



FORSCHUNGSKREIS DER  
ERNÄHRUNGSINDUSTRIE E.V.

# Fettwahrnehmung und Sättigungsregulation: Ansatz zur Entwicklung fettreduzierter Lebensmittel

**Zentrale Ergebnisse des gleichnamigen  
DFG/AiF-Clusterprojektes**





# Zentrale Ergebnisse des DFG/AiF-Clusterprojektes

## Fettwahrnehmung und Sättigungsregulation: Ansatz zur Entwicklung fettreduzierter Lebensmittel

2009 - 2012

Förderung durch:

---



Bundesministerium  
für Wirtschaft  
und Technologie

DFG



FORSCHUNGSKREIS  
DER ERNÄHRUNGSINDUSTRIE E.V.

**AiF** ALLIANZ  
INDUSTRIE  
FORSCHUNG

## **Impressum**

ISBN 978-3-925032-51-6

### **Herausgeber**

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)  
Godesberger Allee 142-148  
D-53175 Bonn

### **Redaktion**

Dr. Volker Häusser  
Daniela Kinkel

### **Layout/Gestaltung**

freiart gmbh, Königswinter

### **Druck**

Bonner Universitäts-Buchdruckerei, Bonn

© FEI e. V. 2012

# Inhalt

|  |     |
|--|-----|
| <b>Einführung und Motivation</b> .....   | 5   |
| <b>Konzeption/Beteiligte des DFG/AiF-Clusterprojektes*</b> .....   | 9   |
| <b>Teilprojekt 1 (AiF)</b> .....   | 11  |
| Mikro- und makrostrukturelle Matrixeigenschaften als Modulatoren der<br>„Fett“-Wahrnehmung in Milchprodukten (AiF 15960 N)   |     |
| <b>Summary Sub-Project 1</b> .....   | 23  |
| <b>Teilprojekt 2 (DFG)</b> .....   | 25  |
| Fettreduktion durch Doppelemulsionen: Grundlegende Untersuchungen zur Beeinflussung der Mikrostruktur von Doppelemulsionen und deren Auswirkung auf konsumentenrelevante Produkteigenschaften (mouth-feel, Kremigkeit, Fettgeschmack, Sättigung) |     |
| <b>Summary Sub-Project 2</b> .....   | 38  |
| <b>Teilprojekt 3 (AiF)</b> .....   | 41  |
| Identifizierung von sättigungsregulierenden Inhaltsstoffen in Nahrungsfetten und Optimierung von fettarmen Lebensmitteln durch Zusatz von lipoiden Verbindungen mit hoher Sättigungswirkung (AiF 15961 N)  |     |
| <b>Summary Sub-Project 3</b> .....   | 55  |
| <b>Teilprojekt 4 (DFG)</b> .....   | 57  |
| Modulation der Insulinwirkung im Gehirn durch Nahrungsfette  |     |
| <b>Summary Sub-Project 4</b> .....   | 66  |
| <b>Teilprojekt 6 A (DFG)</b> .....   | 67  |
| Identifizierung retronasal-olfaktorisch und orosensorisch wirksamer Modulatoren des Fettgeschmacks von Nahrungsfetten  |     |
| <b>Summary Sub-Project 6 A</b> .....   | 86  |
| <b>Teilprojekt 6 B (DFG)</b> .....   | 87  |
| Identifizierung retronasal-olfaktorisch und orosensorisch wirksamer Modulatoren des Fettgeschmacks von Nahrungsfetten  |     |
| <b>Summary Sub-Project 6 B</b> .....   | 97  |
| <b>Teilprojekt 7 (DFG)</b> .....   | 99  |
| Molekulare Mechanismen der Fettgeschmackswahrnehmung   |     |
| <b>Summary Sub-Project 7</b> .....   | 108 |

\* Hinweis: Teilprojekt 5 wurde nicht realisiert (s.S.9).

TP  
1

TP  
2

TP  
3

TP  
4

TP  
6

TP  
7

TP  
8

TP  
9

|   |     |
|---|-----|
| <b>Teilprojekt 8 (AiF)</b> .....  | 109 |
| Simulation und Vorhersage des mechanisch induzierten Mundgefühls<br>beim Verzehr von fettreduzierten, nicht stückigen, fließfähigen Lebens-<br>mitteln (AiF 15962 N)                  |     |
| <b>Summary Sub-Project 8</b> .....  | 130 |
| <b>Teilprojekt 9 (AiF)</b> .....  | 133 |
| Analytische und konsumentenorientierte sensorische Untersuchungen<br>und Wahrnehmungen an ausgewählten Matrices und Lebensmitteln<br>mit unterschiedlichen Fettgehalten (AiF 15963 N) |     |
| <b>Summary Sub-Project 9</b> .....  | 150 |
| <b>Ziele und Ergebnisse des Clusterprojektes (Zusammenfassung)</b> .....  | 153 |
| <b>Aims and Results of the Cluster Project (Summary)</b> .....  | 161 |
| <b>Publikationen aus dem Clusterprojekt (Auswahl)</b> .....   | 168 |

## Einführung und Motivation

In den letzten Jahrzehnten haben sozioökonomische Veränderungen, ein dichtes Angebot an frischen und zubereiteten Lebensmitteln und Getränken verbunden mit einer hohen Verfügbarkeit vor allem in den Industrieländern zu einer signifikanten Veränderung in den Ernährungsgewohnheiten geführt. Ein zu hoher Konsum von Lebensmitteln mit einer hohen Energiedichte und Bewegungsmangel gelten heute als Hauptursachen für Übergewicht und davon ausgehend auch für andere ernährungsbedingte Krankheiten wie *Diabetes mellitus* Typ 2 und Herz-Kreislauf-Erkrankungen.

Geschätzt sind weltweit 500 Millionen Menschen fettleibig, 1,5 Milliarden Menschen übergewichtig (70% der Bevölkerung von USA, 50% der Menschen in Deutschland). Dieses gesellschaftspolitische Problem ist nicht nur eine Herausforderung für das Gesundheitswesen hinsichtlich der resultierenden Kosten, sondern auch für die Lebensmittelindustrie. Der Forderung nach gesundheitsfördernden und bedarfsorientierten Lebensmitteln durch die Verbraucher und staatliche Einrichtungen muss die Industrie mit Produkten, die sich durch ein ausgewogenes Ernährungsprofil auszeichnen, gerecht werden. So hat zum Beispiel eine in 2011 in England durchgeführte Studie ergeben, dass 44% der Befragten um den Fettgehalt in Lebensmitteln besorgt sind.

Pflanzliche und tierische Fette spielen in der Humanernährung traditionell eine wichtige Rolle. Lebensmittel mit traditionell hohem Fettgehalt wie Speiseöle, Nüsse, Samen, Butter und fettreiche Käse-, Fleisch- und Wurstsorten sowie spezielle Zubereitungsformen wie Backen, Braten und Frittieren tragen in der Summe erheblich zur Fett- und somit auch zur Energieaufnahme bei.

Speisefette in der großen und sehr heterogenen Klasse der Lebensmittellipide nehmen darüber hinaus vielfältige Aufgaben im menschlichen Organismus wahr, die deutlich über die Energiegewinnung und die Bildung von Depotfett hinausgehen. Nahrungslipide fördern die Absorption von fettlöslichen Vitaminen (A, D, E und K), gleichzeitig repräsentieren pflanzliche Fette eine äußerst wertvolle Quelle essentieller Fettsäuren.

Für die Lebensmittelindustrie sind zudem die technologischen Eigenschaften von Nahrungsfetten von besonderem Wert, wie z.B. ihre Eignung zur Emulsionsbildung, der unmittelbare Einfluss auf die Textureigenschaften von Lebensmitteln und die damit verbundenen Einflüsse auf wichtige sensorische Attribute wie Mundgefühl und Cremigkeit.

Lipide und Lipoide sind darüber hinaus wichtige Trägersysteme für zahlreiche lipophile Aroma- und Geschmacksstoffe und tragen auch selbst zum Aroma bzw. Geschmack bei, entweder durch geruchs- bzw. geschmacksaktive Verbindungen, die im Fett natürlich vorkommen oder durch solche, die während des Herstellungsprozesses gebildet werden. Gerade in den letzten Jahren haben

vielfältige Studien die wichtige Rolle von Fetten für die Freisetzung von Aromastoffen und die daraus resultierenden Sensorikprofile beschrieben und für die industrielle Anwendung nutzbar gemacht.

Eine weitere wichtige, noch nicht vollständig geklärte Dimension ist der Einfluss von Lipiden bzw. Lipoiden auf die postprandiale Regulation der Sättigung. Regional unterschiedliche Verzehrsgewohnheiten und das unterschiedlichen Auftreten von Übergewicht können dabei wichtige Hinweise für die Entwicklung von neuen, gesundheitsfördernden Produkten geben.

Ein weiterer Aspekt ist der demographische Wandel und die veränderte Erwartungshaltung gegenüber den Eigenschaften von Lebensmitteln, welche insbesondere bei älteren Menschen beobachtet wird. Neben den besonderen Anforderungen für eine ausgewogene und gesunde Ernährung spielen insbesondere Appetit und Sättigung eine erhebliche Rolle für die Präferenz gegenüber neuen Produkten.

Da Fette von den drei Makronährstoffen die höchste Energiedichte haben, stellt die Reduktion des Fettanteils in der Lebensmittelrezeptur einen geeigneten Ansatz zur Reduktion der Kalorienzufuhr dar. Allerdings spielt nicht nur der Fettanteil, sondern auch die Auswahl der Fette aus gesundheitlicher Sicht eine entscheidende Rolle.

Um den Bedürfnissen nach fettärmeren Lebensmittel gerecht zu werden, wurde in den letzten Jahren eine Vielzahl an neuen „leichten“ Produkten vermarktet: Im Zeitraum von 2008 – 2010 waren 8,6% der weltweit neu eingeführten Produkte fettreduziert, in Nordamerika waren es sogar 18,9%. Aus den verschiedenen Produktsegmenten sind vor allem würzige Knabberartikel, Milchprodukte, Tiefkühlprodukte, Backwaren, Cerealien sowie süße bzw. würzige Aufstriche die wichtigsten Kategorien für fettreduzierte Produktneuheiten mit einem Anteil von jeweils größer 10%.

Es ist allerdings auch bekannt, dass fettreduzierte Produkte vom Verbraucher nur dann akzeptiert und damit im Sinne einer umsichtigen Ernährung verwendet werden, wenn sie sich in ihren qualitätsbestimmenden Eigenschaften (z.B. Aroma, Geschmack, Textur) von normalen fettreichen Produkten nicht unterscheiden. Eine von Datamonitor in 2011 durchgeführte Branchenumfrage ergab, dass 71% der Befragten der Meinung sind, dass die derzeit auf dem Markt angebotenen fettreduzierten Lebensmittel nicht den Erwartungen der Verbraucher hinsichtlich Geschmack und Textur entsprechen.

Eine aus Verbrauchersicht zufriedenstellende Formulierung von fettreduzierten Lebensmitteln stellt auch heute noch eine erhebliche Herausforderung für die Lebensmittelindustrie dar, da das komplexe Zusammenspiel zwischen Textur, Aroma und Geschmack bis dato nicht ausreichend wissenschaftlich aufgeklärt ist. Diese Sachlage bildete die Grundlage für das vorliegende DFG/AiF-Clusterprojekt des FEI, in dem durch Kombination von Grundlagen- und anwendungs-



orientierter Forschung ein wesentlicher Erkenntnisgewinn im vorwettbewerblichen Bereich geschaffen werden sollte.

Das Clustervorhaben ist in acht Teilprojekte gegliedert, die alle Aspekte gesundheitsfördernder und wohlschmeckender Lebensmittel abdecken. Beginnend von den Matrixeigenschaften von fettreduzierten Lebensmitteln wurden auch analytische und sensorische Parameter erfasst und mit molekularen Mechanismen der Fettwahrnehmung und Sättigungssteuerung korreliert.

Dieser holistische Ansatz unterscheidet das Clusterprojekt in erheblichem Maße von früheren Studien, die sich mit der Entwicklung von Fettersatzstoffen beschäftigt haben. Die gewonnenen Informationen und Erkenntnisse sind darüber hinaus geeignet, die Reduzierung von *trans*-Fettsäuren und die Balancierung der Anteile von gesättigten Fettsäuren in Lebensmitteln zu unterstützen.

Die wirtschaftliche Bedeutung des Projektes für kleinere und mittlere Unternehmen (KMU) ist vielfältig gegeben. In Deutschland werden beispielsweise von 143 milchverarbeitenden Unternehmen (2011) die unterschiedlichsten frischen und fermentierten Milchprodukte angeboten. Hier sind insbesondere KMU gefordert, die Produktpalette durch sensorisch ansprechende „Low Fat“-Produkte zu erweitern.

Vor dem Hintergrund der stetig wachsenden Weltbevölkerung und der immer wichtiger werdenden Schonung der natürlichen Ressourcen ist auch die nachhaltige Produktion von gesunden Nahrungsfetten ein immer bedeutenderes Thema. Die Ergebnisse des Clusterprojekts können auch hierbei – durch die gezielte Nutzung der verfügbaren Quellen an Nahrungsfetten in Verbindung mit einer optimalen Formulierung im Endlebensmittel – einen wichtigen Beitrag leisten.

Für die finanzielle Förderung des Clusters durch das Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie (BMWi) und die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) sowie für die nachhaltige Unterstützung, die das Vorhaben seitens zahlreicher Unternehmen und Verbände erhielt, sei an dieser Stelle, auch im Namen des FEI, ebenso herzlich gedankt wie für die gute Zusammenarbeit mit der DFG und der AIF. Ein besonderer Dank gilt Prof. Schieberle und seiner Arbeitsgruppe für die professionelle Koordinierung des Vorhabens und die gute und vertrauensvolle Zusammenarbeit mit dem Projektbegleitenden Ausschuss.



Dr. Gerhard Kramer  
Symrise AG, Holzminden

(Leiter des Projektbegleitenden Ausschusses)  
Holzminden, im November 2012



## Konzeption/Beteiligte des DFG/AiF-Clusterprojektes

### Fettwahrnehmung und Sättigungsregulation: Ansatz zur Entwicklung fettreduzierter Lebensmittel

#### Teilprojekte (TP):

- TP 1 (AiF): Mikro- und makrostrukturelle Matriceigenschaften als Modulatoren der "Fett"-Wahrnehmung in Milchprodukten**  
Universität Hohenheim, Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, FG Lebensmittel tierischer Herkunft, Prof. Dr. Dr. Jörg Hinrichs
- TP 2 (DFG): Fettreduktion durch Doppemulsionen: Grundlegende Untersuchungen zur Beeinflussung der Mikrostruktur von Doppemulsionen und deren Auswirkung auf konsumentenrelevante Produkteigenschaften (mouth-feel, Kremigkeit, Fettgeschmack, Sättigung)**  
Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Institut für Bio- und Lebensmitteltechnik, Bereich I: Lebensmittelverfahrenstechnik, Prof. Dr. Heike P. Schuchmann
- TP 3 (AiF): Identifizierung von sättigungsregulierenden Inhaltsstoffen in Nahrungsfetten und Optimierung von fettarmen Lebensmitteln durch Zusatz von lipoiden Verbindungen mit hoher Sättigungswirkung**  
Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie (DFA), Freising, Prof. Dr. Dr. Peter Schieberle/Prof. Dr. Veronika Somoza
- TP 4 (DFG): Modulation der Insulinwirkung im Gehirn durch Nahrungsfette**  
Medizinische Universitätsklinik, Med. Klinik und Poliklinik, Abteilung Innere Medizin IV, Tübingen, Prof. Dr. Andreas Fritsche/Prof. Dr. Hans-Ulrich Häring  
Universität Tübingen, Institut für Medizinische Psychologie und Verhaltensneurobiologie, Prof. Dr. Niels Birbaumer  
Universität Tübingen, Institut für Pharmazie, Abteilung Pharmakologie und Toxikologie, Prof. Dr. Dr. Peter Ruth
- TP 5 (DFG): Das ursprünglich geplante Teilprojekt 5**  
**Ligandeneigenschaften für Transkriptionsfaktoren von Adipokinen – Grundlage sättigungsregulierender Effekte von Nahrungsfetten?**  
wurde im Ergebnis des Begutachtungsverfahrens nicht realisiert. Die Teilprojekt Nummerierung folgt der ursprünglichen Gesamtkonzeption.

**TP 6 (DFG): Identifizierung retronasal-olfaktorisch und orosensorisch wirksamer Modulatoren des Fettgeschmacks von Nahrungsfetten**

Technische Universität München, Wissenschaftszentrum Weihenstephan WZW, Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und Molekulare Sensorik, Prof. Dr. Thomas Hofmann

Technische Universität München, Department Chemie, Lehrstuhl für Lebensmittelchemie, Prof. Dr. Dr. Peter Schieberle

**TP 7 (DFG): Molekulare Mechanismen der Fettgeschmackswahrnehmung**

Deutsches Institut für Ernährungsforschung (DIFE), Nuthetal, Abt. Molekulare Genetik, Prof. Dr. Wolfgang Meyerhof/Dr. Maik Behrens

**TP 8 (AiF): Simulation und Vorhersage des mechanisch induzierten Mundgefühls beim Verzehr von fettreduzierten, nicht stückigen, fließfähigen Lebensmitteln**

Universität Erlangen-Nürnberg, Department für Chemie- und Bioingenieurwesen, Lehrstuhl für Strömungsmechanik, Prof. Dr. Antonio Delgado/Dr. Cornelia Rauh

**TP 9 (AiF): Analytische und konsumentenorientierte sensorische Untersuchungen und Wahrnehmungen an ausgewählten Matrices und Lebensmitteln mit unterschiedlichen Fettgehalten**

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg, Fakultät Life Sciences, Department Ökotoxikologie, Labor Sensorik, Prof. Dr. Mechthild Busch-Stockfisch

**Koordination: Prof. Dr. Dr. Peter Schieberle**

Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie (DFA), Freising

**Beteiligte Wirtschaftsverbände:**

- Bundesverband der Hersteller von Lebensmitteln für eine besondere Ernährung e.V. – Diätverband, Bonn
- Milchindustrie-Verband e.V. (MIV), Berlin

**Zahl der beteiligten Unternehmen im Projektbegleitenden Ausschuss:**

- 30

## Teilprojekt 1 (AiF)

# Mikro- und makrostrukturelle Matriceigenschaften als Modulatoren der „Fett“-Wahrnehmung in Milchprodukten (AiF 15960 N)

**Prof. Dr. Dr. Jörg Hinrichs**

**Dipl.-Troph. Alina Krzeminski**

Universität Hohenheim

Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie

FG Lebensmittel tierischer Herkunft

## Ausgangssituation

Die Textur ist ein entscheidendes Kriterium für die Akzeptanz oder Ablehnung eines Lebensmittels. Darüber hinaus stellt die Textur ein wichtiges sensorisches Merkmalsattribut dar. Zum Beispiel nimmt in Joghurtprodukten mit steigender Partikelgröße ( $> 50 \mu\text{m}$ ) das raue Mundgefühl zu und die cremige Wahrnehmung ab.

Zur Bewertung der sensorischen Eigenschaften (Aussehen, Geschmack, Geruch und Textur) von Lebensmitteln ist ein Sensorikpanel bisher unersetzbar. Der Aufbau eines solchen Panels ist allerdings kostenintensiv und zeitaufwendig. Aus diesem Grund ist die Suche nach Möglichkeiten, das Mundgefühl instrumentell zu bestimmen bzw. vorhersagen zu können, ein wichtiger Teil aktueller Forschung. Bisher wurden zur Beschreibung einiger Sensorikattribute, wie z. B. der textuellen Viskosität und der Cremigkeit rheologische Messungen [1-2], das *Posthumus Funnel* [3-4] herangezogen. Die Wahrnehmung des Mundgefühls ist ein sehr komplexer und noch nicht vollständig verstandener Prozess. Das Mundgefühl während des Kau- und Schluckprozesses wird nicht nur von den Fließeigenschaften des Lebensmittels, sondern auch von den Reibeffekten, die zwischen Zunge und Gaumen auftreten, beeinflusst. Deshalb reicht das Untersuchen rheologischer Eigenschaften von Produkten oft nicht aus, um das sensorische Empfinden hinreichend beschreiben zu können.

## Motivation

Im Rahmen des Forschungsvorhabens (Teilprojekt 1 im DFG/AiF-Cluster) wurden Milchproduktmatrices systematisch mittels physikalischer Methoden, deren Parameter an die Belastung im Mundraum adaptiert wurden, charakterisiert.

Dazu wurde die Zusammensetzung und technologische Behandlung der Milchproduktmatrix variiert, um unterschiedliche Mikro- und Makrostrukturen aufzubauen. Zudem wurden die Produkte einer sensorischen Analyse in Kooperation mit der HAW Hamburg (Teilprojekt 9 des Clusters) unterzogen, um diese mit den Strukturdaten zu korrelieren. Im Teilprojekt 8 (Universität Erlangen-Nürnberg) wurde anhand von rheologischen Messergebnissen die Vorhersage textueller Mundgefühlsattribute durch numerische Simulation geprüft. Mit diesem Wissen wurden gemeinsam mit der DFA Freising (Teilprojekt 3), der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen (Teilprojekt 4) und der TU München (Teilprojekt 6) fettreduzierte Matrices gestaltet; diesen wurden neue Verbindungen und „Sättigungsbotsstoffe“ zugesetzt und sie wurden hinsichtlich ihrer Fettwahrnehmung bzw. Sättigungswirkung beurteilt.

## Oraler Prozess und sensorische Wahrnehmung

In diesem Forschungsansatz wurden verschiedene physikalische Methoden gewählt, um die komplexen Vorgänge im Mund während des Verzehrs eines halbfesten Milchprodukts nachzubilden. Die textuelle Wahrnehmung eines Produkts im Mund hängt im Wesentlichen von dessen Fließeigenschaften, den zwischen Zunge und Gaumen auftretenden Reibungskräften und vorhandenen Partikeln ab. **Abb. 1** stellt die einzelnen Prozessabläufe mit den resultierenden Wahrnehmungen während des Verzehrs eines halbfesten Milchprodukts dar. Zu Beginn des Verzehrs befindet sich das Lebensmittel im vorderen Bereich der Mundhöhle. Dort ist der Spalt zwischen Zunge und Gaumen noch relativ groß ( $> 10 \mu\text{m}$ ), so dass kein Oberflächenkontakt besteht und für das Mundgefühl die Fließeigenschaften dominieren. Wahrgenommen werden die Viskositätseigenschaften des Produkts sowie dessen Eigenschaft zur Mundbelegung. Wandert das Lebensmittel im Mundraum weiter, wird der Spalt zwischen Zunge und Gaumen kleiner ( $< 10 \mu\text{m}$ ), so dass vorhandene Partikel Reibeffekte verursachen. In diesem Bereich des Mundraums wird detektiert, ob ein Lebensmittel cremig, glatt oder rau ist. Der Schluckvorgang wird eingeleitet, wenn der Nahrungsbissen ausreichend klein ist. Dabei wird die zerkleinerte Nahrung mit Speichel durchmischt und gleitfähig gemacht. Das Mundgefühl wird durch den mit Speichel bedeckten Nahrungsbrei und durch die Schmiereigenschaften des Lebensmittels an sich bestimmt. Kenntnisse zum Fließ- und Reibungsverhalten eines Lebensmittels ermöglichen es, Rückschlüsse auf die textuelle Wahrnehmung eines Produkts, insbesondere die sensorische „Cremigkeit“, zu treffen.

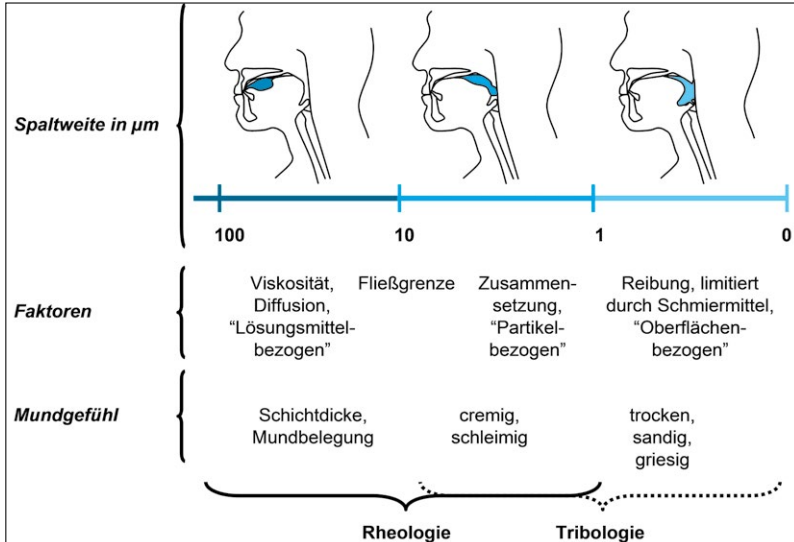


Abb. 1: Abläufe im Mund während des Verzehrs eines halbfesten Milchprodukts.

## Experimentelle Untersuchung zum Reibungsverhalten

Reibungseigenschaften von Stoffen werden in der Regel mittels Tribometer bestimmt, mit dem Reibungskräfte zwischen zwei sich in Bewegung befindlichen Körpern erfasst werden. Zur Durchführung der tribologischen Messung wurde eine Tribologiezelle (T-PTD200, BC12.7, Anton Paar, Ostfildern) auf einem Rheometer (Physica MCR 301, Anton Paar, Ostfildern) befestigt. Der schematische Aufbau der Tribologiezelle ist in **Abb. 2** dargestellt. Die Messung mit der Tribologiezelle beruht auf einem Kugel-auf-drei-Platten-Prinzip. Die Tribologiezelle besteht aus einer Kugel, die an einem Schaft befestigt ist, einem Probenhalter, der drei kleine Plättchen enthält und einer unteren Ebene, die in x-, y- und z-Richtung beweglich ist und auf der der Probenhalter angebracht wird. Sowohl die Kugel als auch die Plättchen sind beliebig austauschbar, so dass die Anpassung des Systems an verschiedene Materialkombinationen möglich ist. Auf den Kontaktflächen zwischen Kugel und Plättchen wirken verschiedene Kräfte. Die Kugel wird mit einer definierten Normalkraft  $F_N$  auf die Plättchen gedrückt. Aus der Normalkraft  $F_N$  wird die Normallast  $F_L$  nach folgender Gleichung (**Gl. 1**) berechnet:

$$F_L = F_N \cdot \sqrt{2} \quad (1)$$

Die Normallast  $F_L$  ist die Kraft, die senkrecht zur Reibungsfläche auf den Plättchen entsteht. Während der Messung rotiert die Kugel mit einer definierten Drehzahl  $n$  auf den Plättchen, aus der die Gleitgeschwindigkeit  $v_s$  berechnet wird. Zur

Aufrechterhaltung der Geschwindigkeit ist ein bestimmtes Drehmoment  $M$  notwendig, das durch das Rheometer vorgegeben wird. Aus dem Drehmoment  $M$  wird die Reibkraft  $F_R$  ermittelt (Gl. 2), die durch Division mit der Normallast  $F_L$  den dimensionslosen Reibungskoeffizienten  $\mu$  ergibt (Gl. 3).

$$F_R = M \cdot \frac{\sqrt{2}}{r_{Kugel}} \quad (2)$$

$$\mu = \frac{F_R}{F_L} \quad (3)$$

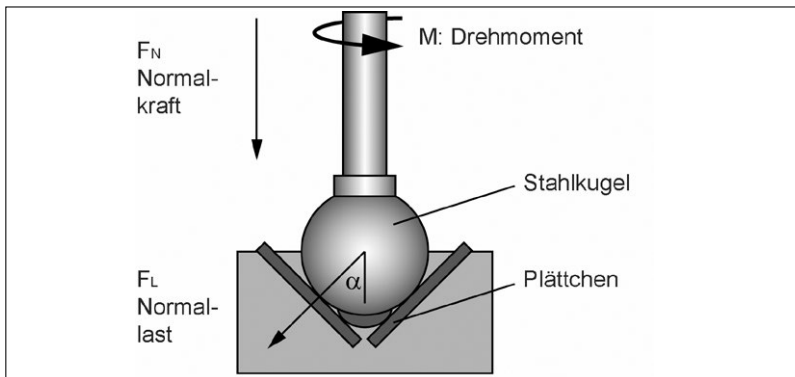


Abb. 2: Schematischer Aufbau der Tribologiezelle.

