

Stabilisierung von (R)-(+)-Limonen in einer
Phospholipid Nanoemulsion mittels
Hochdruckhomogenisation

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Grades

Doktor-Ingenieur
(Dr.-Ing.)

der

Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

zu Bonn

vorgelegt am 13. Juni 2008

von

Dipl.-Ing. Christine Frese

aus

Cuxhaven

Referent:	Prof. Dr. Benno Kunz
Korreferent:	Prof. Dr. Rudolf Galensa
Tag der mündlichen Prüfung:	12.12.2008
Publikation:	2008

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn unter http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Vorwort

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit vom Mai 2002 bis Mai 2008 während meiner Tätigkeit am Institut für Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Professor Dr. Benno Kunz für die Überlassung des Themas, die Übernahme des Hauptreferats, seine engagierte wissenschaftliche Betreuung, die Gewährung von großen Freiräumen sowie für das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Herrn Professor Dr. Rudolf Galensa möchte ich für die Übernahme der Zweitkorrektur und seine freundlichen und hilfreichen Verbesserungsvorschläge sehr danken.

Herrn Professor Dr. K.-J. Steffens, Leiter des Instituts für Pharmazeutische Technologie, möchte ich für das mir entgegengebrachte Vertrauen danken. Die Nutzung von Geräten und Laborräumen seines Instituts waren für mich unerlässliche Hilfsmittel für meine Arbeit.

Meinen Diplomanden Antje Knäpper, Barbara Stoffels und Petra Lehnhoff sowie meinen Praktikanten Natalia Valdivia und Necdet Can Koyutürk fühle ich mich aufgrund ihrer wertvollen Beiträge, die sie zu dieser Arbeit geleistet haben, sehr verbunden. Herr Dr. Rudi Wajda, Firma Lipoid Ludwigshafen, hat mir durch wissenschaftliche Gespräche viele Anregungen gegeben, für die ich mich bedanken möchte. Des Weiteren gilt mein Dank Frau Marion Kamphoff für ihre Fernunterstützung gerade in der letzten Phase meiner Dissertation; Frau Rita Caspers-Weiffenbach für ihre Unterstützung bei allen labortechnischen Fragestellungen; Herrn Dr. Tobias Thiele für viele organisatorische und gaschromatographische Tipps; Herrn Dr. Gernot Thiel und Herrn Dr. Mario Bade für ihre stetige Diskussionsbereitschaft; Frau Natalia Fava sowie allen anderen Mitarbeitern des Instituts für ihre Kollegialität und gute Arbeitsatmosphäre.

Besonders Herrn Dr. Daniel Frese, Frau Ingeborg Weinreich, Herrn Dr. Otmar Weinreich und Herrn Dr. Frank Weinreich, möchte ich für ihre intensive und kritische Durchsicht meiner Arbeit danken.

Bei meinen Eltern möchte ich mich besonders für die große Unterstützung nach der Geburt meiner Tochter bedanken. So haben sie mir den Rücken für meine Arbeit freigehalten.

Mein herzlichster Dank gilt meinem Mann, Herrn Dr. Daniel Frese und meiner Tochter Hannah. Ihre liebevolle Unterstützung und Verständnis haben die Grundlage für das Gelingen dieser Arbeit gebildet.

Bonn, im Juni 2008
Christine Frese

Kurzreferat

Stabilisierung von (R)-(+)-Limonen in einer Phospholipid Nanoemulsion mittels Hochdruckhomogenisation

In dieser Arbeit wird eine neuartige Phospholipid Nanoemulsion und ihr Herstellungsprozess detailliert untersucht und ihre Eignung, den instabilen Aromastoff (R)-(+)-Limonen physikalisch und chemisch zu stabilisieren, bewertet.

Ziel ist es dabei durch genaue Kenntnis des Herstellungsprozesses, der Eigenschaften der Nanoemulsion und ihres Einflusses auf das (R)-(+)-Limonen eine Stabilisierungsform für den Aromastoff zu finden, die es ermöglicht (R)-(+)-Limonen schonend und mit hoher Stabilität in wässrigen Lebensmitteln einsetzen zu können.

Der erste Teil der Arbeit befasst sich mit den physikalischen Eigenschaften der neuartigen Phospholipid Nanoemulsion, die in dieser Form noch nicht in der Literatur beschrieben ist. Neben einer makro- und mikroskopischen Strukturanalyse wird die Lagerstabilität in Abhängigkeit von Temperatur, Zeit und Verdünnungsgrad untersucht. Zur Beurteilung wird die Tropfengrößenverteilung, sowie das Zeta-Potenzial der Emulsion betrachtet.

Im zweiten Abschnitt der Arbeit wird der Hochdruckhomogenisationsprozess zur Herstellung der Nanoemulsion untersucht. Dabei wird der Einfluss der Strömungsverhältnisse im Homogenisator, der Temperatur, der dynamischen Viskositäten der Emulsionsphasen auf das Homogenisationsergebnis systematisch bewertet und optimiert.

In der so charakterisierte Nanoemulsion wird im dritten Teil das flüchtige Aroma (R)-(+)-Limonen kolloidal gelöst. Untersucht wird hierbei, ob sich aufgrund der Zugabe des Aromastoffes die physikalischen Eigenschaften der Emulsion, wie Mikrostruktur und Lagerstabilität verändern. Relevante Einflussgrößen sind hierbei Lagerdauer, Lagertemperatur, Verdünnungsgrad und Aromastoffkonzentration.

Gegenstand des folgenden Abschnittes ist der Einfluss der Nanoemulsion auf die Flüchtigkeit des (R)-(+)-Limonens in Abhängigkeit von der Temperatur, gemessen als Stoffmengenkonzentration im Gasraum über der Probe. Detailliert untersucht werden dabei die Funktion der Ölphase und des Emulgators Lecithin die Flüchtigkeit des Aromastoffes zu beeinflussen.

Im letzten Abschnitt schließlich wird auf die chemische Stabilität des (R)-(+)-Limonens in der Nanoemulsion eingegangen. Die qualitative und quantitative Analyse des Limonengehaltes und der seiner drei Abbauprodukte Carvon, Carveol und alpha-Terpineol werden zur Bewertung herangezogen. Die die Stabilität beeinflussenden Parameter sind dabei die Lagertemperatur, die Lagerdauer sowie die Lichtverhältnisse.

Die vorliegende Arbeit liefert somit umfassende Informationen über die Herstellung

und Charakteristik der untersuchten Phospholipid Nanoemulsion zur Stabilisierung von Limonen, um es besser als Aromastoff in Lebensmitteln einsetzen zu können. Auf diese Weise wird ein Beitrag zum besseren Verständnis der Nanoemulsionstechnologie bei Aromastoffen in der Lebensmitteltechnologie geleistet. Die Ergebnisse dieser Arbeit können als Grundlage für die Entwicklung neuer Applikationsformen von Limonen in Lebensmitteln dienen. Denkbar ist auch die Übertragung der gewonnenen Ergebnisse auf andere Terpene oder lipophile Aromastoffe.

Es werden sowohl das hohe Potenzial der Nanoemulsionstechnologie, als auch ihre Grenzen im Bereich der Lebensmitteltechnologie aufgezeigt und diskutiert.

Abstract

Stabilisation of (R)-(+)-limonen in a phospholipid nanoemulsion by means of high pressure homogenisation

This work deals with a detailed investigation of a new type of phospholipid nanoemulsion and its manufacturing process. Its suitability of physically and chemically stabilizing the sensitive flavouring (R)-(+)-limonen is assessed. The aim of this work is to find a new application form for the flavouring by means of a thorough knowledge of the manufacturing process, the characteristics of the nanoemulsion and its impact on (R)-(+)-limonen. The motivation behind this is to facilitate applications of highly stabilized (R)-(+)-limonen in food products with high water content.

The first part of the work provides an essential characterisation of the physical features of this new type of nanoemulsion. In addition to an analysis of the micro- and macro-structure of the emulsion, shelf-life with regard to temperature, time and dilution is examined. For a quantitative evaluation the distribution of the particle size and the zeta-potential are employed.

In the second part of this work the high pressure homogenisation process to manufacture the nanoemulsion is investigated. The influence of the hydrodynamic factors within the homogenisator, the working temperature, the dynamic viscosity of the inner and outer phases of the emulsion on the emulsifying result are systematically evaluated and optimized.

Having characterized the pure nanoemulsion the volatile flavouring (R)-(+)-limonen is colloiddally dissolved in the disperse phase of the emulsion. Special attention is devoted to whether this entrapment changes the characteristics of the emulsion like micro-structure and shelf-life. Time of storage, temperature of storage and concentration of the flavouring are here the most important factors influencing the emulsion.

The following section is dedicated to the influence of the nanoemulsion on the volatility of (R)-(+)-limonen as a function of temperature. The volatility is measured as concentration of (R)-(+)-limonen in the headspace of the sample. Moreover the influence of the oil phase and of lecithin on the volatility of (R)-(+)-limonen are examined in detail.

Finally, in the last section the chemical stability of (R)-(+)-limonen entrapped in the nanoemulsion is examined. The qualitative and quantitative analysis of the concentration of (R)-(+)-limonen and the three degradation products carvon, carveol and alpha-terpineol is used for the evaluation. Storage temperature and time as well as light conditions are here the most important factors influencing the stability of (R)-(+)-limonen.

Summing up this work provides for the first time a comprehensive characterisation

of the manufacture and features of the present phospholipid nanoemulsion and its potential to improve the stabilisation of (R)-(+)-limonene in food products. This provides an important basis for a more thorough understanding of the technology of nanoemulsions in regard to the stabilisation of flavour components. The results of this work can serve as starting point for the development of new forms of application for (R)-(+)-limonene in food.

It is very likely that these results can be applied to other terpenes or lipophilic flavour. The high potential of the technology of nanoemulsions as well as its limitation within the field of food technology are demonstrated and discussed.

Nomenklatur

Formelzeichen	Bedeutung	Einheit
A	Oberfläche	m^2
A_λ	Gemessene Absorption bei einer Wellenlänge λ	
c	Stoffmengenkonzentration	mol cm^{-3}
c_E^{Gg}	Aromakonzentration in der Emulsion im dynamischen Gleichgewicht	mol cm^{-3}
c_G^{Gg}	Aromakonzentration in der Gasphase im dynamischen Gleichgewicht	mol cm^{-3}
D	Diffusionskonstante	$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$
d	Durchmesser	m
d_{max}	maximaler Tropfendurchmesser, der in laminarer Strömung nicht mehr zerkleinert werden kann	m
F	Freie Energie	J
F_g	Gravitationskraft	N
F_f	Reibungskraft	N
G	Scherrate	s^{-1}
g	Erdbeschleunigung	m s^{-2}
I	transmittierte Lichtintensität bei Messung der Absorption	W cm^{-2}
I_0	Eingangslichtintensität bei Messung der Absorption	W cm^{-2}
K	Kugelkonstante	$\text{Pa m cm}^3 \text{g}^{-1} \text{s}^{-1}$
$K_{G/E}$	Gasraum/Emulsion Verteilungskoeffizient	-
K_W	Korrekturfaktor der Wasserdampfdestillation	

k	Boltzmannkonstante	J K^{-1}
k_D	Aggregationsgeschwindigkeit	$\text{cm}^{-3} \text{s}^{-1}$
$m_{\text{Destillat}}$	Masse des Destillats bei der Wasserdampfdestillation	g
m_{Einwaage}	Masse der Einwaage bei der Wasserdampfdestillation	g
n	Stoffmenge	mol
n_i	Brechungsindex innere Phase	
n_a	Brechungsindex äußere Phase	
r	mittlerer Tropfenradius	m
r_0	anfänglicher mittlerer Tropfenradius	m
p_K	Kapillardruck	$\text{Pa} = \text{N m}^{-2}$
S	Entropie	J K^{-1}
$S(r)$	Löslichkeit eines Öls für einen Tropfen mit Radius r	g cm^{-3}
$S(\infty)$	Löslichkeit eines Öls in der kontinuierlichen Phase aus einem Tropfen verschwindender Krümmung	g cm^{-3}
T	Temperatur	K
t	Zeit	s, h, Tag
$t_{\text{def,krit}}$	kritische Deformationszeit	s
U	Innere Energie	J
V_m	molares Volumen der Ölphase	$\text{m}^3 \text{mol}^{-1}$
v	Geschwindigkeit	m s^{-1}
v_x	Geschwindigkeitskomponente	m s^{-1}
We	Weberzahl	-
We_{lam}	laminare Weberzahl	-
$We_{\text{lam,krit}}$	kritische laminare Weberzahl	-
We_{turb}	turbulente Weberzahl	-
$We_{\text{turb,krit}}$	kritische turbulente Weberzahl	-
x	Weglänge	m

Griechische Formelzeichen

Formelzeichen	Bedeutung	Einheit
α	charakteristisches Längenmaß	m
γ	Grenzflächenspannung	N m ⁻¹
δ	angreifende Spannung	N m ⁻²
η	dynamische Viskosität	N s m ⁻²
ν	Aufrahmgeschwindigkeit in der kontinuierlichen Phase	m ² s ⁻¹
ω	Wachstumsrate im Zusammenhang mit Ostwaldreifung (vgl. Gleichung (2.11))	m ⁻³ s ⁻¹
ρ	Dichte	g cm ⁻³
σ	Oberflächenspannung	N m ⁻¹
ζ	Zeta-Potenzial	mV
τ	Schubspannung	N m ⁻²

Indizes

Formelzeichen	Bedeutung	Einheit
Gg	Gleichgewicht	-
d	dispers	-
k	kontinuierlich	-

Inhaltsverzeichnis

Kurzreferat	V
Abstract	VII
Nomenklatur	IX
1 Einleitung	1
2 Theoretische Grundlagen	3
2.1 Aromastoffe	3
2.1.1 Definition von Aromastoffen	3
2.1.2 Aromafreisetzung aus Lebensmitteln	4
2.2 (R)-(+)-Limonen	6
2.2.1 Chemische und physikalische Eigenschaften von (R)-(+)-Limonen	6
2.2.2 Chemischer Abbau des (R)-(+)-Limonens	9
2.2.3 Bekannte Anwendungen und Grenzen von (R)-(+)-Limonen in der Lebensmittelindustrie	12
2.3 Emulsionen	14
2.3.1 Definition Emulsion	14
2.3.2 Definition Emulgator	14
2.3.3 Stabilisatoren	18
2.3.4 Stabilität	19
2.3.5 Nanoemulsionen	24
2.4 Lecithin	25
2.5 Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)	28
2.6 Hochdruckhomogenisation	30
2.6.1 Emulgieren und Homogenisieren als verfahrenstechnische Grundoperation	30
2.6.2 Hochdruck-Verfahren	30

2.6.3	Zerkleinern und Stabilisieren von Tropfen beim mechanischen Emulgieren	31
3	Ziel der Arbeit	37
4	Material und Methoden	41
4.1	Material	41
4.1.1	Geräte	41
4.1.2	Chemikalien	43
4.1.3	Rezepturen	46
4.2	Methoden	48
4.2.1	Herstellung der Phospholipid Nanoemulsion	48
4.2.1.1	Herstellung der Rohemulsion (Premix)	48
4.2.1.2	Hochdruckhomogenisation	48
4.2.2	Rückgewinnung des (R)-(+)-Limonens aus der Nanoemulsion .	48
4.2.2.1	Wasserdampfdestillation	48
4.2.3	Charakterisierung der Nanoemulsion	50
4.2.3.1	Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) zur Bestimmung der Tropfengröße und des Zeta-Potenzials	50
4.2.3.2	Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)	51
4.2.3.3	Bestimmung des relativen Brechungsindex	52
4.2.3.4	Bestimmung des Absorptionskoeffizientens	52
4.2.3.5	Bestimmung der dynamischen Viskosität	52
4.2.3.6	Bestimmung des Einflusses des pH-Wertes auf das Zeta-Potenzial	53
4.2.4	Methoden zur Analyse des (R)-(+)-Limonens	53
4.2.4.1	Gaschromatographie	53
4.2.4.2	Bestimmung der Flüchtigkeit von (R)-(+)-Limonen .	54
4.2.4.3	Bestimmung des (R)-(+)-Limonengehaltes und seiner Abbauprodukte	57
4.2.5	Lagertests	58
4.2.5.1	Lagertest der Nanoemulsion ohne (R)-(+)-Limonen .	58
4.2.5.2	Lagertest der Nanoemulsion mit (R)-(+)-Limonen . .	59

5	Ergebnisse	61
5.1	Physikalische Charakterisierung der Phospholipid Nanoemulsion . . .	61
5.2	Physikalische Charakterisierung des Herstellungsprozesses	64
5.3	Physikalische Stabilität der Nanoemulsion ohne (R)-(+)-Limonen . .	70
5.3.1	pH-Wert und Zeta-Potenzial	74
5.4	(R)-(+)-Limonen in der Phospholipid Nanoemulsion	74
5.5	Flüchtigkeit von (R)-(+)-Limonen in der Phospholipid Nanoemulsion	78
5.6	Chemische Stabilität von (R)-(+)-Limonen in der Nanoemulsion . . .	80
5.6.1	Abbau von (R)-(+)-Limonen	80
5.6.2	Bildung der Abbauprodukte α -Terpineol, Carvon und Carveol	80
6	Diskussion	87
6.1	Charakterisierung der Phospholipid Nanoemulsion	87
6.1.1	Mikroskopische Struktur	87
6.1.2	Makroskopische Struktur und optische Eigenschaften	88
6.2	Homogenisationsprozess	90
6.2.1	Prozessoptimierung	91
6.2.2	Einfluss der Emulsionseigenschaften und Emulsionszusammensetzung auf das Homogenisationsergebnis	92
6.2.3	(R)-(+)-Limonen-Verluste durch die Hochdruckhomogenisation	94
6.3	Kinetische Lagerstabilität der Phospholipid Nanoemulsion	95
6.3.1	Kinetische Lagerstabilität der Phospholipid Nanoemulsion ohne (R)-(+)-Limonen	95
6.3.2	pH-Wert und Zeta-Potenzial	99
6.3.3	Kinetische Lagerstabilität der Phospholipid Nanoemulsion mit (R)-(+)-Limonen	100
6.4	Flüchtigkeit von (R)-(+)-Limonen in der Phospholipid Nanoemulsion	102
6.5	Chemische Stabilität von (R)-(+)-Limonen in der Nanoemulsion . . .	105
6.5.1	Abbau von (R)-(+)-Limonen	106
6.5.2	Abbauprodukte des (R)-(+)-Limonens	107
7	Zusammenfassung und Ausblick	111
8	Anhang	115

Abbildungsverzeichnis	117
Tabellenverzeichnis	119
Literaturverzeichnis	122

Kapitel 1

Einleitung

Ein weiter ansteigender Qualitätsanspruch der Verbraucher an Lebensmittel in Verbindung mit einem steigenden Wettbewerbsdruck innerhalb der Lebensmittelindustrie bedeuten eine zunehmende Notwendigkeit zur Entwicklung neuer Produkte hoher Qualität. Die Qualität eines Lebensmittels wird wesentlich durch sein Aroma bestimmt [42]. Dieser sensorische Eindruck eines Lebensmittels ist der Faktor, der am wichtigsten für den Kauf eines Lebensmittels ist. Er wird als Kaufgrund noch häufiger als Nährwert, Preis oder Produktsicherheit genannt. Um einem Lebensmittel spezifischen Geschmack oder Geruch und somit einen höheren Genusswert zu verleihen, werden Aromastoffe natürlichen Ursprungs, naturidentische oder künstliche eingesetzt [61]. Der Einsatz von Aromen dient dazu, dass ein Aromaverlust durch Lagerung und Verarbeitung eines Lebensmittels kompensiert wird, bestimmte Aromen intensiviert werden und dass Lebensmitteln ein ganz neuer Aromaeindruck verliehen wird. Der Verbraucher empfindet besonders natürliche Aromen wie z. B. das (R)-(+)-Limonen, das zu den Terpenen gehört, als Wertsteigerung für ein Lebensmittel [47]. Das führt dazu, dass die Aromenentwicklung immer mehr an Bedeutung in der modernen Lebensmitteltechnologie gewinnt.

Terpene spielen als Komponenten zur Aromatisierung von Lebensmitteln, als Duftstoffe in Parfümen, als Pharmaka gegen verschiedene Infektionen und in der Tumorthherapie eine wichtige Rolle [101, 125]. Es sind rund 8000 Terpene bekannt. Sie alle folgen einem einheitlichen Bauprinzip: Sie sind aus 2-Methylbutan- bzw. Isopren-Einheiten $(C_5)_n$ aufgebaut. Ätherische Öle, die überwiegend aus Terpenen bestehen, werden seit Jahrtausenden auf physikalischem Wege (Destillation, Auspressen) aus Pflanzenmaterial gewonnen. Seit dem 19. Jahrhundert dienen sie auch zur Aromatisierung von Lebensmitteln. Sie werden üblicherweise durch Wasserdampfdestillation aus Pflanzenmaterial gewonnen [68].

Ein Monoterpen, das von besonderem Interesse ist, ist das in dieser Arbeit untersuchte (R)-(+)-Limonen, da es impact flavour für viele Zitrusaromen ist, die sich

steigender Beliebtheit erfreuen. (R)-(+)-Limonen ist weiterhin von wirtschaftlichem Interesse, da es das in Nahrungspflanzen am häufigsten vorkommende Monoterpen ist (in Zitrusölen bis zu 90%) und als billiges Nebenprodukt in großen Mengen bei der Gewinnung von Zitrus Säften anfällt. In Lebensmitteln wird es bereits zur Aromatisierung von Getränken, Backwaren und Desserts eingesetzt [125]. Beschränkt wird dieser Einsatz durch die chemischen und physikalischen Eigenschaften des Limonens. Es ist sehr flüchtig und aufgrund seiner Lipophilie praktisch unlöslich in Wasser. Bereits geringe Mengen an Limonen können bei einer längeren Lagerdauer zu starker off-flavour Bildung führen [23, 80].

Die von der Lebensmittelindustrie gestellten Anforderungen an den Einsatz von Limonen als Aromastoff sind höher, als das Leistungsspektrum der bisher entwickelten technologischen Applikationsformen. Es besteht ein dringender Bedarf neue Stabilisierungsformen für den Einsatz von Limonen in Lebensmitteln zu entwickeln.

Einen viel versprechenden Ansatz hierzu liefern die Phospholipid Nanoemulsionen, die in der Pharmazie und Medizin bereits etabliert sind und vielfach zum Einsatz bei der Applikation von lipophilen Wirkstoffen und bei der parenteralen Ernährung kommen [51, 50]. Sie besitzen hohe Lagerstabilitäten und haben bereits ihre gute Einsetzbarkeit für sensitive lipophile Verbindungen bewiesen. Die mit Phospholipid Nanoemulsionen gemachten Erfahrungen haben bisher nur unzureichend Eingang in die Lebensmitteltechnologie gefunden, dabei besitzen sie Eigenschaften, die gerade beim Einsatz von Aromen relevant sind.

Ziel dieser Arbeit ist es daher mit Hilfe einer von der Fa. Lipoid, Ludwigshafen neu entwickelten Phospholipid Nanoemulsion eine neuartige Stabilisierungsform für den Einsatz von Limonen in wässrigen Lebensmitteln zu entwickeln. Im Bereich der Lebensmitteltechnologie ist diese Phospholipid Nanoemulsion bisher noch nicht zur Anwendung gekommen. Daher gilt es eine genaue Charakterisierung dieser Nanoemulsion vorzunehmen um dann ihr Potenzial als neue Applikationsform für den Aromastoff (R)-(+)-Limonen in Lebensmitteln zu untersuchen. Es gilt dabei zu zeigen, dass sich (R)-(+)-Limonen in dieser Form mit großer physikalischer und chemischer Stabilität in Lebensmittel kolloidal lösen lässt ohne den Einsatz zusätzlicher Zusatzstoffe notwendig zu machen.

Kapitel 2

Theoretische Grundlagen

2.1 Aromastoffe

2.1.1 Definition von Aromastoffen

Durch das Zusammenwirken von Geschmacks- und Geruchsempfinden beim Verzehr eines Lebensmittels entsteht ein Gesamteindruck, der im Deutschen als *Geschmack* und im Englischen als *flavour* bezeichnet wird. Die dabei beteiligten Verbindungen lassen sich in Geschmacks- und Geruchs- oder Aromastoffe unterteilen. Manche Stoffe wirken sowohl auf den Geschmacks- als auch den Geruchssinn. Unter einem Aromastoff versteht man eine Verbindung, die aufgrund ihrer Flüchtigkeit über Geruchsrezeptoren wahrgenommen werden kann.

Lebensmittelrechtliche Grundlage

In der aktuellen Aromenverordnung befinden sich in der Anlage 1 (zu §1 Abs. 1 und §4 Abs. 1 Nr. 3 Buchstabe a) die Bezeichnungen und Begriffsbestimmungen für Aromen im deutschen Lebensmittelrecht. Grundlage bildet die aktuelle EU-Aromen-Richtlinie (88/388/EWG und 91/71/EWG), die durch die Veränderungsverordnungen von 1991 und 1998 zum Teil in deutsches Recht umgesetzt wurde. In der Aromenverordnung finden sich folgende Kategorien für Aromen [48, 61]:

- Natürliche Aromastoffe
- Naturidentische Aromastoffe
- Künstliche Aromastoffe
- Reaktionsaromen

- Raucharomen

Natürliche Aromastoffe werden in der Aromenverordnung wie folgt definiert [48]:

„Chemisch definierte Stoffe mit Aromaeigenschaften, gewonnen durch geeignete physikalische Verfahren (einschließlich Destillation und Extraktion mit Lösungsmitteln), durch enzymatische oder mikrobiologische Verfahren aus Ausgangsstoffen pflanzlicher oder tierischer Herkunft, die als solche verwendet oder mittels herkömmlicher Lebensmittelzubereitungsverfahren (einschließlich Trocknen, Rösten und Fermentieren) für den menschlichen Verzehr aufbereitet werden.“

Schlüsselverbindungen

Von Schlüsselverbindungen (*impact flavour*) oder *character impact compounds* spricht man, wenn ein Aromastoff das charakteristische Aroma eines Lebensmittels wesentlich prägt, wie das bei (R)-(+)-Limonen für Orangenschalenöl der Fall ist [115].

Fehlaromen

Aufgrund von Verarbeitung und Lagerung von Lebensmitteln kann es zu einer negativen Beeinträchtigung der Inhaltsstoffe kommen. Artfremde, den sensorischen Eindruck eines Lebensmittels negativ beeinflussende Geruchs- und Geschmackseindrücke können sich bilden. Diese werden als Fehlaromen oder *off-flavour* bezeichnet [83].

Wahrnehmungs- und Erkennungsschwelle

Bei Aromastoffen unterscheidet man eine Wahrnehmungs- und eine Erkennungsschwelle. Von Wahrnehmungsschwelle spricht man, wenn die Konzentration so hoch ist, dass eine Wahrnehmung zwar möglich, aber eine genaue Identifizierung des Aromastoffes noch nicht möglich ist. Steigt die Konzentration weiter an, erreicht sie irgendwann die Erkennungsschwelle und das Aroma kann identifiziert werden.

2.1.2 Aromafreisetzung aus Lebensmitteln

Dampfdruck und dynamisches Gleichgewicht

Verdampft man in einem geschlossenen Gefäß eine Flüssigkeit, so kehren durch die Bewegung der Gasmoleküle einige davon wieder in die flüssige Phase zurück, d.h.

sie kondensieren. Nach einer gewissen Zeit wird ein Gleichgewichtszustand erreicht, in dem die Verdampfungs- und Kondensationsgeschwindigkeiten gleich groß sind. Dieser Zustand wird dynamisches Gleichgewicht genannt [41]. Hier ist die Konzentration der Gasmoleküle bei gleicher Temperatur im Gasraum über der Flüssigkeit konstant und auch der Druck, den sie ausüben. Dieser Druck bei konstanter Temperatur wird Dampfdruck genannt. In diesem Zustand wird die Flüchtigkeit einer Substanz als Konzentration der Moleküle in der Gasphase gemessen. Erhöht man die Temperatur so steigt auch der Dampfdruck [72, 81].

Aus der Stoffmengenkonzentration im Gasraum und der verbleibenden Konzentration in der Emulsion lässt sich der Verteilungskoeffizient berechnen. Der Verteilungskoeffizient ist definiert als Verhältnis der Aromakonzentration in der Dampfphase zur Konzentration in der Emulsion. Er lässt sich gut über die Headspace Gaschromatographie ermitteln [59]. Der Gasraum/Emulsions Verteilungskoeffizient $K_{G/E}$ wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$$K_{G/E} = c_G^{Gg} / c_E^{Gg} \quad (2.1)$$

Dieser Verteilungskoeffizient erlaubt es vergleichbare Messdaten zur Beurteilung der Flüchtigkeit eines Aromastoffes in der Emulsion zu erhalten.

Beeinflussung der Flüchtigkeit

Der Verteilungskoeffizient der flüchtigen Verbindung wird in hohem Maße von der Temperatur bestimmt, aber auch die Gegenwart von nicht flüchtigen Komponenten in der Emulsion (z.B. Zucker und Salze in der kontinuierlichen Phase) spielen eine Rolle. Sie sind in der Lage die dynamische Viskosität der kontinuierlichen Phase zu erhöhen und so die Diffusionswerte der flüchtigen Verbindung in der äußeren Phase zu reduzieren. Je höher der Diffusionskoeffizient, desto größer der Fluss der Moleküle durch die äußere Phase.

Der Diffusionskoeffizient eines Moleküls ist invers proportional zur Viskosität der umgebenden Flüssigkeit und so wird eine erhöhte Viskosität der kontinuierlichen Phase dazu führen, dass die Freisetzungsrates des Aromas reduziert ist, da die Diffusion des Moleküls und damit sein Fluss in disperser und kontinuierlicher Phase abgebremst ist. Dies lässt sich anhand der Stokes-Einstein Gleichung zeigen:

$$D = \frac{kT}{6\pi r r \eta_k} \quad (2.2)$$

Je höher die dynamische Viskosität der äußeren Phase desto langsamer ist die Diffusion und damit die Freisetzung des Aromastoffes. Je höher die Temperatur desto geringer ist die dynamische Viskosität und desto größer der Diffusionskoeffizient und desto schneller die Freisetzung von Aromamolekülen.

Zucker ist außerdem in der Lage, Teile der Oberfläche zu besetzen und hier die flüchtigen Verbindungen daran zu hindern in die Gasphase überzugehen. Umgekehrt beeinflusst der Zucker aber nicht das Kondensieren der Moleküle. Die Menge an verdampfenden Molekülen ist reduziert, nicht aber die der kondensierenden. Es kommt zu einem Massenstrom der Moleküle in die Flüssigkeit hinein, und ein neuer geringerer Gleichgewichtsdampfdruck stellt sich ein [14].

2.2 (R)-(+)-Limonen

2.2.1 Chemische und physikalische Eigenschaften von (R)-(+)-Limonen

Terpene sind eine stark heterogene Gruppe von chemischen Verbindungen, die sich biosynthetisch aus Isopreneinheiten (siehe Abb. 2.1) ableiten lassen. Sie sind sekundäre Pflanzenstoffe, und ihre Biosynthese kann ausschließlich von Pflanzen und einigen Mikroorganismen durchgeführt werden. In der Natur sind sie Hauptbestandteil der ätherischen Öle, so besteht z. B. Orangenschalenöl aus 95% (R)-(+)-Limonen [34]. Je nach Anzahl der Isopren (C₅-) Einheiten im Molekül wird zwischen Mono-(C₁₀), Sesqui-(C₁₅), Di-(C₂₀) und Triterpenen (C₃₀) unterschieden. (R)-(+)-Limonen gehört zur Gruppe der Monoterpene, die aus 10 Kohlenstoffatomen aufgebaut sind. In Abb. 2.2 ist die Molekülstruktur des (R)-(+)-Limonens dargestellt.

Limonen ist eine chirale Verbindung, die als (R)-(+)-Limonen (D-Limonen) und als (S)-(-)-Limonen (L-Limonen) auftritt und als Racematmischung DL-Limonen, die auch als Dipenten bezeichnet wird. Beide Enantiomere besitzen unterschiedliche Geruchseindrücke. (R)-(+)-Limonen weist einen orangenartigen Geruch auf. Das (S)-(-)-Limonen ist in Edeltannen- und Pfefferminzöl enthalten und riecht nach Terpentin.

Die IUPAC Bezeichnung für (R)-(+)-Limonen lautet: (R)-(+)-para-Mentha-1,8-dien. Synonyme sind (+)-4-Isopropenyl-1-methyl-1-cyclohexen, D-(+)-Limonen und d-p-Mentha-1,8-dien.

Seine physikalischen Eigenschaften sind in Tabelle 2.1 zusammengefasst. Bei (R)-(+)-Limonen liegt die Geruchsschwelle in Wasser bei 10 µg/kg, der Geschmacksschwellenwert bei 210 µg/kg.

Sein Geruch wird als angenehm fruchtig, frisch und charakteristisch für Zitrusfrüchte beschrieben [98, 25]. Sein Siedepunkt erlaubt eine Gewinnung durch die Wasserdampfdestillation, seine geringe Dichte und seine geringe Wasserlöslichkeit erschweren den Einsatz in wässrigen Lebensmitteln. Im Folgenden wird zur Vereinfachung

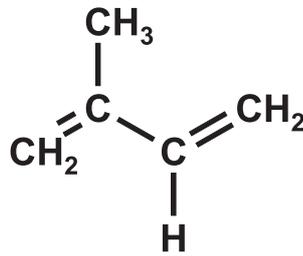


Abbildung 2.1: Basiseinheit der Terpene – Isopren

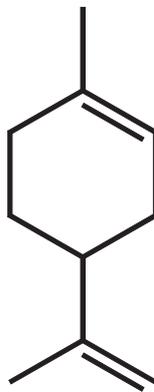


Abbildung 2.2: Molekülstruktur von (R)-(+)-Limonen

von Limonen gesprochen, wenn (R)-(+)-Limonen gemeint ist.

Tabelle 2.1: Physikalische Eigenschaften von (R)-(+)-Limonen

Siedepunkt	176 °C
Schmelzpunkt	- 74,35 °C
Dichte	0,8411 g/cm ³ bei 25 °C
Wasserlöslichkeit	13,8 mg/l bei 25 °C
Dampfdruck	0,19 kPa bei 20 °C
Molekülformel	C ₁₀ H ₁₆
Strukturformel	CH ₃ -C ₆ H ₈ -C(CH ₃)=CH ₂
Molekulargewicht	136,24 g

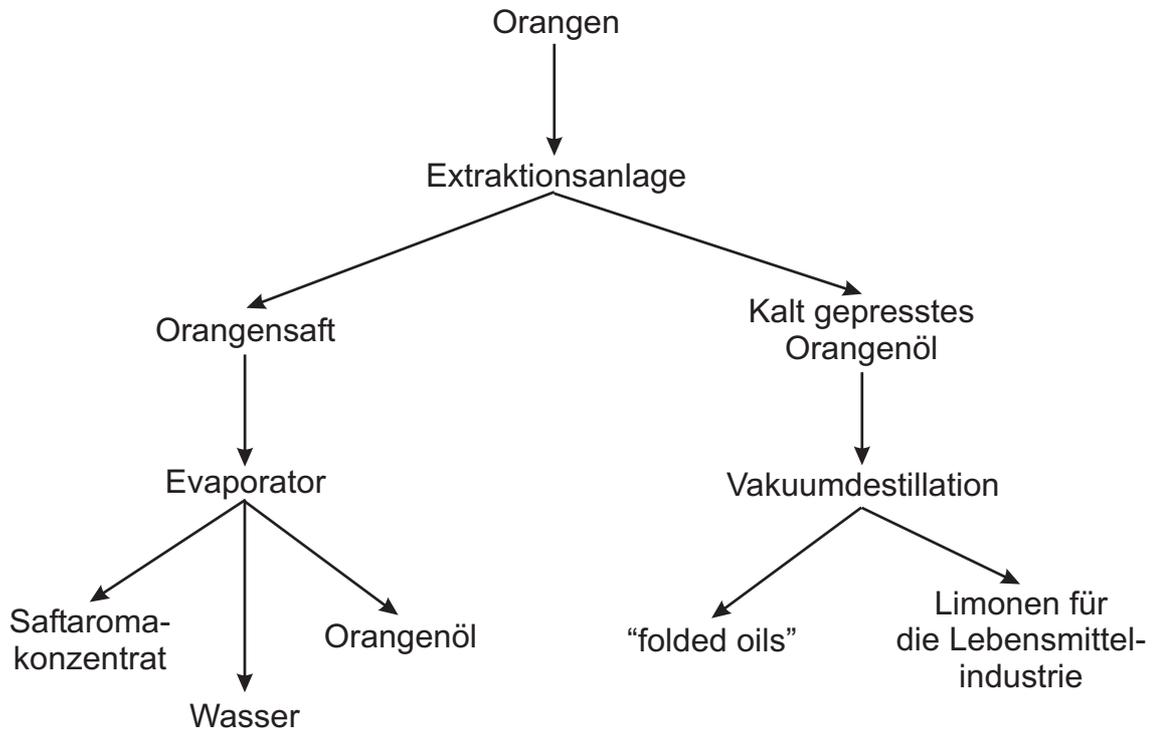


Abbildung 2.3: Gewinnung von Orangenöl

Gewinnung von Limonen

Ein großer Teil der Citruswelternte, insbesondere der Orangen- und Grapefruiternte gelangt nicht auf den Frischmarkt, sondern wird zu Saft und Saftkonzentrat verarbeitet. Bei der Saftgewinnung in der Extraktionsanlage und der anschließenden Aufkonzentrierung in einer mehrstufigen Verdampferanlage (Evaporator, Röhrenfallstromverdampfer und Plattenverdampfer) fallen Schalenöl und Saftaromakonzentrat als wertvolle aromagebende Produkte an. Das Saftaromakonzentrat wird bei der Aromagewinnung aus dem Brüden zurückgewonnen (siehe Abb. 2.3) [63]. Kaltgepresstes Schalenöl kann vor oder während der Saftextraktion gewonnen werden. In beiden Fraktionen kommt Limonen als impact flavour in unterschiedlicher Konzentration vor (siehe Tab. 2.2) [63].

Tabelle 2.2: Limonengehalt in Schalenöl und Saftaromenkonzentrat

Orangenschalenöl	Wasserphase Saftaromakonzentrat
93,5% Limonen	0,02% Limonen

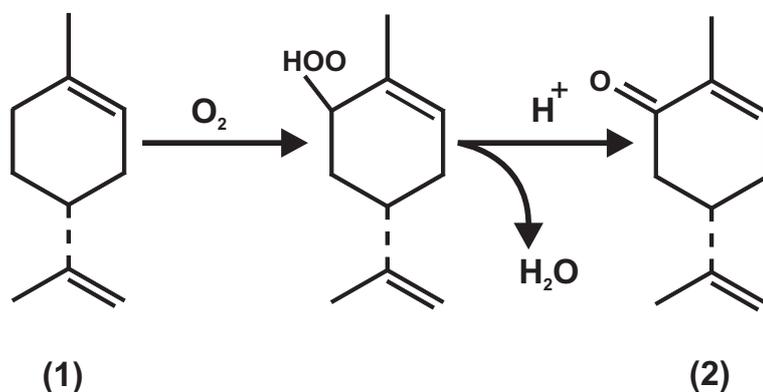


Abbildung 2.4: Bildung von Carvon (2) aus (R)-(+)-Limonen (1)

Das Schalenöl findet nicht nur in der Aromenindustrie Verwendung, sondern große Teile davon gehen in Reinigungsprodukte und Produkte der Körperpflege [3].

2.2.2 Chemischer Abbau des (R)-(+)-Limonens

Neben seiner Bedeutung als Aromastoff spielt Limonen gleichzeitig eine zentrale Rolle bei der off-flavour (Fehlaromen) Bildung in Lebensmitteln und ist damit limitierend für deren Haltbarkeit. Zum besseren Verständnis der Abbaureaktionen werden diese im Folgenden vorgestellt.

Oxidativer Abbau des Limonens Limonen ist gegenüber Oxidation sehr anfällig [6, 82] und Ausgangssubstanz für die Bildung einer Vielzahl von Abbauprodukten [21, 39]. Wird das Limonen Sauerstoff ausgesetzt, laufen viele verschiedene oxidative Reaktionen ab und es entsteht eine Mischung verschiedener Peroxide, Alkohole und Ketone. Von besonderem Interesse sind die dabei gebildeten Fehlaromen, die den Aromaeindruck der Lebensmittel beeinträchtigen. Hier sind das Carvon und Carveol als relevante Fehlaromen untersucht worden [6, 19, 38, 39, 100].

Carvon Das Carvon ist das am häufigsten vorkommende ungesättigte Keton der Menthanreihe [82]. Es kommt in zahlreichen ätherischen Ölen vor. So ist es z. B. die Aromaleitsubstanz des Kümmel- und Dillöls [25, 82]. Sein (R)-Enantiomer besitzt einen Geruch von grüner Minze und Pfefferminz [91, 115]. In Gegenwart von Sauerstoff und Licht oxidiert Limonen über das Limonen-Hydroperoxid unter Abspaltung von Wasser zum Carvon (siehe Abb. 2.4) [49, 9, 38, 39, 115, 91, 92]. Höhere Konzentrationen an Protonen beschleunigen diese Reaktion. Sie läuft ähnlich der Autoxidation ungesättigter Fettsäuren ab [91]. Untersuchungen am Beispiel des

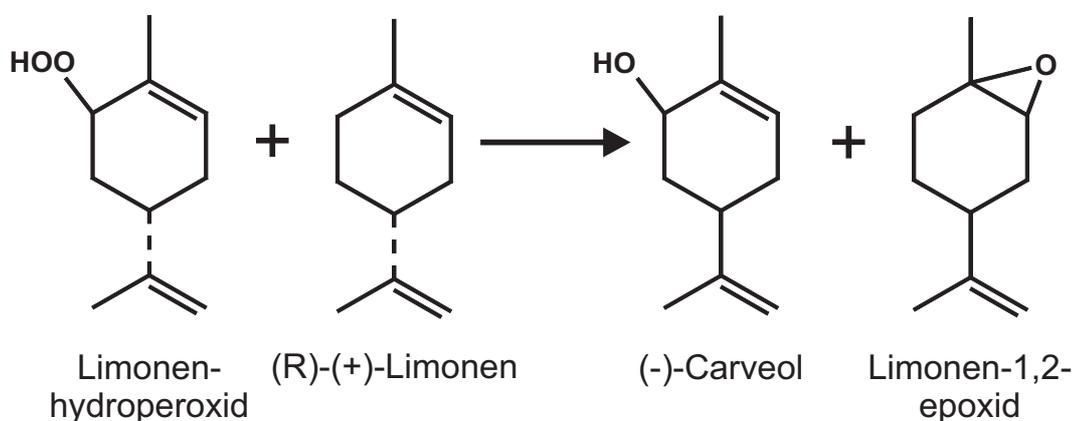


Abbildung 2.5: Bildung von Carveol aus (R)-(+)-Limonen [35]

Orangensaftes mit Limonen zeigen, dass die Bildung des Carvons unter dem Einfluss von Tageslicht und der Gegenwart von Luftsauerstoff nahezu linear in Abhängigkeit von der Zeit verläuft [90, 91]. Pfannhauser und Rauscher [90] fanden heraus, dass es bei einer kühlen Lagerung im Dunkeln zu keiner Bildung von Carvon kommt. Durch alkoholische Lösung, Sonnenlicht oder ultraviolette Strahlung kommt es zu einer Zyklisierungsreaktion, bei der Carvoncamphor aus Carvon entsteht [82, 91]. Carvon besitzt eine sehr niedrige Geruchsschwelle in Wasser. Sie liegt bei ca. 0,53 mg/l [91]. Dieser Geruch wird bei Orangensaft als terpenartiges Fehl aroma wahrgenommen [38, 39, 92].

