liegt nun auf der Düse b ein größerer Druck an als auf Düse a, kommt es neben den Zusammenstößen der Partikel untereinander vermehrt zu einem Aufprall auf die Wandung der Mahlkammer. Die Partikel werden dadurch kleiner, als wenn sie nur untereinander zusammenstoßen würden. Der Druck auf Düse b hat also einen größeren Einfluss auf die Partikelgröße als der Druck auf Düse a. Dafür spricht auch, dass die Partikelgröße bei einem konstant niedrigen Druck auf Düse a mit Zunahme der Zyklenanzahl nicht mehr wesentlich abnimmt, während man bei einem konstant niedrigen Druck auf Düse b zwischen dem ersten und zweiten Mahlgang bei fünf und acht bar noch eine Abnahme der Partikelgröße beobachten kann. Der maximale Zerkleinerungsgrad ist hier erst nach dem zweiten Zyklus erreicht.

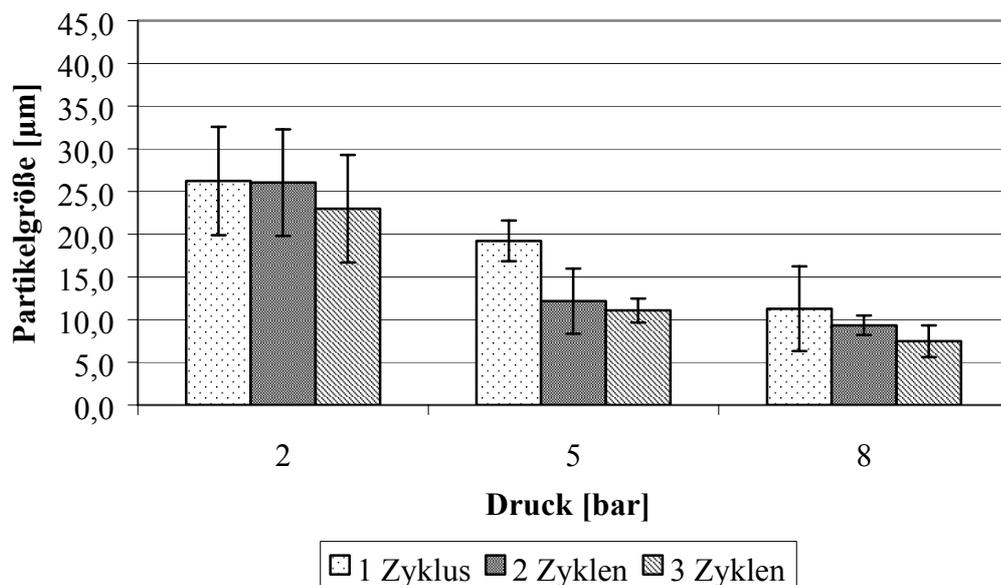


Abbildung 3.10 Abnahme der Partikelgröße in Abhängigkeit von Druck und Zyklenzahl (Druck Düse a: konstant, Druck Düse b: variabel)

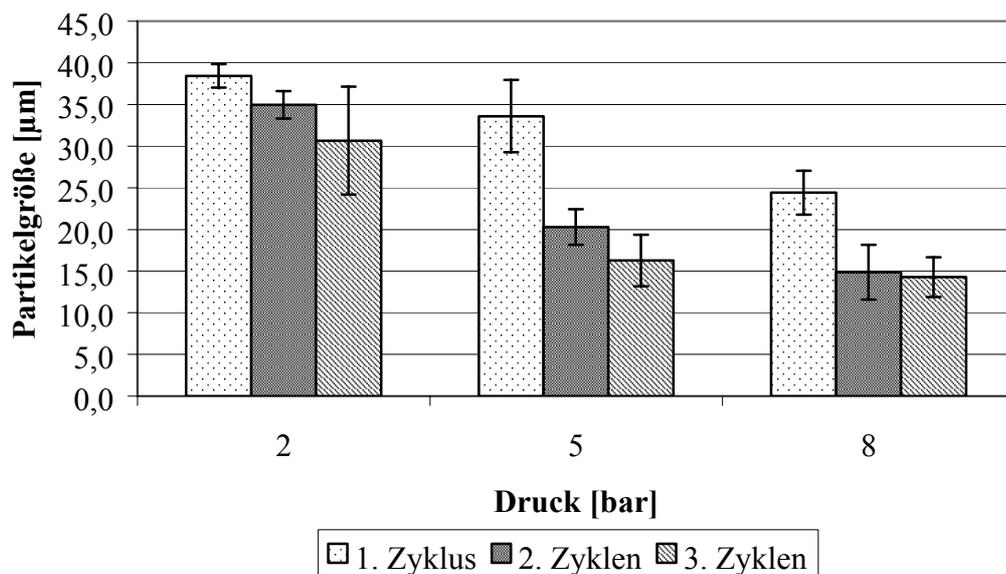


Abbildung 3.11 Abnahme der Partikelgröße in Abhängigkeit von Druck und Zyklenzahl (Druck Düse a: variabel, Druck Düse b: konstant)

#### *Einfluss auf die Keimzahl*

Bei dem Versuch mit dem konstant niedrigen Druck auf Düse a nimmt die Keimzahl erwartungsgemäß mit steigendem Druck ab. Auch bei Zunahme der Zyklenzahl tritt eine Keimzahlverminderung auf. Der Einfluss der Zyklenzahlen ist sowohl bei fünf bar als auch bei acht bar größer als bei zwei bar. Obwohl die Partikelgröße bei acht bar nach dem ersten Zyklus nicht mehr wesentlich abnimmt, kann man bei der Keimzahl noch eine Abnahme erkennen. Das lässt darauf schließen, dass nicht nur die resultierende Partikelgröße einen Einfluss auf die Keimzahl hat. Die Abnahme der Partikelgröße müsste in diesem Fall mit der Abnahme der Keimzahl einhergehen.

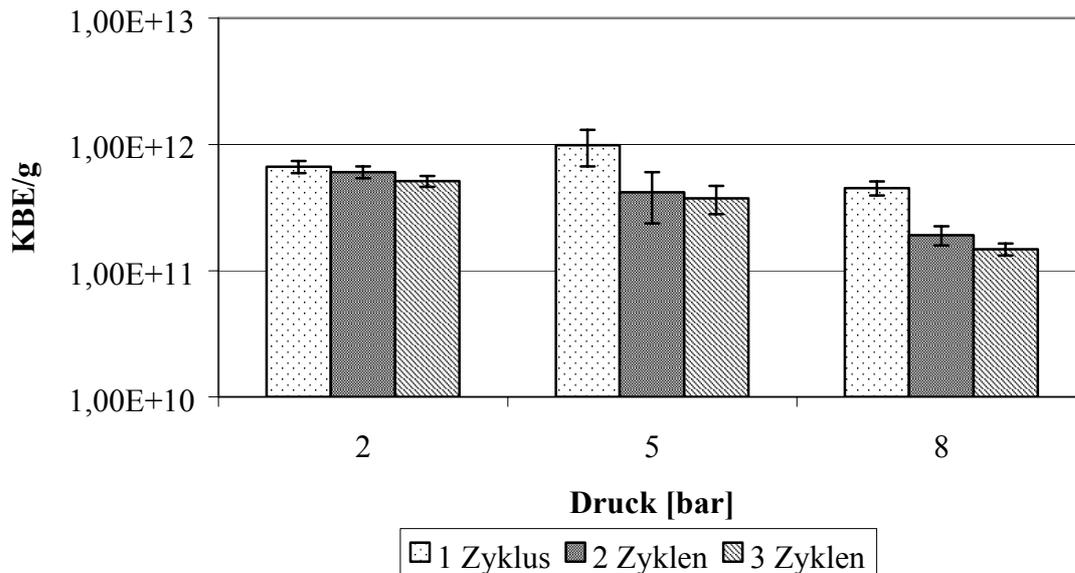


Abbildung 3.12 Abnahme der Keimzahl in Abhängigkeit von Druck und Zyklenzahl (Druck Düse a: konstant, Druck Düse b: variabel)

Auch bei dem Versuch mit dem konstant niedrigen Druck auf Düse b nimmt die Keimzahl erwartungsgemäß mit steigendem Druck und steigender Zahl der Zyklen ab (Abbildung 3.13). Im Gegensatz zu dem Versuch mit konstant niedrigem Druck auf Düse a tritt bei diesem Versuch der Einfluss der Zyklenzahl bei zwei und fünf bar stärker zu Tage. Vergleicht man beide Versuche miteinander, kann man jedoch nur geringe Unterschiede in Bezug auf die Keimzahl feststellen, aus denen sich keine Gesetzmäßigkeiten ableiten lassen. Bezieht man die Partikelgröße mit ein, kann man feststellen, dass bei einem konstant niedrigen Druck auf Düse a das Verhältnis von Partikelgröße zu Keimzahl günstiger ist als bei einem konstant niedrigen Druck auf Düse b. Bei einem Druck von einem bar auf Düse a und acht bar auf Düse b erhält man Partikel mit einer Größe von  $x_{90} = 11,3 \mu\text{m}$  und einer Keimzahl von  $4,5 \times 10^{11}$  KBE/g.

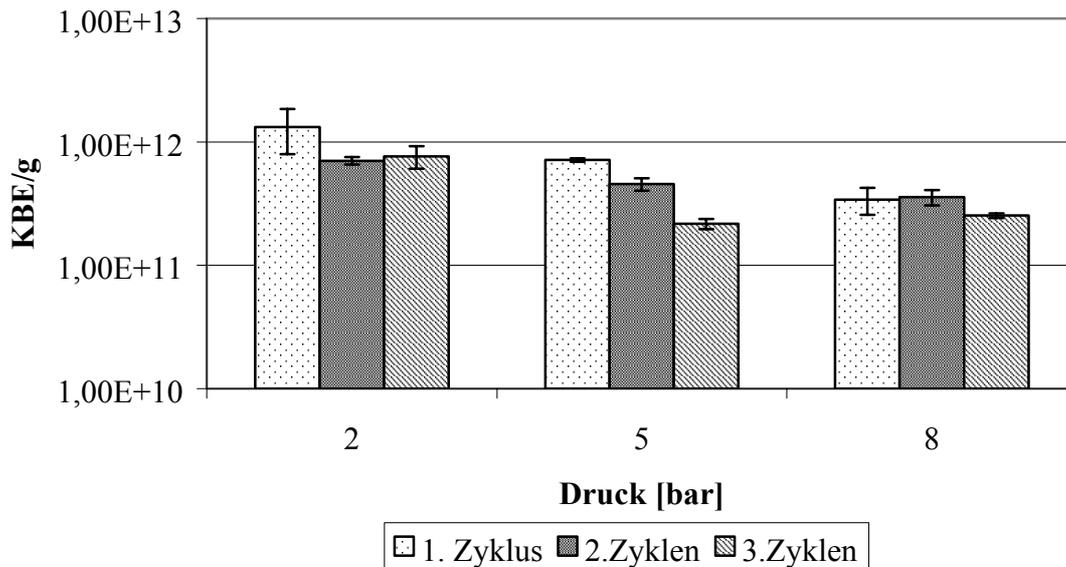


Abbildung 3.13 Abnahme der Keimzahl in Abhängigkeit von Druck und Zyklenzahl (Druck Düse a: variabel, Druck Düse b: konstant)

### 3.2.4 Einfluss verschiedener Hilfsstoffe und deren Konzentration auf Partikelgröße und Keimzahl

#### 3.2.4.1 Durchführung

Zur Hydrophobisierung der Oberfläche der Lyophilisatpartikel kann neben Magnesiumstearat auch das ebenfalls sehr hydrophobe Aerosil<sup>®</sup> 972 verwendet werden. Aerosil<sup>®</sup> 972 ist ein hochdisperses, hydrophobes Silitiumdioxid und wird als Fließregulierungsmittel für hygroskopische Substanzen in einer Konzentration von bis zu 5 % eingesetzt, da es die Wasser(dampf)-aufnahme herabsetzt, verlangsamt oder gar nicht erst auftreten lässt [Fiedler, 2002]. Um die Effekte beider Hilfsstoffe deutlich hervortreten zu lassen, wurde das Lyophilisat jeweils mit 5 %, 10 % oder 25 % Aerosil<sup>®</sup> 972 oder Magnesiumstearat gemischt. Die vorangegangenen Versuche haben gezeigt, dass das Verhältnis von Partikelgröße zu Keimzahl bei einem niedrigen Druck auf Düse a besonders günstig ist.

Die Proben wurden daher mit einem bar auf Düse a, acht bar auf Düse b einen Zyklus lang vermahlen.

### 3.2.4.2 Ergebnisse

#### *Einfluss der Hilfsstoffkonzentration auf die Keimzahl*

In Bezug auf die Keimzahl lassen sich zwischen Magnesiumstearat und Aerosil 972 keine deutlichen Unterschiede feststellen. Auch die Konzentration der beiden Hilfsstoffe für sich gesehen hat keinen Einfluss auf die Keimzahl (Abbildung 3.14).

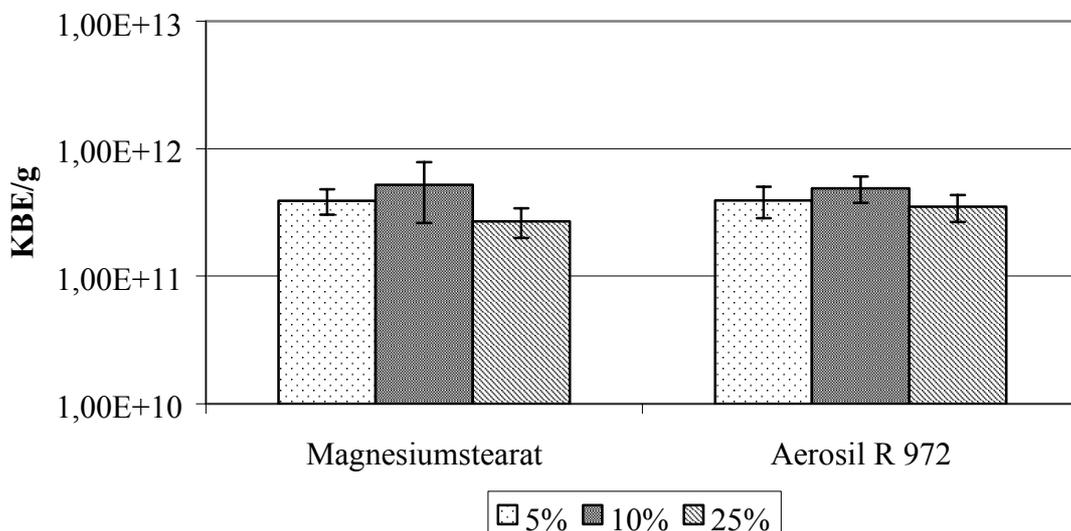
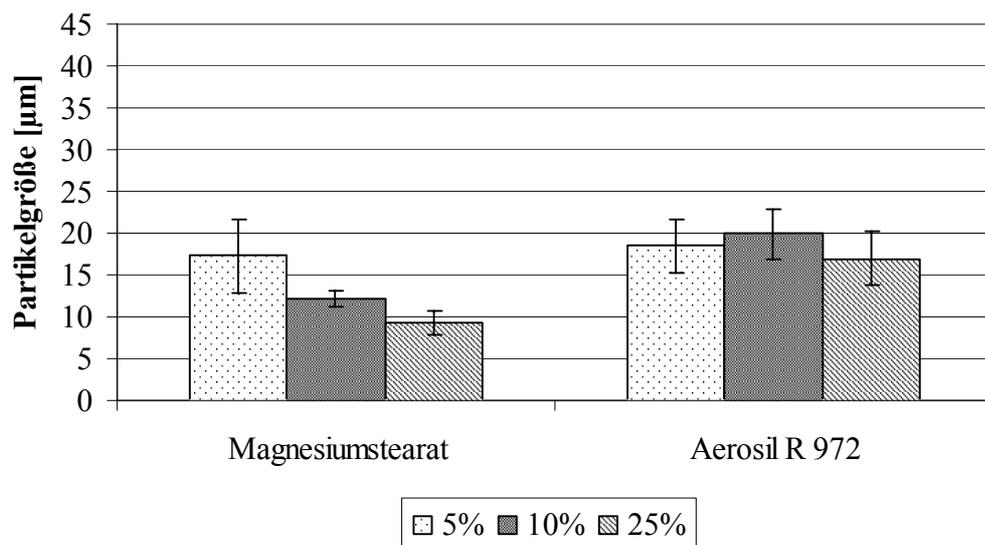


Abbildung 3.14 Einfluss von Konzentration und Art des Hilfsstoffes auf die Partikelgröße

#### *Einfluss der Hilfsstoffkonzentration auf die Partikelgröße*

Betrachtet man den Einfluss auf die Partikelgröße, lassen sich zwischen Magnesiumstearat und Aerosil 972 deutliche Unterschiede feststellen. Im Gegensatz zum Aerosil 972 nimmt die Partikelgröße bei steigenden Magnesiumstearat-Konzentrationen ab (Abbildung 3.15). Bei 5 % Hilfsstoffzusatz ist noch kein

Unterschied zwischen Magnesiumstearat und Aerosil 972 zu erkennen. Bei einem Hilfsstoffzusatz von 10 % hingegen beträgt die Partikelgröße der Magnesiumstearatmischung nur noch 12,2  $\mu\text{m}$  im Gegensatz zu 19,9  $\mu\text{m}$  bei der Aerosilmischung. Dass die Partikelgröße mit steigender Konzentration von Magnesiumstearat abnimmt, zeigt ebenfalls, dass die Energie während der Mahlung besser auf die Partikel übertragen wird.

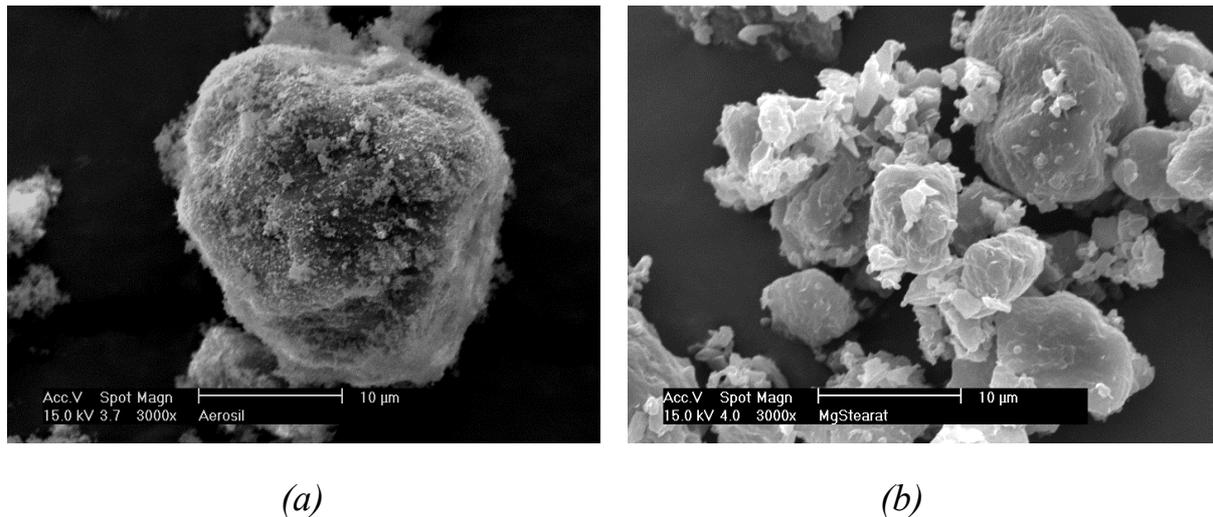


*Abbildung 3.15 Einfluss von Konzentration und Art des Hilfsstoffes auf die Partikelgröße*

Wie schon in vorangegangenen Versuchen festgestellt, zeigt sich auch hier bei der Magnesiumstearat-Mischung kein Zusammenhang von Partikelgröße und Keimzahl. Die Partikelgröße nimmt im Vergleich von 5 % nach 25 % deutlich ab. Diese Abnahme spiegelt sich jedoch nicht in der Keimzahl wider. Dennoch ist der Zusatz von 25 % Magnesiumstearat nicht sinnvoll, da auf Grund der Alkalität des Magnesiumstearates negative Langzeiteffekte in Bezug auf die Bakterien auftreten können.

Die Abbildung 3.16 zeigt die beiden Pulvermischungen mit 10 % Hilfsstoffzusatz nach der Mahlung. Man erkennt deutlich, dass die beabsichtigte Hydropho-

bisierung der Partikeloberfläche vom den Aerosil 972 besser erfüllt wird. Die Aerosilpartikel bilden einen gleichmäßigen Film auf der Oberfläche der Lyophilisatpartikel, während die Magnesiumstearatpartikel sich zwischen den Lyophilisatpartikel anlagern, aber keinen Film auf der Oberfläche bilden.



*Abbildung 3.16 Gemahlenes Lyophilisat mit (a) 10 % Aerosil 972 und (b) 10% Magnesiumstearat Zusatz*

### **3.2.5 Zusammenfassung**

Die Mahlung in der Luftstrahlmühle stellt eine mögliche Methode zur Zerkleinerung des Lyophilisates dar. Es lassen sich Partikel in der gewünschten Größe herstellen, wobei der Keimzahlverlust in Bezug auf die spätere Anwendung in tolerablen Grenzen bleibt. Prozentual gesehen, scheint die Keimzahlabnahme groß. Eine Keimzahl von  $1 \times 10^{11}$  KBE/g Lyophilisat wäre jedoch immer noch mehr als ausreichend für die Verkapselung, wenn man von einer Menge von 10 % Lyophilisat pro g Fett ausgeht. Die gemahlene Partikel lagen auch bei hohen Druck- und Zyklenzahlen über diesem Wert.

Ein Zusatz von Magnesiumstearat hat sich bei der Mahlung als günstig erwiesen. Es hat sich auch gezeigt, dass sich eine Druckminderung auf der Düse a günstig in Bezug auf Partikelgröße und Keimzahl auswirkt. Mit dem Zusatz von 5 % Magnesiumstearat zu dem Lyophilisat kann man den Druck der Düse a von acht bar auf ein bar herabsetzen und erhält Partikel gleicher Größe, aber höherer Keimzahl.

### **3.3 Sprühtrocknung**

#### **3.3.1 Einleitung**

Die Sprühtrocknung ist eine gängige Methode zur Stabilisierung von Bakterien. Abbildung 3.17 zeigt eine schematische Darstellung des Sprühturms Büchi B 290, der für die Versuche benutzt wurde. Der Vorteil der Sprühtrocknung von probiotischen Bakterien gegenüber der Gefriertrocknung liegt darin, dass man bei der Sprühtrocknung ein Pulver mit einer- im Vergleich zu Mahlverfahren engen Partikelgrößenverteilung erhält. Eine weitere Zerkleinerung ist nicht erforderlich. Allerdings hat das Verfahren auch den Nachteil, dass es bei der Sprühtrocknung bei den Bakterien neben den Schäden durch die Trocknung auch noch zu Schäden durch Temperaturstress kommt. Während des Trocknungsprozesses werden zwei Temperaturen bestimmt: die Einlasstemperatur, die oberhalb des Sprühturms gemessen wird, und die Auslasstemperatur. Für das Überleben der Bakterien ist die Auslasstemperatur von Bedeutung. Sie sollte so niedrig wie möglich gehalten werden. Die Auslasstemperatur wird zwischen Sprühturm und Zyklon (Abbildung 3.17) gemessen und ist nicht direkt einstellbar, sondern abhängig von der Einlasstemperatur und der Zufuhrgeschwindigkeit der Sprühlösung. Je mehr Lösung pro Zeit in den Turm gesprüht wird, desto stärker kühlt sich auf Grund der Verdunstungskälte die Temperatur im Turm ab.

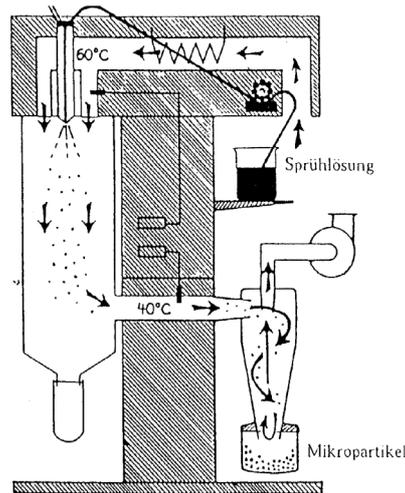


Abbildung 3.17 Schematische Abbildung des Büchi B290

Die Einlasstemperatur hat keinen Einfluss auf das Überleben der Bakterien, da den versprühten Tropfen durch das Verdampfen des Wassers Wärme entzogen wird. Die Temperatur innerhalb des Tropfens liegt darum immer weit unter der Einlasstemperatur. Dazu kommt, dass die thermische Abtötung von Mikroorganismen durch das Senken des  $a_w$ -Wertes verlangsamt wird. Enthält der Tropfen noch viel Wasser, ist die Temperaturempfindlichkeit der Bakterien relativ groß, die Temperatur im Tropfen ist aber vergleichsweise niedrig. Erst im zweiten Abschnitt der Trocknung treten im Tropfen für Bakterien letale Temperaturen auf. Dann ist die Wasseraktivität aber sehr viel niedriger und die Bakterien besitzen eine größere Hitzeresistenz [Loncin und Weisser, 1977].

Für das Überleben der Bakterien während der Trocknung spielt außerdem der Zustand eine Rolle, in dem sie sich vor der Trocknung befinden. Untersuchungen haben gezeigt, dass *Lb. rhamnosus* in der frühen stationären Phase des Wachstums temperaturresistenter als in der Log-Phase oder der Lag-Phase ist [Corcoran et al., 2004; Teixeira et al., 1995].

Ein weiteres wichtiges Kriterium für das Überleben der Bakterien ist die Auswahl der Hilfsstoffe. Wie schon erwähnt ist es nötig, bei der Trocknung von

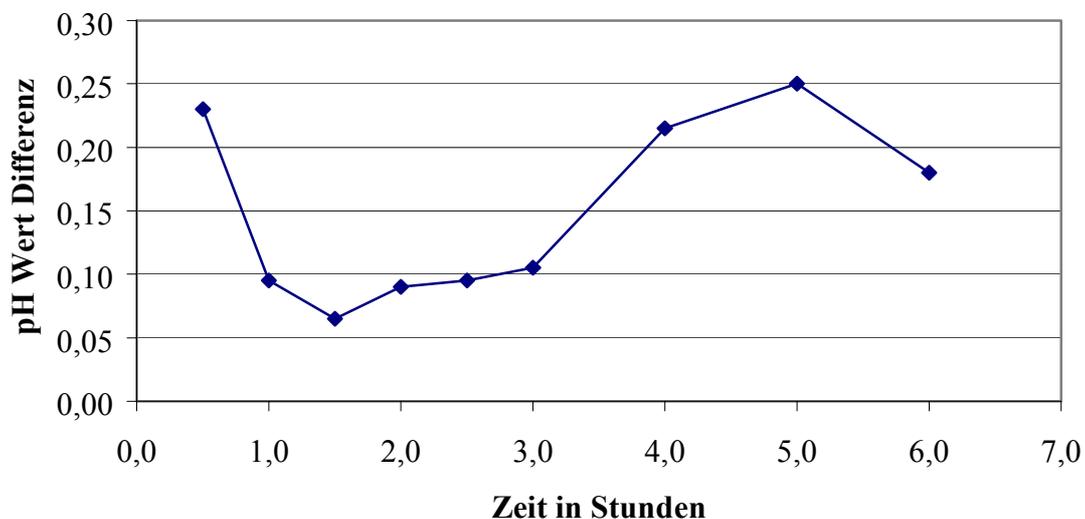
Bakterien die Zellmembranen zu stabilisieren. Eine besonders gute Stabilität lässt sich bei der Gefriertrocknung mit der Zugabe von Zuckern wie Trehalose und Sucrose erreichen [Leslie et al., 1995]. Für die Sprühtrocknung von *Lb. paracasei* und *Lb. salivarius* hat sich Magermilchpulver als guter Stabilisator herausgestellt [Gardiner et al., 2002; Gardiner et al., 2000]. Magermilchpulver enthält 50 % bis 55 % Laktose als Hauptbestandteil. Es ist davon auszugehen, dass sich die guten stabilisierenden Eigenschaften auch bei *Lb. casei* subsp. *casei* zeigen.