Mit dieser Messmethode werden vorrangig die Reibungseigenschaften von Schmierölen bewertet. Die tribologische Messung wird üblicherweise mit der Materialkombination hart – hart (Stahlkugel – Teflon) durchgeführt. Teflon (Polytetrafluorethylen) zeichnet sich durch einen niedrigen Reibwert und durch eine hohe Beständigkeit gegenüber chemischen, mechanischen und thermischen Einflüssen aus. Jedoch stellt Teflon ein relativ hartes ( $E = 0,5$  GPa) und glattes Material dar und ist daher, wie Vorversuche zeigten, für die Nachbildung der Zungeneigenschaften ungeeignet. Deshalb wurden elastische Materialien mit verschiedenen Rauigkeits- und Verformbarkeitsmerkmalen im Vergleich zu den Eigenschaften der Zungenoberfläche untersucht und bewertet. Zu den untersuchten elastischen Materialgruppen gehörten Styrol-Butadien-Kautschuk (SBR, P1 bis P4), Naturkautschuk (P5, P6) und Moosgummi (P7, P8). Die Oberflächentopographie der elastischen Plättchen wurde durch den Young's Modulus, die Eindringtiefe der Kugel in das Material und durch Rauigkeitsparameter charakterisiert [5]. Die Oberflächentopographie der elastischen Plättchen wurde mittels Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) und Chromatic White Light (CWR)



untersucht; die Ergebnisse sind in **Abb. 3** als dreidimensionale Aufnahmen dargestellt. Die Aufnahmen verdeutlichen das Ausmaß der Rauigkeit sowie der Regelmäßigkeit der Oberflächenstrukturen. Diese reicht von regelmäßig (P6, P7) bis hin zu unregelmäßig strukturierten Oberflächen (P1 bis P5 sowie P8).

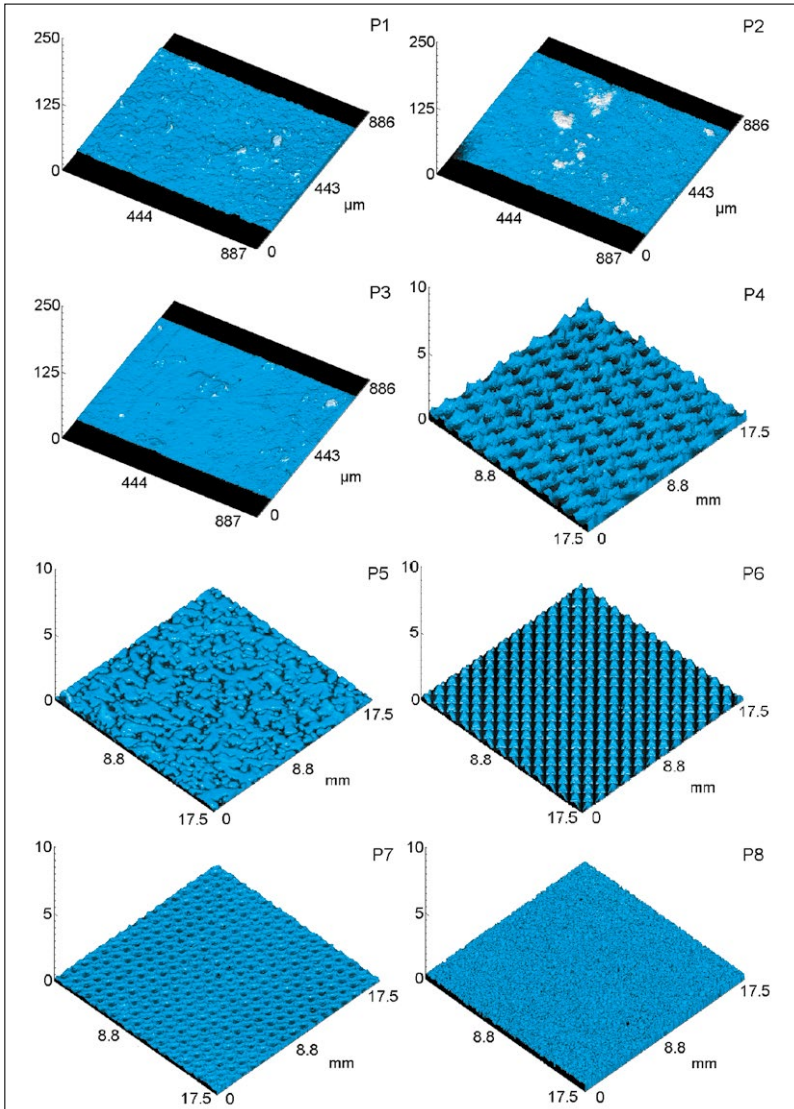


Abb. 3: Oberflächentopographie der elastischen Plättchen.

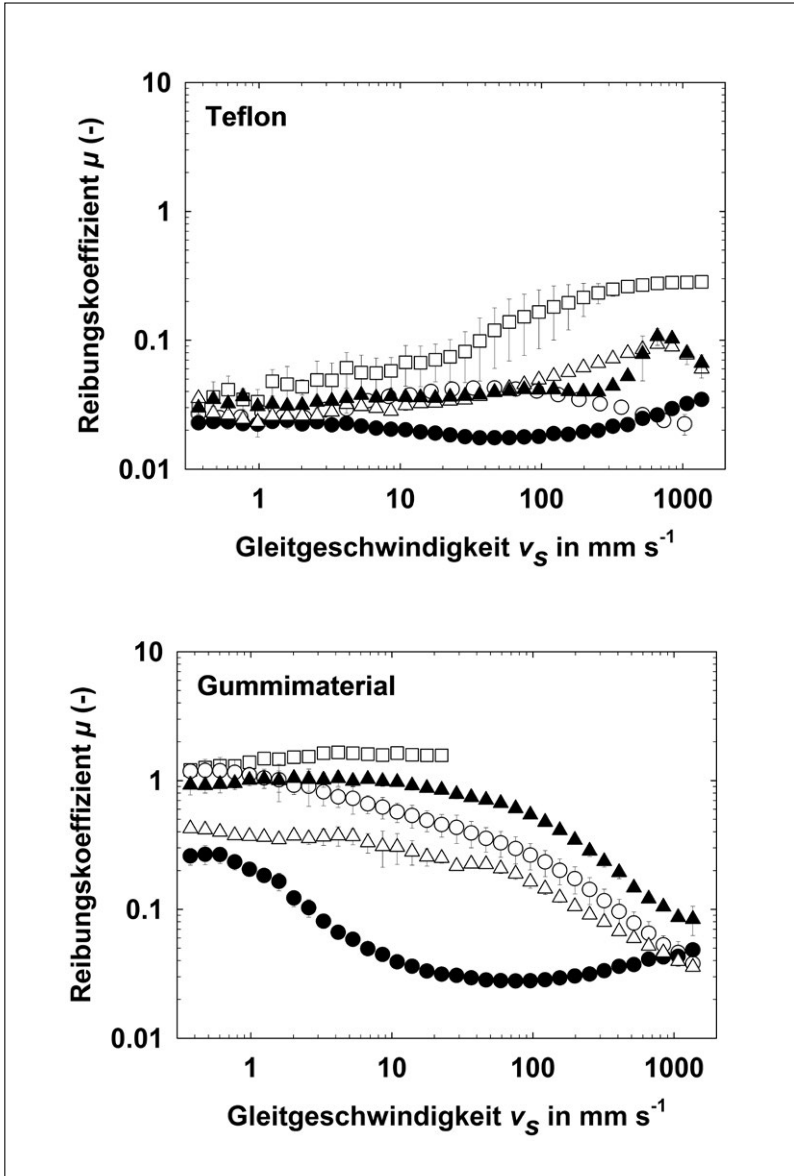


Abb. 4: Reibungskurven für die Materialkombination hart – hart (Stahlkugel – Teflon, oben) und hart – weich (Stahlkugel – Gummi material, unten) mit  $F_N = 3 \text{ N}$ ,  $\vartheta = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $n = 5$ .  
 □ trocken, ○ Wasser, ● Öl, Δ Vollfettjoghurt (3,5 % Fett, 4,5 % Protein), ▲ Magermilchjoghurt (< 0,1 % Fett, 4,5 % Protein)

Zur Auswahl einer geeigneten Materialkombination wurden die Gleiteigenschaften mit einer glatten und harten Edstahlkugel (repräsentativ für Gaumen) auf elastischen Plättchen (Zunge) für verschiedene Produkte bzw. Schmiermittel untersucht. Die Reibungseigenschaften wurden bei einer Normalkraft von  $F_N = 3 \text{ N}$  und einer Gleitgeschwindigkeit von  $v_s = 0,1 \dots 3.000 \text{ mm s}^{-1}$  bestimmt. Die Versuche wurden bei einer konstanten Temperatur von  $20 \text{ °C}$  durchgeführt, um die Vergleichbarkeit mit Literaturdaten zu gewährleisten. Durch ein in die Geometrieaufnahme integriertes Peltierelement wurde das Messsystem auf  $20 \text{ °C}$  temperiert.

Wie in **Abb. 4** (oben) ersichtlich, führte die Materialkombination hart – hart (Stahlkugel – Teflon) zu sehr flachen Kurvenverläufen, die keine gute Unterscheidung zwischen verschiedenen Schmiermitteln ermöglichte. Die Kombination hart – weich (Stahlkugel – Gummimaterial, **Abb. 4** (unten)) gewährleistete die für eine tribologische Messung charakteristischen Stribeck-Kurvenverläufe [6] mit wenigen Stick-Slip-Effekten und sehr gut reproduzierbaren Ergebnissen innerhalb des getesteten Geschwindigkeitsregimes. Weiterhin nahm der Reibungskoeffizient mit zunehmendem Fettgehalt der Schmierstoffe ab. Die Ergebnisse zeigten, dass das beschriebene Tribosystem zur Bestimmung der Reibungseigenschaften von halbfesten Milchprodukten wie Joghurt geeignet ist. Aufgrund dieser Erkenntnis wurden alle weiteren tribologischen Messungen mit der Materialkombination hart – weich durchgeführt.

## Korrelation sensorischer Attribute mit physikalischen Parametern

Die Struktur von Joghurt wird auf Inhaltsstoffebene im Wesentlichen durch den Fett- und Proteingehalt sowie die Proteinart beeinflusst. Im Rahmen dieses Projekts wurde u. a. der Einsatz von Molkenproteinen als milcheigene Texturierungsmittel in Bezug auf die Struktur-Funktions-Beziehung von Joghurtmodellsystemen charakterisiert. Dazu wurde in Form einer Struktur-Sensorikstudie der Einfluss des Fett- und Proteingehalts sowie des Casein-Molkenproteinverhältnisses (CMV) auf die mikro- und makrostrukturellen [7] sowie sensorischen [8] Eigenschaften von Joghurtsystemen untersucht. Die erhaltenen sensorischen Attribute wurden mit den physikalischen Parametern korreliert und hinsichtlich der Beschreibung von textuellen Mundgefühlattributen geprüft.

Die Joghurtsysteme wurden vom Sensorikpanel der HAW Hamburg (Teilprojekt 9) zu den Merkmalseigenschaften Aussehen (A), Geruch (Ge), Geschmack (Gm) und Textur (Te) untersucht. Da die Merkmale Geruch und Geschmack durch die in dieser Arbeit gewählten physikalischen Methoden nicht beschrieben werden, wurden diese nicht berücksichtigt. In **Abb. 5** sind die Korrelationen zwischen den abgefragten sensorischen Attributen zu Aussehen (A) und Textur (Te) und den ermittelten physikalischen Parametern aus rheologischen und tribologischen

Messungen sowie aus der Partikelgrößenanalyse in einem PCA-Biplot (Principal Component Analysis) dargestellt. Durch die erste Hauptkomponente (PC1) werden 60,51 % und durch die zweite Hauptkomponente (PC2) 35,31 % der Gesamtvarianz (95,82 %) erklärt. Die erste Hauptkomponentenachse wird im Positiven durch rotatorische Kenngrößen beschrieben, wohingegen partikelgrößenrelevante und die tribologische Kenngröße  $\mu_{1\text{mm s}^{-1}}$  negativ eingeordnet sind. Die zweite Hauptkomponentenachse wird im Positiven durch den oszillatorischen Parameter  $G'_{10\text{rad s}^{-1}}$  beschrieben. Das Attribut Griesigkeit korrelierte signifikant positiv mit Kenngrößen aus der Partikelgrößenanalyse. Die Viskosität korrelierte signifikant positiv mit rheologischen bzw. signifikant negativ mit tribologischen Kenngrößen. Die Cremigkeit wurde signifikant positiv durch rotatorisch ermittelte Parameter beeinflusst, wohingegen partikelgrößenrelevante und tribologisch ermittelte Kenngrößen einen signifikant negativen Einfluss zeigten.

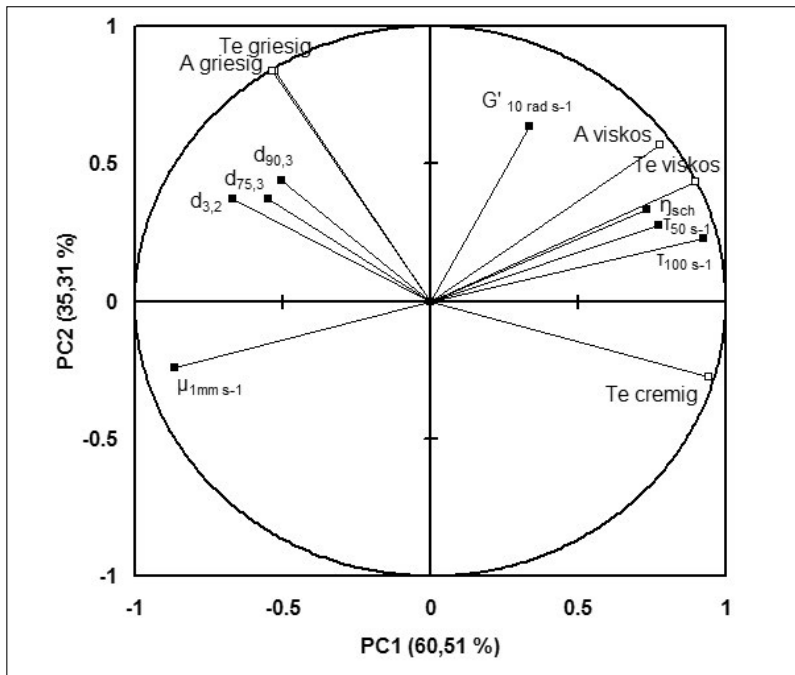


Abb. 5: Korrelations-Biplot nach VARIMAX-Rotation (PCA,  $P < 0,05$ ) zwischen sensorischen Attributen als aktive Variablen (□) und physikalischen Parametern als zusätzliche Variablen (■) von Joghurtmodellensystemen ( $n = 14$ ).

Abkürzungen sind: A, Aussehen; Te, Textur;  $d_{3,2}$ , Sauterdurchmesser;  $d_{75,3}$ , Partikel des 75sten Perzentils;  $d_{90,3}$ , Partikel des 90sten Perzentils;  $G'_{10\text{rad s}^{-1}}$ , Speichermodul bei  $10\text{ rad s}^{-1}$ ;  $\tau_{50\text{s}^{-1}}$ , Schubspannung bei  $50\text{ s}^{-1}$ ;  $\tau_{100\text{s}^{-1}}$ , Schubspannung bei  $100\text{ s}^{-1}$ ;  $\eta_{\text{sch}}$ , scheinbare Viskosität;  $\mu_{1\text{mm s}^{-1}}$ , Reibungskoeffizient bei  $1\text{ mm s}^{-1}$ .

**Abb. 6** zeigt die Qualität des multiplen linearen Regressionsmodells zur Vorhersage der latenten Variable Textur cremig. Dabei sind die Ergebnisse aus der sensorischen Beurteilung gegenüber den gemessenen physikalischen Parametern aufgetragen. Die entsprechende Regressionsgleichung ist in **Gl. 4** dargestellt.

$$Te_{\text{cremig}} = 4,0618 - 1,7014 \cdot \ln(d_{90,3}) + 3,7037 \cdot 10^{-2} \cdot \tau_{100\text{s}^{-1}} - 5,0492 \cdot \mu_{1\text{mms}^{-1}} \quad (4)$$

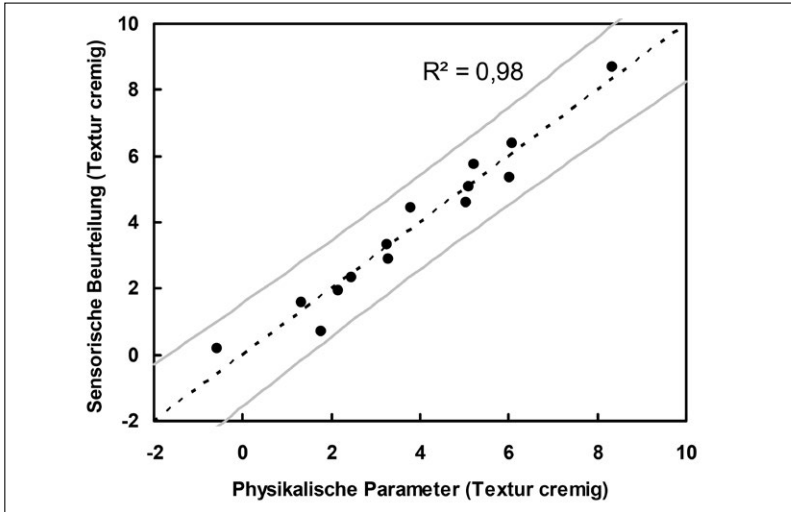


Abb. 6: Linearer Regressions-Plot zur Vorhersage der sensorischen Variable Textur cremig ( $P < 0,05$ ) durch physikalische Parameter aus der Partikelgrößenanalyse und rheologischer bzw. tribologischer Untersuchungen anhand von 14 Joghurtmodellsystemen.

Im Rahmen des Teilprojektes 8 (Universität Erlangen-Nürnberg) wurde mittels numerischer Simulation durch kognitive Algorithmen gezeigt, dass die erhaltenen rheologischen Daten mit der „oralen Viskosität“ sehr gut übereinstimmen und demnach zur Vorhersage textueller Mundgefühlattribute geeignet sind [9].

Auf der Basis dieser Erkenntnisse lässt sich schließen, dass ein cremiger Gesamteindruck bei Joghurtprodukten erreicht wird, wenn der Anteil der größten Mikrogelpartikel gering und somit die Reibung minimiert ist, und wenn die Fließigenschaften erhöht sind.

## Steuergrößen für die textuellen Eigenschaften

Basierend auf den gewonnenen Kenntnissen ist es möglich, durch Zusammensetzung und technologische Behandlung sowohl die strukturellen als auch die

sensorischen Eigenschaften von pastösen Joghurtsystemen einzustellen. Dies wurde genutzt, um im Rahmen einer Sättigungsstudie in Kooperation mit der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen (Teilprojekt 4) den Einfluss von Fett auf die Sättigung gezielt zu untersuchen. Dazu wurden ein Magermilchjoghurt (< 0,1 % Fett) und ein Rahmjoghurt (8 % Fett) mit vergleichbaren Strukturen hergestellt (**Abb. 7**). Trotz vergleichbarer konsumierter Joghurtmenge ergaben sich klare Unterschiede in den Mustern der Hirnströme. Die Ergebnisse zu diesem Experiment finden sich in **[10]**. Dadurch steht ein Modellsystem bereit, dem gezielt „Sättigungsbotenstoffe“ zugesetzt werden können.

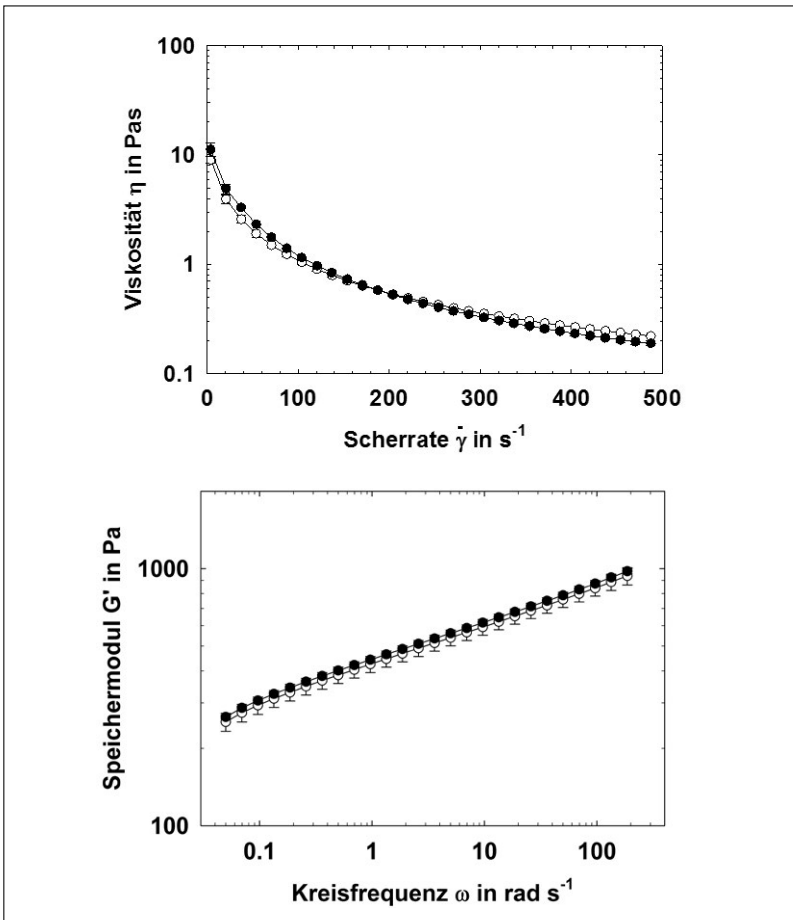


Abb. 7: Viskositäts- (oben) und Festigkeitseigenschaften (unten) eines strukturell angepassten fettarmen Joghurtprodukts (○) im Vergleich zu einem fetthaltigen Joghurtprodukt (●),  $n = 3$ .

## Zusammenfassung

Im Rahmen dieses Forschungsvorhabens wurden mikro- und makrostrukturelle Einflüsse von Inhaltsstoffen und Prozessparametern für fermentierte Milchprodukte erforscht. Zur Nachbildung der komplexen Vorgänge im Mund während des Verzehrs eines Lebensmittels wurde die Methodik zur Erfassung des Reibungsverhaltens von Joghurtprodukten durch tribologische Messungen erarbeitet und in die Methoden der Strukturcharakterisierung aufgenommen. Die erhaltenen physikalischen Parameter wurden mit sensorischen Attributen korreliert und hinsichtlich der Beschreibung von textuellen Mundgefühlsattributen geprüft. Mit diesen Erkenntnissen war es möglich, eine Regressionsgleichung für die textuelle Cremigkeit aufzustellen, aus der Steuergrößen für cremige pastöse Milchprodukte abgeleitet werden können.

## Literatur

- [1] Skriver, A., Holstborg, J., & Qvist, K. B. (1999). Relation between sensory texture analysis and rheological properties of stirred yogurt. *Journal of Dairy Research*, 66 (4), 609-618.
- [2] Jellema, R. H., Janssen, A. M., Terpstra, M. E. J., de Wijk, R. A., & Smilde, A. K. (2005). Relating the sensory sensation 'creamy mouthfeel' in custards to rheological measurements. *Journal of Chemometrics*, 19 (3), 191-200.
- [3] Torres, I. C., Janhøj, T., Mikkelsen, B. Ø., & Ipsen, R. (2011). Effect of microparticulated whey protein with varying content of denatured protein on the rheological and sensory characteristics of low-fat yoghurt. *International Dairy Journal*, 2 (9), 645-655.
- [4] Kutter, A., Singh, J. P., Rauh, C., & Delgado, A. (2011). Improvement of the prediction of mouthfeel attributes of liquid foods by a posthumus funnel. *Journal of Texture Studies*, 42 (3), 217-227.
- [5] Krzeminski, A., Wohlhüter, S., Heyer, P., Utz, J., & Hinrichs, J. (2012). Measurement of lubricating properties in a tribosystem with different surface roughness. *International Dairy Journal*, 26 (1), 23-30.
- [6] Stribeck, R. (1902). Die Wesentlichen Eigenschaften der Gleit- und Rollenlager. *Zeitschrift VDI*, 46, 1341-1348.
- [7] Krzeminski A, Großhable K, & Hinrichs J. (2011). Structural properties of stirred yoghurt as influenced by whey proteins. *LWT – Food Science and Technology*. 44 (10), 2134-2140.
- [8] Tomaschunas M., Hinrichs J., Köhn E., Busch-Stockfisch, M. (2012). Effects of casein to-whey protein ratio, fat and protein content on sensory properties of stirred yoghurt. *International Dairy Journal*, 26 (1), 31-35.

- [9] Rauh, C., Singh, J., Nagel, M., & Delgado, A. (2012). Objective analysis and prediction of texture perception of yoghurt by hybrid neuro-numerical methods. *International Dairy Journal*, 26 (1), 2-14.
- [10] Frank, S., Linder, K., Kullmann, S., Heni, M., Ketterer, C., Cavusoglu, M., Krzeminski, A., Fritsche, A., Häring, H. U., Preissl, H., Hinrichs, J., & Veit, R. (2012). Fat intake modulates cerebral blood flow in homeostatic and gustatory brain areas in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 95 (6), 1342-1349.

---

Im Rahmen des DFG/AiF-Clusters „Fettwahrnehmung und Sättigungsregulation: Ansatz zur Entwicklung fettreduzierter Lebensmittel“ wurde das Teilprojekt 1 des Forschungskreises der Ernährungsindustrie e.V. (FEI) über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung und -entwicklung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.



## Summary Sub-Project 1

### Micro- and macrostructural matrix properties as modulators of the fat perception in milk products

The objective of this research project was to characterise milk product matrices by means of physical methods which parameters are adapted to the oral processing of food. Texture perception of semisolid milk products in the mouth is attributed to a combination of rheology and friction forces generated between the tongue and palate, and the presence of particles. Taking this into account, a method for assessing friction forces exerted by semisolid milk products has been established. The lubricating quality of a tongue-palate tribosystem consisting of a relatively hard steel ball that represents the palate and an elastic pad that covers the complex surface structure of the human tongue was investigated under dry and lubricated conditions. Results showed that SBR (styrene-butadiene rubber) based materials are suitable in order to assess lubricating effects of semisolid yoghurt systems, respectively. Based on this knowledge, yoghurt systems differing in fat and protein content as well as in casein to whey protein ratio were produced and texturally examined. Obtained instrumental and sensory data sets were correlated by means of PCA (principal component analysis) in order to evaluate the descriptive value of parameters derived from particle size analysis as well as from rheological and friction tests with a focus on graininess, viscosity and creaminess. It was shown that an overall impression of a creamy yoghurt product is achieved when small microgel particles and thus a low friction are present and when the flow properties are increased. By means of multivariate data analysis, a regression equation for describing creamy sensations was established. On the basis of these findings, control variables are derivable to adjust structural properties of a paste-like milk product in a defined manner and furthermore, a model system is available that imparts the opportunity to be enriched with specific satiety modulators.



## Teilprojekt 2 (DFG)

# Fettreduktion durch Doppelemulsionen: Grundlegende Untersuchungen zur Beeinflussung der Mikrostruktur von Doppelemulsionen und deren Auswirkung auf konsumentenrelevante Produkteigenschaften (mouth-feel, Cremigkeit, Fettgeschmack, Sättigung)

**Prof. Dr. Heike P. Schuchmann**

**Dipl.-Ing. Anna Schuch**

**Dipl.-Ing. Frederik Wolf**

**Dr. Karsten Köhler**

Karlsruher Institut für Technologie (KIT)

Institut für Bio- und Lebensmitteltechnik

Bereich I: Lebensmittelverfahrenstechnik

TP  
2

## Motivation

Fetthaltige Lebensmittel stellen einen Teil der normalen Ernährung dar. Lipide und Lipoide in Lebensmitteln liegen sehr häufig in (O/W)-Emulsionsstrukturen vor. Die Industrie hat ein großes Interesse daran, diese Produkte in ihrem Gesamtfettgehalt deutlich zu reduzieren. Im Allgemeinen ist diese Reduktion jedoch mit einer starken Veränderung des sensorischen Profils verbunden. Für ausgewählte Produktgruppen wurde bereits gezeigt, dass Doppelemulsionen vom Typ  $W_1/O/W_2$  das Einbringen von Wasser in Fetttropfen und somit eine drastische Reduktion des Fettanteils im Gesamtprodukt ermöglichen. Dieser Aufbau von multiplen Emulsionen, in denen Wassertropfen einen Teil des Öls in den Öltropfen ersetzen, lässt eine nur geringfügige Änderung des sensorischen Profils erwarten. Durch den Austausch des Fetts durch Wasser können Öltropfengröße und Volumenanteil der dispersen Phase nahezu konstant gehalten werden, was die textuellen Eigenschaften der Emulsion bewahrt.