Carveol Carveol ist ein Alkohol und zählt zu den Sauerstoffverbindungen der Menthanreihe. Die Bildung von Carveol ist eine Reaktion von Limonen mit einem Limonenhydroperoxid, das auch bei der Bildung von Carvon beteiligt ist. Es entsteht Limonen-1,2-epoxid und Carveol. In Abb. 2.5 ist die oxidative Reaktion des Limonens mit einem Peroxid zu Carveol dargestellt. Carveol kommt genauso wie das Carvon in Dill und Kümmel vor. Seine beiden Enantiomere ((R)-(-)-Carveol, (S)-(-)-Carveol) besitzen einen Geruch nach Minze, bzw. nach Kümmel. Es wird im Limonen-Aroma jedoch als Fehl aroma wahrgenommen [115, 90]. Die Bildung von Carveol im Schalenöl von Zitrusfrüchten ist temperatur- und lichtabhängig. Sie führt zu einem stickigen Kochgeruch [39, 90, 92].

Nicht-oxidativer Abbau des Limonens

α -Terpineol α -Terpineol gehört wie das Limonen zu den Monoterpenen, besitzt aber eine zusätzliche alkoholische Gruppe (siehe Abb. 2.6) und wird als Sauerstoffverbindung der Menthanreihe zugeordnet. Es liegt natürlich vorkommend in zahl-

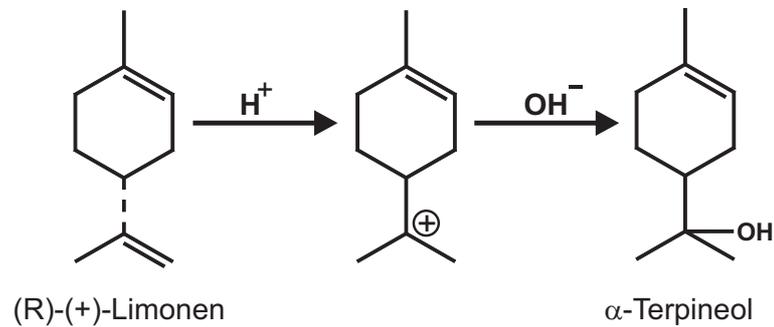


Abbildung 2.6: Bildung von α -Terpineol aus (R)-(+)-Limonen [12]

reichen Gewürzen und Kräutern wie z. B. Pfeffer, Sternanis, Muskat und Majoran vor [114, 115]. Sein Geruch ist bei beiden Enantiomeren unterschiedlich. So weist das (R)-(+)- α -Terpineol einen äußerst intensiven Geruch nach Flieder auf; hingegen riecht das (S)-(-)- α -Terpineol koniferenartig [25]. In Untersuchungen bei der Lagerung von Limonen wird α -Terpineol ein erdiger, muffiger, pilzähnlicher bis fauliger Aromaeindruck zugewiesen. Die Konzentration an α -Terpineol wird daher als Qualitätsparameter für Produkte mit Limonen verwendet [38]. α -Terpineol wird als Abbauprodukt bei der säurekatalysierten Hydratation des Limonens gebildet [21, 82, 88, 91, 114]. Diese Reaktion ist in Abb. 2.6 schematisch dargestellt. Dabei bildet sich bei der Reaktion des Limonens mit einem Proton ein Karboniumion, das durch die Aufnahme einer OH-Gruppe zu α -Terpineol reagiert [21]. Diese säurekatalysierte Reaktion wird auch als ACHD-Reaktion bezeichnet (Acid-catalysed-hydration-dehydration-reaction) [21, 38]. Das für diese ACHD-Reaktion benötigte Wasser kann auch von der Wasserabspaltung bei der Bildung des Carvons (siehe oben) stammen [12, 49]. Es konnte gezeigt werden, dass die Bildung des α -Terpineol durch einen sauren pH-Wert und Lagertemperaturen oberhalb von 21 °C beschleunigt wird [12, 13, 21, 39, 90]. Dementsprechend reduzieren höhere pH-Werte und niedrige Temperaturen die Bildung von α -Terpineol [21]. Jedoch kommt es auch bei dunkler Lagerung bei Raumtemperatur zur Bildung von α -Terpineol, was durch Lichteinstrahlung nochmals beschleunigt wird [39, 90]. Unter Einfluss von Sauerstoff wird das α -Terpineol oxidiert [117]. Im Folgenden wird von Terpeneol die Rede sein, wenn α -Terpineol gemeint ist.

Carvon, Carveol und Terpeneol sind von zentraler Bedeutung bei der Beurteilung der Haltbarkeit von Limonen, da sie als ein Indikator für die Aromastabilität dienen können [90, 39]. Einflussfaktoren für den Abbau des Limonens sind dabei unter anderem die Lagerzeit, die Lagertemperatur, die Milieubedingungen (pH-Wert) und die Lichtverhältnisse [90, 39]. Es werden daher im Rahmen dieser Arbeit neben dem Abbau des Limonens auch die Bildung dieser drei Verbindungen untersucht.

2.2.3 Bekannte Anwendungen und Grenzen von (R)-(+)-Limonen in der Lebensmittelindustrie

Der natürliche Rohstoff Limonen findet als Aromastoff Verwendung in der Lebensmittelindustrie. Er kann in Aromakonzentraten oder direkt ins Lebensmittel eingearbeitet werden [3]. Limonen, gewonnen aus den Schalenölen von Zitrusfrüchten, kommt hierbei als impact flavour zum Einsatz. So ist Limonen gerade in der Getränkeindustrie von großer Relevanz [63, 39, 49, 113].

Trotz seiner großen Bedeutung ist aufgrund seiner geringen Wasserlöslichkeit, seiner geringen Emulgierbarkeit und seiner chemischen Instabilität [19, 39, 90, 49] in Verbindung mit seiner hohen Flüchtigkeit der Einsatz in Lebensmitteln schwierig und noch nicht in allen Fragen befriedigend gelöst [26]. Stand der Technik ist, dass zum Teil der Einsatz von Limonen völlig vermieden wird, indem Zitrusöle entterpenisiert werden. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass Limonen in organischen Lösungsmitteln, wie z. B. Ethanol gelöst wird. Diese Lösungsmittel sind zum einen sehr teuer, ihr Einsatz ist in manchen Religionsgruppen nicht zulässig und das Limonen wird durch die Verdünnung in wässrigen Lebensmitteln praktisch wieder unlöslich. Zum anderen wird Limonen in Form einer O/W-Emulsion stabilisiert und als Emulsion unmittelbar im Lebensmittel eingesetzt [96, 7]. Das Problem, das dabei auftritt, ist, dass die Stabilität dieser Emulsionen aufgrund von Aufrahmung und Koaleszenz gering ist. Limonen besitzt eine deutlich geringere Dichte (0,841 g/ml, 20°C) als andere Speiseöle (z. B. Sonnenblumenöl mit 0,921 g/ml) und ist daher noch schwerer zu emulgieren. Es kommt zur Auftrennung der Emulsion und zur Bildung einer Ölschicht auf der Oberfläche des Getränks (sog. „oiling-off“). Verbesserungen werden durch den kombinierten Einsatz von sterisch stabilisierenden Emulgatoren (wie modifizierte Stärken, Gummi Arabicum), Stabilisatoren (wie modifizierte Stärken, Xanthan, Pectin und Carboxymethylcellulose), Konservierungsstoffen und der Zugabe von Beschwerungsmitteln (sog. „weighting agents“) erzielt [70, 29]. Diese Beschwerungsmittel sind lipophil und werden in der dispersen Phase gelöst, um die Aufrahmung durch die Angleichung der Dichten zu minimieren. Es kommt jedoch nach wie vor zu Koaleszenz und Flokkulation, die von dem Tropfendurchmesser, den Eigenschaften des Emulgators und des Stabilisators der Emulsion abhängen [112].

Emulgatoren, Stabilisatoren, Konservierungsstoffe und Beschwerungsmittel gehören alle zu den zulassungspflichtigen Zusatzstoffen. Gut untersuchte Beschwerungsmittel sind bromierte Speiseöle (BVO), die jedoch in Europa nicht zugelassen sind und z.B. Saccharoseacetatisobutyrat (SAIB). Der Nachteil von SAIB ist, dass sein Einsatz mengenmäßig begrenzt ist (300 mg/l) und es nur für zwei Sorten von Getränken zugelassen ist: Für aromatisierte trübe Getränke ohne Alkohol und für aromatisierte trübe Getränke mit einem Alkoholgehalt < 15% Vol.. Der ADI liegt bei 10 mg/kg [1].

Auch ist es oft nicht möglich mit den vorgegebenen Grenzwerten in Emulsionen mit einem hohen Ölanteil die Dichten vollständig anzugleichen. Die Aufrahmung wird nicht ganz unterbunden [70, 113].

Eine weitere Anwendungsform des Limonens sind sprühgetrocknete Aromapulver [71, 107, 20]. Sie bieten relativ gute physikalische und chemische Stabilisierung für das Limonen in Pulverform. Die Nachteile dieses Verfahrens sind der aufwendige Herstellungsprozess (Sprühtrocknung), die thermische Beanspruchung des Aromas, die Aromaverluste während der Sprühtrocknung [66], der Anteil an nicht verkapseltem ungeschütztem Oberflächenöl [10], die z.T. schlechte Dosierbarkeit bei hygroskopischen Kapselmaterialien und die mechanische Beanspruchung bei Lagerung und Transport, die zum Bruch der Kapseln führen kann [26, 108]. Viele Untersuchungen beschäftigen sich mit der Retention der Pulver für Limonen und dessen chemische Stabilität. Aromaverluste durch Freisetzung und chemischen Abbau begrenzen nach wie vor die Haltbarkeit dieser Pulver [19, 55].

Pulver eignen sich für Instantprodukte und für den direkten Einsatz in Lebensmitteln. Die Kapselmaterialien besitzen emulgierende Eigenschaften, dennoch ist die nach der Redispergierung entstehende Emulsion in ihrer physikalischen Stabilität schlechter als die der Emulsionen mit Beschwerungsmitteln, die unmittelbar in das wässrige Lebensmittel eingearbeitet werden (siehe oben). Deswegen werden bei Softdrinks nach wie vor Emulsionskonzentrate eingesetzt. Flüssige Emulsionen lassen sich leichter pumpen und dosieren, auch entfällt hier der zusätzliche Prozessschritt des Lösens der Pulver, so dass Emulsionen auch aus Sicht des Produktionsprozesses Vorteile bieten.

Ob Limonen als Pulver oder bereits als Emulsion zum Einsatz kommt, hängt davon ab in welches Lebensmittel es in welcher Dosierung eingearbeitet werden soll und welche prozesstechnischen Möglichkeiten für seine Verarbeitung bestehen. Auch Transport und Lagerung spielen dabei eine Rolle. Beide Applikationsformen erschließen einen weiten Anwendungsbereich in Lebensmitteln. Beide Formen werden ständig weiter entwickelt, um oben angeführten Nachteilen zu begegnen und weitere Anwendungsfelder zu erschließen.

2.3 Emulsionen

2.3.1 Definition Emulsion

Die International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) definiert Emulsionen wie folgt [28]:

„In an emulsion liquid droplets and/or liquid crystals are dispersed in a liquid.“

Diese Formulierung impliziert, dass die beiden flüssigen Phasen nicht oder nur sehr geringfügig ineinander löslich sind. Man spricht allgemein von einer wässrigen und einer öligen Phase.

Nach der Lage der Phase unterscheidet man zwischen äußerer (kontinuierlicher) und innerer (dispenser) Phase. Ist die äußere Phase wässrig, so spricht man von einer Öl in Wasser Emulsion (*O/W-Emulsion*), im umgekehrten Fall von einer Wasser in Öl Emulsion (*O/W-Emulsion*). In Abb. 2.7 sind beide Emulsionstypen schematisch dargestellt. Bei der hier betrachteten Nanoemulsion handelt es sich um eine O/W-Emulsion.

In Abhängigkeit von der Größe der Tropfen lassen sich Makro- und Nanoemulsionen unterscheiden. Die Abgrenzung ist in der Literatur nicht einheitlich, eine übliche Unterscheidung ist < 200 nm für Nanoemulsionen und > 200 nm für Makroemulsionen [62]. Die genannte Definition berücksichtigt ferner, dass eine Emulsion Stoffe enthält, die zu einer zumindest zeitlich begrenzten Stabilisierung der dispersen in der kontinuierlichen Phase führen. Dies geschieht z.B. durch Adsorption grenzflächenaktiver Substanzen an den Phasengrenzflächen. Diese grenzflächenaktiven Substanzen werden auch als Tenside oder in Emulsionen als Emulgator bezeichnet.

2.3.2 Definition Emulgator

Emulgatoren sind grenzflächenaktive Substanzen, die sich bevorzugt in einem Zweiphasensystem an der Grenzfläche anlagern. Charakteristisch für solche Verbindungen ist ihr amphiphiler Charakter. Das Molekül einer solchen Verbindung besitzt wenigstens eine Gruppe mit hoher Affinität zur unpolaren Phase (*apolare Gruppe*) und wenigstens eine Gruppe mit Affinität zur polaren Phase (*polare Gruppe*).

In ihrer Ausrichtung orientieren sich die Emulgatormoleküle so, dass ihr lipophiler Teil in das Öl ragt und dass ihr hydrophiler Teil in die hydrophile Flüssigkeit (in der Regel Wasser) ragt. Diese Wechselwirkung bewirkt eine Reduzierung der Grenzflächenspannung. Durch diese Reduzierung lassen sich die beiden Flüssigkeiten leichter unter Bildung einer Emulsion ineinander dispergieren [11, 106].

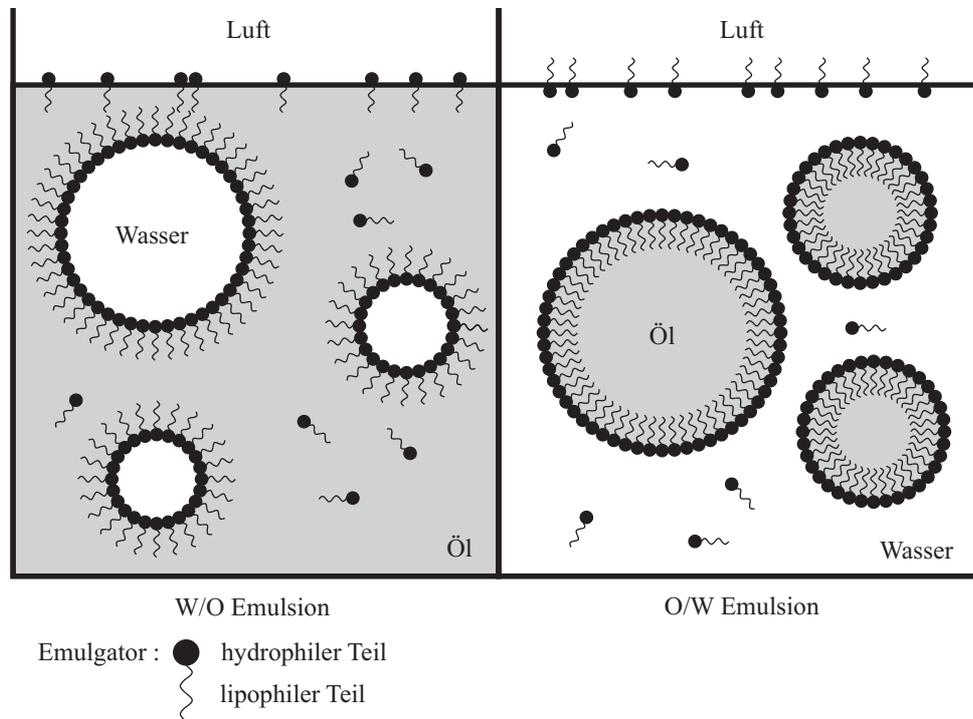


Abbildung 2.7: W/O und O/W Emulsionen mit Emulgatoren. Je nach Emulsionstyp ordnen sich die Emulgatormoleküle entsprechend an

Lebensmittelrechtlich gehören die Emulgatoren zu den Lebensmittelzusatzstoffen. Sie sind als solche zuzulassen und auf dem Lebensmittel als Zusatzstoff kenntlich zu machen.

Klassifizierung der Emulgatoren

Emulgatoren lassen sich anhand verschiedener Kriterien klassifizieren; z.B. nach

- der Ladung der hydrophilen Gruppe in Wasser
- den lipophilen Gruppen
- der Löslichkeit in verschiedenen Lösungsmitteln
- dem Verhältnis der hydrophilen zur lipophilen Gruppe (*HLB Wert*)
- der Kristallform
- der Anordnung der Emulgatormoleküle bei der Wechselwirkung mit Wasser

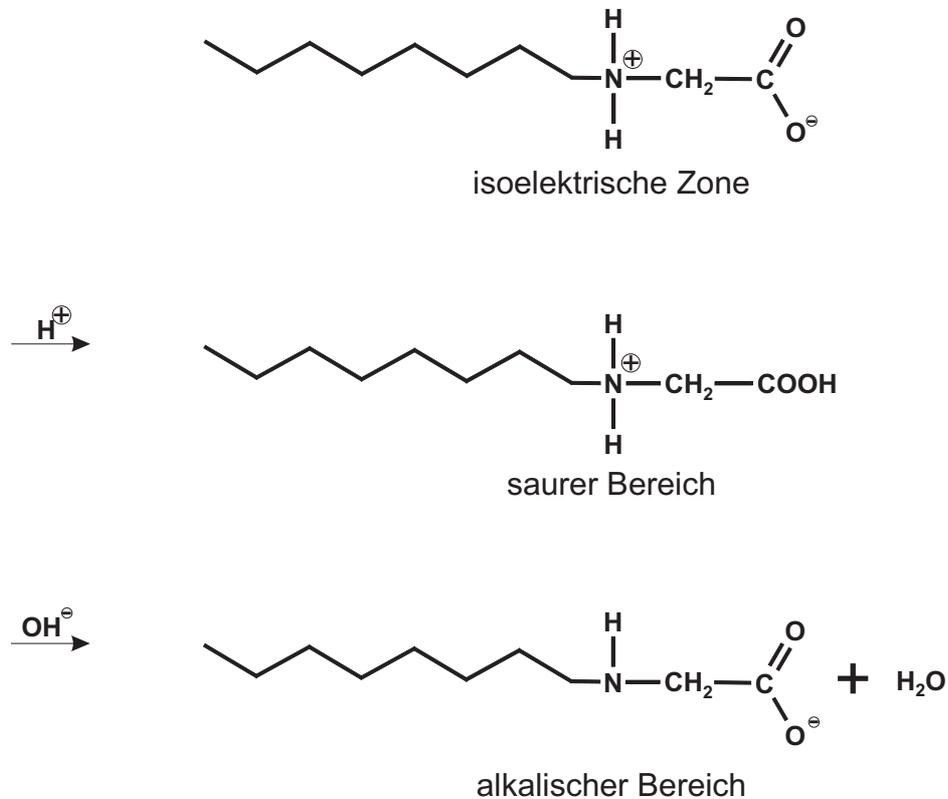


Abbildung 2.8: Amphotere Emulgatoren [106]

Da es sich bei dem in dieser Arbeit verwendeten Emulgator Lecithin um eine Mischung von ionischen Phospholipiden handelt, wird die Klassifizierung nach der Ladung der hydrophilen Gruppe in Wasser ausgeführt.

Klassifizierung nach der Ladung der hydrophilen Gruppe in Wasser

Durch das Verhalten der hydrophilen Gruppe in Wasser unterscheidet man ionische und nicht-ionische Emulgatoren. Die ionische Klasse der Emulgatoren umfasst drei Gruppen, die aufgrund des Verhaltens der hydrophilen Gruppe in amphotere, anionische und kationische Emulgatoren unterteilt werden. Alle drei Gruppen führen neben der Reduzierung der Oberflächenspannung aufgrund ihrer Ladungen der funktionellen Gruppen zu einer elektrostatischen Stabilisierung der Emulsion.

Zu den amphoteren Verbindungen gehören die sogenannten Ampholyte. Das sind Emulgatoren, die in Abhängigkeit vom pH-Wert der wässrigen Lösung als Protonendonator oder Protonenakzeptor fungieren. Das heißt, sie können sowohl als Base als auch als Säure fungieren. Am isoelektrischen Punkt des Moleküls liegt das Molekül als Zwitterion mit einer Nettoladung von Null vor (siehe Abb. 2.8). Zu diesen

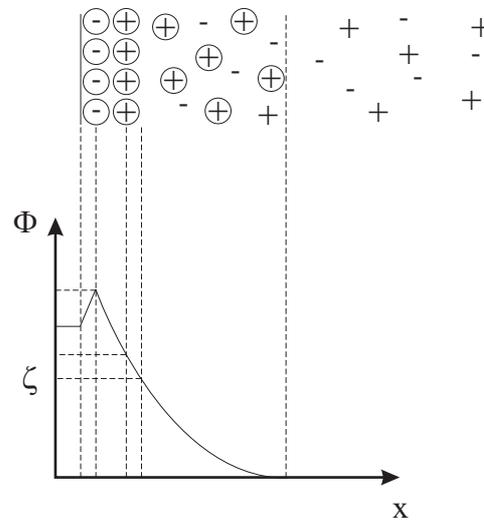


Abbildung 2.9: Modell der elektrochemischen Doppelschicht in einer Emulsion mit ionischem Emulgator

Verbindungen gehört das hier verwendete Lecithin.

Elektrostatische Wechselwirkungen

In Emulsionen mit amphoteren Emulgatoren, wie das hier verwendete Lecithin, tragen die Tropfen der dispersen Phase in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Ionenstärke der wässrigen Phase Oberflächenladungen. Daher spielen besonders elektrostatische Wechselwirkungen eine Rolle bei der Stabilität der hier betrachteten Phospholipid Nanoemulsion. Das Zeta-Potenzial gibt über das Vorhandensein basischer und saurer Gruppen an der Grenzfläche Auskunft. Die Dissoziation saurer Molekülgruppen oder die Adsorption von Hydroxidionen führen zu einer negativen Ladung [36]. Da in der Regel alle Emulsionstropfen mit dem gleichen Emulgator stabilisiert sind, tragen sie alle die gleiche Ladung. Die elektrostatische Wechselwirkung zwischen Tropfen gleicher Ladung ist die Abstoßung, die dazu beiträgt, dass die Tropfen sich schlechter einander annähern können um zu aggregieren. Ausgehend von dem Modell der elektrochemischen Doppelschicht (siehe Abbildung 2.9) an der Phasengrenzfläche lässt sich die elektrochemische Stabilisierung von Emulsionen mit ionischen Emulgatoren erklären. Über dieses Modell kann das Zeta-Potenzial ζ als Maß für die Oberflächenladung bestimmt werden, welches Auskunft über die Stärke der elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den emulgierten Tropfen gibt [85]. In Abbildung 2.9 ist ein solches Doppelschicht Modell an einer negativ geladenen Tropfenoberfläche schematisch dargestellt.

Befindet sich eine Tropfenoberfläche der dispersen Phase einer Emulsion im chemi-

schen Gleichgewicht mit einer umgebenen Elektrolytlösung, so liegt bei freier und unabhängiger Beweglichkeit der Ladungsträger an der Phasengrenze eine andere Ladungsverteilung als im Inneren der kontinuierlichen und der dispersen Phase vor [5].

Der Überschuss einer Ionensorte und Anlagerung deren Gegenionen an der Phasengrenze wird als elektrochemische Doppelschicht bezeichnet. Als Ursache für die Anreicherung einer Ionensorte kann die Dissoziation von Molekülgruppen auftreten und damit zur Anreicherung von Gegenionen an der Grenzfläche zwischen innerer und äußerer Phase führen.

Nach außen schließt sich die diffuse Schicht an, in der die Verteilung der Ladungsträger aufgrund von Wärmebewegung diffus ist. Das Potenzial strebt gegen Null. Im unendlichen Abstand von der Partikeloberfläche ist die elektrische Neutralität nach außen hergestellt [85].

Wird das System durch Anlegung eines elektrischen Feldes gestört, werden die Phasen des Doppelschicht-Modells gegeneinander verschoben und die Neutralität aufgehoben. Durch dieses teilweise Abscheren der diffusen Phase wird an der Scherebene eine messbare Potenzialdifferenz ausgebildet, die als Zeta-Potenzial bezeichnet wird. Bei O/W-Emulsionen kann das Zeta-Potenzial zu Aussagen über die Stabilität herangezogen werden. Insbesondere Koaleszenz und Flokkulation werden mit der Höhe des Zeta-Potenzials in Verbindung gebracht.

Durch ein hohen Betrag des Zeta-Potenzials soll eine bessere elektrostatische Abschirmung der Tropfen der dispersen Phase untereinander erfolgen. Dadurch sind Koaleszenz und Flokkulation vermindert.

2.3.3 Stabilisatoren

Zur Verbesserung der Stabilität von Emulsionen durch Erhöhung der dynamischen Viskosität der kontinuierlichen Phase werden neben Emulgatoren auch Stabilisatoren eingesetzt. Die meisten sind als Zusatzstoff kenntlich zu machen (z.B. Glycerin, Xanthan, PEG 20000) [64, 116]. Zucker wie z. B. Fruktose, Glukose oder Saccharose sind keine Zusatzstoffe und daher als solche auch nicht zulassungspflichtig [122, 22, 57].

Fruktose und die anderen Zucker binden freies Wasser der äußeren Phase über Wasserstoffbrücken, so dass es zu einer Viskositätserhöhung kommt [57, 61, 81, 94]. Die Tropfen der dispersen Phase werden in ihrer Bewegung gebremst, so dass die Kollisions- und die Aggregationsrate der Tropfen reduziert werden (siehe 2.3.4).

Den Zusammenhang zwischen Viskosität der kontinuierlichen Phase und der Aggregationsgeschwindigkeit zeigt die Smoluchowski-Gleichung [70].

$$k_D = 8kT/3\eta_k \quad (2.3)$$

Hier gilt, dass je höher die dynamische Viskosität der kontinuierlichen Phase, desto geringer ist die Änderung der Anzahl der Tropfen pro Volumeneinheit mit der Zeit. Des Weiteren wird das Aufrahmen der Tropfen aufgrund der hohen Viskosität verlangsamt [116]. Das Gesetz von Stokes zeigt dies (vgl. Diskussion um Gleichung 2.7).

2.3.4 Stabilität

Stabilität von Emulsionen

Makro- und Nanoemulsionen sind im Gegensatz zu Mikroemulsionen, die spontan bildend sind, thermodynamisch instabile Systeme.

Es gilt

$$F = U - TS \text{ mit } U = A \cdot \sigma. \quad (2.4)$$

Wie jedes System strebt die Emulsion eine Minimierung der freien Energie an. Dieser stabile Zustand wird durch Reduzierung der inneren Oberfläche erreicht, indem die Öltropfen zusammenfließen. Das System ist bei völliger Trennung der beiden Phasen thermodynamisch stabil. Man spricht auch von einem Aufbruch der Emulsion.

Eine Emulsion kann aufgrund einer ganzen Reihe physikalischer und biochemischer Prozesse destabilisiert werden. Flokkulation, Koaleszenz, Aufrahmung und Ostwaldreifung sind die physikalischen Vorgänge der Destabilisierung. Oxidation und Hydrolyse sind häufig auftretende chemische Destabilisierungs-Prozesse. In der Praxis können mehrere Prozesse zusammenwirken.

Daher ist es wichtig zu untersuchen, welche Prozesse in einer Emulsion auftreten und wie man ihnen entgegenwirken kann [70]. Wie lange eine Emulsion stabil bleiben soll, hängt von der Art des Lebensmittels ab, für das sie gedacht ist. Manche Emulsionen müssen nur wenige Sekunden bis wenige Stunden stabil bleiben, da sie im Herstellungsprozess nur eine Übergangsstufe darstellen (z.B. bei der Sprühtrocknung). Andere hingegen müssen über Monate ja sogar Jahre hinweg stabil bleiben (z. B. Aromaemulsionen für Getränke, Butter oder Eiscreme). In jedem Fall ist es wichtig, die relevanten Destabilisierungs-Mechanismen zu verstehen, um z.B. quantitative Vorhersagen (siehe Ostwaldreifung) über die Emulsionsstabilität machen zu können und um bei unzureichender Emulsionsstabilität gezielte Optimierungen vornehmen zu können. Im Folgenden wird auf die einzelnen physikalischen Destabilisierungs-Prozesse näher eingegangen.

Tropfenaggregation

In einer Emulsion sind die Tropfen in ständiger Bewegung. Sei es aufgrund der Brown'schen Molekularbewegung, der Gravitation oder mechanischer Beanspruchung, z. B. durch Rühren. Dabei stoßen sie häufig mit anderen umgebenden Tropfen zusammen. Nach einer Kollision können sich die Tropfen entweder unverändert von einander trennen, oder sie aggregieren. Das hängt in erster Linie von den anziehenden und abstoßenden Kräften zwischen zwei Tropfen ab.

Man unterscheidet zwei Formen der Aggregation. Das eine ist die Flokkulation und das andere ist die Koaleszenz. Bei der Flokkulation bilden zwei oder mehr Tropfen ein Aggregat, in dem jeder einzelne Tropfen unverändert bleibt. Bei der Koaleszenz kommt es zur Verschmelzung von zwei oder mehr Tropfen zu einem größeren Tropfen. Bei der Flokkulation reicht oft eine sanfte Bewegung der Emulsion um das Aggregat zu trennen. Bei der Koaleszenz muss soviel Energie aufgewandt werden, dass es erneut zum Aufbruch der Tropfen kommt, um die Koaleszenz rückgängig zu machen. Flokkulation ist oft die Vorstufe der Koaleszenz.

Um eine möglichst stabile Emulsion herzustellen, ist es daher notwendig die Faktoren zu kennen, die die Aggregation beeinflussen [70].

Methoden zur Kontrolle der Koaleszenz und der Flokkulation

Ob es zu einer Flokkulation oder Koaleszenz der Tropfen kommt, hängt von einer Reihe von Faktoren ab. Voraussetzung für beide Prozesse ist, dass die Tropfen aufeinander treffen (eine hinreichend große Kollisionsrate), und dass die anziehenden Kräfte die abstoßenden Kräfte überwiegen. Ob es weiterhin zur Koaleszenz kommt, hängt davon ab, ob der Film aus kontinuierlicher Phase (Zwickelflüssigkeit), der sich zwischen den beiden Tropfen befindet, verdrängt wird und es zu einem Aufbruch der Emulgatorgrenzschicht kommt. Unterbleiben diese beiden Vorgänge, kommt es lediglich zu einer Flokkulation. Flokkulation und Koaleszenz können also reduziert werden, indem man die Kollisionsrate reduziert. Sie ist in einer ruhenden Emulsion unter anderem von der Brown'schen Molekularbewegung und der Wanderung im Gravitationsfeld abhängig. Ersteres lässt sich über eine Absenkung der Temperatur und eine Erhöhung der dynamischen Viskosität der kontinuierlichen Phase reduzieren, zweiteres kann über eine Reduzierung der Tropfengröße, der Angleichung der Dichten und auch über eine Erhöhung der dynamischen Viskosität verringert werden (siehe Gleichung 2.7).

Eine Kollision von Tropfen lässt sich nie vollständig unterbinden. Das Verständnis der oben genannten Mechanismen erlaubt es jedoch die Stabilität der Emulsion zu optimieren, indem geeignete Emulgatoren, Stabilisatoren und Homogenisationsprozesse ausgewählt werden.

Auftrennung durch Schwerkraft (Aufrahmung, Sedimentation)

Bei der Aufrahmung (Sedimentation) kommt es zu einer Destabilisierung der Emulsion mittels Gravitation. Sind die Dichten der dispersen und kontinuierlichen Phase unterschiedlich, so greift eine Netto-Gravitationskraft an den Tropfen an. In O/W-Emulsionen besitzt die Ölphase in der Regel die niedrigere Dichte, d.h. die Gravitationskraft ist nach oben gerichtet. Die Öltröpfen wandern an die Oberfläche der Emulsion (Aufrahmung). Dies ist bei O/W-Emulsionen die Regel. Für die Gravitationskraft (F_g) gilt:

$$F_g = \frac{4}{3}\pi r^3 (\rho_d - \rho_k) g \quad (2.5)$$

Wenn der Tropfen durch die kontinuierliche Phase nach oben aufsteigt, so erfährt er eine hydrodynamische Reibungskraft (F_f), die der Aufwärtsbewegung entgegen gerichtet ist [70]. Für die Reibungskraft (F_f) gilt:

$$F_f = 6\pi\eta_k r \nu \quad (2.6)$$

Der Tropfen erreicht eine konstante Geschwindigkeit, wobei die nach oben gerichtete Gravitationskraft von der nach unten gerichteten Reibungskraft kompensiert wird. Es gilt $F_g = F_f$. Kombiniert man die beiden Gleichungen (2.5) und (2.6), so erhält man die Gleichung des Stokes'schen Gesetzes:

$$\nu_{\text{Stokes}} = 2gr^2 \frac{(\rho_d - \rho_k)}{9\eta_k} \quad (2.7)$$

Bei dem Stokes'schen Gesetz werden eine Reihe von Annahmen getroffen, so dass diese Gleichung streng genommen nur auf eine Emulsion mit isolierten sphärischen Tropfen, die sich in einer idealen infiniten Flüssigkeit bewegen, zutrifft. Da das in der Praxis nicht der Fall ist, gibt es eine Reihe von Modifizierungen des Stokes'schen Gesetzes. Drei hier relevante Abweichungen sollen im Folgenden erörtert werden.

Polydispersität Emulsionen enthalten eine Reihe von unterschiedlichen Tropfengrößen, wobei die großen Tropfen schneller aufrahmen als die kleineren. Auf ihrem Weg nach oben stoßen die großen Tropfen mit anderen zusammen. Kommt es zur Aggregation, so wandert das Aggregat aufgrund seines größeren Volumens noch schneller. Eine geringe Polydispersität der Tropfengrößenverteilung reduziert diese Beschleunigung, da der relative Anteil an großen Tropfen gering ist.

Elektrische Ladung Geladene Tropfen neigen dazu, langsamer aufzurahmen als ungeladene Tropfen. Hierfür gibt es zwei Gründe. Abstoßende elektrostatische Kräfte bewirken, dass die Tropfen sich nicht so weit annähern können wie bei ungeladenen

Tropfen. So wird die Aggregation und die damit verbundene Aufrahmung reduziert. Zum zweiten wandern die einen geladenen Tropfen umgebenden Gegenionen langsamer als der Tropfen selber. Es kommt zu einem Ungleichgewicht in den elektrischen Ladungen, das die Bewegung der Tropfen bremst.

Brown'sche Molekularbewegung In der Stokes'schen Gleichung wird weiterhin die Auswirkung der Brown'schen Molekularbewegung auf die Wandergeschwindigkeit der Tropfen nicht berücksichtigt. Die Brown'sche Molekularbewegung ist der Aufrahmung entgegengerichtet und führt zu einer zufälligen Verteilung der Tropfen, da dadurch die Entropie des Systems erhöht wird. Die Brown'sche Molekularbewegung wirkt sich auf das Aufrahmungsverhalten von Emulsionen mit einer Tropfengröße < 100 nm, wie das bei Nanoemulsionen der Fall ist, aus. Das Aufrahmen von Tropfen < 10 nm ist durch die Brown'sche Molekularbewegung fast vollständig unterbunden [70].

Methoden zur Kontrolle der Trennung durch Schwerkraft

Mit Kenntnis der vorausgehenden Mechanismen ist es möglich Methoden zu entwickeln die einer Aufrahmung in einer O/W-Emulsion entgegenwirken. Anhand der Gleichung des Stokes'schen Gesetzes (2.7) lassen sich gut die die Aufrahmung beeinflussenden Größen erklären:

Der Tropfenradius geht zum Quadrat ein, d.h. je kleiner der Tropfen, desto langsamer die Tropfenwanderung im Gravitationsfeld und desto größer der Einfluss der Brown'schen Molekularbewegung. Je kleiner die Dichtedifferenz zwischen der äußeren und der inneren Phase, desto langsamer wandern die Tropfen. Die Höhe der dynamische Viskosität der äußeren Phase wirkt sich linear auf die Wanderungsgeschwindigkeit durch die Erhöhung der Reibungskraft aus. Zusätzlich wirkt der Einsatz von ionischen Emulgatoren dem Aufrahmen entgegen.

Damit sind vier Mechanismen aufgezeigt, die zu einer Reduzierung der Wandergeschwindigkeit im Gravitationsfeld der Tropfen dienen können. Man kann den Emulgierprozess so gestalten, dass die Tropfen maximal zerkleinert werden und damit r einen möglichst geringen Wert annimmt. Zur Angleichung der beiden Dichten werden sogenannte „weighting agents“ eingesetzt. Sie sind in einer O/W-Emulsion öllöslich und erhöhen so die Dichte des Öls. Mit den bei uns zugelassenen weighting agents ist lediglich eine Annäherung, nicht aber eine vollständige Angleichung der Dichten möglich. Der dritte Ansatzpunkt ist die dynamische Viskosität der kontinuierlichen Phase. Wird sie, z.B. durch Zucker oder andere Stabilisatoren erhöht, so wird entsprechend die Wandergeschwindigkeit verringert. Als viertes kann man einen geeigneten Emulgator zur elektrostatischen Stabilisierung wählen.

Ostwaldreifung

Ostwaldreifung ist ein weiterer Prozess, der zur Destabilisierung von Emulsionen führt. Anders als bei der Koaleszenz kommt es nicht zu einer Verschmelzung einzelner Tröpfchen der dispersen Phase, sondern bei der Ostwaldreifung wachsen große Tropfen auf Kosten von kleineren Tropfen an, indem ein Massentransport der Ölmoleküle von kleinen Tropfen zu großen Tropfen durch die umgebende kontinuierliche Phase stattfindet. In den meisten Lebensmittel-emulsionen lässt sich die Ostwaldreifung im Vergleich zur Koaleszenz und zur Aufrahmung vernachlässigen. Nur in O/W-Emulsionen mit sehr kleinen Öltropfen, wie bei der Nanoemulsion, ist dieser Vorgang relevant [70].

Ostwaldreifung tritt auf, da die Löslichkeit der dispersen Ölphase in der kontinuierlichen Wasserphase auch eine Funktion in Abhängigkeit von der Tropfengröße ist. Je kleiner der sphärische Tropfen, desto größer die Löslichkeit des enthaltenen Öls. Diesen Zusammenhang beschreibt die Kelvin Gleichung:

$$S(r) = S(\infty) \exp\left(\frac{2\gamma V_m}{RT r}\right) = S(\infty) \exp(\alpha/r) \quad (2.8)$$

mit

$$\alpha = \frac{2\gamma V_m}{RT}. \quad (2.9)$$

Es lässt sich erkennen, dass eine Abnahme der Tropfengröße r die Löslichkeit $S(r)$ des Öls stark ansteigen lässt.

Dieser Zusammenhang spielt gerade bei Nanoemulsionen aufgrund ihrer kleinen Tropfengrößen eine entscheidende Rolle. Die Zunahme an Löslichkeit bei abnehmender Tropfengröße bedeutet, dass eine höhere Konzentration an Ölmolekülen um kleine Tropfen herum im Vergleich zur Oberfläche der großen Tropfen besteht. Es entsteht ein Konzentrationsgradient und die Ölmoleküle beginnen von hoher Konzentration zur niedriger Konzentration zu wandern. Dieser Prozess lässt die kleinen Tropfen immer kleiner und die großen immer größer werden. Der Radius wächst entlang der Zeit nach folgender Differential-Gleichung an:

$$\frac{\partial}{\partial t} r^3 = \frac{4}{9} \alpha S(\infty) D \quad (2.10)$$

Die Lösung der Differentialgleichung ist gegeben durch

$$r^3 - r_0^3 = \omega t = \frac{4}{9} \alpha S(\infty) D t, \quad (2.11)$$

Die Gleichung bedeutet, dass r^3 linear entlang der Zeit anwächst, wenn Ostwaldreifung vorliegt. Dieser Zusammenhang wird für den Test auf Ostwaldreifung untersucht. Gleichzeitig gilt, dass je höher die Löslichkeit der dispersen Phase in der kontinuierlichen Phase, um so schneller findet dieser Prozess statt. Weiterhin wird bei

der obigen Gleichung davon ausgegangen, dass die Diffusion der gelösten Moleküle von einem Tropfen zum nächsten durch die kontinuierliche Phase der limitierende Schritt für die Wachstumsrate ist.

Methoden zur Beeinflussung der Ostwaldreifung

Kontrolle der Tropfengrößen Die Ostwaldreifung wird beschleunigt, wenn die durchschnittliche Größe der Tropfen abnimmt, da die Löslichkeit der dispersen Phase mit abnehmender Tropfengröße zunimmt (siehe Gleichung (2.8)). Das bedeutet, dass in Emulsionen mit kleinen Tropfen (Nanoemulsionen) die Ostwaldreifung eine größere Rolle spielt.

Der Nachteil von Emulsionen mit großen Tropfen ist jedoch, dass sich so zwar die Ostwaldreifung reduzieren lässt, aber dafür der Aufrahmung und der Koaleszenz Vorschub geleistet wird, was auch zu einer Destabilisierung führt.

Welcher durchschnittliche Tropfenradius am günstigsten für die Stabilität einer Emulsion ist, muss empirisch festgestellt werden.

Löslichkeit Je höher die Löslichkeit der dispersen Phase in der kontinuierlichen, desto größer ist die Ostwaldreifungsrate (siehe Gleichung (2.11)). Daher ist die Ostwaldreifung besonders langsam in O/W-Emulsionen, die Lipide enthalten, die so gut wie gar nicht in Wasser löslich sind.