### **3.3.2 Sprühtrocknung von *Lb. casei* in Magermilch**

#### ***3.3.2.1 Durchführung***

Aus der Literatur lässt sich entnehmen, dass die besten Überlebensraten bei der Sprühtrocknung erzielt werden, wenn die Bakterien aus der stationären Phase versprüht werden. Für die Untersuchung, ob sich sprühgetrocknete Bakterien zur Einbettung in Fett eignen, spielt eine optimale Überlebensrate keine Rolle. Da das Anzüchten der Bakterien sehr zeitaufwändig ist, wurde darauf verzichtet. Die Versuche wurden mit dem lyophilisierten *Lb. casei* 163 durchgeführt. Durch die Trocknung befand sich dieser im inaktiven Zustand und musste daher wieder aktiviert werden, indem das Lyophilisat wieder aufgelöst wurde. Als Stabilisator wurde Magermilchpulver in einer Konzentration von 20 % eingesetzt, da sich diese Konzentration in der Literatur als günstig erwiesen hat [Gardiner et al., 2002; Gardiner et al., 2000; Corcoran et al. 2004]. Da die Bakterien durch die Lyophilisation Schäden erlitten haben, ist es notwendig, ihnen Gelegenheit zu geben, ihre Schäden zu reparieren, bevor sie sprühgetrocknet werden. Ansonsten würden sich die Schäden addieren, die durch die beiden Trocknungsarten hervorgerufen werden. Aktive Lactobacillen bilden aus Laktat Milchsäure. Die Säuerung von Milch ist also ein Maß für die Aktivität der Bakterien. Um herauszufinden, wann die lyophilisierten Bakterien nach Suspendierung in

Milch wieder ihre volle Aktivität erreicht haben, wurde über 6 Stunden die pH-Wert-Änderung von einer 20 %igen, aus Milchpulver hergestellten Magermilch (reconstituted skim milk (RSM)) gemessen, in der vorher 1,0 g des Lyophilisates gelöst wurden. In Abbildung 3.18 sieht man, dass die Bakterien nach vier Stunden begannen, vermehrt Milchsäure zu produzieren. Das heißt, sie hatten nach vier Stunden wieder ihre volle Aktivität erreicht. Der pH-Sprung am Anfang der Messung ist in der Lyophilisatzugabe begründet. Nach 4,5 Stunden hatten die Bakterien die Milch so stark angesäuert, dass die Milchproteine koagulierte sind. Nach fünf Stunden nahm die Säuerungsaktivität wieder ab. Vor dem Sprühtrocknen wurden die Bakterien daher 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Sprühtrocknung erfolgte bei einer Auslasstemperatur von 60 °C (siehe Anhang: Methoden). Es wurden insgesamt sechs Versuche durchgeführt.



*Abbildung 3.18 Säuerungsaktivität von *Lb. casei* bei Inkubation in RSM bei 37°C über 6 Stunden*

### 3.3.2.2 Ergebnisse

Das sprühgetrocknete Produkt ist ein leicht gelbliches Pulver mit einer Partikelgröße von durchschnittlich  $x_{90} = 15,01 \mu\text{m}$ . Abbildung 3.19 zeigt die Verteilungssumme und Verteilungsdichte des Pulvers. Die Partikelgrößenverteilung ist relativ breit und zeigt einen hohen Feinanteil mit einer Partikelgröße, die etwa der Partikelgröße der Bakterien entspricht.

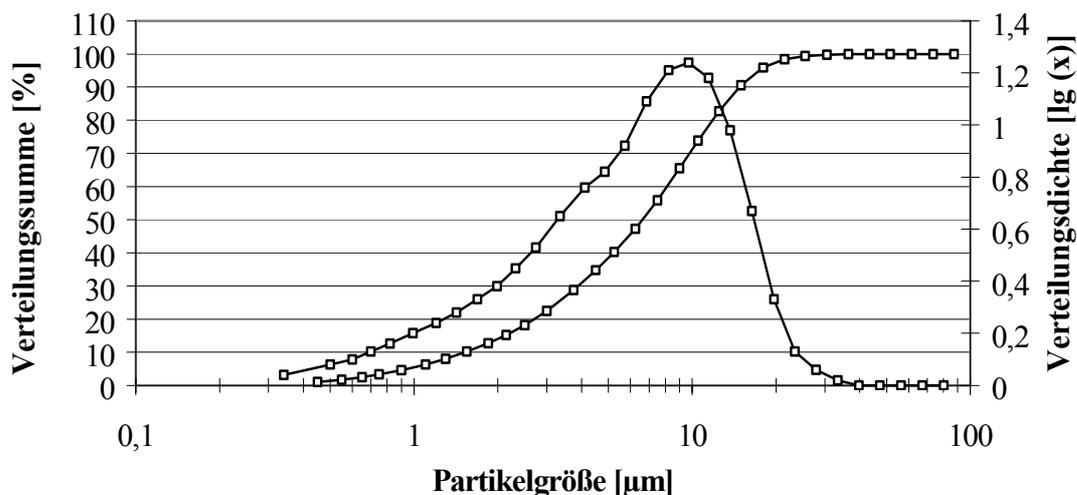


Abbildung 3.19 Partikelgrößenverteilung von in RSM sprühgetrockneten *Lb. casei*

Abbildung 3.20 zeigt die Partikel in einer REM-Aufnahme. Der Feinanteil ist deutlich zu erkennen, man sieht jedoch keine Bakterien. Das lässt darauf schließen, dass die Bakterien vollständig in der Magermilchmatrix eingeschlossen und somit gut geschützt sind.

Die Keimzahl der versprühten Milch betrug durchschnittlich  $6,1 \times 10^{10}$  KBE/g bezogen auf die Masse des Magermilchpulvers. Das sprühgetrocknete Produkt hatte eine durchschnittliche Keimzahl von  $3,2 \times 10^{10}$  KBE/g. Das entspricht einer Überlebensrate von 52 % (Abbildung 3.21).

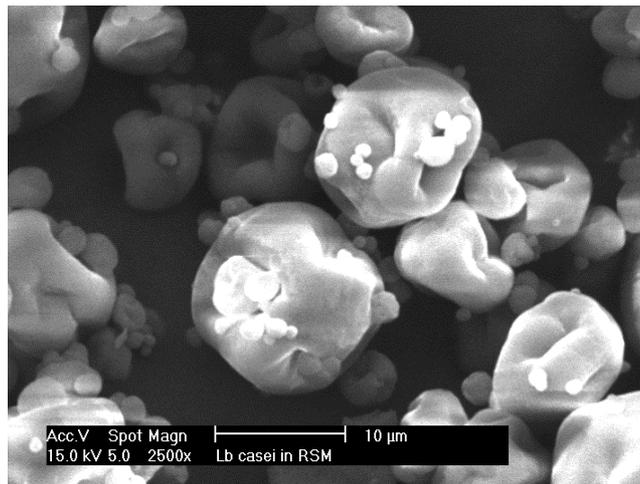


Abbildung 3.20 REM Aufnahme von *Lb. casei* sprühgetrocknet in RSM

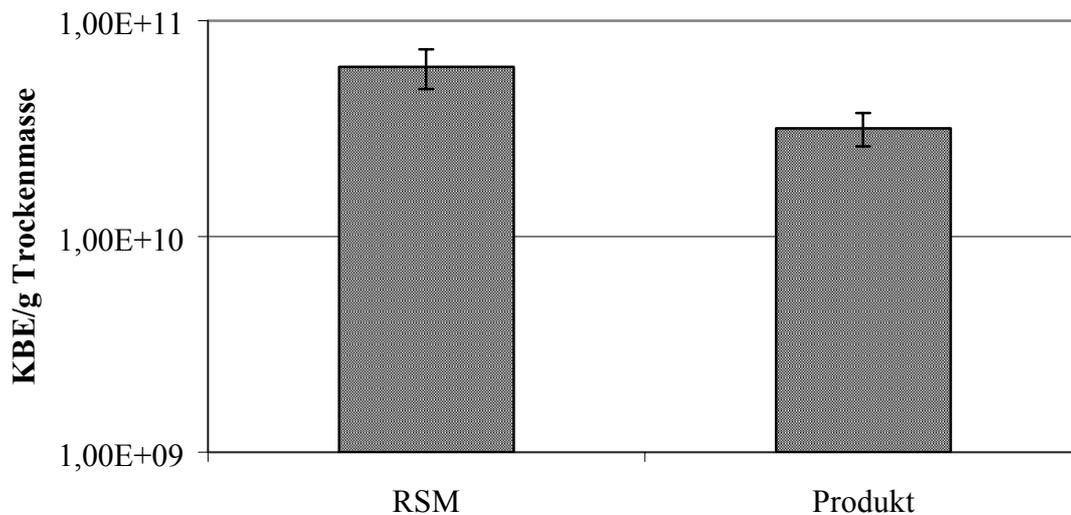


Abbildung 3.21 Abnahme der Keimzahl während des Sprühprozesses

Das sprühgetrocknete Pulver hatte eine durchschnittliche Wasseraktivität von 0,165. Um eine optimale Lagerstabilität zu gewährleisten, wurde das Pulver nach der Sprühtrocknung über Phosphorpentoxid getrocknet, bis es eine Was-

seraktivität zwischen 0.8 und 1.3 hatte. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde das Pulver bei -20°C tiefgefroren.

### **3.3.3 Sprühtrocknung von *Lb. casei* in einer Syloidsuspension**

#### **3.3.3.1 Durchführung**

Um die Partikelgröße weiter zu senken, wurde versucht, die Bakterien auf die Oberfläche von Syloidpartikel aufzuziehen. Das verwendete Syloid 244 hat eine kleine Partikelgröße. Es ist nicht wasserlöslich und lässt sich ohne Zusatz weiterer Hilfsstoffe in Wasser suspendieren. Ohne den Zusatz weiterer Hilfsstoffe kommt es bei der Trocknung der Suspension nicht zu einer Zusammenlagerung der einzelnen Syloidpartikel. Die resultierende Partikelgröße des sprühgetrockneten Pulvers ist daher nicht viel größer als die des Ausgangsmaterials. Die Bakterien wurden aus einer Syloidsuspension mit 10 % Feststoffanteil versprüht.

Um die Bakterien wieder in ihre aktive Form zu überführen, wurden sie vier Stunden in MRS-Bouillion bei 37°C inkubiert. Nach 4 Stunden wurden die Bakterien abzentrifugiert, in der Syloidsuspension suspendiert und unter denselben Bedingungen wie bei der Sprühtrocknung in RSM sprühgetrocknet. Da sich im Laufe der Zeit herausgestellt hat, dass die Partikel nicht stabil sind, wurde der Versuch nur einmal durchgeführt.

#### **3.3.3.2 Ergebnisse**

Das sprühgetrocknete Produkt ist ein weißes Pulver mit sehr hohem Volumen und einer Partikelgröße von  $x_{90} = 4,95 \mu\text{m}$ . Abbildung 3.22 zeigt die Partikelgrößenverteilung von reinem Syloid® und den sprühgetrockneten Partikeln. Die Partikelgröße des getrockneten Pulvers nimmt durch den Zusatz der Bakterienzellen um etwa  $1 \mu\text{m}$  zu. Das entspricht in etwa der Größe der Bakterien. Im Vergleich zur Sprühtrocknung aus Magermilch sind die Partikel deutlich kleiner und haben eine schmalere Partikelgrößenverteilung ohne einen großen Feinanteil.

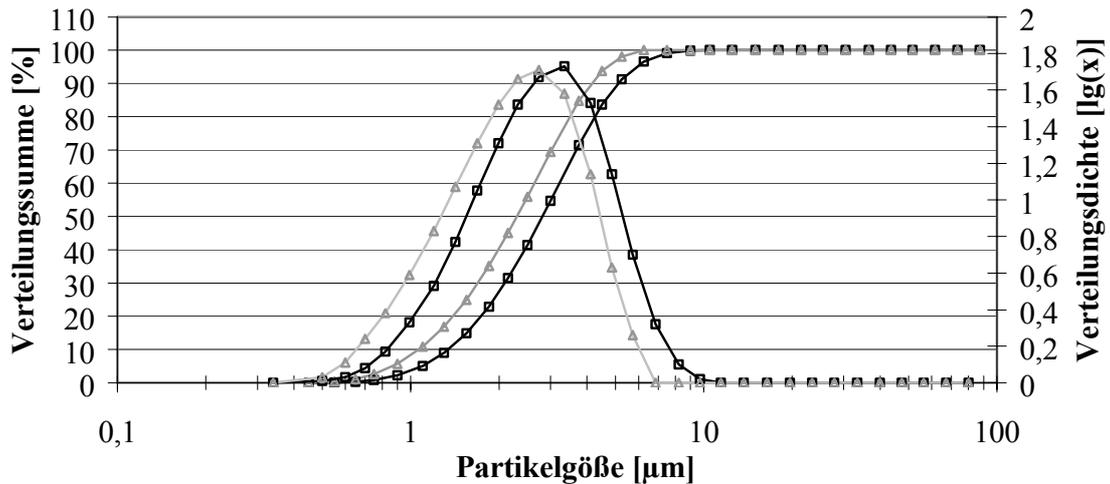
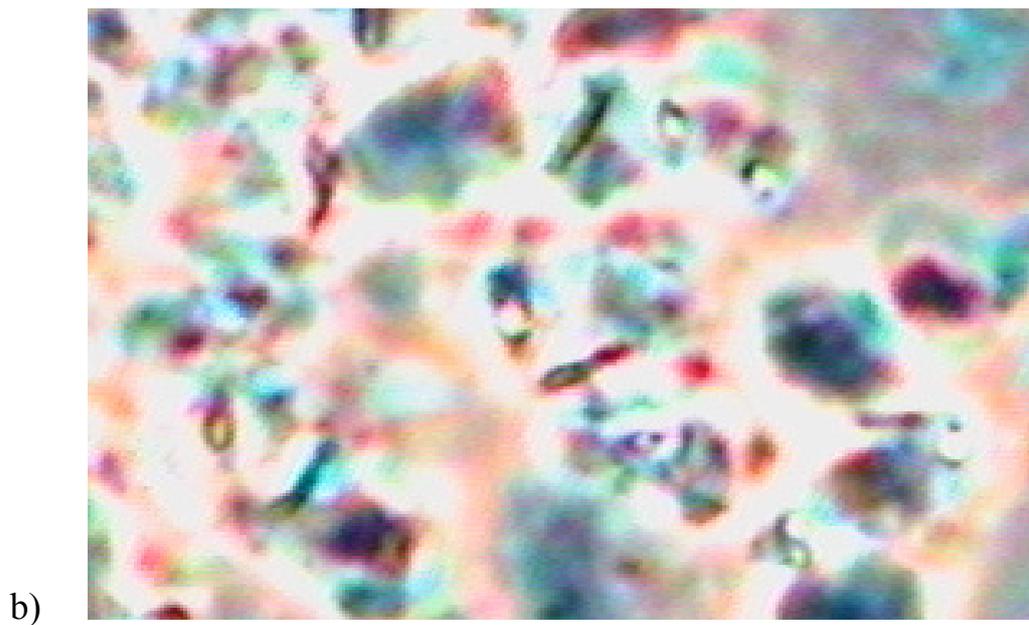


Abbildung 3.22 Partikelgrößenverteilung von sprühgetrocknetem *Lb. casei* in Syloidsuspension (schwarz) und reiner Syloidsuspension (grau)

Die Abbildungen 3.23 zeigen eine REM-Aufnahme und eine Lichtmikroskopische Aufnahme der Probe. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Keime von den Syloidpartikeln nicht umhüllt, sondern nur mit ihnen zusammengelagert sind.

Die Keimzahl der Syloidsuspension betrug  $4,5 \times 10^{10}$  KBE/g, bezogen auf den Feststoffanteil. Das Produkt hatte eine Keimzahl von  $1,5 \times 10^9$  KBE/g. Das entspricht einer Überlebensrate von 3,3 % (Abbildung 3.24). Die Überlebensrate ist damit erwartungsgemäß niedriger als bei der Sprühtrocknung aus RSM. In der Syloidsuspension sind keine weiteren Stabilisatoren wie Zucker enthalten, die die Membranen stabilisieren könnten. Unter dem Lichtmikroskop konnte man erkennen, dass die Bakterien zwischen und auf den Syloidpartikeln lagen.



*Abbildung 3.23 a) REM-Aufnahme, b) lichtmikroskopische Aufnahme (Phasenkontrast)*

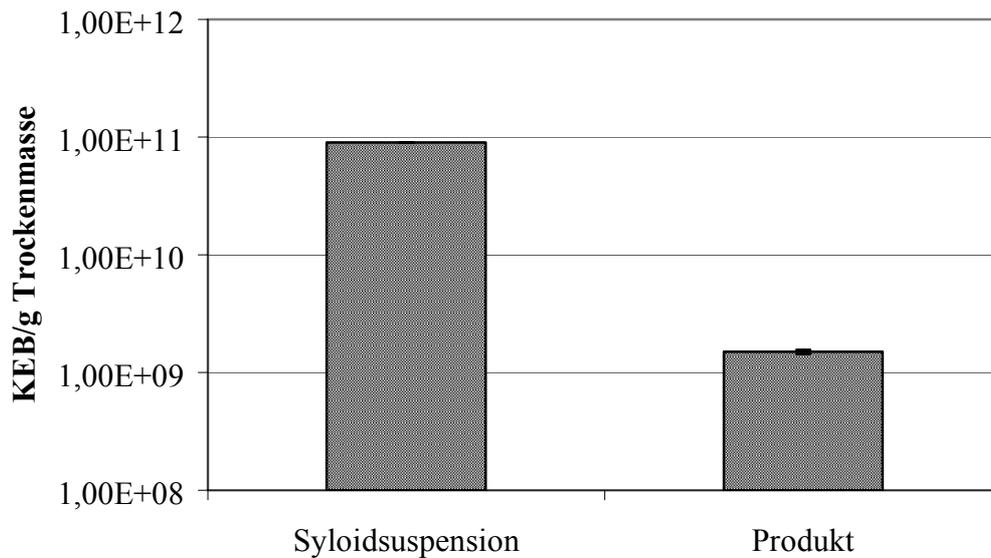


Abbildung 3.24 Abnahme der Keimzahl während des Sprühprozesses

Die Wasseraktivität liegt mit 0,364 im Vergleich mit der Sprühtrocknung aus RSM hoch, was darauf zurückzuführen ist, dass Syloid eine hydrophile Oberfläche und außerdem Poren besitzt, aus denen sich das Wasser nur schwer wegtrocknen lässt. Auf Grund dessen wurde auch dieses Pulver im Exikator über Phosphorpentoxid bis zu einer Wasseraktivität von 0,141 nachgetrocknet. Eine niedrigere Wasseraktivität war auch nach mehreren Tagen der Trocknung nicht zu erreichen.

### 3.3.4 Zusammenfassung

Die Sprühtrocknung stellt eine gute Methode zur Erzeugung kleiner Bakterienagglomerate dar. Es lassen sich Partikel in der gewünschten Partikelgröße erzeugen. Allerdings haben sie durch den weitem Zusatz von Stabilisatoren eine niedrigere Keimzahl pro Gramm als das Lyophilisat. Im Falle der Sprühtrocknung aus RSM liegt die Keimzahl mit  $3,2 \times 10^{10}$  KBE/g in einem Bereich, in dem man noch nach der Einbettung eine ausreichend hohe Keimzahl erreicht, wenn man von einer Keimbelastung von 10 % ausgeht. Eine Keimzahl von  $1,5 \times$

$10^9$  KBE/g im Falle der Sprühtrocknung aus einer Syloidsuspension ist auch noch ein ausreichend hoher Wert für die weitere Einbettung, wenn man von einer Keimbelastung von 10 % ausgeht. Auf Grund des hohen Pulvervolumens ist eine Beladung des Fettes mit 10 % sprühgetrocknetem Pulver jedoch schwierig.

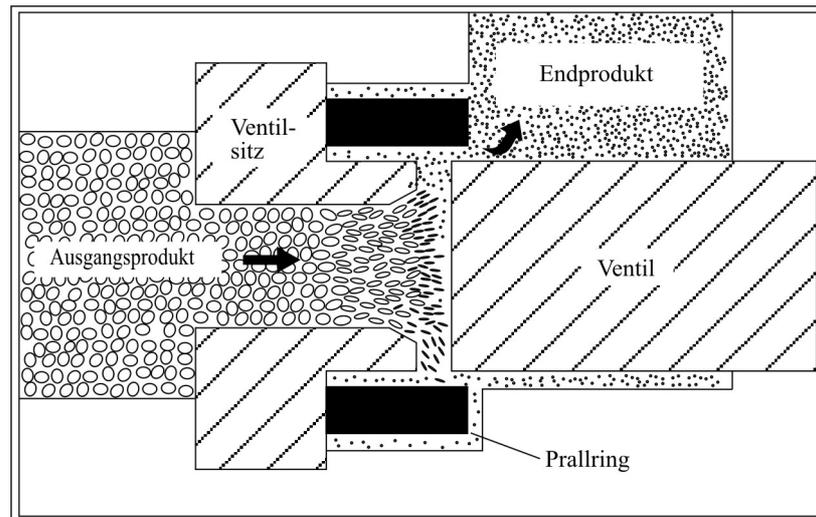
### **3.4 Hochdruckhomogenisation**

#### **3.4.1 Einleitung**

Eine Zerkleinerung des Lyophilisates kann neben der Mahlung in der Luftstrahlmühle auch durch Hochdruckhomogenisation des Lyophilisates in einem Öl erfolgen. Das Öl stellt ein Nichtlösungsmittel für das Lyophilisat dar und eignet sich besonders als Suspensionsmedium, da es später problemlos in das Fett mit eingearbeitet werden kann.

Der verwendete Kolben–Spalt-Homogenisator wird auch in der Lebensmittelindustrie eingesetzt und gehört zur Gruppe der Strömungsdispergiermaschinen. Bei der Hochdruckhomogenisation wirken auf die Partikel verschiedene Kräfte, die zu einer Zerkleinerung der Partikel führen, ein. Die entscheidenden Prinzipien sind Prall, Stoß und Kavitation [Lindenstruth, 2003].

Abbildung 3.25 zeigt eine schematische Darstellung der Ventileinheit des Hochdruckhomogenisators. Durch einen Kolben wird auf das Ausgangsprodukt ein definierter Druck aufgebaut. Ist dieser Druck erreicht, öffnet sich das Ventil und die Suspension wird mit hoher Geschwindigkeit durch den Homogenisatorspalt gedrückt. Es kommt zu einer Bildung von Gasblasen innerhalb der Suspension, da aus dem Suspensionsmedium gelöste Gase freigesetzt werden. Nach dem Passieren des Spaltes kommt es zu einer schlagartigen Entspannung des Gases, was ein Implodieren der Kavitationsblasen zur Folge hat. Die suspendierten Partikel werden durch die freiwerdende Energie auseinander gerissen.



*Abbildung 3.25 Schematische Abbildung der Ventileinheit des Homogenisators [Lindenstruth, 2003]*

In der Lebensmittelindustrie wird die Behandlung mit hohem Druck zur Herabsetzung der Keimzahl in Produkten verwendet. Aktive Bakterien in wässrigen Systemen erfahren durch hohen Druck verschiedene Arten der Schädigung. Zum einen wird die Membran dadurch geschädigt, dass die Phospholipid Doppelschicht zusammengedrückt wird. Zum anderen kommt es zu einer Inaktivierung von Enzymen und einer Denaturierung von Proteinen [Patterson, 1999]. Für eine komplette Deaktivierung der Bakterien werden jedoch höhere Drücke benötigt, als sie bei der Hochdruckhomogenisation auftreten. Zudem liegt die Dauer der Druckbelastung der Bakterien während der Homogenisation im Sekundenbereich. Für eine Reduktion der Keimzahl ist es jedoch nötig, den Druck einige Minuten zu halten. Die Homogenisation an sich führt auch zu einer Schädigung von lebenden Zellen. Als ausschlaggebende Mechanismen werden hier Kavitation und Scherung genannt [Kleinig und Middelberg, 1998].

Auf die Homogenisation von Lyophilisaten lassen sich diese Aussagen jedoch nicht übertragen, da sich die Zellen in einem inaktiven Zustand befinden. Die

Membranen der Bakterien sind durch Zucker stabilisiert und die Zellen befinden sich in einem Verbund. Die bei der Hochdruckhomogenisation entstehenden Kräfte können allenfalls auf die Bakterien wirken, die sich auf der Oberfläche des Verbundes befinden.

### **3.4.2 Einfluss des Druckes auf Partikelgröße und Keimzahl**

#### ***3.4.2.1 Durchführung***

Ziel ist es, eine Suspension zu erzeugen, bei der eine Partikelgröße von 30 µm nicht überschritten wird und bei der die Keimzahl des homogenisierten Lyophilisates im Vergleich zu dem nicht homogenisierten möglichst wenig abnimmt. Dazu wurde in drei Ansätzen 2,5 % Lyophilisat in Miglyol 812 vorsuspendiert. Um die Benetzung des Lyophilisates zu verbessern, wurde 1 % Inwitor 780k zugesetzt. Die Suspension wurde dann bei jeweils 300 bar, 600 bar und 1000 bar homogenisiert.

#### ***3.4.2.2 Ergebnisse***

##### *Partikelgröße*

Wie zu erwarten nimmt die Partikelgröße mit steigendem Druck ab (Abbildung 3.26). Trotz der hohen Drücke wird jedoch eine Partikelgröße < 30 µm nicht erreicht. Ein kleiner Teil der großen Partikel ist außerdem im Aufgabeebehältnis des Homogenisators zurückgeblieben. Grund dafür ist das Totvolumen des Homogenisators. Außerdem können Partikel, die wesentlich größer als der Ventilsplitt sind, am Ventil des Homogenisators zurückgehalten werden.

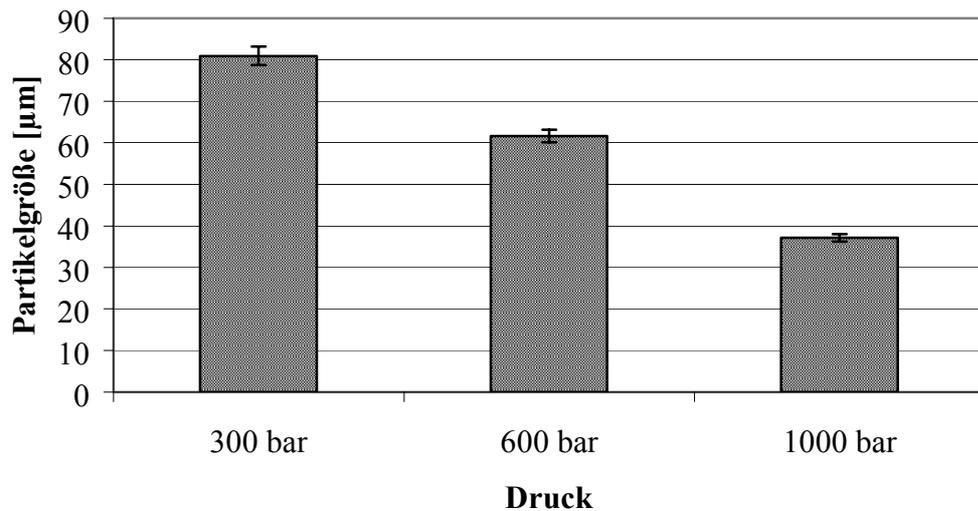
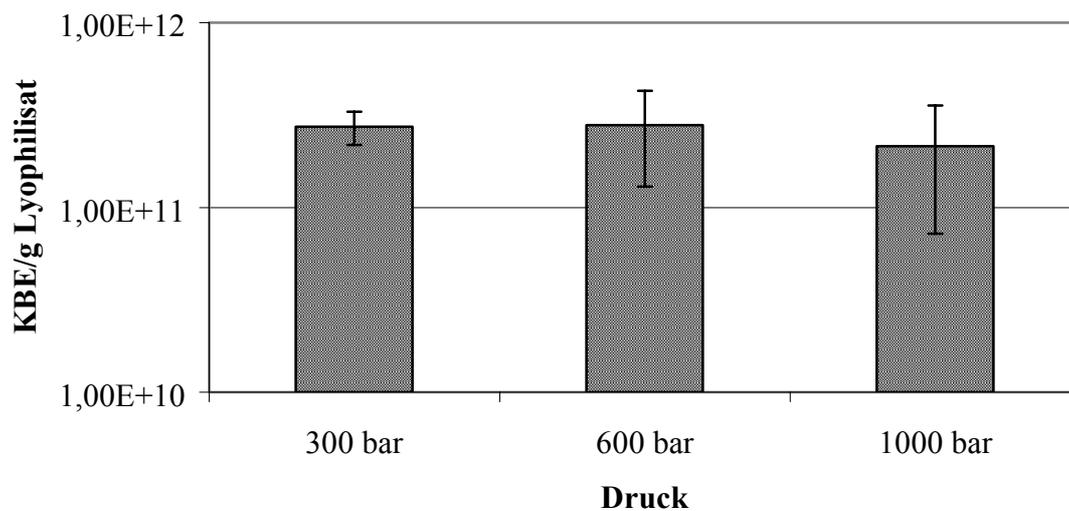


Abbildung 3.26 Abnahme der Partikelgröße bei steigendem Druck

### Keimzahl

Die Ausgangskeimzahl des Lyophilisates lag bei  $9,3 \times 10^{11}$  KBE/g. Nach der Homogenisation lag die Keimzahl zwischen  $2,7 \times 10^{11}$  KBE bei 300 bar und  $2,14 \times 10^{11}$  KBE bei 1000 bar bezogen auf ein Gramm eingesetztes Lyophilisat. Das entspricht einer Keimzahlabnahme zwischen 70 % und 87 %. Unter Berücksichtigung der Standardabweichungen kann man aber nicht von einer Abnahme der Keimzahl bei steigendem Druck sprechen (Abbildung 3.27). Tendenziell ist aber eine Steigerung der Streuung der Werte bei steigendem Druck zu erkennen. Wie schon in der Einleitung erwähnt, sind die Bakterien in dem Lyophilisat durch die Stabilisatoren zu größeren Partikel verklebt. Die Bakterien, die im Inneren der Partikel sitzen, sind so geschützt. Das erklärt, warum die Keimzahl nicht vom Druck abhängig ist.