Die Herstellung stabiler, definierter Doppelemulsionsstrukturen mit zugelassenen, insbesondere E-Nummer-freien, Emulgatoren, ist bis heute aber nicht zufriedenstellend möglich. Zugelassene Emulgatoren sind nicht in der Lage, die eingebrachten, das Fett ersetzenden Wassertropfen ausreichend zu stabilisieren. Unzureichend erforscht ist auch, wie mikrostrukturelle Parameter (Verteilung und Größe der inneren Wassertropfen und der äußeren Fetttropfen) oder/und stoffliche Parameter von Konsumenten gewünschte Produkteigenschaften (wie Cremigkeit, Fettgeschmack und Sättigung) genau beeinflussen.

Zielstellung dieses Teilprojektes war es deshalb zunächst, eine Möglichkeit zur Herstellung multipler Emulsionen mit in Lebensmitteln zugelassenen Emulgatoren zu finden. Ein 2-stufiger Emulgierprozess (siehe **Abb. 1**) wurde verwendet, um die Struktur der Doppelemulsionen einzustellen. Zur Stabilisierung der inneren Tropfen wurde die Möglichkeit der Gelierung der Tropfen direkt im Prozess untersucht. Außerdem wurden die strukturbestimmenden Einflussparameter bei der Herstellung von Doppelemulsionen (zweiter Emulgierschritt) genauer untersucht. Die Ergebnisse dieser Arbeiten wurden dann genutzt, um in Zusammenarbeit mit den Clusterpartnern (Teilprojekt 9) zu untersuchen, inwieweit die Reduktion des Fettgehaltes durch die Verwendung von Doppelemulsionen die konsumentenrelevanten Produkteigenschaften (Kremigkeit, Viskosität, Fettfilm auf der Zunge) beeinflusst.

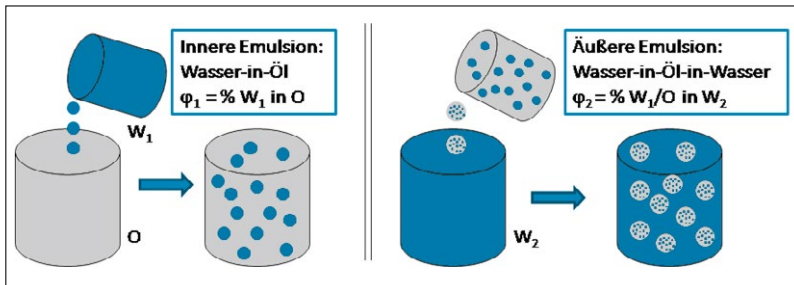


Abb. 1: Schematische Darstellung des 2-stufigen Emulgierprozesses zur Herstellung von Doppelemulsionen.

## Herstellung von W/O-Emulsionen stabilisiert durch Gelierung der Wasserphase im Prozess

Um die in Lebensmitteln nur eingeschränkt zugelassenen Emulgatoren durch unbegrenzt zugelassene zu ersetzen, wurde Pektin als Gelbildner in den Wassertropfen eingesetzt. Durch eine Temperaturabsenkung kann die Gelierung des Pektingels und damit der Tropfen gestartet werden. Zur Realisierung im Prozess wurde der Hochdruckhomogenisator als Emulgierverfahren gewählt und in der Prozessführung modifiziert. Es wurde eine SEM (Simultane-Emulgier- und Misch-)Blende [1,2] so angepasst, dass die Stabilisierungslösung (kalte, kontinuierliche Phase) unmittelbar in die Zone hinter dem Tropfenaufbruch eingemischt werden konnte. Der angepasste Prozess ist in **Abb. 2** schematisch dargestellt.

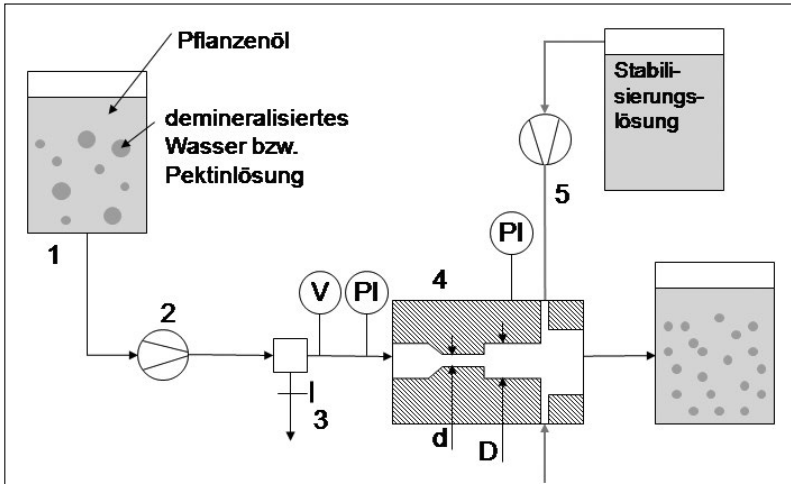


Abb. 2: Schematische Darstellung des modifizierten Hochdruckprozesses mit Möglichkeit zur unmittelbaren Tropfenstabilisierung durch Gelierung (1: Voremulsion-Vorlage, 2: Pumpeneinheit, 3: Regelventil, 4: Blendenblock, 5: Zuspitzpumpe).

Sowohl für die Zerkleinerung als auch für die Stabilisierung der Tropfen bis zu deren Gelierung hinter der Blende ist die vorliegende Strömungsform sehr entscheidend. Aus diesem Grund wurde zunächst eine Methode entwickelt, mit der trotz der hohen Strömungsgeschwindigkeiten sowie des opaken Charakters der Emulsionen eine Aussage über die Strömungsphänomene in und hinter der Lochblende gemacht werden kann. Dazu wurde der Durchflusskoeffizient ( $C_D$ -Wert) als indirekte Kenngröße gewählt. Diese einfach zu bestimmende Größe besitzt aufgetragen über der Reynoldszahl in der Blende einen charakteristischen Verlauf, anhand dessen eine Einteilung in die verschiedenen Strömungsbereiche „laminare Strömung“, „Transition (Übergangsbereich)“ und „turbulente Strömung“ möglich ist [3]. **Abb. 3** zeigt den Verlauf dieses Koeffizienten über der Reynoldszahl in der Blende beispielhaft für Pflanzenöl als Medium und eine Blende mit einem Durchmesser von 0,8 mm.

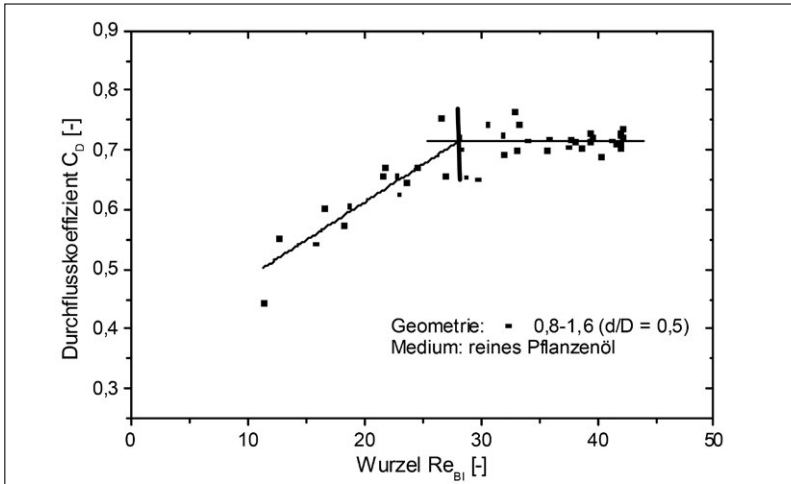


Abb. 3: Verlauf des Durchflusskoeffizienten  $C_D$  über der Wurzel der Reynoldszahl in der Homogenisierblende für reines Pflanzenöl; Blendengeometrie: Durchmesser  $d = 0,8$  mm, Auslaufdurchmesser  $D = 1,6$  mm.

Aus der Literatur ist bekannt, dass der  $C_D$ -Wert bei laminarer Strömung durch eine Blende linear mit der Wurzel der Reynoldszahl zunimmt. In turbulenter Strömung nimmt der Wert einen konstanten Wert an. Im Übergangsbereich erreicht der Kennwert aufgrund der vorliegenden Strömungsphänomene einen maximalen Wert. Beim Übergang in die turbulente Strömung ist also ein Absinken des  $C_D$ -Wertes zu erwarten. Bei dem hier untersuchten Stoffsystem sowie der untersuchten Blendengeometrie kann dieses Absinken des  $C_D$ -Wertes mit Erhöhen der Reynoldszahl nicht beobachtet werden. Deshalb wird vermutet, dass bei den einstellbaren Prozessbedingungen und dem Medium (Pflanzenöl mit ca. 60-facher Viskosität von Wasser) keine turbulente Strömung hinter der Blende ausgebildet wird. Es kann lediglich eine rein laminare sowie eine transitionelle Strömung gezielt eingestellt werden.

Um zu untersuchen, wie sich durch die Einstellung verschiedener Strömungsformen der Aufbruch der Emulsionstropfen verändert, wurden W/O-Emulsionen (3% PGPR 4175, Paalgard, als Emulgator) mit einem Dispersphasenanteil von 3% hergestellt. **Abb. 4** zeigt die Tropfengrößenverteilungen dieser Emulsionen zusammen mit der Verteilung der Voremulsion, d.h. der nicht homogenisierten Emulsion.

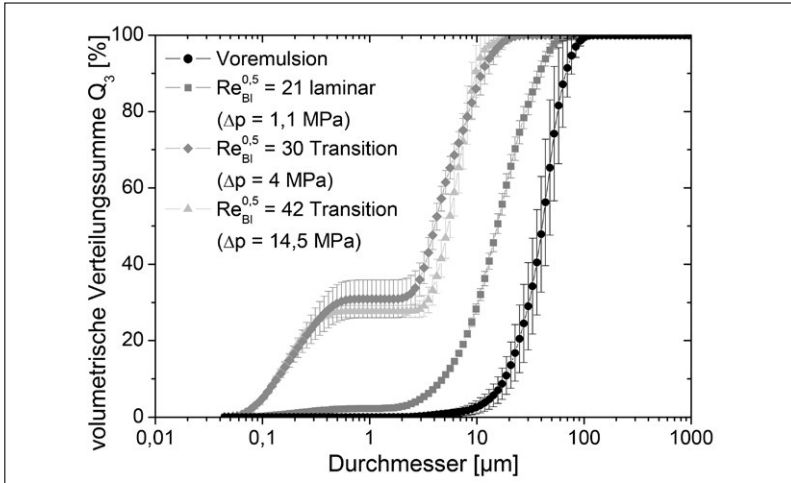


Abb. 4: Tropfengrößenverteilungen von Wasser-in-Öl-Emulsionen hergestellt bei verschiedenen Strömungsbedingungen hinter der Blende; Blendengeometrie: Durchmesser  $d = 0,8 \text{ mm}$ , Auslaufdurchmesser  $D = 1,6 \text{ mm}$ .

Es konnte beobachtet werden, dass die im Blendenausgang vorliegende Strömungsform das Emulgierergebnis stark beeinflusst. Bereits bei laminarem Durchströmen der Blende kommt es zum Aufbruch der Wassertropfen. Bei Erhöhung der eingetragenen Energie und damit Erreichen der transitionellen Strömung werden kleinere Tropfen erreicht, wobei stets eine bimodale Verteilung der Emulsionstropfen auftritt.

Aus der Literatur ist bekannt, dass Strömungen genutzt werden können, um Emulsionen kurzzeitig vor Koaleszenz zu stabilisieren [4]. Dieser Effekt sollte in dem entwickelten Emulgierprozess ausgenutzt werden. In der Voremulsion wurde kein Emulgator vorgelegt und nach der Tropfenzerkleinerung wurde kaltes Öl ( $0 \text{ }^\circ\text{C}$ ) zur Gelierung und damit Stabilisierung der Tropfen zugegeben. Während der Zeit bis zum Einsetzen der Gelierung sollte die Emulsion durch die vorliegende Strömung stabilisiert werden. Bei der Wahl des Zumischortes musste außerdem darauf geachtet werden, dass eine zu frühe Zumischung zur Störung der Strömung und evtl. zur Behinderung des Tropfenauflösungsprozesses führen kann.

In einer Machbarkeitsstudie wurde daher zunächst das Konzept der alleinigen Stabilisierung durch Gelierung überprüft. Dazu wurden Pektin/Wasser-in-Öl-Emulsionen hergestellt und dadurch stabilisiert, dass  $0 \text{ }^\circ\text{C}$  kaltes Pflanzenöl hinter der Blende zugemischt wurde. Um außerdem den Einfluss des Pektins auf die Zerkleinerung zu untersuchen, wurden Emulsionen mit 3 % Dispersphasenanteil in verschiedenen Strömungsbereichen hergestellt. Die Tropfengrößenverteilungen dieser Emulsionen sind in **Abb. 5** dargestellt.

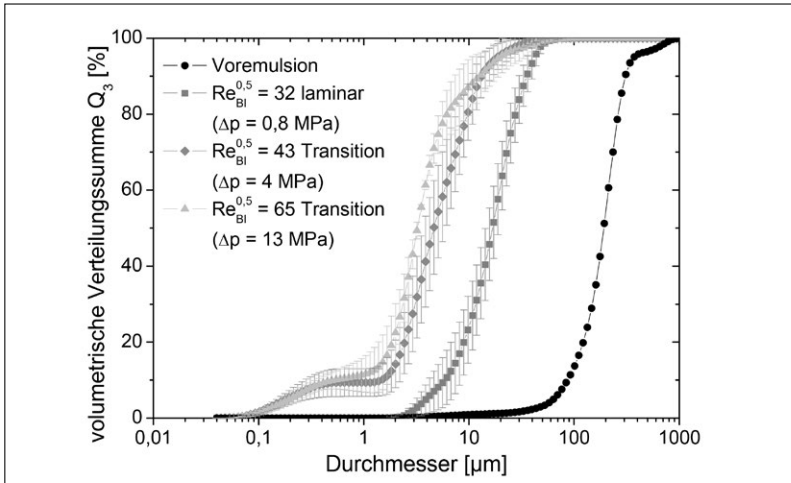


Abb. 5: Volumetrische Verteilungssumme der Pektin/Wasser-in-Öl-Emulsionen mit 3 % Dispersphasenanteil stabilisiert durch die Zugabe von kaltem Öl.

Auch beim Zerkleinern von W/O-Emulsionen, deren Wasserphase durch Pektin geliert wird, ist ein klarer Einfluss der Strömungsform auf die Tropfengrößenverteilungen festzustellen. Außerdem kann ebenso wie bei den Wasser-in-Öl-Emulsionen eine bimodale Verteilung der Tropfen bei transitioneller Strömung beobachtet werden.

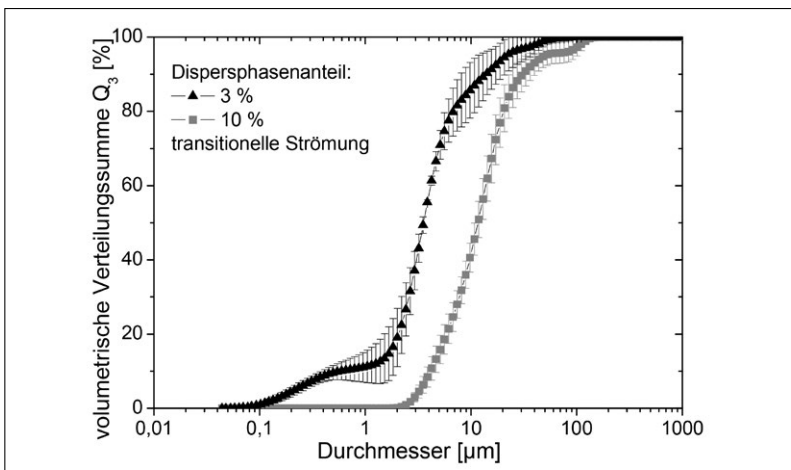


Abb. 6: Volumetrische Verteilungssumme der Pektin/Wasser-in-Öl-Emulsionen stabilisiert durch die Zugabe von kaltem Öl für verschiedene Dispersphasenanteile (vor Verdünnung).



Eine Erhöhung des Dispersphasenanteils, was für die Anwendung in Doppemulsionen zur signifikanten Reduktion des Fettgehaltes notwendig ist, führte bei diesen Rezepturen jedoch zu einer deutlichen Vergrößerung der Tropfengröße, siehe **Abb. 6**.

Zusätzlich muss beachtet werden, dass sich die angegebenen Dispersphasenanteile auf die Voremulsion vor der Verdünnung durch das stabilisierende kalte Öl beziehen. Durch das Stabilisieren mit kaltem Öl liegen die Dispersphasenanteile im Endprodukt bei ca. 50 % der Werte der Voremulsion.

Prinzipiell war es mit dem modifizierten Prozess also möglich, Emulsionen ohne Verwendung zulassungsbeschränkter Emulgatoren herzustellen. Jedoch gelang es nicht, Emulsionen mit einem ausreichend großen Anteil an Tropfen im gewünschten Tropfengrößenbereich ( $< 1 \mu\text{m}$ ) und mit produktrelevanten Dispersphasenanteilen herzustellen. Im Hinblick auf eine spätere Umsetzung dieses Verfahrens wären hier Verfahrensverbesserungen notwendig. Dies war aber nicht Ziel dieses von der DFG geförderten Projekts.

Für die im DFG-Projekt zu bearbeitenden Fragestellungen wurden W/O-Emulsionen mit unterschiedlichen Tropfengrößenverteilungen und Dispersphasenanteilen benötigt. Diese wurden daher mithilfe eines Rotor-Stator-Systems (Kolloidmühle, IKA® MagicLab®) unter Einsatz des Emulgators PGPR hergestellt und gemäß dem in **Abb. 1** gezeigten Verfahren zu Doppemulsionen weiterverarbeitet. Auf diese Weise konnten monomodal verteilte W/O-Emulsionen verschiedener mittlerer Tropfengrößen hergestellt werden. Für die sensorischen Untersuchungen mit dem Sensorikpanel des Teilprojektes 9 wurde die Menge an Emulgator unter die maximal zulässige Menge (0,4 % im Gesamtprodukt) gesenkt.

## Aufbruch von Doppemulsionstropfen

Um das Aufbruchverhalten von Doppemulsionstropfen mit unterschiedlichen Eigenschaften der inneren Wasserphase (Tropfengröße, Dispersphasenanteil  $\varphi_1$ , gelierte/ungelierte Tropfen) zu untersuchen, mussten zunächst ein geeignetes Stoffsystem sowie ein geeignetes Verfahren für den zweiten Emulgierschritt gefunden werden.

Bei der Suche nach einer geeigneten Rezeptur für die Herstellung der Doppemulsionen müssen aufgrund des komplexen Aufbaus einige Randbedingungen beachtet werden. Zum einen kann es zwischen den zwei Wasserphasen zum Stoffaustausch (Diffusion) kommen, der auch durch PFG-NMR-Untersuchungen nachgewiesen werden konnte [5]. Dieser Austausch kann durch Zugabe osmotisch aktiver Substanzen reguliert werden, so dass sich ein Gleichgewicht zwischen Diffusion aus den Tropfen heraus und in die Tropfen hinein einstellt. Außerdem ist aus der Literatur bekannt, dass die Wahl der Emulgatoren eine entscheidende Rolle für die Stabilität multipler Emulsionen spielt [6,7]. Nach Unter-

suchungen zur Eignung verschiedener Emulgatorkombinationen wurde für die folgenden Untersuchungen Eigelb (sprühgetrocknet, Sanovo, Deutschland) als Emulgator sowie PGPR (4175, Paalsgard, Dänemark) gewählt.

Zur Auswahl eines geeigneten Herstellungsverfahrens der Doppelemulsionen wurden verschiedene Rotor-Stator-Maschinen (Kolloidmühle, Zahnkranzdispergiermaschine) sowie die Hochdruckhomogenisation mit angepasster Betriebsweise (SEM-Methode) eingesetzt und die Ergebnisse verglichen. So konnten sowohl der spezifische mechanische Energieeintrag als gemittelte Einflussgröße [8] als auch die lokalen Strömungsbedingungen in einem weiten Rahmen variiert werden. Charakterisiert wurde der Einfluss der Strömungsbedingungen in den verschiedenen Emulgiergeräten bei der Herstellung der äußeren Emulsion auf die resultierende äußere Öl-Tropfengrößenverteilung (Messverfahren: Laserbeugung) und den Erhaltungsgrad der inneren Wassertropfen. Zur Bestimmung des Erhaltungsgrads sollte gemäß Projektantrag eigentlich die publizierte und weit verbreitete Färbemethode [9-11] verwendet werden. Im Projektverlauf wurde jedoch von FRANK et al. [12] gezeigt, dass die üblicherweise verwendeten Farbstoffe in W/O-Emulsionen in die Ölphase übertreten, was die Anwendbarkeit dieser Methodik zur Bestimmung des Erhaltungsgrads stark in Frage stellt. Aus diesem Grund musste eine neue Methode zur Bestimmung des Erhaltungsgrads ausgearbeitet werden. Dazu wurde die Methodik der *Differential Scanning Calorimetry* (DSC) basierend auf den Veröffentlichungen von POTIER et al. [13] weiterentwickelt. Die Methodik ist in [14, eingereicht] im Detail beschrieben.

Doppelemulsionen werden in der Wissenschaft gerne mit Membranverfahren hergestellt, deren technische Umsetzung insbesondere wegen Problemen mit Fouling noch in den Kinderschuhen steckt. Daher wurde im Rahmen dieses Projekts untersucht, ob sich auch großtechnisch einsetzbare Emulgierv Verfahren – Rotor-Stator-Maschinen (Zahnkranzdispergiermaschine, Kolloidmühle) und Hochdruckhomogenisatoren – zur Herstellung von Doppelemulsionen eignen.

Für den Vergleich der in unterschiedlichen Emulgierv Verfahren erreichbaren Doppelemulsionstropfengrößen und Erhaltungsgraden wurde ein Standardstoffs system ausgewählt. Dieses war eine multiple Emulsion mit dem Dispersphasenverhältnis ( $W_1/O/W_2$ ) von (15:35:50). In der Wasserphase  $W_1$  lagen 0,5% NaCl zum Ausgleich des Laplace-Drucks vor. Als lipophiler Emulgator wurde 3% PGPR (bezogen auf die Ölphase) verwendet, als hydrophiler Emulgator 3,5% Eigelbpulver. Die Ergebnisse des kompletten Verfahrensvergleichs sind in **Abb. 7** dargestellt. Zur Vergleichbarkeit der Eignung der verschiedenen Verfahren wurde der Erhaltungsgrad in Abhängigkeit der erzielten Öltropfengröße dargestellt.

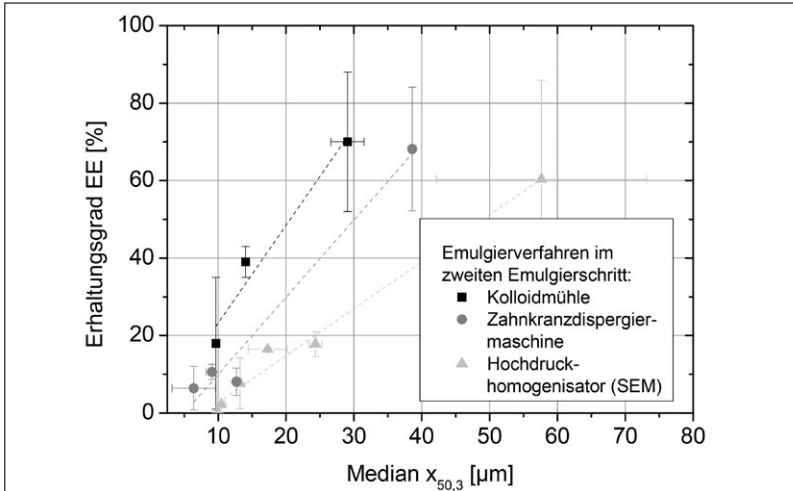


Abb. 7: Abhängigkeit des Erhaltungsgrads der inneren Wassertropfen nach dem zweiten Emulgierschritt vom dabei erreichten äußeren Tropfendurchmesser für Doppel emulsionen hergestellt mit verschiedenen Emulgierverfahren.

Ein linearer Zusammenhang zwischen Erhaltungsgrad und Medianwert der Öltropfen ist für alle Emulgierverfahren zu beobachten. Betrachtet man den Erhaltungsgrad für einen bestimmten Medianwert, so kann die Eignung der verschiedenen Verfahren miteinander verglichen werden. Es wird deutlich, dass beim Erreichen gleicher äußerer Tropfengrößen der Erhaltungsgrad in den mit einer Kolloidsmühle hergestellten Doppel emulsionen am höchsten ist. Die Zahnkranzdispersiermaschine zeigt etwas geringere Erhaltungsgrade und mit dem Hochdruckhomogenisator werden nochmals mehr innere Wassertropfen freigesetzt. Es wird also deutlich, dass die Koaleszenzrate der inneren Tropfen mit der äußeren kontinuierlichen Phase nicht nur von der eingebrachten Energie und damit der erzielten Tropfengröße abhängt. Auch die vorliegende Strömungsform, die sich von Verfahren zu Verfahren unterscheidet, beeinflusst das Ausmaß der Freisetzung der inneren Tropfen. Für die weiteren Arbeiten im Rahmen des Clustervorhabens wurde für den zweiten Emulgierschritt daher eine Kolloidsmühle gewählt und mit kurzen Emulgierzeiten und moderaten Scherraten gearbeitet.

## **Einfluss der Emulsionsstruktur auf konsumentenrelevante Produkteigenschaften**

Um zu untersuchen, inwieweit es möglich ist, den Fettgehalt in Emulsionen zu reduzieren, ohne konsumentenrelevante Produkteigenschaften zu beeinflussen, wurden verschiedene konventionelle (Einfach-) und Doppelemulsionen hergestellt und von den Partnern des Teilprojektes 9 sensorisch bewertet. Untersuchungen an einfachen Emulsionen mit verschiedenen Öltropfengrößen zeigten, dass ab einer Tropfengröße von ca. 50  $\mu\text{m}$  im Vergleich zu Emulsionen mit kleineren Tropfengrößen signifikant abweichende sensorische Eigenschaften detektierbar werden. Deswegen wurde bei den Doppelemulsionen auf eine maximale Tropfengröße in diesem Größenbereich geachtet. Die W/O/W-Emulsionen hatten einen äußeren Dispersphasenanteil von  $\varphi_2 = 50\%$  und wurden aus W/O-Emulsionen mit  $\varphi_1 = 30$  und  $50\%$  Wasser hergestellt. Da jedoch bei höherem Füllgrad der Öltropfen bei der Herstellung der W/O/W-Emulsionen auch mehr Wasser nach außen verloren geht, ergaben sich in den W/O/W-Emulsionen nur geringe Unterschiede im Gehalt an inneren Wassertropfen. Die sensorischen Untersuchungen beschränkten sich deshalb auf Emulsionen mit 15 bzw. 25 % Wasser in der inneren Emulsion. Die sensorischen Eindrücke wurden mit einer vollfetten O/W-Referenzprobe gleicher Tropfengröße verglichen. Die Viskositäten der Emulsionen wurden durch Verdünnung mit kontinuierlicher Phase angepasst. Durch die hohe Viskosität und Elastizität der gefüllten Öltropfen im Vergleich zu Tropfen aus reinem Pflanzenöl ergaben sich in den Doppelemulsionen immer höhere Viskositäten der gesamten Emulsion, obwohl der äußere Dispersphasenanteil sogar geringer war als bei den einfachen Emulsionen. Somit ergaben sich für die sensorisch untersuchten Emulsionen bei gleicher Viskosität folgende Fettgehalte: vollfette Probe: 50 % Fett, Probe A: 23 % Fett, Probe B: 19 % Fett. Die Emulsionen wurden im zweiseitigen Paarvergleich durch Teilprojekt 9 bewertet. Es wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Dabei zeigte sich für alle drei Attribute „Kremigkeit“, „Viskosität“ und „Fettfilm“, dass es den Probanden nicht möglich war, zwischen den drei Proben zu unterscheiden. Die Viskosität der Emulsionen scheint also die sensorische Wahrnehmung in diesen drei untersuchten Attributen zu bestimmen. Damit konnte bestätigt werden, dass grundsätzlich durch die Verwendung von Doppelemulsionen der Fettgehalt in Lebensmitteln deutlich reduziert werden kann, ohne die sensorischen Eigenschaften zu beeinflussen. Die Menge an Wasser in den Öltropfen scheint dabei des Weiteren keinen signifikanten Einfluss zu haben.

