



Doctoral Thesis

Flow Processing to Structure and Functionalize Vesicles for Food Applications

Author(s):

Engel, Helen

Publication Date:

2014

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010394806> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Dissertation ETH number 22016

Flow Processing to Structure and Functionalize Vesicles for Food Applications

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

Helen Engel

Dipl. Lm.-Ing. ETH Zurich

born on 16 May 1981

citizen of Bülach, ZH, Switzerland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Erich J. Windhab, Examiner

Prof. Dr. Peter Walde, Co-Examiner

Dr. Martin E. Leser, Co-Examiner

2014

Summary

Vesicles are spherical compartment structures in an aqueous medium. They consist of an aqueous core and one or more self-assembled, closed bilayers of amphiphilic molecules. The amphiphiles may be biomembrane phospholipids, synthetic surfactants, or amphiphilic block copolymers. The structural and functional versatility of vesicles has led to numerous successful and even some commercial applications in various fields, such as biomembrane research, biomedicine, diagnostics, cosmetics, and food technology. This wide applicability and the strong interest in vesicles can be understood on the basis of their most outstanding properties which include (i) a high biocompatibility, (ii) the adjustability in composition and size, ranging from 20 nm to several tens of micrometers, (iii) the ease of surface modification, and (iv) the ability of encapsulating both hydrophilic and hydrophobic molecules into the aqueous core and the membrane interior, respectively.

Whereas vesicles have been developed to the point where they serve as stimuli-responsive drug delivery vehicles in biomedical applications, their application in food systems is currently lagging behind the technologies established in the biomedical field. Furthermore, the increasing variety of vesicle formulations suggested in either field of biomedicine, cosmetics, or foods needs to be augmented by gentle and controlled production processes.

The present work explored the design and controlled formation of functionalized vesicle structures, in particular but not exclusively for food applications with nutritional, large-scale processing, and technological perspectives. This included the assembly of edible polymersomes from a new type of food grade, amphiphilic block copolymer for controlled delivery-release applications under gastrointestinal conditions. The gentle and scalable process of dynamically enhanced vesicle extrusion was introduced and investigated for its ability to specifically adjust vesicle size and lamellarity. Finally, vesicles were combined with superparamagnetic iron oxide nanoparticles (NPs) with the aim of creating versatile magnetic adsorbents for bioseparation applications.

Multilamellar vesicle (MLV) precursors were prepared by the thin film hydration method. They were homogenized by repetitive extrusion through polycarbonate membranes with 800 nm, 400 nm, and 100 nm pore diameters to obtain VETS₈₀₀, VETS₄₀₀, and LUVETS₁₀₀, i.e. (large unilamellar) vesicles prepared by the extrusion technique, respectively. Giant unilamellar vesicles (GUVs) were formed using

the electroformation method. The mean size and polydispersity of LUVET suspensions, NP dispersions, and their composites were analyzed by dynamic light scattering (DLS). The degree of vesicle lamellarity was estimated using an optimized version of the TNBS assay for external vesicle surface area determination. These routine measurements were complemented with cryo transmission electron microscopy (cryo-TEM) and small angle neutron scattering (SANS) experiments. The Stewart assay was used to determine total phospholipid concentrations, while vesicle release properties were studied by the calcein leakage assay.

The biocompatible and biodegradable PEO-*b*-PMCL diblock copolymer was investigated for its ability to form food grade polymersomes with high storage stability and controlled release properties under gastrointestinal conditions.

The membrane bound vesicle structure was demonstrated by the successful preparation of LUVETs₁₀₀ from PEO₂₃-*b*-PMCL₆₃ with the hydrophilic, fluorescent dye calcein encapsulated in the aqueous core at high self-quenching concentration. The stability of the obtained polymer vesicles in terms of load retention was, however, not significantly higher than that of conventional, thin-walled lipid vesicles. This was revealed by the small difference between the passive permeability coefficients of calcein from LUVETs₁₀₀ prepared from PEO₂₃-*b*-PMCL₆₃ and 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC), respectively. In terms of barrier properties towards hydrophilic molecular cargo, the increased membrane thickness of the PEO₂₃-*b*-PMCL₆₃ bilayer was compensated by its less hydrophobic nature and its less ordered, entangled structure compared to the densely packed POPC membrane. The presence of external bile salts at duodenal concentration triggered an immediate and complete release of calcein from the POPC LUVETs₁₀₀. In contrast, calcein release from the PEO₂₃-*b*-PMCL₆₃ LUVETs₁₀₀ under the same gastrointestinal stress conditions followed a first-order release kinetic and was only complete after an incubation time of 30 min. This controlled destabilization behavior renders the food grade PEO-*b*-PMCL vesicles promising carriers for the delivery of nutrients and nutraceuticals to their site of absorption at increased bioavailability. To this end, the synthesis protocol of aqueous PEO-*b*-PMCL LUV suspensions needs, however, to be optimized in terms of coexisting mixed morphologies, vesicle yield, and encapsulation efficiency.