*Abbildung 3.27 Abnahme der Keimzahl bei steigendem Druck*

### **3.4.3 Einfluss der Zahl der Zyklen auf Partikelgröße und Keimzahl**

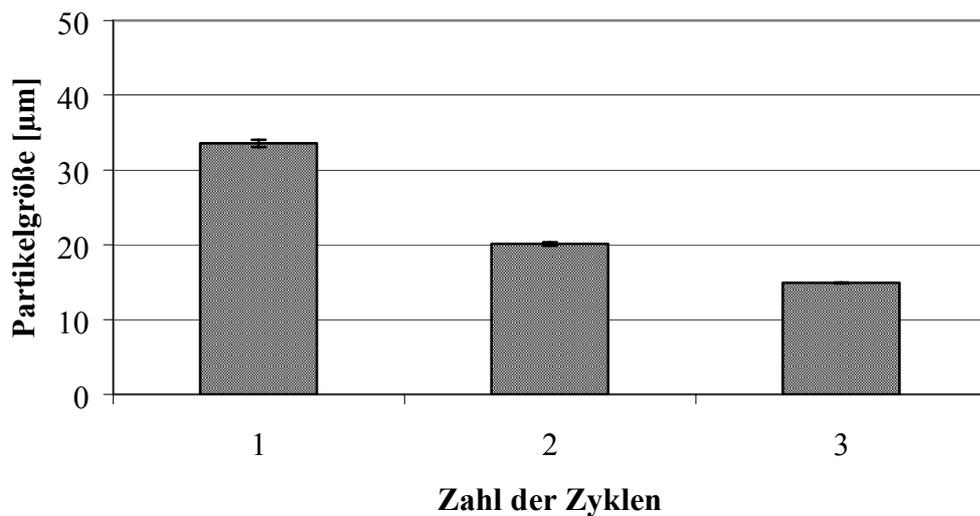
#### ***3.4.3.1 Durchführung***

Da auch bei einem Druck von 1000 bar noch keine ausreichende Zerkleinerung des Lyophilisates erreicht wurde, wurde untersucht, ob eine Anhebung der Zyklenzahl zu einer weiteren Zerkleinerung führt und welche Auswirkung das auf die Keimzahl hat. Dazu wurden drei Ansätze einer Lyophilisat enthaltenden Ölsuspension hergestellt und bei 1000 bar homogenisiert, wobei ein Ansatz einen Zyklus, einer zwei und einer drei Zyklen lang homogenisiert wurde.

### 3.4.3.2 Ergebnisse

#### *Partikelgröße*

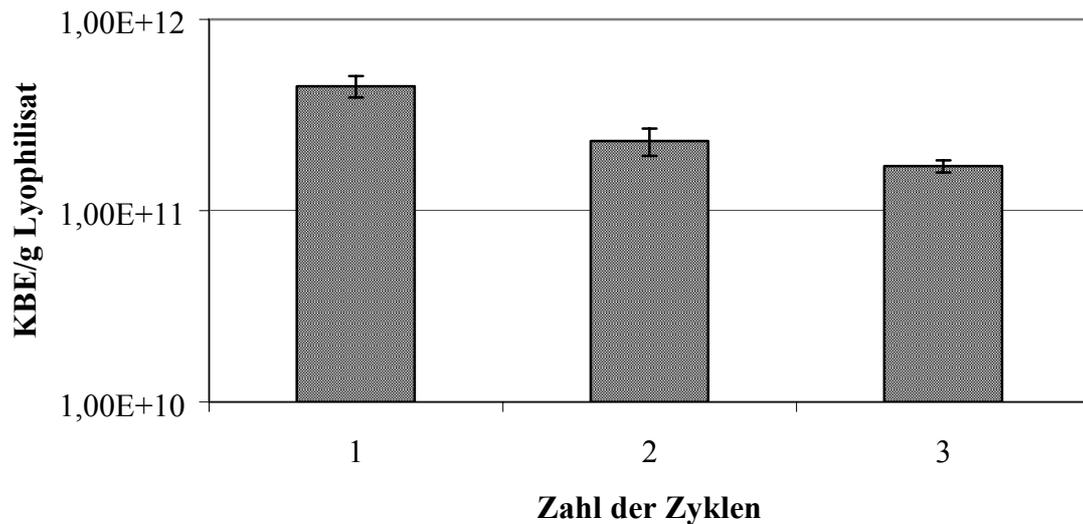
Wie zu erwarten, nahm die Partikelgröße mit steigender Zahl der Zyklen ab. Es ist jedoch deutlich zu erkennen, dass die Abnahme mit steigender Zyklenzahl geringer wird (Abbildung 3.28).



*Abbildung 3.28 Abnahme der Partikelgröße bei steigender Zahl der Zyklen*

#### *Keimzahl*

Anders als bei steigenden Drucken sieht man bei steigender Zahl der Zyklen eine deutliche Abnahme der Keimzahl von 51,8 % bei einem Zyklus bis 71,5 % bei drei Zyklen (Abbildung 3.29). Wie schon erwähnt, sind in den Lyophilisatpartikeln die innen liegenden Keime von den außen liegenden geschützt. Bei der Homogenisation werden also vor allem die Keime Schaden nehmen, die sich an der Oberfläche befinden. Durch die Zerkleinerung der Partikel entstehen jedoch wieder neue Oberflächen. Wird dieselbe Probe noch ein zweites Mal homogenisiert, werden wieder die Partikel an der Oberfläche geschädigt, und somit kommt es zu einer Abnahme der Keimzahl. Bei jedem Mahlzyklus sinkt die Keimzahl ungefähr auf die Hälfte des vorangegangenen Wertes ab.



*Abbildung 3.29 Abnahme der Keimzahl bei steigender Zahl der Zyklen*

#### **3.4.4 Zusammenfassung**

Die Hochdruckhomogenisation stellt eine Möglichkeit zur weiteren Zerkleinerung des Lyophilisates dar. Es lassen sich Partikel in der gewünschten Größe erzeugen. Die Keimzahl liegt dabei in einem Bereich, der für die spätere Einbettung in Fett noch günstig ist, auch wenn man die Verdünnung durch das Öl berücksichtigt. Vorteil dieser Methode ist, dass die Partikel schon in einer hydrophoben Matrix eingebettet sind und dadurch die spätere Einarbeitung in das Fett sehr einfach ist.

### **3.5 Vergleich der entstandenen Bakterienagglomerate**

#### **3.5.1 Einleitung**

Die Beurteilung der hergestellten Bakterienagglomerate in Bezug auf ihr Potenzial für die spätere Einbettung in Fett ist schwierig, da bei jeder Behandlung des Ausgangslyophilisates zu den vorhandenen Vorschädigungen durch das Lyophilisieren noch weitere Schäden hinzukommen können. Diese Schäden sind zum Teil subletal, das heißt, sie führen nicht direkt zu einem Absterben der Bakterien, machen sie jedoch anfälliger für weiteren Stress wie hohe Temperaturen und hohen osmotischen Druck. Picot und Lacroix haben gezeigt, dass sich das Mikronisieren von Bakterienlyophilisaten bei einigen Stämmen auf die Temperaturresistenz negativ auswirkt [Picot und Lacroix, 2003]. In Anbetracht der späteren Einbettung in Fette, die ja aufgeschmolzen werden müssen, um die Bakterien einarbeiten zu können, spielt diese Tatsache eine wichtige Rolle. Die Überlebensrate der Bakterien unter weiteren Belastungen kann also als Indikator ihrer Vorschädigungen dienen. Diese sollten möglichst gering gehalten werden, da die Einbettung an sich auch noch eine zusätzliche Belastung für die Bakterien darstellt.

Die Lagerstabilität der erzeugten Partikel ist ebenfalls ein wichtiges Kriterium für die Beurteilung der erzeugten Bakterienagglomerate. Die erzeugten Fettpartikel sollen bei Raumtemperatur und hoher Luftfeuchte das Überleben der Bakterien im Vergleich zu den ungeschützten Bakterien erhöhen. Erreicht werden soll dieses Ziel durch den Wasserausschluss, den das Fett bewirkt. Die erzeugten Bakterienagglomerate müssen also bei Raumtemperatur und Wasserausschluss lagerstabil sein.

### **3.5.2 Bestimmung der Lagerstabilität bei 0 % RH und 100 % RH**

#### ***3.5.2.1 Durchführung***

Die erzeugten Bakterienagglomerate wurden in offenen Petrischalen in Exikatoren eingelagert. Für die Einlagerung bei 0 % RH wurde der Boden des Exikators mit Phosphorpentoxid gefüllt, für die Einlagerung bei 100 % RH mit Aqua bidest. Bei dem homogenisierten Lyophilisat wurde auf die Einlagerung bei 100 % verzichtet, da durch das Öl ein Wasserdampf-Ausschluss stattfindet. Da sich bei der Einlagerung der Syloidpartikel bei Trockenheit über vier Wochen schon eine deutliche Abnahme der Keimzahl zeigte, wurde auch hier auf die Einlagerung bei 100 % RH verzichtet.

#### ***3.5.2.2 Ergebnisse***

Das Ausgangslyophilisat zeigt wie zu erwarten keine Abnahme der Keimzahl über vier Wochen (Abbildung 3.30). Auch die beiden direkt aus dem Lyophilisat hergestellten gemahlten und homogenisierten Partikel zeigen keine Abnahme der Keimzahl, was auf eine gute Stabilität bei der späteren Einbettung hindeutet. Die beiden sprühgetrockneten Produkte zeigen eine Abnahme der Keimzahl. Bei den aus der Syloidsuspension sprühgetrockneten Partikeln ist diese Abnahme besonders deutlich. Schon nach einer Woche nimmt hier die Keimzahl um 78 % ab. Nach vier Wochen sind nur noch 8,9 % der Bakterien am Leben. Das Fehlen von Stabilisatoren während der Sprühtrocknung bewirkt schon ohne weiteren Stress eine Abnahme der Keimzahl, weshalb sich die Partikel nicht für eine Einbettung in Fett eignen. Diese Partikel werden auf Grund dieser Tatsache nicht weiter untersucht. Bei der aus RSM sprühgetrockneten Bakterien nimmt die Keimzahl innerhalb von vier Wochen um 60 % ab. Im Vergleich zu den Syloidpartikel ist diese Abnahme moderat, weist aber doch auf eine mögliche Instabilität des späteren Produktes hin.

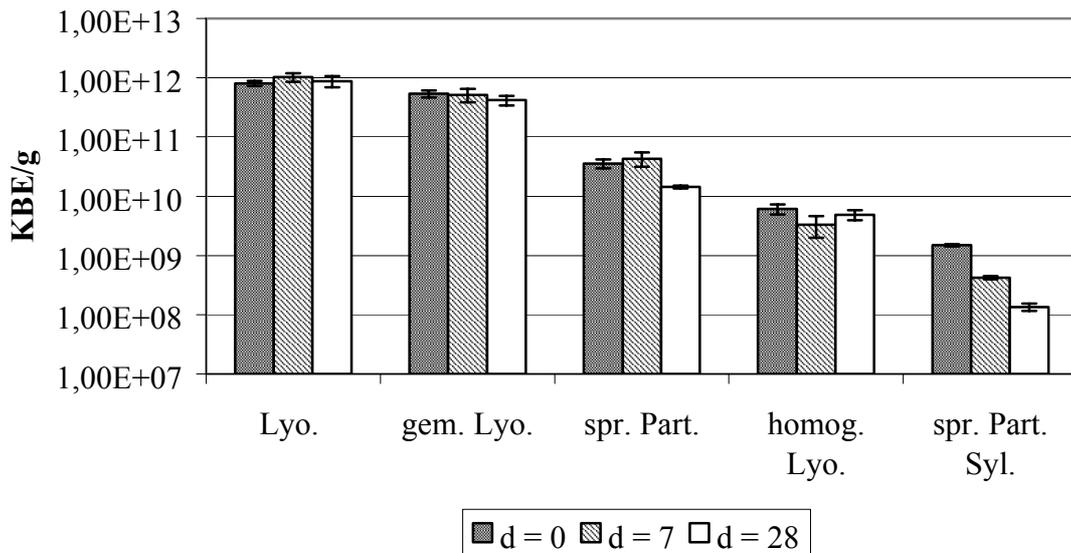


Abbildung 3.30 Änderung der Keimzahl bei Einlagerung über 4 Wochen bei Raumtemperatur und 0% RH (Lyo= Ausgangslyophilisat, gem. Lyo.= gemahlene Lyophilisat, spr. Part.= in RSM sprühgetrocknete Partikel, homog. Lyo.= homogenisiertes Lyophilisat, spr. Part. Syl.= in Syloidsuspension sprühgetrocknete Partikel)

Bei der Einlagerung bei 100 % RH zeigt sich jedoch eine deutlich veränderte Stabilität (Abbildung 3.31). Die in RSM sprühgetrockneten Partikel zeigen hier die beste Überlebensrate. Sogar das Ausgangslyophilisat zeigt eine schlechtere Überlebensrate. Die drastischste Reduktion der Keimzahl zeigt das gemahlene Lyophilisat. Hier sind nach vier Wochen nur noch 660 KBE/g nachzuweisen von ursprünglich  $5,3 \times 10^{11}$  KBE/g. Die Verschlechterung der Überlebensrate gegenüber dem Ausgangslyophilisat zeigt, dass die Bakterien während der Mahlung Schäden davongetragen haben, die aber erst zum Tragen kommen, wenn die Bakterien wieder mit Feuchtigkeit in Berührung kommen. Die nicht ausreichende Wassermenge und das Fehlen von Substrat führen zu einem Absterben der Bakterien, da sie unter diesen Bedingungen nicht in der Lage sind, die bei der Lyophilisation und Mahlung entstandenen Schäden zu reparieren.

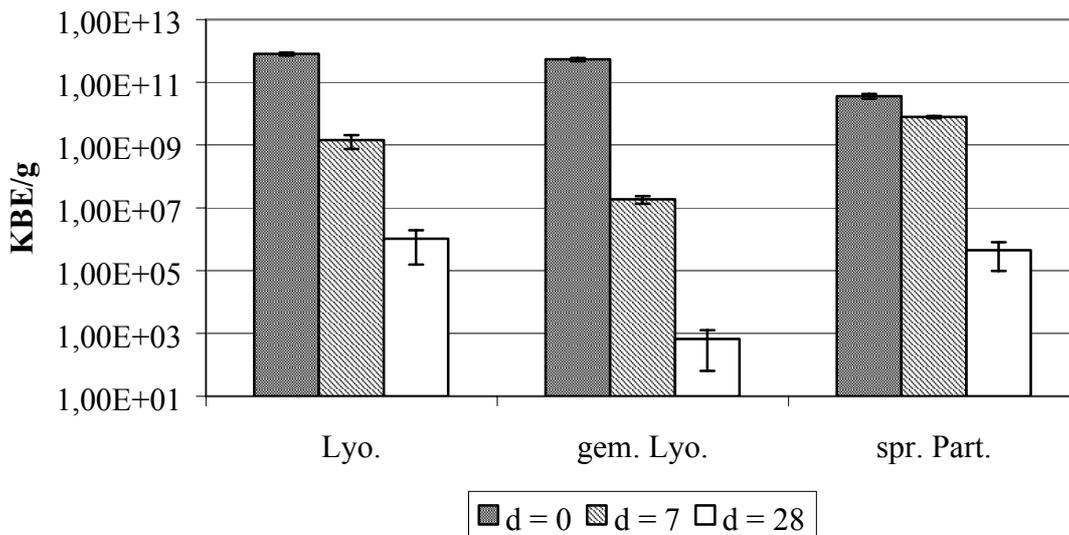


Abbildung 3.31 Änderung der Keimzahl bei Einlagerung über 4 Wochen bei Raumtemperatur und 100% RH (Lyo= Ausgangslyophilisat, gem. Lyo.= gemahlene Lyophilisat, spr. Part.= in RSM sprühgetrocknete Partikel)

### 3.5.3 Bestimmung der Temperaturempfindlichkeit

#### 3.5.3.1 Durchführung

Zur Bestimmung der Temperaturempfindlichkeit wurden die Bakterienagglomerate in PBS-Puffer bei 37 °C (Blindwert), 40°C, 45°C und 50°C 30 min inkubiert. Nach 5, 10, 20 und 30 Minuten wurde die Keimzahl bestimmt. Zum Vergleich wurde auch die Temperaturempfindlichkeit des Ausgangslyophilisates bestimmt.

#### 3.5.3.2 Ergebnisse

Die Abbildung 3.32 bis 3.35 zeigen die Ergebnisse der Temperaturempfindlichkeits-Untersuchung. Bei 37°C zeigen alle Proben nur eine geringe Abnahme der Keimzahl von 12 % bis 20 %. Eine Temperatur von 37°C stellt für die Bakterien keine besondere Stresssituation dar. Sie werden auch bei 37°C im

CO<sub>2</sub> Schrank bebrütet. Die Abnahme der Keimzahl bei dieser Temperatur ist also nicht auf die Empfindlichkeit des Keims zurückzuführen. Bei den anderen Temperaturstufen treten jedoch zum Teil erhebliche Unterschiede auf. Das gemahlene Lyophilisat zeigt bei 40°C keinen Unterschied im Keimzahlverlauf zu dem unbehandelten Lyophilisat. Auch bei 45°C ist noch kein Unterschied zu erkennen. Bei 50°C liegt die Keimzahl des gemahlene Lyophilisates jedoch eine Zehnerpotenz niedriger als die des unbehandelten Lyophilisates, was darauf schließen lässt, dass bei der Mahlung weitere Schäden an den Bakterien entstanden sind.

Im Gegensatz zum gemahlene Lyophilisat zeigt das homogenisierte Lyophilisat schon bei 40°C nach 30 min eine deutliche Keimzahlabnahme von 61 %. Bei 45°C liegt die Keimzahlabnahme nach 30 Minuten schon bei 96,9 % und bei 50°C liegt die Keimzahl nur noch bei 0,002 % des Ausgangswertes und damit sogar noch eine Zehnerpotenz unter der des gemahlene Lyophilisates. Während bei dem unbehandelten Lyophilisat bei 50°C die Keimzahl in den ersten zehn Minuten langsamer abnimmt, nimmt die Keimzahl der homogenisierten Keime bei 50 ° C von Anfang an stark ab. Die größere Temperaturempfindlichkeit der homogenisierten Keime gegenüber den gemahlene Keimen zeigt, dass die Hochdruckhomogenisation für die Bakterien die belastendere Prozedur darstellt. Bei den in RSM sprühgetrockneten Bakterien nimmt die Keimzahl im Gegensatz zu den anderen drei Proben kaum ab. Nach 30 Minuten liegt die Keimzahlabnahme bei 50°C bei 80,6 %. Das gemahlene und das homogenisierte Lyophilisat zeigen schon bei 45°C eine deutlich stärkere Abnahme. Grund für die geringe Temperaturempfindlichkeit sind die Bedingungen von und während der Sprühtrocknung. Für die Sprühtrocknung wurde als Ausgangskeim dasselbe Lyophilisat wie bei den anderen Versuchen verwendet. Die Keime wurden jedoch vier Stunden lang in RSM inkubiert und hatten so die Gelegenheit, die bei der Lyophilisation entstandenen Schäden zu reparieren.

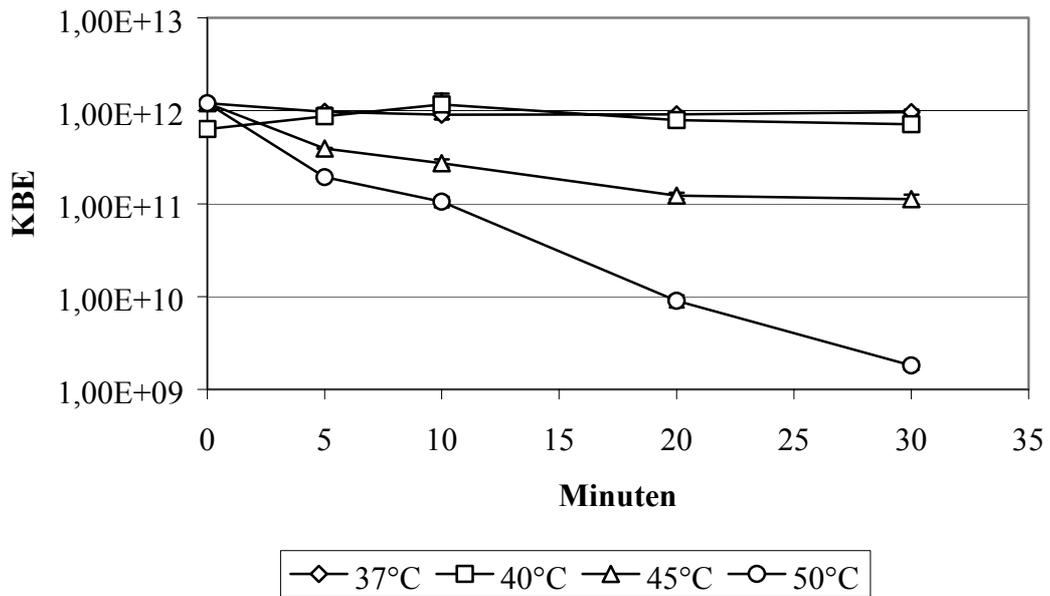


Abbildung 3.32 Keimzahl der lyophilisierten Bakterien in Abhängigkeit von Temperatur und Zeit

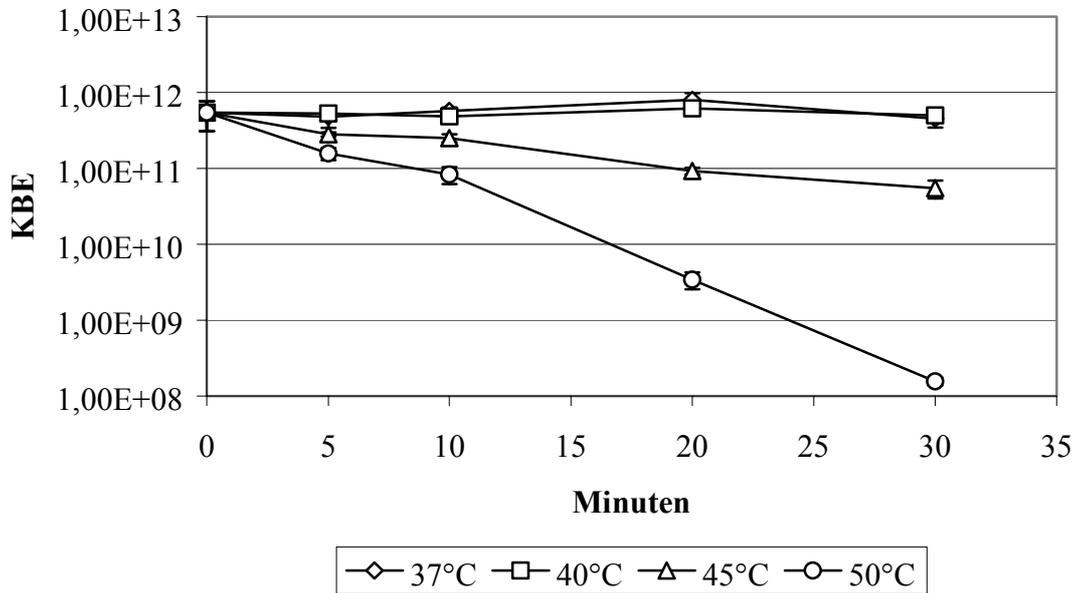


Abbildung 3.33 Keimzahl der lyophilisierten, gemahlene Bakterien in Abhängigkeit von Temperatur und Zeit

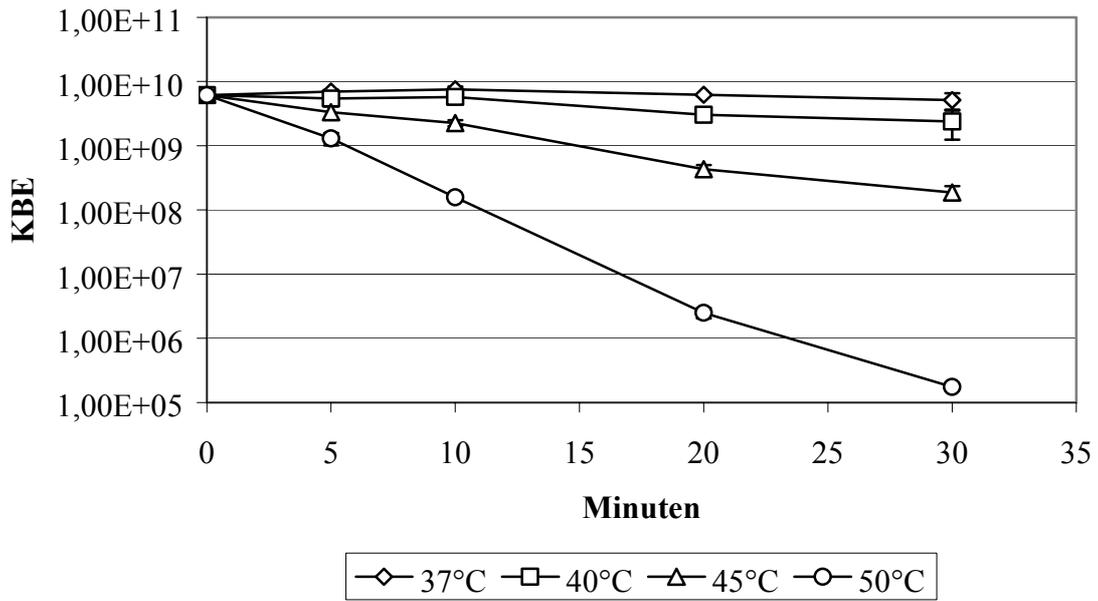


Abbildung 3.34 Keimzahl der homogenisierten Bakterien in Abhängigkeit von Temperatur und Zeit

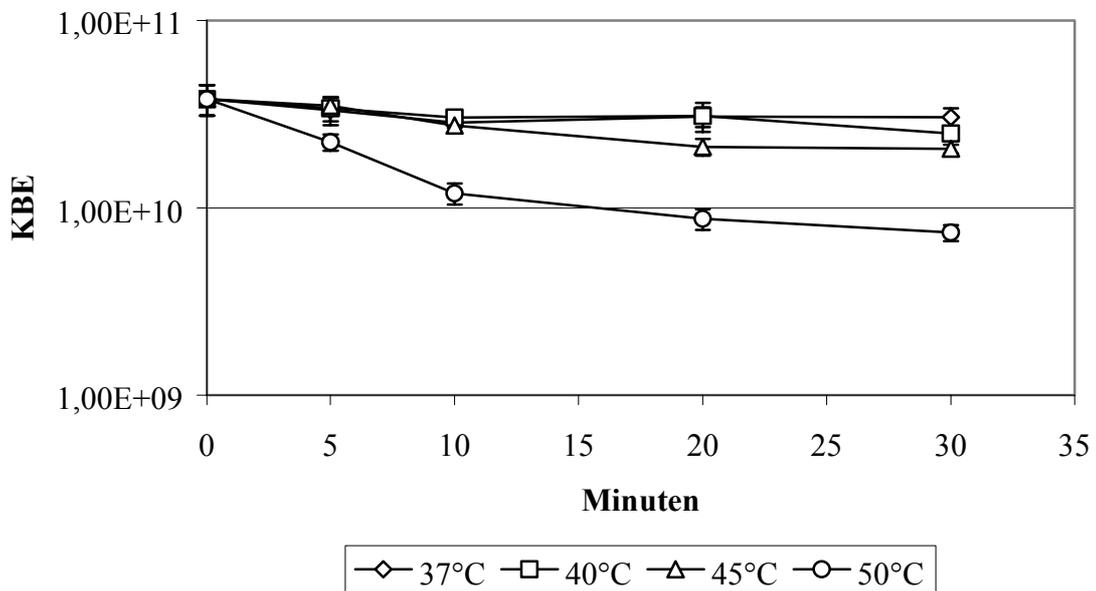


Abbildung 3.35 Keimzahl der sprühgetrockneten Bakterien in Abhängigkeit von Temperatur und Zeit

Die Schäden, die durch den Sprühtrocknungsprozess entstehen, kumulieren also nicht mit Schäden, die die Bakterien schon vorher hatten, wie bei den beiden anderen Methoden. Ein weiterer Grund für die gute Temperaturreistenz ist die Fähigkeit der Bakterien, sich an Stresssituationen anzupassen. Bakterien, die schon mal einer Temperaturbelastung ausgesetzt waren, können diese bei erneuter Belastung besser vertragen [Desmond et al., 2002]. Die Temperaturbelastungen, denen die Bakterien während der Sprühtrocknung ausgesetzt sind, dauern zwar nur Sekunden an, das reicht aber offensichtlich aus um den Bakterien den Anreiz zu geben, sich an Temperaturbelastungen anzupassen. Außerdem stirbt ein Teil der sehr temperaturempfindlichen Keime beim Sprühtrocknungsprozess ab, die hitzestabileren überstehen den Prozess.