Grenzflächenmembran Mit zunehmender Grenzflächenspannung steigt auch die Löslichkeit des Öls und damit die Ostwaldreifung an (siehe Gleichung (2.8)). Daher kann Ostwaldreifung verlangsamt werden, wenn ein Emulgator verwendet wird, der signifikant die Oberflächenspannung reduziert.

2.3.5 Nanoemulsionen

Nanoemulsionen

Eine Sonderstellung innerhalb der Emulsionen nehmen die Nanoemulsionen ein [62]. Nanoemulsionen, auch Miniemulsionen oder Submicronemulsionen genannt, sind wässrige Dispersionen relativ stabiler Öltröpfchen, deren Größe zwischen 30 und 500 nm liegt [53]. Aufgrund ihrer geringen Tröpfchengröße erscheinen sie transparent bis opak-durchscheinend und sind relativ stabil gegenüber Sedimentation und Aufrahmung, was sie mit den Mikroemulsionen in diesen Punkten vergleichbar macht. Im Vergleich zu Mikroemulsionen jedoch ist ihr Emulgatorbedarf wesentlich geringer, um das gleiche Volumen an disperser Phase zu stabilisieren [69]. Nanoemulsionen

besitzen eine enge Partikelgrößenverteilung (d.h. geringe Polydispersität) und eine große innere Oberfläche. Die Stabilität solcher Systeme ist extrem hoch, sie sind jedoch nicht thermodynamisch stabil und gehorchen der normalen Thermodynamik von Emulsionen (siehe Gleichung 2.4).

Ihre Herstellung erfolgt üblicherweise in zwei Stufen: In einem ersten Schritt wird die Rohemulsion hergestellt (z. B. in einer Kolloidmühle) und im zweiten Schritt werden im Hochdruckhomogenisator die Tröpfchen weiter zerkleinert [45]. Nanoemulsionen ermöglichen das kolloidale Lösen auch sehr schlecht wasserlöslicher Additive in Wasser bei gleichzeitig hoher Stabilität und optischer Transparenz. Die Bioverfügbarkeit von stabilisierten Additiven nimmt mit abnehmender Tröpfchengröße zu und ist dadurch bei Nanoemulsionen gegenüber Makroemulsionen erhöht [103]. Im Bereich der pharmazeutischen Technologie haben sich Nanoemulsionen zur parenteralen Gabe von wasserunlöslichen Medikamenten bereits etabliert [64]. Die häufigsten Anwendungen der Nanotechnologie sind in der Pharmazie [46], in der Medizin [126, 74, 75, 64] und in der Kosmetik [44]. Zunehmend wird aber auch ihr Einsatz in Lebensmitteln diskutiert [76].

Phospholipid Nanoemulsion mit Limonen

Der Aufbau der hier untersuchten Phospholipid Nanoemulsion ist schematisch in Abbildung 2.10 zu sehen. Das Limonen liegt gelöst in Miglyol in der dispersen Phase vor. Die äußere Phase wird aus einer 70%igen Fruktoselösung gebildet. Lecithin stabilisiert als Emulgator die Grenzflächen. Die mittlere Tropfengröße liegt bei ca. 85 nm. In der Abbildung sind auch die Faktoren, die die Stabilität des Limonens beeinflussen (Sauerstoff, Licht und pH-Wert), zu erkennen.

2.4 Lecithin

Phospholipide, auch Phosphatide genannt, sind phosphorhaltige Lipide und gehören zu den Membranlipiden, die den Hauptbestandteil der Doppellipidschicht einer Biomembran bilden. Allen Phospholipiden gemein ist, dass sie sich aus einem hydrophilen Kopf und zwei hydrophoben Kohlenwasserstoffketten zusammensetzen, dadurch werden sie grenzflächenaktiv und können als Emulgatoren dienen. Sie gehören zu den amphoteren Emulgatoren, deren Wirkmechanismus bereits in Kap. 2.3.2 erläutert wurde. Phospholipide gliedern sich aufgrund ihres chemischen Aufbaus in zwei Gruppen:

- Phosphoglyceride mit Glycerin als Grundgerüst (auch Glycerophospholipide genannt)

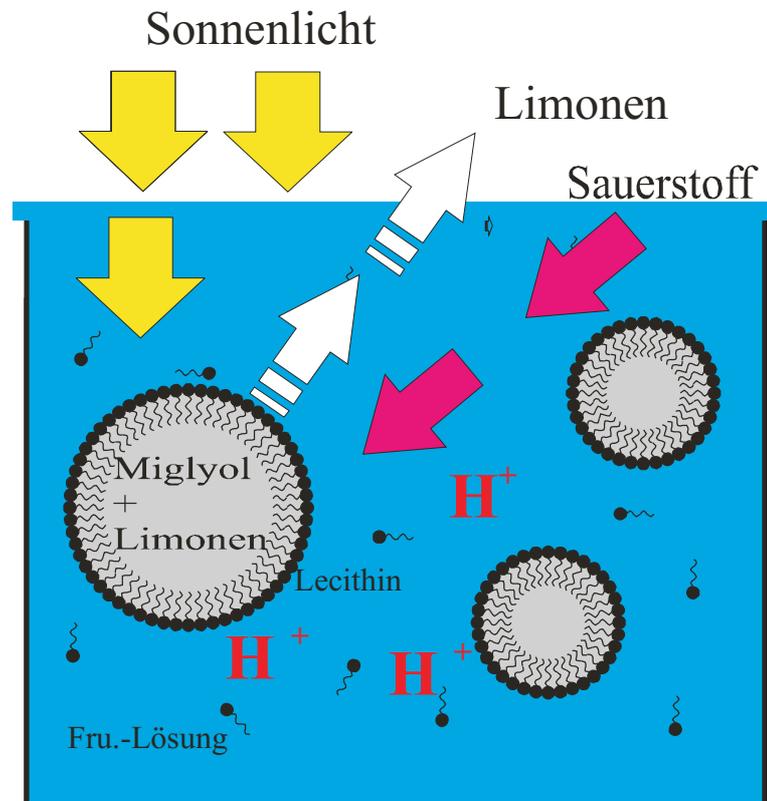


Abbildung 2.10: Schematische Darstellung der Phospholipid Nanoemulsion und ihrer Einflussfaktoren

- Sphingomyeline, die vom Sphingosin abgeleitet sind (Sphingophospholipide)

Die beiden häufigsten Phospholipide in einer Zellmembran sind das Phosphatidylcholin (PC) und das Phosphatidylethanolamin (PE) [18]. Beide bilden auch die Hauptbestandteile des in dieser Arbeit verwendeten Lecithins Lipoid S75. Sie gehören zu den Phosphoglyceriden und sind in Abb. 2.11 und 2.12 dargestellt.

Wegen ihres lipophilen Charakters lassen sich Phospholipide gut mit organischen Lösungsmitteln aus Zellgewebe extrahieren. Der eingedampfte Extrakt, der außer den Phospholipiden noch Fette und andere Lipide enthält, wird als Lecithin bezeichnet [89].

Lebensmittelrechtlich gehört Lecithin zu den Zusatzstoffen und ist damit zulassungspflichtig. Seine Anwendung wird in der Zusatzstoffzulassungsverordnung geregelt [1]. Es ist in der EU für Lebensmittel allgemein (auch für Bio-Produkte) zugelassen. Höchstmengenbeschränkungen bestehen ausschließlich für Säuglingsnahrung. Lecithin wird als Lecithin, Sojalecithin oder E322 auf der Zutatenliste aufgeführt. Als Emulgator oder Trennmittel kommt es vor allem in Brot und Backwaren, Margarine,

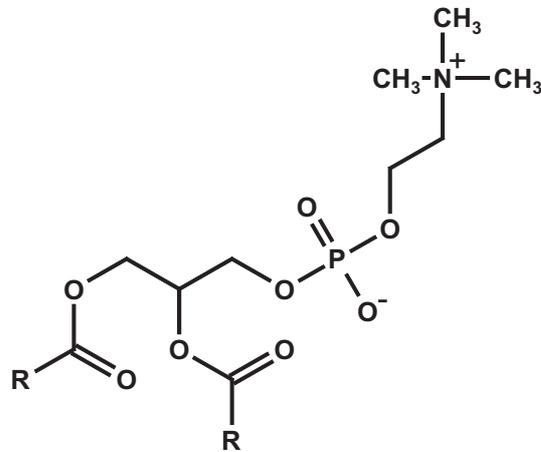


Abbildung 2.11: Strukturformel des Phosphatidylcholins (PC)

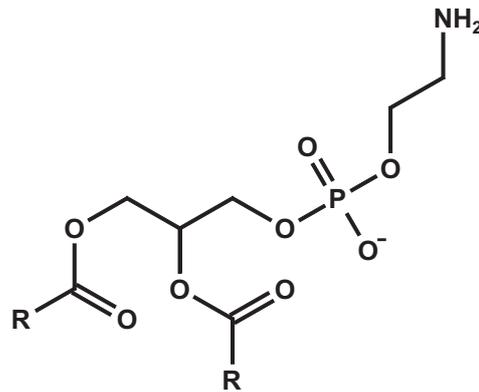


Abbildung 2.12: Strukturformel des Phosphatidylethanolamins (PE)

Schokolade und Schokoladenüberzügen und in Instantgetränken zum Einsatz.

Gewinnung und Aufbereitung des Lecithins

Pro Jahr werden derzeit weltweit ca. 180.000 t Lecithin vorwiegend aus Sojabohnen gewonnen, aber auch die Isolierung aus Eigelb ist möglich. Bei der Gewinnung des Lecithins aus Soja werden als erstes die Sojabohnen aufgebrochen und das Rohöl extrahiert. Das Rohöl, das als Begleitstoff ca. 2% Lecithin enthält, wird mit Wasser erwärmt. Dabei quillt das Lecithin auf und wird mit Separatoren vom Öl abgetrennt. Das so entstandene Rohlecithin besteht in erster Linie aus Phospholipiden, Triglyceriden, Glycolipiden und Kohlenhydraten. Für eine spezialisierte Anwendung von Lecithin kann eine weitere Aufbereitung sinnvoll sein. Durch Entölung werden pulverförmige oder granuliert Lecithine erzeugt, indem das restliche Öl und die frei-

en Fettsäuren entfernt werden. Diese Lecithine sind geschmacksneutral und besitzen verbesserte Emulgierereigenschaften für O/W-Emulsionen. Bei der Fraktionierung wird der Lecithinkomplex in alkohollösliche und alkoholunlösliche Komponenten getrennt. Aus der alkoholischen Fraktion kann durch chromatographische Verfahren eine weitere Fraktionierung bzw. Anreicherung erzielt werden. So können z. B. Lecithine mit hohen Konzentrationen an speziellen Phospholipiden hergestellt werden. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Lipoid S75 handelt es sich um ein Sojalecithin mit einem sehr hohen Gehalt an Phosphatidylcholin (68-73%) und Phosphatidylethanolamin (7-10%). So können spezifische Eigenschaften wie HLB-Wert oder Oberflächenladung gezielt beeinflusst werden und der jeweiligen Anwendung angepasst werden.

Liposomen (Vesikel) und Mizellen

Beim Einsatz von Lecithin in Emulsionen kann es nicht nur zu einer Belegung der Grenzflächen durch die Emulgatormoleküle und so zur Bildung von Emulsionstropfen kommen. Es ist auch möglich, dass die Emulgatormoleküle Assoziations-Kolloide wie Mizellen oder Liposomen ausbilden.

Mizellen sind Aggregate aus amphoteren Emulgatormolekülen, die sich spontan bilden wenn eine bestimmte Konzentration an Emulgator, die sogenannte kritische mizellare Konzentration (CMC), überschritten ist. Liegen sie in der wässrigen Phase vor, richten sich die Emulgatormoleküle so aus, dass ihre lipophilen Enden ins Innere der Mizelle und die hydrophilen nach außen ragen. Es entstehen kugelige Aggregate mit einer Größe von wenigen Nanometern.

Liposomen bilden sich aufgrund der Eigenschaft des Lecithins, Doppelschichten ausbilden zu können. Diese sind in der Lage, sich zu kugelförmigen, sackartigen Strukturen zusammenzuschließen. In ihrem Inneren befindet sich eine wässrige Phase und innerhalb der Doppelschicht lassen sich geringe Mengen an lipophilen Verbindungen lösen. Ihre Größe ist $< 1,0 \mu\text{m}$. Ein Liposom kann aber auch größer sein und von mehreren konzentrischen Lipiddoppelschichten umgeben sein, den sogenannten Multi Lamellar Vesicle (MLV).

2.5 Photonenkorrelationspektroskopie (PCS)

Bestimmung des mittleren Tropfendurchmessers

Tropfen einer O/W-Emulsion mit einem mittleren Tropfendurchmesser $< 100 \text{ nm}$, wie das bei der vorliegenden Nanoemulsion der Fall ist, lassen sich nicht mit herkömmlichen lichtmikroskopischen Messungen darstellen, da die Tropfen klei-

ner sind als die Wellenlänge des sichtbaren Lichtes. Zur Abbildung eignet sich die Gefrierbruch- Elektronenmikroskopie. Eine solche Abbildung gibt wertvolle Informationen über die Emulsion: Sie kann zeigen, ob es sich tatsächlich um Öltröpfchen und nicht um Liposomen oder mizellare Strukturen handelt und welche Tropfengröße das System besitzt. Aufgrund hoher Kosten, aufwändiger Probenvorbereitung und Auswertung kommt die Elektronenmikroskopie jedoch für Routine-Untersuchungen nicht in Frage. Ihre Ergebnisse erlauben jedoch die richtige Methode zu Tropfengrößenbestimmung zu wählen.

In dieser Arbeit erweist sich der Einsatz der Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) als sinnvoll. Bei der Photonenkorrelationsspektroskopie wird die Eigenschaft der Tropfen genutzt, dass sie zwar zu klein sind, um das Licht zu beugen, dass sie aber in der Lage sind, das auftreffende Licht zu streuen (Tyndall-Effekt).

Bei dem hier verwendeten PCS Messsystem wird ein Laserstrahl mit der Wellenlänge 532,6 nm auf die verdünnte Probe in einer Küvette geschickt. Laserlicht besitzt die Eigenschaft nahezu monochromatisch zu sein. Das führt dazu, dass es durch die Streuung des Lichtes an der Oberfläche der Tropfen zur Bildung von Interferenzmustern auf dem Lichtdetektor kommt. Wäre die Probe bis auf den absoluten Nullpunkt bei 0 Kelvin abgekühlt, wären die Tropfen unbeweglich, da keine Brown'sche Molekularbewegung stattfindet. Als Folge wären die Interferenzmuster des Laserlichtes immer statisch. Da die Tropfen sich aber bei 20°C durch die Brown'sche Molekularbewegung mit dem Diffusionskoeffizienten D bewegen, werden durch das gestreute Laserlicht immer andere Interferenzmuster gebildet.

Es kommt zur fluktuierenden Überlagerung von Lichtwellentälern und Lichtwellenhügeln. Das daraus resultierende Lichtsignal wird vom Detektor (einem Photomultiplier) als Intensitätsschwankung wahrgenommen.

Je größer die Tropfen, desto langsamer ihre Bewegung und umso langsamer die Intensitätsschwankungen. Kleine Tropfen fluktuieren schneller, was am Detektor als schnellere Intensitätsschwankungen wahrgenommen wird.

Über eine Autokorrelationsfunktion der gemessenen Intensität lässt sich die Zeitkonstante der Intensitätsänderung und damit der Diffusionskoeffizient D bestimmen. Bei gegebenem D lässt sich der mittlere Tropfendurchmesser berechnen. Es ist im Folgenden der mittlere hydrodynamische Tropfendurchmesser gemeint, wenn von Tropfendurchmesser oder Tropfengröße die Rede ist.

Bestimmung des Zeta-Potenzials

Elektrophoretische Messtechniken sind die wichtigsten Methoden zur Bestimmung des Zeta-Potenzials von Emulsionen.

Ähnlich wie bei der Bestimmung des mittleren Tropfendurchmessers kann das Zeta-Potenzial nur indirekt bestimmt werden [86]. Die Messung erfolgt aus einer Kombination von Elektrophorese und PCS. Beides kann am gleichen Gerät erfolgen, es wird lediglich über zwei Elektroden ein Spannungsfeld in der Küvette mit der Probe erzeugt. Beim Anlegen eines elektrischen Feldes an eine Emulsion mit kolloidalen Tropfen werden die Tropfen in Richtung der entgegengesetzt geladenen Elektrode beschleunigt. Ein stationärer Zustand stellt sich nach einiger Zeit ein, in dem die Tropfen mit konstanter Geschwindigkeit im Kräftegleichgewicht wandern.

Die Wandergeschwindigkeit kann genauso wie die Diffusionsgeschwindigkeit bei der Tropfengrößenbestimmung mittels PCS erfolgen. Mittels Autokorrelation lässt sich das Zeta-Potenzial berechnet [67, 128, 5, 36].

2.6 Hochdruckhomogenisation

2.6.1 Emulgieren und Homogenisieren als verfahrenstechnische Grundoperation

Eine feindisperse Emulsion wird beim konventionellen mechanischen Emulgieren bzw. Homogenisieren durch Zerkleinerung und anschließende Stabilisierung der neu gebildeten Tropfen aus einem Premix (Rohemulsion) hergestellt [116].

Mechanisches Emulgieren umfasst hier die Herstellung feindisperser Emulsionen unter Anwendung von Kräften, die auf die sich bewegenden flüssigen Phasen und auf die Grenzfläche zwischen den Phasen wirken. Die Veränderung am dispersen System ist rein physikalischer Natur durch die Vergrößerung der spezifischen (d.h. der volumenbezogenen) Phasengrenzfläche. Bei allen Systemen laufen Dispergieren und Stabilisieren gleichzeitig ab.

2.6.2 Hochdruck-Verfahren

Feindisperse Emulsionen werden unter Nutzung von Hochdruck-Homogenisatoren hergestellt. Neben der erforderlichen Hochdruckpumpe, die Drücke über 1000 bar erzeugen kann, ist die Geometrie der Homogenisierdüse von entscheidender Bedeutung. Dabei wird zunächst eine Rohemulsion hergestellt, die dann durch die Homogenisierdüse gepresst wird. Die Homogenisierdüsen werden nach der Strömungsführung unterschieden in (siehe Abb. 2.13)

- Radialdiffusoren,
- Gegenstrahldispergatoren,

- Axiale Düsenaggregate

Bei den *Radialdiffusoren*, zu denen auch der hier verwendete Spalthomogenisator mit einem Flachventil gehört, wird die Rohemulsion über eine zentrische Zulauföffnung dem Radialspalt zwischen Ventilsitz und Ventilstempel zugeführt [109]. Dieses Prinzip ist das am weitesten verbreitete System zur Homogenisierung. In der Abbildung 2.13 a) ist der Aufbau einer solchen Homogenisierdüse schematisch dargestellt.

Mit Drücken bis zu 1000 bar wird die Rohemulsion durch diesen radialen Homogenisiererspalt gepumpt. Bei gegebener Durchsatzleistung wird durch die Pumpe der Homogenisieredruck durch die Kraft auf den axial beweglichen Ventilstempel bestimmt. Durch Einstellung der Spalthöhe lässt sich der Druck verändern. Bei kleinerem Spalt wird der Druck und somit die Zerkleinerungswirksamkeit erhöht.

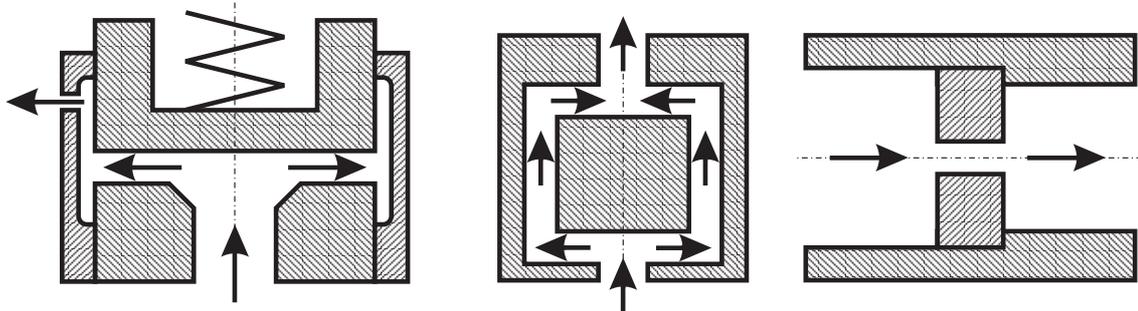
Die Strömungsverhältnisse werden auch durch die Düsengeometrie im Ventil selbst bestimmt. Sie bestimmt den Grad der Turbulenz sowie den Ort und die Höhe des auftretenden Verdichtungsstoßes (wichtig bei der Kavitation, siehe unten). Folglich ist neben dem Druck auch die Geometrie der Homogenisierdüse für das Homogenisationsergebnis (Tropfengrößenverteilung nach der Homogenisation) verantwortlich [109].

Für den Tropfenaufbruch sind hauptsächlich Kavitation und Scherkräfte in turbulenter Strömung verantwortlich. Aber auch der Tropfenaufbruch in laminarer Strömung spielt eine Rolle. Nachteilig kann sich die hohe Produktbeanspruchung aufgrund des Druckgradienten, der Strömungsgeschwindigkeit und der Wärmeentwicklung auswirken. Diese Faktoren sind zu berücksichtigen, wenn Aromen verarbeitet werden sollen.

2.6.3 Zerkleinern und Stabilisieren von Tropfen beim mechanischen Emulgieren

Abbildung 2.14 zeigt schematisch die während des Emulgierens ablaufenden Vorgänge am Beispiel einer O/W-Emulsion [116]. Die großen Öltropfen der Rohemulsion werden in der Dispergierzone des Hochdruckhomogenisators weiter zerkleinert. Dabei entstehen neue Phasengrenzflächen, die durch die Adsorption von Emulgatormolekülen stabilisiert werden. Die Vorgänge beim Emulgieren lassen sich demnach in zwei Schritte unterteilen:

1. Die Tropfendeformation und der Tropfenaufbruch geschehen in Abhängigkeit zur eingetragenen Energie pro Zeit.
2. Die Stabilisierung der neu gebildeten Grenzflächen und das Koaleszieren unzureichend stabilisierter Tropfen findet statt.



a) Radialdiffusoren
Flachventil

b) Gegenstrahl-dispergator
Mikrofluidizer

c) Axiale Düsenaggregate
Blende

Abbildung 2.13: Schematische Darstellung verschiedener Homogenisierdüsen

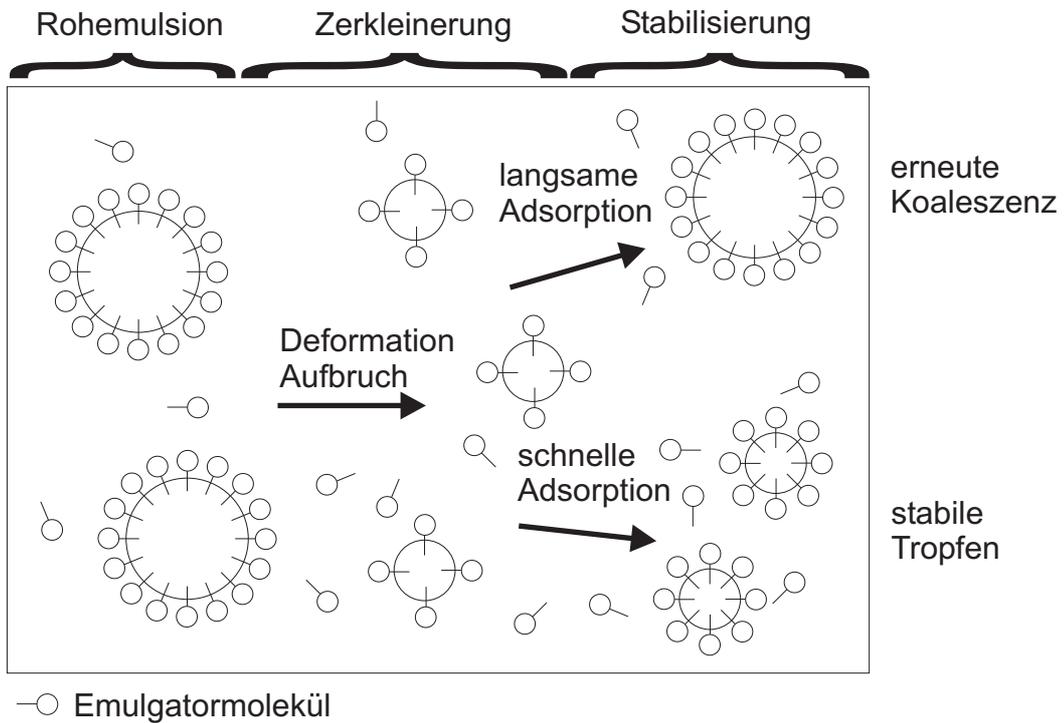


Abbildung 2.14: Vorgänge beim mechanischen Emulgieren dargestellt am Beispiel einer O/W-Emulsion

Damit Tropfen zerkleinert werden können, müssen sie vorher deformiert werden. Es ist dabei notwendig, dass sie solange durch die angreifenden Kräfte deformiert werden, bis sich ein kritischer Deformationszustand einstellt und der Tropfen aufbricht. Diese dazu notwendige Deformationsdauer wird als kritische Deformationszeit ($t_{def,krit}$) bezeichnet. Sie hängt im Wesentlichen von der Viskosität der dispersen Phase, dem Kapillardruck und der angreifenden Spannung ab.

$$t_{def,krit} = \frac{\eta_d p_k}{\delta} \quad (2.12)$$

Der Tropfendeformation wirkt der vorherrschende formerhaltende Kapillardruck p_k entgegen. Für einen kugelförmigen Tropfen mit dem Durchmesser d gilt für den Kapillardruck:

$$p_k = 4\gamma/d \quad (2.13)$$

Je kleiner der Tropfendurchmesser (d), desto höher der Kapillardruck. Ein Maß für das Verhältnis zwischen deformierenden und formerhaltenden Kräften ist die Weber-Zahl (We). Sie ist definiert als Quotient aus der an der Tropfengrenzfläche angreifenden Spannung σ und dem Kapillardruck des undeformierten Tropfens.

$$We = \sigma/p_k = \frac{\sigma d}{4\gamma} \quad (2.14)$$

Die Kräfte, die in Abhängigkeit von den Strömungsverhältnissen bei der Deformation an dem Tropfen angreifen, sind entweder Scherkräfte oder Druckschwankungen, d.h. Trägheitskräfte, die über die äußere Phase auf die Tropfen übertragen werden.

Scherkräfte bewirken Schubspannung, die tangential an die Tropfenoberfläche angreift. Sie können sowohl in laminarer Strömung als auch in turbulenter Strömung auftreten. In turbulenter Strömung können zusätzlich Trägheitskräfte an der Tropfenoberfläche angreifen (siehe Kap. 2.6.3). Trägheitskräfte wirken senkrecht zur Tropfenoberfläche, d.h. sie verursachen eine Normalspannung am Tropfen. Trägheitskräfte entstehen durch lokale Druckschwankungen in der Umgebung des Tropfens. Diese Druckschwankungen treten durch örtlich unterschiedliche Geschwindigkeiten in der turbulenten Strömung auf.

Eine weitere Ursache für die Entstehung lokaler Druckschwankungen kann auch die Kavitation sein (siehe Kap. 2.6.3) [116].

Es lassen sich also zwei Strömungsbereiche für die Tropfenzerkleinerung bei der Hochdruckhomogenisation unterscheiden: Der Tropfenaufbruch kann in laminarer oder in turbulenter Strömung stattfinden. Hinzu kommt noch die Kavitation. Diese Strömungsverhältnisse sollen im Folgenden erläutert werden.

Tropfenzerkleinerung in laminarer Strömung

Bei der laminaren Scherströmung verlaufen die Stromlinien parallel zur Strömungsrichtung, wobei sich die Länge der Geschwindigkeitsvektoren senkrecht zur Scherrichtung verändert. Die Veränderung der Geschwindigkeit v_x senkrecht zur Strömungsrichtung ist dann die Scherrate G . Es gilt:

$$G = dv_x/dy. \quad (2.15)$$

Wie weiter oben angeführt, wirkt die tangentielle Schubspannung τ , die an der Tropfenoberfläche angreift, dem formerhaltenden Kapillardruck entgegen. Daraus leitet sich folgende Weberzahl für die laminare Strömung ab:

$$We_{lam} = \frac{\tau d}{2\gamma}, \quad (2.16)$$

mit $\tau = \eta_k G$ und η_k als dynamischer Viskosität der kontinuierlichen Phase und G als Scherrate. Für die zu erreichende Tropfengröße gilt [109]:

$$d \sim \frac{\gamma We_{lam,krit}}{\eta_k G} \quad (2.17)$$

In einem laminaren Strömungsfeld gibt somit die kritische Weber-Zahl $We_{lam,krit}$ an, welcher Tropfendurchmesser d_{max} bei gegebener Schubspannung nicht mehr zerkleinert werden kann.

$$We_{lam,krit} = \frac{\tau d_{max}}{2\gamma} \quad (2.18)$$

Ist We_{lam} größer als $We_{lam,krit}$ wird der Tropfen weiter zerkleinert; ist We_{lam} kleiner als $We_{lam,krit}$ so wird der Tropfen lediglich deformiert.

Tropfenzerkleinerung in turbulenter Strömung

Über die Deformation und den Tropfenaufbruch in turbulenter Strömung gibt es bisher wenige theoretische und experimentelle Untersuchungen und die dabei ablaufenden Vorgänge sind noch nicht vollständig beschrieben. Es lassen sich jedoch eine Reihe von Zusammenhängen bereits darstellen.

Für den Tropfenaufbruch in turbulenter Strömung lassen sich zwei Fälle unterscheiden, da der Tropfen durch die in turbulenter Strömung entstehenden Wirbel in unterschiedlicher Weise beeinflusst werden kann.

1. Der Tropfendurchmesser ist kleiner als der Wirbel. In diesem Fall wird der Tropfen der Wirbelbewegung folgen. Es wirken Scherkräfte auf den Tropfen.

2. Der Tropfendurchmesser liegt in der gleichen Größenordnung wie der Wirbel. Hier erfährt der Tropfen lokale Druckschwankungen aufgrund der sich ändernden Geschwindigkeit in der Umgebung des Tropfens. Die dabei auftretenden Trägheitskräfte können den Tropfen deformieren und zu seinem Aufbruch führen [116].

Die maximale stabile Tropfengröße kann mit folgender Gleichung abgeschätzt werden [121]:

$$d_{max} \sim \frac{\gamma}{\sqrt{P_v \eta_k}}, \quad (2.19)$$

Analog zur laminaren Strömung lassen sich folgende Zusammenhänge darstellen:

Wenn $We_{turb} > We_{turb,krit}$ und $t_{def} > t_{def,krit}$ dann kommt es zum Tropfenaufbruch, mit

$$We_{turb,krit} = \rho_k (v(d_{max}))^2 d_{max} / \gamma \quad (2.20)$$

Tropfenzerkleinerung durch Kavitation

Unter Kavitation versteht man das Bilden und Kollabieren von Dampfblasen in der Emulsion. Dabei wird der dynamische Druck schlagartig durch die hohe Beschleunigung der Emulsion in der Emulgierereinheit erhöht und dadurch wiederum wird der statische Druck im gleichen Maße reduziert. Fällt der Druck bis unter den Dampfdruck, so entstehen Dampfblasen. Im Anschluss fällt der dynamische Druck aufgrund der fallenden Geschwindigkeit (z. B. nach der Passage durch einen Homogenisationsspalt) schlagartig wieder ab. Der statische Druck erhöht sich und die Tropfen kollabieren. Bei diesen Kollapsvorgängen wird die eigentliche zerkleinerungswirksame Energie freigesetzt.

Bei der Hochdruckhomogenisation in dem hier eingesetzten Spalthomogenisator ist davon auszugehen, dass sowohl beide Strömungsbereiche, als auch die Kavitation relevant sind.

Kapitel 3

Ziel der Arbeit

Der Einsatz von (R)-(+)-Limonen als natürlicher Aromastoff in Lebensmitteln ist für die Lebensmittelindustrie von großer Relevanz, da Zitrusaromen mit zu den populärsten Fruchtaromen beim Verbraucher gehören und in einer Vielzahl von Lebensmitteln zum Einsatz kommen [14, 49, 39]. R-(+)-Limonen kann sehr einfach und in großen Mengen aus Zitruschalenölen gewonnen werden und fällt in großen Mengen bei der Fruchtsaftverarbeitung an. Aufgrund seiner sehr schlechten Wasserlöslichkeit, seiner schwierigen Emulgierbarkeit, seiner hohen Flüchtigkeit und seiner geringen chemischen Stabilität stellen sich bei der Verarbeitung, Lagerung und Anwendung eine Reihe von technologischen Problemen. Diese erschweren nach wie vor den Einsatz von (R)-(+)-Limonen besonders in wässrigen Lebensmitteln [26].

Die Anwendung von (R)-(+)-Limonen in Emulsionen für Getränke machen bisher den Einsatz von Emulgatoren, Stabilisatoren, Konservierungsstoffen und Beschwerungsmitteln (*weighting agents*) notwendig [70, 29, 27].

Das steht im Gegensatz zum Anspruch des Verbrauchers auf möglichst wenige Zusatzstoffe. Außerdem bleiben noch chemische und physikalische Stabilitätsprobleme in den Aromakonzentraten und im fertigen Getränk bestehen [70, 113, 112]. Der Einsatz von sprühgetrockneten Limonenpulvern bietet eine gute physikalische und chemische Stabilität des (R)-(+)-Limonens in Pulverform [71, 107, 20]. Die Nachteile dieses Verfahrens sind jedoch ein aufwendiger Herstellungsprozess, thermische Belastung und Aromaverluste während der Herstellung und Lagerung [66, 19] und ein hoher Einsatz von Kapselmaterial im Verhältnis zur Aromakonzentration [26, 108]. Trotz der guten Pulverstabilitäten können sie Emulsionen nicht vollständig ersetzen, da für bestimmte Lebensmittel und Herstellungsprozesse der Einsatz von flüssigen Aromasystemen sinnvoller ist (z. B. bei Fruchtsaftgetränken und Milchprodukten).

Ziel dieser Arbeit ist es daher eine neue Stabilisierungsform zu finden, die aufgrund guter chemischer und physikalischer Stabilität des (R)-(+)-Limonens während der Lagerung als Aromakonzentrat und in der Verdünnung Vorteile gegenüber bisheri-

gen Applikationsformen bietet. Voraussetzung dabei ist, dass der Einsatz von Zusatzstoffen (Emulgatoren, Stabilisatoren, Konservierungsstoffe und Beschwerungsmittel) minimiert wird und dass alle Inhaltsstoffe natürlichen Ursprungs sind. Der Herstellungsprozess soll dabei einfach und verlustarm sein und eine in der Industrie gut etablierte Prozesstechnik nutzen.

Einen vielversprechenden Ansatz dazu liefert die Nanoemulsionstechnologie. Bei ihr werden Verbindungen in Emulsionen mit mittleren Tropfengrößen kleiner 300 nm dispergiert. In der Regel erfolgt die Herstellung mittels Hochdruckhomogenisation. Eine Sonderform dieser Nanoemulsionen sind die Phospholipid Nanoemulsionen, die Lecithin als Emulgator einsetzen. Diese Emulsionen kommen schon seit den 60er-Jahren in der Pharmazie bei parenteraler Ernährung oder bei der Applikation lipophiler Wirkstoffe zur Anwendung [122, 51]. Sie zeichnen sich durch gute Dispergierbarkeit sensitiver lipophiler Verbindungen bei gleichzeitig hoher physikalischer Stabilität aus [64, 123].

Dieses Wissen hat in der Lebensmitteltechnologie bisher nur unzureichend Eingang gefunden. Untersuchungen zum Einsatz einer Phospholipid-Nanoemulsion zur physikalisch-chemischen Stabilisierung von lipophilen Aromen in wässrigen Lebensmitteln fehlen. Verwandte Arbeiten unterscheiden sich im Emulgator [40], in der Zusammensetzung der dispersen Phase oder in der Tropfengröße. Eine Weiterentwicklung dieser Emulsionen stellt die Phospholipid Nanoemulsion Nanosolve der Fa. Lipoid, Ludwigshafen dar [118]. Neuartig sind ihre noch kleineren Tropfendurchmesser (< 100 nm), ihre Transparenz, die Vermeidung weiterer Zusatzstoffe und der hohe Gehalt an Zucker als Stabilisator in der äußeren Phase, der sie ohne Konservierungsstoffe mikrobiologisch haltbar macht. Diese Phospholipid Nanoemulsion ist in der Literatur noch nicht umfassend charakterisiert und ihr Anwendungspotenzial konnte bisher nur im kosmetischen und pharmazeutischen Bereich gezeigt werden [119, 120].

Aufgrund ihrer neuartigen Eigenschaften und ihrer Zusammensetzung aus Lebensmittelrohstoffen wird sie in dieser Arbeit als vielversprechende Stabilisierungsform für (R)-(+)-Limonen eingesetzt, untersucht und mit anderen Stabilisierungssystemen verglichen.

Die Anwendung dieses neuartigen dispersen Systems macht eine mikroskopische Strukturanalyse zur genauen Definition des Systems notwendig. So lassen sich auch makroskopische Eigenschaften klären und strukturelle Ursachen für ihre chemischen und physikalischen Eigenschaften finden. Dadurch kann ihr Anwendungspotenzial in Lebensmitteln besser eingeschätzt werden.

Für einen wirtschaftlichen und effizienten Einsatz dieser neuartigen Phospholipid-Nanoemulsion in Lebensmitteln ist eine genaue Charakterisierung des Herstellungsprozesses notwendig. Diese erlaubt es, für die Herstellung optimale Prozessparame-

ter festzulegen und steckt ab, welche Veränderungen in der Zusammensetzung der Phasen der Emulsion zu welchen Veränderungen beim Emulgierergebnis führen. So lassen sich Grenzen für eine weiterführende Produktentwicklung zur Anpassung an die Anforderungen der Lebensmittelindustrie abstecken.

Bei der Entwicklung eines neuen Stabilisierungssystems für (R)-(+)-Limonen ist eine wichtige Anforderung, dass dieses System hohe physikalische Stabilität während der Lagerung und nach der Anwendung im Lebensmittel besitzt. Lagertests der Nanoemulsion mit und ohne (R)-(+)-Limonen geben darüber Auskunft und erlauben es zusätzlich relevante Destabilisierungsprozesse (Koaleszenz, Ostwaldreifung und elektrostatische Stabilisierung) zu benennen. Dieses Verständnis ist wichtig, um besser das Potenzial und die Grenzen der Anwendung der Phospholipid Nanoemulsion in Lebensmitteln abschätzen zu können. Neben einer guten Lagerstabilität ist es für eine Aromaemulsion notwendig, dass sie den chemischen und physikalischen Aromaverlust während Produktion, Lagerung und im fertigen Lebensmittel vergleichsweise gering hält. Neben einer zu hohen Flüchtigkeit des Aromas ist gerade der chemische Abbau des empfindlichen (R)-(+)-Limonen von Bedeutung. Er führt nicht nur zu Aromaverlusten sondern gleichzeitig auch zur Bildung einer Reihe von Fehlparmen. Die Vorteile, die dabei eine Phospholipid Nanoemulsion zur Stabilisierung von (R)-(+)-Limonen in Abhängigkeit von Zusammensetzung, Verdünnungsgrad, Licht und Temperatur besitzt, werden durch Bestimmung der Verlustrate bei der Herstellung, der Freisetzungskinetik (Flüchtigkeit) des (R)-(+)-Limonens aus der Emulsion und seinem oxidativen und nicht-oxidativen Abbau im Vergleich zu geeigneten Standards untersucht.

Mit den so gewonnenen Ergebnissen, soll das Potenzial der hier verwendeten Phospholipid Nanoemulsion für seine Anwendung als Aromaemulsion für (R)-(+)-Limonen aufgezeigt werden. Ihre Anwendungsgrenzen sollen abgesteckt und neue Anwendungen bei verwandten Fragestellungen möglich gemacht werden.