## Zusammenfassung

Ziel des Teilprojektes war die Herstellung von W/O/W-Doppelemulsionen mit gezielt einstellbaren Strukturen in Lebensmittelqualität. Dazu wurde ein zweistufiger Emulgierprozess genutzt. Im ersten Emulgierschritt wird dabei eine Wasser-in-Öl-Emulsion hergestellt, die dann im zweiten Emulgierschritt als disperse Phase der Doppelemulsion weiterverarbeitet wird.

Im ersten Teil der Arbeit wurde gezeigt, dass es prinzipiell möglich ist, die innere Emulsion ohne die Verwendung von in Lebensmitteln nur beschränkt zugelassenen Emulgatoren zu stabilisieren. Hierzu wurde in der dispersen Wasserphase Pektin als Gelbildner eingesetzt und durch eine gezielte Temperatursenkung im Prozess die Gelierung der Tropfen und damit deren Stabilisierung hervorgerufen. Zur Realisierung kam ein Hochdruckhomogenisator mit Lochblenden zum Einsatz. Nach dem Aufbruch der Tropfen im Bereich der Blende wurde mithilfe der SEM-Technologie (Simultanes Emulgieren und Mischen) kaltes Öl zur Auflösung der Gelierung zugemischt. Da prinzipiell bimodale Tropfengrößenverteilungen mit nennenswerten Anteilen an zu großen Tropfen auftraten, wurde die Strömung in den eingesetzten Lochblenden genauer untersucht. Für die Charakterisierung des Prozesses wurde mit dem Durchflusskoeffizienten  $C_D$  eine Kenngröße der Strömungsmesstechnik adaptiert. Damit ist es möglich, die während des Emulgierens vorliegende Strömungsform einzuordnen und darüber den Prozess zu steuern. Es konnte gezeigt werden, dass die vorliegende Strömungsform beim Emulgieren mit Lochblenden das Emulgierergebnis entscheidend beeinflusst. Die bimodalen Verteilungen konnte auf Strömungen im Übergangsbereich zwischen laminaren und turbulenten Strömungen zurückgeführt werden. Zusätzlich konnten Instabilitäten detektiert werden, die eine Erhöhung des Dispersphasenanteils auf, für die Reduktion des Fettgehalts durch Doppelemulsionen, notwendige Mengen erschweren. Damit konnten für eine weitere Ausarbeitung dieses Verfahrens für technische Anwendungen die relevanten Ansatzpunkte gefunden werden.

Da dies aber nicht Ziel dieses DFG-Projekts war, wurden für die weiteren Untersuchungen innere Emulsionen mithilfe des Emulgators PGPR (im zugelassenen Konzentrationsbereich) stabilisiert und mit einer Kolloidmühle hergestellt. So konnten Tropfen  $< 1 \mu\text{m}$  erzeugt und stabilisiert werden.

Bei der Herstellung von Doppelemulsionen ist neben den erreichbaren Tropfengrößen vor allem der Erhaltungsgrad, also der Anteil des Wassers in den Tropfen, der nach dem zweiten Emulgierschritt noch in den Tropfen vorliegt, entscheidend. Da nachgewiesen werden konnte, dass die hierzu in der Literatur beschriebene Färbemethode ungeeignet ist, wurde eine neue Methode auf Basis von DSC-Messungen herangezogen und für Anwendungen in Doppelemulsionen weiterentwickelt.

Doppelemulsionen werden in der Wissenschaft gerne mit Membranverfahren hergestellt, deren technische Umsetzung wegen Problemen mit Fouling noch in der Kinderschuhen steckt. Daher wurde im Rahmen dieses Projekts untersucht, ob sich auch großtechnisch einsetzbare Emulgiervverfahren – Rotor-Stator-Maschinen (Zahnkranzdispergiermaschine, Kolloidmühle) und Hochdruckhomogenisatoren – zur Herstellung von Doppelemulsionen eignen. Es zeigte sich, dass der höchste Erhalt der inneren Tropfen bei vergleichbarer äußerer Tropfengröße durch den Einsatz einer Kolloidmühle realisiert werden kann.

Abschließend wurden in Kooperation mit dem Cluster-Partner (Teilprojekt 9) sowohl konventionelle Vollfett- als auch fettreduzierte Doppelemulsionen sensorisch untersucht. Die Ergebnisse der Untersuchungen an einfachen Emulsionen gaben Hinweise auf die notwendigen maximalen Tropfengrößen in Doppelemulsionen. Außerdem wurden Doppelemulsionen mit verschiedenen Mengen an Wasser in den inneren Tropfen mit einer vollfetten Referenz verglichen. Die Viskositäten der Emulsionen wurden durch Verdünnen angeglichen. Es zeigte sich, dass trotz deutlich variierendem Fettgehalt (19, 23 und 50 %) keine Unterscheidung der Proben möglich war.

Mit diesem Forschungsprojekt konnte somit generell gezeigt werden, dass sich Doppelemulsionen zur gezielten Fettreduktion in Lebensmitteln ohne sensorisch wahrnehmbaren Verlust an konsumentenrelevanten Eigenschaften eignen. Auch konnte ein skalierbares technisches Herstellverfahren entwickelt werden. Gezeigt wurde zudem, welchen Einfluss Stoff- und Prozessparameter auf die Mikrostruktur und auf die Eigenschaften der Emulsionen haben. Die Ergebnisse wiesen aber auch darauf hin, dass die Herstellung von inneren Emulsionen ohne Einsatz von E-Nummern behafteten Emulgatoren noch schwierig ist. Auch der Erhalt der inneren Tropfen im zweiten Emulgierschritt ist noch kritisch und zieht erheblichen Forschungsbedarf nach sich.

## Literatur

- [1] Köhler, K., Aguilar, F.A., Hensel, A., Schubert, K., Schubert, H., Schuchmann, H.P.: *Chemical Engineering & Technology*, Vol. 30 (11), 2007, pp. 1590-1595.
- [2] Köhler, K.: *Simultanes Emulgieren und Mischen*, Logos Verlag, Berlin, 2010.
- [3] Johansen, F.C.: *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character*, Vol. 126 (801), 1930, pp. 231-245.
- [4] Danner, T., Schubert, H., Stang, M.: *Proceedings of the Eighth International Congress on Engineering and Food - ICEF 8 -*, Vol. 12001, pp. 628-632.
- [5] Guan, X., Hailu, K., Guthausen, G., Wolf, F., Bernewitz, R., Schuchmann, H.P.: *European Journal of Lipid Science and Technology*, Vol. 112 (8), 2010, pp. 828-837.
- [6] Dziezak, J.D.: *Food Technology*, Vol. 42 (10), 1988, pp. 172-&.
- [7] Garti, N.: *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, Vol. 30 (3), 1997, pp. 222-235.
- [8] Karbstein, H.: *Dissertation, Universität Karlsruhe (TH)*, 1994.
- [9] Dickinson, E., Evison, J., Owusu, R.K.: *Food Hydrocolloids*, Vol. 5 (5), 1991, pp. 481-485.
- [10] Hino, T., Shimabayashi, S., Tanaka, M., Nakano, M., Okochi, H.: *Journal of Microencapsulation*, Vol. 18 (1), 2001, pp. 19-28.
- [11] Fechner, A., Knoth, A., Scherze, I., Muschiolik, G.: *Food Hydrocolloids*, Vol. 212006, pp. 943-952.
- [12] Frank, K., Leick, S., Skrebek, S., Köhler, K., Rehage, H., Schuchmann, H. P.: *Coll. Surf.A: Physicochem.Eng.Aspects*, 2011.
- [13] Potier, L., Raynal, S., Seiller, M., Grossiord, J.L., Clause, D.: *Thermochimica Acta*, Vol. 204 (1), 1992, pp. 145-155.
- [14] Schuch, A., Köhler, K., Schuchmann, H.P.: *Thermal Analysis and Calorimetry*, 2012, submitted.

## Summary Sub-Project 2

### **Double emulsions for fat reduction: Fundamental investigations on influencing the microstructure of double emulsions and how the structure influences product properties relevant for consumers (mouth feel, creaminess, fatty taste, saturation)**

The aim of this project was to produce food-grade W/O/W double emulsions with adjustable structures. Therefore, a two-step process was used. In the first emulsification step, a water-in-oil emulsion is produced which is again dispersed in water to produce the final double emulsion.

In the first part of the project, it could be shown that in principle it is possible to stabilize the inner W/O emulsion without using emulsifiers that underlie restrictions for the use in food products. Pectin as a gelling agent was used in the dispersed water phase of the W/O emulsions. A targeted temperature shift during the production of the emulsions was used to start the gelation and therefore stabilize the droplets/gel particles. A high pressure homogenizer with an orifice was used. By using the modified SEM technology (simultaneous emulsification and mixing) it was possible to first break the droplets and then stabilize them by decreasing the temperature by mixing with cold oil. Bimodal droplet size distributions were observed in all emulsions. Therefore, the process first was further investigated in order to better understand this observation and to control the process later on. It was possible to characterize the flow patterns by using the discharge coefficient  $C_D$ . This is a characteristic parameter known from flow measurements which was adapted to the process. It was possible to classify the current flow pattern and use it to control the process. Furthermore, it could be shown, that the flow pattern in and behind the orifice influences the resulting droplet sizes of the emulsion significantly. The bimodal droplet size distributions were caused by the transient flow behavior (between laminar and turbulent flow). In addition, instabilities were observed when the dispersed phase content was increased (which is needed for significant fat reduction). These findings did not allow the usage of this process in the further investigations in this project. Nevertheless, they showed the relevant parameters for the development of this process for industrial applications.

In this DFG project, inner emulsions stabilized by the emulsifier PGPR (in authorized quantities) and produced with a colloid mill were used for the further investigations. Droplet sizes below 1  $\mu\text{m}$  could be realized like that.

Both, droplet sizes and encapsulation efficiency of the inner droplets, are very important for the functionality and stability of double emulsions. Therefore, these parameters have to be measured in order to characterize the emulsions.



Unfortunately, it was shown that the coloring method described in literature shows a lot of inaccuracies. Another method based on measurements with differential scanning calorimetry was adapted and further developed for the characterization of W/O/W double emulsion.

For scientific purposes membrane processes are used very often to produce multiple emulsions. However, they are not really established for industrial applications till now because of occurring difficulties like fouling of the membranes. Therefore, it was investigated if it is possible to use conventional emulsification devices to produce double emulsions – rotor stator devices (tooth rim dispersing machine and colloid mill) and high pressure homogenizers. We investigated how suitable they are for the breakup of filled droplets. It could be observed that comparing the production of emulsion droplets of the same size the highest encapsulation efficiency could be achieved using the colloid mill.

Sensory studies of simple (normal fat content) and double (fat reduced) emulsions were conducted in cooperation with the cluster partner of sub-project 9. The investigations of simple emulsions gave a hint on required maximum outer droplet sizes in double emulsions. Furthermore, double emulsions with two different amounts of inner water droplets were compared to a full fat reference emulsion. In order to make them comparable, the viscosities of the emulsions were adjusted by dilution of the double emulsions. In spite of significant differences in fat content (19, 23 and 50%) the panelists were not able to distinguish between the 3 samples.

In conclusion, the results of this research project indicate that double emulsions show a great possibility to reduce the fat content in food. By using double emulsions the consumer relevant sensory properties do not change perceivably in comparison to normal full fat emulsions. By using the two-step process a scalable technical production process was found. In addition, it could be shown, how material and process parameters influence the microstructure of double emulsions and therefore their properties. Furthermore, the results indicated that the stabilization of double emulsions without using conventional emulsifiers is still challenging. In addition, the preservation of the inner droplets during the second emulsification step seems to be crucial for the whole production and needs to be further investigated.



## Teilprojekt 3 (AiF)

# Identifizierung von sättigungsregulierenden Inhaltsstoffen in Nahrungsfetten und Optimierung von fettarmen Lebensmitteln durch Zusatz von lipoiden Verbindungen mit hoher Sättigungswirkung (AiF 15961 N)

**Prof. Dr. Peter Schieberle<sup>1</sup>**

**Prof. Dr. Veronika Somoza<sup>2</sup>**

**Dr. Malte Rubach<sup>1</sup>**

**Dipl. troph. Lucia Scholl<sup>1</sup>**

**Staatl. gepr. Leb. Chem. Michelle Balzer<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie (DFA)  
Freising

<sup>2</sup> Korrespondenzadresse: Universität Wien  
Institut für Ernährungsphysiologie und Physiologische Chemie

TP  
3

## Ausgangssituation

Die Verbreitung von Übergewicht hat in den letzten Jahrzehnten weltweit stark zugenommen. Laut der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE) sind mehr als 65 % der Männer und etwa 55 % der Frauen in Deutschland übergewichtig. Schätzungen gehen davon aus, dass im Jahre 2014 ca. 40 % der Kinder in Europa übergewichtig sein werden. Als zwei maßgebliche Faktoren werden geringe körperliche Aktivität sowie der übermäßige Verzehr insbesondere von fettreichen Lebensmitteln angesehen. Daher wird von Gesundheitsorganisationen eine Verringerung der Fettaufnahme empfohlen. Als Reaktion hierauf werden von Lebensmittelunternehmen inzwischen vermehrt Lebensmittel mit reduziertem Fettgehalt angeboten. So ist beispielsweise die Produktion von fettarmem Joghurt in den letzten fünf Jahren um fast 45 % gestiegen, die von entrahmtem Joghurt sogar um 57 %. Der Anteil fettreduzierter Margarine stieg in den vergangenen 10 Jahren von zwei auf 23 %. Trotz der gestiegenen Marktanteile von fettreduzierten Lebensmitteln stellt sich deren Entwicklung noch immer als schwierig dar, da ein gleichwertiger sensorischer Eindruck wie bei fetthaltigen Lebensmitteln meist nicht erreicht wird. Zusätzlich ist hervorzuheben, dass das wachsende Angebot fettreduzierter Lebensmittel die Prävalenz des Übergewichtes in den Industrieländern in den letzten Jahren nicht verringern konnte. Ein möglicher Grund hierfür könnte die im Vergleich zu nicht fettreduzierten Lebensmitteln gesteigerte Verzehrmenge fettreduzierter Lebensmittel sein. Dass von energiereicheren Lebensmitteln mehr verzehrt wird, konnte im Rahmen einer Tierstudie gezeigt

werden, in der alte und junge Ratten über einen Zeitraum von 16 Wochen mit Light-Produkten gefüttert wurden. Im Anschluss erhielten die Tiere die gleichen, jedoch nicht energiereicheren Nahrungsmittel. Besonders die jungen Ratten nahmen weit über ihren Bedarf hinaus Kalorien zu sich und somit an Gewicht zu. Als Grund hierfür postulierten die Autoren eine Veränderung der natürlichen Hunger- und Sättigungsregulation [1].

Für eine zielgerichtete Entwicklung neuer fettreduzierter Produkte gilt es daher, die wissenschaftlichen Grundlagen der Sättigungsregulation zu kennen und ferner die das Sättigungsgefühl auslösenden Inhaltsstoffe von Speisefetten und -ölen zu identifizieren.

## Zielsetzung

Das Teilprojekt 3 (Prof. Dr. Veronika Somoza) beschäftigte sich mit der Identifizierung von sättigungsregulierenden Inhaltsstoffen in Nahrungsfetten. Hierzu wurden zwei Humaninterventionen durchgeführt.

Die Humaninterventionen wurden durchgeführt, um die Effekte ausgesuchter Fette und Öle sowie daraus hergestellter Aromaextrakte auf mit der Sättigungsregulation assoziierte Parameter, wie z.B. Leptin- und Serotoninkonzentrationen, im Serum von gesunden Personen zu untersuchen. Zeitgleich erfolgten Zellkulturstudien, um die zellulären Effekte von Fettsäuren und Aromaextrakten der Zielfette und -öle sowie von biomimetischen Gemischen dieser Komponenten auf Mechanismen der Glucose- und Fettspeicherung zu charakterisieren.

## Kernergebnisse der Humanintervention I: Effekte von tierischen und pflanzlichen Nahrungsfetten

Die Humanintervention wurde in Kooperation mit dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Andreas Fritsche in Tübingen durchgeführt. Insgesamt 120 (60 je Studienzentrum Freising/Tübingen) stoffwechselgesunde und normalgewichtige Probanden wurden in 5 Studiengruppen (Kontroll-, Schweineschmalz-, MilCHFett-, Rapsöl- und Olivenölgruppe) randomisiert. Jeder Studienteilnehmer konsumierte über einen Zeitraum von drei Monaten täglich 500g Studienjoghurt. Dieser Joghurt bestand aus 0,1% fetthaltigem Magermilchjoghurt mit einem Zusatz von je 40g Schweineschmalz, MilCHFett, Rapsöl oder Olivenöl. Teilnehmern der Kontrollgruppe wurden 500g eines Magermilchjoghurts (Fettgehalt 0,1%) verabreicht. Vor und nach der Intervention wurde ein oraler Glucose-Toleranz Test (OGTT) zur Bestimmung der Sättigungsparameter durchgeführt. Die Darstellung der Ergebnisse des OGTT erfolgte durch den Arbeitskreis von Prof. Fritsche (Tübingen, Teilprojekt 4). Des Weiteren wurde die Veränderung des Körpergewichts und Körperfettanteils verfolgt und die Ernährungsweise mittels Ernährungsprotokoll vor und während der Intervention dokumentiert.

Die mit den jeweiligen Speisefetten bzw. -ölen angereicherten Studienjoghurts wiesen einen mittleren Energiegehalt von 2.374 kJ pro 500 g auf. Da die Probanden den Joghurt zusätzlich zu ihrer normalen Diät verzehrten und den Studienteilnehmern keine weiteren Einschränkungen hinsichtlich ihrer Ernährung auferlegt wurden, wurde von einer um 2.374 kJ erhöhten Energieaufnahme pro Tag während der Intervention ausgegangen. Nach dreimonatiger Intervention zeigte sich, dass sich bei den Probanden, die den mit Schweineschmalz oder Olivenöl angereicherten Joghurt zu sich genommen hatten, die Energiezufuhr gegenüber der Ernährungsweise vor der Intervention nicht verändert hatte und damit unter der erwarteten Gesamtenergiezufuhr blieb (**Abb. 1**).

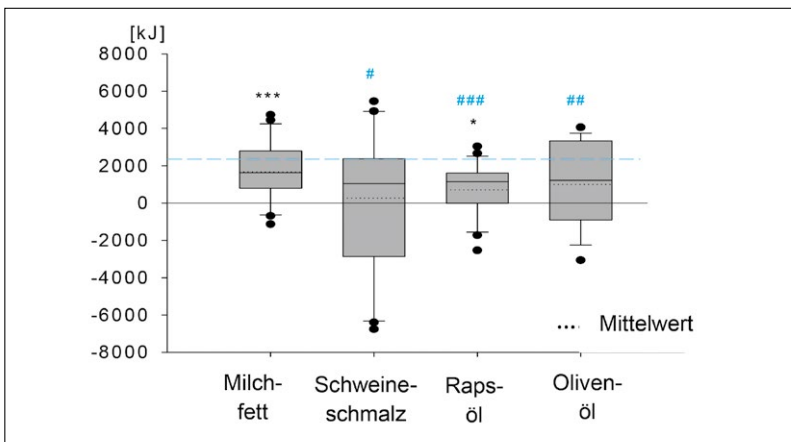


Abb. 1: Einfluss des dreimonatigen Verzehrs eines mit Milchfett, Schweineschmalz, Rapsöl oder Olivenöl angereicherten Magermilchjoghurts auf die tägliche, durchschnittliche Energieaufnahme [kJ]. Ermittelte Energieaufnahme während Ernährung vor Intervention = 0 kJ. Erwartete Energieaufnahme der Normaldiät und Studienjoghurt = 2.374 kJ (rote Linie).

Statistik: gepaarter t-Test, beidseitig: \*  $p < 0,05$  vs. Ausgangswert, \*\*\*  $p < 0,001$  vs. Ausgangswert (0); #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,001$  jeweils vs. erwartete Energieaufnahme mit Studienjoghurt.

Hingegen führte der Verzehr des mit Rapsöl angereicherten Magermilchjoghurts bei den Teilnehmern der Rapsölgruppe zu einer Gesamtenergieaufnahme, die unterhalb der erwarteten Energieaufnahme lag (**Abb. 1**). Allerdings wiesen die Probanden dieser Studiengruppe als einzige Studienteilnehmer eine mittlere Zunahme  $0,74 \pm 0,35$  kg Körperfett nach Intervention auf (**Abb. 2**). Angemerkt werden muss hier jedoch, dass, obwohl ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  im Vergleich zu den mittleren Körperfettgehalten zu Studienbeginn in keiner anderen Interventionsgruppe erreicht wurde, aus **Abb. 2** hervorgeht, dass die Studienteilnehmer der Olivenölgruppe die geringste Erhöhung des Körperfettanteils aufwiesen.

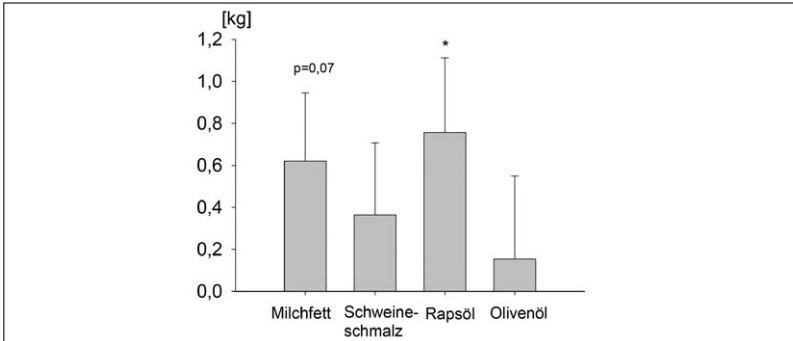


Abb. 2: Einfluss des dreimonatigen Verzehrs eines mit Milchfett, Schweineschmalz, Rapsöl oder Olivenöl angereicherten Magermilchjoghurts auf die Körperfettveränderung – BIA-Messung.

Statistik: gepaarter t-Test, beidseitig: \* =  $p < 0,05$  vs. Ausgangswert (0 kg).

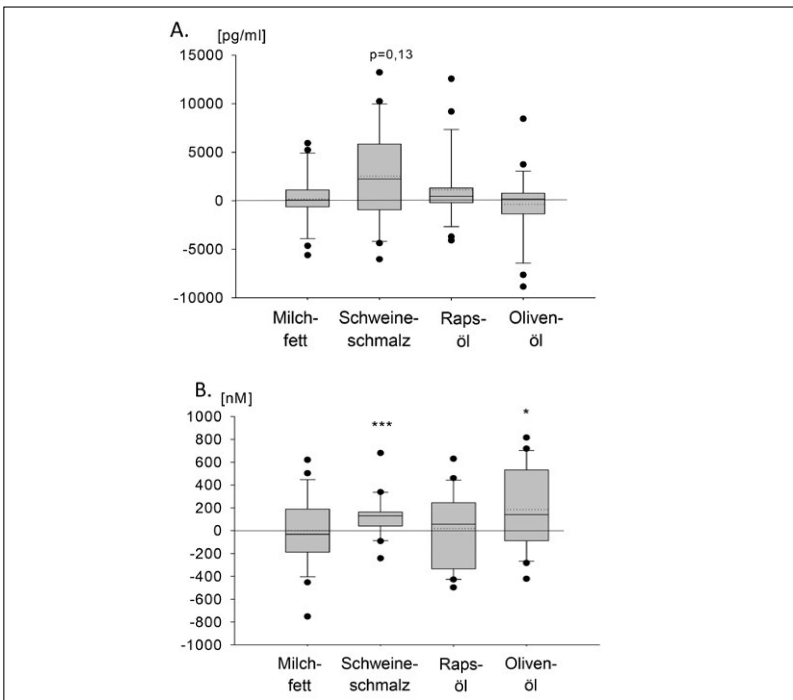


Abb. 3: Veränderung der Leptin- (A.) und Serotoninkonzentration (B.) nach Intervention; 0=Ausgangswert.

Statistik: gepaarter t-Test, beidseitig: \*  $p < 0,05$  vs. Ausgangswert, \*\*\*  $p < 0,005$  vs. Ausgangswert.

Hinsichtlich der Leptinkonzentration im Serum, welche bei gesunden Probanden positiv mit der Fettmasse korreliert, konnten keine Unterschiede in Abhängigkeit der Ernährungsintervention festgestellt werden (**Abb. 3**). Hingegen zeigte sich eine durchschnittlich erhöhte Konzentration des Sättigungshormons Serotonin im Serum nach Verzehr des mit Schweineschmalz bzw. des mit Olivenöl angereicherten Joghurts (**Abb. 3**). Zusätzlich beurteilten die Probanden der Olivenölgruppe ihren Joghurt subjektiv als den Joghurt mit der stärksten Sättigungswirkung (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt kann festgehalten werden, dass der Verzehr des mit Olivenöl angereicherten Magermilchjoghurts den deutlichsten Einfluss auf die mit der Sättigungsregulation assoziierten Parameter hatte.

Ergebnisse aus Zellkulturexperimenten (siehe unten) zeigten allerdings, dass die majoren Fettsäuren von Rapsöl und Olivenöl auf zellulärer Ebene ähnliche Effekte, z.B. auf die Glucoseaufnahme in Adipozyten (unten gezeigt ist der Effekt auf Leberzellen), aufweisen. Da Rapsöl und Olivenöl ähnliche majore Fettsäuren aufweisen, wurde angenommen, dass nicht die Fettsäuren, sondern eine andere Substanzklasse für die sättigende Wirkung des Olivenöls verantwortlich sein muss. In der Humanintervention II wurde daher der Effekt der Aromastofffraktion des Olivenöls auf Parameter der Sättigung untersucht.

## Kernergebnisse der Humanintervention II: Einfluss von Aromastoffen aus Olivenöl

Der Effekt von in Fetten und Ölen enthaltenen Aromastoffen auf Mechanismen der Sättigungsregulation ist weitgehend ungeklärt. Die vorliegende Humanintervention gibt erstmals Hinweise darauf, dass nicht nur Fettsäuren, sondern auch Aromastoffe einen Einfluss auf die Sättigungsregulation nach Aufnahme von Speisefetten und -ölen nehmen. Zur Durchführung der Studie wurde zunächst ein Aromaextrakt aus Olivenöl mittels Dünnschichtdestillation gewonnen und in 500 g eines 0,1 % fetthaltigen Magermilchjoghurts eingearbeitet. Dieser Joghurt (500 g) enthielt nach Anreicherung eine Menge von 0,132 ml Aromaextrakt, welches aus einer Ausgangsmenge von 120 ml Olivenöl gewonnen wurde. Teilnehmer der Kontrollgruppe erhielten wiederum einen Magermilchjoghurt mit einem Fettgehalt von 0,1 %.

Für diese zweite Humanintervention wurden 30 Probanden nach gleichen Kriterien wie in der ersten Humanintervention rekrutiert. Das Studiendesign folgte ebenfalls dem der ersten Humanintervention: Nach dreimonatiger Verabreichung von 500 g des jeweiligen Studienjoghurts erfolgte die Bestimmung der Sättigungsparameter im Serum der Probanden. Zudem wurde die Veränderung des Körpergewichts und Körperfettanteils verfolgt und die Ernährungsweise mittels Ernährungsprotokoll vor und während der Intervention erfasst.

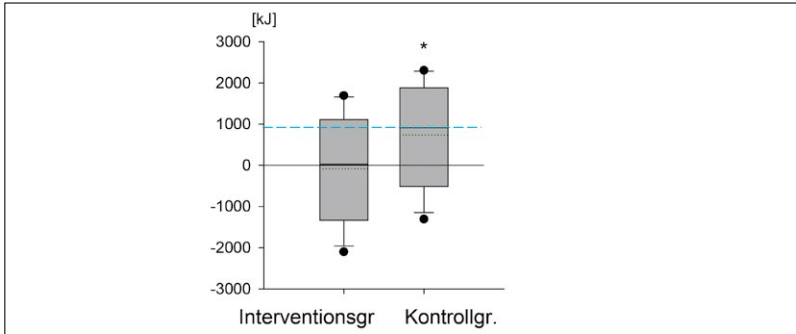


Abb. 4: Tägliche Energiezufuhr während Intervention; Normaldiät = 0 kJ. Erwartete Energieaufnahme der Normaldiät und Studienjoghurt = 942 kJ (rote Linie).