### **3.5.4 Vergleich der Salztoleranz von Lyophilisat und gemahlenem Lyophilisat**

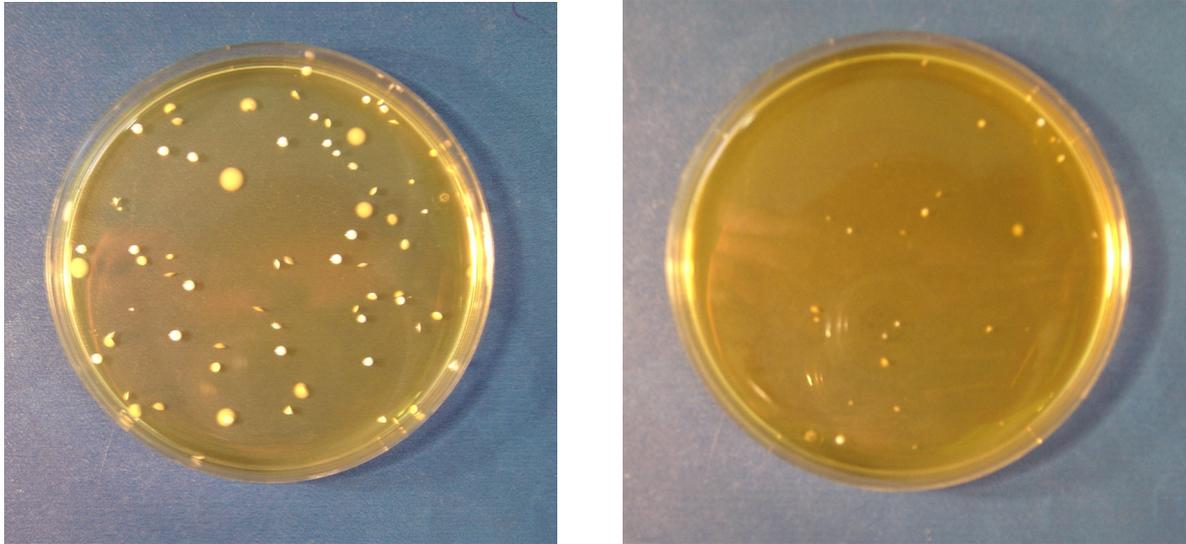
#### ***3.5.4.1 Durchführung***

Zur Bestimmung der Salztoleranz wurden die Bakterienagglomerate in Phosphatpuffer bei 37 °C (Blindwert), 45°C und 50°C 30 min inkubiert. Nach 5, 10, 20 und 30 Minuten wurde die Keimzahl bestimmt. Der eigentliche Salztoleranztest besteht aus der Zugabe von 4 % bis 5 % NaCl zum MRS- Agar [Gardiner et al., 2000].

#### ***3.5.4.2 Ergebnisse***

Die Salztoleranz von Bakterien ist vor allem von der Art abhängig, der sie angehören. Sie ist aber auch ein Indikator für Stressschäden bei Bakterien. [Gardiner et al., 2000]. Die Empfindlichkeit subletal geschädigter Bakterien gegenüber Natriumchlorid ist eine Folge von Zellmembranschäden [Brennan et al., 1986; Teixeira et al, 1997; Teixeira et al., 1995]. Wie schon im Kapitel „Stabilisierung durch Trocknung“ beschrieben, wird die Zellmembran der Bakterien schon

durch den Trocknungsprozess geschädigt. Ziel ist es herauszufinden, ob die Belastung einer mechanischen Zerkleinerung des Lyophilisates zu einer weiteren Schädigung der Membran führt.



*Abbildung 3.36 links: Lyophilisat auf MRS-Agar, rechts: Lyophilisat auf MRS-Agar mit 4,5 % Natriumchlorid*

Der Zusatz von Natriumchlorid führt bei Bakterien mit Membranschäden zu einer Abnahme der Keimzahl und die Kolonien werden bei sonst gleichen Wachstumsbedingungen deutlich kleiner (Abbildung 3.36).

In Abbildung 3.37 und Abbildung 3.38 sieht man den Keimzahlverlauf von unbehandeltem Lyophilisat und gemahlenem Lyophilisat über die Zeit von 30 Minuten bei 37°C und 50°C im Salztoleranztest. Zum Vergleich sind die jeweiligen Temperaturkurven aus der Bestimmung der Temperaturempfindlichkeit aufgetragen. Vergleicht man die Keimzahlverläufe der beiden Kurven des unbehandelten Lyophilisates bei 37°C und 50°C stellt man fest, dass schon das unbehandelte Lyophilisat bei einer Salzkonzentration von 4,5 % eine deutlich geringere Keimzahl aufweist als der Vergleich. Das zeugt von den Zellmembranschäden, die während der Lyophilisation entstanden sind.

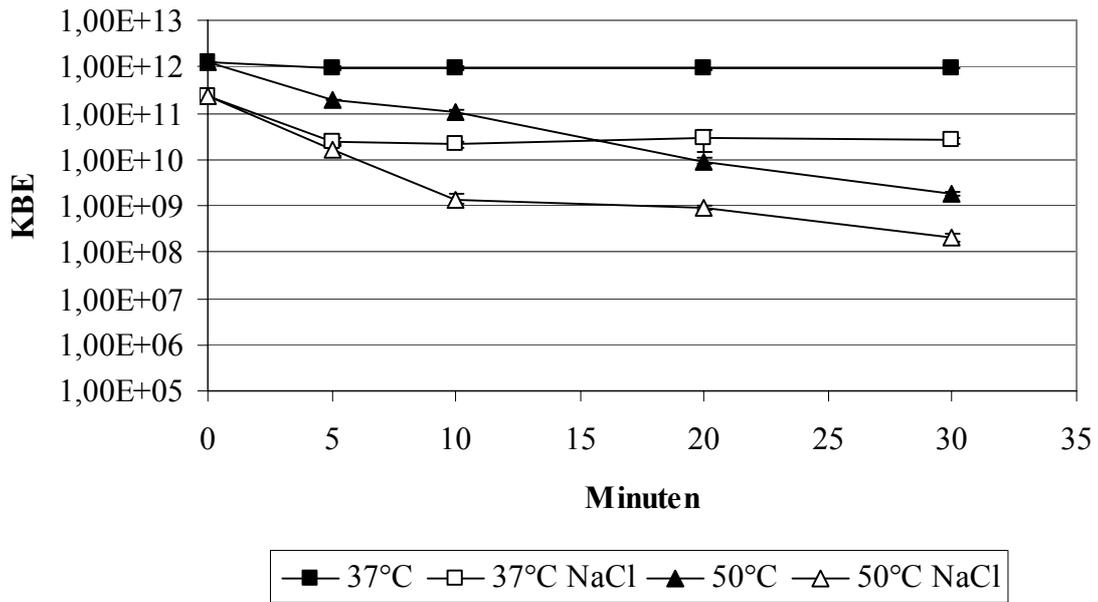


Abbildung 3.37 Lyophilisat

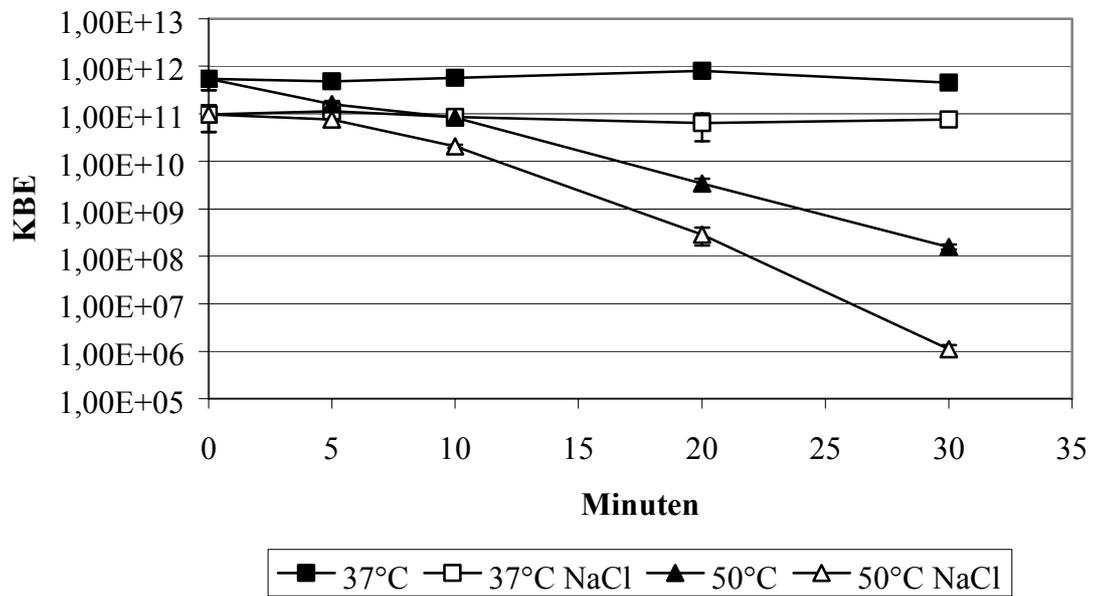
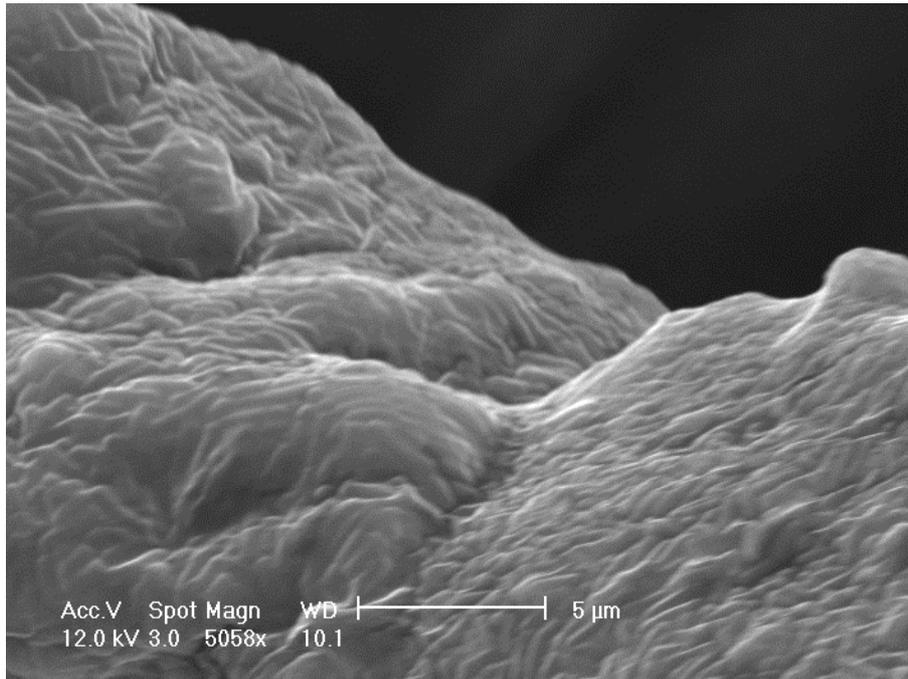


Abbildung 3.38 gemahlene Lyophilisat

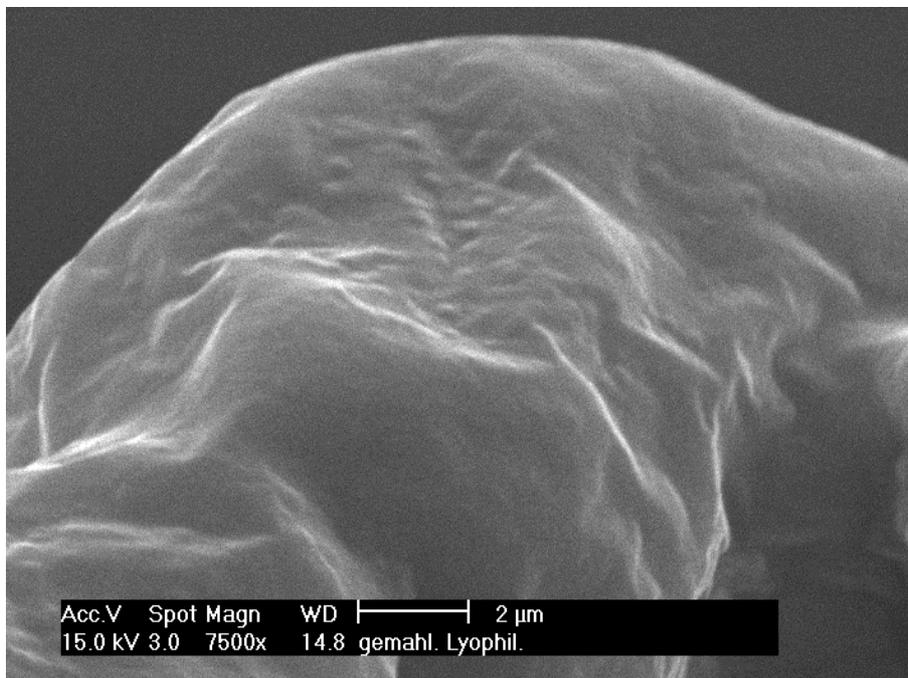
Im Vergleich dazu sieht man bei dem gemahlene Lyophilisat (Abbildung 3.38) bei den 37°C Kurven jedoch keine Abnahme der Keimzahl. Die Keimzahl liegt hier sogar etwas höher. Daraus folgt, dass die bei der Mahlung entstandenen subletalen Schäden keine Zellmembranschäden sind. Wären die entstandenen Schäden Membranschäden, würden sich die negativen Effekte von Salz und Temperaturstress summieren. Die Kurven der jeweiligen Temperaturen laufen aber sowohl bei dem ungemahlene als auch bei dem gemahlene Lyophilisat nahezu parallel.

### **3.5.5 Vergleich der Morphologie der Partikel**

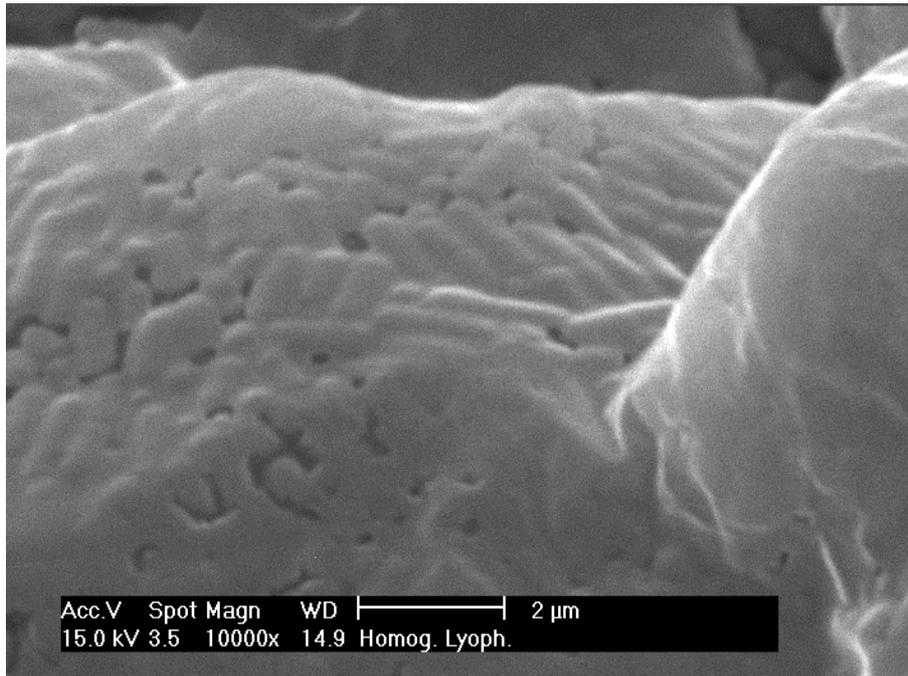
Nach der Gefriertrocknung wird das Lyophilisat von *Lb. casei* 163 vom Hersteller grob gemahlen, um ein fließfähiges Pulver zu erhalten. Abbildung 3.39 zeigt die Oberfläche eines solchen nicht weiter behandelten Lyophilisatpartikels. Auf der Oberfläche sind die einzelnen Bakterien gut zu erkennen. Sie liegen dicht an dicht, die Oberfläche zeigt keine Risse oder Löcher. Die Abbildung 3.40 zeigt die Oberfläche des in der Luftstrahlmühle gemahlene Lyophilisates. Durch die Reibung während des Mahlprozesses ist die Oberfläche an den exponierten Stellen glatt geschliffen. Daraus resultiert die Keimzahlabnahme durch den Mahlprozess. Nur in den Senken des Partikels sind die Bakterien noch zu erkennen. Auch die geringe Temperaturempfindlichkeit des in Öl homogenisierte Lyophilisates zeugt von subletalen Schäden. Diese scheinen auch größer als bei dem gemahlene Lyophilisat, obwohl die Aufnahme der Oberfläche der Partikel im Vergleich zum gemahlene Lyophilisat nur geringe Schäden aufweist. Aber auch hier zeigt sich eine gute Lagerstabilität.



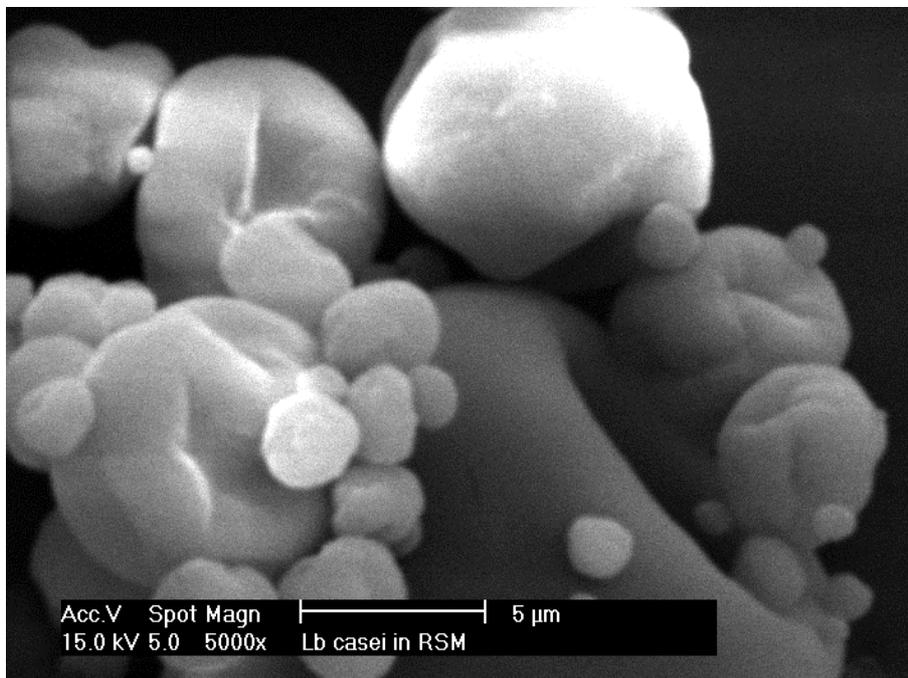
*Abbildung 3.39 REM-Aufnahme des unbehandelten Lyophilisates*



*Abbildung 3.40 REM-Aufnahme des gemahlten Lyophilisates*



*Abbildung 3.41 REM-Aufnahme des homogenisierten Lyophilisates*



*Abbildung 3.42 REM-Aufnahme der in RSM sprühgetrockneten Partikel*

Abbildung 3.41 zeigt die Oberfläche von homogenisiertem Lyophilisat. Auch hier sieht man an exponierten Stellen einen Abrieb der Bakterien. Dieser ist jedoch nicht so ausgeprägt wie bei den gemahlenden Partikeln. Die Oberfläche der Partikel ist mit Löchern überzogen, was darauf hindeutet, dass sich teilweise die stabilisierenden Substanzen zwischen den Bakterien herausgelöst haben. Um welche Substanzen es sich hierbei handelt, lässt sich nicht sagen, da die Rezeptur des Lyophilisates dem Firmengeheimnis unterliegt. Auf Abbildung 3.42 sind sprühgetrocknete Partikel zu erkennen. Es sind keine Bakterien auf der Oberfläche zu erkennen. Die Bakterien sind durch die Magermilchbestandteile vollständig umschlossen und dadurch gut geschützt.

### **3.5.6 Zusammenfassung**

Zusammenfassend kann man sagen, dass die einzigen Partikel, die sich nicht für die Einbettung in Fette eignen, die aus der Syloidsuspension sprühgetrockneten Partikel sind. Ihre Keimzahl nimmt schon bei trockener Lagerung deutlich ab. Da die Syloidpartikel eine im Vergleich zu den anderen Partikel geringere Ausgangskeimzahl pro Gramm haben, fällt die Abnahme besonders ins Gewicht. Da ein weiterer Keimzahlverlust bei der Einbettung zu erwarten ist, wäre die Keimzahl pro Gramm der erzeugten Partikel durch den Keimzahlverlust bei trockener Lagerung schon zu niedrig für die Einarbeitung in Produkte.

Das gemahlene Lyophilisat hat durch den Mahlprozess weitere subletale Schäden erlitten, wie sich bei der Bestimmung der Temperaturempfindlichkeit und der Lagerung bei 100 % RH gezeigt hat. Auch die durch die Mahlung geglättete Oberfläche der Partikel lässt auf eine weitere Schädigung schließen. Das gemahlene Lyophilisat weist aber eine sehr hohe Ausgangskeimzahl auf und zeigt bei trockener Einlagerung keine Abnahme der Keimzahl. Wenn durch das Fett ein vollständiger Wasserausschluss erreicht werden kann, eignet sich das gemahlene Lyophilisat für die Einbettung.

Im Vergleich zu dem gemahlten Lyophilisat und den sprühgetrockneten Bakterien weist die Lyophilisatsuspension auf Grund der Verdünnung eine geringere Keimzahl auf. Da sich nur etwa 10 % Öl in die Hartfette einarbeiten lassen, ohne dass diese ihre Festigkeit verlieren, ist dem resultierenden Keimgehalt der Bakterien enthaltenden Fettpartikel eine Grenze gesetzt. Geht man von keiner weiteren Keimzahlabnahme aus, reicht der resultierende Keimgehalt für einen Einsatz in Lebensmitteln jedoch aus.

In Vergleich zu dem gemahlten Lyophilisat und der Lyophilisatsuspension zeigen die sprühgetrockneten Bakterien eine Abnahme der Keimzahl während der trockenen Lagerung. Diese Abnahme ist jedoch geringer als die der Syloidpartikel. Betrachtet man die Temperaturempfindlichkeit der sprühgetrockneten Bakterien, zeigt sich mit Abstand die geringste Schädigung der Bakterien. Auch bei der Lagerung bei 100 % RH zeigt sich eine deutlich gesteigerte Stabilität gegenüber dem gemahlten Lyophilisat. Die Keimzahlabnahme ist sogar geringer als die des unbehandelten Lyophilisates. Die REM-Aufnahme der sprühgetrockneten Partikel zeigt, dass die Bakterien von den sie stabilisierenden Substanzen vollständig umschlossen sind, was ein Grund für die große Stabilität der Bakterien ist.

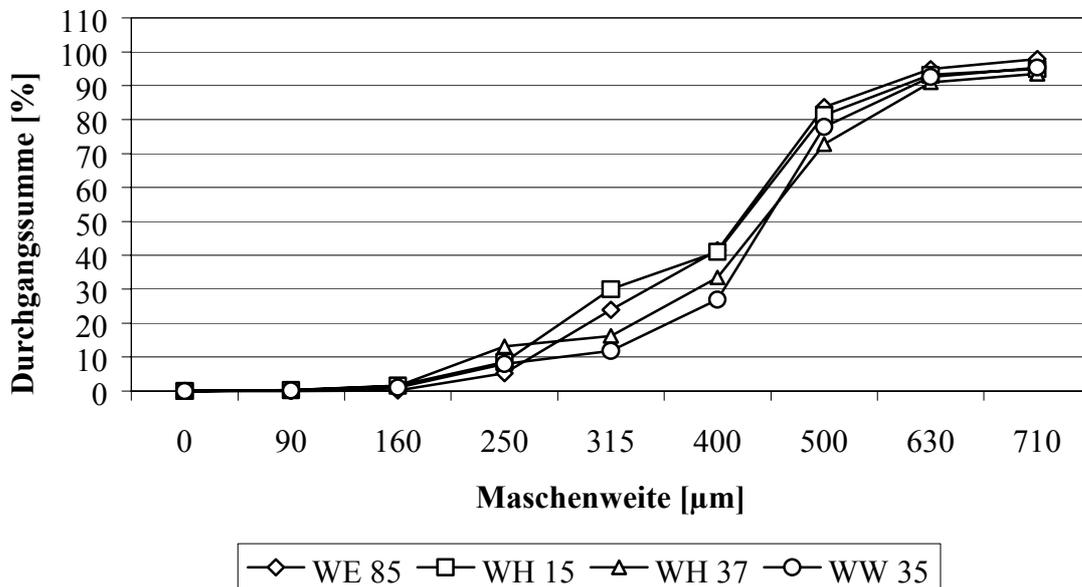
## 4 HERSTELLUNG VON FETTPARTIKELN MITTELS KRYOMAHLUNG

### 4.1 Beschreibung der Methode

Die Einbettung von probiotischen Bakterien in Fett zur Erzeugung von fließfähigem Pulver oder Granulat erfolgte bis jetzt in der Wirbelschicht oder durch Sprüherstarrung. Bei der Einbettung in der Wirbelschicht wird aufgeschmolzenes Fett auf in der Schwebelage gehaltenes Lyophilisat aufgesprüht [Pacífico et al., 2001; Durand und Panes, 2001]. Bei der Sprüherstarrung wird das Lyophilisat in aufgeschmolzenem Fett suspendiert und anschließend erstarrt, indem es in einem gekühlten Sprühturm versprüht wird [Sozzi et al., 1982]. Bei beiden Verfahren ist ein relativ großer apparativer Aufwand nötig.

Bei der Einbettung der Bakterien mittels Kryomahlung werden die getrockneten Bakterien in dem aufgeschmolzenen Fett suspendiert. Das Fett wird dann zu einer dünnen Schicht ausgegossen wobei es sofort wieder erstarrt. Unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff wird das Fett nach einer groben Vorzerkleinerung in einer Rotorschnellmühle vermahlen. Dieses Verfahren bietet gegenüber den beiden anderen Verfahren neben dem geringeren technischen und energetischen Aufwand zusätzlich den Vorteil, dass die Bakterien nur für kurze Zeit einer thermischen Belastung ausgesetzt sind. Das Fett muss nur bis kurz über seinen Schmelzpunkt erwärmt werden und kann sofort nach Einarbeiten der Bakterien wieder erstarren. Durch die langsame Abkühlung des Fettes entsteht eine stabile Modifikation des Fettes. Die erhaltene Partikelgröße wird durch den Siebringeneinsatz in der Rotorschnellmühle vorgegeben. Bei der Herstellung der Partikel wurde ein Siebring mit einer Lochweite von 500  $\mu\text{m}$  verwendet. Da die Partikelgrößenverteilung des erhaltenen Pulvers sehr breit ist, wurde sie mittels Siebanalyse bestimmt. Abbildung 4.1 zeigt die Summenverteilung von Partikeln aus verschiedenen Fetten. Bei allen Fetten liegt die Partikelgröße von ca. 90 % der

Partikel kleiner als die Lochweite des Siebringes. Bei den restlichen 10 % handelt es sich um Agglomerate.



*Abbildung 4.1 Summenverteilung der Partikelgrößen verschiedener Fettpartikel*

Die aus dem Mahlprozess resultierende breite Partikelgrößenverteilung ist gegenüber den anderen beiden Verfahren ein Nachteil. Allerdings ist die Partikelgrößenverteilung nicht bei allen verwendeten Fetten gleich (siehe Abbildung 4.2).

Da es sich um ein abbauendes Verfahren handelt, wird immer ein Teil der Bakterienagglomerate ungeschützt an der Oberfläche der Fettpartikel liegen. Allerdings ist auch bei der Einbettung in der Wirbelschicht die vollständige Umhüllung der Bakterien nur durch eine sehr große Schichtdicke zu gewährleisten, welche in einer großen Partikelgröße resultiert. Durand und Panes erreichten bei der Einbettung im Fließbett eine Partikelgröße von 400µm, aber nur eine Einbettungsrate von 60% [Durand und Panes, 2001].