Kapitel 4

Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Geräte

Prozesstechnik

Hochdruckhomogenisator, Modell Mini Lab, Typ 8.30 H
APV Gaulin GmbH

(Dankenswerterweise zur Verfügung gestellt durch das Institut der Pharmazeutischen Technologie der Universität Bonn)

Wasserdampfdestillationsapparatur nach DIN 10228 [2], nach DAB 2005 [4]
Glasapparatebau Gebr. Retteberg GmbH, Göttingen

500 ml Rundkolben, mit Kegelschliff und Verbindungsstück

Heizpilz für 500 ml Rundkolben

Heraeus/Wittmann, Heidelberg

Kühlaggregat, Profi Cool Umlaufkühler, UKT 300-1, Arbeitsbereich $-10 - +40^{\circ}\text{C}$

National Lab GmbH, Mölln

Isoliermaterial für die Kühlschläuche (Luftpolsterfolie) und Kühler (Styropor)

Analysengeräte

Photonenkorrelationspektroskop, Zeta Potential Analyser
Brookhaven Instruments Corporation (BIC)

1,5 ml Küvetten für die PCS

Brookhaven Instruments Corporation (BIC)

PCS Standard: Latexkugeln, Durchmesser $96 \pm 3 \text{ nm}$

Brookhaven Instruments Corporation (BIC)

(Dankenswerterweise zur Verfügung gestellt durch das Institut der Pharmazeutischen Technologie der Universität Bonn)

Gaschromatograph, Chem Station 6890 N, mit Flammenionisationsdetektor (FID), mobile Phase: Stickstoff

Agilent Technologies Network GC Systems, Waldbronn

Automatischer Probengeber (Autosampler), Typ COMBI-Pal 122296

CTC Analytics AG, Zwingen, Schweiz

Spritze, 2, 5 ml, Typ Headspace-Syringe SYRC 1002 N CTC

Hamilton, Bonaduz, Schweiz

Spritze für Direktinjektion, 10 μ L SYR N, FN 0,47 (G26s) a/51

ILS, Stützerbach

Probenfläschchen, Typ Headspace-Vials, 10,0 ml Füllvolumen, Klarglas mit Verschlusskappe und Septum

Merck Eurolab

Probenfläschchen zur Direktinjektion, 2,0 ml Füllvolumen, mit Septum und Drehverschluss

Merck. Eurolab

1. Säule INNOWAX 19091N-233, fused Silica Kapillare, 30 m Länge, 0,25 mm Innendurchmesser, 0,5 μ m Filmdicke

Heizbereich: 40-260°C

Agilent Technologies, Waldbronn

2. Säule OPTIMA delta-6, Art. Nr. 726481.30, 30 m Länge, 0,32 mm Innendurchmesser, 0,35 μ m Filmdicke, Heizbereich 100 - 340°C

Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren

Elektronische Präzisionswaagen, Typ PT 120 und Typ PT 2100

Sartorius GmbH Göttingen

Refraktometer, RL 2,

PZO Warschau, Polen

Kugelfallviskosimeter, Typ C

HAAKE Messtechnik GmbH und Co. KG, Karlsruhe

Spektral-Photometer, Lambda 2 UV/MS-Spektral Photometer

Perkin-Elmer, Waltham, Massachusetts (USA)

1,5 ml Küvetten, Plastibrand

Brand GmbH, Wertheim

Sonstige Geräte

Beheizbarer Magnetrührer, Ikamag, RCT

IKA Werke GmbH, Staufen

pH-Meter, Universalmeter Multiline P4
WTW, Weinheim

Heizbad, DC3
HAAKE FISIONS, Karlsruhe

Tiefkühlschrank, -18°C , Privileg Öko
AEG-Electrolux

Kühlschrank, 8°C , Privileg de luxe
AEG-Electrolux

Wärmeschrank, 30°C , Typ FST 420
Heraeus, Hanau

Wärmeschrank, 20°C , dunkel und mit Tageslichtsimulation

Wärmeschrank, 32°C mit Tageslichtsimulation
interner Eigenbau IEL, Universität Bonn

Tageslichtsimulation, Sylvania Terrariumlampe Reptistar 18 W, Vollspektrum, 250 nm - 750 nm, im UVA - und UVB - Bereich, UVA - Anteil bis zu 30%, UVB - Anteil bis zu 5%

Philips Tageslichtlampe Flutone TLD 18 W/965 Deluxe 90, insgesamt 2200 Lux

4.1.2 Chemikalien

Komponenten der Nanoemulsion

Lecithin – Lipoid S75 [65]

Phosphatidylcholin (PC) 68,0 - 73,0%

Phosphatidylethanolamin (PE) 7,0 - 10,0%

Lysophosphatidylcholin (LPC) max. 5,0%

Typische Zusammensetzung der Fettsäuren in % der Gesamtfettsäure

Palmitinsäure 17 - 20%

Stearinsäure 2 - 5%

Ölsäure und Isomere 8 - 12%

Linolsäure 58 - 65%

Linolensäure 4 - 6%

(Dankenswerterweise bereitgestellt durch die *Lipoid GmbH, Ludwigshafen*)

MCT-Fette

Triglyceride mit Fettsäuren mittlerer Kettenlänge werden als MCT-Fette (medium chain triglycerides) bezeichnet. Sie werden durch Hydrolyse aus Kokosöl gewonnen und besitzen gesättigte Fettsäuren mittlerer Kettenlänge. Dabei handelt es sich im

Wesentlichen um Capronsäure (C₆), Caprylsäure (C₈) und Caprinsäure (C₁₀). Aufgrund ihrer gesättigten Fettsäuren sind sie oxidationsstabil und eignen sich daher für den Einsatz in der Nanoemulsion zur Stabilisierung von Limonen [129].

Miglyol (MCT-Öl)

Brechungsindex (20°C)	1,440 – 1,455
Dichte (20°C)	0,96 g/ml
Capronsäure	2,0%
Caprylsäure	57,7%
Caprinsäure	41,4%
Laurinsäure	3,0%
Myristinsäure	1,0%

Synopharm GmbH, Barsbüttel

D-Fruktose

Reinheit	> 99,5%
----------	---------

Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Sonnenblumenöl

Brechungsindex 20°C	1,478
Ölsäure	ca. 23%
Linolsäure	ca. 63%
Palmitinsäure	ca. 6,5%
Stearinsäure	ca. 5%

Hausgold Plus-Vertriebsgesellschaft

Aqua bidestilliert (Aqua bidest.)

Aromen

Alle Aromastoffe wurden bei der *Merck KG, Darmstadt* oder bei *Fluka Chemie AG, Basel, Schweiz* erworben (siehe Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: Auflistung der verwendeten Aromastoffe

Aroma / Summenformel	Siede- punkt [°C]	rel. Dicht [g/ml]	Dampf- druck [hPa]	Wasserlös- lichkeit [mg/kg]	Hersteller
(R)-(+)-Limonen Purum > 94% $C_{10}H_{16}$	178	0,841 (20°C)	2,1 (20°C)	13,8 (20°C)	Merck
(S)-Carvon Purum > 96% $C_{10}H_{14}O$	230	0,96 (20°C)	2,1 (20°C)	unlöslich (20°C)	Fluka
(-)-Carveol Purum > 97% $C_{10}H_{16}O$	226	0,958 (20°C)	(20°C)	unlöslich (20°C)	Fluka
α -Terpineol Purum > 98% $C_{10}H_{18}O$	216	0,935 (20°C)	2,4 (20°C)	unlöslich (20°C)	Merck

Tabelle 4.2: Zusammensetzung der Pufferlösungen von der Merck KG, Darmstadt

pH (20°C)	NaOH [mol·L ⁻¹]	HCl [mol·L ⁻¹]	Weitere Bestandteile [mol·L ⁻¹]
2,0 ± 0,02	0,061	0,069	$C_2H_8O_7$ 0,03
3,0 ± 0,02	0,08	0,06	$C_6H_8O_7$ 0,04
4,0 ± 0,02	0,11	0,044	$C_6H_8O_7$ 0,056
5,0 ± 0,02	0,2		$C_6H_8O_7$ 0,096
6,0 ± 0,02	0,16		$C_6H_8O_7$ 0,06
7,0 ± 0,02	0,041		KH_2PO_4 0,026
8,0 ± 0,02	0,056	0,044	H_3BO_3 0,11

Sonstige Chemikalien

Ethanol, reinst

DAB reinst $\geq 99,8\%$

Merck KG, Darmstadt

Salzsäure, 0,1 molar

Merck KG, Darmstadt

4.1.3 Rezepturen

Rezeptur der Phospholipid Nanoemulsion ohne Limonen

Die Rezeptur der Nanoemulsion basiert auf einer Offenlegungsschrift zur Patentanmeldung der Firma Lipoid GmbH, Ludwigshafen [118]. Die Basisrezeptur ohne Limonen ist in Tabelle 4.3 aufgeführt. Miglyol bildet die innere Phase der O/W-Emulsion und Lecithin ist der amphotere Emulgator in der Grenzfläche.

Rezeptur der Nanoemulsion mit Limonen

Die Rezeptur setzt sich genauso zusammen wie die der Nanoemulsion ohne Limonen (vgl. Rezeptur in Tabelle 4.3), nur werden hier 2,5% Miglyol durch 2,5% Limonen ersetzt. Die Rezeptur wird in Tabelle 4.4 wiedergegeben.

Systemvariationen

Um die Auswirkung einzelner Rezepturbestandteile der Nanoemulsion auf die Flüchtigkeit des Limonens zu untersuchen werden die in Tabelle 4.5 und 4.6 aufgeführten Rezepturen in Abweichung zur Rezeptur mit Limonen Rezeptur (4.4) hergestellt. Bei der Untersuchung der kinetischen Stabilität der Nanoemulsion mit Limonen wird eine Rezeptur mit verdoppelter Limonenkonzentration (5,0%) eingesetzt (siehe Tab. 4.7).

Tabelle 4.3: Rezeptur der Nanoemulsion ohne Limonen (Basisrezeptur)

Inhaltsstoff	Anteil in g	Anteil in %
Fruktose	105	52,5
Aqua bidest.	45	22,5
Lecithin	10	5,0
Miglyol	40	20,0

Tabelle 4.4: Rezeptur der Nanoemulsion mit 2,5% Limonen

Inhaltsstoff	Anteil in g	Anteil in %
Fruktose	105	52,5
Aqua bidest.	45	22,5
Lecithin	10	5,0
Miglyol	35	17,5
(R)-(+)-Limonen	5	2,5

Tabelle 4.5: Rezeptur der Nanoemulsion mit Sonnenblumenöl und 2,5% Limonen

Inhaltsstoff	Anteil in g	Anteil in %
Fruktose	105	52,5
Aqua bidest.	45	22,5
Lecithin	10	5,0
Sonnenblumenöl	35	17,5
(R)-(+)-Limonen	5	2,5

Tabelle 4.6: Rezeptur der Nanoemulsion mit 10% Lecithin und 2,5% Limonen

Inhaltsstoff	Anteil in g	Anteil in %
Fruktose	100	50,0
Aqua bidest.	40	20,0
Lecithin	20	10,0
Miglyol	35	17,5
(R)-(+)-Limonen	5	2,5

Tabelle 4.7: Rezeptur der Nanoemulsion mit 5% Limonen

Inhaltsstoff	Anteil in g	Anteil in %
Fruktose	105	52,50
Aqua bidest.	45	22,5
Lecithin	10	5,0
Miglyol	30	15
(R)-(+)-Limonen	10	5

4.2 Methoden

4.2.1 Herstellung der Phospholipid Nanoemulsion

4.2.1.1 Herstellung der Rohemulsion (Premix)

Die Herstellung der Rohemulsion geschieht für alle Rezepturen gleichermaßen. In einem verschlossenen 500 ml Erlenmeyerkolben wird auf einem beheizbaren Magnetprüher unter ständigem Rühren die Fruktose in Aqua bidest. gelöst. Die Lösung wird dazu auf 70°C erhitzt. Dann wird die Lösung leicht abgekühlt und das Lecithin wird darin dispergiert.

Nach dem Abkühlen dieser Lösung auf Raumtemperatur wird das Miglyol unter Rühren zugegeben. Bei Rezepturen mit Limonen wird dieses vorher in Miglyol gelöst. Die so entstandene Emulsion wird im Folgenden als Rohemulsion oder Premix bezeichnet. Ihre mittlere Tropfengröße beträgt rund 2,4 μm . Sie ist sehr instabil und trennt sich innerhalb von ca. 16 h wieder auf. Es wird jedesmal eine Menge von 200 g angesetzt, da größere oder kleinere Probenmengen sich nicht im Hochdruckhomogenisator verarbeiten lassen.

4.2.1.2 Hochdruckhomogenisation

Unmittelbar vor der Hochdruckhomogenisation wird der Premix, der sich aufgrund einer Standzeit wieder in seine Phasen getrennt hat, erneut auf einem Magnetprüher gemischt. Bei einem Druck von rund 1000 bar wird der Premix für 3 Minuten im Hochdruckhomogenisator homogenisiert. Für die Untersuchungen des Hochdruckhomogenisationsprozesses wird die Homogenisationszeit auf 4 Minuten ausgedehnt.

Dazu wird der Premix im Umlauf kontinuierlich durch den Homogenisationsspalt gepumpt. Die so entstandene Nanoemulsion wird nach abgeschlossener Homogenisation aufgefangen und in Eiswasser abgekühlt um thermische Reaktionen zu minimieren. Die Lagerung der Probe bis zur Untersuchung findet in 500ml Schottflaschen mit Schraubverschluss im Dunkeln bei 8 °C statt.

4.2.2 Rückgewinnung des (R)-(+)-Limonens aus der Nanoemulsion

4.2.2.1 Wasserdampfdestillation

Durch Wasserdampfdestillation können hochsiedende, in Wasser nicht oder nur geringfügig lösliche Verbindungen oder Gemische unterhalb ihrer Siedetemperatur getrennt werden. Dazu wird entweder Wasserdampf durch die Probe geleitet oder —

wie in der vorliegenden Arbeit — die Probe zusammen mit Wasser erhitzt. Da es sich um ein sehr schonendes Verfahren handelt wird es zur Gewinnung von ätherischen Ölen aus pflanzlichem Rohmaterial eingesetzt [14, 77]. Anders als bei einer Extraktion mit organischen Lösungsmitteln kann durch die Wasserdampfdestillation das Limonen auch vom Miglyol getrennt werden, um in reiner Form für die Analysen vorzuliegen. In dieser Arbeit wird die Wasserdampfdestillation für drei Zwecke eingesetzt.

1. Bestimmung des Limonen-Verlustes durch den Herstellungsprozess.
2. Bestimmung des genauen Gehaltes an Limonen in der Nanoemulsion zur Erstellung vergleichbarer Standards mit dem identischen Gehalt an Limonen.
3. Rückgewinnung und Isolierung des Limonens aus der Nanoemulsion für die Analyse.

Der Aufbau der Wasserdampfdestillation erfolgt nach DIN 10228 [2] für die Gewinnung von ätherischen Ölen aus pflanzlichem Material nach DAB 2005 [4]. Der Aufbau wird modifiziert, indem nicht Wasserdampf durch die Probe geleitet wird, sondern die Probe zusammen mit Wasser zum Sieden gebracht wird. Diese Modifizierung ist notwendig, da die hohe Konzentration an Fruktose in der unverdünnten Nanoemulsion die Freisetzung des Limonens behindern würde. Für die Destillation werden 25,0 g Nanoemulsion mit 225,0 g Aqua bidest. in einen 500 ml Rundkolben eingewogen. Für den besseren Aufschluss der Nanoemulsion wird der Destillationsansatz mit 0,1 molarer Salzsäure auf einen pH-Wert von 3,3 - 3,9 eingestellt. Die Destillation erfolgt für 2 Stunden auf Stufe II des Heizpilzes. Die Kühlung des Destillats erfolgt mit einem Kühlaggregat, das auf 6°C eingestellt ist. Der Rückflusskühler und seine Zu- und Ableitungen werden mit Styropor isoliert, um konstante Kühlung zu erzielen. Nach abgeschlossener Destillation wird die Apparatur mit Aqua bidest. gespült, um anhaftende Limonenreste zu gewinnen. Nach 10 Minuten Ablaufzeit in den Scheidebecher wird das Limonen dekantiert und kühl (8°C) und dunkel gelagert.

Bestimmung des Korrekturfaktors

Während der Destillation kommt es zu geringen Limonenverlusten. Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate werden 3 g reines Limonen in 300 ml Aqua bidest. eingewogen und destilliert. Der prozentuale Anteil des Gewichtes des Destillats an der Einwaage ist die Wiederfindungsrate. Daraus ergibt sich nach folgender Gleichung ein Korrekturfaktor K_W von 1,07 :

$$K_W = \frac{m_{\text{Einwaage}}}{m_{\text{Destillat}}}. \quad (4.1)$$

4.2.3 Charakterisierung der Nanoemulsion

4.2.3.1 Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) zur Bestimmung der Tropfengröße und des Zeta-Potenzials

Bei der Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) muss eine Probe folgende Bedingungen erfüllen: Die zu messenden Partikel müssen im Idealfall rund sein, da die PCS nur den hydrodynamischen Durchmesser bestimmen kann. Die Probe muss verdünnt werden bis eine Wechselwirkung (Agglomerate; Phasentrennung) auszuschließen ist und bis sichergestellt ist, dass es nicht zu einer Mehrfachstreuung des Lichtes kommen kann. Es werden die Proben daher solange verdünnt, bis mehrere aufeinander folgende Verdünnungen die gleiche mittlere Tropfengröße aufweisen. Verdünnt man weiter, so reichen die Messsignale nicht mehr für eine Messung aus.

Alle Emulsionen werden mit Aqua bidest. auf 0,015625% Nanoemulsion in der Probe verdünnt. Je Messpunkt wird eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Probe wird in eine PCS Küvette gegeben und in den auf 20°C temperierten Küvetten-schacht der PCS gestellt. Die Messparameter sind in Tabelle 4.8 aufgelistet. Für jeden Messpunkt wird der Mittelwert einer Doppelbestimmung angegeben. Mit einem Standard (Latexkügelchen 96 ± 3 nm) kann die Funktion des Spektrometers überprüft werden. Um den Messfehler bestimmen zu können, werden 10 Nanoemulsionsproben analysiert. Die Ergebnisse sind in Tab. 4.9 zusammengestellt. Daraus ergibt sich ein Messfehler von $\pm 2,2$ nm.

Tabelle 4.8: Einstellungen der PCS: Methode: BIC Particle Sizing

Parameter	Einstellung
Runs pro Messung	4
Anzahl der Proben je Messung	Doppelbestimmung
Verdünnungsmedium	aqua bidest.
Brechungsindex	1,334
Einfallswinkel Laser	90°
Küvettemperatur	20°C
Staubfilter	an
Wellenlänge Laser	532,6 nm
Viskosität der Probe	1,002 cP

Bestimmung des Zeta-Potenzials

Die gleichen Küvetten mit Probe, die zur Bestimmung der mittleren Tropfengröße verwendet werden, werden auch zur Messung des Zeta-Potenzials eingesetzt. Dazu werden von oben zwei Elektroden in die Küvette eingeführt und mit dem Programm *BIC Pals Zeta Potential* analysiert. Die Einstellungen entsprechen denen der Tropfengrößenbestimmung (siehe Tab. 4.8). Es wird je Messpunkt der Mittelwert einer Doppelbestimmung angegeben. Der Messfehler der Zeta-Potenzial Bestimmung wird ermittelt und beträgt $\pm 2,4$ mV. Die Messung des Zeta-Potenzials mittels PCS ist eine sehr sensible Messmethode, da bereits geringe Mengen an Ionen im Aqua bidest. oder im Probenbehälter zur Veränderung der Oberflächenladung führen können. Die Leitfähigkeit des aqua bidest. wurde daher vor jeder Messung untersucht und entsprach der für aqua bidest. vorgeschriebenen Leitfähigkeit von $< 10\mu\text{S}/\text{cm}$.

4.2.3.2 Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)

Zur Aufklärung der mikroskopischen Struktur der Nanoemulsion (ohne Limonen) wird eine Aufnahme mit Hilfe der Transmissions-Elektronenmikroskopie von der Lipoid GmbH, Ludwigshafen, in Auftrag gegeben und diesem Projekt zur Verfügung gestellt (*Freeze Fracture Services, Germering*). Die Vorgehensweise wird im Prüfprotokoll wie folgt wiedergegeben [16]:

„Dabei werden die Proben auf Goldobjektträgern (Sandwich-Träger) nach der Standard Gefriermethode eingefroren. Dazu wird der Objekt-

Tabelle 4.9: Bestimmung des Messfehlers der Tropfengröße durch PCS

Messung	hydrodynamischer Durchmesser [nm]
1	88,9
2	88,8
3	93,8
4	93,6
5	95,9
6	92,5
7	91,4
8	90,1
9	91,3
10	90,8
Mittelwert	91,7
Standardabweichung	2,2

träger in flüssiges Propan getaucht, das in einem Dewar auf der Temperatur von flüssigem Stickstoff gehalten wird. Nach dem Transfer in die Gefrierätzeinheit (auch diese wird mit flüssigem Stickstoff gekühlt) wird der Sandwich-Objektträger aufgebrochen. Direkt nach dem Aufbruch, durch das ein Oberflächenrelief der Probe entsteht, erfolgt die Beschattung mit Schwermetall zur Herstellung eines Oberflächenabdruckes der Probe. Folgende Beschattungsbedingungen wurden verwendet: 1,5 nm Pt/C und 8 nm C. Die Schichtdickenbestimmung erfolgt mit Hilfe eines Schwingquartzes. Nach dem Reinigen des Metall-Replikats wird es in einem Elektronenmikroskop mit einer Beschleunigungsspannung von 100 kV untersucht.“

4.2.3.3 Bestimmung des relativen Brechungsindex

Um Aussagen über die optischen Eigenschaften der Nanoemulsion machen zu können, ist es notwendig das Verhältnis der Brechungsindices der inneren und äußeren Phase zu bestimmen. Zu diesem Zweck werden Fruktoselösungen mit 20,0%, 40,0%, 50,0% und 70% Fruktose in Aqua bidest. angesetzt. Bei 20°C wird von ihnen und von Miglyol mit dem Refraktometer der Brechungsindex bestimmt.

4.2.3.4 Bestimmung des Absorptionskoeffizientens

Zur Bestimmung des Absorptionskoeffizienten der Nanoemulsion in Abhängigkeit von der Fruktosekonzentration werden nach Rezeptur 4.3 Nanoemulsionen mit unterschiedlichen Fruktosekonzentrationen in der kontinuierlichen Phase (20,0%, 40,0%, 50,0% und 70,0% Fruktose) hergestellt. Die Absorption der Proben wird bei 20°C bei 400 nm im Vergleich zur Nullprobe (Aqua bidest.) bestimmt. Die gemessene Absorption A_λ wird aus der transmittierten Lichtintensität I und der Eingangslichtintensität I_0 wie folgt berechnet:

$$A_\lambda = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right) \quad (4.2)$$

4.2.3.5 Bestimmung der dynamischen Viskosität

Die dynamische Viskositäten der Komponenten der Nanoemulsion werden in einem Kugel-Fall-Viskosimeter der Firma Haake Mess-Technik in Abhängigkeit von der Temperatur bestimmt. Die Messung erfolgt nach der DGF-Einheitmethode H-II 4 (92) [78]. Die Temperierung der Proben erfolgt mit Hilfe eines Temperierbades, Haake Fisons DC 3. In Abhängigkeit von der dynamischen Viskosität der Probe kommen die Kugeln aus Tabelle 4.10 zum Einsatz.

4.2.3.6 Bestimmung des Einflusses des pH-Wertes auf das Zeta-Potenzial

Um den Zusammenhang zwischen pH-Wert und Zeta-Potenzial zu untersuchen, werden von der unverdünnten Nanoemulsion (Rezeptur in Tabelle 4.3) Proben in verschiedenen Puffern angesetzt (siehe Tabelle 4.2). Dazu werden die Emulsionen gemäß der Verdünnungsvorschrift der PCS (siehe Methode 4.2.3.1) statt mit Aqua bidest. mit den jeweiligen Pufferlösungen verdünnt und analysiert.

4.2.4 Methoden zur Analyse des (R)-(+)-Limonens

4.2.4.1 Gaschromatographie

Die Gaschromatographie (GC) ist ein physikalisches Trennverfahren zur quantitativen und qualitativen Analyse von gasförmig vorliegenden Verbindungen oder von Verbindungen, die sich verdampfen lassen. Die Trennung der Komponenten erfolgt durch die wiederholte Verteilung der Verbindungen auf zwei nicht mischbare Phasen. Die eine Phase ist unbeweglich (stationär) und befindet sich im Inneren der Säule. Die andere Phase ist beweglich, d.h. mobil und wird durch das Trägergas gebildet. Der Transport der Verbindung durch die Säule erfolgt mit einem inerten Trägergas. Die Trennung erfolgt durch adsorptive und desorptive Vorgänge zwischen den analysierten Verbindungen und der stationären Phase. Es stellen sich für die einzelnen Verbindungen unterschiedliche Gleichgewichte zwischen stationärer und mobiler Phase ein. So kommt es zu einer Auftrennung des Gemisches.

Bei den vorliegenden Analysen wird Stickstoff als mobile Phase verwendet. Die Analyse der Verbindungen erfolgt in dieser Arbeit mit einem Flammenionisationsdetektor (FID) und einem Datenprozessor. Die elektrischen Impulse des Detektors werden an den Prozessor weitergegeben, wo sie in die Form eines Chromatogramms umgerechnet werden. Die analysierten Verbindungen können qualitativ bestimmt werden,

Tabelle 4.10: Benutzte Kugeln für das Viskosimeter

Kugel Nr.	Werkstoff	Dichte ρ [g·cm ⁻³]	Durchmesser [mm]	Kugelkonstante K [mPas·cm ³ ·g ⁻¹ ·s ⁻¹]	Empfohlener Messbereich [mPa·s]
1	Borosilikat	2,2	15,81	0,007	0,2 – 2,5
2	Borosilikat	2,4	15,66	0,05	2,0 – 20
3	Vacodil 42	8,1	15,62	0,07	15 – 200

indem ihre Retentionszeit mit geeigneten Standards verglichen wird. Die Fläche der Peaks erlaubt über lineare Regression eine quantitative Bestimmung der Verbindungen [102].

Die Headspace Gaschromatographie (*Headspace GC*) ist eine Sonderform der Gaschromatographie. Hierbei werden flüchtige Verbindungen mit einer gasdichten Spritze direkt aus dem Kopfraum (*Headspace*) über einer Probe entnommen, um die genaue Konzentration der analysierten Verbindung im Gasraum bestimmen zu können. Die Probe wird vorher bei konstanten Bedingungen so lange temperiert, bis sich das dynamische Gleichgewicht für die Verbindung eingestellt hat (siehe Theorie 2.1.2) [81]. Sie eignet sich in dieser Form zur Ermittlung der Freisetzungskinetik (Flüchtigkeit) von Aromastoffen.

4.2.4.2 Bestimmung der Flüchtigkeit von (R)-(+)-Limonen

Um das Temperaturverhalten der Flüchtigkeit des Limonens in der Nanoemulsion im Vergleich zum Standard zu untersuchen, werden die Nanoemulsion (Rezeptur 4.4) und die Standardproben auf die Temperaturen 7°C, 24°C, und 60°C temperiert, bis sich nach 5,5 h das dynamische Gleichgewicht einstellt. Diese Messung wird auch für die Flüchtigkeit von Limonen aus den beiden Systemvariationen mit Sonnenblumenöl (siehe Tabelle 4.5) und mit doppelter Lecithinkonzentration (siehe Tabelle 4.6) bei 60°C eingesetzt, um zu untersuchen, wie sich diese beiden Phasen auf die Flüchtigkeit auswirken. Aus der Konzentration an Limonen im Kopfraum und der verbleibenden Konzentration an Limonen in der Emulsion lässt sich der relative Verteilungskoeffizient bestimmen (siehe Theorie 2.1.2). Die Konzentration an Limonen im Kopfraum der Probe zur Bestimmung der Flüchtigkeit wird mit der Headspace Gaschromatographie durchgeführt.

Anhand des mit Wasserdampfdestillation bestimmten Gehaltes der Nanoemulsionen an Limonen wird der Standard mit genau gleichem Gehalt an Limonen hergestellt. Als Standard dient eine Limonen-Wasser-Ethanol-Lösung (siehe Tab. 4.11). Um eine Temperaturabhängigkeit der Freisetzung zu untersuchen, werden die Nanoemulsion mit Limonen und der Standard (je 1,0 ml) bei 7°C, 24°C, und 60°C in 10 ml Pro-

Tabelle 4.11: Zusammensetzung der Standardlösung für die Headspace Gaschromatographie

Bestandteil	Gewicht
Ethanol	97,99 g
Aqua bidest.	30,00 g
Limonen	7,50 g

benfläschchen eingefüllt und temperiert bis das dynamische Gleichgewicht erreicht ist und der Dampfdruck konstant bleibt. Diese Temperierzeit wird anhand der Freisetzungskinetik des Limonens aus der Emulsion bestimmt (siehe Abb. 4.1).

Dann wird mit Hilfe des automatischen Probengebers mit einer luftdichten Spritze je 1,0 ml der Gasphase aus dem Kopfraum der Probe entnommen und zur Analyse in den Gaschromatographen injiziert. Die Einstellungen des Gaschromatographen sind in Tab. 4.12 und 4.13 zusammengefasst. Es werden zwei Säulen verwendet. Die Innowax-Säule wird später durch die Optima-Säule ersetzt, um die Messung noch zu optimieren.

Für jede Messung werden 5 Proben analysiert. Die qualitative Analyse erfolgt durch den Vergleich ihrer Retentionszeit mit der Retentionszeit eines geeigneten Standards.

Erstellung der Regressionsgeraden

Zur quantitativen Kalibrierung der gaschromatographischen Analyse wird ein externer Standard erstellt. Je Säule (INNOWAX und OPTIMA) werden Standardlösungen mit definierten Konzentrationen an Limonen in Ethanol gelöst und gaschroma-

Tabelle 4.12: Einstellung des Gaschromatographen für die Headspace Analyse

Parameter	Einstellung
Injektionstemperatur	200°C
Säulentemperatur	200°C
Trägergasfluss	0,4 ml/min
Detektor/Detektortemperatur	FID / 250°C
Trägergas	Stickstoff
Laufzeit der Analyse	4,2 min
Ausheizzeit	4,0 min
Ausheiztemperatur	250°C

Tabelle 4.13: Einstellung des Autosamplers für die Headspace Analyse

Parameter	Einstellung
Temperatur der Spritze	100°C
Injektionsvolumen	1,0 ml
Injektionsgeschwindigkeit	1,0 ml/s
Split	Ohne Split
Füllgeschwindigkeit	1 ml/s

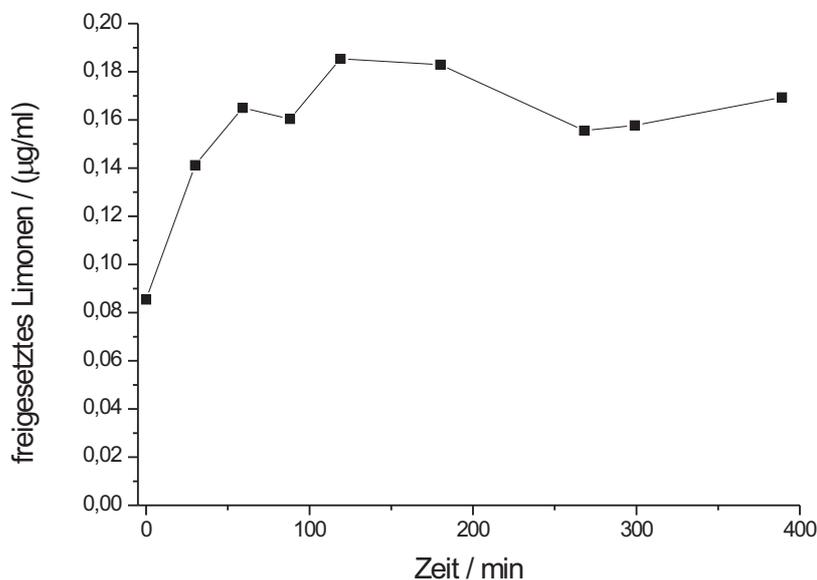


Abbildung 4.1: Limonenfreisetzungskinetik in der Nanoemulsion mit 2,5% Limonen bei 7°C

tographisch analysiert. Je Konzentration wird eine Dreifachbestimmung gemacht. Die für die Standardlösungen gewählten Limonenkonzentrationen decken dabei die Schwankungsbreite der Konzentration an Limonen in den Proben ab. Für die Optima-Säule ergibt sich ein Regressionskoeffizient von 0,99 und für die Innowax-Säule ein Regressionskoeffizient von 0,99. Die Zuordnung der gemessenen Peakflächen zu den entsprechenden Konzentrationen erfolgt über lineare Regression. Abbildung 8.1 zeigt ein solches charakteristisches Chromatogramm der hier durchgeführten Head-Space Analyse.

Die Proben für die Kalibrierung werden gaschromatographisch über Direktinjekti-

Tabelle 4.14: Einstellung des Autosamplers bei Direktinjektion

Parameter	Einstellung
Injektionsvolumen	1,0 µl
Injektionsgeschwindigkeit	0,5 µl/s
Füllgeschwindigkeit der Spritze	1,0 µl/s
Split	Ohne Split

on auf die Säule gegeben [81]. Die Analyse erfolgt mit gleichen Einstellungen des Gaschromatographen wie bei der Analyse der Proben (siehe Tab. 4.12). Nur der Autosampler wird in Abweichung dazu wie in Tabelle 4.14 aufgeführt eingestellt.

4.2.4.3 Bestimmung des (R)-(+)-Limonengehaltes und seiner Abbauprodukte

Um die chemische Haltbarkeit von Limonen in der Nanoemulsion in Abhängigkeit von Zeit, Temperatur, Verdünnungsgrad und Lichtverhältnissen zu untersuchen, wird nach der Rezeptur in Tabelle 4.4 eine Nanoemulsion mit 2,5% Limonen hergestellt und zusammen mit ihrer Verdünnung und dem Standard unter den in Tabelle 4.15 wiedergegebenen Bedingungen eingelagert. Die hier gewählten Lagerbedingungen orientieren sich an der Untersuchung von W. Pfannhauser, H. Rauscher und A. Thaller [90], die unter den gleichen Bedingungen den Abbau von Limonen und die Bildung von Carveol, Terpeneol und Carvon in Orangenlimonaden untersucht haben. Dazu werden je Probe mit unverdünnter Nanoemulsion (Konzentrat) 25,0 g Probe in transparente Probenfläschchen (Füllvolumen 100 ml) aus Glas mit Septum und Schraubverschluss eingewogen und eingelagert. Um die Auswirkung des Verdünnungsgrades der Nanoemulsion auf die chemische Stabilität des Limonens zu untersuchen, wird mit sterilem Aqua bidest. die Nanoemulsion 1:10 verdünnt (25,0 g Nanoemulsion + 225 g Aqua bidest.) und in transparente Gläser (Füllvolumen 400 ml) mit Twist-off Deckel eingelagert. Zur Erstellung des Standards wird mit Wasserdampfdestillation (siehe Methode 4.2.2.1) der genaue Gehalt an Limonen in der Nanoemulsion bestimmt. Der Standard besteht aus unverdünntem Limonen. Er enthält die gleiche Menge an Limonen wie die Nanoemulsionsproben (0,625 g Limonen). Er wird in transparente Probenfläschchen (Füllvolumen 100 ml) aus Glas mit Septum und Schraubverschluss eingelagert. Die Proben werden am Tag der Einlagerung und dann in einem 14-tägigen Rhythmus für einen Zeitraum von 35 bzw. 91 Tagen analysiert. Dabei wird der Limonenabbau in Standard, Konzentrat und Verdünnung bestimmt. Die Abbauprodukte Terpeneol, Carvon und Carveol werden

Tabelle 4.15: Bedingungen für die Lagertests zur Untersuchung der Limonenabbauprodukte

Temperatur	Lichtverhältnisse
8°C	dunkel
20°C	dunkel
20°C	Tageslichtsimulation (hell)
32°C	Tageslichtsimulation (hell)

in Standard und Konzentrat bestimmt. Das Limonen aus den Nanoemulsionsproben muss vor der gaschromatographischen Analyse erst wieder aus den Emulsionsproben isoliert werden. Dies geschieht mittels Wasserdampfdestillation (siehe Methode 4.2.2.1).

Zur Analyse der Destillate und des Standards werden diese in GC Direktinjektionsfläschchen (Füllvolumen 2 ml) im Verhältnis 1:10 mit Ethanol, reinst, verdünnt, mit Septum und Drehverschluss verschlossen und mit dem Programm in Tabelle 4.16 analysiert.

Vor der Injektion der Probe wird die Spritze (10 μ l) jeweils zweimal mit Ethanol und anschließend mit Analysenprobe gespült. Zur genauen Zuordnung der Retentionszeiten des R(+) Limonens und der Abbauprodukte sowie zur Kalibrierung der Analyse werden Messungen mit den reinen Substanzen durchgeführt und so die jeweiligen Retentionszeiten sowie die Regressionsgeraden erhalten (siehe oben). Der Regressionskoeffizient dieser Messung beträgt 0,99 für Limonen, 0,997 für Terpeneol, 0,998 für Carveol und 0,995 für Carvon. Abbildung 8.2 zeigt ein solches Charakteristisches Chromatogramm der hier durchgeführten Messungen.

4.2.5 Lagertests

4.2.5.1 Lagertest der Nanoemulsion ohne (R)-(+)-Limonen

Um das Lagerverhalten der Nanoemulsion ohne Limonen in Abhängigkeit von Temperatur und Verdünnungsgrad zu charakterisieren, wird eine Nanoemulsion hergestellt (siehe Rezeptur in Tabelle 4.3) und in verschiedenen Verdünnungsstufen mit Aqua bidest. angesetzt. Die Verdünnungsstufen für die Nanoemulsion sind:

Tabelle 4.16: Einstellungen des Gaschromatographen bei Direktinjektion

Parameter	Einstellung
Einlasstemperatur	160°C
Injektionsvolumen	1,0 μ l
Trägergasdruck	0,649 bar
Trägergasfluss	1,3 ml/min
Injektionsart/Split	100:1
Trennsäule	Optima Delta-6
Temperaturprogramm	Heizrate 8°C/min bis 192°C
Trägergas	Stickstoff
Ausheizen	300°C/10 min

1. unverdünnt
2. 4,0% Nanoemulsion
3. 0,5% Nanoemulsion

Sie werden bei folgenden Temperaturen dunkel eingelagert:

1. -18°C (Gefrierschrank)
2. 8°C (Kühlschrank)
3. 30°C (Wärmeschrank, Heraeus, Typ FST 420)

Je Messreihe werden 100,0 g der Probe in einer verschlossenen 200 ml Schottflasche angesetzt. Die Ausnahme bildet die Lagerung bei -18°C . Hier wird je Messpunkt 1,0 g der Probe in einem 1,5 ml Eppendorf-Cap angesetzt um wiederholtes Auftauen und Gefrieren zu vermeiden. Mittlerer Tropfendurchmesser und Zeta-Potenzial werden mittels PCS (siehe 4.2.3.1) bestimmt.

Der Lagertest wird bei -18°C und 8°C für 331 Tage und bei 30°C über 113 Tage geführt.

4.2.5.2 Lagertest der Nanoemulsion mit (R)-(+)-Limonen

Um die Auswirkung des Limonens auf die Stabilität der unverdünnten Nanoemulsion zu untersuchen, wird zum einen die Rezeptur der Nanoemulsion mit Limonen (siehe Tabelle 4.4) und eine Nanoemulsion mit doppelter Menge an Limonen hergestellt (siehe Tab. 4.7). Beide Proben werden unter den gleichen Lagerbedingungen wie die Nanoemulsion ohne Limonen (siehe 4.2.5.1) eingelagert und untersucht. Je Messreihe werden 100 g der Probe in einer verschlossenen 200 ml Schottflasche angesetzt. Die Ausnahme bildet die Lagerung bei -18°C . Hier wird je Messpunkt 1,0 g der Probe in einem 1,5 ml Eppendorf-Cap angesetzt um wiederholtes Auftauen und Gefrieren zu vermeiden. Die Lagerdauer bei diesem Versuch beträgt 97 Tage. Im Abstand von 2 – 4 Wochen werden mittlere Tropfengröße und Zeta-Potenzial (siehe Methode 4.2.3.1) bestimmt.

Kapitel 5

Ergebnisse

5.1 Physikalische Charakterisierung der Phospholipid Nanoemulsion

Elektronenmikroskopische Abbildung

Für einen gezielten Einsatz eines neuartigen dispersen Systems in Lebensmittel, ist es eine Grundvoraussetzung, die genaue mikroskopische Struktur des Systems zu definieren und einordnen zu können.

Eine geeignete Abbildungsmethode für Nanostrukturen ist die Transmissions-Elektronenmikroskopie. In Abbildung 5.1 ist eine solche Aufnahme des hier untersuchten dispersen Systems ohne Limonen unmittelbar nach der Hochdruckhomogenisation abgebildet. Die Aufnahme der Probe zeigt gleichmäßig verteilte runde Partikel, deren Größenverteilung in einem Bereich von 30 bis 80 nm liegt. Die glatten Oberflächenbrüche sind denen liposomaler Partikel ähnlich. Partikel mit nur leicht angebrochenen Oberflächen lassen keinen eindeutigen Schluss auf Liposomen zu. Deutlicher gebrochene Objekte, genauso wie die vollständig durchbrochenen, weisen unregelmäßige Bruchflächen auf und zeigen nicht die typisch lamellare Zwiebelstruktur, wie sie bei gebrochenen multilamellaren Vesikeln (Liposomen) auftreten. Deshalb handelt es sich bei den runden Strukturen um sehr kleine Öltröpfchen in einer Zucker-Matrix.

Eindeutige großflächige multilamellare Emulgatorstrukturen wurden in dieser Probe nicht gefunden. Die Probe lässt sich als Nanoemulsion mit vereinzelt einfachen liposomalen Strukturen definieren [16].



Abbildung 5.1: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Nanoemulsion, mittels Gefrierbruchtechnik

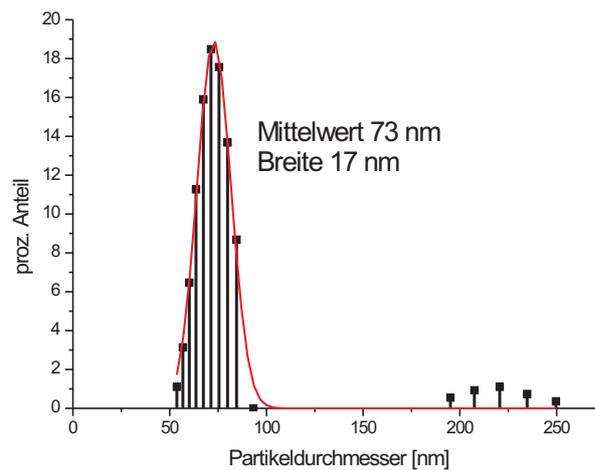


Abbildung 5.2: Tropfengrößenverteilung der Nanoemulsion ohne Limonen, gemessen mit der Photonenkorrelationspektroskopie

Tropfengrößenverteilung in der Nanoemulsion

Da die Messung der Tropfengrößenverteilung der Nanoemulsion unverzichtbar für eine Einschätzung der Lagerstabilität der Emulsion ist, wurde sie mittels PCS unmittelbar nach der Hochdruckhomogenisation gemessen. Abbildung 5.2 zeigt eine solche charakteristische Verteilung der Tropfengrößen. Auffällig ist, dass die Verteilung bimodal ist. Zwei voneinander getrennte Verteilungen sind zu erkennen. Die eine Verteilung besitzt Tropfengrößen < 100 nm mit einem Mittelwert von 73 nm

und einer Breite der Verteilung von 17 nm, die andere Verteilung macht den viel geringeren Teil an Tropfen aus und besitzt Tropfengrößen von 195 bis 250 nm. Die linke Verteilung ist nahezu monodispers. Anders ist es bei der rechten Verteilung. Sie ist aufgrund ihrer großen Verteilungsbreite polydispers.

Optische Eigenschaften

Bei einer Verarbeitung der Nanoemulsion in flüssigen Lebensmitteln ist es von Vorteil, wenn im Vorfeld Aussagen über mögliche Veränderungen der optischen Eigenschaften des Lebensmittels getroffen werden können. Eine Färbung oder Trübung des Lebensmittels durch die Emulsion kann gewollt oder unerwünscht sein. Daher ist es notwendig die optischen Eigenschaften der Nanoemulsion zu untersuchen. Dazu wurde eine Nanoemulsion (Rezeptur in Tabelle 4.3) in unverdünnter und in verdünnter Form (0,5%, 4,0% und 10,0% Nanoemulsion mit Aqua bidest. verdünnt) aufgenommen. In Abbildung 5.3 ist die Nanoemulsion unmittelbar nach der Hochdruckhomogenisation in unverdünnter Form abgebildet. Durch die Hochdruckhomogenisation wird aus einer trüben, aufgrund des Lecithins bräunlichen Rohemulsion (Premix), eine gold-braune transparente Nanoemulsion.