Statistik: gepaarter t-Test, beidseitig: \* =  $p \leq 0,05$  vs. Ausgangswert.

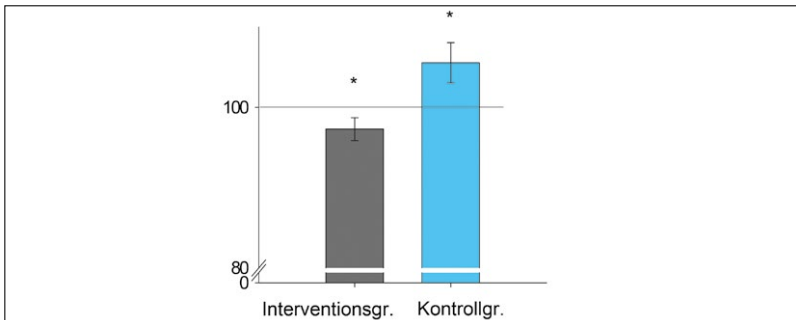


Abb.5: Veränderung des Körperfettanteils in % im Vergleich zum Ausgangsgewicht (100%).

Statistik: gepaarter t-Test, beidseitig: \* =  $p \leq 0,05$  vs. Ausgangswert.

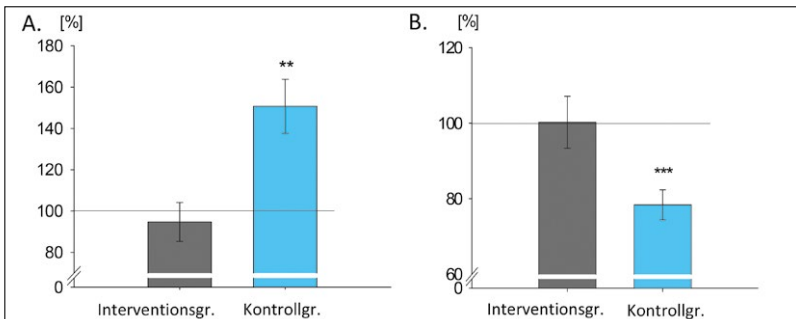


Abb. 6: Veränderung der Leptinkonzentration (A.) bzw. Serotoninkonzentration (B.) in % im Vergleich zum Ausgangswert (100%).

Statistik: gepaarter t-Test, beidseitig: \*\* =  $p < 0,01$  vs. Ausgangswert (100%), \*\*\* =  $p < 0,001$  vs. Ausgangswert (100%).



Der in den beiden Studiengruppen verabreichte Joghurt wies einen identischen Energiegehalt von 942 kJ pro 500 g auf. Da die Probanden keinem Ernährungsregime unterlagen, sollte der Joghurt zusätzlich zur täglichen Nahrungsaufnahme verzehrt werden, woraus sich bei unveränderter Ernährungsweise eine zusätzliche tägliche Energieaufnahme von 942 kJ ableiten ließ. Tatsächlich wiesen die Probanden der Kontrollgruppe während der Intervention eine erhöhte Energieaufnahme um 735 kJ pro Tag auf (**Abb. 4**), während die tägliche Energieaufnahme bei den Studienteilnehmern der Interventionsgruppe im Vergleich zur Energieaufnahme vor der Intervention nicht erhöht war (**Abb. 4**).

Ebenso wiesen die Teilnehmer der Interventionsgruppe nach Intervention eine Verringerung des Körperfettanteils um -0,48 kg auf ( $p < 0,05$ ), während sich bei den Probanden der Kontrollgruppe eine signifikante Zunahme von +0,45 kg Körperfett zeigte (**Abb. 5**).

**Abb. 6** zeigt die prozentualen Veränderungen der Leptin- sowie Serotoninkonzentrationen im Serum nach Intervention im Vergleich zu den Ausgangswerten vor Intervention.

Dem erhöhten Körperfettanteil folgend, wiesen die Probanden der Kontrollgruppe eine im Vergleich zur Ausgangskonzentration zu Studienbeginn erhöhte Leptinkonzentration auf (**Abb. 6**). Zudem spiegelte sich die erhöhte Gesamtenergieaufnahme der Studienteilnehmer der Kontrollgruppe (**Abb. 4**) in einer Verringerung der Serumkonzentration des Sättigungshormons Serotonin wider (**Abb. 6**). Keine dieser Veränderungen, die in der Kontrollgruppe auf eine ungünstige Regulation der Sättigung hindeuten, war bei den Probanden der Interventionsgruppe festzustellen.

## Kernergebnisse der Zellkulturexperimente: Einfluss von lipoiden Inhaltsstoffen von Speisefetten und -ölen auf zelluläre Mechanismen der Sättigungsregulation

Um die in den Humaninterventionsstudien erzielten Effekte verschiedener Fette bzw. Öle und lipoider Fettbegleitstoffe näher zu charakterisieren, wurde ein Zellkulturmodell herangezogen: Mittels humaner Leberzellen wurde der Einfluss von Lipiden und lipoiden Verbindungen der in den Humanstudien eingesetzten tierischen und pflanzlichen Fette auf die zelluläre Glucoseaufnahme gemessen. Gemäß der sog. „glucostatischen Theorie“ geht von einem Anstieg der Blutglucosekonzentration ein Sättigungssignal aus. Eine beschleunigte Aufnahme von Glucose aus dem Darm oder eine verlangsamte Aufnahme von Glucose durch periphere Zellen gelten als zwei wesentliche Mechanismen zur Regulation der Blutglucosekonzentration und somit zur Beeinflussung der Sättigung. Ergebnisse zellbiologischer Experimente zur Bestimmung der Wirkung einer Substanz auf die zelluläre Glucoseaufnahme, z.B. von Leberzellen, ermöglichen daher Rückschlüsse auf eine mögliche sättigungsregulierende Wirkung dieser Substanzen.

## Einfluss von Fettsäuren und biomimetischen Fettsäuregemischen auf die Glucoseaufnahme in Leberzellen

Neben einzelnen Fettsäuren wurden verschiedene Fette und Öle repräsentierende biomimetische Fettsäuregemische der majoren Fettsäuren mit zwei weiteren Fettsäuren für Schweinsschmalz, Milchfett, Olivenöl und Rapsöl hergestellt, cytotoxische Einflüsse der eingesetzten Konzentrationen ausgeschlossen und hinsichtlich ihrer Potenz, die Glucoseaufnahme in Hepatozyten zu verändern [7], untersucht. Es zeigte sich, dass mit steigender Anzahl an C-Atomen und abnehmendem Sättigungsgrad der Fettsäuren der Anteil glucoseaufnehmender Zellen signifikant verringert wurde (- 60 bis 97%; s. **Abb. 7 A**). Pflanzliche Öle (Raps und Olive) repräsentierende Fettsäuregemische im Vergleich zu Fettsäuregemischen, welche die tierischen Fette Schweineschmalz und Milch repräsentieren, konnten den Anteil glucoseaufnehmender Zellen ebenfalls verringern (- 98%; s. **Abb. 7 B**).

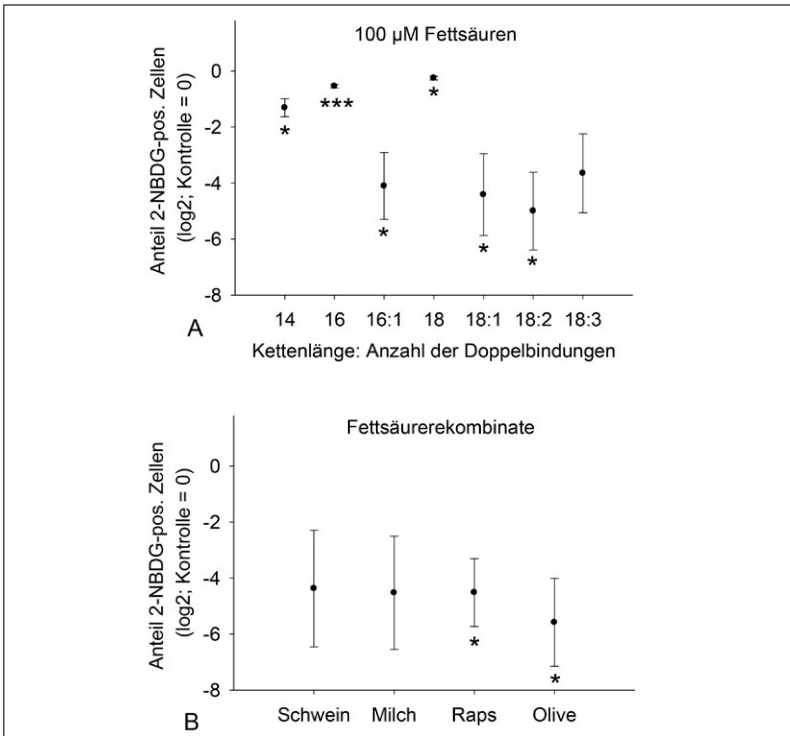


Abb. 7: Veränderung der Glucoseaufnahme in humanen Leberzellen (HepG2) nach Inkubation mit 100 µM Fettsäuren und biomimetischen Fettsäurerekombinaten.

Darstellung als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes, n = 3; statistische Auswertung: t-Test vs. Kontrolle:  $p \leq 0,001 = ***$ ,  $p \leq 0,05 = *$ .

## Einfluss von Aromaextrakten verschiedener Olivenöle auf die Glucoseaufnahme in Leberzellen

In den Humaninterventionsstudien konnte eine positive Wirkung von Olivenöl (Herkunftsland Italien) hinsichtlich verschiedener Sättigungsparameter gezeigt werden. Vom Arbeitskreis Prof. Dr. Schieberle mittels Dünnschichtdestillation hergestellte Extrakte flüchtiger Verbindungen aus verschiedenen Olivenölen sollten in Zellexperimenten zeigen, ob es eine generelle Wirkung der flüchtigen Fraktion und insbesondere der aromaaktiven Verbindungen gibt bzw. inwieweit die Herkunft eines Öles und die daraus resultierende veränderte Zusammensetzung die Glucoseaufnahme in humanen Leberzellen verändert.

In Inkubationsversuchen wurden Dünnschichtdestillate aus italienischem (eingesetzt in Humanintervention I & II), spanischem, griechischem und australischem Olivenöl nach Cytotoxizitätsprüfung und Festlegung der jeweils zulässigen Höchstkonzentration verwendet, um die Veränderung der Glucoseaufnahme in Hepatozyten zu messen. Die hierbei eingesetzte prozentuale Konzentration als Vielfaches der natürlichen Konzentration in Öl kann in **Tab. 1** abgelesen werden. Eine Identifizierung und Quantifizierung der wichtigsten flüchtigen und aromaaktiven Verbindungen kann dem Teilprojekt 3 (Prof. Dr. P. Schieberle) entnommen werden.

Tab. 1: Prozentualer Anteil an Aromaextrakt

| Vielfaches d. natürl. Konzentration \ Extrakt [%] | 1x   | 2x   | 4x   | 8x   | 16x  | 64x  | 256x | 512x |
|---|------|------|------|------|------|------|------|------|
| <b>Australien</b>                                 | 0,08 | 0,16 | 0,32 | 0,64 | 1,28 | 5,12 | 20,5 | 41,0 |
| <b>Griechenland</b>                               | 0,09 | 0,18 | 0,34 | 0,68 | 1,36 | 5,44 | 21,8 | 43,5 |
| <b>Italien</b>                                    | 0,13 | 0,26 | 0,52 | 1,04 | 2,08 | 8,32 | 33,3 | 66,6 |
| <b>Spanien</b>                                    | 0,08 | 0,16 | 0,32 | 0,64 | 1,28 | 5,12 | 20,5 | 41,0 |

Eingesetzte Konzentrationen an Aromaextrakt in Prozent entsprechend der vielfachen natürlichen Konzentration. Die vertikale Endbegrenzung (blau) entspricht der Grenze zur größten nicht-toxischen Konzentration.

Als Ergebnis konnten gegenläufige Effekte auf die Glucoseaufnahme durch italienisches und spanisches Extrakt gemessen werden: Die Behandlung der humanen Leberzellen mit spanischem Extrakt führte dosisabhängig zu einer gesteigerten Glucoseaufnahme, wohingegen die Inkubation mit italienischem Extrakt eine geringere Glucoseaufnahme zur Folge hatte (Differenz bei achtfacher natürlicher Konzentration > 300 %, s. **Abb. 8 B**). Australisches und griechisches Aromaextrakt zeigten ebenso wie italienisches Extrakt eine hemmende Wirkung auf die Glucoseaufnahme (- 25 % bis - 50 % im Vergleich zur Kontrolle, s. **Abb. 8 A**). Weitere Experimente werden zeigen, welche Inhaltsstoffe für diese unterschiedliche Wirkung verantwortlich sind.

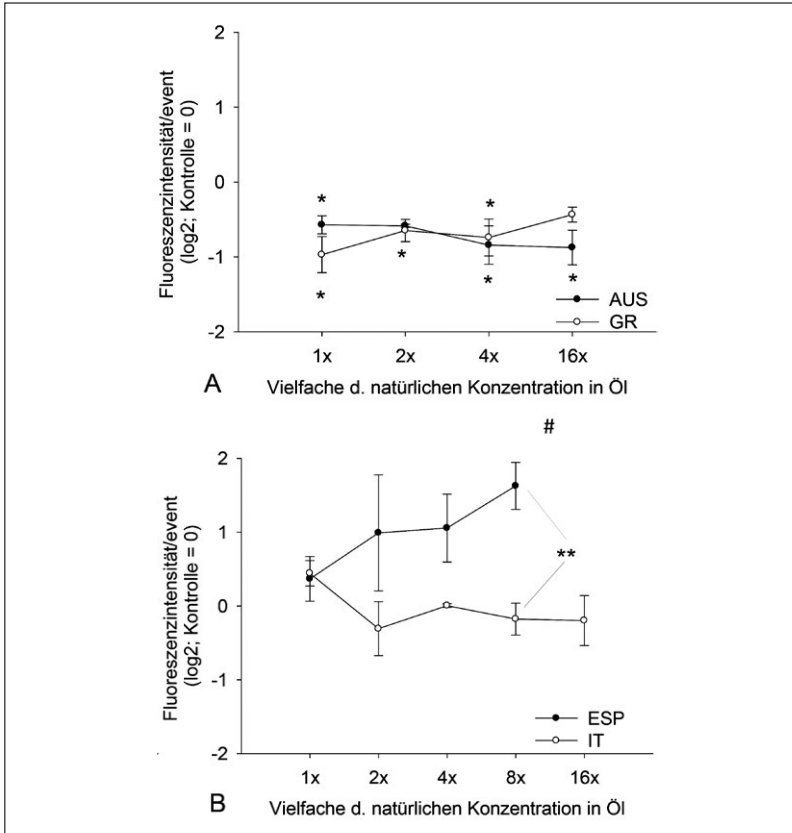


Abb. 8: Veränderung der Glucoseaufnahme nach Inkubation mit Aromaextrakten aus Olivenölen verschiedener Länder.

Darstellung als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes,  $n = 3 - 4$ ; Herkunft der Öle: Australien (AUS), Griechenland (GR), Spanien (ESP), Italien (IT). Statistische Auswertung Diagramm A: ONE WAY ANOVA, Post hoc -Test: Holm-Sidak  $p \leq 0,05 = *$ ; Diagramm B: t-Test ESP vs. IT  $p \leq 0,01 = **$ ; t-Test ESP vs. Kontrolle = 0  $p \leq 0,01 = \#$ .

Da das griechische und australische Aromaextrakt eine sehr ähnliche Zusammensetzung im Vergleich zum italienischen Aromaextrakt aufwies (Daten nicht gezeigt) und das italienische Extrakt auch in der Humaninterventionsstudie eingesetzt wurde, wurden Rekombinate der einzelnen Aromastoffe für spanisches und italienisches Olivenölaromaextrakt untersucht.

## **Einfluss von E2-Hexenal, Hexanal und Aromarekombinaten verschiedener Olivenöle auf die Glucoseaufnahme in Leberzellen**

Da Aromaextrakte aus Olivenölen verschiedener Länder die Glucoseaufnahme in Hepatozyten unterschiedlich beeinflussten, wurde die Wirkung von Aromarekombinaten und Einzelsubstanzen auf die Glucoseaufnahme getestet. Hierdurch konnte eine Eingrenzung auf wirksame Substanzen aus den Aromaextrakten erfolgen.

Hinsichtlich der Glucoseaufnahme in Leberzellen zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen einem Aromarekombinat aus den zehn quantitativ wichtigsten Aromastoffen des spanischen Olivenöls und einem Rekombinat, das italienisches Olivenöl repräsentiert. Während die Behandlung der humanen Leberzellen mit dem dem spanischen Öl entsprechenden Rekombinat keine Veränderung der Glucoseaufnahme herbeiführte (Daten nicht gezeigt), konnte die Behandlung mit dem Aromarekombinat, welches das italienische Olivenöl repräsentierte, die Glucoseaufnahme senken (s. **Abb. 9 A**). Die aromaaktive Fraktion des italienischen Olivenöls unterscheidet sich nicht qualitativ, jedoch quantitativ von spanischem Olivenöl: Das Aromaextrakt, das aus dem italienischen Olivenöl gewonnen wurde, enthält die doppelte Menge an Hexanal sowie die vierzigfache Menge an E2-Hexenal im Vergleich zu dem aus spanischem Olivenöl gewonnenen Extrakt. Dies könnte die unterschiedliche Wirkung dieser beiden Extrakte bzw. Rekombinate erklären. Daher wurden Inkubationsversuche zur Glucoseaufnahme in Hepatozyten mit Hexanal und E2-Hexenal sowie Omissionsexperimente mit den Rekombinaten durchgeführt.

Hier zeigte sich eine signifikante, die Glucoseaufnahme senkende Wirkung des das italienische Olivenöl repräsentierenden Rekombinats ohne E2-Hexenal/ mit Hexanal (-20%) im Konzentrationsbereich bis zum Sechzehnfachen der natürlichen Konzentration in Öl (s. **Abb. 9 A**). Eine signifikante Abnahme der Glucoseaufnahme konnte auch ein entsprechendes Rekombinat aus den acht wichtigsten Aromastoffen ohne E2-Hexenal und ohne Hexanal erzielen (-10% bei einfacher bis sechzehnfacher Konzentration; -15% bei 64 x bis 512 x der natürlichen Konzentration in Öl). Ein Rekombinat mit den acht wichtigsten aromaaktiven Substanzen aus italienischem Olivenöl mit E2-Hexenal/ohne Hexanal konnte keine signifikante Veränderung der Glucoseaufnahme herbeiführen.

Bei den beiden getesteten Einzelsubstanzen konnte Hexanal in Konzentrationen bis zum Sechzehnfachen der natürlichen Konzentration in Öl (absolute Konzentration s. **Tab. 2**) eine signifikante Hemmung der Glucoseaufnahme erzielen (-15%), während E2-Hexenal erst in der höchsten nicht-cytotoxischen Konzentration eine signifikante Veränderung bewirken konnte (s. **Abb. 9 B**).

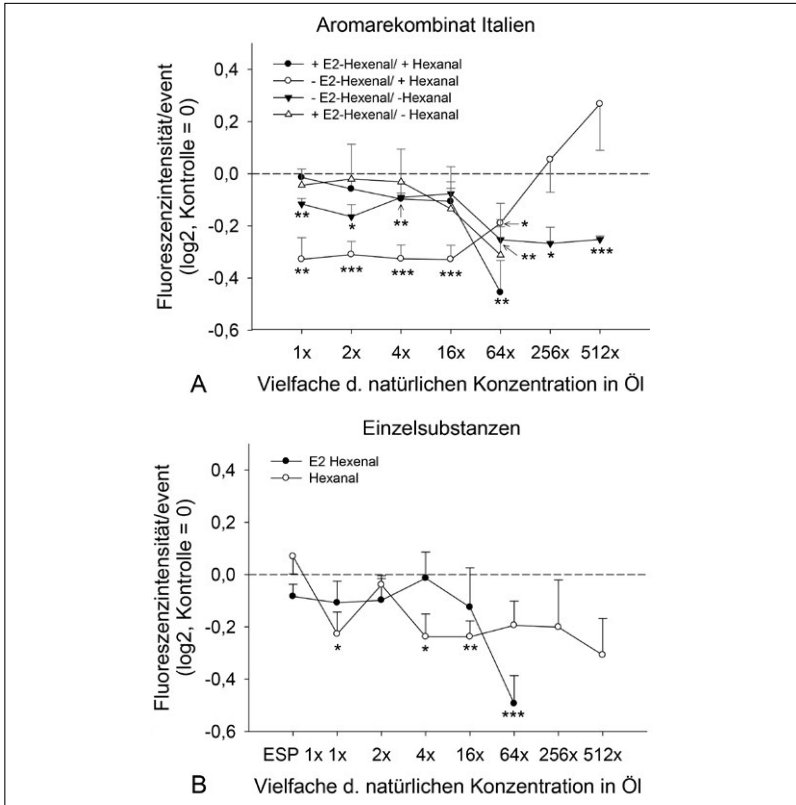


Abb. 9: Veränderung der Glucoseaufnahme nach Inkubation mit Aromarekombinat „Olivenöl Italien“ mit/ohne E2-Hexenal und mit/ohne Hexanal (A) und Einzelsubstanzen (B). Darstellung als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes,  $n = 4 - 6$ , 1 x ESP entspricht der natürlichen Konzentration in spanischem Olivenöl; statistische Auswertung: t-Test vs. Kontrolle:  $p \leq 0,001 = ***$ ,  $p \leq 0,01 = **$ ,  $p \leq 0,05 = *$ .

Tab. 2: Eingesetzte Konzentrationen Einzelsubstanzen

| Vielfaches d. natürlichen Konzentration<br>Konzentration<br>[ $\mu\text{g} * \mu\text{l}^{-1}$ ] | Vielfaches d. natürlichen Konzentration |       |       |       |       |       |      |      |      |  |
|--|---|-------|-------|-------|-------|-------|------|------|------|--|
|  | 1x ESP                                  | 1x    | 2x    | 4x    | 8x    | 16x   | 64x  | 256x | 512x |  |
| Hexanal  | 0,0005                                  | 0,001 | 0,002 | 0,004 | 0,008 | 0,02  | 0,06 | 0,26 | 0,51 |  |
| E2-Hexenal   | 0,0002                                  | 0,005 | 0,011 | 0,022 | 0,044 | 0,088 | 0,35 | 1,40 | 2,79 |  |

Eingesetzte Konzentrationen entsprechend der vielfachen natürlichen Konzentration. Die vertikale Endbegrenzung (blau) entspricht der Grenze zur größten nicht-toxischen Konzentration. 1 x ESP ist die natürliche Konzentration im hier verwendeten spanischen Olivenöl.

Insgesamt zeigt sich anhand der Ergebnisse der Zellkultorexperimente, dass Hexanal als Inhaltsstoff von Olivenöl einen Beitrag zu der in den Humaninterventionsstudien gezeigten positiven Wirkung von Olivenöl auf die Sättigungsregulation haben könnte.

## Zusammenfassung

Das Teilprojekt 3 hatte das Ziel, im ersten Schritt die sättigende Wirkung von tierischen und pflanzlichen Nahrungsfetten anhand physiologischer Parameter und anhand der subjektiven Einschätzung der Sättigung zu bewerten. Dies erfolgte u.a. sowohl durch eine humane Interventionsstudie sowie in Zellkulturstudien mit humanen Leberzellen (HepG2). Im zweiten Schritt sollten zusätzliche Inhaltsstoffe aus dem in der Humanintervention identifizierten Zielfett in einer weiteren humanen Interventionsstudie und ebenfalls in Zellkulturstudien untersucht werden. Die Identifizierung dieser Inhaltsstoffkomponenten wurde in enger Kooperation mit den Teilprojekten 3 (Prof. Dr. Peter Schieberle) und 6 (Prof. Dr. Thomas Hofmann) durchgeführt.

Mittels der ersten Humanintervention und parallelen Zellkulturstudien gelang es, Olivenöl als das Nahrungsfett zu identifizieren, welches die gewählten, mit der Sättigung assoziierten Parameter positiv beeinflusste. Die Verabreichung eines mit Olivenöl angereicherten Magerjoghurts führte bei gesunden Probanden zu einer Erhöhung des Serotoninspiegels und zu einer hohen subjektiven Sättigung der Testpersonen. Die Zellkulturstudien zeigten, dass unter Einfluss von biomimetischen Gemischen der majoren Fettsäuren der untersuchten Nahrungsfette, die dem Olivenöl bzw. Rapsöl entsprachen, die Glucoseaufnahme verringert wurde. Dieses Ergebnis wurde für die eingesetzten biomimetischen Gemische von Schweineschmalz und Milchfett nicht erzielt.

Aufgrund des ähnlichen Fettsäuremusters von Olivenöl und Rapsöl wurden Fettsäuren als alleiniger Faktor für den positiven Sättigungseffekt des Olivenöls ausgeschlossen. In einem weiteren Studienteil wurde daher die Aroma- und Geschmacksstofffraktion des Olivenöls getestet. Ein positiver Effekt auf Parameter der Sättigung ließ sich für italienisches Olivenöl auch hier nach der Intervention bestätigen. Bei den Teilnehmern der Interventionsgruppe wurde der Körperfettanteil verringert. Zwar blieb der Serotoninspiegel bei diesen Probanden konstant, jedoch führte die Verabreichung von dem nicht mit Olivenöl aromaextrakt angereicherten Magermilchjoghurt zu einer Verringerung des Serotoninspiegels.

In Zellkultorexperimenten konnte für Hexanal und E2-Hexanal als quantitativ dominierende flüchtige Inhaltsstoffe in italienischem Olivenöl ein hemmender Effekt auf die Glucoseaufnahme in humanen Leberzellen gezeigt werden. Dieses Ergebnis deutet entsprechend der glucostatischen Theorie auf eine positive Wirkung der Sättigungsregulation.

In Teilprojekt 3 konnte somit erstmals ein Zusammenhang zwischen dem sättigenden Effekt von Olivenöl und den hierin enthaltenen Aromastoffen Hexanal und E2-Hexenal aufgezeigt werden.

## Literatur

- [1] Pierce DW, Heth CD, Owczarczyk JC, Russel JC, Proctor SD (2007) Overeating by young obesity-prone and lean rats caused by tastes associated with low energy foods. *Obesity* 15: 1969-1979.
- [2] Shai, I., Schwarzfuchs, D., Henkin, Y., Shahar, D. R., et al., Weight loss with a low-carbohydrate, Mediterranean, or low-fat diet. *N Engl J Med.* 2008, 359, 229-241.
- [3] Samaha, F. F., Iqbal, N., Seshadri, P., Chicano, K. L., et al., A low-carbohydrate as compared with a low-fat diet in severe obesity. *N Engl J Med.* 2003, 348, 2074-2081.
- [4] Lawton, C. L., Delargy, H. J., Brockman, J., Smith, F. C., Blundell, J. E., The degree of saturation of fatty acids influences post-ingestive satiety. *Br J Nutr.* 2000, 83, 473-482.
- [5] Vogler, O., Lopez-Bellan, A., Alemany, R., Tofe, S., et al., Structure-effect relation of C18 long-chain fatty acids in the reduction of body weight in rats. *Int J Obes (Lond).* 2008, 32, 464-473.
- [6] Halford, J. C., Blundell, J. E., Separate systems for serotonin and leptin in appetite control. *Ann Med.* 2000, 32, 222-232.
- [7] Yamada K, Saito M, Matsuoka H, Inagaki N (2007), A real-time method of imaging glucose uptake in single, living mammalian cells. *Nature Protocols* 2 (3):753-762.

---

Im Rahmen des DFG/AiF-Clusters „Fettwahrnehmung und Sättigungsregulation: Ansatz zur Entwicklung fettreduzierter Lebensmittel“ wurde das Teilprojekt 3 des Forschungskreises der Ernährungsindustrie e.V. (FEI) über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung und -entwicklung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.