The self-assembly of certain PEO-*b*-PMCL polymers into predominantly lamellar vesicle structures was also directly observed under the light microscope by the formation of GUVs from PEO₂₃-*b*-PMCL₅₀ using an adapted electroformation protocol. The higher voltage required for the PEO-*b*-PMCL membrane to grow and its higher resistance to lateral fusion compared to POPC bilayers reflected the enhanced mechanical stability of polymersome membranes.

The gentle, continuous, and scalable process of dynamically enhanced vesicle extrusion was introduced within the scope of this work by designing and setting up the ROTating Membrane ExtrudeR (ROMER). The device couples the conventional

(static) extrusion process with a defined shear flow induced directly at the outlet of a nanopore membrane. Varying shear rates were expected to allow for a controlled shearing-off of leading vesicle endcaps emerging from the nanopore membrane. Thereby, vesicle size and lamellarity were meant to be controlled by a single, dynamically enhanced extrusion cycle. This was investigated in systematic parameter studies using regularized MLV, i. e. pre-extruded VET₈₀₀, suspensions from pharmaceutical grade phosphatidylcholines (PCs) and nanopore membranes with 200 nm pore diameters and different pore shapes.

Dynamically enhanced VET₈₀₀ extrusion resulted in a small decrease in mean vesicle size and lamellarity with increasing shear rates, if the shear forces acted at the outlet of a nanopore membrane with cylindrical pore channels. However, the collected vesicle suspensions were still characterized by the presence of heterogeneous, uni-, oligo- and multilamellar vesicles, irrespectively of the applied shear rate. The ROMER shear flow had no influence on the structure of vesicles emerging from conical pore exits. This showed that nanometer-sized lipid vesicles are only broken up by the action of the ROMER shear forces in the limit where they emerge from the confinement of cylindrical pore channels in a deformed, i. e. pre-stretched, state. However, since large MLV precursors are extensively broken down by a pressure-induced rupture mechanism at the pore entrance, this precondition for the effective shearing-off of pre-stretched vesicle endcaps at the pore exit is hardly given. Therefore, dynamically enhanced extrusion of MLV pre-suspensions did not allow the controlled generation of homogeneous, unilamellar to n-multilamellar vesicles by adjusting the shear rate at the membrane outlet. Nevertheless, the ROMER setup gave valuable insight into the mechanism of vesicle extrusion as discussed in this work.

Water-based magnetic nanofluids containing fatty acid bilayer stabilized, superparamagnetic iron oxide NPs were considered to load magnetic nanoparticles (MNPs) into the lumen of pharmaceutical grade phospholipid vesicles for bioseparation applications. The resulting magnetoliposomes could serve as cost-effective and versatile magnetic adsorbents offering the wide variety of liposomal surface functionalization, while showing no remanent magnetization.

Magnetoliposomes were prepared following the standard passive encapsulation protocol. This included MLV formation in the magnetic nanofluid, repetitive extrusion, and removal of nontrapped MNPs by size exclusion chromatography (SEC). It turned out that fatty acid double layer coated iron oxide NPs were prone to agglomeration and to interactions with phospholipid bilayers. As a consequence, extrusion of the composite suspension was not practicable through pore sizes < 400 nm. Furthermore, the separation of VETs₄₀₀ from nontrapped particle agglomerates by SEC was not successful. Finally, the particle agglomerates did not partition into the liposome lumen but were mainly localized in the external medium, often accumulated at the outer surface of the phospholipid vesicles. The poor stability of fatty

Summary

acid bilayer coated iron oxide NPs was attributed to the reversible adsorption of the dispersant layer and to the dynamic nature of fatty acid bilayers. Alternative strategies to sterically stabilize iron oxide NPs for subsequent liposome functionalization have been suggested.