Die optischen Eigenschaften der Nanoemulsion verdünnt in Wasser hängen stark vom Verdünnungsgrad ab. In Abbildung 5.4 wird dieser Zusammenhang deutlich. Mit steigendem Emulsionsanteil kommt es zu einer leichten Trübung.



Abbildung 5.3: Phospholipid Nanoemulsion nach der Hochdruckhomogenisation



Abbildung 5.4: Nanoemulsion verdünnt mit Wasser mit steigendem Emulsionsanteil (v.l.n.r.: 0,5%, 4,0% und 10,0% Nanoemulsion)

5.2 Physikalische Charakterisierung des Herstellungsprozesses

Um für den Hochdruckhomogenisationsprozess optimale Prozessparameter zu finden, ist es notwendig verschiedene Parameter wie Homogenisationsdauer und Temperaturverlauf während der Homogenisation zu betrachten. Als Beurteilungskriterium wurde die Güte des Emulgierergebnisses, d.h. der mittlere hydrodynamische Tropfendurchmesser der Emulsion nach der Hochdruckhomogenisation gewählt. Ziel ist es dabei, möglichst kleine Tropfendurchmesser (< 100 nm) zu erzielen um eine gute Lagerstabilität und Dispergierbarkeit der Emulsion zu erreichen, ohne eine zu hohe thermische Produktbeanspruchung in Kauf zu nehmen. Zur Untersuchung des Homogenisationsprozesses und der Emulsion wurden während und nach der Hochdruckhomogenisation folgende Untersuchungen mit einer Emulsion ohne Limonen (siehe Rezeptur 4.3) durchgeführt:

- 1. Entwicklung der Tropfengrößen** Bei dem Ziel Tropfengrößen < 100 nm bei gleichzeitig geringem Energieeintrag zu erhalten, ist es notwendig zu untersuchen, wie sich die Tropfengrößen während der Homogenisation verhalten. Dazu wurden aus dem Homogenisator während laufender Homogenisation Proben entnommen und mittels PCS der mittlere Tropfendurchmesser bestimmt (Methode 4.2.3.1). In Abbildung 5.5 wird deutlich, dass die Tropfengröße zu Beginn der Homogenisation stark abfällt, um dann nach ca. 150 Sekunden ihren niedrigsten Wert bei ca. 75 nm zu erreichen. Eine längere Homogenisationszeit verringert diesen Wert nicht mehr.

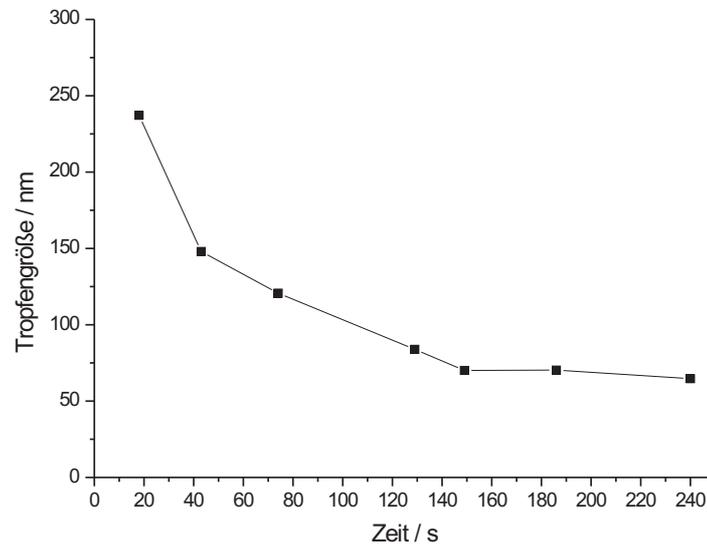


Abbildung 5.5: Veränderung des mittleren Tropfendurchmessers während der Homogenisation in Abhängigkeit von der Zeit

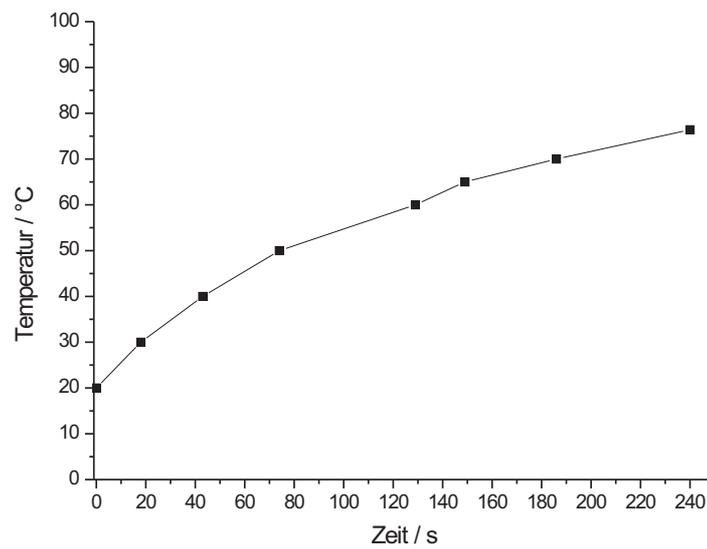


Abbildung 5.6: Temperaturverlauf in der Emulsion während der Hochdruckhomogenisation

- 2. Temperaturverlauf** Um die thermische Beanspruchung der Emulsion während der Hochdruckhomogenisation einschätzen zu können, wurde die Temperatur der Emulsion im Homogenisator während der Homogenisation mit einem Stichthermometer bestimmt. Der Verlauf ist in Abb. 5.6 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Temperatur entlang der Homogenisationszeit stetig ansteigt und nach 240 Sekunden ca. 75°C erreicht.
- 3. Veränderung der mittleren Tropfengröße bei einer temperierten Rohemulsion** Da bei der Hochdruckhomogenisation die Temperatur der Emulsion entlang der Homogenisationszeit ansteigt, ist es schwer zu unterscheiden in welcher Abhängigkeit die Tropfengröße von Temperatur und Zeit steht. Um den Faktor Zeit als Einflussgröße ausschließen zu können, wurde eine auf 50°C vorgeheizte Rohemulsion homogenisiert und die Veränderung der Tropfengröße während der Homogenisation gemessen (siehe Tab. 5.1). Es ist zu erkennen, dass sich die Emulsion bereits nach 67 Sekunden auf 60°C erwärmt und die Tropfen kleiner als 100 nm sind. Bei der Rohemulsion, die bei Raumtemperatur in den Homogenisator gegeben wird, dauert es etwa doppelt so lang bis die Tropfengröße — wiederum bei 60°C — unter 100 nm gefallen ist.
- 4. Entwicklung der dynamischen Viskosität der dispersen Phase** Da bei einer vorgeheizten Rohemulsion (siehe Punkt 3.) gezeigt wird, dass die Tropfengröße nicht allein von der Homogenisationsdauer abhängt, sondern auch eine deutliche Abhängigkeit von der Temperatur zeigt, wurde im Weiteren untersucht, ob eine damit verbundene Veränderung der dynamischen Viskosität der dispersen Phase auch eine Rolle spielt (siehe Methode 4.2.3.5). In Abbildung 5.7 sieht man, dass die Viskosität mit steigender Temperatur, wie sie auch während der Homogenisation auftritt, leicht absinkt. In Tabelle 5.2 sind der dynamischen Viskosität die zeitgleich erzielten Tropfengrößen gegenübergestellt. Einer fallenden Viskosität des Miglyols stehen fallende Tropfengrößen gegenüber.

Tabelle 5.1: Tropfengröße in Abhängigkeit der Temperatur bei einem temperierten System

Temperatur [°C]	Mittlere Partikelgröße [nm]	Homogenisationsdauer[s]
50	n.b.	0
60	100,7	67
65	93,8	149
70	88	186
79,9	66	240

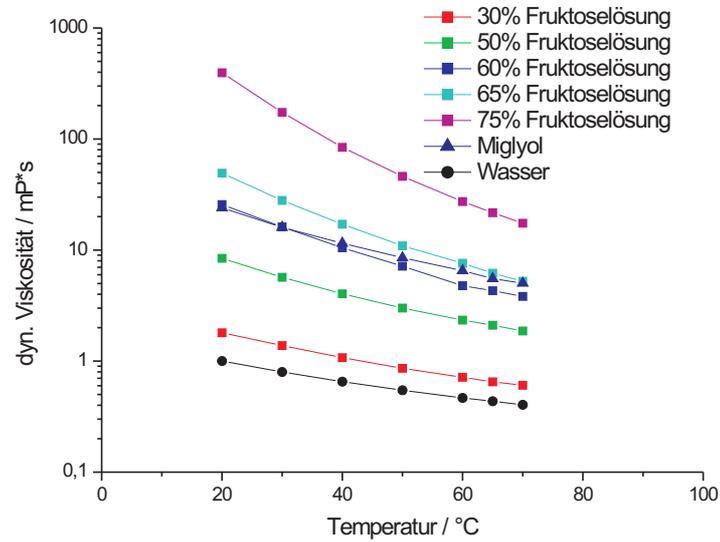


Abbildung 5.7: Dynamische Viskosität von Wasser, Miglyol und Fruktoselösung verschiedener Konzentrationen in Abhängigkeit vom Temperaturverlauf während der Hochdruckhomogenisation

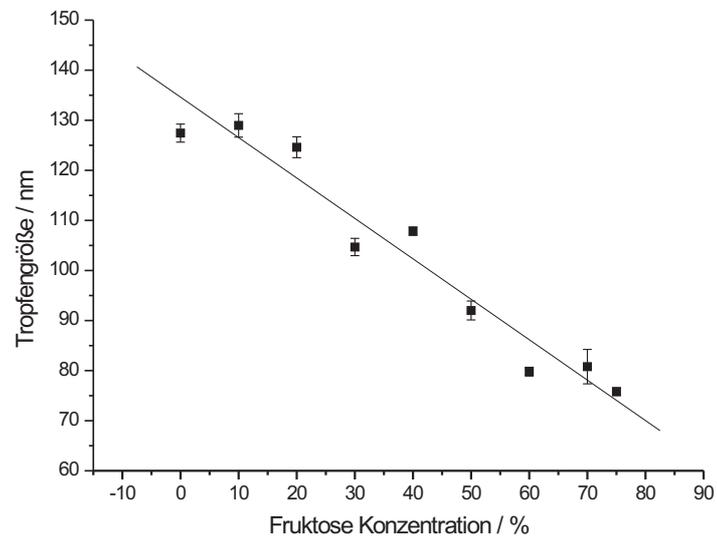


Abbildung 5.8: Tropfengröße in Abhängigkeit von der Fruktosekonzentration am Tag 0 der Einlagerung

5. Einfluss der Fruktosekonzentration auf das Emulgierergebnis Die hier verwendete Nanoemulsion unterscheidet sich aufgrund ihrer hohen Konzentration an Fruktose von 70% in der dispersen Phase von verwandten Systemen mit niedrigeren Gehalten an Stabilisatoren. Es ist daher interessant zu sehen, ob die Fruktose bei der Herstellung eine entscheidende Rolle beim Tropfenbruch spielt, da Anwendungen denkbar sind, wo eine geringere Fruktosekonzentration wünschenswert ist (z. B. für eine Sprühtrocknung). Es wurden Nanoemulsionssysteme mit unterschiedlichen Konzentrationen an Fruktose in der kontinuierlichen Phase (0%, 10,0%, 20,0%, 30,0%, 40,0%, 50,0%, 60,0%, 70,0%, 75,0%) hergestellt. Am Tag der Herstellung wurde der mittlere Tropfendurchmesser mittels PCS bestimmt (siehe Methode 4.2.3.1. Der Gehalt an Lecithin und Miglyol ist gemäß Basisrezeptur (siehe Tab. 4.3) bei allen gleich. Die Wassermenge wurde der Fruktosemenge angepasst, so dass jeder Ansatz 200 g beträgt. Diese Ergebnisse finden sich in Abbildung 5.8. Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen Fruktosekonzentration und Tropfengröße. Je höher die Fruktosekonzentration, desto kleiner der erzielte Tropfendurchmesser.

Für die Untersuchung der dynamischen Viskositäten in Abhängigkeit von der Fruktosekonzentration wurden Lösungen mit verschiedenen Konzentrationen an Fruktose (0%, 10,0%, 20,0%, 30,0%, 40,0%, 50,0%, 60,0%, 70,0%, 75,0%) in Aqua bidest. hergestellt und ihre Viskositäten bestimmt (siehe Methode 4.2.3.5). Höhere Konzentrationen an Fruktose lassen sich nicht untersuchen, da die Löslichkeitsgrenze von Fruktose in Wasser bei 20 °C bei ca. 78% liegt [97].

Diese Ergebnisse sind in 5.7 dargestellt. Deutlich sichtbar ist, dass mit steigender Konzentration an Fruktose die Viskosität der kontinuierlichen Phase ansteigt. Alle Viskositäten fallen mit steigender Temperatur gleichmäßig ab.

Tabelle 5.2: Tropfengröße in Abhängigkeit von der dynamischen Viskosität der dispersen Phase (Miglyol)

Temperatur [°C]	Dyn. Viskosität Miglyol [mPa·s]	Tropfengröße [nm]
20	24	n.b.
30	16,01	237,2
40	11,25	148
50	8,52	120,7
60	6,52	83,9
65	5,53	70,1
70	5,03	70,3

6. Tropfengrößen in Abhängigkeit vom Anteil der dispersen Phase Die Güte einer Emulsion bemisst sich auch daran wie hoch ihre Aufnahmekapazität an disperser Phase ist. Je mehr Miglyol sich in der Emulsion dispergieren lässt, desto mehr steht auch zur Lösung des Limonens zur Verfügung. Daher wurde der Einfluss der Konzentration an disperser Phase (Miglyol) auf das Emulgierergebnis untersucht. Es wurden auf Basis der Rezeptur 4.3 Nanoemulsionen mit unterschiedlichen Miglyolkonzentrationen (17,7%, 35,0% und 40,0%) hergestellt und nach der Homogenisation der Tropfendurchmesser bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.3 dargestellt. Es ist zu sehen, dass sich im Rahmen der hier gewählten Miglyolkonzentrationen keine Auswirkungen auf die Tropfengröße ergeben.

Aromaverluste

Um die Wirtschaftlichkeit der Herstellung einer Aromastoff-Formulierung abschätzen zu können, ist es wichtig, die Verlustrate an Aromastoff durch die Herstellung zu kennen. In Tabelle 5.4 ist mit Wasserdampfdestillation (siehe Methode 4.2.2.1) von sechs Nanoemulsionen gleicher Rezeptur 4.3 der prozentuale Verlust an Limonen durch den Herstellungsprozess bestimmt worden. Es ergibt sich ein durchschnittlicher Verlust von 3,8% Limonen durch die Herstellung.

Tabelle 5.3: Tropfengröße in Abhängigkeit vom Dispersphasenanteil

Miglyol [g]	Tropfengröße [nm]
17,5	80
35	85,2
40	86,9

Tabelle 5.4: Limonenverlust bei der Herstellung der Phospholipid Nanoemulsion

Nanoemulsion	Limonen-Verlust durch Destillation [%]
1	0,8
2	1,5
3	4,5
4	2,5
5	12
6	1,5

5.3 Physikalische Stabilität der Nanoemulsion ohne (R)-(+)-Limonen

Langzeitlagertests gehören zu den üblichen Verfahren zur Beurteilung der Stabilität von Emulsionen. Die Bestimmung der mittleren Tropfengröße mittels PCS kann Aufschluss über das Tropfenwachstum als Maß für die Stabilität der Emulsion entlang einer vorgegebenen Lagerdauer geben. Will man die Nanoemulsion in wässrige Lebensmitteln einbringen, so ist es zusätzlich relevant, wie sich ihre Stabilität in der Verdünnung mit Wasser verhält. Neben der mittleren Tropfengröße wurde auch das Zeta-Potenzial der Proben bestimmt (vgl. Methode 4.2.3.1). Denn bei Emulsionen mit amphoteren Emulgatoren wie das Lecithin ist es von Interesse zu sehen, ob sich die Stabilität in der Höhe des Zeta-Potenzials widerspiegelt, um mögliche Ursachen einer Destabilisierung diskutieren und vermeiden zu können. Diese Untersuchungen wurden bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt, um abschätzen zu können, in welchem Temperaturbereich die Nanoemulsion in Lebensmitteln eingesetzt werden kann. Die Durchführung des Lagertests ist in Kap. 4.2.5.1 beschrieben. Im Folgenden werden die Ergebnisse dargestellt (Bei 30°C musste der Versuch vorzeitig abgebrochen werden, da das Thermostat ausgefallen ist. Zwischen Tag 113 und 206 mussten zwei Zeta-Potenzial Messungen ausfallen, da die Elektrode der PCS defekt war). Die Linien in den Diagrammen sind zur Veranschaulichung der Entwicklung zwischen den Messpunkten eingetragen.

Lagerung der Nanoemulsion bei -18 °C

Während der Lagerung bei -18°C nehmen die mittleren Tropfengrößen bei der 4,0%igen und der 0,5%igen Verdünnung bereits bei der ersten Messung von 88 nm auf ca. 250 nm zu, halten sich jedoch im weiteren Verlauf der Lagerung unverändert auf diesem Niveau (siehe Abbildung 5.9). Das Verhalten der beiden Verdünnungen ist als gleich zu beurteilen. Anders verhält es sich bei der unverdünnten Nanoemulsion. Hier findet kein signifikanter Anstieg der Tropfengröße statt.

Das Zeta-Potenzial schwankt in den ersten 113 Tagen bei allen drei Verdünnungsstufen zwischen -37,1 und -46,12 mV, wenn der Ausreißer -30,5 mV bei 0,5%iger Verdünnung an Tag 3 außer acht gelassen wird. Eine eindeutige Abhängigkeit vom Verdünnungsgrad ist nicht zu erkennen. Anschließend fällt das Zeta-Potenzial bei allen drei Verdünnungen auf Werte zwischen -43,19 und -57,23 mV (siehe Abbildung 5.10).

Lagerung der Nanoemulsion bei +8°C

Zu Beginn der Lagerung sind die mittleren Tropfengrößen bei allen drei Verdünnungsstufen kleiner als 90 nm. Entlang der Lagerung steigt die durchschnittliche Tropfengröße bei allen drei Versuchen nicht signifikant an (siehe Abbildung

5.11).

Der Verlauf des Zeta-Potenzials bei 8°C ist bei allen Verdünnung annähernd gleich. Der größte Teil der Werte schwankt innerhalb von –30 und 45 mV, mit Ausreißern nach oben und nach unten (siehe Abbildung 5.12). Die Schwankungen zwischen den einzelnen Tagen verlaufen für alle drei Verdünnungen fast einheitlich.

Lagerung der Nanoemulsion bei +30°C

Eine deutliche Abhängigkeit der Lagerstabilität von der Verdünnungsstufe lässt sich bei der Lagerung bei 30°C erkennen (siehe Abbildung 5.13). Mit steigendem Verdünnungsgrad steigt auch der Tropfendurchmesser stärker an. Der stärkste, nahezu lineare Anstieg der mittleren Tropfengröße von 90 auf 132 nm findet bei 0,5% Nanoemulsion statt. Flacher erfolgt der Anstieg bei der unverdünnten Probe und bei 4,0% Nanoemulsion. Beim Zeta-Potenzial lässt sich bei allen drei Verdünnungsstufen kein eindeutiger Trend erkennen (siehe Abbildung 5.14). Die Werte schwanken zwischen –30 bis –48 mV.

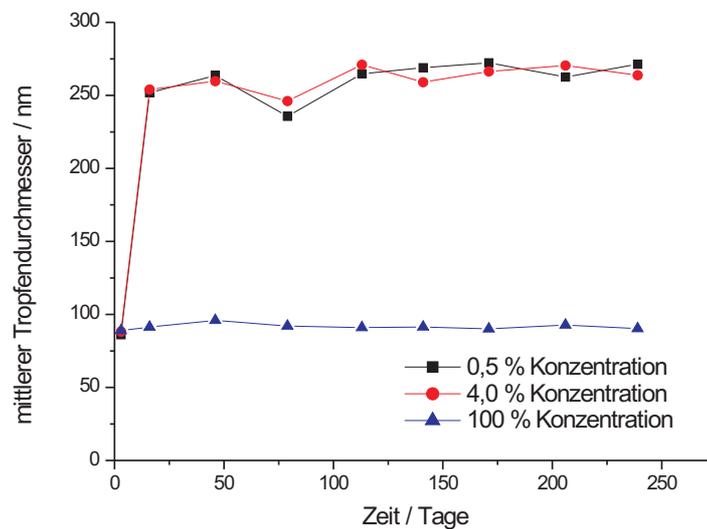


Abbildung 5.9: Tropfengröße der Nanoemulsion (ohne Limonen) bei –18°C in Abhängigkeit von der Lagerungszeit

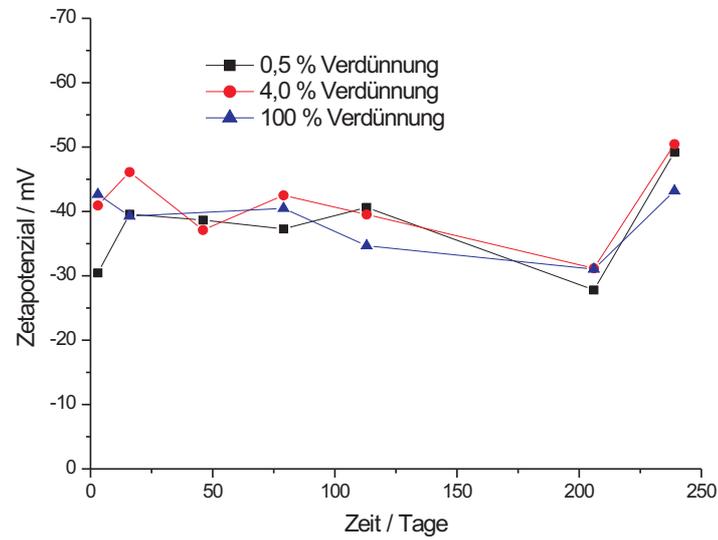


Abbildung 5.10: Zeta-Potenzial der Nanoemulsion (ohne Limonen) bei -18°C in Abhängigkeit von der Lagerungszeit

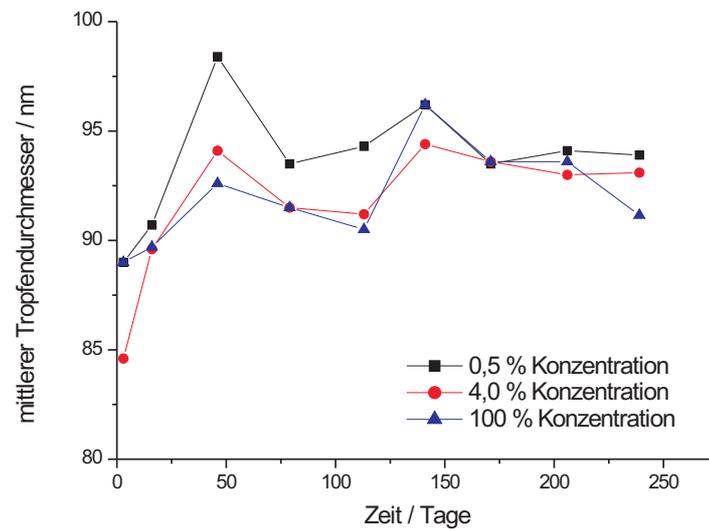


Abbildung 5.11: Tropfengröße der Nanoemulsion (ohne Limonen) bei 8°C in Abhängigkeit von der Lagerungszeit

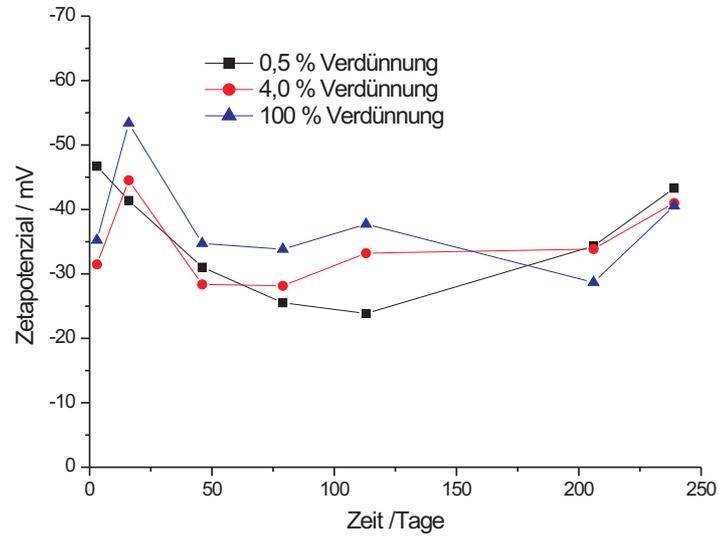


Abbildung 5.12: Zeta-Potenzial der Nanoemulsion (ohne Limonen) bei 8°C in Abhängigkeit von der Lagerungszeit

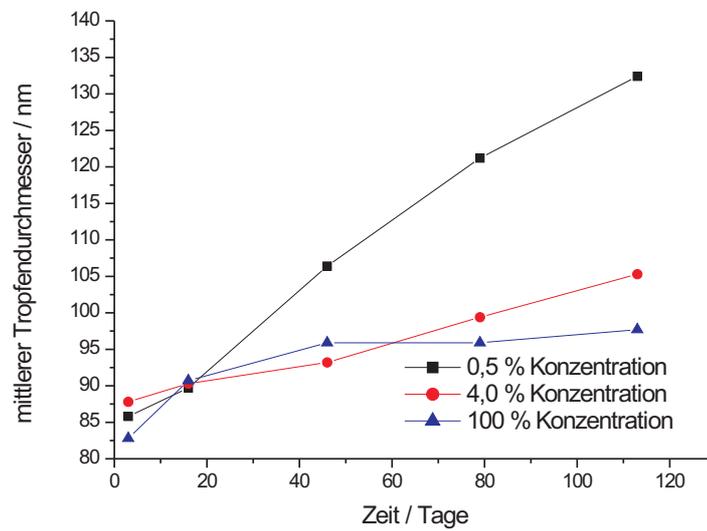


Abbildung 5.13: Tropfengröße der Nanoemulsion (ohne Limonen) bei 30°C in Abhängigkeit von der Lagerungszeit

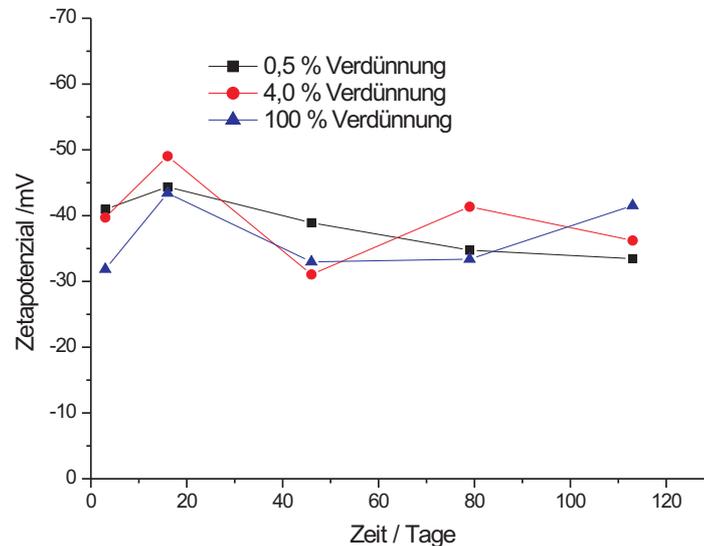


Abbildung 5.14: Zeta-Potenzial der Nanoemulsion (ohne Limonen) bei 30°C in Abhängigkeit von der Lagerungszeit

5.3.1 pH-Wert und Zeta-Potenzial

Um den Einsatzbereich von Phospholipid Nanoemulsionen besser abstecken zu können, ist es von Bedeutung den genauen pH-Wert Bereich innerhalb dessen die Emulsion ausreichende Stabilität besitzt, zu kennen. Zu diesem Zweck wurde der in Abbildung 5.15 dargestellte Zusammenhang zwischen pH-Wert und Zeta-Potenzial untersucht. Die Methode dazu ist in Kapitel 4.2.3.6 dargestellt. Auch bei den hier gemachten Untersuchungen wird gezeigt, dass das Zeta-Potenzial mit dem pH-Wert korreliert. Das Zeta-Potenzial sinkt bei steigendem pH-Wert ab.

5.4 (R)-(+)-Limonen in der Phospholipid Nanoemulsion

Nachdem die Stabilität der Nanoemulsion ohne Limonen untersucht wurde, ist es von Interesse zu sehen, ob sich diese Stabilität nach der Dispergierung von 2,5% (die Konzentration mit der in dieser Arbeit im Weiteren gearbeitet wird) bzw. 5% Limonen in der dispersen Phase ändert, da die Beschreibung dieser Stabilität wichtige Voraussetzung für den Einsatz der Emulsion mit Limonen in Lebensmitteln ist. So können auch erste Aussagen darüber getroffen werden, in welcher Konzentration sich

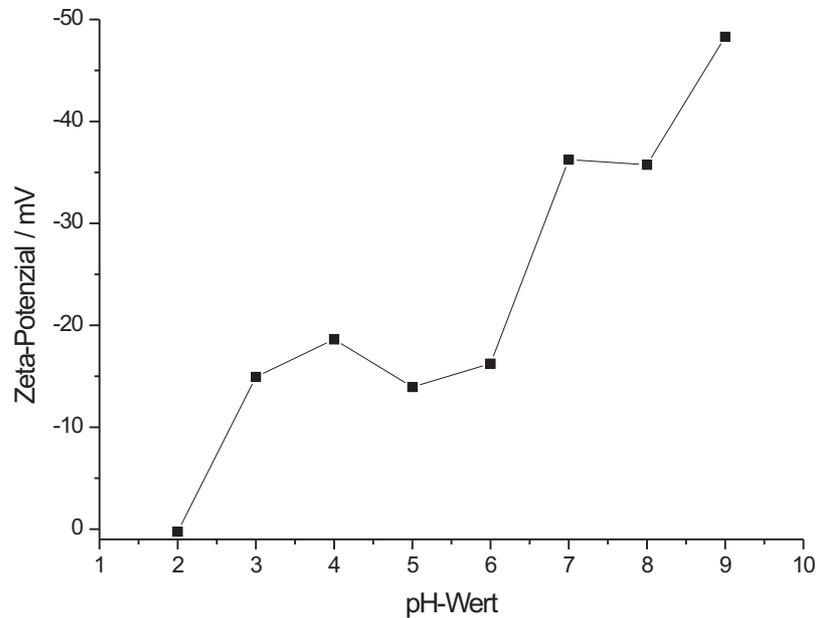


Abbildung 5.15: Abhängigkeit des Zeta-Potenzials der Phospholipid Nanoemulsion vom pH-Wert

Limonen gut in der Nanoemulsion dispergieren lässt. Um eine gute Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen der Nanoemulsion ohne Limonen zu erzielen, wurden die gleichen Lagerbedingungen gewählt. In Kapitel 4.2.5.2 ist die genaue Durchführung des Lagertests beschrieben. Im Folgenden werden die Ergebnisse zusammengefasst.

Wie in Abb. 5.16 anhand der mittleren Tropfengrößen zu erkennen ist, lassen sich 2,5% Limonen zu einer Nanoemulsion emulgieren, deren mittlere Tropfengröße 79,3 nm beträgt. Bei dem System mit 5,0% Limonen (Abb. 5.17) liegt die Tropfengröße mit durchschnittlich 102,9 nm höher. Bei 2,5% Limonen lässt sich bei allen drei Lagertemperaturen innerhalb der hier betrachteten 95 Tage kein signifikanter Anstieg der Tropfengröße erkennen (siehe Abb. 5.16). Die Unterschiede zwischen den Ergebnissen bei den verschiedenen Temperaturen liegen überwiegend im Bereich des Messfehlers.

Die zugehörigen Zeta-Potenziale bei 2,5% Limonen (siehe Abb. 5.18) zeigen auch keine Temperaturabhängigkeit. Ihr Betrag ist leicht fallend, bleibt aber immer unterhalb von $|\text{30 mV}|$.

Auch bei 5% Limonen (siehe Abb. 5.17) zeigt sich keine Temperaturabhängigkeit der Tropfengrößen. Jedoch ist der Verlauf der drei Graphen leicht steigend. Die

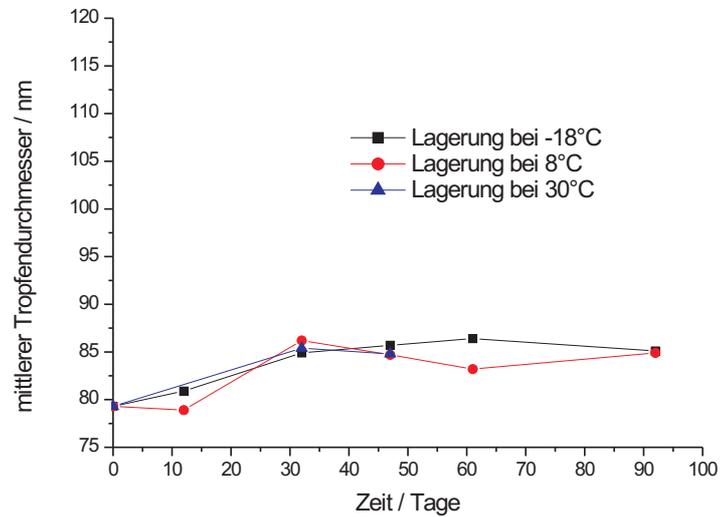


Abbildung 5.16: Mittlere Tropfengröße in Abhängigkeit von der Zeit und der Temperatur bei einem Limonengehalt von 2,5%

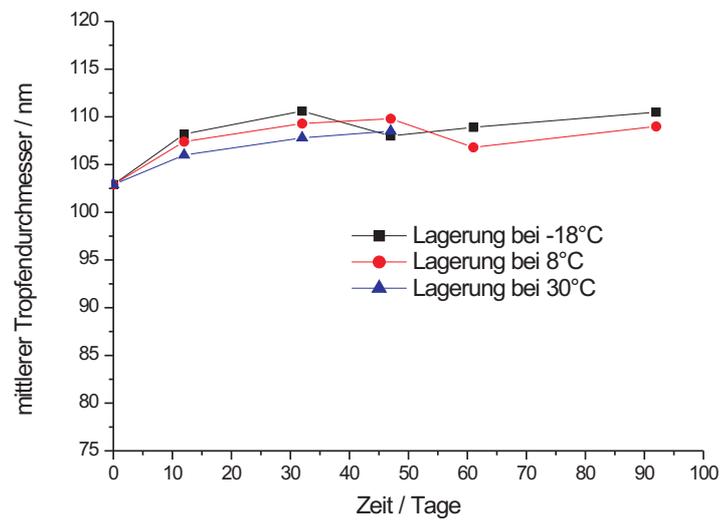


Abbildung 5.17: Mittlere Tropfengröße in Abhängigkeit von der Zeit und der Temperatur bei einem Limonengehalt von 5,0%

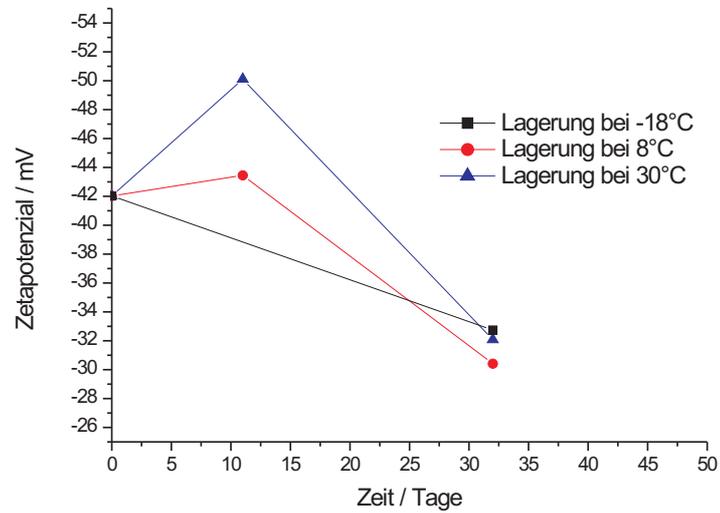


Abbildung 5.18: Zeta-Potenzial in Abhängigkeit von der Zeit und der Temperatur bei einem Limonengehalt von 2,5%

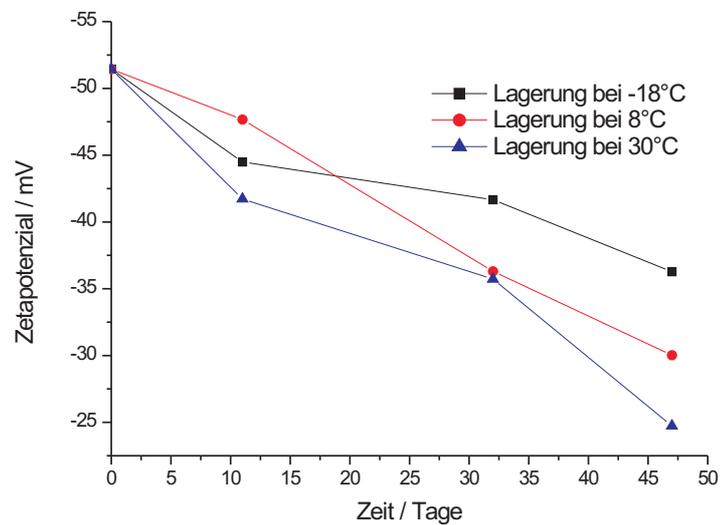


Abbildung 5.19: Zeta-Potenzial in Abhängigkeit von der Zeit und der Temperatur bei einem Limonengehalt von 5,0%

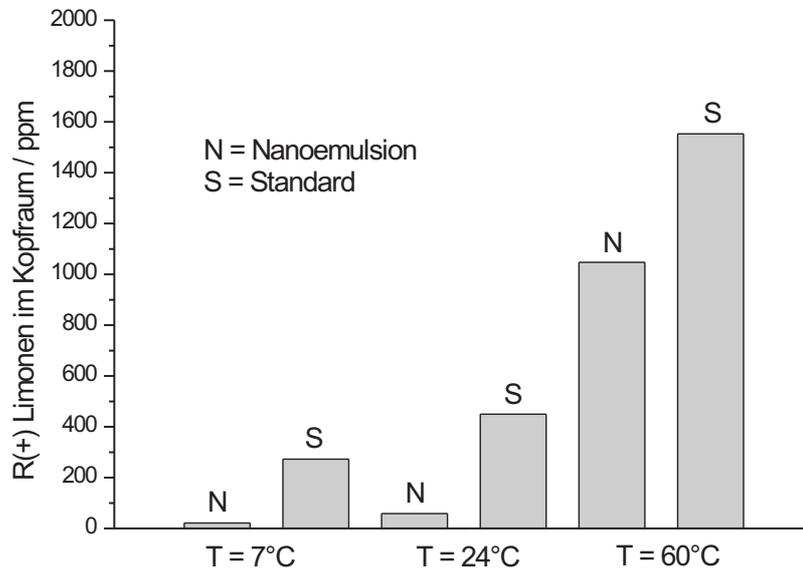


Abbildung 5.20: Vergleich der Flüchtigkeiten von Limonen in der Nanoemulsion und im Standard in Abhängigkeit von der Temperatur

Tropfendurchmesser steigen von 103 auf 110 nm an. Der Verlauf der zugehörigen Zeta-Potenziale ist temperaturabhängig und deutlich steigend (siehe Abb. 5.19). Mit steigender Temperatur steigt auch das Zeta-Potenzial von ca. -52 mV auf Werte zwischen -43 bis -23 mV an.

5.5 Flüchtigkeit von (R)-(+)-Limonen in der Phospholipid Nanoemulsion

Flüchtigkeit des Limonens in der Nanoemulsion im Vergleich zum Standard

Die Lagerung und Verarbeitung von Aromen führt oft zu unwirtschaftlichen Aromaverlusten. Eine Aromastoffformulierung, bei der diese Verluste minimiert werden, ist daher von besonderem Interesse. Neben den Herstellungsverlusten (siehe Tab. 5.4), kann es bei Aromen zu Verlusten durch Verdampfung kommen. Ziel ist es daher zu untersuchen, ob Limonen in der Nanoemulsion im Vergleich zum Standard in Abhängigkeit von der Temperatur einen geringeren Dampfdruck und damit eine ge-

ringere Flüchtigkeit besitzt. Die Durchführung dieser Messreihe ist in Kapitel 4.2.4.2 beschrieben.

Die Ergebnisse der gaschromatographischen Headspace Analyse (siehe Abb. 5.20) zeigen, dass die Freisetzung des Limonens im Vergleich zum Standard bei allen Temperaturen (7°C, 24°C und 60°C) signifikant reduziert ist.

Für die Untersuchung welche Komponenten der Nanoemulsion für diese reduzierte Flüchtigkeit verantwortlich sind, wurde bei 60°C der Verteilungskoeffizient (siehe Gleichung (2.1)) zwischen Emulsion und Gasraum für Limonen bei verschiedenen Zusammensetzungen der Nanoemulsion bestimmt (siehe Methode 4.2.4.2).

In Abb. 5.21 sind die Ergebnisse dargestellt. Es ist dort kein signifikanter Unterschied zwischen dem Einsatz von Miglyol im Basissystem und Sonnenblumenöl zu beobachten. Zu einer deutlichen Reduzierung des Verteilungskoeffizienten kommt es bei der Erhöhung des Lecithingehaltes auf 10,0% im Vergleich zum Basissystem.

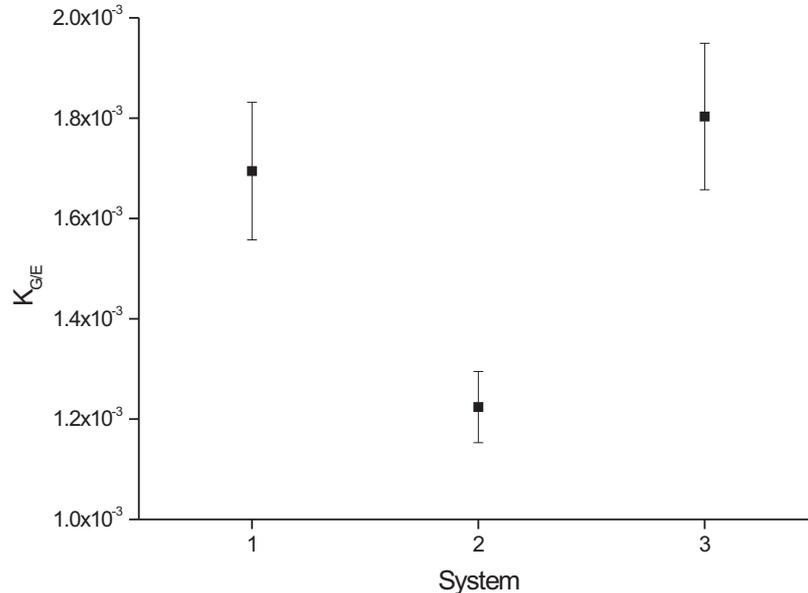


Abbildung 5.21: Verteilungskoeffizient des Limonens zwischen Gasraum und Emulsion bei 60°. 1 = Basissystem (mit Miglyol und 5% Lecithin). 2 = Variation mit 10% Lecithin, siehe Tabelle 4.6; 3 = Variation mit Sonnenblumenöl, siehe Tabelle 4.5

5.6 Chemische Stabilität von (R)-(+)-Limonen in der Nanoemulsion

Bei der Suche nach neuen Applikationsformen für das Limonen ist es notwendig zu untersuchen, welche chemische Stabilität des Limonens dabei erreicht werden kann. Zu diesem Zweck wurde der Abbau des Limonens bei verschiedenen Temperatur- und Lichtbedingungen untersucht.