## Summary Sub-Project 3

### Identification of satiating compounds in dietary fats and optimization of low-fat foods by adding satiating lipid compounds

The prevalence of overweight is constantly increasing across the population of Western countries. Obesity and overweight result from an imbalance between the energy consumed and the physical activity performed. With lifestyles becoming more sedentary, the intake of energy-dense foods, in particular those rich in saturated fats, contributes to the growing prevalence of overweight and obesity. The food industry has responded to the consumer demand for less energy-dense foods by offering an increasing variety of low-fat eating choices. However, several animal and human intervention studies showed that consumption of low-fat products may conduct to a reduction of fat intake, whereas the total energy uptake is higher. Our hypothesis, therefore, was, that the intake of dietary fat affects mechanisms regulating satiety. Results from human intervention studies have already demonstrated that fatty acids contribute to satiation, depending on their degree of saturation and number of carbon atoms. The aim of this project was to evaluate the satiating effects of different types of fat in two human intervention studies, and to elucidate the molecular mechanisms in cell culture experiments using human hepatic cancer cells (HepG2). In the first human intervention study, total amounts of 8% olive oil, canola oil, lard or milk fats were added to low-fat yoghurt (0.1 % fat). Five hundred grams of each of these yoghurts were administered to healthy volunteers for three month. Consumption of olive oil-enriched yoghurt increased serum serotonin levels and resulted in improved subjective satiation of the volunteers. Administration of the canola oil-enriched yoghurt resulted in increased leptin levels, but also led to a higher body fat mass. In cell culture experiments with human hepatocytes, biomimetic mixtures of quantitatively pre-dominant fatty acids in olive oil and canola oil stimulated the cellular glucose uptake less than fatty acid mixtures corresponding to lard or milk fat. Since the fatty acid pattern of these two vegetable oils is very similar, whereas olive oil showed the stronger satiating effect in the human intervention study, aroma compounds present in olive oil were tested for their effects on mechanisms regulating satiety.

In a second human intervention study, 500 g low-fat yoghurt (0.1 % fat) was enriched with an aroma extract prepared from 120 ml olive oil. Compared to volunteers from the control group, who received the low-fat yoghurt and demonstrated an increased body fat mass and increased serotonin levels at the end of the intervention, consumption of the aroma-enriched yoghurt led to significantly reduced body fat mass and stable serotonin levels. Cell culture experiments confirmed the impact of olive oil aroma compounds on cellular glucose uptake, being one of the mechanisms regulating satiety. In these experiments, hexanal

and E2-hexenal being two of the predominant aroma active compounds in olive oil, were identified as key active compounds. In conclusion, this study showed - for the first time - that aroma compounds, in particular hexanal and E2-hexenal predominantly present in olive oil, elicit satiating effects.

## Teilprojekt 4 (DFG)

### Modulation der Insulinwirkung im Gehirn durch Nahrungsfette

**Prof. Dr. Andreas Fritsche<sup>1</sup>**

**Prof. Dr. Hans-Ulrich Häring<sup>1</sup>**

**Prof. Dr. Niels Birbaumer<sup>2</sup>**

**Prof. Dr. Dr. Peter Ruth<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Medizinische Universitätsklinik, Med. Klinik und Poliklinik,  
Abteilung Innere Medizin IV, Tübingen

<sup>2</sup> Universität Tübingen,  
Institut für Medizinische Psychologie und Verhaltensneurobiologie

<sup>3</sup> Universität Tübingen,  
Institut für Pharmazie, Abteilung Pharmakologie und Toxikologie

#### 1. Einführung und Motivation

Die Studien in diesem Projekt wurden an der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen (Prof. Dr. Hans-Ulrich Häring) in Kooperation mit dem MEG-Zentrum des Universitätsklinikum Tübingen (Prof. Dr. Niels Birbaumer) durchgeführt. Durch Tierstudien konnte belegt werden, dass der Konsum von tierischen Fetten die Gehirnfunktion und den Schlaf verändern kann. Danach führt eine gesteigerte Aufnahme von Milchfett zu erhöhten Blutzuckerwerten, einer verminderten Gehirnaktivität und weniger Bewegung. Dies ist bei einer vergleichbaren Aufnahme von Rapsöl, das reich an ungesättigten Fettsäuren ist, nicht der Fall. Aus früheren Studien unserer Arbeitsgruppe ist bekannt, dass Fette, die einen hohen Anteil an gesättigten Fettsäuren enthalten, das Diabetesrisiko erhöhen und die Hirnleistung reduzieren. Der hohe Konsum von Lebensmitteln mit einer hohen Energiedichte wird heute – zusammen mit körperlicher Inaktivität – als eine der Hauptursachen für Übergewicht und *Diabetes mellitus* Typ 2 angesehen. Diese Erkrankungen stellen für das Gesundheitssystem eine große Herausforderung dar. Neben der Gesamtfettaufnahme wird der Fettqualität eine entscheidende Rolle beigemessen. Unsere Arbeitsgruppe untersuchte in Kooperation mit dem Deutschen Zentrum für Diabetesforschung e.V., wie sich eine kaloriengeleiche Aufnahme von Rapsöl oder Milchfett auf den Blutzuckerspiegel, die körperliche Aktivität sowie die Aktivität des Gehirns und das Schlafverhalten auswirkt. Aus ernährungsphysiologischer Sicht handelt es sich bei Rapsöl um ein äußerst wertvolles Speiseöl, da es einen hohen Anteil an einfach ungesättigten Fettsäuren enthält und besonders arm an gesättigten Fettsäuren ist. Milchfett, ein tierisches

Fett, besteht zum größten Teil aus gesättigten Fettsäuren, Hauptbestandteil ist hier Palmitinsäure.

Die Untersuchungen von nahrungsbezogenen Gehirnprozessen im Menschen werden in unserem Institut mit nicht-invasiven, bildgebenden Verfahren durchgeführt. In zahlreichen Studien haben wir differentielle nahrungsbezogene Protokolle mittels funktioneller Magnetresonanztomographie (fMRT) und Magnetoencephalographie (MEG) durchgeführt. Hierbei wurden die Gehirnaktivitäten bei normal- und übergewichtigen Probanden, in Reaktion auf Nahrungsstimuli, sowie bei der Applikation von Insulin untersucht. Insbesondere konnten wir nachweisen, dass die Insulinwirkung im Gehirn bei Übergewichtigen reduziert ist, was einer zentralen Insulinresistenz entspricht. Akute und langzeitliche Einflüsse bestimmter Nahrungsmittel auf Hirnfunktionen wurden bisher nur unzureichend untersucht. Bisherigen Arbeiten unter Anwendung der fMRT konzentrierten sich auf die sensorischen Qualitäten von Fett, wie Geschmack, Textur und Viskosität, und deren unmittelbare Effekte auf die Gehirnaktivität.

## Akute Effekte durch Fette (Mensch)

### Material und Methoden

#### *Joghurt*

In dieser Studie wurde untersucht, inwieweit eine fettreiche Mahlzeit im Vergleich zu einer fettarmen einen Einfluss auf die neuronale Aktivität in gustatorischen und homöostatischen Gehirnarealen hat. Dafür wurde am Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie der Universität Hohenheim fettreicher und fettarmer Joghurt produziert (eine ausführliche Beschreibung des Herstellungsprozesses findet sich in FRANK et al., 2012, **(3)**). Um den Einfluss sensorischer Qualitäten auf die Ergebnisse zu minimieren, sollten diese von den Probanden geschmacklich und hinsichtlich der Textur nicht zu unterscheiden sein. Die Messung der Viskositätseigenschaften beider Produkte zeigte dabei keine bedeutsamen Unterschiede. Eine Aufstellung der Makronährstoffe und der berechneten Energiewerte findet sich in **Tab. 1**.

*Tab. 1: Inhalt der Nährstoffe und berechnete Energiewerte des fettarmen und fettreichen Joghurts gemittelt über drei Messungen*

|                     | $C_F$ (% w/w) | $C_P$ (% w/w) | $C_L$ (% w/w) | TM (%)    | Energiewert (kcal/100 g) |
|---------------------|---------------|---------------|---------------|-----------|--------------------------|
| Fettarmer Joghurt   | 0.08±0.05     | 6.13±0.05     | 4.7±0.04      | 12.9±0.13 | ~40                      |
| Fettreicher Joghurt | 8.04±0.12     | 3.42±0.06     | 4.6±0.06      | 15.8±0.34 | ~100                     |

$C_F$ : Fettinhalt,  $C_P$ : Proteininhalt,  $C_L$ : Laktoseinhalt, TM: Gehalt an Trockenmasse

### Versuchsteilnehmer

An der Studie nahmen elf normalgewichtige männliche Erwachsene (Alter:  $28.81 \pm 0.57$  Jahre; BMI:  $24.17 \pm 0.71$  kg/m<sup>2</sup>) teil. Zur Bestimmung des zerebralen Ruhe-Blutflusses verwendeten wir ein fMRT-basiertes Messverfahren ('Pulsed Arterial Spin Labelling') mit dessen Hilfe die Gehirndurchblutung (Perfusion) in physiologisch definierten Einheiten (ml/100g/min) erfasst werden kann. Die Untersuchungen erfolgten an zwei verschiedenen Tagen und wurden an einem 3-Tesla-Tomographen (Siemens Tim Trio) vorgenommen. Die Reihenfolge der Joghurtzuordnung erfolgte randomisiert und einfach verblindet. Der Joghurt (500 ml) wurde jeweils nach der ersten Messung eingenommen.

### CBF-Messung

Insgesamt wurden an jedem Tag drei Blutflussmessungen mit einer Dauer von jeweils 8 min und 27 s durchgeführt. Die zweite Messung erfolgte 30 Minuten nach der ersten Messung und die dritte Messung nach 120 Minuten. Vor jeder Messung wurde Blut entnommen und das subjektive Hungergefühl erfasst (**Abb. 1**).

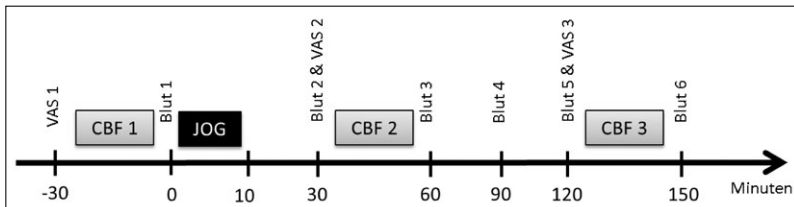


Abb. 1 : Studiendesign. CBF, zerebraler Blutfluss ; VAS, visuelle Analogskala ; JOG, Joghurt.

Die Bildverarbeitung der CBF-Daten erfolgte standardisiert mit etablierten Verfahren (FMRIB's Software Library software (FSL)). Der mittlere zerebrale Blutfluss im Hypothalamus und im insulären Kortex zu den jeweiligen Messzeitpunkten diente als Maß der zerebralen Perfusion. Zusätzlich wurde der CBF in ausgewählten Bereichen im visuellen Kortex, im Temporalkortex und im Thalamus zur Überprüfung etwaiger unspezifischer Effekte berechnet. Zur Kontrolle intra- und interindividueller Unterschiede im Ruhe-CBF dienten die prozentualen Veränderungen jeweils bezogen auf die Erstmessung als abhängige Variable für die weitere statistische Analyse (Varianzanalysen mit Messwiederholungen mit den Faktoren Fett (fettarm/fettreich) und Zeit ( $\Delta$  30 Min/ $\Delta$  120 Min)).

## Ergebnisse

Während im Hypothalamus nach Einnahme des fettreichen Joghurts eine Abnahme des Blutflusses sowohl nach 30 als auch nach 120 Minuten festgestellt werden konnte, führte die Gabe von fettarmen Joghurt zu keinen Veränderungen des Blutflusses (**Abb. 2**). Die Analyse subjektiver Hungerbewertungen ergab hingegen keine Unterschiede zwischen den beiden Nahrungsmitteln. Auch in den Kontrollregionen konnten keine fettspezifischen CBF-Veränderungen ausgemacht werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es im insulären Kortex

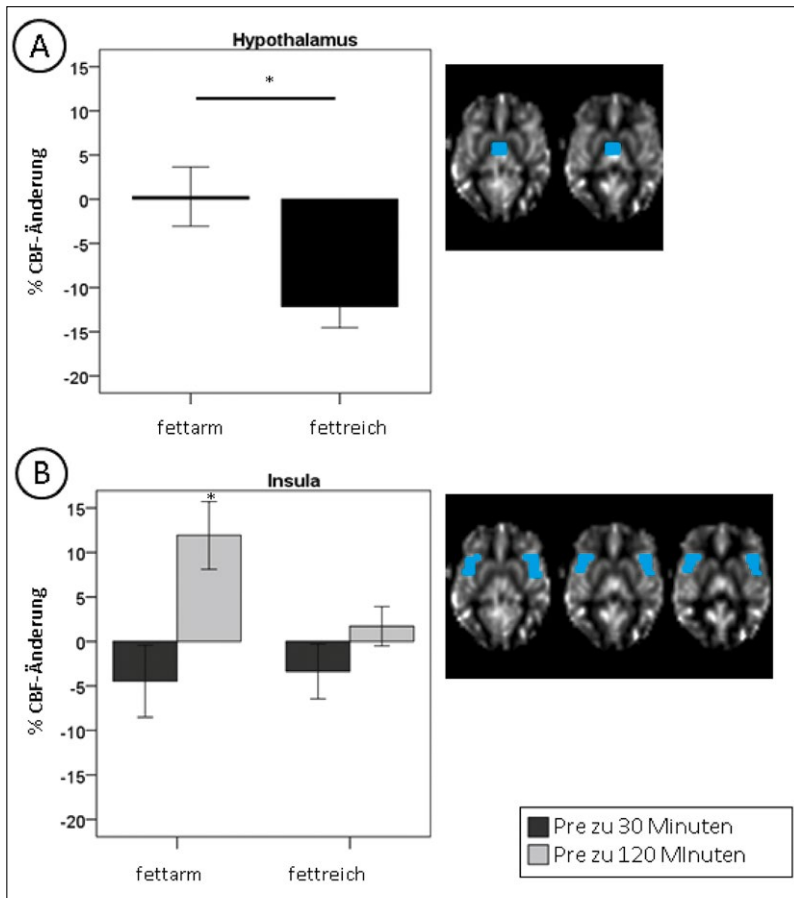


Abb. 2: Ergebnisse der fMRT-CBF-Auswertung für den Vergleich von fettarmem und fettreichen Joghurt im Hypothalamus (A) und im insulären Kortex (B).

nur nach Einnahme fettarmen Joghurts zu einer Zunahme des CBF nach 120 Minuten kommt. Es gab jedoch einen Zeiteffekt mit leichten CBF-Abnahmen nach 30 Minuten und einer Rückkehr zu den Ausgangswerten nach 120 Minuten. Eine Korrelationsanalyse der CBF-Veränderungen im Hypothalamus nach 30 Minuten und im insulären Kortex nach 120 Minuten ergab einen signifikanten Zusammenhang nur nach Einnahme fettreichen Joghurts. Weiterhin konnte eine Korrelation der differentiellen Insulinkonzentrationen nach 30 Minuten bezogen auf die Initialwerte sowohl mit den hypothalamischen Veränderungen nach 30 Minuten als auch nach 120 Minuten beobachtet werden.

## Schlussfolgerung

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass nur fettreicher Joghurt zu einer Abnahme des CBF im Hypothalamus führt und dass dieser Effekt sowohl nach 30 als auch nach 120 Minuten zu beobachten ist. Verantwortlich für diese spezifischen Veränderungen dürften postprandiale metabolische und endokrine Prozesse sein [4], die unabhängig vom subjektiven Hungergefühl zu beobachten sind. Dafür sprechen auch die stärkeren Zunahmen in der Insulinausschüttung beim fettarmen Joghurt gegenüber der fettreichen Variante. Eine verzögerte gastrische Entleerung bei hoher Fettkonzentration [5] oder eine über den Hypothalamus gesteuerte veränderte Insulinkonzentration kommen dabei als mögliche Mediatoren in Frage [6]. Unterstützt wird diese Annahme durch die gleichbleibenden Glukosewerte im postprandialem Zustand sowie den nicht unterschiedlichen Kohlenhydratmengen in beiden Joghurtarten. Weiterhin konnten wir eine Zunahme der Aktivität im insulären Kortex 120 Minuten nach Einnahme des fettarmen Joghurts beobachten. Die Aktivitätszunahme korrelierte dabei negativ mit den Veränderungen im Hungergefühl zwischen 30 und 120 Minuten. Der Einfluss des Hungerzustandes (satt gegenüber hungrig) auf die Aktivität in der Inselregion konnte auch in früheren Studien gezeigt werden [7]. Es scheinen dabei aber eher gustatorische als metabolische Prozesse eine Rolle zu spielen, da keine korrelativen Zusammenhänge mit der Insulinkonzentration gefunden wurde. Betrachten wir die Aktivität in der Insel und im Hypothalamus in ihrem Zusammenspiel, so zeigt sich, dass es nur in der fettreichen Bedingung zu einer Korrelation zwischen den Aktivierungsabnahmen im Hypothalamus im postprandialem Zustand und den Aktivierungszunahmen im insulären Kortex nach 120 Minuten gibt. Dies lässt darauf schließen, dass nicht die Joghurteinnahme per se, sondern der Fettgehalt der Mahlzeit die neuronale Verschaltung zwischen Inselregion und Hypothalamus moduliert.

## Langzeiteffekte durch Fette (Mensch und Tier)

### Auch das Gehirn mag gutes Fett – Fettqualität beeinflusst Blutzuckerspiegel, körperliche Aktivität und Gehirnaktivität

In Mäusestudien konnten wir nachweisen, dass zu viele gesättigte Fettsäuren in der Nahrung zu erhöhten Blutzuckerwerten und einer verschlechterten Insulinwirkung in Gehirn führen kann (**Abb. 3 A**) und übergewichtige Mäuse ein

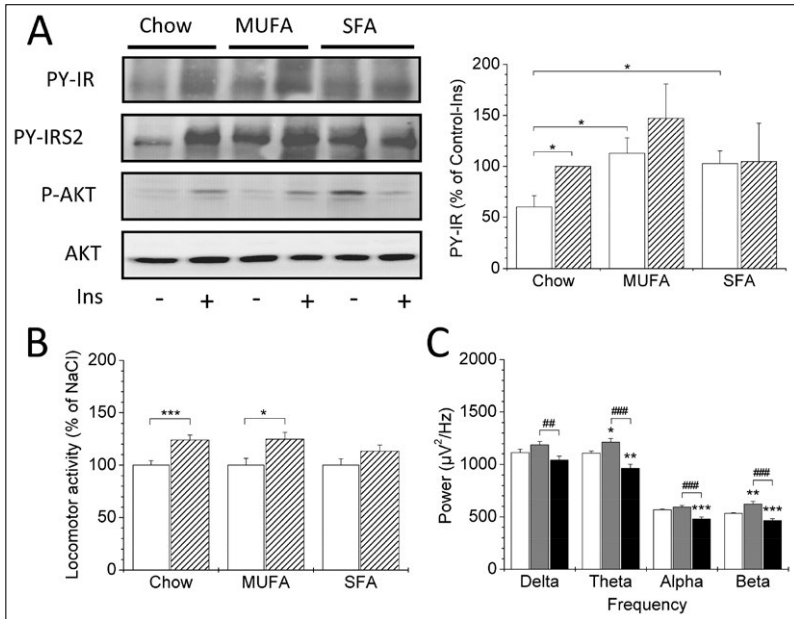


Abb. 3: Einfluss von gesättigten (SFA) und einfach ungesättigten Fettsäuren (MUFA) auf die Insulinsensitivität im Gehirn und deren Einfluss auf die kortikale und lokomotorische Aktivität.

A: Abgeschwächte Tyrosinphosphorylierung (PY) von Insulinrezeptor (IR), Insulinrezeptorsubstrat 2 (IRS2), und Phosphorylierung von AKT (S473) bzw. Proteinexpression von AKT nach intravenöser Insulininjektion in mit MUFA- und SFA-supplementierten Mäusen bzw. Kontrolltieren. Densitometrische Quantifizierung von PY-IR (relativer Anstieg von PY-IR im Vergleich zu insulin-stimulierten Kontrolltieren;  $n=5-6$ /Gruppe,  $*P < 0.05$ ) nach intravenöser Injektion von Insulin (schraffiert) oder Vehikellösung (weiß). B: Eine akute intracerebroventrikuläre Insulinapplikation (schraffiert) vs. Vehikellösung (weiß) resultiert in einem weniger ausgeprägten Anstieg der lokomotorischen Aktivität in SFA-gefütterten Mäusen.  $***P < 0.001$  and  $*P < 0.05$  im Vergleich zu Kontrolltieren. C: Basale Powerspektralanalyse (aufgezeigt für delta [0.5–4 Hz], theta [4–8 Hz], alpha [8–12 Hz], and beta [12–30 Hz] Frequenzen) in MUFA- (grau), SFA- (schwarz), und Kontrolltieren (weiß). Basale ECoG-Messungen wurden in einem Zeitraum von 4 Tagen ermittelt ( $n=11-24$ /Gruppe;  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.005$ , and  $***P < 0.001$  im Vergleich zu Kontrolltieren;  $##P < 0.005$  and  $###P < 0.001$  zwischen Fettgruppen) between fat-enriched diet groups).



reduziertes Bewegungsverhalten (**Abb. 3 B**), eine Beeinträchtigung der Gehirnaktivität (**Abb. 3 C**) und ein verändertes Schlafmuster zeigen. Dahingegen führen ungesättigte Fettsäuren zu keinen Veränderungen im Blutzuckerprofil, obwohl auch diese Mäuse übergewichtig sind. Sie bleiben dennoch körperlich aktiv und haben keinen gestörten Schlaf.

Interessanterweise konnte in körpergewichtsgleichen Subgruppen ebenfalls nachgewiesen werden, dass zu viel gesättigte Fettsäuren in der Nahrung zu

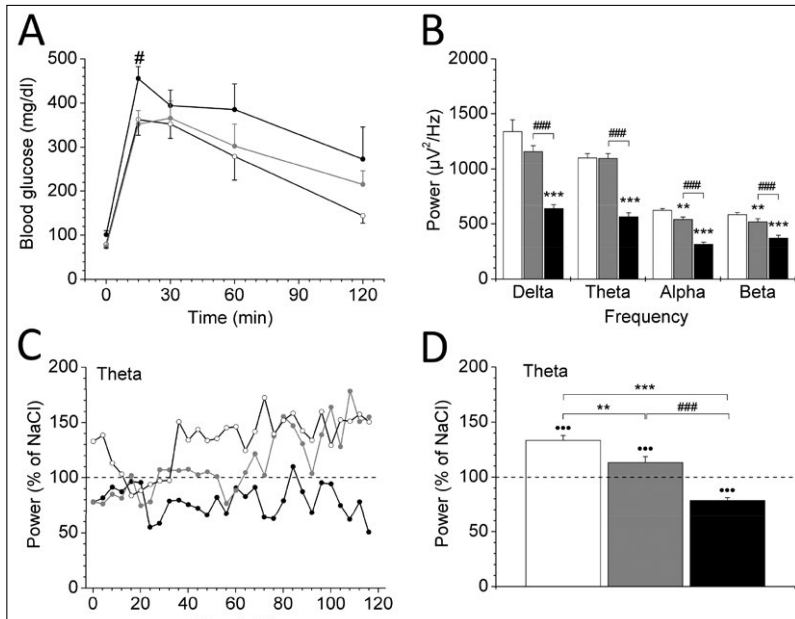


Abb.4: Metabolische Konsequenzen von Fett-angereicherten Diäten in körpergewichtsgleichen C57BL/6-Mäusen. Die Mäuse wurden über einen Zeitraum von 8 Wochen mit MUFA- (grau) oder SFA-angereicherter (schwarz) Diät bzw. Kontrolldiät (weiß) gefüttert und Subgruppen von körpergewichtsgleichen Tieren selektiert (n=4/Gruppe).

A: Intraperitoneal injizierte Glucose während eines Glucosetoleranztestes wurde in SFA-gefütterten Mäusen (schwarze Kreise) langsamer und ineffektiver entgegengewirkt im Vergleich zu Kontrolltieren (weiße Kreise) bzw. MUFA-gefütterten Mäusen (graue Kreise) ( $\#P < 0.05$  zur MUFA-Gruppe). B: Basale Powerspektralanalyse (aufgezeigt für delta [0.5–4 Hz], theta [4–8 Hz], alpha [8–12 Hz], and beta [12–30 Hz] Frequenzen) in MUFA- (grau), SFA- (schwarz), und Kontrolltieren (weiß). Basale ECoG-Messungen wurden in einem Zeitraum von 4 Tagen ermittelt ( $**P < 0.005$ ,  $***P < 0.001$  verglichen mit Kontrolltieren;  $###P < 0.001$  zwischen Fettgruppen). C: Insulinstimulierte kortikale Aktivität im Theta-Frequenzbereich von körpergewichtsgleichen MUFA- (grau), SFA- (schwarz) bzw. Kontrolltieren (weiß). Signifikanz zwischen Fettgruppen und Kontrollgruppe:  $**P < 0.005$ ,  $***P < 0.001$ ; Signifikanz zwischen Fettgruppen:  $###P < 0.001$ ; Signifikanz zwischen intracerebroventrikulären Insulin und Vehikellösung:  $***P < 0.001$ .

Glucoseintoleranz (**Abb. 4 A**) und einer verminderten Hirnaktivität (**Abb. 4 B**) führt. Zudem hat intracerebroventrikulär verabreichtes Insulin nur bei Kontrolltieren und mit ungesättigten Fettsäuren supplementierten Tieren eine gesteigerte neuronale Aktivität zur Folge, wohingegen gesättigte Fettsäuren die Insulinwirkung im Gehirn negativ beeinträchtigten (exemplarisch Theta-Aktivität, **Abb. 4 C, D**).

Auch beim Menschen konnten wir ähnliche Effekte nachweisen. Obwohl die Probanden nach einer 3-monatigen Aufnahme von Joghurt, der mit Milchlaktose oder Rapsöl angereichert war, keine Veränderungen im Körpergewicht oder Blutzucker zeigten, war die Gehirnkraft bei denen, die vermehrt gesättigte Fettsäuren gegessen haben, reduziert (**Abb. 5 A-C**). Dies betrifft vor allem Gehirnregionen, die für das Sättigungsgefühl, das Gedächtnis und das Bewegungsverhalten verantwortlich sind.

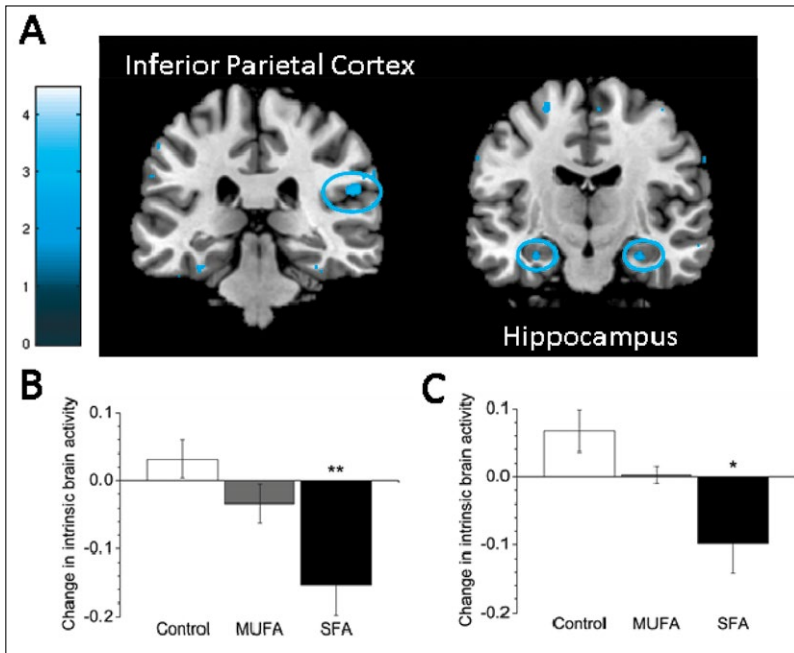


Abb. 5: Effekt einer MUFA- und SFA-angereicherten Diät auf die Hirnaktivität des Menschen.

A: Farbig-kodierte Abbildung repräsentiert signifikant ( $P < 0.05$ ) reduzierte intrinsische Hirnaktivitäten 3 Monate nach SFA- bzw. MUFA-angereichertem Joghurtkonsum im Vergleich zur Kontrollgruppe. B, C: Veränderungen der intrinsischen Hirnaktivität im Hippocampus (B) und inferiorer Parietalkortex (C) 3 Monate nach SFA- (schwarz) bzw. MUFA-angereichertem (grau= Joghurtkonsum bzw. Kontrolldiät (weiß)). Nur die SFA-angereicherte Diät führt zu einer signifikant beeinträchtigte hippocampalen und kortikalen Aktivität (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.005$ ).  $n=8$  /Gruppe.