In summary, this work provides a versatile platform of simple and reliable methodologies for the development, optimization, and in-process control of new vesicle formulations and processing technologies.

Zusammenfassung

Vesikel sind sphärische Kompartiment-Strukturen in wässrigen Medien. Sie bestehen aus einem wässrigen Kern und einem oder mehreren selbstorganisierten, geschlossenen Bilayern aus amphiphilen Molekülen. Bei den amphiphilen Molekülen kann es sich um biologische Phospholipide, synthetische Surfactants oder amphiphile Block Copolymere handeln. Die strukturelle und funktionelle Vielseitigkeit von Vesikeln hat zu vielen erfolgreichen, z. T. sogar kommerziellen Anwendungen in verschiedenen Gebieten geführt. Dazu gehören die Grundlagenforschung von Biomembranen, die Biomedizin, Diagnostik, und Kosmetik sowie die Lebensmitteltechnologie. Die breite Anwendbarkeit und das grosse Interesse an Vesikeln ist auf deren ausserordentliche Eigenschaften zurückzuführen. Die wichtigsten sind (i) eine hohe Biokompatibilität, (ii) die Einstellbarkeit der Zusammensetzung und Grösse, welche sich von 20 nm bis zum dreistelligen Mikrometer-Bereich erstreckt, (iii) die Leichtigkeit für Oberflächenmodifikation, und (iv) die Fähigkeit, sowohl hydrophile als auch hydrophobe Moleküle im wässrigen Kern oder im Membraninneren zu enkapsulieren.

Während Vesikel in biomedizinischen Anwendungen bis hin zu stimulus-reagierenden Vehikeln für die Abgabe von Arzneimitteln entwickelt wurden, hinkt ihre Anwendungsvielfalt in Lebensmittelsystemen den etablierten Technologien des biomedizinischen Bereichs hinterher. Des weiteren muss die zunehmende Vielfalt von vorgeschlagenen Vesikel-Rezepturen, nicht nur im Bereich der Biomedizin, sondern auch in Kosmetik- und Lebensmittelanwendungen, durch schonende und kontrollierte Produktionsprozesse erweitert werden.

Die vorliegende Arbeit erkundet das Design und die kontrollierte Bildung von funktionalisierten Vesikelstrukturen, vor allem aber nicht nur für Lebensmittelanwendungen mit Perspektiven in der Ernährung, der Herstellung im Industriellen Massstab und technologischer Anwendungen. Dies beinhaltet das Zusammenfügen von essbaren Polymersomen aus einem neuen, lebensmitteltauglichen, amphiphilen Block Copolymer für kontrollierte Freisetzungsanwendungen unter gastrointestinalen Bedingungen. Der schonende und skalierbare Prozess der dynamisch erweiterten Vesikelextrusion wurde eingeführt und bezüglich seiner Fähigkeit, Vesikelgrösse und -lamellarität spezifisch einzustellen, untersucht. Schliesslich wurden Vesikel mit superparamagnetischen Eisenoxid Nanopartikeln (NP) kombiniert, um vielseitige, magnetische Absorbenzien für Bioseparationsanwendungen zu kreieren.

Multilamellare vesikel (MLV) wurden mit der Film Hydratationsmethode hergestellt. Diese wurden durch wiederholte Extrusion durch Polycarbonatmembranen mit 800 nm, 400 nm, und 100 nm Porendurchmessern homogenisiert, um VETs₈₀₀, VETs₄₀₀, und LUVETs₁₀₀ ((large unilamellar) vesicles prepared by the extrusion technique) zu erhalten. Gigantische unilamellare Vesikel (GUV) wurden mit Hilfe der Elektroformationsmethode hergestellt. Die Durchschnittsgrösse und Polydispersität von LUVET-Suspensionen, NP-Dispersionen und deren Komposite wurden mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) analysiert. Der Grad der Vesikel-Lamellarität wurde unter Verwendung einer optimierten Version des TNBS assays für die Bestimmung der externen Vesikeloberfläche abgeschätzt. Diese Routinemessungen wurden mit cryo-TEM and SANS Experimenten ergänzt. Der Stewart assay wurde zur Bestimmung der Phospholipidkonzentration verwendet, während die Freisetzungseigenschaften von Vesikeln mittels Calcein assay untersucht wurden.