Der Limonenabbau wurde im Standard, in der unverdünnten Nanoemulsion und in der verdünnten Nanoemulsion bestimmt. Die Bildung der drei Abbauprodukte (Carvon, Carveol, Terpeneol) wurde für den Standard und die unverdünnte Nanoemulsion bestimmt. Die Methode ist in 4.2.4.3.

Für Nanoemulsion und Standard wurde dabei bei der grafischen Darstellung der gleiche Maßstab gewählt, um eine bessere Vergleichbarkeit zu ermöglichen. Im Folgenden werden die Ergebnisse vorgestellt.

5.6.1 Abbau von (R)-(+)-Limonen

Der Limonenabbau im Standard zeigt neben einer Zeitabhängigkeit eine deutliche Temperatur- und Lichtabhängigkeit (siehe Abb. 5.22). Der gemessene Abbau des Limonens bei 32°C, hell, liegt am Ende der Lagerung bei nahezu 100%, der bei 20°C, hell bei ca. 50%, der bei 20°C dunkel bei ca. 47% und der bei 8°C dunkel bei ca. 8%.

Bei dem Limonenabbau im Konzentrat (siehe Abb. 5.23) wird keine Temperatur- und Lichtabhängigkeit innerhalb des hier betrachteten Zeitraums deutlich. Die Limonenkonzentration nimmt entlang der Lagerung ab. Dabei ist die Abnahme bei allen vier Lagerbedingungen nahezu identisch. Der Abbau liegt nach 50 Tagen bei ca. 16%. Der Verlauf des Limonenabbaus in der 1:10 Verdünnung der Nanoemulsion ist bei allen Lagerbedingungen mit dem der unverdünnten Nanoemulsion vergleichbar (siehe Abb. 5.24). Der Abbau des Limonens ist nur geringfügig höher (ca. 17%).

5.6.2 Bildung der Abbauprodukte α -Terpeneol, Carvon und Carveol

Standard

Neben dem Abbau des Limonens im Standard wurde die Bildung der drei Limonenabbauprodukte, Terpeneol (Abb. 5.25), Carvon (Abb. 5.26) und Carveol (Abb. 5.27) analysiert. Wie sich erkennen lässt, nehmen alle drei Konzentrationen in Abhängig-

keit von der Zeit und den Lagerbedingungen zu. Vergleicht man die Bildung der drei Verbindungen im Standard miteinander, so lassen sich deutliche Konzentrationsunterschiede erkennen. Am meisten werden Terpeneol und Carvon gebildet, die Menge an Carveol ist deutlich geringer. Spitzenwerte erreichen das Carvon und das Terpeneol bei 32°, hell.

Nanoemulsionskonzentrat

Zum besseren Vergleich mit dem Standard wird bei der Emulsion die gleiche Skalierung für die Bildung der Abbauprodukte wie im Standard gewählt. In Abb. 5.29 und 5.30 wird deutlich, dass die Konzentration der Abbauprodukte Carvon und Carveol in der Nanoemulsion nur sehr geringfügig in Abhängigkeit von der Lagerzeit ansteigt. Eine eindeutige Abhängigkeit von den Lagerbedingungen ist in dem hier betrachteten Zeitraum nicht zu erkennen.

In Abb. 5.28 lässt sich die Entwicklung der Terpeneolkonzentration verfolgen. Der Verlauf bei allen vier Lagerbedingungen ist annähernd gleich. Es kommt zu keinem Anstieg der Terpeneolkonzentration, sondern zu einem leichten Abfall.

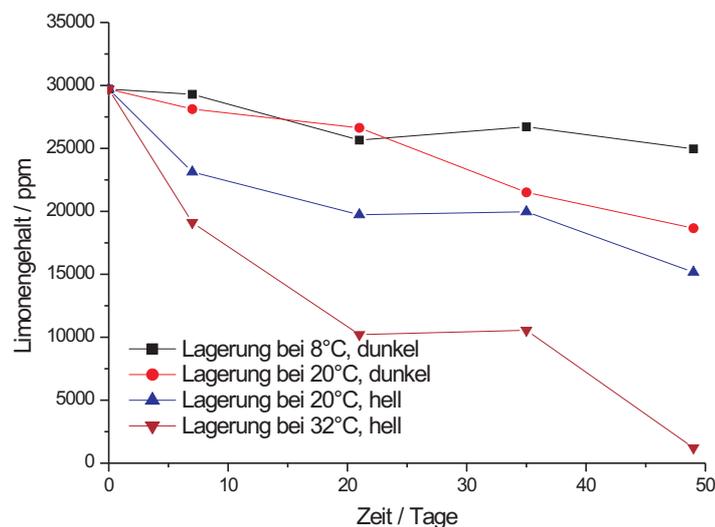


Abbildung 5.22: Abbau des Limonens im Standard

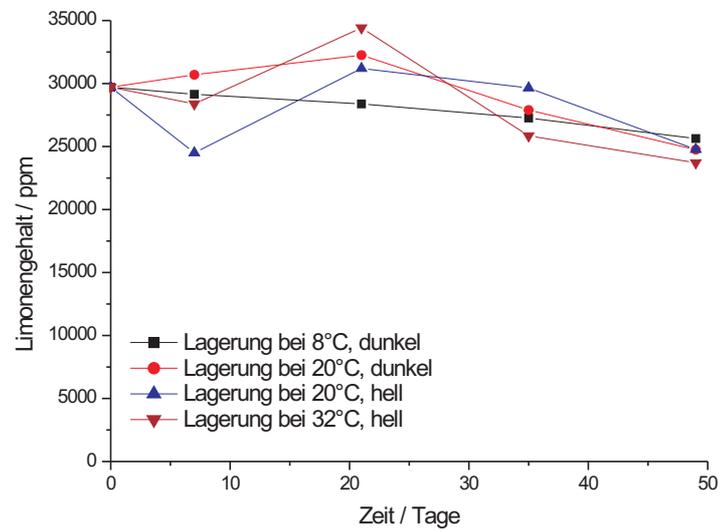


Abbildung 5.23: Abbau des Limonens im Konzentrat

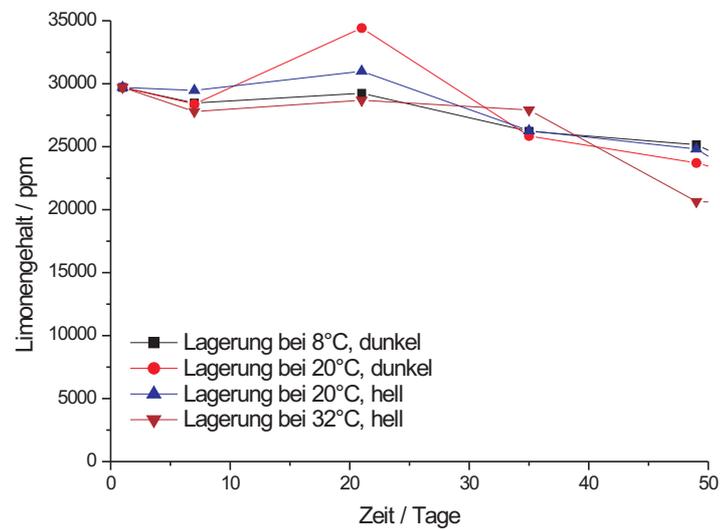


Abbildung 5.24: Abbau des Limonens in der verdünnten Nanoemulsion

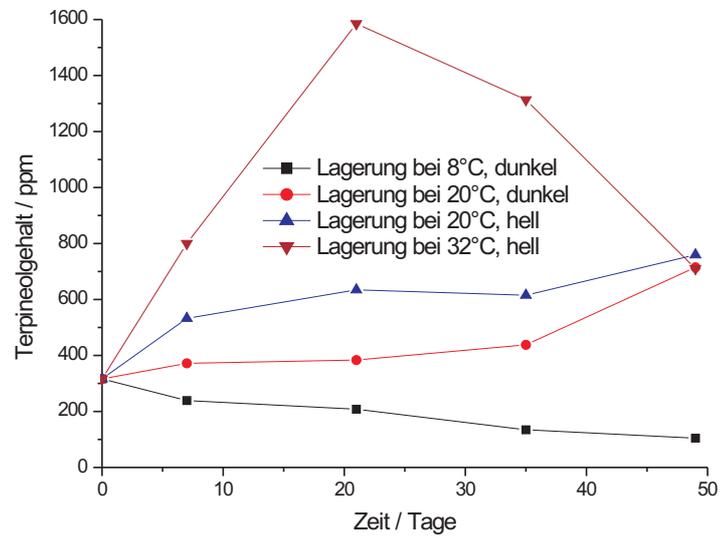


Abbildung 5.25: Bildung von Terpineol im Standard

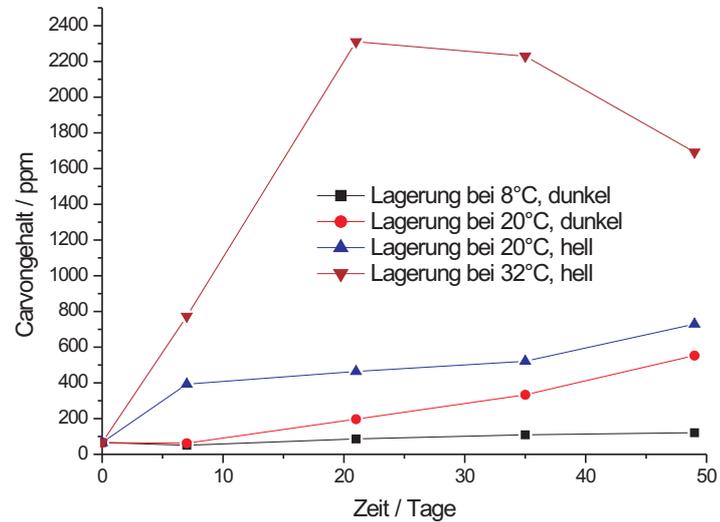


Abbildung 5.26: Bildung von Carvon im Standard

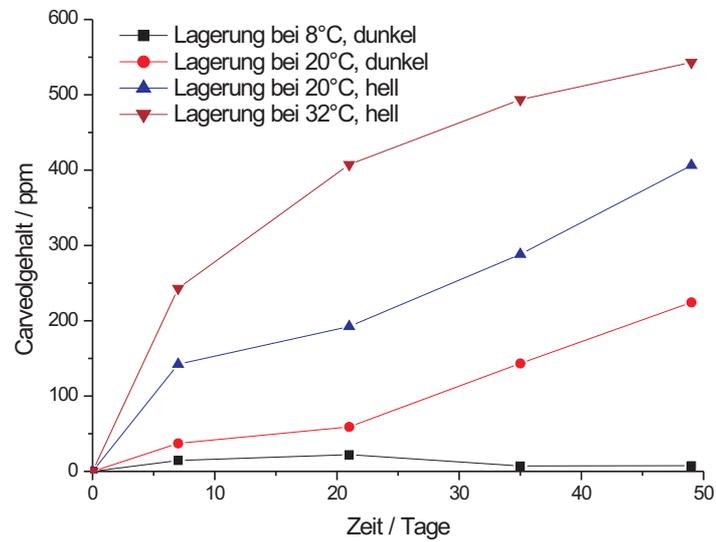


Abbildung 5.27: Bildung von Carveol im Standard

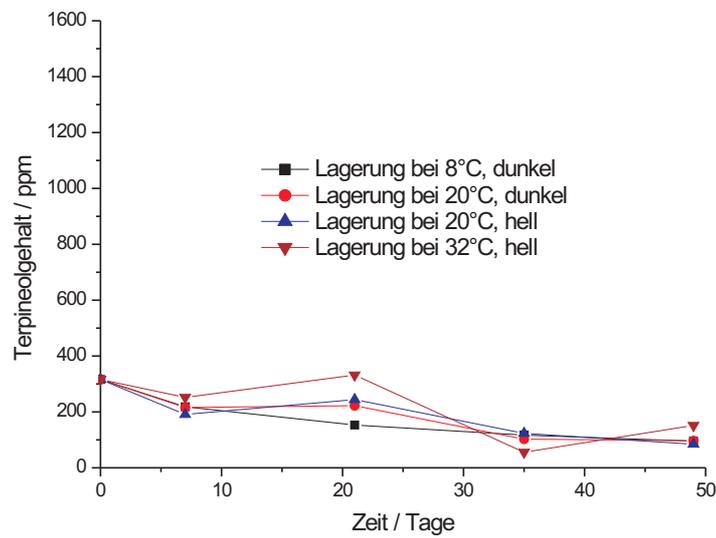


Abbildung 5.28: Bildung von Terpeneol im Konzentrat

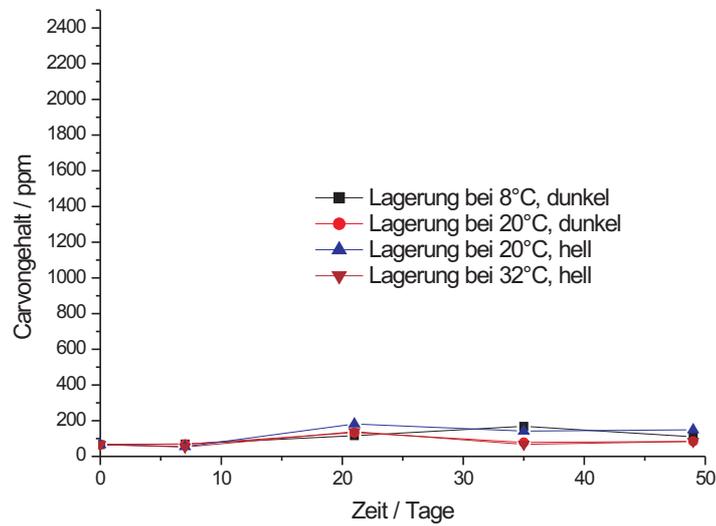


Abbildung 5.29: Bildung von Carvon im Konzentrat

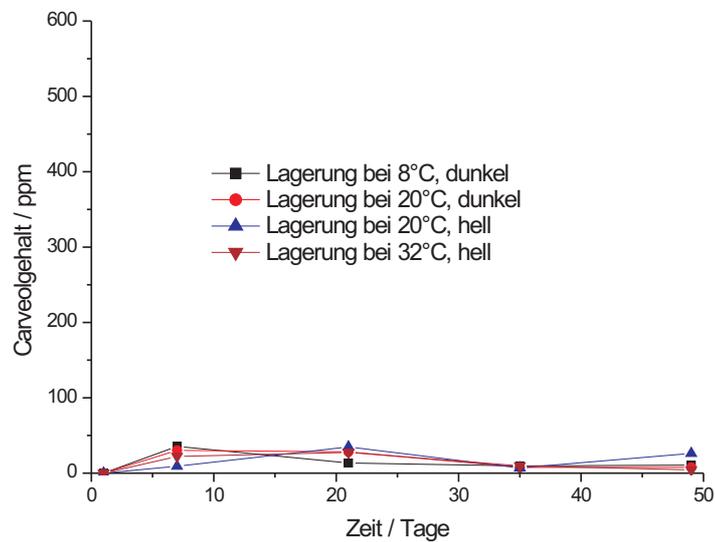


Abbildung 5.30: Bildung von Carveol im Konzentrat

Kapitel 6

Diskussion

6.1 Charakterisierung der Phospholipid Nanoemulsion

Es handelt sich bei der hier beschriebenen Emulsion um ein für die Lebensmitteltechnologie neuartiges disperses System. Daher ist eine genaue Kenntnis der Struktur des Systems essentielle Voraussetzung für den Einsatz in Lebensmitteln. Deshalb wird eine mikroskopische und makroskopische Strukturanalyse vorgenommen, um das System genau definieren und mögliche Auswirkungen auf die Anwendung in Lebensmitteln abschätzen zu können.

6.1.1 Mikroskopische Struktur

TEM Aufnahme

Da sich die Nanoemulsion aufgrund sehr kleiner kolloidaler Strukturen nicht mit herkömmlichen lichtmikroskopischen Methoden abbilden lässt, wurde eine elektronenmikroskopische Aufnahme von Lipoid GmbH, Ludwigshafen in Auftrag gegeben, um zu belegen, welche dispersen Strukturen vorliegen. So lässt sich das System eindeutig definieren (siehe Abbildung 5.1). Wie in den Ergebnissen bereits ausgeführt, lässt sich das vorliegende disperse System als eine Phospholipid Nanoemulsion mit vereinzelt einfachen liposomalen Strukturen in einer Zucker-Matrix definieren, deren gleichmäßig verteilte runde Partikel eine Größenverteilung von 30 bis 80 nm zeigen [16].

Tropfengrößenverteilung

Die Messung der Tropfengrößen und ihrer Verteilung ist bei der Untersuchung von Lagerstabilitäten und bei der Untersuchung der Hochdruckhomogenisation von entscheidender Bedeutung. Da elektronenmikroskopische Aufnahmen für Routineuntersuchungen zu aufwendig und zu teuer sind, ist es notwendig andere Analysemethoden zu finden. Da aufgrund der elektronenmikroskopischen Aufnahme die Größe und die Form der dispersen Phase bekannt sind, konnte eine geeignete Messmethode gefunden werden. Die Photonenkorrelationsspektroskopie erlaubt es sphärische Partikel im Bereich von einigen Nanometern bis hin zu einem Mikrometer gut zu analysieren. Sie wurde daher in diese Arbeit zur Messung des mittleren hydrodynamischen Tropfendurchmessers eingesetzt.

Abbildung 5.2 zeigt eine solche charakteristische Verteilung der Tropfengrößen in der Nanoemulsion. Auffällig ist, dass alle Durchmesser oberhalb von 50 nm liegen. Das ist höher als durch die TEM Aufnahme gezeigt. Kim et al. [58] machten eine ähnliche Beobachtung, die sie damit erklärten, dass die PCS den mittleren hydrodynamischen Durchmesser der Tropfen bestimmt, die Kryotechnik zur Vorbereitung der Proben die Tropfen aber nicht immer in ihrer Mitte aufbricht. So scheinen sie durchschnittlich etwas kleiner zu sein.

Deutlich ist zu erkennen, dass die Verteilung bimodal ist. Die linke Verteilung mit den kleineren Tropfengrößen ist bei einer Breite von 17 nm sehr eng. Man spricht auch davon, dass die Emulsion eine geringe Polydispersität besitzt, was einen guten Schutz vor Aufrahmung bietet. Bei der Verteilung mit den großen Tropfen ist die Aufrahmungsgeschwindigkeit aufgrund der großen Tropfen und der höheren Polydispersität höher (siehe Stokes'sches Gesetz Gleichung (2.7)). Soll ausschließlich die Verteilung mit dem kleineren mittleren Tropfendurchmesser für eine bessere Lagerstabilität erhalten werden, so lässt man die Probe ein bis zwei Tage stehen und dekantiert die großen, inzwischen aufgerahmten Tropfen, wie es auch in der pharmazeutischen Technologie umgesetzt wird.

6.1.2 Makroskopische Struktur und optische Eigenschaften

Bei einer Verarbeitung der Nanoemulsion in flüssigen Lebensmitteln ist es von Vorteil, wenn im Vorfeld Aussagen über mögliche Veränderungen der optischen Eigenschaften des Lebensmittels getroffen werden können. Eine Färbung oder Trübung des Lebensmittels durch die Emulsion kann gewollt oder unerwünscht sein.

Durch die Hochdruckhomogenisation wird aus einer trüben, aufgrund des Lecithins bräunlichen Voremulsion (Premix), eine gold-braune transparente Nanoemulsion (siehe Abbildung 5.3). Die Farbe stammt vom Lecithin, da alle übrigen Komponenten farblos sind. Die Transparenz kommt aufgrund einer Angleichung der Bre-

chungsindizes der äußeren und der inneren Phase zustande. In Abbildung 6.1 lässt sich gut erkennen, dass bei einer Angleichung der Brechungsindizes die Absorption gegen Null geht (siehe Methoden 4.2.3.3 und 4.2.3.4). Die Emulsion erscheint transparent. Diese Beobachtung deckt sich mit den Arbeiten von Chantrapornchai et al. [32] und von Sun et al. [110], die darüber hinaus noch zeigen konnten, dass dieser Zusammenhang unabhängig von der Partikelgröße und der Konzentration der dispersen Phase ist. Bei der Nanoemulsion kommt es aufgrund der 70%igen Fruktoselösung zu einer Angleichung der Brechungsindizes der inneren und äußeren Phase. Ist die Fruktoselösung geringer oder höher konzentriert, so kommt es zu einer Trübung, was bei der Verdünnung im Lebensmittel zu berücksichtigen ist.

Um einen Eindruck der optischen Eigenschaften in Verdünnungen zu erhalten, wird die Nanoemulsion mit deionisiertem Wasser verdünnt und optisch beurteilt (siehe Abb. 5.4). Bei einem Emulsionsanteil von 0,5% kommt es kaum zu einer Trübung, die Probe ist transparent. Bei einem Anteil von 4,0% kommt es bereits zu einer leichten Trübung, bei einem Anteil von 10,0% ist eine deutliche Trübung zu erkennen (vergleiche Abbildung 5.4).

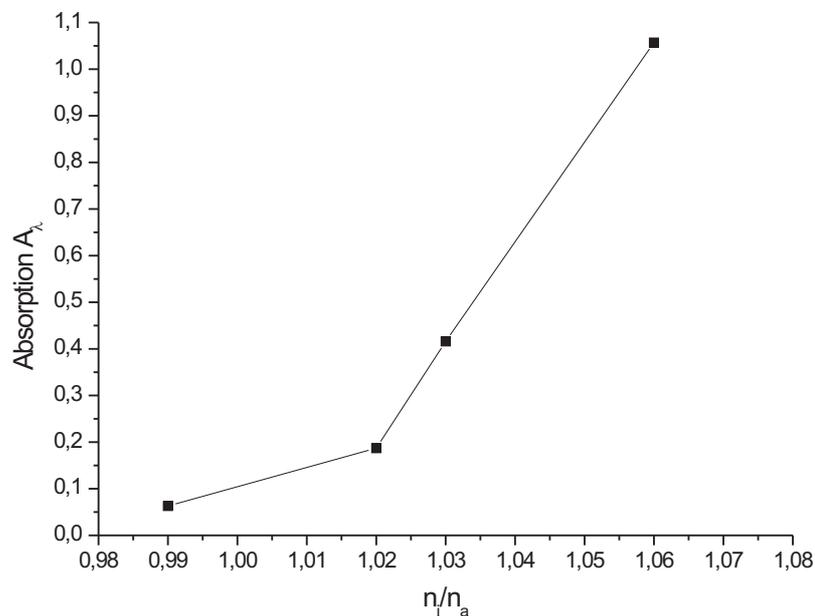


Abbildung 6.1: Extinktionskoeffizient der Nanoemulsion in Abhängigkeit zum relativen Brechungsindex. In der Abbildung steht n_i für den Brechungsindex von Öl und n_a für den Brechungsindex der Fruktoselösung

Die Probe mit 0,5% ist am transparentesten. Hier führt der geringere Anteil an disperser Phase dazu, dass am wenigsten Öltröpfchen in der Probe sind. D.h., dass weniger Grenzflächen in der Probe sind, an denen das Licht reflektiert oder gestreut werden kann. Je mehr Emulsion in der Verdünnung ist, desto stärker trübt sich die Probe ein.

Alle drei Verdünnungen sind jedoch noch gut lichtdurchlässig und nicht milchig-trüb, wie das bei anderen O/W - Emulsionen, wie z.B. bei Magermilch, mit einem vergleichbaren Fettgehalt wie der der 10,0%ige Verdünnung der Nanoemulsion, der Fall ist. Ursache hierfür ist die sehr geringe Tropfengröße der Nanoemulsion. Die Tropfen besitzen eine Größe, die kleiner ist als die Wellenlänge des sichtbaren Lichts und damit ist die Streuung stark reduziert [72]). Die Probe bleibt lichtdurchlässig. Eine Bestätigung dieses Zusammenhangs lässt sich bei den Arbeiten von Chantrapornchai et al. [30, 31] finden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es sich bei dem hier vorliegenden System um eine Nanoemulsion mit vereinzelt liposomalen Strukturen in einer Zuckermatrix handelt. Der mittlere Durchmesser liegt zwischen 70-80 nm. Die Tropfengröße vergleichbarer Phospholipid Nanoemulsionen, wie sie in der Pharmazie [123, 15] zum Einsatz kommen und in Miniemulsionen der Lebensmitteltechnologie [52, 40, 56], sind deutlich größer und liegen zwischen 200 und 500 nm. Das bedeutet, dass die Tropfengröße hinsichtlich einer guten Lagerstabilität bei der hier untersuchten Nanoemulsion optimiert ist. Die unverdünnte Nanoemulsion ist aufgrund der angeglichenen Brechungsindizes der inneren und äußeren Phase transparent. In der Verdünnung mit Wasser kommt es zu einer leichten Trübung, da die Brechungsindizes sich aufgrund der Verdünnung mit Wasser unterscheiden. Aufgrund der geringen Tropfengröße und in Abhängigkeit von der Konzentration der dispersen Phase kommt es jedoch nur zu einer leichten Eintrübung der Verdünnung. Dieses optische Verhalten ist bei der Wahl der Anwendung zu berücksichtigen, je nachdem, ob das Lebensmittel trüb oder transparent sein muss.

6.2 Homogenisationsprozess

Bei den bisherigen Anwendungen der hier untersuchten Nanoemulsion im pharmazeutischen und kosmetischen Bereich [119, 120] ist die Herstellung mit einem Mikrofluidizer (Schematische Darstellung siehe Abb. 2.13) erfolgt. Die dabei gewählten Prozessparameter lassen sich nicht unverändert auf den hier eingesetzten Spalthomogenisator übertragen. Daher werden Prozess- und Emulsions-Parameter untersucht und hinsichtlich einer produkt schonenden, standardisierten Herstellung zum effektiven Tropfenaufbruch gewählt. Als Zielvorgabe für die Homogenisation gilt, dass ein mittlerer Tropfendurchmesser von 70 – 90 nm erreicht werden soll, um eine

gute Lagerstabilität der Emulsion zu erzielen. Das hierbei gewonnene Verständnis von den Zusammenhängen zwischen Eigenschaften der Rohemulsion und dem erzielten Homogenisationsergebnis erlaubt es, für Rezepturveränderungen technologisch bedingte Grenzen abzustecken. Innerhalb dieser Grenzen kann die Rezeptur den Anforderungen des Ziellebensmittels angepasst werden, ohne das Homogenisationsergebnis zu beeinträchtigen.

Aufgrund der Vielzahl von Einflussgrößen sowie der schlechten Zugänglichkeit für Messinstrumente wegen der sehr kleinen Geometrien gibt es bis zum heutigen Tag keine geschlossene Theorie für den Homogenisierungsprozess, mit der sich solche Zusammenhänge simulieren lassen [104]. Die empirische Bestimmung der relevanten Parameter ist nach wie vor unerlässlich.

6.2.1 Prozessoptimierung

Homogenisationszeit

Um die optimale Homogenisationsdauer zu ermitteln, wird die Rohemulsion für 4 Minuten bei 1000 bar kontinuierlich homogenisiert. Dabei wird in regelmäßigen Abständen die Tropfengröße bestimmt. In Abb. 5.5 ist zu beobachten, dass die Tropfengröße stetig abnimmt. Nach 129 Sekunden ist die Tropfengröße auf 83,9 nm abgefallen. Bereits nach 150 Sekunden ist ein mittlerer Tropfendurchmesser von 70,1 nm erreicht. Eine längere Homogenisationszeit (240 Sekunden) verkleinert die Tropfen nicht weiter. Das System hat seine Leistungsgrenze erreicht. Es gilt $We_{turb} \leq We_{turb,krit}$ und $We_{lam} \leq We_{lam,krit}$ (siehe Kap. 2.6.3 und 2.6.3).

Das bedeutet, dass bei den im Homogenisator auftretenden Strömungsverhältnissen kein weiterer Tropfenaufbruch mehr möglich ist. Der maximale Durchmesser (d_{max}), der nicht mehr zerkleinert wird, ist erreicht. Nur durch eine Veränderung der Strömungsverhältnisse, z. B. durch die Erhöhung des Homogenisationsdruckes lässt sich d_{max} noch reduzieren.

Homogenisationstemperatur

Um ein Maß für die thermische Beanspruchung der Emulsion während der Homogenisation zu erhalten, wird der Temperaturverlauf während der Homogenisation gemessen. Beginnend bei einer Raumtemperatur von 20°C steigt die Temperatur der Emulsion während der Homogenisierung stetig an. Nach einer Homogenisationszeit von 240 Sekunden ist die Temperatur auf 76,4°C angestiegen (siehe Abb. 5.6). Verantwortlich für diesen Anstieg sind große mechanische Kräfte, die auf die Emulsion bei der Passage durch den Homogenisator ausgeübt werden.

Vergleicht man die Ergebnisse der Messung Temperaturverlauf und Tropfengrößenveränderung miteinander, so lässt sich erkennen, dass bei einer Homogenisationszeit von 129 Sekunden die Tropfengröße erstmals unter 100 nm fällt. Die dabei zeitgleich erreichte Temperatur beträgt 60°C. Um zu prüfen ob eine Temperatur von 60°C entscheidende Voraussetzung für das Erzielen von Tropfengrößen < 100 nm ist, oder ob die Tropfengröße eine reine Funktion der Homogenisationszeit ist, wird ein Versuch mit vorgeheiztem Premix durchgeführt (siehe Tabelle 5.1). Deutlich wird, dass sowohl die Homogenisationsdauer als auch die Temperatur eine Rolle spielen. Durch die Vorheizung des Systems kann die Hochdruckhomogenisationszeit verkürzt und die mechanische Belastung reduziert werden. Aus diesen Ergebnissen ergibt sich, dass bei einer nicht vorgeheizten Rohemulsion eine Homogenisationszeit von 150 Sekunden notwendig ist, um Tropfengrößen von 70 – 90 nm zu erzielen, die als Zielvorgabe für den Prozess gemacht werden. Eine Verkürzung der Homogenisationszeit kann dadurch erreicht werden, dass die Emulsion auf 60°C vorgeheizt wird. Damit verkürzt sich die Homogenisationszeit auf 120 Sekunden. Wichtig ist auch zu berücksichtigen, dass die kritische Temperatur des Lecithins von 70°C, oberhalb derer es nicht mehr stabil ist nicht überschritten wird [127]. Bei einer drei-minütigen Homogenisationszeit, wie sie in dieser Arbeit eingesetzt wurde, kommt es maximal zu einer Erhitzung auf 65 °C.

6.2.2 Einfluss der Emulsionseigenschaften und Emulsionszusammensetzung auf das Homogenisationsergebnis

Da, wie oben gezeigt, auch die Emulsionstemperatur neben der Homogenisationszeit für den Tropfenaufbruch relevant ist, wurden die temperaturabhängige dynamische Viskosität der kontinuierlichen und der dispersen Phase untersucht, um ihren Einfluss auf das Emulsionsergebnis diskutieren zu können. Zusätzlich wurden Veränderungen in der Zusammensetzung der Emulsion (Öl- und Fruktosekonzentration) vorgenommen, um ihre Auswirkung auf die Hochdruckhomogenisation zu untersuchen. Beide Untersuchungen erlauben es Aussagen zum einen über die Aufnahmekapazität der Emulsion für die Öl-Phase zu machen und zum anderen abzuschätzen, innerhalb welcher Grenzen sich die Fruktosekonzentration variieren lässt ohne das Emulsionsergebnis zu beeinträchtigen.

Abbildung 5.7 zeigt deutlich, wie die Werte für die dynamische Viskosität der dispersen Phase während der Hochdruckhomogenisation stetig abfallen. Stellt man diese Werte der Temperatur und der Tropfengröße gegenüber (siehe Tab. 5.2), so lässt sich erkennen, dass mit fallender Viskosität aufgrund steigender Temperatur die Tropfengröße abnimmt. Zwar lässt sich dieser Zusammenhang mit dieser Messung nicht eindeutig belegen, da der Tropfenaufbruch auch von anderen Temperatur abhängigen Größen abhängt, aber dieser Zusammenhang lässt sich auch theoretisch deuten:

In Gleichung 2.12 lässt sich erkennen, dass eine niedrige dynamische Viskosität der dispersen Phase die kritische Deformationszeit reduziert. Damit können bereits kürzer angreifende Spannungen zum Tropfenaufbruch führen. Diese Hypothese deckt sich mit den Literaturdaten: Schultz, Wagner und Ulrich konnten zeigen, dass der Tropfenaufbruch mit steigender Viskosität der dispersen Phase erschwert ist. Die Tropfen verhalten sich mehr und mehr wie starre Kugeln, die schwerer zu deformieren sind [104]. Auch Tesch [116] fand diesen Zusammenhang heraus und folgerte daraus, dass die Tropfendeformation und der Tropfenaufbruch im Spalthomogenisator in turbulenter Strömung und eventuell mit Kavitation stattfindet. Die hier bei der Homogenisation auftretende Temperaturerhöhung ist in diesem Punkt von Vorteil, da sie zu einer Reduzierung der dynamischen Viskosität der dispersen Phase führt.

Bei der hier eingesetzten Nanoemulsion ist der hohe Gehalt an Fruktose (70%) in der dispersen Phase auffällig. Dies unterscheidet sie signifikant von anderen Phospholipid Nanoemulsionen [22, 99, 64]. Um die Frage zu klären, ob dieser hohe Fruktosegehalt für das Emulgierergebnis Ausschlag gebend ist, oder ob für die Produktentwicklung ein gewisser Spielraum besteht, werden Rohemulsionen mit verschiedenen Fruktosekonzentrationen (0%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%) homogenisiert und deren Tropfengrößen untersucht. Abbildung 5.8 fasst die Ergebnisse zusammen. Bei gleichen Homogenisationsbedingungen besteht ein linearer Zusammenhang zwischen Fruktosekonzentration und der mittleren Tropfengröße der dispersen Phase. Die besten Ergebnisse, d.h. die kleinsten Tropfengrößen, werden bei einer Fruktoselösung mit 60 bzw. 70% Fruktose erzielt.

Das verbesserte Emulsionsergebnis bei steigender Fruktosekonzentration lässt sich über die steigende Viskosität der kontinuierlichen Phase erklären. Wie bereits in Abb. 5.7 gezeigt, steigt die Viskosität der kontinuierlichen Phase mit steigender Fruktosekonzentration an. Sie ist damit in der Lage, die Tropfenkollision der neu gebildeten Tropfen und die damit verbundene mögliche Aggregation abzubremesen. Dieser Zusammenhang lässt sich über die Smoluchowski Gleichung beschreiben, wonach gilt, dass die Reduktion der Aggregation von Öltropfen aufgrund der hohen Viskosität des Mediums zustande kommen kann.

Nach Smoluchowski gilt:

$$k_D = \frac{8k_B T}{3\eta_k}, \quad (6.1)$$

Diese durch den Stabilisator Fruktose erhöhte Kurzzeitstabilität schafft dem Emulgator Lecithin mehr Zeit, um die neu gebildeten Oberflächen zu besetzen und zu stabilisieren.

Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Tesch [116], die zeigen konnte, dass aufgrund erhöhter Viskosität die Koaleszenz unmittelbar nach dem Tropfenaufbruch vermindert ist. Als Ursache beruft sie sich auf die Arbeiten von Stang [109], der die

Theorie aufstellte, dass die höhere Viskosität der kontinuierlichen Phase die Emulsion hydrodynamisch stabilisiert, indem die Drainage der Zwickelflüssigkeit zwischen zwei kollidierenden Tropfen verlangsamt ist. Anders ist es bei niedriger Fruktosekonzentration. Hier sind die Tropfen weniger in ihrer Beweglichkeit behindert. Einige können wieder koaleszieren, bevor sie durch das Lecithin stabilisiert werden. Das Homogenisationsergebnis ist schlechter.

Bei der Untersuchung eines dispersen Systems zur Stabilisierung von flüchtigen Aromastoffen ist es auch von Bedeutung zu wissen, welche Aufnahmekapazität das System für die Ölphase besitzt. Die Tropfengröße in Abhängigkeit vom Dispersphasenanteil sind in Tabelle 5.3 zu sehen. In dem hier untersuchten Rahmen konnte beim Anstieg des Dispersphasenanteils keine signifikante Zunahme der durchschnittlichen Tropfengröße ermittelt werden. Die Unterschiede liegen im Rahmen der Messgenauigkeit. Das ist in Übereinstimmung mit den von Schubert ermittelten Ergebnissen. Laut Schubert [103] spielt der Volumenanteil der dispersen Phase bei der Hochdruckhomogenisation keine Rolle beim Tropfenaufbruch. Auch bei den Ergebnissen von Schultz, Wagner und Ulrich ist der Einfluss des Anteils der dispersen Phase ϕ_k bei der Hochdruckhomogenisation zu vernachlässigen, wenn in ausreichendem Maße Emulgatormoleküle zur Stabilisierung der neu gebildeten Oberflächen vorhanden sind [104]. Im Widerspruch dazu stehen die Ergebnisse von Tesch, die zeigte, dass höhere Ölgehalte zu größeren Tropfen führen und es ab einer gewissen Ölkonzentration zum Aufbruch der Emulsion kommt.

Zusammenfassend lässt sich zeigen, dass die Kombination von 20% Miglyol und 70%iger Fruktoselösung in der hier verwendeten Rezeptur bei der Homogenisation im Spalthomogenisator zu dem besten Homogenisationsergebnis führt. Ohne Einbußen an der Emulsionsgüte lässt sich der Dispersphasenanteil im Bereich von 17,5–40,0% Miglyol variieren. Eine Konzentration von 60–70% Fruktose in der kontinuierlichen Phase stellt die Konzentration dar, mit der die Fruktose als Stabilisator optimal arbeitet und die kleinsten Tropfendurchmesser erzielt werden können. Will man im Rahmen weiterer Produktentwicklungen die Zusammensetzung der beiden Phasen ändern, sollte diesem Zusammenhang Beachtung geschenkt werden.

6.2.3 (R)-(+)-Limonen-Verluste durch die Hochdruckhomogenisation

Bei der Entwicklung einer geeigneten Aromaformulierung für Limonen ist auch die Wirtschaftlichkeit der Herstellung hinsichtlich der Produktverluste wichtig. Im Vergleich zu anderen Aromastoffformulierungen wie den sprühgetrockneten Pulvern, zeigt die Herstellung der Nanoemulsion mit Limonen signifikant geringere Verluste. In Tabelle 5.4 ist der prozentuale Limonenverlust bei der Herstellung bestimmt worden.

Daraus ergibt sich für die Herstellung eine durchschnittliche Verlustrate von 3,8%, die im Vergleich zu Pulvern zur Stabilisierung von Limonen signifikant geringer ist. S. Jafari, Yinghe He und Bhesh Bhandari fanden bei besten Maltodextrin Emulatorkombinationen eine Verlustrate von 13,8% [55] und A. Bertolini, A. Siani, und C. Grosso fanden bei einer Verkapselung von Limonen mit Gummi Arabicum 9-25% Verlustrate in Abhängigkeit von der Konzentration an Kapselmaterial [19].

6.3 Kinetische Lagerstabilität der Phospholipid Nanoemulsion

Bei der Untersuchung von Emulsionen, die zur Stabilisierung von Aromen dienen sollen, ist es von entscheidendem Interesse zu wissen, welche physikalische Lagerstabilität die Emulsion als Konzentrat während der Lagerung beim verarbeitenden Betrieb und in der Verdünnung besitzt. Gefordert werden z. B. von der Getränkeindustrie sechs Monate in der Verdünnung [37]. Langzeitlagertests gehören dabei zu den üblichen Verfahren zur Beurteilung der kinetischen Stabilität von Emulsionen [15]. Dabei werden zur Beurteilung der mittlere Tropfendurchmesser und das Zeta-Potenzial bestimmt [87]. Im ersten Teil dieses Kapitels wird die Stabilität der Nanoemulsion ohne Limonen untersucht, um dann im zweiten Teil die Stabilität des Systems mit Limonen bei gleichen Lagerbedingungen und in Abhängigkeit von der Limonenkonzentration zu untersuchen. So lassen sich zusätzlich Aussagen über den Einfluss des Limonens auf die Lagerstabilität machen, und zeigen welche Limonenkonzentrationen sich gut stabilisieren lassen.

6.3.1 Kinetische Lagerstabilität der Phospholipid Nanoemulsion ohne (R)-(+)-Limonen

Lagertest bei -18°C

Während der Lagerung bei -18°C nehmen die mittleren Tropfengrößen bei der 4,0% und der 0,5%igen Verdünnung bereits zu Beginn der Lagerung zu, halten sich jedoch im weiteren Verlauf der Lagerung unverändert auf diesem höheren Niveau (siehe Abbildung 5.9). Anders verhält es sich bei der unverdünnten Nanoemulsion. Hier findet kein signifikanter Anstieg der Tropfengröße statt. Es wird deutlich, dass die Verdünnung des Systems bei der Lagerung bei -18°C eine signifikante Rolle spielt. In der unverdünnten Probe liegt kaum freies Wasser aufgrund der hohen Fruktosekonzentration vor. Als Folge kommt es zu einer Erniedrigung des Gefrierpunktes. Die Nanoemulsion ist bei -18°C nicht gefroren, sondern pastös. Anders bei den Verdünnungen — hier gefrieren die Proben. Es ist davon auszugehen, dass diese

Ausbildung von Kristallen verantwortlich für die schlagartige Erhöhung der Tropfengröße ist. Beim Tiefgefrieren von stark wasserhaltigen Lebensmitteln (wie hier in den beiden Verdünnungen) kommt es zu einer Schädigung von Membranen durch die Entstehung großer Eiskristalle [115]. Es ist sehr wahrscheinlich, dass diese Kristalle die Lecithinmembran teilweise zerstören und so zu einer stärkeren Koaleszenz der Tropfen führen. Warum jedoch die Emulsion nicht vollständig aufbricht, konnte nicht geklärt werden. Das Zeta-Potenzial steigt bei allen drei Verdünnungen nie über $-37,1$ mV an. Eine eindeutige Abhängigkeit vom Verdünnungsgrad ist dabei nicht zu erkennen. Gegen Ende der Lagerung fällt das Zeta-Potenzial bei allen drei Verdünnungen auf Werte zwischen $-43,19$ und $-57,23$ mV ab (siehe Abbildung 5.10). Dieser Effekt lässt sich mit den hier gemachten Versuchen nicht erklären.