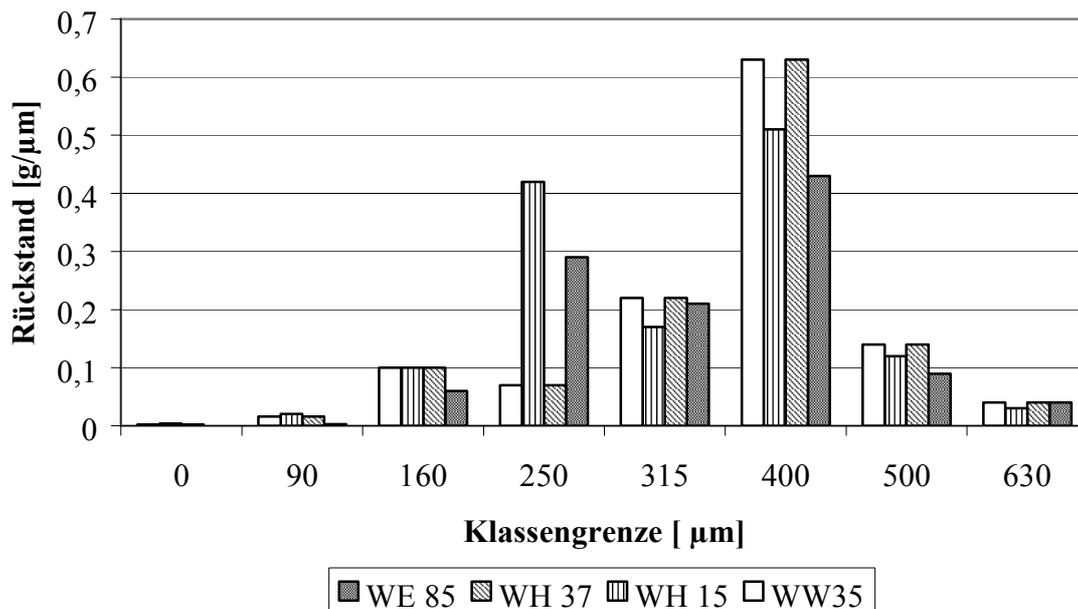


Abbildung 4.2 Dichteverteilung der Partikelgrößen verschiedener Fette

## 4.2 Auswahl der Fette

Das Fett, in das die Bakterien eingebettet werden sollen, muss bestimmte Eigenschaften haben. Die wichtigste zu beachtende Eigenschaft ist der Schmelzbereich des Fettes. Da Fette Gemische aus Glyceriden mit verschiedener Fettsäurezusammensetzung sind, haben sie keinen scharf definierten Schmelzpunkt. Damit das entstehende Pulver fließfähig ist, muss das Fett einen so hohen Schmelzbereich haben, dass es bei Raumtemperatur nicht erweicht. In diesem Zusammenhang ist auch der Solid-Fat-Index wichtig. Bei gleichem Schmelzbereich können Fette unterschiedlich hohe Anteile an bei Raumtemperatur flüssigen Anteilen haben [Sasol, 2004]. Ein hoher Anteil flüssiger Komponenten kann bewirken, dass die Partikel schon bei Raumtemperatur eine schmierige Oberfläche bekommen und die Partikel zusammenkleben. Auf der anderen Seite darf der Schmelzbereich des Fettes nicht so hoch liegen, dass die Bakterien beim Einarbeiten in das Fett auf Grund der thermischen Belastung Schaden nehmen

und absterben. Da in der Literatur nicht belegt ist, ob Fette, die bei Körpertemperatur fest sind, von Lipasen im Darm abgebaut werden, sollte das Fett einen Schmelzbereich aufweisen, bei dem es im Körper zumindest erweicht.

Das Fett sollte zudem eine möglichst geringe Jodzahl besitzen. Die Jodzahl ist ein Maß für den Anteil ungesättigter Fettsäuren. Diese können oxidieren und die Oxidationsprodukte können die Bakterien schädigen oder später im Produkt zum Verderb führen.

Eine weitere wichtige Kennzahl, die beachtet werden muss, ist die Hydroxylzahl. Sie ist ein Maß für den Anteil an Partialglyceriden, also Mono- und Diglyceriden. Partialglyceride zeigen stärkere Benetzungseigenschaften als Triglyceride [Müller, 1986], was für die Einbettung von Bakterien von Vorteil ist. Allerdings binden sie auch mehr Wasser an ihrer Oberfläche. Abbildung 4.3 zeigt den Massezuwachs von drei verschiedenen Hartfetten unterschiedlicher Hydroxylzahl in der DVS. Der Massezuwachs ist zwar bei allen drei Proben nicht besonders groß, man kann aber deutlich erkennen, dass die Probe mit der größten Hydroxylzahl auch die größte Menge an Wasser aufnimmt. Außerdem bewirkt ein hoher Anteil an Partialglyceriden, dass das Hartfett elastischer und bei Schockkühlung weniger spröde ist als reine Triglyceride [Sasol, 2004]. Diese Eigenschaft ist theoretisch für die Vermahlung des Fettes von Nachteil. In Abbildung 4.2 sieht man hingegen, dass das Fett mit der niedrigsten Hydroxylzahl sowie das Fett mit der höchsten Hydroxylzahl sehr ähnliche Verteilungsmuster in der Partikelgrößenverteilung zeigen. Nur die beiden Fette mit einer Hydroxylzahl zwischen 5 und 15 zeigen ein etwas anderes Verteilungsmuster. Die Größe der Hydroxylzahl spielt daher praktisch keine Rolle bei der Vermahlung. Des Weiteren neigen Fette mit einem hohen Anteil an Partialglyceriden zur Schmelzpunktserhöhung während der Lagerung.

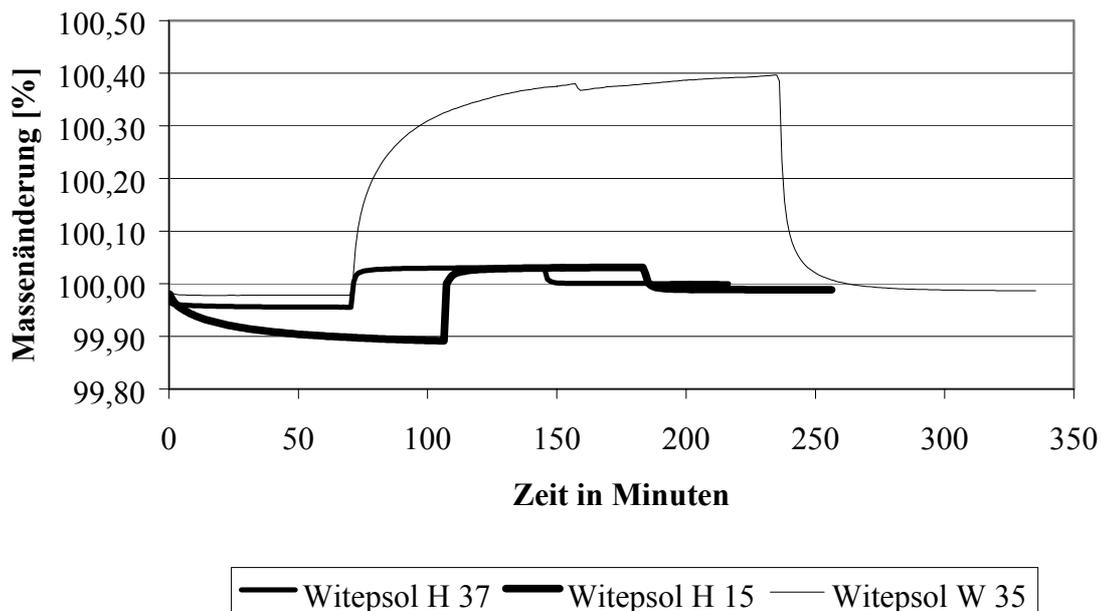


Abbildung 4.3 Massenzunahme dreier Hartfette unterschiedlicher Hydroxylzahl in der DVS. Bei den Proben handelt es sich um gemahlene Fettpartikel. Witepsol<sup>®</sup> H37 hat eine OHZ von max. 3, Witepsol<sup>®</sup> H15 von 5-15 und Witepsol<sup>®</sup> W35 eine OHZ von 40-50

Bei allen in dieser Arbeit verwendeten Hartfetten handelt es sich um Witepsole der Firma Sasol GmbH. Witepsole sind Veresterungsfette und eigentlich Suppositoriengrundmassen. Sie werden aus Palmkernölen hergestellt, indem die Fettsäuren vom Glycerin abgetrennt, hydriert und fraktioniert destilliert werden. Die gewünschte Fettsäurefraktion wird dann wieder mit Glycerol verestert [Müller, 1986]. Bei allen Witepsolen sind außerdem Fettsäuren von C8 – C10 entfernt worden, so dass sie alle einen guten Solid-Fat-Index besitzen.

Die Witepsole haben gegenüber Fetten aus der Lebensmittelindustrie den Vorteil, dass sie in Bezug auf ihre Fetteigenschaften genau definiert sind, und man daher die Einflüsse dieser Eigenschaften gut zeigen kann. Da es sich um hydrierte Pflanzenfette handelt, sind sie auch für Lebensmittel zugelassen.

*Tabelle 4.1 Kennzahlen der verwendeten Fette*

	aufsteigender Schmelzpunkt in °C	Hydroxylzahl in mg KOH/g	Iodzahl in g I <sub>2</sub> /100g
Witepsol® H 15	33,5 - 35,5	5 – 15	max. 3
Witepsol® H 37	36,0 – 38,0	max. 3	max. 3
Witepsol® W 35	33,5 – 35,5	40 – 50	max. 3
Witepsol® E 85	42,0 – 44,0	5 - 15	max. 3

### **4.3 Stabilität von Fettpartikel mit einer Keimbelastung von 10 %**

#### **4.3.1 Einleitung**

Die Einbettung in Fett soll die Bakterien vor Feuchtigkeit schützen. Dieses Ziel lässt sich nur erreichen, wenn die Bakterienagglomerate vollständig von dem Fett umschlossen sind und dadurch kein Wasser in die Partikel eindringen kann. Der Keimgehalt muss daher mit dem Fett im richtigen Verhältnis stehen. Ist der Bakterienanteil zu hoch, kann das Fett nicht alle Bakterienagglomerate benetzen. Der Keimgehalt muss jedoch so hoch sein, dass die Keimzahl in dem Produkt, in das die Partikel später eingearbeitet werden, hoch genug ist um einen probiotischen Effekt zu erzielen. In der Literatur gibt es unterschiedliche Angaben, welche Konzentration an Bakterien aufgenommen werden muss, um einen positiven Effekt zu erzielen. Als probiotische Konzentration wird in der Literatur eine Keimzahl von  $10^5$  KBE/g bis  $10^7$  KBE/g Produkt angegeben (Tabelle

4.2). Die Keimzahl pro Gramm Fettpartikel muss also so hoch angesetzt werden, dass diese Konzentration über den Lagerungszeitraum nicht unterschritten wird.

*Tabelle 4.2 Keimkonzentrationen pro Gramm probiotisches Produkt*

Menge an Bakterien	Referenz
$10^5$ KBE/g – $10^6$ KBE/g	Dave und Shah [1998]
$10^6$ KBE/g	Kneifel et al. [1999]
$10^7$ KBE/g	Gardiner et al. [2000]

Die Keimzahl pro Gramm Fett wurde daher auf 10 % der Gesamtmasse festgelegt, dies ist im Vergleich zu den in der Literatur beschriebenen Daten ein geringerer Wert (Tabelle 3.1).

Da die Fettpartikel später möglichst universell eingesetzt werden sollen, wird die Lagerstabilität der Fettpartikel bei Raumtemperatur und 100 % RH getestet. Sind die Bakterien bei diesen Bedingungen stabil, kann davon ausgegangen werden, dass sie auch in Produkten stabil sind, die weniger Feuchtigkeit enthalten.

#### **4.3.2 Vergleich von Fettpartikeln mit mikronisiertem Lyophilisat und sprühgetrockneten Bakterien**

##### **4.3.2.1 Durchführung**

Zunächst wurde die Stabilität von verschiedenen Bakterienagglomerate in einer Fettgrundlage untersucht. Dazu wurden 10 % des jeweiligen Keims in aufgeschmolzenes Witepsol<sup>®</sup> H 37 eingerührt. Die erstarrte Fettmasse wurde dann

unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff zu Partikel vermahlen. Es wurden zunächst nur das gemahlene Lyophilisat ohne Hilfsstoff und mit 10 % Aerosil<sup>®</sup> 972-Zusatz (Mahlschema: Düse a: 1 bar, Düse b: 8 bar, 1 Zyklus) und die in RSM sprühgetrockneten Bakterien untersucht. Die Bakterienagglomerate, die in der Syloidsuspension sprühgetrocknet wurden, können auf Grund des großen Pulvervolumens nicht in einer Konzentration von 10 % eingearbeitet werden. Auch die homogenisierten Bakterien können nicht in einer Konzentration von 10 % eingesetzt werden, da auf Grund des dann sehr hohen Ölanteils das Fett nicht mehr fest wird. Um zu zeigen, dass nicht der Prozess des Einbettens als solcher die Bakterien weiter schädigt, wurden die Partikel zusätzlich bei 0 % RH eingelagert.

### **4.3.3 Ergebnisse**

Die Einbettung an sich führt nicht zu einer Abnahme der Keimzahl während der Lagerung (Abbildung 4.4). Bei den Fettpartikeln mit den sprühgetrockneten Bakterien ist nach vier Wochen bei trockener Lagerung zwar eine geringe Keimzahlabnahme festzustellen, die Keimzahl dieser Bakterienagglomerate nahm aber auch nicht eingebettet während der Lagerung ab (Abbildung 3. 29).

Bei der Lagerung bei 100 % RH sieht man bei den Fettpartikeln mit den sprühgetrockneten Bakterien über vier Wochen eine deutliche Keimzahlabnahme von vier log-Stufen. Bei der Lagerung von nicht eingebetteten Partikeln nimmt die Keimzahl um viereinhalb log- Stufen ab. Das Fett bietet also so gut wie keinen Schutz für die Bakterien. Die Keimzahlabnahme ist so groß, dass man nicht von einer Stabilisierung durch das Fett sprechen kann. Bei den Fettpartikeln mit dem gemahlene Lyophilisat ist nach einer Woche kein Überleben der Bakterien mehr nachzuweisen (Abbildung 4.5). Aus der Bestimmung der Temperaturempfindlichkeit ging bereits hervor, dass die Bakterien durch das Mahlen zusätzlichen Schaden neben den Schäden durch den Trocknungsvorgang nehmen. Auch die Einbettung in Fett ist für die Bakterien eine zusätzliche Stressbelastung, die

zu weiteren subletalen Schäden führt. Diese führen aber erst im Zusammenspiel mit weiteren Stressfaktoren wie hoher Luftfeuchte, Temperatur oder Scherung zu einer Abnahme der Keimzahl.

Bei der trockenen Lagerung führt das Einbetten in Fett nicht zu einer Abnahme der Keimzahl. Das eingeschränkte Überleben der Bakterien bei feuchter Einlagerung zeigt, dass die Bakterienagglomerate von dem Fett nicht vollständig umschlossen sind. Auch der Zusatz des Hilfsstoffes Aerosil® 972 beim Mahlen zeigt keine positive Wirkung bezüglich der Überlebensrate der Keime.

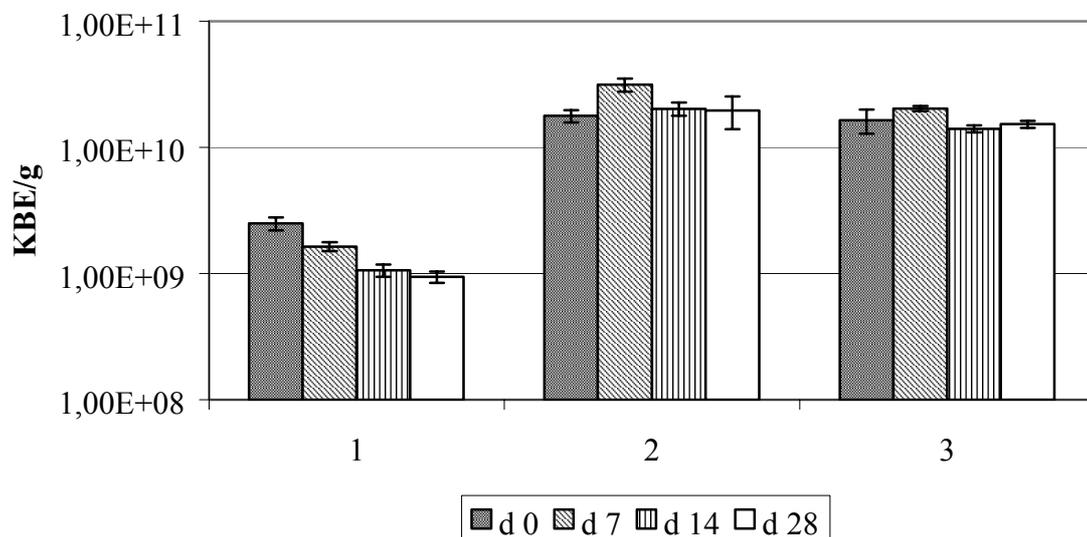


Abbildung 4.4 Keimzahl der Fettpartikel mit 1: sprühgetrockneten Bakterien, 2: gemahlenem Lyophilisat ohne Hilfsstoff und 3: gemahlenem Lyophilisat mit 10 % Aerosil 972 während der Lagerung bei Raumtemperatur und 0 % RH

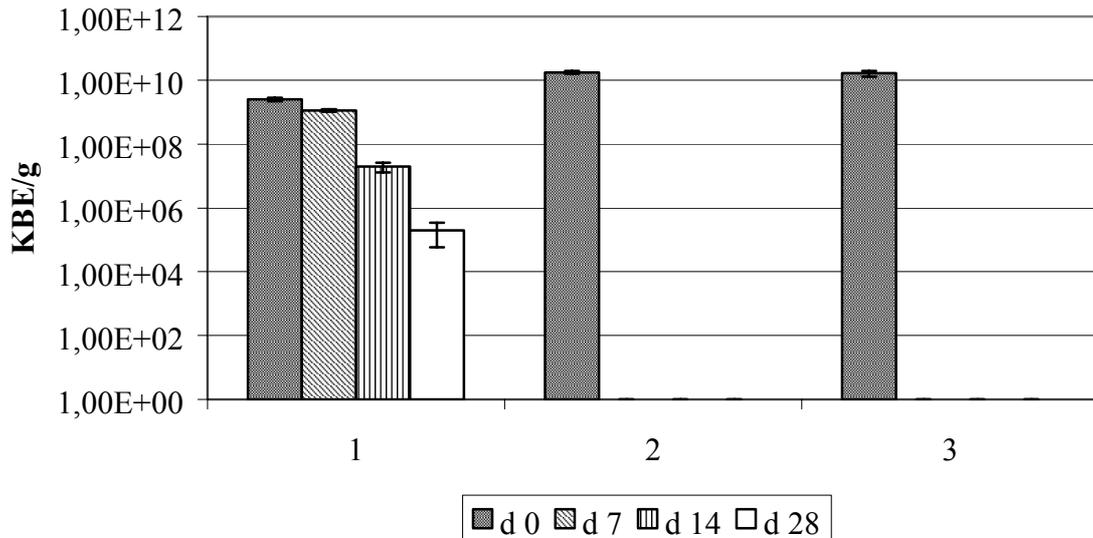


Abbildung 4.5 Keimzahl der Fettpartikel mit 1: sprühgetrockneten Bakterien, 2: gemahlenem Lyophilisat ohne Hilfsstoff und 3: gemahlenem Lyophilisat mit 10 % Aerosil 972 während der Lagerung bei Raumtemperatur und 100 % RH

#### 4.3.4 Vergleich verschiedener Herstellungsmethoden

##### 4.3.4.1 Durchführung

Durch das bloße Einrühren der Bakterien in das aufgeschmolzene Fett kommt es offensichtlich nicht zu einer vollständigen Benetzung der Bakterien. Durch die Mahlung in der Luftstrahlmühle wird die Oberfläche der Partikel stark vergrößert, was mit einer Zunahme der freien Oberflächenenergie einhergeht. Die Partikel sind also bestrebt sich wieder zusammenzulagern, um ihre Oberflächenenergie zu verkleinern und bilden infolgedessen Agglomerate [Martin, 1975]. Diese lassen sich durch das bloße Einrühren in Fett nicht vollständig zerstören. Auch die sprühgetrockneten Partikel neigen zur Agglomeration, allerdings nicht so stark wie die gemahlenen Partikel. Insgesamt wurden sieben Versuche durchgeführt, um den Einfluss verschiedener Herstellungsmethoden zu untersuchen. Zur Verbesserung der Benetzung der Partikel wurden die Bakterienagglomerate

mit dem Fett angerieben oder das Fett mit einem Emulgator versetzt. Bei den Versuchen eins bis vier wurden in RSM sprühgetrocknete Bakterien verwendet, in den Versuchen fünf bis sieben gemahlene Lyophilisate ohne Hilfsstoff. Bei dem für die Einbettung verwendeten Fett handelte es sich um Witepsol<sup>®</sup> H 37. Bei Versuch eins wurden die Bakterien mit etwas aufgeschmolzenem Fett in einer Fantaschale angerieben und der Rest der Schmelze wurde langsam zugegeben. Während der Zeit des Einarbeitens (ca. 10 min.) musste das Fett auf einer Temperatur von 45°C gehalten werden, was für die Bakterien eine Temperaturbelastung darstellte. Bei Versuch zwei wurden die Bakterien in etwas aufgeschmolzenem Fett angerieben. Nach Erstarren des Fettes wurde die Masse zerbröselnd und in dem Rest des aufgeschmolzenen Fettes unter Rühren aufgelöst. Die thermische Belastung der Bakterien war so wesentlich kürzer als bei Versuch eins. Versuch drei diente als Vergleich: Bakterien wurden einfach mit dem Magnetrührer in die aufgeschmolzene Fettmasse eingerührt. Bei Versuch vier wurde dem Fett als Emulgator das Phospholipid Lipoid<sup>®</sup> S 20 in 3 %iger Konzentration zugesetzt. Die Bakterienagglomerate wurden auch hier ohne Anreiben eingerührt. Versuch fünf wurde wie Versuch drei durchgeführt, Versuch sechs wie Versuch zwei. Versuch sieben wurde ebenfalls wie Versuch zwei durchgeführt, dem Fett wurde als Emulgator 3 % Lipoid S 20 zugesetzt, da sich bei Versuch fünf anders als bei Versuch zwei keine gleichmäßige Verteilung der Bakterien ergeben hat. Nach dem Einarbeiten der Bakterien wurde das Fett dann unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff vermahlen.

#### ***4.3.4.2 Ergebnisse***

Aus technischen Gründen konnte bei der Probe eins nach vier Wochen keine Keimzahlbestimmung mehr durchgeführt werden. Die Abnahme der Keimzahl der Proben eins bis vier über drei Wochen zeigt, dass es keine großen Unterschiede zwischen den einzelnen Herstellungsmethoden gibt (Abbildung 4.6). Bei beiden Versuchen, bei denen die Keime angerieben wurden, zeigt sich ein fast

identischer Keimzahlverlauf, der darauf schließen lässt, dass die thermische Belastung des Herstellungsprozesses nur einen geringen Einfluss auf das Überleben der Keime hat. Nach vier Wochen Einlagerung haben die Fettpartikel mit den angeriebenen Bakterien jedoch sogar eine geringere Keimzahl als der Vergleichsversuch drei. Daraus kann man schließen, dass die gleichmäßige Verteilung der Bakterien im Fett keine Rolle für ihr Überleben während der Einlagerung spielt. Der Zusatz des Emulgators zum Fett hat zunächst einen positiven Einfluss auf das Überleben der Bakterien, nach vier Wochen ist dieser Vorteil jedoch nicht mehr vorhanden. Der Emulgator sorgt zwar für eine bessere Benetzung der Bakterien mit dem Fett, er erhöht aber gleichzeitig dessen Hydrophilie und damit die Neigung, Wasser an seiner Oberfläche zu binden.

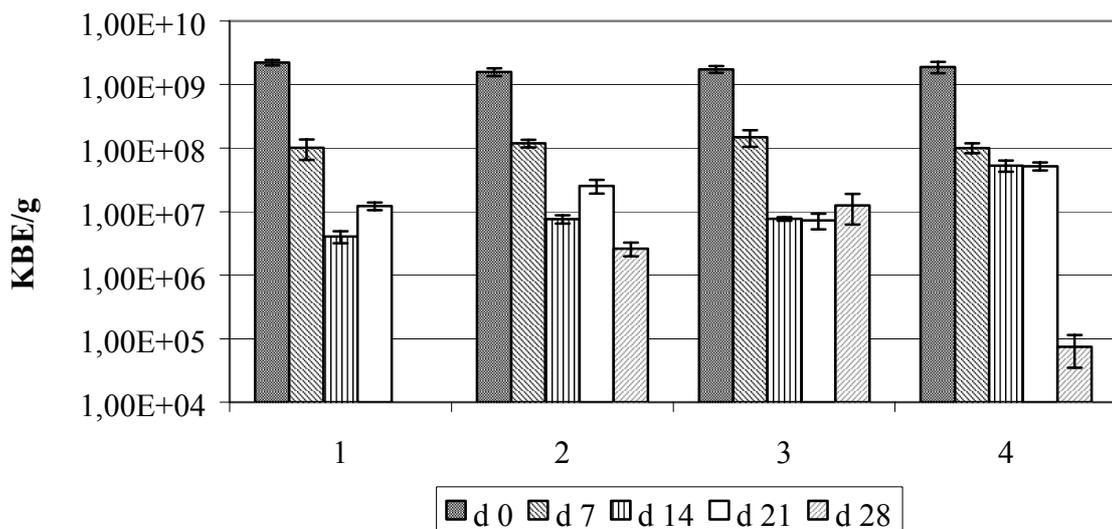


Abbildung 4.6 Keimzahl der Fettpartikel verschiedener Herstellungsmethoden. Versuch 1- 4 (Herstellung der Partikel: siehe Durchführung, keine Angabe Tag 28 bei Versuch 1)

Nach einer Woche sind bei den Versuchen fünf bis sieben keine überlebenden Keime mehr nachzuweisen (Abbildung 4.7). Das Anreiben der Bakterien, sowie

der Zusatz des Emulgators bewirken auch bei den gemahlten Bakterien keine erhöhte Stabilität. Daraus lässt sich ableiten, dass die schlechte Überlebensrate der Bakterien im Fett sich nicht mit einer mangelnden Benetzung der Bakterien begründen lässt.

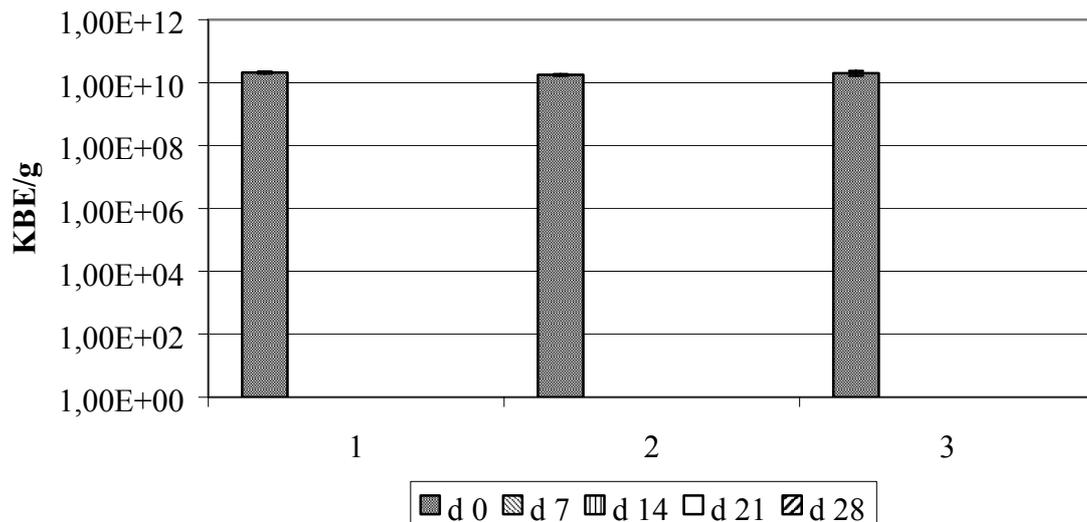


Abbildung 4.7 Keimzahl der Fettpartikel verschiedener Herstellungsmethoden. Versuch 1- 4 (Herstellung der Partikel: siehe Durchführung)

### 4.3.5 Vergleich verschiedener Fette

#### 4.3.5.1 Durchführung

Wie schon im Kapitel „Auswahl der Fette“ beschrieben, muss das Fett für die Einbettung von Bakterien verschiedene Voraussetzungen erfüllen. Um den Einfluss der verschiedenen Fetteigenschaften auf das Überleben der Keime zu untersuchen, wurden 10 % in RSM sprühgetrocknete Bakterien in verschiedene Fette eingearbeitet und dann vermahlen. Bei den Fetten handelt es sich um Witepsol<sup>®</sup> H 37, Witepsol<sup>®</sup> H 15, Witepsol<sup>®</sup> E 85 und Witepsol<sup>®</sup> W 35.

#### 4.3.5.2 Ergebnisse

Aus technischen Gründen konnte die Keimzahl der Fettpartikel nach sechs Wochen bei Witepsol® H 15 und E 85 nicht bestimmt werden. Die stärkste Abnahme der Keimzahl zeigt sich bei den Fettpartikeln aus Witepsol® W 35 (Abbildung 4.8).

Schon nach eine Woche liegt die Keimzahl hier eine log-Stufe niedriger als die der anderen Partikel. Witepsol® W 35 hat mit einer Hydroxylzahl von 40 bis 50 von den vier verwendeten Fetten die größte Hydroxylzahl. Die Hydroxylzahl ist ein Maß für den Anteil an Mono- und Diglyceriden. Das Fett kann durch einen hohen Anteil an Mono- und Diglyceriden mehr Wasser an seiner Oberfläche binden (Abbildung 4.9). Sind in den Fettpartikeln Poren oder Risse, kann das Wasser leichter in die Partikel eindringen.