Das biokompatible und biologisch abbaubare PEO-*b*-PMCL Block Copolymer wurde im Hinblick auf seine Fähigkeit untersucht, lebensmitteltaugliche Polymersomen mit hoher Lagerstabilität und kontrollierten Freisetzungseigenschaften unter gastrointestinalen Bedingungen zu bilden.

Die erfolgreiche Herstellung von LUVETs₁₀₀ aus PEO₂₃-*b*-PMCL₆₃ konnte durch die Einkapsulierung des hydrophilen, fluoreszierenden Farbstoffs Calcein im wässrigen Kern in hoher, selbst-quencher Konzentration nachgewiesen werden. Die Freisetzungskinetik von Calcein aus diesen Polymervesikeln im Vergleich zu den konventionellen, dünnwandigen Lipidvesikeln wird jedoch nicht signifikant verzögert. Dies wurde ersichtlich aus dem geringen Unterschied zwischen den passiven Permeabilitätskoeffizienten von Calcein aus PEO₂₃-*b*-PMCL₆₃ und 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC) LUVETs₁₀₀. Bezüglich Barriereeigenschaften gegenüber hydrophilen Molekülen wurde die erhöhte Membrandicke des PEO₂₃-*b*-PMCL₆₃-Bilayers durch seine geringere Hydrophobizität und seine weniger geordnete, verkeilte Struktur im Vergleich zu der dicht gepackten POPC Membran kompensiert.

Die Gegenwart von externen Gallensalzen in Duodenumkonzentration löste bei den POPC LUVETs₁₀₀ eine unmittelbare und komplette Freisetzung von Calcein aus. Im Gegensatz dazu folgte die Calcein-Freisetzung aus den PEO₂₃-*b*-PMCL₆₃ LUVETs₁₀₀ unter denselben gastrointestinalen Stressbedingungen einer Kinetik erster Ordnung und war erst nach 30 min Inkubationszeit abgeschlossen. Diese kontrollierte Destabilisierung macht die lebensmitteltauglichen PEO-*b*-PMCL Vesikel besonders attraktiv als Transporter für die Auslieferung von Nährstoffen zu ihrem Absorptionsort mit erhöhter Bioverfügbarkeit. Hierfür muss aber das Syntheseprotokoll von wässrigen PEO-*b*-PMCL LUV-Suspensionen hinsichtlich coexistierenden gemischten Morphologien, Vesikelausbeute und Einkapsulierungseffizienz optimiert werden.

Die Selbstorganisation von bestimmten PEO-*b*-PMCL Molekülen in mehrheitlich lamellare Vesikelstrukturen konnte auch direkt während der Bildung von GUVs aus

PEO₂₃-*b*-PMCL₅₀ unter Verwendung eines angepassten Elektroformationsprotokolls unter dem Lichtmikroskop beobachtet werden. Die höhere Spannung, die von der PEO-*b*-PMCL Membran benötigt wurde um zu wachsen, und der höhere Widerstand gegenüber lateraler Fusion im Vergleich zu POPC Bilayern spiegelte die erhöhte mechanische Stabilität von Polymermembranen wider.

Der schonende, kontinuierliche und skalierbare Prozess der dynamisch erweiterten Vesikel-Extrusion wurde im Rahmen dieser Arbeit eingeführt. Hierfür wurde ein ROTating MEMbrane Extruder (ROMER) entwickelt und erfolgreich aufgebaut. Das Gerät verbindet den konventionellen (statischen) Extrusionsprozess mit einer definierten Scherströmung, die direkt am Austritt einer Nanoporenmembran erzeugt wird. Es wurde angenommen, dass die eingestellte Scherrate das Abscheren von aus der Nanoporenmembran austretenden Vesikelabschnitten kontrolliert, so dass die Vesikelgrösse und -lamellarität nach einem einzigen dynamisch erweiterten Extrusionszyklus spezifisch angepasst werden kann. Dies wurde im Rahmen einer systematischen Parameterstudie untersucht. Dabei wurden normalisierte MLV, d. h. vorextrudierte VET₈₀₀-Suspensionen aus pharmazietauglichen Phosphatidylcholinen (PC) und Nanoporenmembranen mit 200 nm Porendurchmesser sowie unterschiedlichen Porenformen verwendet.