Als Ergebnis kann man sagen, dass bei der Lagerung der unverdünnten Nanoemulsion die Proben über 250 Tage lang stabil bleiben. In den Verdünnungen kommt es jedoch trotz ausreichender elektrostatischer Stabilisierung zum Anwachsen der Tropfen, vermutlich aufgrund von Kristallbildung (siehe oben). Damit eignet sich die unverdünnte Nanoemulsion für eine Tiefkühlagerung ohne Einbußen in ihrer Stabilität.

Lagertest bei 8°C

Zu Beginn der Lagerung sind die mittleren Tropfengrößen bei allen drei Verdünnungsstufen < 90 nm. Entlang der Lagerung steigt die durchschnittliche Tropfengröße bei allen drei Versuchen nicht signifikant an (siehe Abbildung 5.11). Das heißt, dass es über 250 Tage bei 8°C unabhängig vom Verdünnungsgrad zu keiner Beeinträchtigung der Lagerstabilität kommt.

Der Verlauf des Zeta-Potenzials bei 8°C ist bei allen Verdünnungen annähernd gleich. Der große Teil der Werte schwankt innerhalb von -30 und -45 mV, mit Ausreißern nach oben und nach unten ohne dass ein eindeutiger Trend erkennbar wird (siehe Abbildung 5.12). Das entspricht nach R. Schumann [105] dem für Emulsionen mit Lecithin typischen Zeta-Potenzial-Werten zwischen -30 und -50 mV. Die Schwankungen zwischen den einzelnen Tagen verlaufen für alle drei Verdünnungen fast einheitlich. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die Qualität des destillierten Wassers von Tag zu Tag geschwankt haben kann. Bereits geringe Konzentrationen an Elektrolyten wirken sich auf diese sehr empfindliche Messung aus. Dieser Fehler wird aber systematisch, wenn man die Messwerte am gleichen Tag miteinander vergleicht. Der Verlauf der Zeta-Potenziale ohne eindeutigen Trend deckt sich mit der gleichbleibenden Stabilität der Emulsionen. Die hier gemessenen Zeta-Potenziale < -30 mV führen alle zu einer guten elektrostatischen Stabilität. Diesen Wert nennt auch R. Müller [73] als Voraussetzung für eine elektrostatische Stabilisierung einer Emulsion. Das ist in Übereinstimmung mit Werten für andere Lecithinmischungen

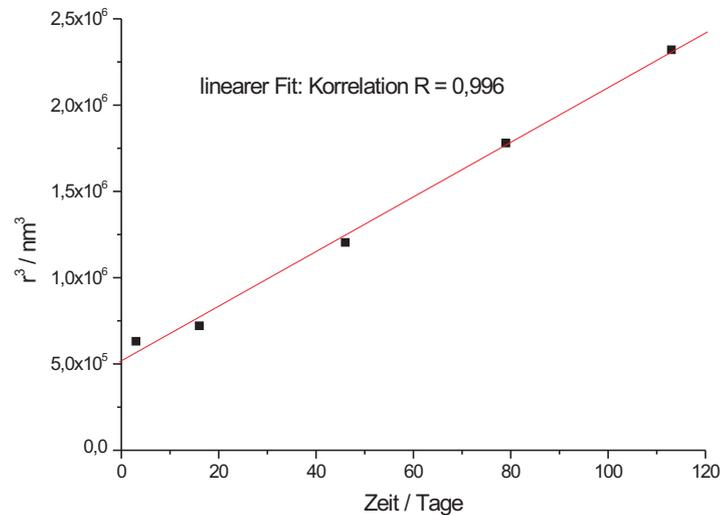


Abbildung 6.2: Abhängigkeit der Kuben der Partikeldurchmesser gegen die Lagerung als Test der verdünnten Nanoemulsion (0,5%ige Verdünnung bei 30°C) ohne Limonen auf Ostwaldreifung

in den Untersuchungen von C. Washington, A. Chawla, N. Christiy et al. Sie machen aber auch deutlich, dass diese Werte sich nicht von einem Lecithinpräparat auf ein anderes übertragen lassen, da neben den Unterschieden in der Phospholipidzusammensetzung auch sonstige Begleitstoffe (Elektrolyte) relevant sein können [123].

Lagertest bei 30°C

Eine deutliche Abhängigkeit der Lagerstabilität von der Verdünnungsstufe lässt sich bei der Lagerung bei 30°C erkennen (siehe Abbildung 5.13). Mit steigendem Verdünnungsgrad steigt auch der Tropfendurchmesser stärker an. Um beurteilen zu können, welche Destabilisierungsprozesse eine Rolle spielen, wird ein Test auf Ostwaldreifung bei der 0,5%igen Verdünnung durchgeführt (Abb. 6.2) [54, 27]. Hier deutet der lineare Verlauf der Kurve auf Ostwaldreifung hin. Das deckt sich mit den Ergebnissen von R. Buffo und G. Reineccius [27], die zeigen konnten, dass bereits bei O/W-Emulsionen mit größeren Tropfendurchmessern die Ostwaldreifung von entscheidender Relevanz für die Destabilisierung ist. Je kleiner die Öltröpfen und je höher die Löslichkeit der dispersen Phase in der kontinuierlichen Phase ist, desto leichter kann Ostwaldreifung auftreten (siehe Gleichung (2.8)). Da Miglyol besser wasserlöslich ist als andere Speiseöle und der hier vorherrschende mittlere Tropfen-

durchmesser sehr gering ist, kann zusammen mit dem Test auf Ostwaldreifung davon ausgegangen werden, dass sie für das beobachtete Tropfenwachstum mit verantwortlich ist. Das schließt aber nicht automatisch Koaleszenz und Flokkulation aus. Es ist wahrscheinlich, dass die drei Prozesse parallel ablaufen.

Da die Verdünnungsstufe bei 30°C eine deutliche Rolle spielt, ist anzunehmen, dass die Viskosität der äußeren Phase relevant ist. Die unverdünnte Nanoemulsion und die 4%ige Verdünnung besitzen eine höhere Viskosität als die 0,5%ige Verdünnung. Bei 0,5% kommt es aufgrund einer niedrigeren Reibungskraft (siehe Gleichung (2.6)) zu einem rascheren Aufrahmen der Tropfen und damit zur Koaleszenz und Flokkulation. Höhere Fruktosekonzentrationen hingegen bremsen die Bewegung der Tropfen aufgrund höherer dynamischer Viskositäten stärker ab. Dieser Zusammenhang ist am Stokes'schen Gesetz (siehe Gleichung 2.7) zu erkennen. Auch die Aggregationsrate der Tropfen und die Ostwaldreifung sind aufgrund eines niedrigeren Diffusionskoeffizienten reduziert (siehe Gleichung 2.2).

Beim Zeta-Potenzial lässt sich bei allen drei Verdünnungsstufen kein eindeutiger Trend erkennen (siehe Abbildung 5.14). Die Werte schwanken zwischen -30 und -48 mV. Das deckt sich mit den Wertebereichen bei den anderen beiden Lagerungstemperaturen. Der in Abb. 5.13 deutliche Anstieg der mittleren Tropfengröße bei der 0,5%igen Verdünnung findet sich in keiner Form bei dem Verhalten des Zeta-Potenzials wieder. Das legt nahe, dass für den Anstieg der Tropfengrößen (siehe oben) nicht eine Erhöhung des Zeta-Potenzials, z. B. durch pH-Wert Änderung oder den Abbau des Limonens eine Rolle spielt, sondern dass andere Temperatur abhängige Größen, wie z. B. die Diffusionsgeschwindigkeit bei der Ostwaldreifung oder die Aufrahmungsgeschwindigkeit relevant sind.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die unverdünnte Nanoemulsion durch eine hohe Lagerstabilität bei allen hier untersuchten Lagerungsbedingungen auszeichnet. Sie bleibt entlang der hier untersuchten 250 Tage ohne deutlichen Anstieg der Tropfengröße stabil, so dass davon auszugehen ist, dass auch längere Lagerzeiten nicht zum raschen Aufbruch der Emulsion führen. Auch die Verdünnungen zeigen zwar bei -18 °C und 30 °C einen Anstieg der Tropfengrößen, aber sie bleiben dennoch stabil. Alle untersuchten Nanoemulsionen besitzen eine gute elektrostatische Stabilisierung mit Zeta-Potenzialen unterhalb von -30 mV. Das ist in Übereinstimmung mit den Werten, die von C. Washington, A. Chawla, N. Christy et al. gemessen wurden [123]. Sie konnten in O/W -Emulsionen mit verschiedenen Lecithinmischungen, die wie das hier verwendete S75 der FA. Lipoid einen hohen PC Gehalt besitzen, zeigen, dass erst Werte größer -22 bis -28 mV zu einem Aufbruch der Emulsion führen. Bei höheren Temperaturen (30°C) findet zwar ein leichtes Tropfenwachstum in Abhängigkeit von der Verdünnung statt, aber es kommt nicht zum Aufbruch der Emulsionen. Hier kann Ostwaldreifung als einer der relevanten Destabilisierungsprozesse nachgewiesen werden. Weiterführende Untersuchungen, die den Austausch

von Miglyol gegen lipophilere Speiseöle zur Reduzierung der Ostwaldreifung zum Gegenstand haben, sind an dieser Stelle sinnvoll, wurden aber im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. Generell gilt, dass das Tropfenwachstum bei steigender Temperatur ansteigt, da bei hohen Temperaturen alle relevanten Destabilisierungsprozesse (Aggregation, Aufrahmung und Ostwaldreifung) schneller ablaufen (siehe oben).

6.3.2 pH-Wert und Zeta-Potenzial

Der Einsatz eines amphoteren Emulgators zur Aromastabilisierung macht es notwendig, sich den Zusammenhang zwischen Oberflächenaktivität und Milieubedingungen anzuschauen, da die elektrostatische Stabilität unmittelbar von der Anwesenheit von Ladungsträgern abhängt. Das Phosphatidylcholin in der Lecithinmischung ist bei einem pH-Wert von 7 elektrisch neutral. Senkt man den pH-Wert weiter ab, so wird es positiv geladen. Bei einer frisch hergestellten Nanoemulsion nach Basisrezeptur 4.3 liegt der pH-Wert bei ca. 6,75. Verantwortlich für das negative Zeta-Potenzial der Nanoemulsion ist hier das Phosphatidylethanolamin. Aus der Literatur ist ein starker Zusammenhang zwischen dem Zeta-Potenzial bei Phospholipid Emulsionen und ihrem pH-Wert bekannt [122, 64].

Um den Einsatzbereich der Phospholipid Nanoemulsionen besser abstecken zu können, wurde der in Abbildung 5.15 dargestellte Zusammenhang zwischen pH-Wert und Zeta-Potenzial untersucht. Es wird deutlich, dass das Zeta-Potenzial bei steigendem pH-Wert absinkt. Dieser Verlauf ähnelt den von M. Levy und S. Benita gemessenen Werten für eine Phospholipid Nanoemulsion für die parenterale Ernährung. Sie verwendeten ein in der Zusammensetzung dem hier verwendeten Lipoid S 75 sehr ähnliches Lecithin [64]. Für die Stabilität der Emulsion gilt, dass je höher der Betrag des Zeta-Potenzials, desto höher ist die elektrostatische Abstoßung zwischen den Tropfen und desto höher die Stabilität der Nanoemulsion. Im Säuren kommt es zu einer zunehmenden Neutralisierung der negativen Ladungen des PE durch die Anlagerung von Protonen und damit zu einer Erhöhung des Zeta-Potenzials.

Dieser Zusammenhang zwischen Zeta-Potenzial und Stabilität von Emulsionen findet sich auch bei Washington, Athersuch und Kynoch [122] und Washington, Chawla und Christy [123].

Die in in der vorliegenden Messung gemachten Werte stehen scheinbar im Widerspruch zu den Messungen des Zeta-Potenzials bei dem Lagertest der Nanoemulsion ohne Limonen (siehe Kapitel 6.3.1). Dort wurde am 3. Tag der Einlagerung (bei einem pH-Wert von 5,7 - 5,5) ein Zeta-Potenzial von -30 und -45 mV in Abhängigkeit von Verdünnungsgrad und Lagertemperatur gemessen, das hier zu einer guten Stabilität der Nanoemulsion ausreicht. Bei der hier vorliegenden Messung würde man bei

einem solchen pH-Wert ein Zeta-Potenzial von > -20 mV erwarten, das aber in keinem der Lagertests mit und ohne Limonen gemessen wurde. Da das Zeta-Potenzial nicht nur vom pH-Wert, sondern auch von anderen Parametern, wie der Elektrolytkonzentration oder Komplexbildnern für bivalente Ionen abhängt [43, 124], lassen sich in dieser Messung zwar die Abhängigkeiten zeigen, nicht aber ein für die Stabilität kritischer pH-Wert bestimmen. Dieser kann nur unter Berücksichtigung der übrigen Milieufaktoren durch Einbringen der Nanoemulsion in das jeweilige Ziellebensmittel untersucht werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Einsatz einer Phospholipid Nanoemulsion zur Aromenstabilisierung in Lebensmitteln entscheidend von den Milieubedingungen im Ziellebensmittel abhängt. Generell gilt, dass niedrige pH-Werte sich nachteilig auf die Stabilität auswirken, dass aber eine theoretische Einschätzung eines kritischen pH-Bereiches so nicht möglich ist, da das Zeta-Potenzial von vielen Faktoren negativ oder positiv beeinflusst wird [122, 124]. Nur Untersuchungen der Nanoemulsion in Lebensmitteln können darüber Aufschluss geben.

6.3.3 Kinetische Lagerstabilität der Phospholipid Nanoemulsion mit (R)-(+)-Limonen

Um die hier beschriebene Phospholipid Nanoemulsion zur Stabilisierung von Limonen in Lebensmitteln einsetzen zu können, muss als erstes gewährleistet sein, dass das Limonen sich gut in der Nanoemulsion dispergieren lässt. Dieses System sollte einen ähnlich niedrigen mittleren Tropfendurchmesser und gute kinetische Stabilität wie die Nanoemulsion ohne Limonen besitzen. Zu diesem Zweck wird die Lagerstabilität der Nanoemulsion mit Limonen in Abhängigkeit von der Limonenkonzentration (2,5% und 5,0% Limonen), der Lagertemperatur und der Lagerzeit untersucht.

Wie in Abb. 5.16 anhand der mittleren Tropfengrößen zu erkennen ist, lassen sich 2,5% Limonen zu einer Nanoemulsion emulgieren, deren mittlere Tropfengröße (79,3 nm) denen der Nanoemulsion ohne Limonen (82,8 nm) innerhalb der Messgenauigkeit entspricht. Ähnlich verhält es sich bei dem System mit 5,0% Limonen (Abb. 5.17): Hier liegen die Tropfengrößen von durchschnittlich 102,9 nm etwas höher.

Bei 2,5% Limonen lässt sich bei allen drei Lagertemperaturen innerhalb der hier betrachteten 95 Tage kein signifikanter Anstieg der Tropfengrößen erkennen. Die Unterschiede zwischen den Ergebnissen bei den verschiedenen Temperaturen liegen überwiegend im Bereich des Messfehlers, d.h. die Emulsion verhält sich in diesem Zeitraum kinetisch stabil. Die zugehörigen Zeta-Potenziale (siehe Abb. 5.18) zeigen auch keine Temperaturabhängigkeit, ihr Betrag ist leicht fallend, bleibt aber immer oberhalb von $|30$ mV, der sich auch in den Versuchen ohne Limonen als ausreichend für die Stabilität gezeigt hat (siehe Abbildungen 5.10, 5.12, 5.14, 5.9, 5.11, 5.13). Die Stabilität der Nanoemulsion mit Limonen ist im beobachteten Zeitraum mit der der

Nanoemulsion ohne Limonen vergleichbar. Eine Ausnahme bildet die Lagerung bei 30°C. Hier ist die Stabilität der Emulsion mit 2,5% Limonen gegenüber der Stabilität der Emulsion ohne Limonen verbessert.

Auch bei 5,0% Limonen (siehe Abb. 5.17) zeigt sich keine Temperaturabhängigkeit der Tropfengrößen. Jedoch ist der Verlauf der drei Graphen leicht steigend. Die Tropfendurchmesser steigen leicht von 103 auf 110 nm an. Der Verlauf der zugehörigen Zeta-Potenziale ist Temperatur abhängig und deutlich steigend (siehe Abb. 5.19). Mit steigender Temperatur steigt auch die Steigung der Kurven von ca. -52 mV auf Werte zwischen -43 bis -23 mV. Diese Abnahme der elektrostatischen Stabilisierung findet sich nicht im Verlauf der Tropfendurchmesser wieder. Neben dem Zeta-Potenzial sind offensichtlich noch andere Faktoren an der Stabilisierung beteiligt (siehe Kap. 6.3.2).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich 2,5% und 5,0% Limonen in der Phospholipid Nanoemulsion gut stabilisieren lassen und diese Emulsionen weisen ähnlich gute Stabilitäten wie das System ohne Limonen auf. Es ist davon auszugehen, dass die Stabilisierungsmechanismen denen der Nanoemulsion ohne Limonen entsprechen, daher wird an dieser Stelle auf Kapitel 6.1 zur weiteren Erklärung verwiesen.

Zur besseren Einordnung dieser Ergebnisse wird ein Vergleich mit der Literatur vorgenommen: Kim, Morr und Schenz [58] untersuchten Gummi Arabicum, Soya Proteinisolat, Weizen Proteinisolat und Natrium Caseinat zur Stabilisierung von Orangenöl ohne den Einsatz von Weighting Agents in einer O/W-Makroemulsion. Die von ihnen durch Hochdruckhomogenisation minimal erreichten Tropfendurchmesser lagen bei $4 \mu\text{m}$. Sie konnten eine Stabilität der untersuchten Emulsionen bei 20–25°C für 10 Tage nachweisen, über den weiteren Verlauf der Lagerstabilität machen sie keine Aussagen. Die hier untersuchte Nanoemulsion erreicht ca. 50-fach geringere Tropfendurchmesser und wird über einen 10-fach höheren Zeitraum bei 20 °C untersucht ohne Veränderung in der Lagerstabilität zu zeigen.

In der Arbeit von A. Edris [40] wurden 20% Orangenöl in O/W-Emulsionen mit 6% Natrium Caseinat stabilisiert und ihre Lagerstabilität bei den Temperaturen von 4°C, 23°C und 55°C über einen Zeitraum von 100 Tagen untersucht. Die durch die Hochdruckhomogenisation bei 1.000 bar mit einem Mikrofluidizer erzielten Tropfengrößen lagen bei durchschnittlichen Werten von 290 nm. Er konnte bei einer Lagerung von 100 Tagen bei 4°C und bei 23°C keinen Anstieg der Tropfengrößen nachweisen. Er verglich seine Emulsion mit einer Emulsion gleicher Zusammensetzung, bei der 1 Massenprozent Caseinat mit 1 Massenprozent Tween 80, das auch in Aromaemulsionen für Getränke eingesetzt wird, kombiniert wurde. Es erfolgte kein Zusatz von Weighting Agents. Hier verschlechterte sich die Stabilität bei einer Lagerung bei 23°C und 55°C im Vergleich zur Emulsion mit Casein als alleinigem Emulgator.

A. Edris stellte damit fest, dass Natrium Caseinat ein hohes Potenzial für die Sta-

bilisierung von Orangenöl in Emulsionen besitzt. Genauso gute Werte können im Rahmen dieser Arbeit für die Phospholipid Nanoemulsion nachgewiesen werden. Zusätzlich wird in dieser Arbeit die Stabilität der Nanoemulsion über einen weiteren pH-Wert Bereich untersucht. Da Edris seine Emulsion mit einem Puffer auf einen pH-Wert von 7 einstellte, um die elektrostatische Stabilisierung durch das Protein konstant hoch zu halten, kann er keine Aussagen darüber treffen, wie sich diese Stabilitäten mit fallendem pH-Wert verhalten.

Die in dieser Arbeit untersuchten Phospholipid Nanoemulsionen mit 2, 5 und 5,0% Limonen sind ungepuffert. Sie besitzen einen deutlich niedrigeren pH-Wert von 5,7 am Tag der Einlagerung bei 20°C und dieser fällt auf 5,1 nach 91 Tagen ab. Das zeigt zusätzlich eine Stabilität über einen weiteren pH-Wert Bereich.

6.4 Flüchtigkeit von (R)-(+)-Limonen in der Phospholipid Nanoemulsion

Beim Einsatz von Aromen in Lebensmitteln ist es von großer Relevanz, dass keine großen Aromaverluste während der Herstellung, Verarbeitung und Lagerung auftreten. Mit dieser Stabilisierung beschäftigen sich eine ganze Reihe von Untersuchungen [79, 84, 60]. Ziel der Stabilisierung ist, dass die Flüchtigkeit des jeweiligen Aromas (sein Dampfdruck) und damit seine Konzentration im Gasraum über der Emulsion möglichst gering ist. Aufgrund des hohen Dampfdrucks des Limonens (2,1 hPa bei 20°C) ist eine Reduzierung der Flüchtigkeit sinnvoll. In dieser Arbeit wird daher der Einfluss der Nanoemulsion auf die Flüchtigkeit des Limonens bei verschiedenen Temperaturen mittels Headspace Gaschromatographie untersucht.

Die Ergebnisse der gaschromatographischen Headspace Analyse (siehe Abb. 5.20) zeigen, dass die Freisetzung des Limonens im Vergleich zum Standard bei allen Temperaturen (7°C, 24°C und 60°C) signifikant reduziert ist.

Bei 7°C wird im Standard die 12,9-fache Menge an Limonen freigesetzt, bei 24°C ist es noch die 7,7-fache Menge und bei 60°C immerhin noch die 1,5-fache Menge.

Die Konzentration an Limonen in der Gasphase ist bei niedrigen Temperaturen geringer als bei hohen Temperaturen, da der Dampfdruck mit steigender Temperatur zunimmt (siehe Kap. 2.1.2). Da sich die Flüchtigkeit bei gleichem Gehalt an Limonen jedoch zwischen Nanoemulsion und Standard unterscheidet, gibt es offensichtlich neben der Temperatur noch weitere Faktoren, die die Flüchtigkeit des Limonens beeinflussen. Hinzu kommt, dass das Verhältnis der Flüchtigkeiten zwischen Standard und Emulsion nicht bei allen Temperaturen konstant ist, sondern sich die Werte mit steigenden Temperaturen angleichen. Um diese Effekte besser einordnen zu können, werden im Folgenden die einzelnen Phasen der Nanoemulsion hinsichtlich ihres Ein-

flusses auf den Dampfdruck des Limonens diskutiert. Zum besseren Verständnis sind in der Tabelle 6.1 die Strukturen der Nanoemulsion denen des Standards gegenüber gestellt.

Öle sind in der Lage, lipophile Aromen zu adsorbieren und zu lösen, so dass sie sich in der Ölphase anreichern. Das reduziert signifikant ihren Übergang in die Gasphase oder in die wässrige Phase. Dies spielt gerade in O/W-Emulsionen eine wichtige Rolle [70]. Auch J. Kinsella [59] beschäftigt sich mit dieser Abhängigkeit in seinen Untersuchungen von flüchtigen Aromastoffen in stark fetthaltigen Lebensmitteln. Chevance et al. konnten diesen Zusammenhang auch für Limonen belegen [33]. Bei zunehmendem Gehalt an Öl in der dispersen Phase nimmt die Freisetzung von R(+)-Limonen im Kopfraum der Probe ab, aufgrund der guten Löslichkeit des Terpens in Öl. Bei der hier untersuchten Emulsion zeichnen sich Miglyol und Limonen durch eine hohe Lipophilität aus, so dass sich das Miglyol gut als Lösungsmittel für das Limonen eignet und entscheidend für seine reduzierte Flüchtigkeit ist. Das ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Roberts et al. [95]. Sie konnten zeigen, dass das Öl in Emulsionen die Hauptkomponente ist, die die Freisetzung der flüchtigen Aromamoleküle beeinflusst. Je unpolarer dabei Öl und Aroma sind, desto stärker die Bindung des Aromas an die Ölmoleküle und desto geringer der Dampfdruck. Eine solche Beeinflussung des Dampfdruckes in Abhängigkeit von der Art des Öls kann in dieser Arbeit jedoch nicht bestätigt werden. In Abb. 5.21 ist kein signifikanter Unterschied zwischen dem Einsatz von Miglyol im Basissystem und Sonnenblumenöl in der Variation 3 zu beobachten.

Obwohl die Lecithingrenzfläche zwischen disperser und kontinuierlicher Phase nur einen sehr geringen Volumenanteil in der Emulsion besitzt, kann sie entscheidenden Einfluss auf die Verteilungskoeffizienten des Aromastoffes haben. Das Lecithin kann das lipophile Limonen an der Grenzfläche zwischen Öl und Fruktoselösung binden und so seine Konzentration in der Ölphase, der Wasserphase und dem Gasraum re-

Tabelle 6.1: Vergleich der Komponenten in der Nanoemulsion und im Standard

Komponenten	Nanoemulsion	Standard
Disperse Öl Phase	vorhanden	nicht vorhanden
Lecithin Grenzsicht	vorhanden	nicht vorhanden
Mizellen	vermutlich vorhanden	nicht vorhanden
Liposomen	vorhanden	nicht vorhanden
Kontinuierliche Phase mit Fruktose als Stabilisator	vorhanden	nicht vorhanden
Ethanol als Lösungsmittel	nicht vorhanden	vorhanden
Löslichkeit des Limonens	13,8 mg/kg Wasser bei 25°C	vollständig

duzieren [70, 8]. Zusätzlich reduziert es durch Absenkung der Oberflächenspannung der Tropfen die Löslichkeit des Limonens in der dispersen Phase (Gleichungen 2.8 und 2.9) und verzögert damit die Freisetzung.

Neben den Lecithinmolekülen in der Phasengrenzfläche gibt es in der Regel genug freie Emulgatormoleküle in der kontinuierlichen Phase, die Mizellen (siehe Kapitel 2.4) ausbilden können. In ihnen können sich unpolare Aromamoleküle lösen. So erhöhen die Mizellen die Affinität der unpolaren Moleküle für die kontinuierliche Phase [70, 111].

Neben Mizellen kann es bei einem Emulgatorüberschuss auch zur Ausbildung von Liposomen kommen. Die Anwesenheit von Liposomen in der Nanoemulsion konnte mit Hilfe der elektronenmikroskopischen Aufnahme bestätigt werden (siehe Abb. 5.1). Genauso wie Mizellen wirken sie sich auf den Verteilungskoeffizienten zwischen Gasraum und kontinuierlicher Phase aus. Al-Bawab et al. [8] konnten zeigen, dass der Dampfdruck von Limonen gelöst in Wasser höher ist, als bei der gleichen Menge an Limonen in einer Liposomen-Dispersion. Die Menge an Limonen, die sich in Wasser lösen lässt, ist gering (13,8 mg/kg bei 25°C). Die Gegenwart von Liposomen erhöht in dieser Arbeit von Al-Bawab et al. die Menge um 50%. Al-Bawab et al. gehen daher davon aus, dass ein Teil des Limonens in den Liposomen gelöst und so der Dampfdruck reduziert ist.

Diese Daten decken sich mit den Ergebnissen, die beim Einsatz der doppelten Menge an Lecithin gemacht wurden (siehe Abbildung 5.21). Hier wurde bei 60°C der Verteilungskoeffizient (siehe Gleichung (2.1) zwischen Emulsion und Gasraum für das Limonen bestimmt. Die Messung wurde einmal für die Basisrezeptur mit 5,0% Lecithin und für die Variation mit 10,0% Lecithin durchgeführt. Bei 10,0% Lecithin wird ein niedrigerer Verteilungskoeffizient erzielt, was sich vermutlich auf die oben genannten Eigenschaften des Lecithins zurückführen lässt. Die vorliegenden Ergebnisse machen es wahrscheinlich, dass das Lecithin in der Nanoemulsion eine weitere Barriere gegen die Freisetzung des Limonens bildet. Auch hier kann der Standard diese Stabilisierung des Aromas nicht bewirken, da ein Emulgator fehlt.

Da die Zusammensetzung der Nanoemulsion bei allen untersuchten Temperaturen gleich ist, ist ein Hauptunterschied bei steigender Temperatur die Reduzierung der dynamischen Viskosität in der kontinuierlichen Phase. Diese deutliche Abhängigkeit ist in Abbildung 5.7 zu sehen. Als Folge kommt es zu einem erhöhten Diffusionskoeffizienten (siehe Gleichung (2.2)) der Moleküle. Das erklärt, warum bei steigender Temperatur die Freisetzung des Limonens aus der Emulsion erhöht ist. Der Dampfdruck beim Standard und bei der Nanoemulsion steigt nicht in gleichem Maße an. Bei der Nanoemulsion steigt er stärker an als bei dem Standard, was dazu führt, dass die Differenz zwischen den Konzentrationen an Limonen im Kopfraum immer kleiner wird. Dieser Verlauf lässt sich dadurch erklären, dass sich bei höherer Temperatur die dynamische Viskosität der Fruktoselösung stark reduziert, im Standard die

Veränderung der dynamischen Viskosität aber zu vernachlässigen ist. Auch Nahon [81] und Roberts, Elmore [94] konnten bei Zuckern zeigen, dass diese die Freisetzungsrates von Aromamolekülen aus einer Emulsion aufgrund ihrer Eigenschaft die Viskosität der kontinuierlichen Phase zu erhöhen [70] reduzieren. Hinzukommt, dass durch Zucker die Konzentration an freiem Wasser in der kontinuierlichen Phase, das für die Lösung der Aromamoleküle relevant ist, reduziert wird. Dies wiederum erschwert die Freisetzung [70]. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Bredie, Mottram und Birch [24].

Anhand der vorliegenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die unverdünnte Nanoemulsion eine gute Möglichkeit darstellt, um den Dampfdruck des Limonens zu reduzieren. Das ist von Vorteil bei der Lagerung und Verarbeitung als Aromakonzentrat, da so Aromaverluste vermieden werden. Eine Reihe von Eigenschaften der Nanoemulsion spielen hierbei eine Rolle. Die Ölphase, die Emulgatorschicht, Liposomen, Mizellen und die äußere Fruktose-Wasser-Phase sind hier von Bedeutung. Welche Faktoren in welchem Umfang eine Rolle spielen konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht bestimmt werden, aber die Ergebnisse liefern eine gute Basis für Untersuchungsansätze, die sich damit beschäftigen, diese Nanoemulsion auch für andere lipophile, flüchtige Verbindungen einzusetzen. Verwandte Arbeiten, die sich mit der Freisetzung von flüchtigen Verbindungen aus wässrigen Systemen beschäftigen, sind für eine eindeutige Einordnung der hier erzielten Ergebnisse nicht geeignet, da sie sich in ihrem Versuchsaufbau zu stark von den hier gemachten Untersuchungen unterscheiden (D. Nahon, M. Harrison und Jacques Roozen [81], Scoot Rankin, Floyd Bodyfelt [93]), Wender Bredie, Donald Mottram and Gordon Birch [24]).

6.5 Chemische Stabilität von (R)-(+)-Limonen in der Nanoemulsion

Die Verringerung der sensorischen Akzeptanz eines Lebensmittels ist ein Wechselspiel zwischen der Verminderung von sensorisch positiv bewerteten Aromastoffen und der Konzentrationserhöhung von Verbindungen, die negativ bewertete Aromastoffe einbringen. Diskutiert man die Phospholipid Nanoemulsion als System zur Stabilisierung von Limonen, so ist es daher von großer Relevanz zu untersuchen, ob sie in der Lage ist, dass chemisch sehr instabile Limonen besser vor chemischem Abbau zu schützen. Zahlreiche Veröffentlichungen haben sich bereits mit dieser Fragestellung befasst [39, 90, 80], aber Untersuchungen zu Limonen in einer Phospholipid Nanoemulsion fehlen bisher. Limonen ist eine Verbindung, die neben ihrer hohen Flüchtigkeit auch sehr anfällig für Oxidation und säurekatalysierten Abbau ist. Soll Limonen als Aroma in Lebensmitteln eingesetzt werden, so können gerade diese Ab-

bauprodukte (siehe 2.2.1) zu einer sensorischen Beeinträchtigung des Lebensmittels führen [80, 49]. Da es während der Herstellung und Lagerung von Aromaemulsion zu unterschiedlichen Lagerbedingungen kommen kann, wurde daher der Limonenabbau in Abhängigkeit von Temperatur, Licht und Zeit und Verdünnungsgrad untersucht. Unterstützt werden diese Ergebnisse durch die Messung der Bildung der drei Abbauprodukte Carvon, Carveol und Terpeneol. Im Folgenden werden diese Ergebnisse diskutiert.

6.5.1 Abbau von (R)-(+)-Limonen

Standard

Der Limonenabbau im Standard zeigt neben einer Zeitabhängigkeit eine deutliche Temperatur- und Lichtabhängigkeit (siehe Abb. 5.22). Der Limonenabbau steigt von 8°C, dunkel, über 20°C, dunkel, und 20°C, hell, bis zu der Lagerung bei 32°C, hell, an. Diese Zusammenhänge werden bei gleichen Lagerbedingungen auch in der Arbeit von W. Pfannhause, H. Rauscher und A. Thaller für Limonen in Orangenlimonade belegt [90]. Sie stellten jedoch fest, dass der Einfluss einer Lagerung bei Licht zu wesentlich deutlicheren Veränderungen führt, als der Einfluss der Lagertemperatur. Diese Abhängigkeit lässt sich mit den hier gemachten Ergebnissen nicht belegen. Vergleicht man die Kurvenverläufe der Lagerung bei 20 °C, dunkel, 20 °C, hell und 32 °C, hell, so führt die Temperaturerhöhung von 20 °C auf 32 °C zu einer stärkeren Erhöhung des Limonenabbaus, als der Einfluss des Lichtes bei 20 °C, hell im Vergleich zu 20 °C, dunkel.

Unverdünnte (Konzentrat) und verdünnte Nanoemulsion

Bei Limonen im Konzentrat (siehe Abb. 5.23) nimmt die Limonenkonzentration entlang der Lagerung ab. Es wird aber in dem hier betrachteten Zeitraum keine Temperatur- und Lichtabhängigkeit deutlich. Der Abbau liegt nach 50 Tagen bei ca. 16%. Der Verlauf des Limonenabbaus in der 1:10 Verdünnung der Nanoemulsion ist bei allen Lagerbedingungen mit dem der unverdünnten Nanoemulsion vergleichbar (siehe Abb. 5.24). Der Verlust liegt bei ca. 17 %. Der Grad der Verdünnung wirkt sich hier nicht auf den Limonenabbau aus.

Bei der Lagerung von 8°C, dunkel, ist der Abbau von Limonen im Standard, im Konzentrat und in der Verdünnung nahezu vergleichbar gering. Diese Lagerbedingungen bieten eine gute Stabilität des Limonens. Da jedoch eine solche Lagerung bei Lebensmitteln nicht die Regel ist, ist es von Interesse, wie sich das Limonen unter extremeren Lagerbedingungen verhält.

Aufgrund der deutlichen Licht- und Temperaturabhängigkeit des Limonenabbaus im Standard (siehe Abb. 5.22), sowie der fehlenden Abhängigkeit in der Nanoemulsion (Konzentrat und Verdünnung), (siehe Abb. 5.23 und 5.24) erhöht sich die prozentuale Differenz zwischen Standard und Proben stark nach folgenden Rangfolge: Die Differenz bei 8°C, dunkel ist geringer als die bei 20°C, dunkel. Die Differenz ist bei 20°C, hell höher als die bei 20°C, dunkel und geringer als die bei 32°C hell. Bei 32 °C, hell liegt der Limonenabbau im Standard um 100 % höher als in der Emulsion. Es wird deutlich, dass die Nanoemulsion als Konzentrat und in der Verdünnung einen verbesserten Schutz für das Limonen vor Abbau gerade bei höheren Temperaturen im Vergleich zum Standard bietet. Da die Proben alle luftdicht verschlossen waren, lässt sich Verdampfung als Ursache für diese Abnahme der Limonenkonzentration ausschließen. Man kann davon ausgehen, dass für diese Abnahme die Bildung anderer Abbauprodukte des Limonens verantwortlich ist (siehe 2.2 Theorie). Um dieses Ergebnis zu erhärten werden im Folgenden die drei Abbauprodukte Terpeneol, Carvon und Carveol als relevante Fehlparfums untersucht.

6.5.2 Abbauprodukte des (R)-(+)-Limonens

Standard

Neben dem Abbau des Limonens im Standard wurde die Bildung der drei Limonenabbauprodukte, Terpeneol, Carvon und Carveol untersucht. In der Abbildung 5.25 wird die Bildung von Terpeneol, in der Abbildung 5.26 die des Carvons und in Abbildung 5.27 die des Carveols analysiert im Standard dargestellt. Wie sich erkennen lässt, nehmen alle drei Konzentrationen in Abhängigkeit von der Zeit zu. Es lässt sich bei allen drei Verbindungen eine Temperatur- und Lichtabhängigkeit analog zum Limonenabbau (siehe Abb. 5.22) erkennen.

Diese Beobachtung deckt sich mit den Untersuchungen von Pfannhauser et al. [90]. Auch sie beobachteten die Bildung der drei genannten Abbauprodukte. In seiner Versuchsreihe spielte der Einfluss des Lichtes eine größere Rolle als die Lagertemperatur. Das lässt sich mit den hier gemachten Ergebnissen bei der Bildung des Carveols bestätigen. Nicht ganz eindeutig sind hier die Ergebnisse bei Carvon und Terpinol. Die Bildung aller drei Verbindungen geschieht wie folgt: Der Abbau bei 8°C, dunkel ist geringer als der bei 20°C, dunkel. Der Abbau bei 20°C, hell ist höher als der bei 20°C, dunkel und geringer als der bei 32°C, hell.

Dieses Verhältnis bleibt beim Carveol auch für die restliche Lagerdauer bis zum 49. Tag bestehen. Beim Terpeneol und Carvon kommt es jedoch bei 32°C, hell zu einer Abnahme zwischen dem 21. und 49. Tag. Dies hängt mit der Oxidationsfähigkeit der beiden Verbindungen zusammen. Das Carvon oxidiert anteilig zu Carvoncampher und auch das Terpeneol oxidiert. Die Konzentration des Terpeneols, gelagert

bei 32°C, hell sinkt gegen Ende der Lagerung auf das Niveau der anderen Lagerbedingungen ab. Das deckt sich mit den Ergebnissen aus den Untersuchungen von M. Tsai und Y. Cheng [117], die auch eine Terpeneolabnahme aufgrund von Oxidation feststellten.

Nanoemulsion

In Abb. 5.29 und 5.30 wird deutlich, dass auch bei der Bildung der Abbauprodukte Carvon und Carveol in der Nanoemulsion, genauso wie beim Limonenabbau in der Emulsion, keine Licht- und Temperaturabhängigkeit zu erkennen ist. Der Gehalt an Carvon und Carveol steigt im Vergleich zum Standard nur sehr geringfügig an. In Abb. 5.28 lässt sich die Entwicklung der Terpeneol Konzentration verfolgen. Der Verlauf bei allen vier Lagerbedingungen ist annähernd gleich. Hier kommt es, anders als im Standard, zu keinem Anstieg der Terpeneol Konzentration, sondern zu einem leichten Abfall. Dies lässt sich, wie bereits im Standard diskutiert, durch eine Oxidation des Terpeneols erklären. Wie es zu der hier untersuchten fehlenden Licht- und Temperaturabhängigkeit der Bildung der drei Abbauprodukte kommt, lässt sich im Rahmen der hier gemachten Untersuchungen nicht klären. An dieser Stelle wäre es jedoch sinnvoll die Bedeutung der Autoxidation der ungesättigten Fettsäuren des Lecithins [17] zur Reduzierung der Konzentration an Sauerstoff näher zu betrachten. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Phospholipid Nanoemulsion einen guten Schutz vor chemischem Abbau im Konzentrat und in der Verdünnung bietet. Ein Vergleich der Ergebnisse mit den Untersuchungen von Pfannhauser et al., die Limonen in Orangenlimonade untersuchten [90], lässt eine bessere Bewertung ihrer Relevanz zu. In den Proben mit Limonen in Orangenlimonade wird nach 60-tägiger Lagerung bei 20°C, hell bereits ein Abbau des Limonens um ca. 46% beobachtet. Das liegt im Rahmen der in der vorliegenden Arbeit gemachten Ergebnisse zum Limonenabbau im Standard nach 50 Tagen (ca. 50% Abbau). Der Abbau des Limonens in der unverdünnten Nanoemulsion liegt nach 50 Tagen bei ca. 16% und der der Verdünnung bei ca. 17%. Dieser Vergleich zeigt, wie hoch das Potenzial der Nanoemulsion zum Schutz vor chemischem Abbau des Limonens ist.

Die Ursachen für diese Schutzfunktion der Phospholipid Nanoemulsion sind anhand der hier gemachten Untersuchungen nicht zweifelsfrei zu klären und sollen daher nur als Hypothesen diskutiert werden.

Als erstes liegt das Limonen im Inneren der Nanoemulsionstropfen dispergiert vor, d.h. es kommt nicht unmittelbar mit dem Luftsauerstoff in Verbindung. Dieser erreicht nur im Wasser gelöst das Limonen. Auch durch das Miglyol, in dem das Limonen gelöst ist, genauso wie durch das Lecithin in der Grenzschicht wird der Zugang von Sauerstoff erschwert. Es ist auch davon auszugehen, dass das leicht oxidierbare Lecithin und sein Gehalt an Tocopherol antioxidative Wirkung besitzen.

Wie an den Ergebnissen zu erkennen ist, ist die Bildung des Terpeneols durch die saure Hydrolyse des Limonens fast vollständig unterbunden, vermutlich weil freies Wasser in der Miglyolphase so gut wie nicht vorhanden ist. Eine Funktion der Fruktose kann weitestgehend ausgeschlossen werden, da der Limonenabbau in der unverdünnten und verdünnten Emulsion annähernd gleich verläuft. Weiterführende Untersuchungen, die diese Zusammenhänge klären können, sind von Interesse, da sie auch die Grundlage für weitere Optimierung von Aromadisersionen bieten.