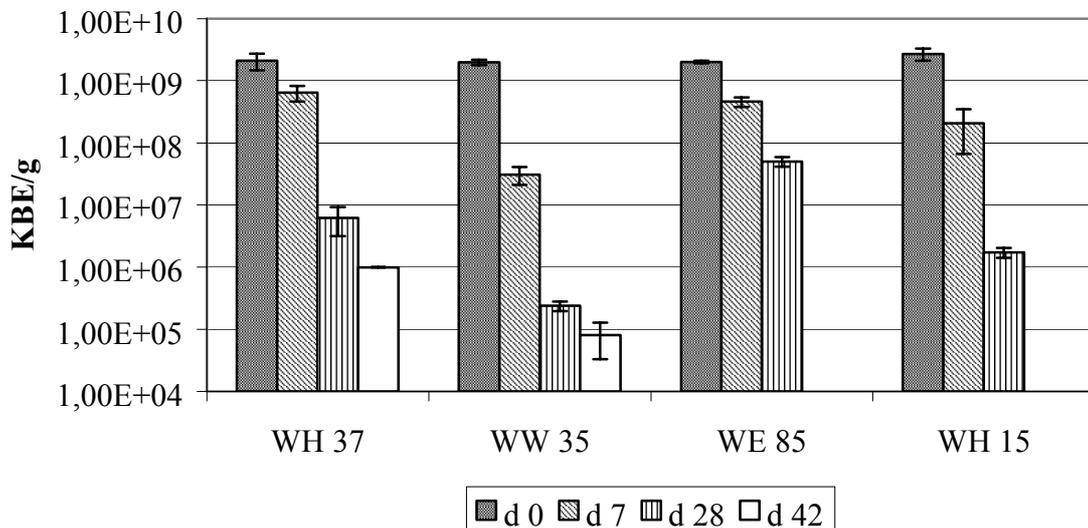


Abbildung 4.8 Einfluss der verschiedenen Fette auf das Überleben der Bakterien während der Lagerung bei 100 % RH und RT (keine Angabe für Tag 42 bei den Proben WE 85 und WH 15)

Die Fettpartikel aus Witepsol<sup>®</sup> W 35 nehmen so auch bei der dynamischen Wasserdampf-Sorption am meisten Wasser auf. Witepsol<sup>®</sup> E 85 und Witepsol<sup>®</sup> H 15 haben eine Hydroxylzahl von 5-15, während Witepsol<sup>®</sup> H 37 eine Hydroxylzahl von max. 3 hat. Der Unterschied zwischen den Hydroxylzahlen dieser drei Fette lässt sich mit Hilfe der DVS nicht feststellen, allerdings ist die Differenz zwischen den Hydroxylzahlen dieser drei Fette auch nur gering. Die Keimzahlabnahme der Partikel dieser drei Fette innerhalb von vier Wochen korreliert ebenfalls nicht mit den Ergebnissen der DVS-Messung. Die Messung der Wasseraufnahme kann also nicht als Voraussage der Überlebenswahrscheinlichkeit der Bakterien herangezogen werden, sondern sie kann nur Hinweise geben.

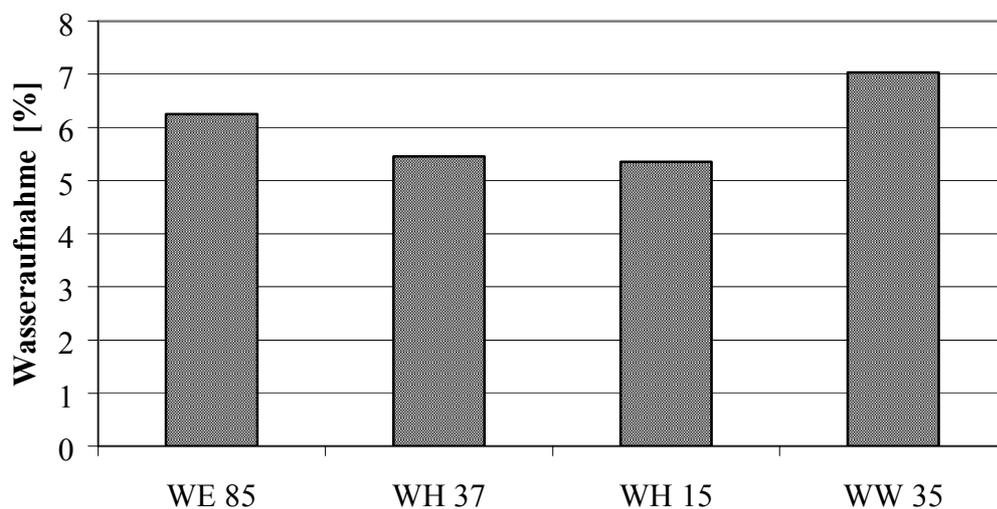


Abbildung 4.9 Wasseraufnahme der Partikel in der DVS

Bei den drei Fetten mit der niedrigeren Hydroxylzahl korreliert die Überlebensrate der Bakterien jedoch mit dem Schmelzbereich. Witepsol<sup>®</sup> H 15 hat ebenso wie Witepsol<sup>®</sup> W 35 einen Schmelzbereich von 33,5 bis 35,5. Es hat aber nur eine Hydroxylzahl von 5-15 und ist daher hydrophober als Witepsol<sup>®</sup> W 35, was sich in der Überlebensrate bemerkbar macht. Das nächsthöher schmelzende Fett ist das Witepsol<sup>®</sup> H 37. Das Fett mit dem höchsten Schmelzbereich ist Wi-

tepsol<sup>®</sup> E 85, welches auch die größte Überlebensrate der in ihm eingebetteten Bakterien zeigt.

#### **4.3.6 Vergleich der Überlebensrate von Lb. casei in Fettpartikeln und in ungemahlenem Fett**

##### ***4.3.6.1 Durchführung***

Es hat sich gezeigt, dass die Bakterien nach der Einbettung in Fett nicht vollständig von dem Fett umschlossen sind. Durch die Vermahlung des Fettes entstehen Partikel mit einer großen Oberfläche. An den Bruchkanten der Partikel liegen die Bakterien frei und sind nicht von dem Fett geschützt. Eine Verringerung der Oberfläche des Fettes müsste darum eine erhöhte Stabilität der Bakterien zur Folge haben.

In zwei Ansätzen wurden 10 % in RSM sprühgetrocknete Bakterien in Fett eingebettet. Bei den verwendeten Fetten handelte es sich um Witepsol<sup>®</sup> H 37 und Witepsol<sup>®</sup> W 35. Ein Ansatz wurde mit 1 % sprühgetrockneten Bakterien in Witepsol<sup>®</sup> H 37 hergestellt. Die Hälfte der im Fett eingebetteten Bakterien wurde vermahlen, die andere Hälfte nicht.

##### ***4.3.6.2 Ergebnisse***

Vergleicht man die oben genannten Proben dann fällt auf, dass es nur bei dem Ansatz mit 10 % Bakterien in Witepsol<sup>®</sup> H 37 nach sechswöchiger Einlagerungszeit einen deutlichen Unterschied zwischen gemahlene Fettpartikeln und ungemahlenem Fett gibt (Abbildung 4.10). Die Keimzahl nimmt bei der gemahlene Charge um mehr als drei log-Stufen ab, während es bei der ungemahlene Probe nur zwei log-Stufen sind. Die Verkleinerung der Fettoberfläche hat hier zu einer besseren Überlebensrate der Bakterien geführt. Dieser Unterschied zwischen gemahlene Fettpartikeln und der ungemahlene Probe zeigt sich jedoch bei den zwei anderen Ansätzen nicht. Bei dem Ansatz mit 10 %iger Keimbelastung in Witepsol<sup>®</sup> W 35 ist nur nach der ersten Woche die Keimzahl des unge-

mahlenen Fettes höher, bei längerer Einlagerung gleicht sich dieser Unterschied jedoch wieder aus. Die sehr starke Keimzahlabnahme dieser Proben lässt sich nicht damit erklären, dass nur die Bakterien absterben, die an der Oberfläche der Partikel sitzen. Vielmehr muss man darauf schließen, dass auch im Inneren der Partikel Keime absterben. Dazu kann es nur kommen, wenn Feuchtigkeit in die Partikel eindringt. Bei einer Bakterienbeladung von 10 % liegen die Bakterienagglomerate so dicht nebeneinander, dass sie sich teilweise berühren, und so Wasser in das Innere der Partikel eindringen kann (Abbildung 4.12).

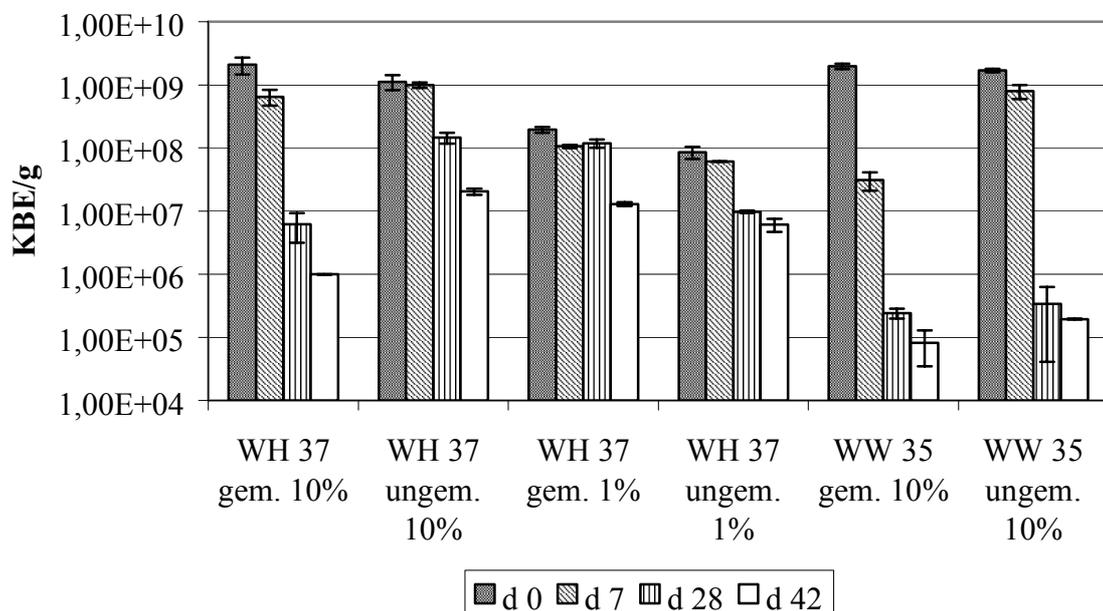


Abbildung 4.10 Keimzahl der eingelagerten Fettpartikel bei Lagerung bei 100 % RH und Raumtemperatur (gem.: gemahlene Fett, ungem.: ungemahlene Fett)

Dies erklärt auch, warum die Überlebensrate der Bakterien in den Fettpartikel mit einem Prozent Keimbelastung viel größer ist als bei 10 % Keimbelastung, obwohl das gleiche Fett zur Einbettung verwendet wurde. Hier liegen die Bakterienagglomerate so weit auseinander, dass kein Wasser in die Partikel eindringen kann. Durch eine hohe Hydroxylzahl des Fettes wird bei einer Keimbel-

dung von 10 % das Eindringen des Wassers noch erleichtert, so dass es hinsichtlich der Überlebensrate der Bakterien über einen Einlagerungszeitraum von 42 Tagen keinen Unterschied mehr macht, ob das Fett gemahlen ist oder nicht. Da sich das Wasser in dem Partikel ausbreiten kann, spielt es keine Rolle, ob die Oberfläche des Fettes durch das Mahlen groß ist oder ob sie wie bei der ungemahlten Probe klein ist. Bei dem Fett mit einer niedrigen Hydroxylzahl spielt der Größenunterschied der Oberfläche noch eine Rolle, da das Eindringen des Wassers in den Partikel nicht durch einen hohen Anteil an Mono- und Diglyceriden, welche Emulgatoreigenschaften besitzen, unterstützt wird. Auch bei der Untersuchung der verschiedenen Herstellungsmethoden war die Probe, der ein Emulgator zugesetzt wurde, die mit der schlechtesten Überlebensrate nach vierwöchiger Einlagerung.

#### **4.3.7 Zusammenfassung**

Obwohl die gemahlten Lyophilisatpartikel bei trockener Lagerung eine gute Stabilität aufweisen, eignen sie sich nicht für die Einbettung in Fett in einer Konzentration von 10 %. Die Einbettung ist bei dieser Konzentration nicht vollständig, und es kommt schon innerhalb einer Woche zu einem sehr starken Keimzahlverlust. Die in RSM sprühgetrockneten Bakterien eignen sich besser für die Einbettung in Fett, eine Bakterienkonzentration von 10 % ist jedoch für eine Stabilisierung der Bakterien zu groß, und es kommt über die Lagerdauer zu einem erheblichen Keimzahlverlust. Dabei ist es unerheblich, ob die Bakterien durch Anreiben mit dem Fett optimal verteilt sind oder nicht. Ist die Konzentration der Bakterien zu groß, liegen die Bakterienagglomerate nicht mehr separat im Fett vor, sondern sie liegen so dicht nebeneinander, dass Wasser von außen nach innen in die Partikel eindringen kann. So kommt es zu einem Absterben der Bakterien auch im Inneren des Partikels. Die Auswahl der Fette spielt auch hier eine erhebliche Rolle. Die Hydroxylzahl der Fette sollte niedrig sein, da eine große Konzentration an Mono- und Diglyceriden das Eindringen des Wassers in

die Partikel beschleunigt. Zwar ist die Menge des aufgenommenen Wassers bei Anwendung von Witepsol<sup>®</sup> W 35 nur wenig höher als bei den anderen Fetten. Es kommt aber nicht auf die Menge des Wassers an, sondern wie weit dieses in die Partikel vordringen kann. Fettpartikel aus einem Fett mit einer niedrigen Hydroxylzahl und einer Keimbelastung von einem Prozent haben nach sechswöchiger Lagerung eine zehnfach höhere Restkeimzahl als die Fettpartikel mit einer 10 %igen Keimbelastung. Die erhöhte Ausgangskeimzahl dieser Partikel erweist sich hier also nicht als Vorteil.

#### **4.4 Stabilität von Fettpartikeln mit einer Keimbelastung von bis zu 1 %**

##### **4.4.1 Einleitung**

Im vorangegangenen Kapitel hat sich gezeigt, dass ein Bakterienzusatz von 10 % für die Einbettung in Fett zu groß ist, um die Bakterien vor Feuchtigkeit zu schützen. Außerdem war es aus technischen Gründen nicht möglich, die in Syloidsuspension sprühgetrockneten Bakterien sowie das homogenisierte Lyophilisat in einer Konzentration von 10 % in das Fett einzuarbeiten.

Bei der Einbettung von 1 % Bakterien in das Fett ist es nicht mehr möglich, die getrockneten Bakterien einfach in das Fett einzurühren, da es auf Grund der Agglomerationsneigung der Partikel nicht zu einer gleichmäßigen Verteilung im Fett kommt. Das Bakterienpulver wird deshalb bei der Einbettung in das Fett jeweils mit Miglyol<sup>®</sup> 812, dem Lipoid<sup>®</sup> S 20 als Emulgator zugesetzt wurde, angerieben. Der Zusatz des Emulgators hatte sich zwar bei der Einarbeitung von 10 % Bakterien als nicht vorteilhaft herausgestellt, die Menge an Keimpartikeln war jedoch in diesem Fall, im Vergleich zur Fettmenge, so gering, dass es nötig war einen Emulgator zuzusetzen, um die Benetzung der Partikel zu erhöhen und so die gleichmäßige Verteilung der Bakterienagglomerate im Fett zu gewährleisten.

*Tabelle 4.3: Rezeptur der Partikel*

trockenes Bakterienpulver	1 % (m/m)
Lipoid® S 20	1 % (m/m)
Miglyol®812	9 % (m/m)
Fett	ad 100 % (m/m)

#### **4.4.2 Vergleich von Fettpartikeln mit mikronisiertem und homogenisiertem Lyophilisat und in RSM und Syloidsuspension sprühgetrockneten Bakterien**

##### ***4.4.2.1 Durchführung***

Es wird jeweils ein Prozent Bakterienagglomerate in das Fett eingearbeitet. Das homogenisierte Lyophilisat liegt als Suspension mit einem Lyophilisatanteil von 2,5 % vor. Von der Suspension wurden 10 % in das Fett eingearbeitet, woraus bei diesem Ansatz eine Lyophilisatkonzentration von 0,25 % resultiert. Das Fett wurde dann nach dem Erstarren wie auch bei der Herstellung der Fettpartikel mit 10 % Keimbelastung vermahlen.

##### ***4.4.2.2 Ergebnisse***

Innerhalb von sechs Wochen nimmt die Keimzahl der Fettpartikel mit dem in RSM sprühgetrockneten Lyophilisat auf 8,2 % des Ausgangswertes ab (Abbildung 4.11). Im Vergleich dazu sinkt die Keimzahl der nicht eingebetteten sprühgetrockneten Partikel innerhalb von vier Wochen schon auf einen Wert von 0,001 % des Ausgangswertes und die Keimzahl der Fettpartikel mit 10 % Bakterien sinkt im gleichen Zeitraum auf 0,008 % (siehe 4.3). Mit Hilfe der Einbettung in Fett lassen sich die in RSM sprühgetrockneten Partikel stabilisieren und vor Feuchtigkeit schützen. Ein gewisses Maß an Keimzahlabnahme ist durch den Mahlprozess bedingt. Auf Grund des nicht steuerbaren Bruches des

Fettes während der Mahlung, liegen immer einige Bakterienagglomerate ungeschützt an der Oberfläche. Diese Bakterien sterben im Laufe der Lagerung zwangsläufig ab.

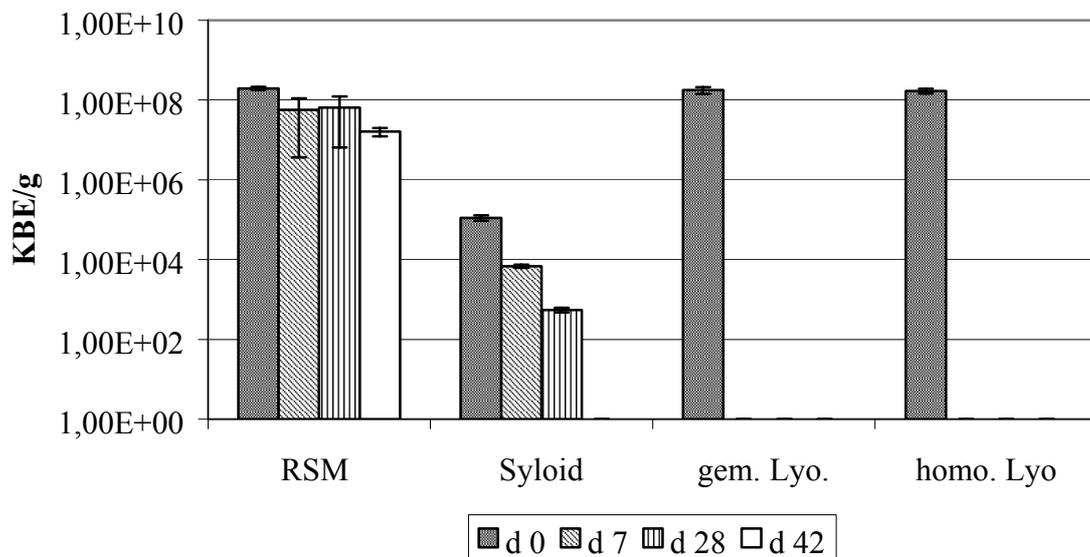
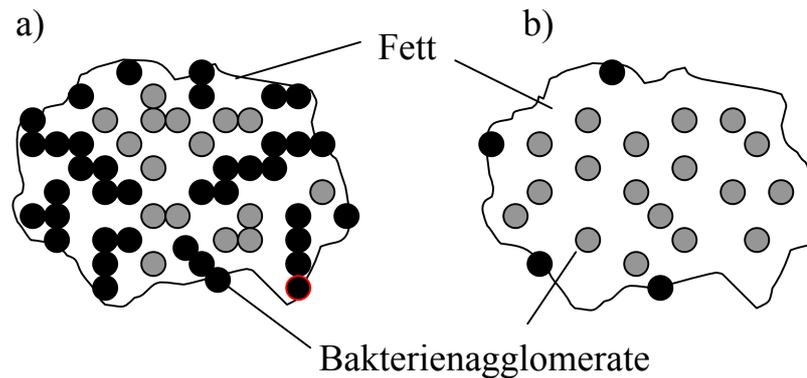


Abbildung 4.11 Keimzahl der Fettpartikel während der Lagerung bei 100 % RH (RSM: Fettpartikel mit in RSM sprühgetrockneten Bakterien, Syloid: Fettpartikel mit in Syloidsuspension sprühgetrockneten Bakterien, gem. Lyo: Fettpartikel mit gemahlenem Lyophilisat, homo. Lyo: Fettpartikel mit homogenisiertem Lyophilisat)

Je geringer die Konzentration der Bakterienagglomerate im Fett ist, desto weniger liegen sie an der Oberfläche. Dadurch, dass die Bakterienagglomerate bei einprozentiger Konzentration in dem Fettpartikel separiert voneinander vorliegen, kann kein Wasser in die Partikel eindringen und zu einem massiven Abnehmen der Keimzahl führen (Abbildung 4.12).



*Abbildung 4.12 Schematische Darstellung von a) Fettpartikel mit 10 % Keimbelastung, b) Fettpartikel mit 1 % Keimbelastung*

Bei den Fettpartikeln mit den in Syloidsuspension sprühgetrockneten Bakterien sinkt die Keimzahl innerhalb von sechs Wochen auf Null ab. Schon bei den nicht eingebetteten Bakterien zeigte sich bei trockener Einlagerung eine Keimzahlabnahme von 91,1 %. Der Mangel an Stabilisatoren macht sich auch bei der Einbettung in das Fett und der anschließenden Mahlung bemerkbar. Anders als bei allen anderen Bakterienagglomeraten nimmt die Keimzahl hier schon im Verlauf der Fettpartikelherstellung deutlich ab. Bei einer Ausgangskeimzahl von  $1,5 \times 10^9$  KBE/g sprühgetrockneten Partikeln müsste die Keimzahl der Fettpartikel bei 1 % Bakterienzusatz bei  $1,5 \times 10^7$  liegen. Die Ausgangskeimzahl der Fettpartikel liegt aber bei  $1,1 \times 10^5$  KBE/g. Das heißt, dass 99,2 % der Keime schon während des Herstellungsprozesses absterben. Die in Syloidsuspension sprühgetrockneten Bakterien eignen sich daher nicht für eine Einbettung in Fett. Ebenso wenig eignet sich das gemahlene und homogenisierte Lyophilisat. Wie bei der Einlagerung der Fettpartikel mit 10 % Keimbelastung sinkt auch hier die Keimzahl innerhalb von einer Woche auf Null ab. Die Schäden, die die Bakterien in dem Lyophilisat während einer mechanischen Zerkleinerung erleiden, sind offensichtlich größer als zuvor angenommen.

### **4.4.3 Vergleich verschiedener Fette**

#### ***4.4.3.1 Durchführung***

Da sich herausgestellt hat, dass die in RSM sprühgetrockneten Bakterien die einzigen sind, die sich für eine Einbettung in das Fett eignen, werden in den folgenden Versuchen nur noch diese verwendet. Wie auch bei der Einbettung von 10 % Bakterien wurden Fettpartikel aus Witepsol<sup>®</sup> E 85, Witepsol<sup>®</sup> H 37, Witepsol<sup>®</sup> H 15 und Witepsol<sup>®</sup> W 35 mit 1 % Bakterien hergestellt und miteinander verglichen. Der direkte Einfluss des Fettes auf die Überlebensrate der Bakterien müsste sich in diesem Versuch deutlicher zeigen als bei der Einbettung von 10 % Bakterien, da die Porenbildung durch die niedrigere Bakterienkonzentration hier sehr viel geringer ausfällt.

#### ***4.4.3.2 Ergebnisse***

Auch in diesem Versuch zeigt sich, dass die Hydroxylzahl des Fettes einen entscheidenden Einfluss auf die Überlebensrate der Keime hat (Abbildung 4.13). Während die Keimzahl der drei Fettpartikelansätze aus Fetten niedriger Hydroxylzahl über vier Wochen um weniger als eine log-Stufe abnimmt, nimmt die Keimzahl der Fettpartikel hoher Hydroxylzahl innerhalb dieser Zeit stärker ab. Auch nach sechs Wochen sieht man noch einen deutlichen Unterschied bei der Keimzahl der Partikel aus Fetten niedriger und hoher Hydroxylzahl. Die analytische Auswertung der Wasseraufnahme zeigt auch hier, dass die Partikel aus Witepsol<sup>®</sup> W 35 mehr Wasser aufnehmen als die anderen drei Fette (Abbildung 4.14). Der Effekt tritt in diesem Versuch noch deutlicher zu Tage als bei den Fettpartikeln mit 10 % Keimbelastung. Dadurch, dass an der Oberfläche der Partikel weniger freie Bakterienagglomerate sitzen, tritt der Einfluss der Hydroxylzahl noch mehr in den Vordergrund. Besonders deutlich wird dies im Vergleich mit der Wasseraufnahme der Fettpartikel ohne Keim (Abbildung 4.15).

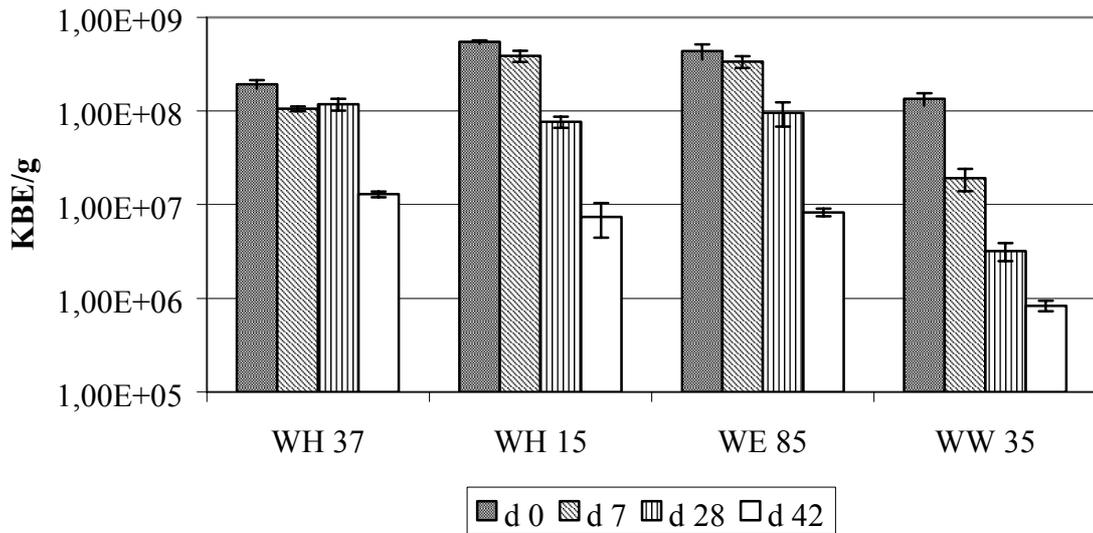


Abbildung 4.13 Einfluss der verschiedenen Fette auf das Überleben der Bakterien während der Lagerung bei 100 RH und RT

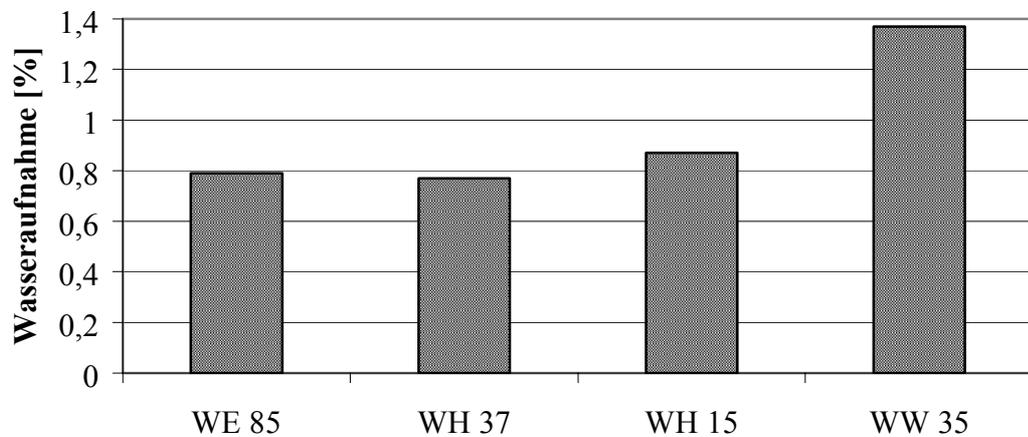


Abbildung 4.14 Wasseraufnahme der Fettpartikel mit 1 % Keimbelastung in der DVS

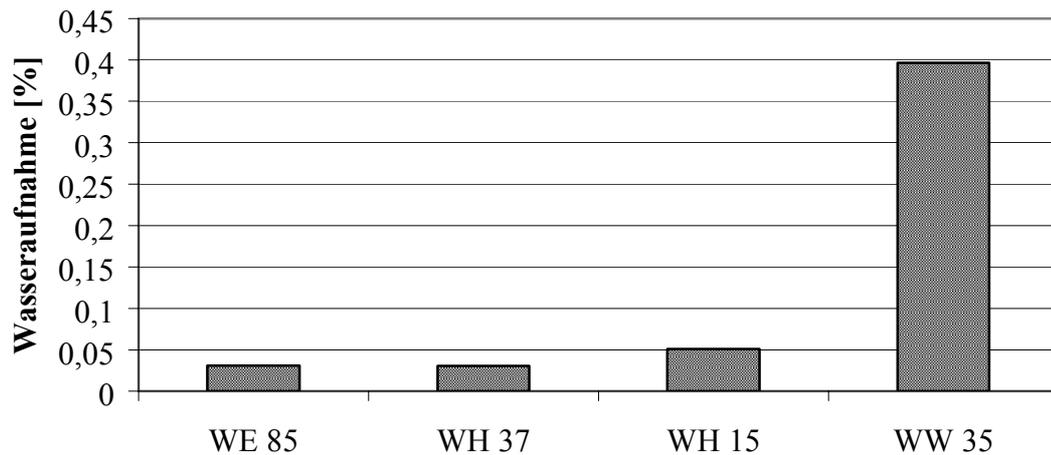


Abbildung 4.15 Wasseraufnahme der Fettpartikel ohne Keimbelastung in der DVS

Die Wasseraufnahme der Partikeln aus Witepsol® W 35 liegt hier um mehr als ein Zehnfaches über der Wasseraufnahme der Partikel aus den anderen drei Fetten, während der Unterschied bei den Fettpartikeln mit einer Keimbelastung von 1 % nur etwas weniger als das Doppelte beträgt.