## Schlussfolgerung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zu viel Fett in der Nahrung immer zu Übergewicht führt. Allerdings wirken sich nur gesättigte Fettsäuren, wie sie in tierischen Fetten enthalten sind, negativ auf den Blutzucker, die Gehirnaktivität und die körperliche Bewegung aus, was dann zu einer weiteren Gewichtszunahme führt.

## Literatur

- [1] Smeets PA, de Graaf C, Stafleu A, van Osch MJ, van der Grond J. Functional MRI of human hypothalamic responses following glucose ingestion. *Neuroimage* 2005;24(2):363-8.
- [2] Smeets PA, de Graaf C, Stafleu A, van Osch MJ, van der Grond J. Functional magnetic resonance imaging of human hypothalamic responses to sweet taste and calories. *Am J Clin Nutr* 2005;82(5):1011-6.
- [3] Frank S, Linder K, Kullmann S, Heni M, Ketterer C, Cavusoglu M, Krzeminski A, Fritsche A, Haring HU, Preissl H, et al. Fat intake modulates cerebral blood flow in homeostatic and gustatory brain areas in humans. *Am J Clin Nutr* 2012.
- [4] Maljaars J, Peters HP, Masclee AM. Review article: The gastrointestinal tract: neuroendocrine regulation of satiety and food intake. *Aliment Pharmacol Ther* 2007;26 Suppl 2:241-50.
- [5] Welch IM, Bruce C, Hill SE, Read NW. Duodenal and ileal lipid suppresses postprandial blood glucose and insulin responses in man: possible implications for the dietary management of diabetes mellitus. *Clinical science* 1987;72(2):209-16.
- [6] Obici S, Rossetti L. Minireview: nutrient sensing and the regulation of insulin action and energy balance. *Endocrinology* 2003;144(12):5172-8.
- [7] Smeets PA, de Graaf C, Stafleu A, van Osch MJ, Nivelstein RA, van der Grond J. Effect of satiety on brain activation during chocolate tasting in men and women. *Am J Clin Nutr* 2006;83(6):1297-305.

## Summary Sub-Project 4

### Modulation of the effects of fat intake on brain functions

Fat and physical inactivity are the most evident factors in the pathogenesis of obesity, and fat quality seems to play a crucial role for measures of glucose homeostasis. However, the impact of dietary fat quality on brain function, behavior, and sleep is basically unknown. In this project, human and mice studies were combined to investigate acute and long term effects of fat intake on brain functions.

In humans, a functional magnetic resonance imaging study revealed differential homeostatic and gustatory effects dependent of intake of a high or low fat meal. The hypothalamus, representing the homeostatic control center of the brain, showed a pronounced decrease of cerebral blood flow (CBF) after the ingestion of the high fat yoghurt and the corresponding CBF change correlated positively with the insulin change. Furthermore, the activity of the insular cortex, the primary gustatory cortex, showed pronounced activation in the low fat condition. The CBF change of both regions correlated positively in the high fat condition.

For the investigation of long term effects, we investigated the effect of a 3-month fat intervention in humans and mice. The mice were fed a diet supplemented with either monounsaturated fatty acids (MUFAs) or saturated fatty acids (SFAs) and their impact on glucose homeostasis, locomotion, brain activity, and sleep behavior was evaluated. MUFAs and SFAs led to a significant increase in fat mass but only feeding of SFAs was accompanied by glucose intolerance in mice. Radiotelemetry revealed a significant decrease in cortical activity in SFA-mice whereas MUFAs even improved activity. SFAs decreased wakefulness and increased non-rapid eye movement sleep. An intracerebroventricular application of insulin promoted locomotor activity in MUFA-fed mice, whereas SFA-mice were resistant. In humans, SFA-enriched diet led to a decrease in hippocampal and cortical activity determined by functional magnetic resonance imaging techniques. Together, dietary intake of MUFAs promoted insulin action in the brain with its beneficial effects for cortical activity, locomotion, and sleep, whereas a comparable intake of SFAs acted as a negative modulator of brain activity in mice and humans.

The overall conclusion of this project is that fat has an important impact on brain functions, locomotion and sleep. Different types and amounts of fat highly influence neural functions in humans and animals showing the importance of an even more critical examination of nutrient ingredients.

## Teilprojekt 6 A (DFG)

# Identifizierung retronasal-olfaktorisch und orosenso- risch wirksamer Modulatoren des Fettgeschmacks von Nahrungsfetten

**Prof. Dr. Thomas Hofmann**

**Julia Stein**

**Silvija Abakuks**

Technische Universität München

Wissenschaftszentrum Weihenstephan

Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und Molekulare Sensorik

## Einführung

Lange Zeit wurde angenommen, dass das fettige und cremige Mundgefühl von Speiseölen allein durch die taktile, mechanosensorische Detektion der Fette im Mundraum vermittelt wird (RICHARDSON et al., 1993). Hingegen existieren heute Hinweise, dass nicht nur die typische Textur, sondern auch die chemosensorische Detektion von flüchtigen Geruchsstoffen und nicht-flüchtigen Fettinhaltsstoffen zur wahrgenommenen „Fettigkeit“ von Speiseölen beitragen (KIRKMEYER, TEPPER, 2003). Bislang ist allerdings völlig unklar, welche flüchtigen bzw. nichtflüchtigen Stimuli zur Induktion des typischen Fettgeschmacks maßgeblich beitragen (DREWNOWSKI et al., 1997; FUSHIKI et al., 2005). Um anhand humaner psychophysikalischer Experimente die an der Wahrnehmung des Fettgeschmacks beteiligten Komponenten zu identifizieren, ist es zunächst notwendig, durch ein entsprechendes experimentelles Design und die Verwendung eines deskriptiven Sensorikpanels die verschiedenen sensorischen Inputs (Geruch, Geschmack, Textur) der Fettwahrnehmung zu entkoppeln (KIRKMEYER, TEPPER, 2003).

Daher sollte im Forschungsprojekt zunächst ein Sensorik-Assay zur Detektion Fettgeschmack-stimulierender Verbindungen entwickelt und anschließend bei der aktivitätsorientierten Fraktionierung eines Speiseöls sowie zur sensorischen Evaluierung von Einzelverbindungen zum Einsatz kommen. Zudem sollten erste Erkenntnisse über die Aktivität der linguale Lipase des Menschen erarbeitet werden. Quantitative Studien sollen abschließend grundlegende Daten zur Zusammensetzung und Schichtdicke oraler Fettfilme nach Genuss von Speiseöl liefern.

## Ergebnisse und Diskussion

### Aktivitätsorientierte Fraktionierung von Olivenöl

Mit dem Ziel, diejenigen Inhaltsstoffe zu identifizieren, die neben den Triglyceriden den typischen fettigen Geschmack von Speiseölen induzieren bzw. modulieren, sollte Olivenöl aktivitätsorientiert fraktioniert werden. Hierzu war zunächst die Entwicklung eines geeigneten Sensorik-Assays notwendig.

Zu Beginn des Forschungsprojekts wurde daher ein Testsystem – basierend auf einer lipid-ähnlichen, aber triglycerid-freien Matrix (TFL-Matrix) – entwickelt, um die humanen Schwellenwerte und Geschmackseindrücke von Fraktionen und Testsubstanzen entkoppelt von textuellen Einflüssen bewerten zu können. Die TFL-Matrix setzt sich zusammen aus 5 % Weißöl (mouse embryo tested, Sigma, Deutschland), 5 % Gummi arabicum, 0,3 % Molkenproteinen (100 % Natural Whey Protein Isolate, Olimp) und 0,01 % EDTA. Die zu untersuchenden Stimuli wurden jeweils in der Matrix gelöst, dann zur Bestimmung von Schwellenwerten (für den Fettgeschmack) in 1:1-Verdünnungen in aufsteigender Konzentration im Duotest von 10 geschulten Sensorikpersonen unter Nutzung einer Nasenklammer bei 22°C verkostet. Zwischen der sensorischen Bewertung der einzelnen Verdünnungen wurde der Mundraum der Testpersonen mit wässriger 1 %iger Ethanollösung gespült. Die Schwellenwertbestimmung für jede Substanz wurde in viermaliger Wiederholung durchgeführt und daraus der Mittelwert bestimmt.

Zur Fraktionierung wurden zuerst aus einem kaltgepressten Olivenöl die Triglyceride durch Ausfrieren entfernt und der Rückstand dann mittels Kieselgel-säulenchromatographie in einzelne Fraktionen aufgetrennt. Hierfür wurde der vom Lösungsmittel befreite triglyceridfreie Rückstand auf eine wassergekühlte Kieselgelsäule (450 x 35 mm i.d, Kieselgel 60, Merck, Deutschland) aufgegeben. Zur Chromatographie wurde n-Pentan (750 ml; Fraktion A), n-Pentan/Diethylether (95:5, v/v; 750 mL; Fraktion B), n-Pentan/Diethylether (90:10, v/v; 750 mL; Fraktion C), n-Pentan/Diethylether (80:20, v/v; 750 mL; Fraktion D), n-Pentan/Diethylether (60:40, v/v; 750 mL; Fraktion E) und Diethylether (750 mL; Fraktion F) als Elutionsmittel verwendet. Die einzelnen Fraktionen wurden im Vakuum vom Lösungsmittel befreit und mittels HPLC/ELSD analysiert (**Abb. 1**). Als Fließmittel wurden 85% Acetonitril / 15 % *tert*-Butylmethylether (A) und 65 % Acetonitril / 35 % *tert*-Butylmethylether (B) verwendet.

Die erhaltenen Kieselgelfractionen wurden dann in triglycerid-freier Lipid (TFL)-Matrix gelöst und von einem trainierten Panel hinsichtlich ihres Geschmackseindrucks sensorisch bewertet. Wie in **Abb. 2** dargestellt, wurden alle getesteten Kieselgelfractionen von den Panelisten als fettig und cremig bewertet. Die ermittelten Schwellenwerte liegen im Bereich von 0,03 mg/L bis 0,43 mg/L.

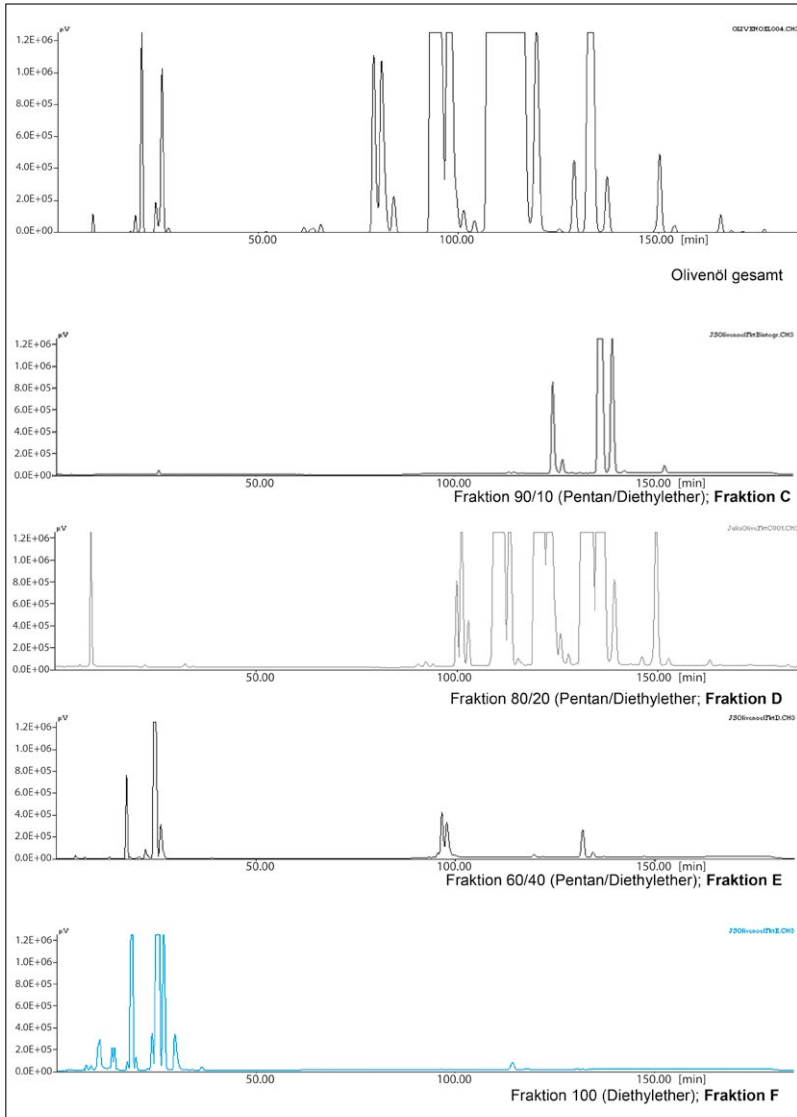


Abb. 1: HPLC-ELSD-Chromatogramme der Kieselgelfractionen des Olivenöls.

Die mit dem niedrigsten Schwellenwert bewertete Fraktion F wurden anschließend mittels semipräparativer HPLC getrennt und die jeweiligen Strukturen mittels NMR-Spektroskopie und HPLC-MS identifiziert (**Abb. 3**). Neben einer Reihe

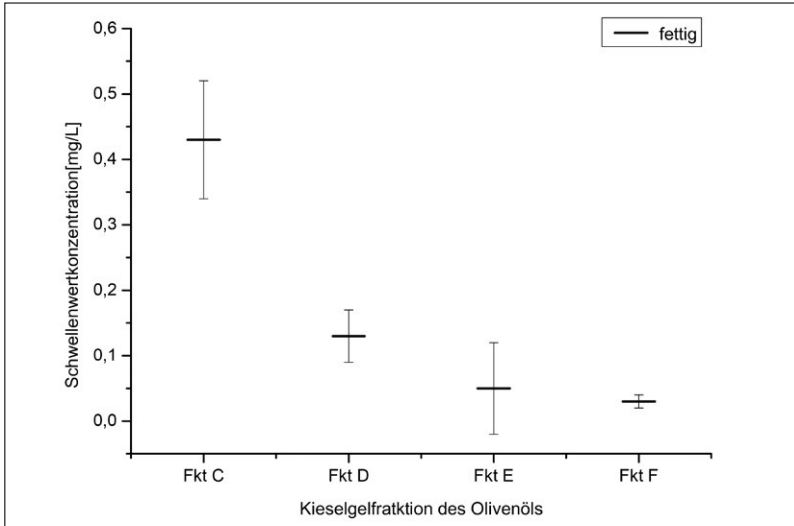


Abb. 2: Schwellenwertkonzentrationen der Kieselgelfractionen des Olivenöls.

von Diglyceriden wurde eine polare Fraktion X gewonnen (Elutionsfenster 4-8 min), die in sensorischen Experimenten einen besonders deutlichen Fettgeschmack induzierte. LC-MS-Studien führten zur Identifizierung der Verbindungen in Fraktion X als freie Fettsäuren mit der Ölsäure als Hauptfettsäure.

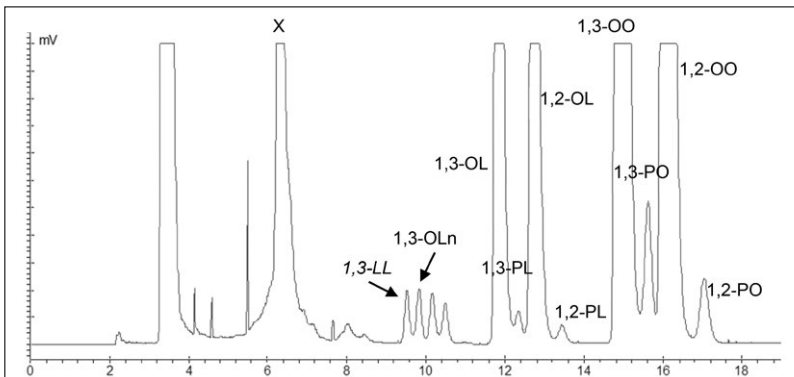


Abb. 3: HPLC-ELSD-Chromatogramm der Kieselgelfraktion F des Olivenöls.

- 1) 1,3-Dilinolein, 2) 1-Oleoyl-2-Linolenoyl Glycerol, 3) 1-Oleoyl-3-Linolenoyl Glycerol,
- 4) 1-Palmitoyl-3-Linoleoyl Glycerol, 5) 1-Oleoyl-2-Linoleoyl Glycerol, 6) 1-Palmitoyl-2-Linoleoyl Glycerol,
- 7) 1,3-Diolein, 8) 1-Palmitoyl-3-Oleoyl Glycerol, 9) 1,2-Diolein,
- 10) 1-Palmitoyl-2-Oleoyl Glycerol.



## Bestimmung von Schwellenwerten

Da die aktivitätsorientierte Fraktionierung in der polaren Fraktion des Olivenöls auf die freien Fettsäuren als Stimuli des Fettgeschmacks hindeutete, wurden im Folgenden gereinigte freie Fettsäuren (C10:0, C 12:0, C18:1, C18:2, C18:3, C20:4), aber auch Triglyceride (Trioleat und Trilinoleat) sowie Fettsäurealkohole (Oleoyl- und Linoleoylalkohol) in der TFL-Matrix gelöst, dann in 1:1-Verdünnungen in aufsteigender Konzentration im Duotest von 10 geschulten Sensorikpersonen unter Nutzung einer Nasenklammer bei 22°C verkostet. Zwischen der sensorischen Bewertung der einzelnen Verdünnungen wurde der Mundraum der Testpersonen mit wässriger 1%iger Ethanollösung gespült. Die Schwellenwertbestimmung für jede Substanz wurde in viermaliger Wiederholung durchgeführt und daraus der Mittelwert bestimmt. Die Experimente ergaben, dass ungesättigte Fettsäuren mit Schwellenwerten von 0,1 bis 0,4 mmol/L einen fettigen Geschmackseindruck hervorrufen und erst in höheren Konzentrationen als kratzig wahrgenommen werden (**Abb. 4**). Im Vergleich dazu wurden gesättigte Fettsäuren und Fettsäurealkohole lediglich als unangenehm kratzig beschrieben.

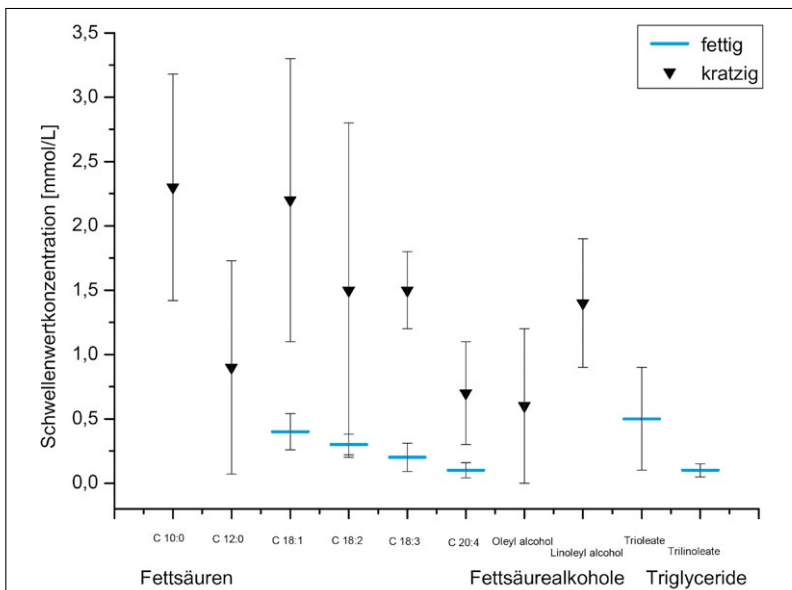


Abb. 4: Schwellenwerte von freien Fettsäuren, Fettalkoholen und Triglyceriden in der TFL-Matrix.

Um zu untersuchen, inwiefern die Wahrnehmung des fettigen Geschmacks der ungesättigten Fettsäuren an die Anwesenheit eines entsprechenden Mund-

gefühls gekoppelt ist, wurden Schwellenwerte ungesättigter Fettsäuren in der TFL-Matrix (Weißöl, Gummi Arabicum, Molkenprotein, EDTA) und vergleichsweise in einer Weißöl-freien Matrix (Gummi Arabicum, Molkenprotein, EDTA) sowie einer Weißöl- und Dickungsmittel-freien wässrigen Lösung (EDTA) bestimmt.

Die Daten zeigen, dass sich der Schwellenwert der fettigen Geschmacks-wahrnehmung der Fettsäuren bei Verkostung in der Weißöl-freien Matrix auf das Doppelte erhöhte, während die wässrige Weißöl- und Dickungsmittel-freien Lösung der Fettsäure mit einem Schwellenwert von 1,2 mmol/L nur als unangenehm kratzig wahrgenommen wurde (**Abb. 5**). Daraus lässt sich erstmals die Schlussfolgerung ziehen, dass die fettige Geschmacks-wahrnehmung der un-gesättigten Linolsäure eine lipid-ähnliche Texturempfindung voraussetzt. Diese Daten machen es wahrscheinlich, dass die orosensorische Fettwahrnehmung sowohl aus chemosensorischer Detektion der Fettsäuren als auch aus mechano-sensorischer Detektion einer lipid-ähnlichen Textur zusammengesetzt ist.

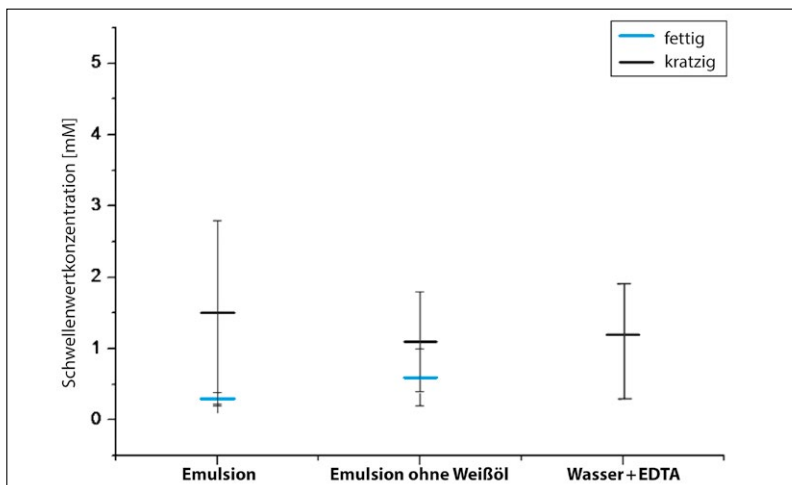


Abb. 5: Einfluss der Matrix auf die sensorische Qualität und den Schwellenwert von Linolsäure.

Des Weiteren konnte mittels Viskositätsmessungen ein Einfluss der Viskosität auf die Fettwahrnehmung ausgeschlossen werden. Hierfür wurden Viskositäts-messungen der TFL-Matrix mit zugesetzten Stimuli durchgeführt. Es wurde ein Aliquot der Linolsäure-, Linoleylalkohol- und Trilinoleatlösung abgenommen, welche in der TFL-Matrix gelöst waren und eine Konzentration zwischen 0,001 und 10 mmol/L besaßen. Zur Ermittlung der Viskosität der TFL-Emulsion mit der jeweiligen Testsubstanz wurde jede Konzentrationsstufe sechs Mal gemessen und daraus der Mittelwert gebildet (**Abb. 6**).

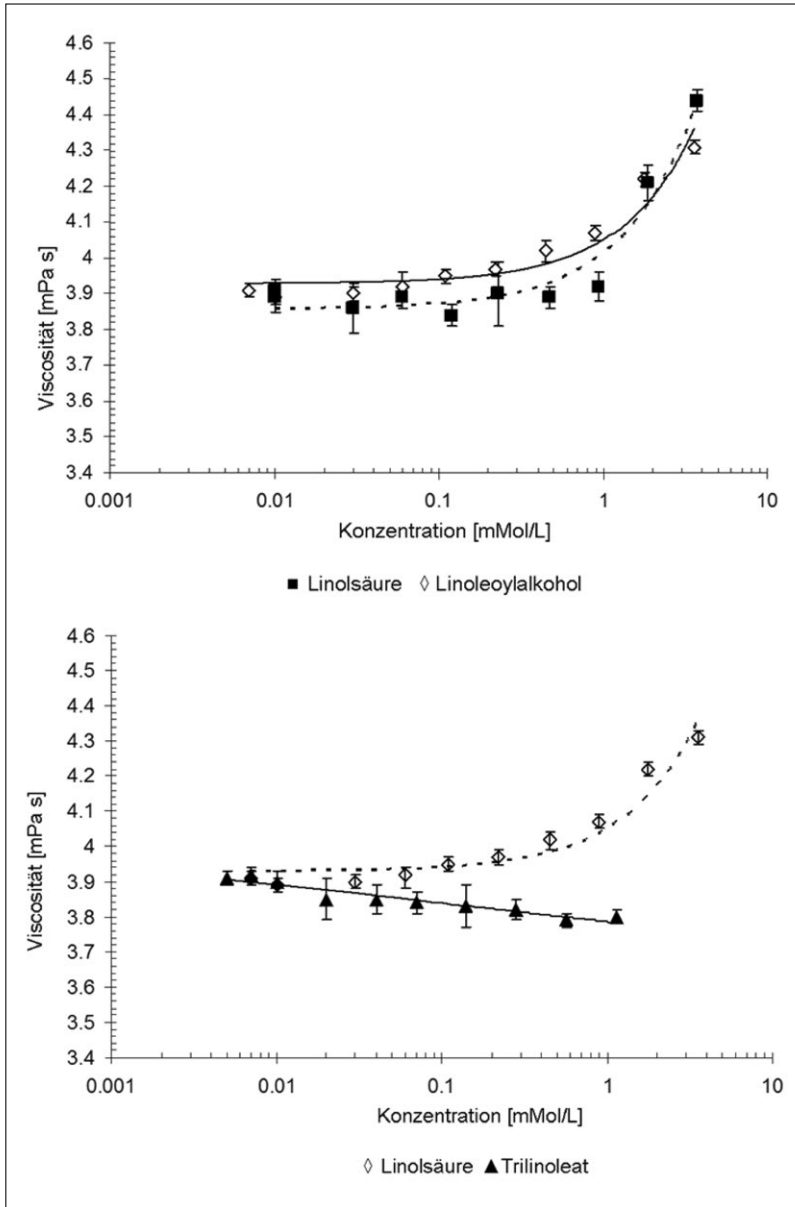


Abb. 6: Einfluss von Linolsäure, Linoleylalkohol und Trilinoleatlösung auf die Viskosität der TFL-Matrix.

Die ermittelten Werte zeigen, dass die Viskosität der TFL-Matrix mit zugesetzter Linolsäure im Vergleich zum Schwellenwert der fettigen Wahrnehmung erst ab einer 10-fach höheren Konzentration signifikant ansteigt. Im Gegensatz dazu zeigt die Viskosität der TFL-Matrix keine Änderung durch Zugabe des Trilinoleats. Im Hinblick auf den fettigen Geschmackseindruck weist Linoleylalkohol im Vergleich zu Linolsäure und Trilinoleat erstaunlicherweise nur einen kratzigen Geschmackseindruck auf und eine Änderung der Viskosität erst ab einer zugesetzten Konzentration von 0,1 mmol/L zur TFL-Matrix. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass der wahrgenommene fettige Geschmackseindruck nicht auf die Viskositätsänderung der Matrix und damit auf die Texturkomponente zurückgeht.

## Bestimmung der Lipaseaktivität

Mit Hilfe des Sensorik-Assays waren die Panelisten in der Lage, freie Fettsäuren, aber auch Triglyceride als Substanzen zu identifizieren, die einen fettigen Geschmackseindruck hervorrufen. Um die potentielle Funktion der lingualen Lipase für das Zustandekommen des triacylglycerid-induzierten Fettgeschmacks durch möglicherweise freigesetzte Fettsäuren zu studieren, wurde die Lipase-Aktivität in Humanspeichel bestimmt. Eine ausreichende Aktivität der lingualen Lipase bei Ratten ist in der Literatur bereits beschrieben (KAWAI et al.), darin wird von einem Beitrag der lingualen Lipase zur Wahrnehmung der Triglyceride ausgegangen.

Zur Bestimmung der Aktivität der oralen humanen Lipase wurde zunächst ein kommerziell verfügbarer Enzymtest (NEFA-HR(2), ACS-ACOD-Methode, bezogen über Wako Chemicals, Neuss, Deutschland) verwendet. Zur Durchführung der photometrischen Messung wurde humanem Poolspeichel eine definierte Menge des Triglycerids Triolein zugesetzt und bei 37°C für 1, 5 und 20 Min. inkubiert. Der Gehalt an enzymatisch freigesetzter Ölsäure aus dem Triglycerid wurde photometrisch bei 550 nm gemessen.