Die dynamisch erweiterte Extrusion von VET₈₀₀ resultierte lediglich in einer geringen Abnahme der mittleren Vesikelgrösse und -lamellarität mit zunehmenden Scherraten, wenn die Scherkräfte am Ausgang von Nanoporenmembranen mit zylindrischen Porenkanälen wirkten. Unabhängig von der angewandten Scherrate waren die so produzierten Vesikelsuspensionen durch die Präsenz von heterogenen, uni-, oligo- und multilamellaren Vesikeln charakterisiert. Die ROMER Scherströmung hatte keinen Einfluss auf die Struktur der Vesikel, die aus konischen Porenausgängen hinaustraten. Dies zeigte, dass nanometer-grosse Lipidvesikel nur durch die Einwirkung von ROMER Scherkräften aufbrechen, wenn sie in einem deformierten, gestreckten Zustand aus der Einschränkung von zylindrischen Porenkanälen austreten. Weil grosse MLV-Vorläufer allerdings bereits am Poreneingang durch einen druckinduzierten Reissmechanismus stark aufgebrochen werden, wird diese Voraussetzung für die effektive Abscherung von gestreckten Vesikelabschnitten am Porenausgang kaum noch erfüllt. Deshalb war es nicht möglich, mittels dynamisch erweiterter Extrusion von MLV-Vorsuspensionen homogene, unilamellare bis n-multilamellare Vesikel durch Variation der Scherrate am Membranaustritt gezielt zu generieren. Nichtsdestotrotz hat der ROMER-Setup einen wertvollen Einblick in den Mechanismus der Vesikel-extrusion ermöglicht.

Wasserbasierte, magnetische Nanofluide, die fettsäurebilayer-stabilisierte, superparamagnetische Eisenoxid-NPs beinhalten, wurden evaluiert, um magnetische Nanopartikel (MNP) in das Lumen von pharmazietauglichen Phospholipidvesikeln für Bioseparationsanwendungen zu laden. Die resultierenden Magnetoliposomen könnten als kostengünstige und vielseitige magnetische Absorbenzien dienen, die eine

grosse Vielfalt von liposomalen Oberflächenfunktionalisierungen offerieren und keine magnetische Remanenz zeigen.

Magnetoliposomen wurden mittels Standardprotokoll der passiven Enkapsulierung hergestellt. Dies beinhaltet die Bildung von MLVs im magnetischen Nanofluid, mehrfache Extrusion und die Entfernung von uneingeschlossenen MNPs durch Gelfiltration (SEC). Es hat sich herausgestellt, dass fettsäurebilayer-beschichtete Eisenoxid-NPs stark zu Agglomeration und zur Interaktion mit Phospholipid-Bilayern neigen. Deshalb war die Extrusion der Kompositsuspension durch Porengrössen < 400 nm nicht praktikabel und die Trennung von VETs₄₀₀ von uneingeschlossenen Partikelagglomeraten mittels SEC nicht erfolgreich. Schliesslich lagerten sich die Partikelagglomerate nicht in das Lumen der Liposomen ein, sondern befanden sich hauptsächlich im äusseren Medium, oft an der Oberfläche von den Phospholipidvesikeln akkumuliert. Die geringe Stabilität der fettsäurebilayer-beschichteten Eisenoxid-NPs wurde der reversiblen Adsorption der Dispersionsschicht und den dynamischen Eigenschaften von Fettsäurebilayern zugeschrieben. Alternative Strategien zur sterischen Stabilisierung von Eisenoxid-NPs für die darauffolgende Funktionalisierung von Liposomen wurden vorgeschlagen.

Abschliessend bleibt festzuhalten, dass die vorliegende Arbeit eine nützliche Sammlung von einfachen und zuverlässigen Methoden zur Entwicklung, Optimierung und Qualitätskontrolle von neuen Vesikelrezepturen und Verarbeitungstechnologien beinhaltet.