#### 4.4.4 Vergleich verschiedener Herstellungsmethoden

##### 4.4.4.1 Durchführung

In diesem Versuch wurden jeweils drei Ansätze Fettpartikel mit einem Prozent Keimbelastung und zwei verschiedene Herstellungsmethoden verglichen. Die drei Ansätze wurden wie unter 4.4.2.1 hergestellt. Als Fett diente Witepsol® H 37. Bei den anderen drei Ansätzen wurde jeweils zuerst 10 % Bakterienpulver in Witepsol® E 85 eingearbeitet und vermahlen. Von den gemahlten Fettpartikeln wurden dann 10 % in aufgeschmolzenem Witepsol® H 15 suspensiert. Die Temperatur des Witepsol® H 15 wurde so niedrig angesetzt, dass die Fettpartikel aus Witepsol® E 85 nicht geschmolzen sind. Nach dem Erstarren der Fettsuspension

wurde auch diese vermahlen. Die entstandenen Fettpartikel kamen damit auf eine Keimkonzentration von einem Prozent.

#### 4.4.4.2 Ergebnisse

Zwischen den beiden Ansätzen verschiedener Herstellungsmethoden lassen sich bezüglich der Keimzahl keine Unterschiede erkennen. Die Werte der einzelnen Ansätze schwanken zwar teilweise erheblich, was an den Fehlerbalken zu erkennen ist.

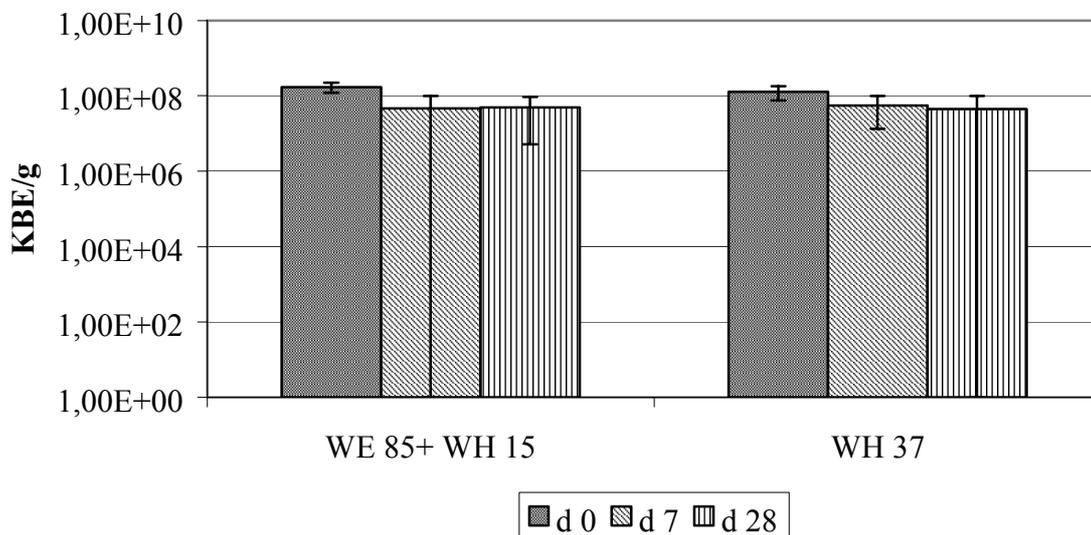


Abbildung 4.16 Vergleich der Keimzahl von Fettpartikeln zweier verschiedener Herstellungsarten während der Einlagerung bei 100 % RH und RT

Durch die logarithmischen Zusammenhänge bei Wachstums- und Absterbeprozessen von Bakterien kommt es bei stärkeren Schwankungen der Werte schnell dazu, dass die Standardabweichungen größer als die Mittelwerte sind. Im Mittel zeigen aber beide Herstellungsansätze eine gute Stabilität über einen Lagerungs-

zeitraum von vier Wochen. Die Einbettung in zwei Fette unterschiedlichen Schmelzpunktes bringt folglich keinen erkennbaren Vorteil für das Überleben der Bakterien. Für eine gute Überlebensrate der Bakterien ist also vor allem ein günstiges Verhältnis von Bakterienmenge zu Fettmenge entscheidend.

#### **4.4.5 Vergleich der Einlagerung bei 100 % RH und der Einlagerung in Puffer**

##### ***4.4.5.1 Durchführung***

Um zu überprüfen, ob die Lagerung bei 100 % RH mit einer Lagerung in einem flüssigen Lebensmittel zu vergleichen ist, wurden Fettpartikel wie im vorangehenden Kapitel beschrieben hergestellt. Die Partikel wurden, wie bei den anderen Versuchen, bei 100 % RH und Raumtemperatur eingelagert. Außerdem wurde ein Teil der Partikel in Phosphatpuffer pH 7,6 eingelagert. Es wurde Phosphatpuffer gewählt, um osmotische Einflüsse auf die Bakterien zu vermeiden. In dem Einlagerungsmedium sollten außerdem keine Bestandteile enthalten sein, die den Bakterien als Nahrungsmittel dienen können, da diese die Überlebensrate der Bakterien erhöhen würden, und man folglich den schützenden Effekt des Fettes nicht mehr richtig beurteilen kann.

##### ***4.4.5.2 Ergebnisse***

Die Überlebensrate der Bakterien unterscheidet sich nach sechs Wochen Einlagerung nicht (Abbildung 4.17). Die Keimzahl der bei 100 % RH eingelagerten Bakterien nimmt sogar etwas schneller ab als die der in Puffer eingelagerten Bakterien. Grund dafür ist, dass die Bakterien im Puffer genug Wasser in ihrer Umgebung haben, um wieder vollständige Stoffwechselaktivität zu erlangen, während die Bakterien bei 100 % RH nur so viel Wasser zur Verfügung haben, um aus der inaktiven Phase in die aktive Phase überzugehen.

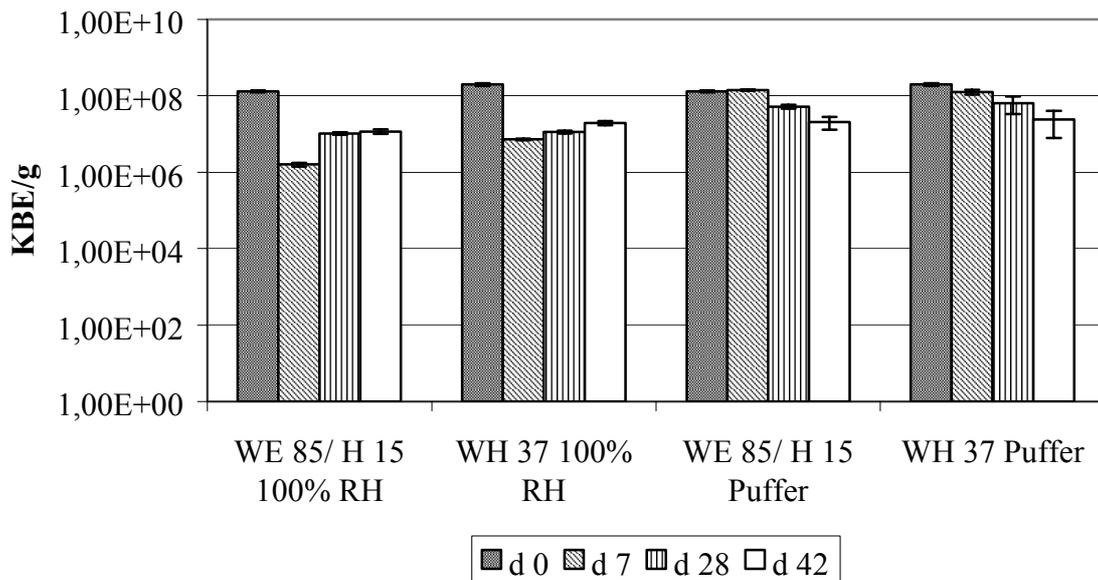


Abbildung 4.17 Keimzahl der Fettpartikel während der Lagerung bei 100 % RH und in Puffer bei Raumtemperatur

Durch die Magermilch, die den Bakterien bei der Sprühtrocknung als Stabilisator zugesetzt wurde, haben sie etwas Nahrung, die sie aber nur im Zusammenhang mit ausreichend Wasser nutzen können.

#### 4.4.6 Zusammenfassung

Für die Einbettung der Bakterien in Fett zur Stabilisierung eignen sich nur die in RSM sprühgetrockneten Bakterien. Bei den in Syloidsuspension sprühgetrockneten Bakterien liegt der Keimzahlverlust bei der Einbettung und anschließenden Kryomahlung schon bei 99,2 %. Die Keimzahl der Partikel sinkt dann auch während der Lagerung kontinuierlich. Die Fettpartikel, die das gemahlene oder homogenisierte Lyophilisat enthalten, weisen schon nach einer Woche einen totalen Keimzahlverlust auf.

Das Verhältnis von Fett zu Bakterien spielt die entscheidende Rolle bei der Erhaltung der Lebensfähigkeit der Bakterien. Fettpartikel mit einer Ausgangskonzentration von 1 % Bakterien zeigen nach vier Wochen Lagerung bei

feuchten Bedingungen eine weit höhere Keimzahl als Fettpartikel mit einer Ausgangskonzentration von 10 % Bakterien. Bei dem verwendeten Fett spielt die Hydroxylzahl eine wichtige Rolle. Sie sollte möglichst niedrig sein, um die Neigung des Fettes, Wasser an seiner Oberfläche zu adsorbieren, möglichst niedrig zu halten.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer neuen Methode zur Herstellung probiotikahaltiger Partikel, deren Keimzahl bei feuchter Umgebung deutlich stabiler ist als die Keimzahl von ungeschützten Bakterien. Dieses Ziel sollte dadurch erreicht werden, dass getrocknete Bakterien in ein Fett eingebettet werden. Dieses Fett wurde anschließend mit flüssigem Stickstoff versprödet und in einer Rotorschnellmühle unter Fremdkühlung mit flüssigem Stickstoff vermahlen. Der Einfluss der Herstellungsbedingungen auf die Überlebensrate der Keime wurde ebenso untersucht, wie der Einfluss der Eigenschaften der Fette. Als Ausgangskeim wurde ein lyophilisierter Lb. casei 163 der Firma Danisco (Niebüll) verwendet. Als Fette wurden vier Suppositoriengrundlagen der Firma Sasol GmbH (Witten) verwendet. Die vier Fette unterschieden sich in ihrem Schmelzpunkt und in ihrer Hydroxylzahl. Im Laufe der Arbeit hat sich herausgestellt, dass sich das Lyophilisat, so wie es industriell geliefert wird, nicht für die Partikelherstellung durch Kryomahlung eignet, da es im Vergleich zu den entstehenden Fettpartikeln eine zu große Agglomeratgröße aufweist. Es wurden daher verschiedene Versuche unternommen, kleinere Bakterienagglomerate zu erzeugen. Dafür wurde das Ausgangslyophilisat in einer Luftstrahlmühle vermahlen. Die Einflüsse des Zusatzes von Magnesiumstearat oder Aerosil<sup>®</sup> 972 als Hilfsstoff zur Hydrophobisierung der Partikeloberfläche wurden untersucht. Dabei hat sich herausgestellt, dass der Zusatz von Magnesiumstearat bei der Vermahlung des Lyophilisates einen günstigen Einfluss auf Partikelgröße und Keimzahl hat. Des Weiteren stellte sich heraus, dass die Keimzahl des Lyophilisates während der Mahlung nur gering abnahm, die Bakterien durch den Mahlprozess jedoch sehr starke subletale Schäden davongetragen haben, sodass ihre Keimzahl bei weiteren zusätzlichen Belastungen rapide abnahm. Das in Fett eingebettete

gemahlene Lyophilisat zeigte bei Lagerung unter feuchten Bedingungen keine Stabilität.

In einem weiteren Versuch wurde das Lyophilisat in einem Öl suspendiert und anschließend im Hochdruckhomogenisator homogenisiert. Dabei wurde der Einfluss des Druckes und der Zahl der Homogenisationszyklen untersucht. Es stellte sich heraus, dass der Druck einen geringeren Einfluss auf die Keimzahl hat als die Zahl der Zyklen. Ferner zeigte sich, dass, obwohl die Abnahme der Keimzahl während des Prozesses nur gering abnahm, auch hier die Bakterien durch die mechanische Belastung starke subletale Schäden davongetragen haben, die bei weiterer Belastung zu einem Absterben der Bakterien führten. Auch hier hat sich gezeigt, dass die Bakterien nach der Einbettung in Fettpartikel bei Lagerung in feuchter Umgebung keine Stabilität aufweisen. Ein weiterer Versuch zur Erzeugung kleiner Bakterienagglomerate war die Sprühtrocknung der Bakterien in Magermilch oder in einer Syloidsuspension. Es zeigte sich, dass die in Magermilch getrockneten Bakterien eine gute Stabilität und nur wenige subletale Schäden aufweisen. Die in der Syloidsuspension getrockneten Bakterien zeigten jedoch schon während des Sprühprozesses eine starke Abnahme der Keimzahl, und diese Abnahme setzte sich bei Einbettung in das Fett fort. Die Sprühtrocknung der Bakterien in Magermilch zur Erzeugung kleiner Bakterienagglomerate hat sich als die beste Methode herausgestellt.

Bei der Fettpartikelherstellung durch Kryomahlung hat sich herausgestellt, dass die wichtigsten Faktoren für die Stabilität der Bakterien das Verhältnis von Masse der Bakterien zur Masse des Fettes und die Teilchengröße der Bakterienagglomerate sind. Bei einer Keimbelastung von 10 % liegen die Bakterienagglomerate im Fett dicht zusammen und es können sich bei feuchter Lagerung Kanäle bilden, durch die das Wasser ins Innere der Fettpartikel vordringen kann. So kommt es bei einer Lagerung unter feuchten Bedingungen schnell zu einer starken Keimzahlabnahme. Bei einer Keimbelastung von einem Prozent kommt es zwar auch zu einer Keimzahlabnahme während der Lagerung, diese ist aber

nicht so groß wie bei einer Beladung mit 10 %. Unter gleichen Lagerungsbedingungen weisen die Fettpartikel mit einem Prozent Keimgehalt nach vier Wochen eine höhere Keimzahl auf als die Partikel mit 10% Keimbeladung, obwohl diese eine größere Ausgangskeimzahl aufweisen.

Als weiterer wichtiger Faktor für die Stabilität der Bakterien bei feuchter Lagerung hat sich die Hydroxylzahl des Fettes herausgestellt. Fette mit einer höheren Hydroxylzahl haben einen höheren Gehalt an Mono- und Diglyceriden. Diese besitzen Emulgatoreigenschaften und machen das Fett dadurch hydrophiler. Dadurch kann sich bei feuchter Lagerung mehr Wasser an die Oberfläche des Fettes binden, was einen negativen Effekt auf die Keimzahl der eingeschlossenen Bakterien hat.

## 6 ABSTRACT

The aim of this thesis was to develop a new method for the preparation of particles containing probiotic bacteria in order to stabilize the microbial count in humid environment in comparison to unprotected bacteria. This aim is to be reached by the encapsulation of the bacteria in fat which is solid at room temperature. The production of the particles was carried out by dispersing the dried bacteria in molten fat. After solidification the fat was embrittled with liquid nitrogen and ground in a rotor speed mill which was also cooled with liquid nitrogen. The study of the impact of different fat properties on the viability of the encapsulated bacteria was also an aim of this thesis. The probiotic bacteria used during the investigation were freeze-dried ground *Lactobacillus casei* 163 (Danisco, Niebüll). The fats used in this thesis were suppository bases of the Sasol GmbH (Witten). The four fats used in this investigation differed in their melting point and in their hydroxyl value.

During the investigation it became clear that the freeze-dried bacteria are not suitable for encapsulation by this method. That was due to the particle size of the freeze-dried bacteria compared to the size of the produced fat particles. The next steps consisted of different attempts to produce smaller particles of dried bacteria. The first step was the micronisation of the freeze-dried bacteria in an oval tube jet mill. In order to obtain hydrophobic particle surfaces Magnesiumstearat or Aerosil 972 was added. The addition of Magnesiumstearat turned out to have a good influence on the freeze-dried bacteria during the grinding process. The particles became smaller and the loss of viability of the bacteria decreased. During the grinding process the microbial count barely decreased but the bacteria sustained sublethal damages so that they did not show any stability in humid environment after being encapsulated in fat.

Another attempt to obtain small dried bacteria particles was to homogenise a suspension of freeze-dried bacteria and oil with high pressure. The influence of pressure and number of cycles on particle size and microbial count was investigated. The results showed that the influence of the pressure on the microbial count was bigger than the influence of the number of cycles. Like the ground bacteria the homogenised bacteria barely decreased in microbial count during the process but showed no stability in humid environment after encapsulation due to their sublethal damages caused by the homogenisation.

The third attempt to obtain small dry bacteria particles was the spray-drying of the probiotic bacteria in reconstituted skim milk or in a Syloid suspension. During the process the bacteria in the reconstituted skim milk showed good stability whereas the bacteria in the Syloid suspension clearly decreased in their viability. This decrease continued during the encapsulation in fat. The spray-dried bacteria stabilised by skim milk turned out to be most suitable for the encapsulation.

The results of the storage testing of the particles under humid conditions showed that there are two main factors which have an effect on the stability of the bacteria. The most important impact on the viability of the bacteria turned out to be the proportion of dried bacteria and fat. A 10 % amount of bacteria results in a great loss of viability during storage in humid environment. If the amount of bacteria particles is huge, the bacteria particles get in contact so that they form pores. Due to this water penetrates into the particle and causes a huge decrease in microbial count. Fat particles with a bacterial amount of 1 % showed much better stability under the same storage conditions.

Another factor interfering with the stability of the bacteria is a high hydroxyl value. The hydroxyl value is a standard for the amount of mono- and diglycerids in fat. These have surfactant attributes and enhance the binding of water on the particle surface.

## 7 ANHANG

## 7.1 Verwendete Substanzen

Substanz	Firma
Lactobacillus casei 163	Danisco, Niebül
Witepsol <sup>®</sup> E 85	Sasol GmbH, Witten
Witepsol <sup>®</sup> W 35	Sasol GmbH, Witten
Witepsol <sup>®</sup> H 37	Sasol GmbH, Witten
Witepsol <sup>®</sup> H 15	Sasol GmbH, Witten
MRS Agar	Heipha Dr. Müller GmbH, Heidelberg
MRS Boullion	Sigma-Alerich GmbH, Taufkirchen
Magermilchpulver	Sigma-Alerich GmbH, Taufkirchen
Syloid <sup>®</sup> 244	Grace GmbH & Co KG, Worms
Lipoid <sup>®</sup> S 20	Lipoid GmbH, Ludwigshafen
Imwitor <sup>®</sup> 780 k	Sasol GmbH, Witten
Miglyol <sup>®</sup> 812	Condea Chemie GmbH, Witten
Magnesiumstearat	Merck Eurolab GmbH, Hamburg
Aerosil <sup>®</sup> 972	Degussa AG, Frankfurt
Phosphorpentoxid	Merck Eurolab GmbH, Hamburg
Natriumchlorid	Merck Eurolab GmbH, Hamburg
Kaliumchlorid	Merck Eurolab GmbH, Hamburg
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat	Merck Eurolab GmbH, Hamburg
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck Eurolab GmbH, Hamburg
Natronlauge	Merck Eurolab GmbH, Hamburg
Salzsäure	Merck Eurolab GmbH, Hamburg

## 7.2 Zusammensetzung der Medien

MRS Agar:

Pepton	10,0 g/l
Fleischextrakt	8,0 g/l
Hefeextrakt	4,0 g/l
Glucos	20,0 g/l
Di-Kaliumhydrogenphosphat	2,0 g/l
Natriumacetat	5,0 g/l
Ammoniumcitrat	2,0 g/l
Magnesiumsulfat	0,2 g/l
Mangansulfat	50 mg/l
Tween 80	1 ml/l
Agar	14,0 g/l
pH - Wert	5,7 ± 0,2

Magermilchpulver:

Proteine	> 35 %
Lactose	50 % - 55 %
Fette	< 1,5 %
freie Milchsäure	< 2 %
Asche	< 10 %
Wasser (Karl- Fischer)	< 5 %
pH-Wert (1 % in Wasser)	6-7

Phosphatpuffer (PBS) pH 7,6

NaCl	8,0 g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	1,15 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g/l
KCl	0,2 g/l

## 7.3 Methoden und Geräte

### 7.3.1 Präperativ

#### 7.3.1.1 *Sprühtrocknung*

Die Srühtrocknung der Bakterien erfolgte im Büchi B290 Mini Spray-Dryer (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Schweiz) im Gleichstromverfahren.

##### *Sprühtrocknung von Lb. casei in Magermilch*

Zur Trocknung von Lb. casei in Magermilch wurde 1,00g Lb. casei 163 Lyophilisat in 99,0g zwanzigprozentiger Magermilch vier Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Magermilch wurde dabei mit Hilfe eines Magnetrührers gerührt. Die Magermilch wurde am Tag zuvor 30 Minuten auf 90°C erhitzt, um Fremdkeime abzutöten [Gardiner et al. 2000]) Nach vier Stunden wurde die Fermentation durch schnelle Abkühlung der Magermilch im Eisbad unterbrochen. Die Bakterien enthaltende Magermilch wurde mit 1N NaOH auf pH 6,8 eingestellt. Anschließend wurde sie Keimsuspension unter folgenden Bedingungen im Sprühtrockner mit Hilfe einer Zweistoffdüse versprüht:

*Tabelle 7.1 Bedingungen während der Sprühtrocknung*

Flow:	40 %
Aspirator:	100%
Pumpe :	35 %
Kühlung der Düse:	10°C
Einlasstemperatur:	120°C
Auslasstemperatur:	57°C- 61°C

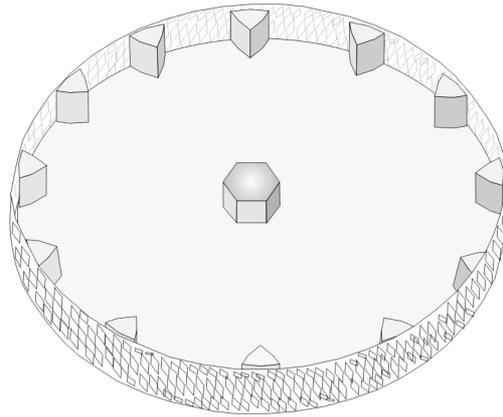
Nach der Sprühtrocknung wurde das erhaltene Pulver in einem Exikator über Phosphorpentoxid auf eine Wasseraktivität von ca. 0,1 getrocknet.

### *Sprühtrocknung von Lb. casei in einer Syloidsuspension*

Zur Sprühtrocknung von Lb. casei in einer Syloidsuspension wurde 1,00 g Lb. casei 163 Lyophilisat in 99,0 g autoklavierter MRS-Bouillion bei 37°C für vier Stunden im Brutschrank unter Rühren inkubiert. Nach vier Stunden wurde der Fermentationsprozess durch rasches Abkühlen der Bouillion im Eisbad gestoppt. Die Suspension wurde dann mit 3000 rpm 15 Minuten zentrifugiert. Die Zentrifuge (Biofuge 17RS, Heraeus Sepatech) wurde dabei auf 25°C temperiert. Der Überstand über den abgesetzten Bakterien wurde mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Anschließend wurden die Bakterienzellen zweimal in 50 ml PBS durch resuspendieren und zentrifugieren gewaschen. Zum Schluss wurden die Bakterienzellen in einer 10 %igen Syloidsuspension suspendiert. Zur Herstellung der Syloidsuspension wurden 20,0g Syloid 244 in 200ml Aqua bidest suspendiert und anschließend fünf Minuten mit dem Ultraturax (T25 basic, Janke & Kunkel GmbH, Staufen) homogenisiert. Die Bakterien enthaltende Suspension wurde unter den gleichen Bedingungen versprüht wie die Bakterien enthaltende Magermilch.

#### **7.3.1.2 Kryomahlung**

Die Herstellung der Fettpartikel erfolgte in der Rotorschnellmühle Pulverisette 14 (Fritsch GmbH, Idar Oberstein). Die Zerkleinerungswirkung der Mühle beruht auf den extrem hohen Drehzahlen des aus Edelstahl bestehenden Rotors. Der Schlagrotor der Mühle hat scharfkantige Schlagzähne. Im Zusammenspiel mit dem um den Schlagrotor befindlichen Siebring findet die Zerkleinerung nicht nur durch Schlag und Prall, sondern auch durch Schnitt und Scherung, ähnlich der schnell laufenden Schneidmühlen, statt (Abbildung 7.1). Es wurden ein Schlagrotor mit 12 Rippen und ein Siebring mit Trapezlochung verwendet.



*Abbildung 7.1 Schematische Darstellung von Schlagring und Siebring der Rotorschnellmühle*

Der Lochdurchmesser lag bei 0,5 mm und der Siebring wurde mit dem Pfeil nach unten eingesetzt. Laut Hersteller führt diese Ausrichtung zu einem geringeren Feinanteil.

Zur Herstellung der Partikel wurde das Mahlgut in einem Metallbecher versprödet, indem es mit flüssigem Stickstoff übergossen wurde, sodass es ganz bedeckt war. Die Mühle wurde vor jedem Mahlgang mit flüssigem Stickstoff vorgekühlt, indem der Stickstoff in die geschlossene Mühle eingefüllt wurde.

Wenn der flüssige Stickstoff vollständig vom Mahlgut abgedampft war, wurde dieses mit einem Pistill grob vorzerkleinert. Es wurden pro Mahlgang ca. 10 g Probe vermahlen. Der Hersteller gibt für Mahlung unter Fremdkühlung eine maximale Beladung der Mühle von 20 g vor. Durch die Kühlung schlägt sich jedoch Kondenswasser auf dem Siebring nieder, der dadurch verstopft. Eine Mahlung von mehr als 10 g war daher mit einem größeren Verlust während der Mahlung verbunden. Die Mahlung der Proben erfolgte bei 8000 rpm.

### ***7.3.1.3 Herstellung der Pulvermischungen für die Mikronisierung***

Die Mikronisierung des Lyophilisates erfolgte teilweise unter Zusatz von den hydrophoben Hilfsstoffen Aerosil<sup>®</sup> 972 und Magnesiumstearat. Diese wurden vor der Mikronisierung unter das Lyophilisat gemischt. Dazu wurden Lyophilisat und Hilfsstoff in Schichten in ein Mischgefäß eingewogen. Als Mischgefäß diente je nach Probenmenge eine 30ml bzw. eine 50ml Kruke, die dann mit Schaumstoff in einem größeren Mischgefäß fixiert wurde. Das Mischen erfolgte in einem Turbula-Mischer (T10B, W. A. Bachhofen AG, Basel, Schweiz). Es wurde 15 Minuten gemischt, dann wurde die Mischung gesiebt (Maschenweite: 355 µm) und noch mal 15 Minuten gemischt. Bevor das Pulver in der Luftstrahlmühle vermahlen wurde, wurde erneut gesiebt.

### ***7.3.1.4 Mikronisierung des Lyophilisates***

Die Mikronisierung des Lb. casei Lyophilisates erfolgte in einer Ovalrohrstrahlmühle (Jet-O-Mizer 00, Fluid Energy Aljet, Plumsteadville, USA). Als Trägergas für die Mahlung wurde Stickstoff verwendet. Die Ovalrohrstrahlmühle hat drei Düsen: zwei Mahldüsen am Boden und eine Einlassdüse die sich an der Seite befindet. Die beiden Mahldüsen sind so ausgerichtet, dass es nur zu einem minimalen Wandkontakt des Mahlgutes kommt und der Partikelstrom in einer kontinuierlichen Kreisbahn gehalten wird. In dem unteren Teil der Mühle, in dem sich die beiden Mahldüsen befinden, findet der größte Teil der Partikelzerkleinerung statt. Durch die Einlassdüse wird ein Vakuum erzeugt, dass das Mahlgut in die Mahlkammer saugt. Um dieses Vakuum zu erzeugen muss der Druck auf der Einlassdüse immer größer gewählt werden als der Druck in der Kammer.

Die Mahlung des Lyophilisates erfolgte mit verschiedenen Drücken an den beiden Mahldüsen und bei verschiedener Zyklenzahl. Drücke und Zahl der Zyklen sind im jeweiligen Kapitel angegeben.

Der Auftrag des Mahlgutes erfolgte mit Hilfe einer Schüttelrinne.