Kapitel 7

Zusammenfassung und Ausblick

Die steigende Nachfrage nach natürlichen Aromen in der Lebensmittelindustrie hat zu einer verstärkten Entwicklungstätigkeit auf dem Gebiet der Aromen für Lebensmittel geführt. Ein solcher natürlicher Aromastoff ist das (R)-(+)-Limonen, das entscheidend am sensorischen Eindruck von Zitrusaromen beteiligt ist, und daher von besonderem Interesse für die Lebensmittelindustrie ist. Sein bisheriger Einsatz erfolgt in organischen Lösungsmitteln, als Pulver oder in Makroemulsionen, aber noch sind dadurch nicht alle Problemstellungen, die die chemische und physikalischen Stabilität des (R)-(+)-Limonens betreffen, geklärt.

Vor diesem Hintergrund ist es wichtig neue Applikationsformen für den Aromastoff (R)-(+)-Limonen zu finden. In dieser Arbeit wird dazu eine neuartige Phospholipid Nanoemulsion (Nanosolve der Firma Lipoid, Ludwigshafen) untersucht, die im Vergleich zu anderen Phospholipid Nanoemulsionen eine Reihe zusätzlicher Vorteile für Lebensmittel (wie Vermeidung weiterer Zusatzstoffe, Transparenz und mikrobiologische Stabilität) bietet.

Ziel dieser Arbeit ist es, das (R)-(+)-Limonen in der untersuchten Phospholipid Nanoemulsion kolloidal zu stabilisieren. So soll eine Aromaemulsion mit guter physikalischer Lagerstabilität erzielt werden, die in der Lage ist auch in verdünnter Form (R)-(+)-Limonen vor zu hoher Flüchtigkeit und chemischem Abbau zu schützen. Die Herstellung soll dabei einfach und verlustarm erfolgen und den Einsatz von Zusatzstoffen auf den alleinigen Einsatz des Lecithins beschränken. Bei der Stabilisierung wird Augenmerk auf Lagerdauer, Temperatur, Einfluss des Lichtes, Verdünnungsgrad und (R)-(+)-Limonengehalt gelegt. Die Arbeit ist entsprechend dieser Untersuchungsschwerpunkte in folgende Abschnitte gegliedert.

Im ersten Abschnitt werden eine genaue Charakterisierung und systematische Einordnung der neuartigen Phospholipid Nanoemulsion vorgenommen. Verschiedene Abbildungsmethoden ermöglichen eine makro- und mikroskopische Strukturanalyse, die zeigt, dass es sich um eine Nanoemulsion mit liposomalen Strukturen in

einer Zucker-Matrix handelt, die mittlere Tropfendurchmesser < 100 nm bei geringerer Polydispersität besitzt. Damit liegen ihre Werte niedriger als die vergleichbarer Emulsionen im pharmazeutischen Bereich und kleiner als bei Miniemulsionen in der Lebensmitteltechnologie. Daraus ergeben sich Vorteile für eine verbesserte Langzeitlagerstabilität ohne den Einsatz weiterer Zusatzstoffe, wie Beschwerungsmittel, notwendig zu machen.

Im zweiten Abschnitt wird der Hochdruckhomogenisationsprozess untersucht. Es kann gezeigt werden, welche Prozessparameter und welche Eigenschaften der Emulsion sich auf das Emulgierergebnis auswirken. Es wird deutlich, dass eine Temperierung der Voremulsion einen optimalen Herstellungsprozess ermöglicht und dass der mittlere Tropfendurchmesser in linearer Abhängigkeit von der Fruktosekonzentration steht. Für die hier vorgegebenen Tropfengrößen zwischen 70 und 80 nm sind Fruktosekonzentrationen zwischen 65% und 70 % notwendig. Es kann weiterhin gezeigt werden, dass die Zusammensetzung der Emulsion in der vorliegenden Form bereits optimale Bedingungen für die Herstellung liefert. Eine Ölkapazität der Nanoemulsion von 17,5 bis 40,0% ohne Verschlechterung des Emulgierergebnisses konnte bestimmt werden. Die bei der Herstellung ermittelten (R)-(+)-Limonenverluste sind sehr gering und liegen bei 3,8%, was im Vergleich zu den Sprühtrocknungs-Verfahren signifikant geringer ist.

Im dritten Teil wird die Lagerstabilität der Nanoemulsion mit und ohne (R)-(+)-Limonen untersucht. Die Entwicklung des mittleren Tropfendurchmessers und des Zeta-Potenzials dienen dabei als Beurteilungsgrundlage. Es kann gezeigt werden, dass sich die mit (R)-(+)-Limonen hergestellte Nanoemulsion (mit 2,5% und 5,0% (R)-(+)-Limonen) und ihre Lagerstabilität nicht wesentlich von der Emulsion ohne (R)-(+)-Limonen unterscheiden. Beide besitzen eine gute Langzeitstabilität über einen breiten Temperaturbereich (-18 bis 30°C). Diese kann für die Nanoemulsion ohne (R)-(+)-Limonen für einen Zeitraum von 250 Tagen und für die Nanoemulsion mit (R)-(+)-Limonen für 100 Tage mit keinem oder nur sehr geringem Anstieg der Tropfengröße gezeigt werden. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die tatsächliche Lagerstabilität bis zum Aufbruch der Emulsion noch deutlich höher liegt. Es werden aber auch Grenzen der Anwendung aufgezeigt, die die pH-Abhängigkeit des Zeta-Potenzials der Tropfen mit sich bringt und die besonders bei Lebensmitteln mit niedrigen pH-Werten berücksichtigt werden müssen.

Da die Nanoemulsion als Trägersystem für (R)-(+)-Limonen dienen soll, ist es von entscheidender Bedeutung, dass sie in der Lage ist Aromaverluste bei Herstellung, Lagerung und Verarbeitung zu minimieren. Im vierten Teil wird daher untersucht, wie sich der Dampfdruck des (R)-(+)-Limonens in der Nanoemulsion in Abhängigkeit von der Temperatur verhält. Es zeigt sich eine im Vergleich zum Standard stark reduzierte Flüchtigkeit bei Temperaturen im Bereich von 8 bis 60°C . Auch kann eine Abhängigkeit von der Fruktose- und Lecithinkonzentration gezeigt werden.

Im letzten Abschnitt wird auf die chemische Stabilität des (R)-(+)-Limonens in der Nanoemulsion eingegangen. (R)-(+)-Limonen ist sehr anfällig für oxidativen und nicht-oxidativen Abbau. Licht und Temperatur sind dabei entscheidende Faktoren. Neben dem damit verbundenen Aromaverlust ist gerade die Bildung von Fehlparmen (off-flavour) von Nachteil. Anhand des (R)-(+)-Limonenabbaus und der Bildung der drei Abbauprodukte Carvon, Carveol und α -Terpineol kann nachgewiesen werden, dass das Limonen in der Nanoemulsion weitaus besser vor Abbau geschützt wird als z. B. das (R)-(+)-Limonen in Orangenlimonade. Erwähnenswert an diesen Ergebnissen ist auch, dass eine fehlende Temperatur- und Lichtabhängigkeit des (R)-(+)-Limonenabbaus in der Nanoemulsion gezeigt werden kann.

Die vorliegende Arbeit liefert somit umfassende Ergebnisse über die Herstellung und die Charakteristik der hier verwendeten Phospholipid Nanoemulsion und ihrem Potenzial für eine verbesserte Anwendung von (R)-(+)-Limonen als Aromastoff in Lebensmitteln. Auf diese Weise wird ein wichtiger Beitrag zum besseren Verständnis der Anwendung von Phospholipid Nanoemulsionen in der Lebensmitteltechnologie geleistet. Denkbar ist auch die Übertragung der mit (R)-(+)-Limonen gewonnenen Ergebnisse auf andere Terpene oder andere lipophile Aromastoffe. Es werden sowohl das hohe Potenzial der Phospholipid Nanoemulsion, als auch ihre Grenzen bei der Stabilisierung von (R)-(+)-Limonen aufgezeigt und diskutiert. Somit dient diese Arbeit einer zielgerichteten und effektiven Anwendung von einer Phospholipid Nanoemulsion zur Stabilisierung von (R)-(+)-Limonen in Lebensmitteln. Die Verifizierung der in dieser Arbeit gemachten Ergebnisse durch den Einsatz der Phospholipid Nanoemulsion mit (R)-(+)-Limonen in Lebensmitteln, wie z. B. Milchprodukten, Backwaren, Getränken und Süßigkeiten, sollte Gegenstand weitergehender Untersuchungen sein.

Kapitel 8

Anhang

Zur besseren Verständlichkeit der im Methoden Kapitel (4.2.4.1) beschriebenen gaschromatographischen Analysen, werden hier exemplarische zwei Chromatogramme vorgestellt. Abb. 8.1 zeigt ein Headspace-Gaschromatogramm einer Nanoemulsion bei 60 °C mit dem Aromastoff (R)-(+)-Limonen. Die entsprechende Analyse ist unter 4.2.4.2 beschrieben.

Abb. 8.2 zeigt ein Gaschromatogramm der Abbauprodukte Terpeneol, Carvon und Carveol des Limonens. Die entsprechende Analyse ist unter 4.2.4.3 beschrieben.

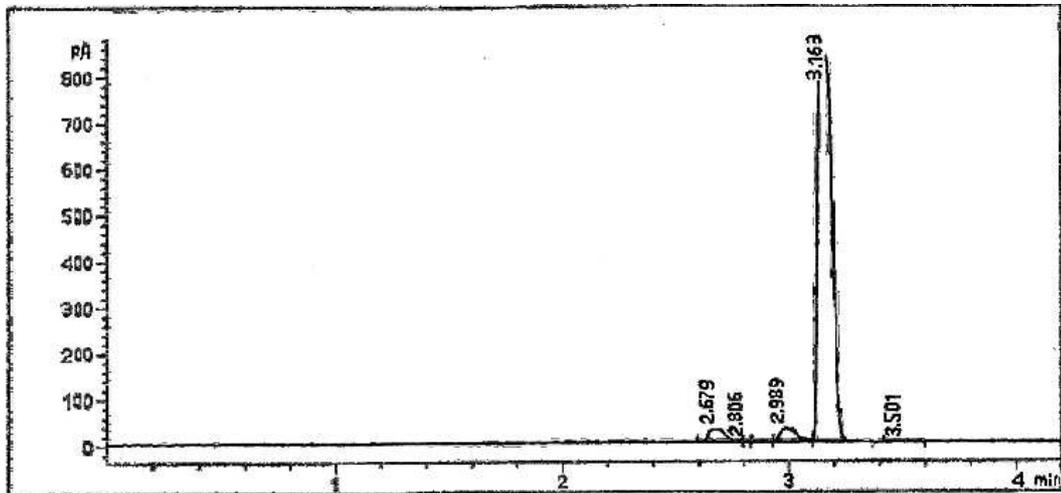


Abbildung 8.1: Headspace-Chromatogramm einer Nanoemulsion bei 60 °C mit dem Aromastoff (R)-(+)-Limonen (Retentionszeit: 3,16 min)

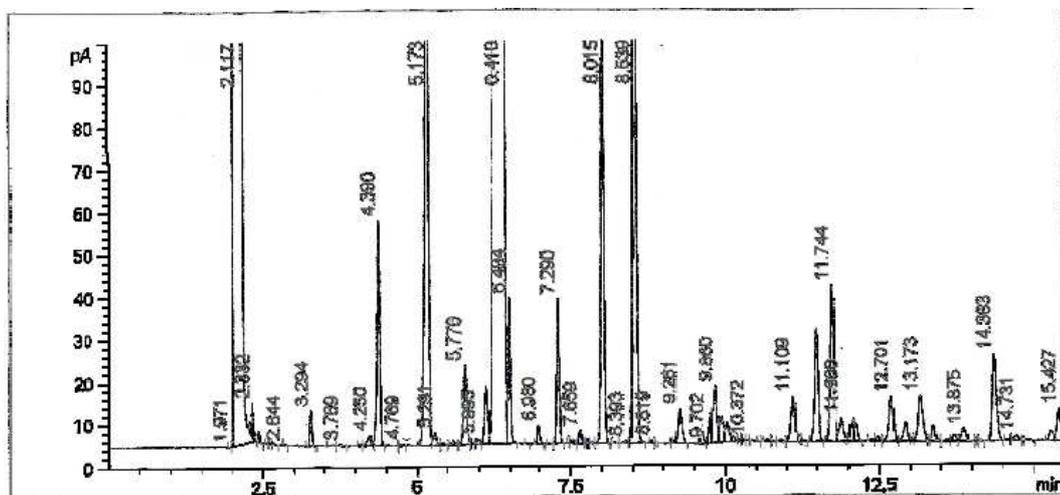


Abbildung 8.2: Gaschromatogramm von Limonen nach einer Lagerung bei 32 °C hell für 1 Woche mit dem Lösungsmittel Ethanol. Die Peaks für Limonen (6,410 min), Terpeneol (11,744 min), die cis- und trans-Isomere von Carveol (12,701 min und 13,173 min) und Carvon (14,363 min) sind abgebildet.

Abbildungsverzeichnis

2.1	Basiseinheit der Terpene – Isopren	7
2.2	Molekülstruktur von Limonen	7
2.3	Gewinnung von Orangenöl	8
2.4	Bildung von Carvon aus (R)-(+)-Limonen	9
2.5	Bildung von Carveol aus (R)-(+)-Limonen	10
2.6	Bildung von α -Terpineol aus (R)-(+)-Limonen	11
2.7	W/O und O/W Emulsionen mit Emulgatoren	15
2.8	Amphotere Emulgatoren	16
2.9	Modell der elektrochemischen Doppelschicht	17
2.10	Schematische Darstellung der Phospholipid Nanoemulsion und ihrer Einflussfaktoren	26
2.11	Strukturformel des Phosphatidylcholins (PC)	27
2.12	Strukturformel des Phosphatidylethanolamins (PE)	27
2.13	Schematische Darstellung verschiedener Homogenisierdüsen	32
2.14	Vorgänge beim mechanischen Emulgieren	32
4.1	Limonenfreisetzungskinetik in der Nanoemulsion mit 2,5% Limonen bei 7°C	56
5.1	Elektronenmikroskopische Aufnahme der Nanoemulsion	62
5.2	Tropfengrößenverteilung der Nanoemulsion	62
5.3	Nanoemulsion nach der Hochdruckhomogenisation	63
5.4	Nanoemulsion verdünnt mit Wasser mit steigendem Emulsionsanteil	64
5.5	Veränderung des mittleren Tropfendurchmessers während der Homogenisation in Abhängigkeit von der Zeit	65
5.6	Temperaturverlauf in der Emulsion während der Hochdruckhomogenisation	65

5.7	Viskositäten von Wasser, Miglyol und Fruktoselösung in Abhängigkeit von der Temperatur	67
5.8	Anfangstropfengröße in Abhängigkeit von der Fruktosekonzentration .	67
5.9	Tropfengröße der Nanoemulsion (ohne Limonen) bei -18°C	71
5.10	Zeta-Potenzial der Nanoemulsion (ohne Limonen) bei -18°C	72
5.11	Tropfengröße der Nanoemulsion (ohne Limonen) bei 8°C	72
5.12	Zeta-Potenzial der Nanoemulsion (ohne Limonen) bei 8°C	73
5.13	Tropfengröße der Nanoemulsion (ohne Limonen) bei 30°C	73
5.14	Zeta-Potenzial der Nanoemulsion (ohne Limonen) bei 30°C	74
5.15	Abhängigkeit des Zeta-Potenzials der Phospholipid Nanoemulsion vom pH-Wert	75
5.16	Mittlere Tropfengröße in Abhängigkeit von der Zeit und der Temperatur bei einem Limonengehalt von 2,5%	76
5.17	Mittlere Tropfengröße in Abhängigkeit von der Zeit und der Temperatur bei einem Limonengehalt von 5,0%	76
5.18	Zeta-Potenzial in Abhängigkeit von der Zeit und der Temperatur bei einem Limonengehalt von 2,5%	77
5.19	Zeta-Potenzial in Abhängigkeit von der Zeit und der Temperatur bei einem Limonengehalt von 5,0%	77
5.20	Vergleich der Flüchtigkeiten von Limonen in der Nanoemulsion und im Standard	78
5.21	Verteilungskoeffizient des Limonens zwischen Gasraum und Emulsion bei 60°	79
5.22	Abbau des Limonens im Standard	81
5.23	Abbau des Limonens im Konzentrat	82
5.24	Abbau des Limonens in der verdünnten Nanoemulsion	82
5.25	Bildung von Terpeneol im Standard	83
5.26	Bildung von Carvon im Standard	83
5.27	Bildung von Carveol im Standard	84
5.28	Bildung von Terpeneol im Konzentrat	84
5.29	Bildung von Carvon im Konzentrat	85
5.30	Bildung von Carveol im Konzentrat	85
6.1	Extinktionskoeffizient der Nanoemulsion in Abhängigkeit zum relativen Brechungsindex	89
6.2	Test der verdünnten Nanoemulsion ohne Limonen auf Ostwaldreifung	97

-
- 8.1 Headspace-Chromatogramm einer Nanoemulsion bei 60 °C 116
- 8.2 Headspace-Chromatogramm einer Nanoemulsion bei 32 °C 116

Tabellenverzeichnis

2.1	Physikalische Eigenschaften von Limonen	7
2.2	Limonengehalt in Schalenöl und Saftaromenkonzentrat	8
4.1	Auflistung der verwendeten Aromastoffe	45
4.2	Zusammensetzung der Pufferlösungen	45
4.3	Rezeptur der Nanoemulsion ohne Limonen	46
4.4	Rezeptur mit 2,5% Limonen	47
4.5	Variierte Rezeptur mit Sonnenblumenöl statt Miglyol und mit 2,5% Limonen	47
4.6	Variierte Rezeptur mit 10% Lecithin und 2,5% Limonen	47
4.7	Rezeptur mit 5% Limonen	47
4.8	Einstellungen der PCS	50
4.9	Messfehler der Tropfengröße	51
4.10	Benutzte Kugeln für das Viskosimeter	53
4.11	Zusammensetzung der Standardlösung für die Headspace Gaschroma- tographie	54
4.12	Einstellung des Gaschromatographen für die Headspace Analyse	55
4.13	Einstellung des Autosamplers für die Headspace Analyse	55
4.14	Einstellung des Autosamplers bei Direktinjektion	56
4.15	Bedingungen für die Lagertests zur Untersuchung der Limonenabbau- produkte	57
4.16	Einstellungen des Gaschromatographen bei Direktinjektion	58
5.1	Tropfengrößen in Abhängigkeit der Temperatur bei einem temperier- ten System	66
5.2	Tropfengröße in Abhängigkeit von der dynamischen Viskosität der dispersen Phase (Miglyol)	68

5.3	Tropfengröße in Abhängigkeit vom Dispersphasenanteil	69
5.4	Limonenverlust bei der Herstellung der Phospholipid Nanoemulsion .	69
6.1	Vergleich der Komponenten in der Nanoemulsion und im Standard . .	103

Literaturverzeichnis

- [1] *Zusatzstoffzulassungsverordnung (ZZuV) Verordnung über die Zulassung von Zusatzstoffen zu Lebensmitteln zu technischen Zwecken vom 29.1.1998.* Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz.
- [2] *ISO 6571.* Internationale Organization für Standardisierung, 1984.
- [3] *Limonene - Priority Existing Chemical Assessment Report No. 22.* Department of Health and Ageing/NICNAS; Australian Government, 2002.
- [4] *Deutsches Arzneibuch (DAB 2005).* Deutscher Apotheker Verlag, 2005.
- [5] ACOBASCH, H.-J., F. SIMON, W. CARSTEN und ET AL.: *Elektrokinetische Meßmethoden: Grundlagen und Anwendungen.* tm-Technisches Messen, 63:1, 1996.
- [6] AHMED, E. M., R. DENNISON, H. DOUGHERTY und ET AL: *Flavor and Odor Thersholds in Water of Selected Orange Juice Components.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 26:187, 1978.
- [7] ALAN, H. und J. VARNAM: *Beverages: Technology, Chemistry and Microbiology.* Sutherland, Chapman & Hall, 1994.
- [8] AL-BAWAB, A., N. HELDT und Y. LI: *Emulsified Orange Oil in an Aqueous Vesicle Solution.* Journal of Dispersion Science and Technology, 26:251, 2005.
- [9] ANANDARAMAN, S. und G. REINECCIUS: *Stability of Encapsulated Orange Peel Oil.* Food Technology, 11:88, 1986.
- [10] ANANDARAMAN, S. und G. A. REINECCIUS: *Analysis of encapsulated orange peel oil.* Perfumer and Flavorist, 12:33, 1987.
- [11] ASCHE, H., D. ESSIG und P. SCHMIDT: *Technologie von Salben, Suspensionen und Emulsionen.* Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 1. Auflage, 1984.

- [12] ASKAR, A.: *Lagerverhalten, Aromaveränderungen während der Herstellung und Lagerung bei Fruchtsäften*. Flüssiges Obst, 11:564, 1984.
- [13] ASKAR, A., H. BIELIG und H. TREPTOW: *Aromaveränderungen von Orangensaft*. Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 69:162, 1973.
- [14] ATKINS, P. W.: *Einführung in die physikalische Chemie: Ein Lehrbuch für alle Naturwissenschaftler*. VCH-Wiley Weinheim, 1. Auflage, 1993.
- [15] BALOGH, J., J. BUBENIK, F. DREDAN und ET AL.: *The effect of structured triglycerides on the kinetic stability of total nutrient admixtures*. Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science, 8:552, 2005.
- [16] BAYERL, S.: *Gutachten zur Aufklärung der mikroskopischen Struktur einer fetthaltigen Formulierung mit Hilfe der TEM*. Technischer Bericht, Freeze Fracture Services Germering, 2002.
- [17] BELITZ, H.-D. und W. GROSCH: *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. Springer Verlag, fünfte Auflage, 2001.
- [18] BERG, J., J. TYMOCZKO und L. STRYER: *Stryer - Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 5. Auflage, 2007.
- [19] BERTOLINI, A., C. SIANI und C. GROSSO: *Stability of Monoterpenes encapsulated in Gum arabic by Spray Drying*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49:780, 2001.
- [20] BHANDARI, B., B. D'ARCY und L. BICH: *Lemon Oil to β -Cyclodextrin Ratio Effect on the Inclusion Efficiency of β -Cyclodextrin and the Retention of Oil Volatiles in the Complex*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46:1494, 1998.
- [21] BIELIG, H.-J., A. ASKAR und H. TREPTOW: *Aromaveränderung von Orangensaft*. Fortschritte in der Lebensmittelwissenschaft, 1, 1974.
- [22] BLACK, C. und N. POPOVICH: *A Study of intravenous emulsion compatibility: Effects of dextrose, amino acids, and selected electrolytes*. Drug Intelligence and Clinical Pharmacy, 15:184, 1981.
- [23] BOYD, J. M. und G. T. PETERSON: *Quality of canned orange juice*. Industrial and Engineering Chemistry Research, 37:3760, 1945.
- [24] BREDIE, W., D. MOTTRAM und G. BIRCH: *Trends in Flavour Research*, Kapitel Aroma binding in maltodextrin solutions. Developments in Food Science 35. Elsevier Amsterdam, 1. Auflage, 1994.

- [25] BREITMAIER, E.: *Terpene, Aromen, Düfte, Pharmaka, Pheromone*. VCH-Wiley Weinheim, 2005.
- [26] BRETSCHNEIDER, F., F. KEMPE, M. MINOR und ET AL.: *Pellets and method for production thereof*. Patent WO/2004/056469, 2004.
- [27] BUFFO, R. und G. REINECCIUS: *Shelf-life and mechanisms of destabilization in dilute beverage emulsions*. Flavour and Fragrance Journal, 16:7, 2001.
- [28] BUTTERWORTH: *Manual of colloid and surface science*. International Union of Pure and Applied Chemistry IUPAC, 1972.
- [29] CHANAMAI, R. und D. J. MCCLEMENTS: *Impact of Weighting Agents and Sucrose on Gravitational Separation of Beverage Emulsions*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48:5561, 2000.
- [30] CHANTRAPORNCHAI, W., F. CLYDESDALE und D. J. MCCLEMENTS: *Influence of Droplet Size and Concentration on the Color of Oil-in-Water Emulsions*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46:2914, 1998.
- [31] CHANTRAPORNCHAI, W., F. CLYDESDALE und D. J. MCCLEMENTS: *Influence of droplet characteristics on the optical properties of colored oil-in-water emulsions*. Colloids and Surfaces A, 155:373, 1999.
- [32] CHANTRAPORNCHAI, W., F. CLYDESDALE und D. J. MCCLEMENTS: *Influence of relative refractive index on optical properties of emulsions*. Food Research International, 34:827, 2001.
- [33] CHEVANCE, F. und L. FARMER: *Release of Volatile Odor Compounds from Full-Fat and Reduced-Fat Frankfurters*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47:5161, 1999.
- [34] CONOLLY, J. und A. HILL: *Dictionary of Terpenoids*. Chapman & Hall, London, New York, 1. Auflage, 1991.
- [35] COURTHAUDON, J.-L. und E. DICKINSON: *Competitive Adsorption of Lecithin and β -Casein in Oil in Water*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 39:1365, 1991.
- [36] DITTMEN, M. und B. HERBST: *Das Zetapotential - Grundlagen, Meßmethoden und Anwendung in der Pharmazie*. Organ der Pharmazeutischen Gesellschaft der Deutschen Demokratischen Republik, 10:641, 1987.

- [37] DLUZEWSKA, E., A. STOBIECKA und M. MASZEWSKA: *Effect of Oil Phase Concentration on Rheological Properties and Stability of Beverage Emulsions*. Acta Sci. Pol. Technol. Aliment., 5:147, 2006.
- [38] DÜRR, P.: *Aroma Quality of Orange Juice: A Brief Review*. Alimenta, 19:35, 1980.
- [39] DÜRR, P. und R. WALDVOGEL: *Aroma Quality of Orange Juice after Filling and Storage in soft Packages and Glas Bottles*. Alimenta, 20:91, 1981.
- [40] EDRIS, A. E.: *Preparation and stability of a protein stabilized orange oil-in-water emulsion*. Nahrung, 42:19, 1998.
- [41] FALBE, J. und M. REGITZ: *Römpp Chemielexikon*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 10. Auflage, 1999.
- [42] FRICKER, A.: *Lebensmittel mit allen Sinnen prüfen !* Springer Verlag Berlin, erste Auflage, 1984.
- [43] GALLARATE, M., M. E. CARLOTTI, M. TROTTA und ET AL: *On the stability of ascorbic acid in emulsified systems for topical and cosmetic use*. International Journal of Pharmaceutics, 188:233, 1999.
- [44] GAREISS, J., P. FUSSBROICH und M. GHYCZY: *Formulierung von Parfümölen mittels Phospholipiden in wäßrigen Systemen*. SÖFW-Journal, 120:93, 1994.
- [45] GAREISS, J., E. HOFF und M. GHYCZY: *Phospholipide - Liposomen - Nanoemulsionen*. Parfümerie und Kosmetik, 75:652, 1994.
- [46] GARTI, N. und C. BISPERINK: *Double emulsions: progress and applications*. Technischer Bericht, Nestle Research Center-Lausanne, 1989.
- [47] GIESE und JAMES: *Modern Alchemy: Use of Flavors in Food*. Food Technology, 2:106, 1994.
- [48] HAGENMEYER, M. (Herausgeber): *Lebensmittelrecht. Band I*. Verlag C. H. Beck München, 2. Auflage, 2006.
- [49] HAUG, M. E.: *Die Sensorische Haltbarkeit von Zitrus-Erfrischungsgetränken und anderen Saffhaltigen Getränken*. Flüssiges Obst, 70:72, 2003.
- [50] HERMAN, C. J. und M. J. GROVES: *Hydrolysis Kinetics of Phospholipids in Thermally Stressed Intravenous Lipid Emulsion Formulations*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 44:539, 1992.

- [51] HERMAN, C. J. und M. J. GROVES: *The Influence of Free Fatty Acid Formation on the pH of Phospholipid Stabilized Triglyceride Emulsions*. Pharmaceutical Research, 10:774, 1993.
- [52] HERNANDEZ, E. und R. BAKER: *Turbidity of Beverages with Citrus Oil Clouding Agent*. Journal of Food Science, 56:1024, 1991.
- [53] HOFFMANN, D., F. TIARKS, K. F. LANDFESTER und ET AL.: *Anwendungsmöglichkeiten der Miniemulsion: Verkapselung von anorganischen Partikeln*. Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung, Forschungszentrum Golm, 1999.
- [54] IZQUIERDO, P., J. ESQUENA, TH. TADROS und ET AL.: *Formation and Stability of Nano-Emulsions Prepared Using the Phase Inversion Temperature Method*. Langmuir, 18:26, 2002.
- [55] JAFARI, S. M., Y. HE und B. BHANDARI: *Encapsulation of Nanoparticles of d-Limonen by Spray-drying. Role of Emulsifiers and Emulsifying Techniques*. Drying Technology, 25:1069, 2007.
- [56] KEOWMANEECHAI, E. und D. J. MCCLEMENTS: *Effect of CaCl₂ and KCl on Physicochemical Properties of Model Nutritional Beverages Based on Whey Protein Stabilized Oil-in-Water Emulsions*. Journal of Food Science, 67:665, 2002.
- [57] KIM, H.-J., E. DECKER und D. J. MCCLEMENTS: *Influence of Sucrose on Droplet Flocculation in Hexadecane Oil-in-Water Emulsions Stabilized by β -Lactoglobuline*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 3:766, 2003.
- [58] KIM, Y., C. MORR und T. SCHENZ: *Microencapsulation Properties of Gum Arabic and Several Food Proteins: Liquid Orange Oil Emulsion Particles*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44:1308, 1996.
- [59] KINSELLA, J.: *Flavor Chemistry of Lipid Foods*, Kapitel Flavor Perception and Binding to Food Components, Seite 376. Amer Oil Chemists Society, 1989.
- [60] KLANG, S. H., M. PARNAS und S. BENITA: *Emulsions and Nanosuspensions for the Formulation of Poorly Soluble Drugs*, Kapitel Emulsions as drug carriers - possibilities, limitations and future perspectives. Medpharm Publications, 1998.
- [61] KUNZ, B.: *Lexikon der Lebensmitteltechnologie*. Springer Verlag, 1. Auflage, 1993.

- [62] KUNZ, B. und C. FRESE: *Praxishandbuch Functional Food*. Behrs Verlag Hamburg, 2003.
- [63] KUPPER, H.: *Inhaltsstoffe und Aromen für Fruchtsäfte*. FLO Spezial, 1, 2004.
- [64] LEVY, M. Y. und S. BENITA: *Design and characterization of a submicronized o/w emulsion of diazepam for parenteral use*. International Journal of Pharmaceutics, 54:103, 1989.
- [65] LIPOID GMBH, LUDWIGSHAFEN: *Lipoid S 75 Produktspezifikation*, 2006.
- [66] LIU, X., T. FURUTA, H. YOSHII und ET AL.: *Retention of Emulsified Flavor in a Single Droplet during Drying*. Food Science and Technology Research, 6:335, 2000.
- [67] MASSON, G.: *Advanced Techniques for Preparation and Characterization of small unilamellar vesicles*. Food Microstructure, 8:11, 1989.
- [68] MATHEIS, G.: *Wissenswertes über ätherische Öle*. Technischer Bericht, Dragoco Report Holzminden, 2001.
- [69] MATSUZAKI, M., F. MCCAFFERTY und M. KAREL: *The Effect of Cholesterol Content of Phospholipid Vesicles on the Encapsulation and Acid Resistance of Beta-Galactos*. International Journal of Food Science Technology, 24:451, 1989.
- [70] MCCLEMENTS, D. J.: *Food Emulsions, Principles, Practice, and Techniques*. CRC Press Boca Raton, 2nd Auflage, 2005.
- [71] MERKT, G.: *Agent for increasing density for aromatic oil in beverage and beverage concentrate product therewith*. Europäisches Patent EP20010116735, 2002.
- [72] MESCHÉDE, D.: *Gerthsen Physik*. Springer, Berlin, Heidelberg, 23. Auflage, 2006.
- [73] MÜLLER, R. H.: *Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 1. Auflage, 1996.
- [74] MÜLLER, R. H. und B. H. L. BÖHM: *Emulsions and Nanosuspensions for the Formulation of Poorly Soluble Drugs*, Kapitel Nanosuspensions. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 1998.
- [75] MOLLET, H. und A. GRUBENMANN: *Formulation Technology, Emulsions, Suspensions, Solid Forms*. VCH-Wiley Weinheim, 1. Auflage, 2000.

- [76] MORARU, C., C. PANCHAPAKESAN, Q. HUANG und ET AL.: *Nanotechnology: A New Frontier in Food Science*. Food Technology, 57:24, 2003.
- [77] MORTIMER, C.: *Das Basiswissen der Chemie*. Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 7. Auflage, 2001.
- [78] MUNSTER, A.: *Deutsche Einheitsmethoden zur Untersuchung von Fetten, Fettprodukten, Tensiden und verwandten Stoffen*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 1. Auflage, 1988.
- [79] MUSCHIOLI, G.: *Multiple Emulsionen als Beispiel für ein neues Produkt — Entwicklung von Prozeßstrukturen der wirtschaftlichen Herstellung*. Seminar der GDL-Fachgruppe Studierende „Einführung in die Planung von Herstellungsverfahren für Lebensmittel“, 1998.
- [80] NAGY, S. und J. A. ATTAWAY: *Less desirable flavour components in processed citrus products*. Proc. Int. Soc. Citriculture, 2:872, 1981.
- [81] NAHON, D., M. HARRISON und J. ROOZEN: *Modeling Flavor Release from Aqueous Sucrose Solutions, Using Mass Transfer and Partition Coefficients*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48:1278, 2000.
- [82] NEWMANN, A. A. (Herausgeber): *Chemistry of Terpenes and Terpenoids*. Academic Press New York, 1972.
- [83] NEY, K. H. und P. HAHN: *Lebensmittelaromen*. Behr's Verlag, Hamburg, 1. Auflage, 1987.
- [84] NIEUWENHUYZEN, W. VON: *Emulsions in food products: preparation, stabilization and applications*, Kapitel Emulsions as drug carriers - possibilities, limitations and future perspectives. Medpharm Publications, 1998.
- [85] NITZSCHE, R.: *Malvern Short Course - Zetapotential*. Malvern Instruments GmbH, 1996.
- [86] NITZSCHE, R. und F. SIMAON: *Bestimmung des Zetapotentials aus Messungen der elektrophoren Mobilität*. tm-Technisches Messen, 64:1, 1997.
- [87] OGAWA, S., E. DECKER und D. J. MCCLEMENTS: *Production and Characterization of O/W Emulsions Containing Cationic Droplets Stabilized by Lecihin-Chitosan Membranes*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51:2806, 2003.
- [88] OHLOFF, G.: *Riechstoffe und Geruchssinn*. Springer Verlag, Berlin, 1990.

- [89] PARDUN, H.: *Pflanzenlecithine*. Verlag für chemische Industrie, Zioldowsky KG, Augsburg, 1. Auflage, 1988.
- [90] PFANNHAUSER, W., H. RAUSCHER und H. THALLER: *Untersuchungen über Veränderungen von Orangenlimonaden - Aromastoffen während der Lagerung*. Deutsche Lebensmittelrundschau, 83:307, 1987.
- [91] POPKEN, A. M., H. M. DECHENT und D. GÜRSTER: *Fruit Processing*, Band 9, Kapitel Investigations on the Origin of Carvone in Orange Juices as an Off-Flavour Component, Seite 338. Confructa Medien GmbH, 1999.
- [92] PROCTOR, B. E. und E. M. KENYON: *Objective Evaluation of Odor Deterioration in Orange Oil*. Food Technology, 3:387, 1949.
- [93] RANKIN, S. und F. BODYFELT: *Headspace Diacetyl as Affected by Stabilizers and Emulsifiers in a Model Dairy System*. Journal of Food Science, 61:921, 1996.
- [94] ROBERTS, D., J. ELMORE, R. LANGLEY und ET AL.: *Effects of Sucrose, Guar Gum, and Carboxymethylcellulose on the Release of Volatile Flavor Compounds under Dynamic Conditions*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44:1321, 1996.
- [95] ROBERTS, D., P. POLLIEN und B. WATZKE: *Experimental and Modeling Studies Showing the Effect of Lipid Type and Level, on Flavor Release from Milk-Based Liquid Emulsions*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51:189, 2003.
- [96] ROBINS, M.: *Lipid Emulsions*. Grasas y Aceitas, 51:26, 2000.
- [97] ROSENPLENTER, K.: *Handbuch Süßungsmittel*. Behr's Verlag, Hamburg, 2007.
- [98] ROTH, LUTZ: *Terpene, Terpentinöl*. Ecomed Verlag, Landsberg, 1. Auflage, 2001.
- [99] RYDHAG, L.: *The Importance of the Phase Behaviour of Phospholipids for Emulsion Stability*. Fette, Seifen, Anstrichmittel, 81:168, 1979.
- [100] SCHENCK, G., O. NEUMÜLLER, G. OHLOFF und ET AL.: *Justus Liebig Annalen der Chemie*. 687:26, 1965.
- [101] SCHMANDKE, H.: *D-Limonen in Zitrusfrüchten mit antikanzerogener Wirkung*. Ernährungs-Umschau, 7:264, 2003.

- [102] SCHOMBURG, G.: *Gaschromatographie: Grundlagen, Praxis, Kapillartechnik*. VCH-Wiley Weinheim, 2. Auflage, 1987.
- [103] SCHUBERT, H. und K. AX: *Product engineering of dispersed systems*. Trends in Food Science Technology, 14:9, 2003.
- [104] SCHULTZ, S., G. WAGNER und J. ULRICH: *Hochdruckhomogenisation als ein Verfahren zur Emulsionsherstellung*. Chemie und Ingenieur Technik, 74:901, 2002.
- [105] SCHUMANN, R.: *Physikalische Stabilität parenteraler Fettemulsionen: Entwicklung eines Untersuchungsschemas unter besonderem Aspekt analytischer Möglichkeiten*. Doktorarbeit, Institut für Pharmazie und Pharmazeutische Technologie der Freien Universität Berlin, 1995.
- [106] SCHUSTER, G.: *Emulgatoren für Lebensmittel*. Springer Verlag Berlin, 1. Auflage, 1985.
- [107] SHIGA, H., H. YOSHI, R. TAGUCHI und ET AL.: *Release Characteristics of Flavor from spray-dried powder in boiling water during Rice Cooking*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 67:426, 2003.
- [108] SOOTTITANTAWAT, A., H. YOSHII, T. FURUTA und ET AL.: *Effect of Water Activity on the Release Characteristics and Oxidative Stability of D-Limonen encapsulated by Spray-Drying*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52:1269, 2004.
- [109] STANG, M.: *Zerkleinern und Stabilisieren von Tropfen beim mechanischen Emulgieren*, Band Reihe 3: Verfahrenstechnik, Nr. 527 der Reihe VDI Fortschrittsberichte. VDI Verlag Düsseldorf, 1998.
- [110] SUN, J., M. ERICKSON und J. PARR: *Refractive Index Matching: Principles and Cosmetic Applications*. Cosmetics & Toiletries Magazin, 118:65, 2003.
- [111] SURATKAR, V. und S. MAHAPATRA: *Solubilisation Site of organic perfume molecules in sodium dodecyl sulfate micelles*. Journal of Colloid and Interface Science, 207:221, 2000.
- [112] TAHERIAN, A., P. FUSTER und H. RAMASWAMY: *Effect of added oil and modified starch on rheological properties, droplet size distribution, opacity and stability of beverage cloud emulsions*. Journal of Food Engineering, 77:687, 2006.
- [113] TAN, C.: *Food Emulsions*, Kapitel Beverage Emulsions. Marcel Dekker, 2. Auflage Auflage, 1990.

- [114] TEMPLETON, W.: *An introduction to the chemistry of terpenoids and steroids*. Butterworth & Co Ltd., Bath, 1969.
- [115] TERNES, W.: *Naturwissenschaftliche Grundlagen der Lebensmittelzubereitung*. Behr's Verlag, Hamburg, zweite Auflage, 1995.
- [116] TESCH, S.: *Charakterisieren mechanischer Emulgierverfahren: Herstellen und Stabilisieren von Tropfen als Teilschritte beim Formulieren von Emulsionen*. Dissertation, Technische Hochschule Karlsruhe, 2002.
- [117] TSAI, M. und Y. CHENG: *Air oxidation of alpha-Terpineol*. Journal of Chinese Chemical Society, 22:149, 1974.
- [118] WAJDA, R.: *Patent Anmeldung: Micellare wasserlösliche Konzentrate*. Lipoid GmbH Ludwigshafen, 2002.
- [119] WAJDA, R.: *NanoSolve - a new type of technique for the solubilization of lipophilic actives such as coenzyme Q10 or omega-3 fatty acids*. Innovations in Food Technology, August:1, 2004.
- [120] WAJDA, R., J. ZIRKEL und T. SCHAFFER: *A Novel Carrier System for Cosmetic Application*. International Journal of Applied Science, 8:132, 2006.
- [121] WALSTRA, P. und P. SMULDERS: *Modern aspects of emulsion science*, Kapitel Emulsion formulation, Seite 56. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1998.
- [122] WASHINGTON, C., A. ATHERSUCH und D. J. KYNOCH: *The electrokinetic properties of phospholipid stabilized fat emulsions. IV. The effect of glucose and pH*. International Journal of Pharmaceutics, 64:217, 1990.
- [123] WASHINGTON, C., N. CHAWLA, CH. DAVIS und ET AL.: *The electrokinetic properties of phospholipid-stabilized fat emulsions*. International Journal of Pharmaceutics, 54:191, 1989.
- [124] WASHINGTON, C., M. CONNOLLY, R. MANNING und ET AL.: *The electrokinetic properties of phospholipid stabilized fat emulsions. V. The effect of amino acids on emulsion stability*. International Journal of Pharmaceutics, 77:57, 1991.
- [125] WATZL, B.: *Monoterpene*. Ernährungs-Umschau, 49:322, 2002.
- [126] WEDER, H. und M. MUTSCH: *Process for the production of a nanoemulsion of oil particles in an aqueous phase*. US Patent 7012345, 1992.

-
- [127] WEIDNER, E., Z. ZHANG, B. CZECH und ET AL.: *Entölung von Rohlecithin mit Propan*. Fat Science Technology, 95:347, 2006.
- [128] WEINER, B. und W. W. TSCHARNUTER: *Particle Size Distribution*, Kapitel Uses and Abuses of Photon Correlation Spectroscopy, Seite 48. American Chemical Society, 1987.
- [129] WOLFRAM, G.: *Aktuelles Interview: Sind MCT-Fette die „Fettsensation“?* Ernährungslehre und - praxis, Dezember:45, 2001.