### **7.3.1.5 Hochdruckhomogenisation**

Zur Herstellung der Lyophilisatsuspension wurde die flüssige Phase mit dem Emulgator in einem Becherglas vorgelegt. Bei der flüssigen Phase handelte es sich um Miglyol<sup>®</sup> 812. Nach Zugabe des Lyophilisates wurde die Suspension so lange auf einem Magnetrührer gerührt, bis das Lyophilisatpulver in dem Öl gut verteilt war. Diese Suspension wurde dann in den Hochdruck-Homogenisator (APV Gaullin, Lübeck) überführt und dort homogenisiert. Die verwendeten Drücke und die Zahl der Zyklen sind in den jeweiligen Kapiteln angegeben.

## **7.3.2 Analytik**

### **7.3.2.1 Bestimmung der Wasseraktivität**

Die Wasseraktivität wurde mit dem Aquaspector (Nagy Messsystemr GmbH, Gäufelden) bestimmt. Das Gerät besteht aus einem digitalen Messgerät mit angeschlossener Messkammer. Das zu vermessene Gut wurde für die Messung in einem speziellen Probenbehältnis in die Messkammer eingebracht. Im oberen Teil der Messkammer befinden sich ein kapazitiver Feuchte-Sensor und ein Temperatur-Sensor. Der Feuchte-Sensor besteht aus einer hygroskopischen Substanz, die zwischen zwei Elektroden angebracht ist. Je nach Feuchte der sie umgebenden Luft ändert sie ihren Widerstand, indem sie Wasser aufnimmt oder abgibt. Die Änderung des Widerstandes wird von dem Gerät in die Wasseraktivität umgerechnet. Durch einen kleinen Ventilator wird die Luft über der Probe in den Raum des Feuchte-Sensors geblasen und von dort wieder über die Probe.

Die Wasseraktivität wird mit einer Zahl zwischen 0 und 1,00 angegeben und ist abhängig von der Temperatur. Die Abhängigkeit von der Temperatur ist aber vergleichsweise gering, da der Partialdruck  $p$  des Wassers im Gut und der Dampfdruck  $p_0$  des reinen Wassers etwa die gleiche Temperaturabhängigkeit

besitzen. Für kleine Temperaturunterschiede ändert sich daher das Verhältnis  $p/p_0$  nur unwesentlich [Loncin und Weisser, 1977].

### **7.3.2.2 Keimzahlbestimmung**

Von allen Proben wird jeweils die Lebendkeimzahl bestimmt. Sie gibt die Zahl der lebensfähigen Keime im Produkt an und ist abzugrenzen von der Gesamtkeimzahl. Die Gesamtkeimzahl ist die Summe aller lebenden und toten Keime im Produkt [Schlegel, 1992].

Zur Untersuchung der Lebendkeimzahl wurde 1,00 % der zu untersuchenden Probe in 99,0 % PBS Puffer eingewogen. Handelte es sich bei der Probe um Fettpartikel, wurde der Puffer vorher auf 45°C erwärmt. Die Keime wurden dann mind. 60 sec. aus dem geschmolzenen Fett ausgeschüttelt. Nachdem sich das wieder erstarrte Fett an der Oberfläche abgesetzt hatte, wurde aus dieser Keimsuspension eine Verdünnungsreihe hergestellt.

Handelte es sich bei der Probe um Lyophilisat oder sprühgetrocknetes Produkt, wurde kalter Puffer verwendet und die Suspension wurde so lange geschüttelt, bis sich alle Agglomerate aufgelöst hatten. Aus dieser Keimsuspension wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt.

Die Verdünnungsreihen wurden mit PBS Puffer hergestellt. Es wurde jeweils 1:100 verdünnt. Das Ausplattieren der Keimsuspension erfolgte nach dem Kochschen Plattenguss Verfahren [Pharm. Eur., 2002] auf MRS-Agar [de Man et al, 1960]. Anders als im Arzneibuch beschrieben wurden die Keime 4-5 Tage bei 37°C im CO<sub>2</sub> Brutschrank (LEEC GA26N, LEEC Limeted, Nottingham, England) bebrütet. Der CO<sub>2</sub> Partialdruck lag dabei bei 5 %.

Jede Keimzahlbestimmung wurde doppelt durchgeführt.

### **7.3.2.3 Laserdiffraktometrie**

Für die Partikelgrößenbestimmung der sprühgetrockneten Keime, des Lyophilisates, des mikronisierten Lyophilisats und des homogenisierten Lyophilisates

wurde ein HELOS Laserdiffraktometer (Helium Neon Laseroptischer System, Sympathec, Clausthal-Zellerfeld) verwendet. Dem Messprinzip liegt die von Fraunhofer beschriebene Lichtbeugung zu Grunde. In einem aufgeweiteten Laserstrahl (hier: 632,8 nm) erzeugen Partikel auf Grund von Interferenzerscheinungen ein Beugungsbild, dessen Lichtintensität von einem Multielement-Ringdetektor gemessen wird. Der Detektor besteht aus 32 konzentrisch angeordneten Detektorringen. Da unterschiedlich große Partikel das Licht unterschiedlich stark beugen, kann ein dem System angeschlossener Computer aus dem Beugungsbild die Partikelgrößenverteilung (Volumenverteilung) errechnen. Eine Fourier Transformationslinse bewirkt, dass das gebeugte Licht unabhängig von der Position der Partikel immer auf den selben Detektorring auftrifft. Daher kann die Bewegung der Partikel vernachlässigt werden.

Es wurden zwei verschiedene Messeinrichtungen verwendet. Zur Vermessung des gemahlten Lyophilisates und der sprühgetrockneten Bakterien wurde das HELOS-RODOS Dispergiersystem benutzt. Das Pulver wurde dazu auf eine Dispergierrinne aufgetragen und mit Hilfe von Pressluft (3bar) in der Brennebene einer nachgeschalteten Linse dispergiert. Hinter dem Messbereich befindet sich ein Staubsauger, der die dispergierte Probe durch den Messbereich saugt.

Zur Vermessung des homogenisierten Lyophilisates wurde die Keimsuspension mit Miglyol 812 bis zu einer optischen Konzentration von 5% - 15% verdünnt und dann in einer Quarzküvette vermessen. Die Brennweite der Linse wurde je nach Teilchengröße der Partikel abgestimmt.

#### ***7.3.2.4 Siebanalyse***

Die Partikelgröße der Fettpartikel wurde mit Hilfe der Siebanalyse bestimmt. Auf Grund der Größe der Partikel und der breiten Partikelgrößenverteilung war es nicht möglich die Partikelgröße per Laserdiffraktometrie zu bestimmen, obwohl diese Methode genauere Ergebnisse liefert.

100,0 g der zu vermessenden Probe wurde auf einen Siebturm mit tarierten Sieben folgender Maschenweiten aufgebracht:

90  $\mu\text{m}$ , 160  $\mu\text{m}$ , 250  $\mu\text{m}$ , 315  $\mu\text{m}$ , 400  $\mu\text{m}$ , 500  $\mu\text{m}$ , 630  $\mu\text{m}$ , 710  $\mu\text{m}$ .

Der Siebturm wurde dann bei 35 Hz 15 min auf der Siebmaschine (Vibro, Retsch AG, Haan) geschüttelt. Die einzelnen Siebe wurden vor und nach der Siebung ausgewogen und so der Anteil der jeweiligen Siebfraktionen ermittelt.

### ***7.3.2.5 Dynamische Wasserdampfsorption (DVS)***

Die Eigenschaft der Partikel Wasser aufzunehmen wurde gravimetrisch mit Hilfe der Dynamischen Wasserdampfsorption (DVS1, Surface Measurement Systems, London, UK) bestimmt. 120 mg bis 140 mg wurden dazu in ein Waageschälchen eingewogen, welche sich, ebenso wie ein Referenzschälchen, in einem Stickstoffstrom (Stickstoff 5,0, Fluss: 200 ml/min) mit definierter Feuchte befindet. Beide Schälchen befinden sich in einem auf 25°C +/- 0,1°C temperierten Inkubator (Abbildung 7.2). Die Probe und die Referenz werden zunächst bei 0% relativer Feuchte bis zur Gleichgewichtsfeuchte (0,0005 % Masseänderung/min) getrocknet. Die Feuchte des Trägergases wird mit Hilfe des Masseflusskontrollers eingestellt. Sie wurde dann auf 90% RH heraufgesetzt und die Probe wird so lange umspült, bis sich eine Gleichgewichtsfeuchte von 0,0005 % Masseänderung/min eingestellt hat, maximal jedoch 10 Stunden lang. Dann wird die Probe wieder bei 0% RH bis zu einer Gleichgewichtsfeuchte von 0,0005 % Masseänderung/min getrocknet. Mit Hilfe einer Cahn D-200-Mikrowaage, an der die beiden Waageschälchen hängen, wird der Massenzuwachs der Probe und damit die Wasseraufnahme bestimmt.

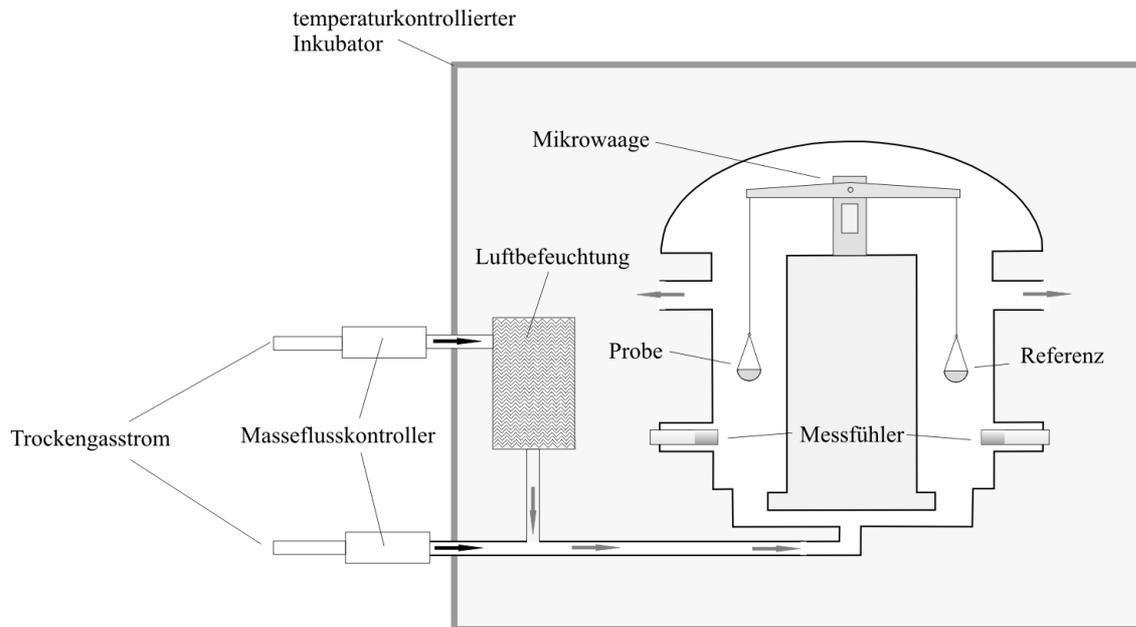


Abbildung 7.2 Schematische Abbildung der DVS

### 7.3.2.6 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Im Gegensatz zu anderen mikroskopischen Verfahren stellt die Rasterelektronenmikroskopie kein optisches Verfahren dar [Skoog und Leary, 1992]. Ein Elektronenstrahl tastet im Vakuum nach einem Raster die Oberfläche der Probe ab und erstellt von ihr eine Karte, die dann in ein Bild umgewandelt wird.

Zur Erstellung der REM-Bilder wurden die Proben mit doppelseitig klebender, leitfähiger Folie (Leit-Tabs, 12mm Durchmesser, W. Plannet GmbH, Wetzlar) auf den Probenhaltern fixiert und anschließend im Sputter Coater (Bal-Tec AG, Lichtenstein) unter Argonatmosphäre (50 Pa) bei 50mA für 90 Sekunden mit Gold bedampft.

Zur Aufnahme der Bilder wurde ein Philips XL 20 Rasterelektronenmikroskop (Philips, Eindhoven, Niederlande) und ein XL 30 (FEI-Philips, Eindhoven, Niederlande) verwendet, wobei die Höhe der angelegten Spannung der thermischen Stabilität der Proben angepasst wurde.

**7.3.3 Weitere Geräte**

Gerät	Typ	Hersteller
Lichtmikroskop Magnetrührer	Axioskop 40 IKAMAG RET basic	Carl Zeiss Jena GmbH IKA- Werke, Janke & Kunkel GmbH, Stauffen
pH- Meter Trockenschrank Waagen	pH 540 GLb B6200 Satorius A2005 Satorius BA2105 Satoriu BP 31005 Satorius CP22025	WTW GmbH Wielheim Heraeus, Hanau Satorius AG, Göttingen
Wasserbad		Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach

## 7.4 Liste der verwendeten Abkürzungen und Symbole

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µm	Mikrogramm
bzw.	beziehungsweise
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
DVS	Dynamic Water Sorption
g	Gramm
HCL	Salzsäure
KBE	Koloniebildende Einheiten
Lb.	Lactobacillus
log	Logarythmus zur Basis 10
mA	Milliamper
max.	maximal
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mod.	modifiziert
MRS	de Man Rogosa Sharpe
N	Normal
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
OHZ	Hydroxylzahl
p	Wasserdampfdruck
p <sub>0</sub>	Sättigungsdampfdruck

## Liste der verwendeten Abkürzungen und Symbole

---

Pa	Pascal
PBS	Phosphate Buffer Solution
Pharm. Eur.	Pharmacopoea Europaea
RH	relative humidity
rpm	rounds per minute
RSM	reconstituted skim milk
RT	Raumtemperatur
sec.	Sekunden

## 8 LITERATURLISTE

**Baba, H., H. Kubota, S. Horishita, and A. Matsunobu.** 1996. Lactic bacteria-containing composition and use in confectionery. EP Patent 704164.

**Batt, C. A.** 1999. Lactobacillus. *In* C. A. Batt and P. Patel (ed.), Encyclopedia of food microbiology. Academic Press.

**Bauer, K. H., K.-H. Frömming, and C. Führer.** 1999. Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie.

**Brennan, M., B. Wanismail, M. C. Johnson, and B. Ray.** 1986. Cellular damage in dried Lactobacillus acidophilus. Journal of Food Protection 49:47-53.

**Bug, J., I. Manneck, and M. Schmid.** 2001. Oral formulations of probiotic microorganisms with coating. WO Patent 2001012164.

**Bundesministerium für Ernährung und LändlichenRaum Badem Württemberg** 1998, überarbeitet 2004, Broschüre: Rund um die Milch. [Online.]

**Bykov, V. A., M. V. Dalin, D. V. Somov, and L. A. Pavlova.** 2001. Method of preparing microcapsulated forms of Lactobacillus. RU Patent 2171672.

**Castro, H. P., P. M. Teixeira, and R. Kirby.** 1996. Changes in the Cell Membrane of Lactobacillus bulgaricus during storage following freeze-drying. Biotechnology Letters 18:99-104.

**Collins, F. M., and B. P. Carter.** 1978. Growth of Salmonellae in orally infected germ free mice. Infection and Immunity 21:41-47.

**Corcoran, B. M., R. P. Ross, G. F. Fitzgerald, and C. Stanton.** 2004. Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. Journal of Applied Microbiology 96:1024-1039.

**Crowe, J. H., L. M. Crowe, J. F. Carpenter, A. S. Rudolph, C. A. Winstrom, B. J. Spargo, and T. J. Anchoadoguy.** 1988. Interactions of sugars with membranes. Biochem. Biophys. Acta 947:367-384.

**Crowe, J. H., L. M. Crowe, A. E. Oliver, N. Tsvetkova, W. Wolkers, and F. Tablin.** 2001. The trehalose myth revisited: introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state. *Cryobiology* 43:89-105.

**Crowe, L. M., J. H. Crowe, A. Rudolph, C. Womersly, and L. Appel.** 1985. Preservation of freeze-dried liposomes by trehalose. *Arch. Biochem. Biophys.* 242:240-247.

**Crowe, L. M., C. Womersley, J. H. Crowe, D. Reid, L. Appel, and A. Rudolph.** 1986. Prevention of fusion and leakage in freeze-dried liposomes by carbohydrates. *Biochem. Biophys. Acta* 861:131-140.

**Dave, R. I., and N. P. Shah.** 1998. Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt. *Journal of dairy science* 81:2804-16.

**De Man, J. C., M. Rogosa, and M. E. Sharpe.** 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* 23:130-135.

**De Valdez, G. F., G. S. De Giorgi, A. P. De Ruiz Holgado, and G. Oliver.** 1985. Effect of Drying Medium on Residual Moisture Content and Viability of Freeze-Dried Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 49:413-415.

**de Vrese, M., and J. Schrezenmeir.** 2000. *Probiotika, Praxishandbuch Funktional Food.*

**Desmond, C., C. Stanton, G. F. Fitzgerald, K. Collins, and R. Paul Ross.** 2002. Environmental adaptation of probiotic lactobacilli towards improvement of performance during spray drying. *International Dairy Journal* 12:183-190.

**Durand, H., and J. Panes.** 2001. Preservation of dehydrated microorganisms in microcapsules of a hydrophobic material and methods of encapsulation. WO Patent 2001068808.

**Engel, D., and E. Brocker.** 2001. Capsule for the release of bacteria, containing lyophilized bacteria and a method for the production thereof. EP Patent 1072258.

**Englisch, W. (ed.).** 1993. *In Memoriam Albert Döderlein.* Springer-Verlag.

**Europäisches Arzneibuch.** 2002. Deutscher Apothekerverlag, Stuttgart & Govi Verlag, Eschborn.

**Fiedler, H. P.** 2002. Lexikon der Hilfsstoffe für Pharmazie. ECV.

**Fluid Energy.** 2004. Principles of Jet Milling Size Reduction. Firmeninformation.

**Fuller, R.** 1989. Probiotics in man and animals. Journal of applied bacteriology 365-78

**Fuller, R.** 1992. Probiotics: The scientific basis. Chapman & Hall.

**Gardiner, G. E., P. Bouchier, E. O'Sullivan, J. Kelly, J. Kevin Collins, G. Fitzgerald, R. Paul Ross, and C. Stanton.** 2002. A spray-dried culture for probiotic Cheddar cheese manufacture. International Dairy Journal 12:749-756.

**Gardiner, G. E., E. O'Sullivan, J. Kelly, M. A. E. Auty, G. F. Fitzgerald, J. K. Collins, R. P. Ross, and C. Stanton.** 2000. Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying. Applied and Environmental Microbiology 66:2605-2612.

**Godward, G., and K. Kailasapathy.** 2003. Viability and survival of free, encapsulated and co-encapsulated probiotic bacteria in ice cream. Milchwissenschaft 58:161-164.

**Groboillot, A., D. K. Boadi, D. Poncelet, and R. J. Neufeld.** 1994. Immobilization of cells for application in the food industry. Critical reviews in biotechnology 14:75-107

**Hunnius Pharmazeutisches Wörterbuch.** 1998. Walter de Gruyter.

**Katsuhiro, O.** 1979. Powdery composition comprising viable Bifidobacteria cells and Lactulose. US Patent 4147773.

**Kim, S. S., and S. R. Bhowmik.** 1990. Survival of Lactic Acid bacteria during Spray Drying of Plain Jogurt. Journal of Food Science 55:1008-1010.

**Kleinig, A. R., and A. P. J. Middelberg.** 1998. On the mechanism of microbial cell disruption in high-pressure homogenization. *Chemical Engineering Science* 53:891-898.

**Kneifel, W., T. Mattila-Sandholm, and A. v. Wright.** 1999. Probiotic Bakteria. In C. A. Batt and P. Patel (ed.), *Encyclopedia of food microbiology*. Academic Press.

**Kneifel, W., J. Raffalt, and H. Viernstein.** 1997. Probiotically Acting Formulation. WO Patent 9716077.

**Koo, S.-M., Y.-H. Cho, C.-S. Huh, Y.-J. Baek, and J. Park.** 2001. Improvement of the stability of *Lactobacillus casei* YIT 9018 by microencapsulation using alginate and chitosan. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 11:376-383.

**Lauro, A.** 1995. Cream based on anhydrous fat containing viable *Lactobacillus*. EP Patent 0666031.

**Lee, Y.-K., K. Nomoto, S. Salminen, and S. L. Gorbach.** 1999. *Handbook of Probiotics*. John Wiley & Sons, Inc.

**Leslie, S. B., E. Israeli, B. Lighthart, J. H. Crowe, and L. M. Crowe.** 1995. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Applied and Environmental Microbiology* 61:3592-7.

**Leslie, S. B., S. A. Teter, L. M. Crowe, and J. H. Crowe.** 1994. Trehalose lowers membrane phase transitions in dry yeast cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1192:7-13.

**Lewenstein, A.** 1986. Liquid preparation containing living microorganisms, process for preparing it. EP Patent 0180743.

**Lilly, D. M., and R. H. Stillwell.** 1965. Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms. *Science* 147:747-8

**Lindenstruth, K.** 2003. Entwicklung multibeler Emulsionen als Träger von Peptidarzneistoffen. Christian Albrecht Universität, Kiel.

**Loncin, M., and H. Weisser.** 1977. Water activity and its importance in the food industry. *Chemie Ingenieur Technik* 49:312-19.

**Martin, A. N., J. Swarbrick, and A. Cammarata.** 1975. *Physikalische Pharmazie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft MBH, Stuttgart.

**Müller, B. W.** 1986. *Suppositorien*. WVG mbH Stuttgart.

**Nighswonger, B. D., M. M. Brashears, and S. E. Gilliland.** 1996. Viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in fermented milk products during refrigerated storage. *Journal of Dairy Science* 79:212-19.

**Oliver, A. E., L. M. Crowe, and J. H. Crowe.** 1998. Methods for dehydration-tolerance: depression of the phase transition temperature in dry membranes and carbohydrate vitrification. *Seed Science Research* 8:211-221.

**Pacifico, C. J., W.-H. Wu, and M. Fraley.** 2001. Sensitive substance encapsulation. US Patent 6251478.

**Parker, R. B.** 1974. Probiotics, the other half of the antibiotics story. *Animal Nutrition and Health* 29:4-8.

**Patterson, M.** 2000. High Pressure Treatment of Foods. *In* C. A. Batt and P. Patel (ed.), *Encyclopedia of food Microbiology*. Academic Press.

**Picot, A., and C. Lacroix.** 2003. Effects of micronisation on viability and thermotolerance of probiotic freeze-dried cultures. *International Dairy Journal* 13:455-462.

**Porbucan, R. s., and S. H. Gehrman.** 1985. Stabilized liquid bacterial suspension for oral administration to animals. US Patent 4518696.

**Pschyrembel Klinisches Wörterbuch.** 2002. Walter de Gruyter.

**Raffalt, J.** 1999. Technologische Lösungsvorschläge zur Herstellung von Nahrungs- und Genussmitteln sowie pharmazeutischen Formulierungen mit gesundheitsfördernden lyophilisierten Milchsäurebakterien. Universität für Bodenkultur, Wien.

**Rasenack, N.** 2003. Optimierung physikochemischer Arzneistoffeigenschaften durch Verfahren zur kontrollierten Kristallisation. Christian Albrechts Universität, Kiel.

**Rote Liste** 2004. Service GmbH, Aulendorf.

**Runeman, B., U. Forsgren-Brusk, and H. E. Gran.** 2003. Hygiene tissue impregnated with a composition comprising a lactic acid-producing bacteria suspended in a lipid. WO Patent 2003053397.

**Rutherford, W. M., J. E. Allen, H. W. Schlameus, D. J. Mangold, and W. W. Harlowe, Jr.** 1992. Fatty acid-microencapsulated bacteria and their manufacture by rotary disc encapsulation. WO Patent 9212234.

**Sasol, G. W.** 2004. Fatty bases for suppositories.

**Schlegel, H. G.** 1992. Allgemeine Mikrobiologie. Thieme.

**Shah, N. P., and R. R. Ravula.** 2000. Influence of water activity on fermentation, organic acids production and viability of yogurt and probiotic bacteria. Australian Journal of Dairy Technology 55:127-131.

**Shah, N. P., and R. R. Ravula.** 2000. Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented dairy desserts. The Australian Journal of Dairy Technology 55:139-144.

**Sheu, T. Y., R. T. Marshall, and H. Heymann.** 1993. Improving survival of culture bacteria in frozen desserts by microentrapment. Journal of dairy science 76:1902-7

**Simmons, D. L., P. Moslemy, G. O. Paquette, D. Guerin, and M.-h. Joly.** 2004. Stable probiotic microsphere compositions. WO Patent 2004022031.

**Siuta-Cruce, P., and J. Goulet.** 2001. Improving probiotic survival rates. Microencapsulation preserves the potency of probiotic microorganisms in food systems. Food Technology (Chicago, IL, United States) 55:36, 38-40, 42.

**Skoog, A., and J. Leary.** 1992. Instrumentelle Analytik. Springer.

**Sokhey, A., and K. P. Boebel.** 2003. System and method for on-line mixing and application of surface coating compositions for food products. WO Patent 2003009710.

**Sozzi, T., A. Schrenk, and M. Buhler.** 1982. Microcapsule containing a micro-organism and a process for its production. US Patent 4332790.

**Tannock, G. W.** 1995. Normal Microflora. Chapman and Hall.

**Teixeira, P., H. Castro, and R. Kirby.** 1994. Spray drying as a method for preparing concentrated cultures of *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Applied Bacteriology* 78:456-462.

**Teixeira, P., H. Castro, C. Mohacsi-Farkas, and R. Kirby.** 1997. Identification of sites of injury in *Lactobacillus bulgaricus* during heat stress. *Journal of Applied Microbiology* 83:219-226.

**Teixeira, P. C., M. H. Castro, F. X. Malcata, and R. M. Kirby.** 1995. Survival of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* following spray-drying. *J. Dairy Sci.* 78:1025-1031.

**To, B. C. S., and M. R. Etzel.** 1997. Spray drying, freeze drying, or freezing of three different lactic acid bacteria species. *Journal of Food Science* 62:576-578.

**Viernstein, H.** 2000. Formulations having probiotically active microorganisms. WO Patent 2000007571.

**Viernstein, H., D. Polheim, and S. Laulund.** 1997. Probiotically Acting Formulation. WO Patent 9716198.

**Wigley, R. C.** 1999. Starter Cultures. *In* C. A. Batt and P. Patel (ed.), *Encyclopedia of Food Microbiology*. Academic Press.

**Yakult.** 2004. Firmeninformation. Internet.

## **Danksagung**

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Dr. h.c. Bernd W. Müller und bei Prof. Dr. Jürgen Schrezenmeir für die Überlassung des interessanten Themas und die Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

Ich möchte mich auch beim Wissenschaftsministerium des Landes Schleswig-Holstein für die finanzielle Förderung dieser Arbeit bedanken, die im Rahmen des Projektes "Mikroverkapselung von Mikroorganismen und bioaktiven Substanzen für funktionelle Lebensmittel" entstanden ist. Dieser Dank gilt auch den beteiligten Mitarbeitern der Pharmatech GmbH, der Tecura GmbH, der Firma Danico, der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel und der Universität Kiel, die zum Gelingen dieses Projektes beigetragen haben.

Bei Dennis und Imke möchte ich mich für den regen fachlichen Austausch während der Promotionszeit bedanken. Ein ganz besonders großes Dankeschön geht dabei an Imke, die mir im Studium und der Promotionszeit immer eine gute Laborpartnerin und Freundin war und ist.

Dr. Neve danke ich für die REM-Aufnahmen. Er hat immer mit viel Geduld aus allen Proben das Beste rausgeholt. Regina und Dr. Franz Furkert danke ich für die Tipps und die Hilfestellung bei mikrobiologischen Problemen, Rüdi und Dirk für die Unterstützung bei technischen Problemen und Arne und Detlef für die schnelle Hilfe bei großen und kleinen Computerproblemen. An dieser Stelle sei auch Peter gedankt. Für das Korrekturlesen bedanke ich mich bei Eva, Silke, Christina, Heike, Imke, Arne und Anne.

Christina und Heike danke ich für ihr offenes Ohr bei großen und kleinen Problemen aller Art.

Bei allen anderen Kollegen bedanke ich mich für die schöne Zeit am Institut, die gute Zusammenarbeit und Unterstützung.

Ganz besonders danke ich auch meinen Eltern für ihre Unterstützung auf meinem bisherigen Weg.

# Lebenslauf

## **Persönliche Daten**

Vor- und Familienname	Astrid Marianne von Holt
Geburtsdatum /-ort	24.10.1976 in Fürstenfeldbruck
Staatsangehörigkeit	deutsch

## **Schulbildung**

Sept. 1983 bis Nov. 1983	Grundschule Fürstenfeldbruck
Dez. 1983 bis Jun. 1987	Grundschule Osdorf
Aug. 1987 bis Mai 1996	Gymnasium Altenholz

## **Hochschulausbildung**

Okt. 1996	Aufnahme des Pharmaziestudiums an der CAU Kiel
März 1999	Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Nov. 2000	Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung

## **Praktisches Jahr**

Jan. 2001 bis Jun. 2001	Ferring GmbH, Kiel
Jul. 2001 bis Dez. 2001	Hirsch Apotheke, Friedrichsort
Jan. 2002	Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung; Approbation als Apothekerin

## **Berufstätigkeit**

seit Feb. 2002	Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel, Kiel; Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. h.c. Bernd W. Müller
----------------	---

## Erklärung

Hiermit erkläre ich gemäß § 9 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität Kiel, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Weiterhin habe ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

.....  
Astrid von Holt