Als alternative Methoden wurden die enzymatisch freigesetzten Fettsäuren mittels GC-FID und HPLC-MS quantitativ bestimmt. Hierfür wurde einem Aliquot-Poolspeichel Triolein und der interne Standard Margarinsäure beziehungsweise <sup>13</sup>C-Palmitinsäure zugegeben und ebenfalls bei 37°C für 1, 5 und 20 Min. inkubiert. Ein Aliquot der so erhaltenen Probe wurde auf eine Aminopropyl-SPE Glas-kartusche aufgegeben (KALUZNY et al., 1985; COLLOMB et al., 2003), durch Elution mit Dichlormethan/Isopropanol (3/1) wurden die Triglyceride entfernt und die gewünschten freien Fettsäuren mit Diethylether/Essigsäure (49/1) eluiert. Die Fraktion, die die freien Fettsäuren enthält, wurde im N<sub>2</sub>-Strom vom Lösungsmittel befreit und ein Aliquot mittels GC-FID und HPLC-MS analysiert.

In **Abb. 7** ist zu erkennen, dass mit den verwendeten instrumentell-analytischen Methoden zwar ein minimaler Anstieg der Ölsäurekonzentration im Verlauf der Inkubationszeit von 1-20 Min messbar war, allerdings sind diese Daten aufgrund der Standardabweichung nicht signifikant.

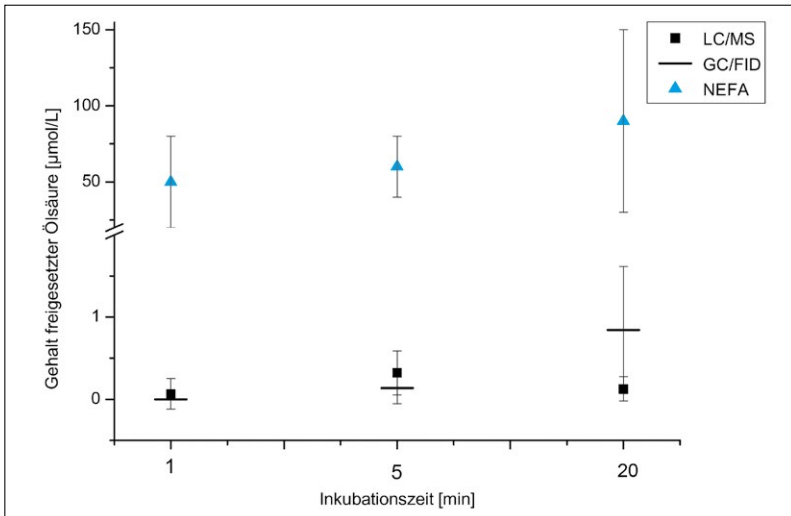


Abb. 7: Einfluss der Inkubationszeit auf die Freisetzung von Ölsäure aus Trioleat in Humanspeichel.

Um auszuschließen, dass die linguale Lipase nicht membrangebunden an den Von-Ebner-Speicheldrüsen vorliegt und somit über den Assay mit gepooltem Speichel nicht vollständig erfasst werden konnte, wurden in einem weiteren Versuchsaufbau mittels HPLC-MS die enzymatisch freigesetzten Fettsäuren nach In-mouth-Inkubation quantifiziert. Bei der In-mouth-Inkubation wurde den Panelisten eine Lösung mit zugesetztem Triglycerid gereicht, diese für 30/45/60/75/90 s im Mundraum verteilt und anschließend gesammelt und wie zuvor beschrieben aufgearbeitet (**Abb. 8**).

Die In-mouth-Messungen zeigten ebenfalls einen geringfügigen Anstieg der Ölsäurekonzentration über den Verlauf der Inkubationszeit. Jedoch zeigen sowohl Linolsäure, als auch Palmitinsäure den gleichen Konzentrationsverlauf im Speichel auf. Dieser Befund deutet darauf hin, dass möglicherweise bei der In-mouth-Inkubation Fettsäuren aus Speicheldrüsen in den Mundraum sezerniert werden, jedoch nicht im signifikanten Umfang die Fettsäure Ölsäure aus dem Trioleat lipolytisch freigesetzt wird. Die erhaltenen Daten lassen den Schluss zu, dass der Mensch entweder über keine oder nur äußerst geringfügig aktive linguale Lipase verfügt. Derzeit laufen Experimente zur Aktivität der linguale

Lipase aus Speichelproben der Von-Ebner-Drüsen foliater Geschmackspapillen um herauszufinden, ob evtl. im Umfeld von Geschmackspapillen lokale Konzentrationsgradienten an Lipase auftreten, die zur signifikanten Freisetzung von Fettsäuren aus Triglyceriden in der Lage sind.

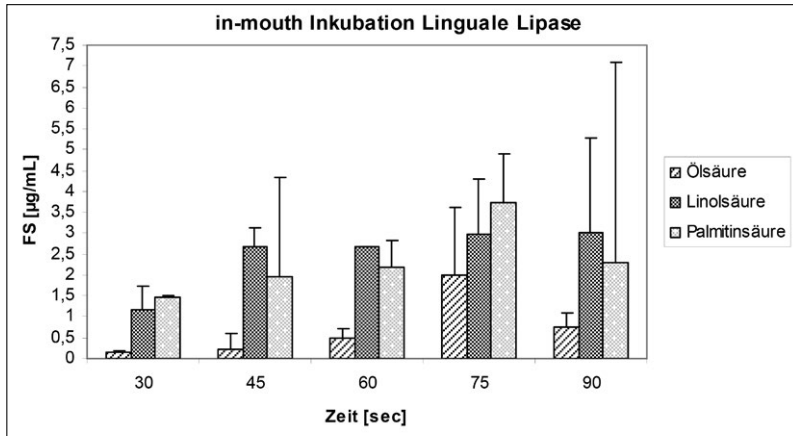


Abb. 8: In-mouth-Experiment zur Freisetzung von Ölsäure aus Trioleat im Vergleich zu den Konzentrationsänderungen von Palmitinsäure und Linolsäure.

## Studien zur Zusammensetzung des oralen Fettfilms nach Genuss von Olivenöl

Um erste Einblicke in die stoffliche Zusammensetzung und Struktur des nach Genuss fetthaltiger Lebensmittel im Mundraum verbleibenden Fettfilms zu erhalten, wurde im Folgenden damit begonnen, die lipophilen Verbindungen von der Mukosa abzulösen und mittels RP-HPLC-ELSD und LC-MS/MS zu analysieren. Hierzu nahmen die Panelisten 5 mL Olivenöl in den Mund und verteilten dieses 30 s im Mund. Nach dem Ausspucken des Olivenöls wurden 5 mL 5%-iges Ethanol für 30 s im Mund verteilt und anschließend im Zentrifugenglas aufgefangen. Die Extraktion des Fettfilms wurde insgesamt dreimal durchgeführt und separat aufgefangen. Für die Phasentrennung wurde nach der Zugabe von 5 mL Wasser (Millipore S.A.S., Molsheim, Frankreich) und 30 mL Methanol/Chloroform (1:2, v/v) 10 min bei 2000 rpm zentrifugiert (**Abb. 9**). Das Lösungsmittel der unteren Phase wurde unter dem Stickstoffstrom entfernt.

Um zu vergleichen, welche Substanzen aus dem Speichel stammen, wurde ebenfalls der Mundraum ohne vorherige Einnahme von Olivenöl mit 5 mL Ethanol gespült. Zur Kontrolle wurde 1 g Olivenöl direkt in das Zentrifugenglas gegeben und gleichermaßen weiterverfahen (**Abb. 9**)

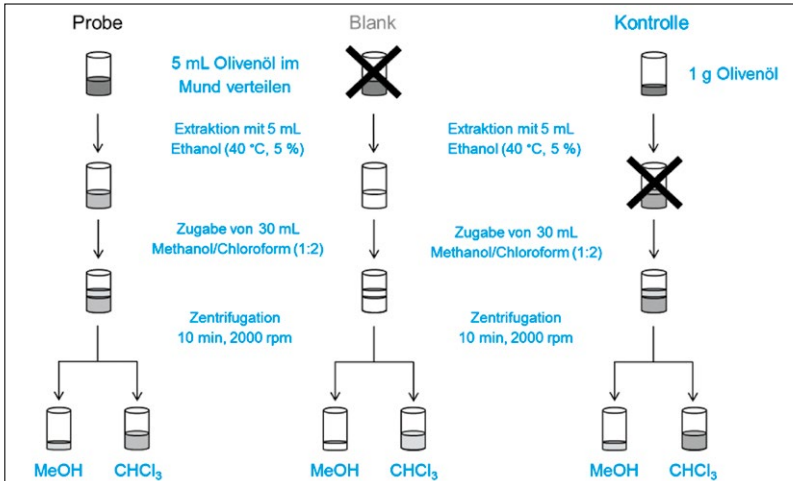


Abb. 9: Arbeitsschema für die Probenaufarbeitung oraler Fettfilme.

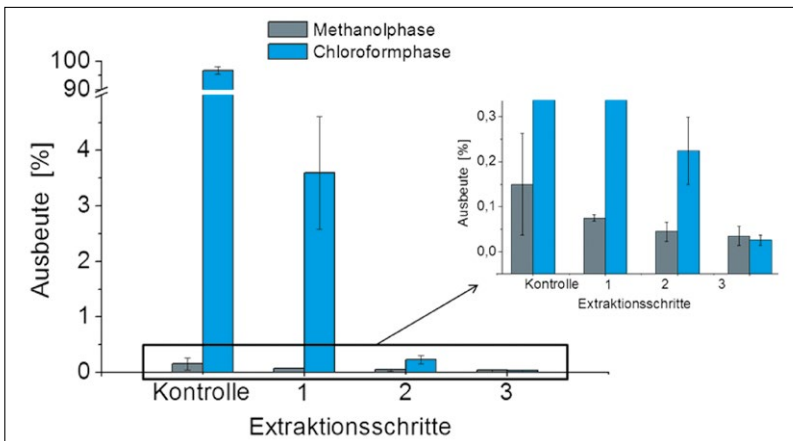


Abb. 10: Ausbeute der Gewinnung oraler Fettfilme nach Lösungsmittel-Extraktion.

Die Fettfilm-Ausbeute lag im ersten Spülschritt bei 3,59% ( $\pm 1,02$ ), beim zweiten Spülschritt bei 0,22% ( $\pm 0,07$ ) und beim dritten Spülschritt bei 0,03% ( $\pm 0,01$ ) (**Abb. 10**). Da nach dem ersten Extraktionsschritt eine deutliche Minderung der Ausbeute zu erkennen war und beim dritten Schritt fast nichts mehr extrahiert worden ist, ist davon auszugehen, dass der Fettfilm nahezu vollständig isoliert worden war. Durch Analyse der jeweiligen Methanol- und Chloroformphasen mittels HPLC-ELSD und UPLC-TOF-MS wurde sichergestellt, dass die Substanzen

beim Zentrifugieren in die Chloroformphase übergegangen und nicht in der Methanolphase vorzufinden waren.

Zur Aufklärung der Zusammensetzung des Fettfilms wurde eine Festphasenextraktion (SPE) durchgeführt, um den oralen Lipidfilm in drei Fraktionen zu unterteilen. Jeweils 0,5 g des extrahierten Lipidfilms und der Kontrolle wurden auf eine mit Methanol-konditionierte SPE- C18-E-Kartusche (Phenomenex Strata, 55  $\mu\text{m}$ , 70 A, 10 g/60 mL Giga tubes) aufgegeben und mit jeweils 60 mL Methanol (Fraktion 1; Ausbeute 0,5%), 80% Methanol/20% tert.-Butylmethylether (Fraktion 2; Ausbeute 2,3%) und tert.-Butylmethylether (Fraktion 3; Ausbeute: 95%) eluiert. Die einzelnen Fraktionen wurden am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit und anschließend zur Analyse mittels RP-HPLC eingesetzt (**Abb. 11**).

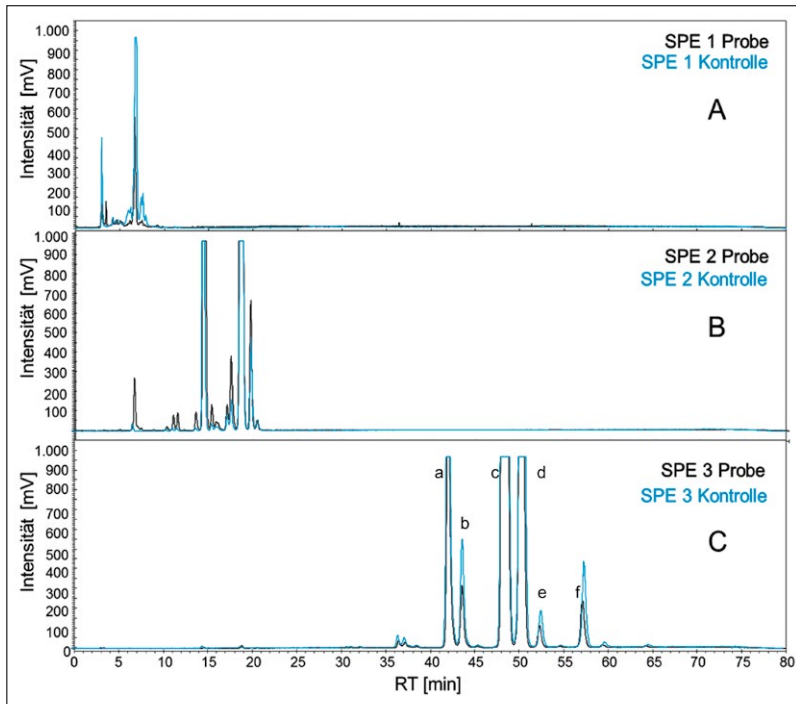


Abb. 11: RP-HPLC-Chromatogramme der SPE-Fractionen (ELSD schwarz, UV-Detektor (203 nm) blau).

Säule: Microsorb MV-100 5  $\mu\text{m}$ ; Fluss: 1 mL/min; Gradient: A (Isopropanol, HPLC Grade, JT Baker), B (Acetonitril, HPLC Grade, JT Baker); 0 min 20% A, 30 min 40% A, 60-70 min 50% A, 75-80 min 20% A; Dioleoyl-linoleoyl-glycerol (a), Palmitoyl-oleoyl-linoleoyl-glycerol (b), Triolein (c), Palmitoyl-dioleoyl-glycerol (d), Dipalmitoyl-oleoyl-glycerol (e) und Stearoyl-dioleoyl-glycerol (f).



Da die lipophile Fraktion 3 den größten Anteil am Fettfilm hat, wurde mit der Untersuchung dieser Fraktion begonnen.

Um die einzelnen Substanzen zu identifizieren, wurden die Peaks präparativ mittels RP-HPLC-ELSD fraktioniert und die Bestandteile durch Loop-Injektion an der LC-MS/MS gemessen. Zur Unterstützung der Ionisation wurde 10 mM Ammoniumacetat zugesetzt und anschließend mittels Elektrospray-Ionisation (ESI) im positiven Modus analysiert. Somit konnten die sechs mengenmäßig überwiegenden Triglyceride Dioleoyl-linoleoyl-glycerol (a), Palmitoyl-oleoyl-linoleoyl-glycerol (b), Triolein (c), Palmitoyl-dioleoyl-glycerol (d), Dipalmitoyl-oleoyl-glycerol (e) und Stearoyl-dioleoyl-glycerol (f) identifiziert werden (**Abb. 11**). In **Abb. 12** ist beispielhaft für die Identifizierung der Triglyceride das MS<sup>2</sup>-Spektrum von Dioleoyl-linoleoyl-glycerol mit m/z von 901,1 dargestellt.

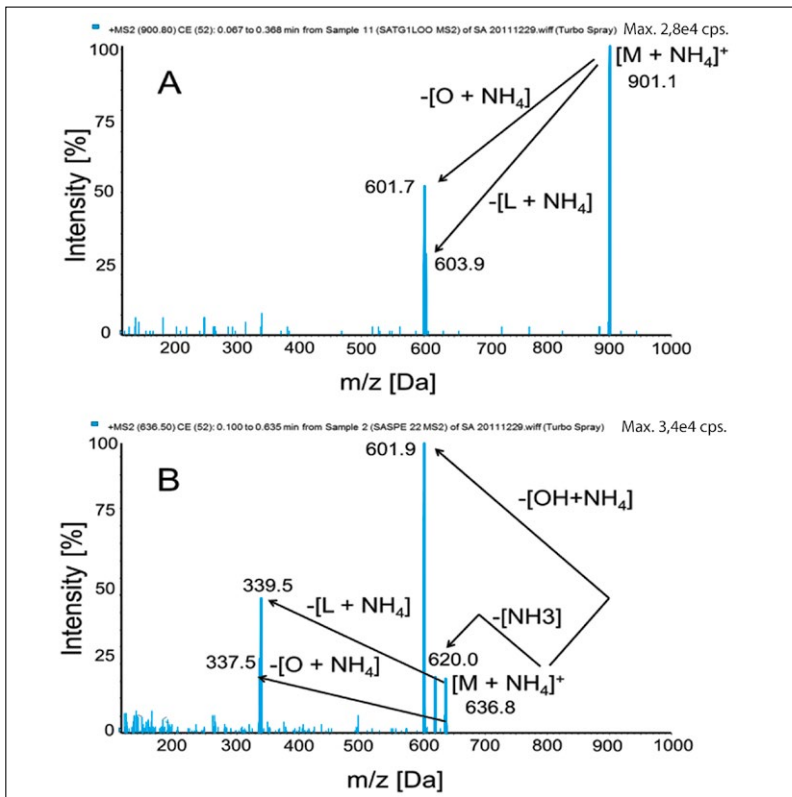


Abb. 12: MS/MS-Spektrum (ESI+) von Dioleoyl-linoleoyl-glycerol (A) und Oleoyl-linoleoyl-glycerol (B).

Für die Identifizierung der weiteren Komponenten wurde die Triglycerid-Fraktion mittels UPLC-TOF-MS mittels Elektrospray-Ionisation (ESI) im positiven Modus analysiert. Dadurch konnten noch weitere Triglyceride identifiziert werden. Das Chromatogramm ist in **Abb. 13** abgebildet und in **Tab. 1** sind die Ergebnisse zusammengefasst.

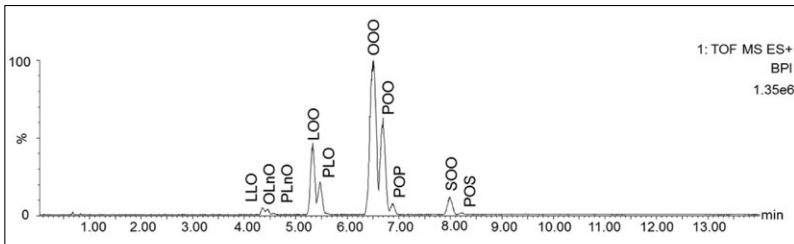


Abb. 13: UPLC-TOF-MS Chromatogramm der SPE3-Fraktion des oralen Lipidfilms.

Säule: BEH C18 1,7  $\mu\text{m}$  100 mm x 2,1 mm; Fluss: 0,4 mL/min;  
 Gradient: A (Acetonitril, LC-MS Grade, Honeywell; 0,1 % FA; 10 mM Ammoniumacetat), B (Isopropanol, LC-MS Grade, JT Baker; 0,1 % FA; 10 mM Ammoniumacetat);  
 0 min 80 % A, 10 min 70 % A, 11-12 min 40 % A  
 L = Linolsäure, Ln = Linolensäure; O = Ölsäure; P = Palmitinsäure; S = Stearinsäure.

Tab. 1: Pseudomolekül- und Fragmentionen identifizierter Triglyceride

| Rt [min] | Triglycerid | [M + NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] | Fragmente           |
|----------|-------------|-------------------------------------|---------------------|
| 4,35     | LOO         | 898,8                               | 599,5; 601,5        |
| 4,46     | OLnO        | 898,8                               | 599,5; 603,5        |
| 4,56     | PLnO        | 872,8                               | 573,5; 577,5; 599,5 |
| 5,33     | LOO         | 900,8                               | 601,5; 603,5        |
| 5,46     | PLO         | 874,8                               | 575,5; 577,5; 601,5 |
| 6,51     | OOO         | 902,8                               | 603,5               |
| 6,69     | POO         | 876,8                               | 577,5; 603,5        |
| 6,88     | POP         | 850,8                               | 551,5; 577,5        |
| 7,99     | SOO         | 904,8                               | 603,5; 605,5        |
| 8,22     | POS         | 878,8                               | 577,5; 579,5; 605,5 |

Zur Identifizierung der Komponenten der SPE-Fraktion 2 wurden die Substanzen ebenfalls präparativ durch RP-HPLC-ELSD fraktioniert. Für die Bestimmung der exakten Masse der jeweiligen Bestandteile wurden die Komponenten mittels UPLC-TOF-MS analysiert. Zudem wurden die Fragmentspektren der isolierten

Verbindungen mittels LC-MS/MS untersucht. Dadurch konnten die Diglyceride Palmitoleoyl-oleoyl-glycerol, Oleoyl-linoleoyl-glycerol, Palmitoyl-linoleoyl-glycerol, Diolein und Palmitoyl-oleoyl-glycerol identifiziert werden. **Abb. 12 B** zeigt beispielhaft das MS<sup>2</sup>-Spektrum von Oleoyl-linoleoyl-glycerol mit m/z von 636,8.

In der polaren Fraktion konnten freie Fettsäuren (Palmitinsäure, Ölsäure und Linolsäure) bestimmt werden, wobei Ölsäure mengenmäßig deutlich überwiegt. Des Weiteren wurden geringe Mengen an den Secoiridoid-Phenolen Oleuropein und Ligstroside sowie einige Phenolcarbonsäuren, Flavone und Lignane detektiert. Die geringen Mengen dieser Substanzen erlaubten bisher keine genaueren Strukturidentifizierungen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die oralen Fettfilme im Wesentlichen die Triglyceridverteilung des Speiseöls widerspiegeln und offenbar keinerlei Spezifität in der Ausbildung des Fettfilms vorliegt.

## Studien zur Bestimmung der Schichtdicke von oralen Fettfilmen

Zur Untersuchung der Bedeutung der fettigen Mundbelegung für die Fettwahrnehmung sollten im Folgenden die Schichtdicken oraler Fettfilme mittels In-mouth-Fluoreszenzmessungen analysiert werden.

Zur Bestimmung der Schichtdicke des oralen Fettfilms mittels Fluoreszenz-Spektrometer mit Faseroptiksonde (Agilent, Cary Eclipse) wurde zunächst Olivenöl mit 1 mM des fettlöslichen natürlichen Lebensmittelfarbstoffs Curcumin (Sigma, Deutschland) als Fluoreszenztracer dotiert.

Die Kalibrierung erfolgte mit speziell angefertigten Glasplatten (Glasbläserei Bahr, Manching). Diese Glasplatten sind an beiden Enden mit einer Schicht von 10 µm bzw. 20 µm bedruckt, so dass durch Auflegung einer weiteren Glasplatte die Schichtdicke des zuvor aufgegebenen Olivenöls genau bestimmt werden kann (**Abb. 14**). Dadurch konnte eine Kalibrierung der Fettfilmschichtdicke im Bereich von 0-40 µm erfolgen.

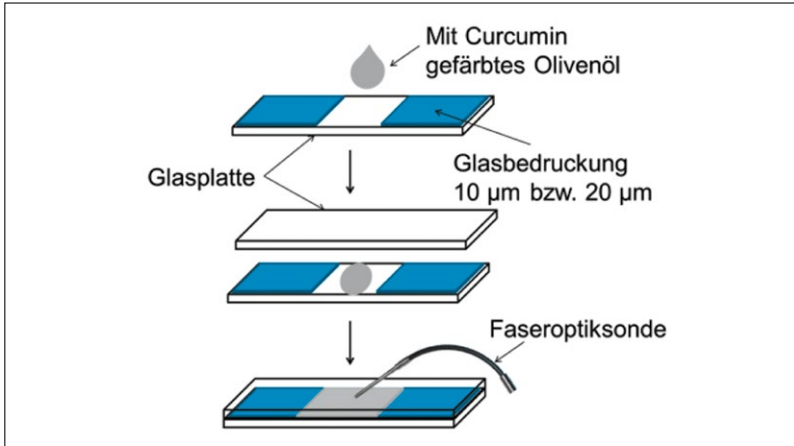


Abb. 14: Versuchsaufbau zur Erstellung der Kalibriergeraden für die Bestimmung der Schichtdicke oraler Fettfilme.

In **Abb. 15** ist die Kalibriergerade abgebildet. Darauf ist deutlich der Einfluss der Temperatur auf die Intensität erkennbar. Da die nachfolgenden Messungen auf der Zunge durchgeführt wurden, wurde die Kalibriergerade bei der Zungentemperatur von 35 °C aufgenommen.

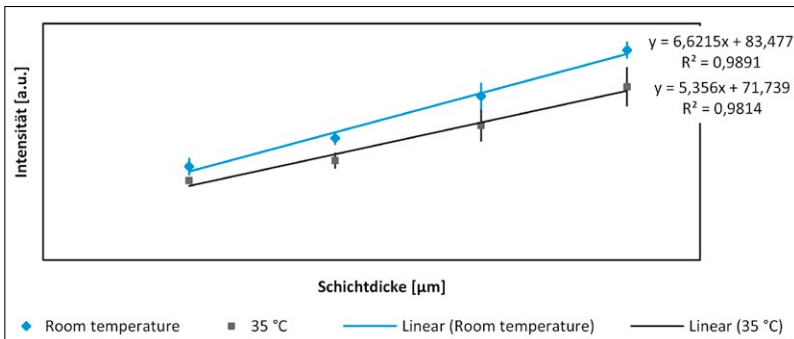


Abb. 15: Kalibriergerade für die Bestimmung der Schichtdicke. Messungen mittels Fluoreszenzspektrometer mit Faseroptiksonde. Anregungswellenlänge: 450 nm; Emissionswellenlänge: 516 nm; Durchschnittliche Messzeit: 0,5 s.

Für die Time/Intensity-Messungen zur Bestimmung des verbleibenden Fettfilms verteilen die Panelisten, nachdem sie zuvor den Mundraum mit 5 mL Wasser ausgespült hatten und einen Zungenblindwert gemessen hatten, 5 g des mit

Curcumin gefärbten Olivenöl für 30 s im Mund. Nach dem Ausspucken wurde durch eine fixierte Glasplatte die Messung im hinteren Bereich der Zunge jeweils nach 0 s, 1 min, 2 min und nach 5 min durchgeführt. Erste Messungen haben große interindividuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Panelisten offen gelegt (**Abb. 16**). Die Fettschichtdicke liegt direkt nach der Ölaufnahme in einem Bereich von 25-190  $\mu\text{m}$  und halbiert sich innerhalb einer Minute. Nach ca. fünf Minuten ist der Fettschicht auf  $< 20 \mu\text{m}$  abgesunken.

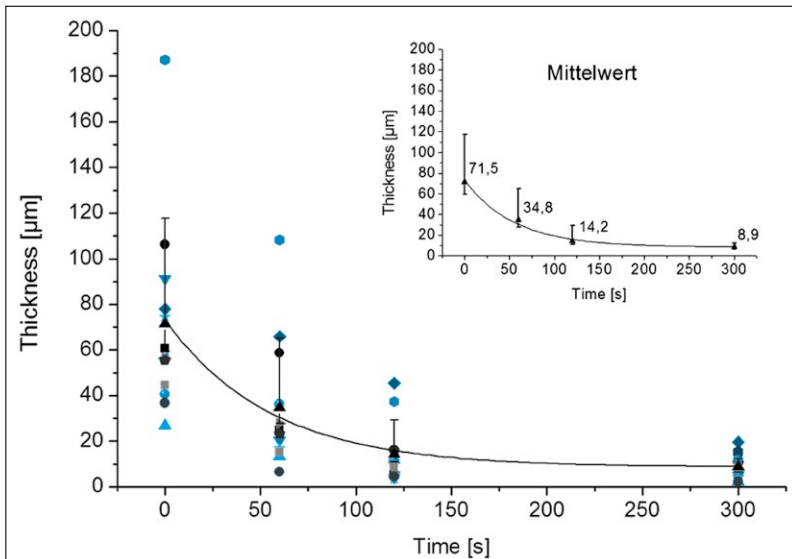


Abb. 16: Time/Intensity-Studien zur Schichtdicke des oralen Fettschicht bei verschiedenen Panelisten. Gleich markierte Punkte stellen Proben der gleichen Person dar.

## Zusammenfassung

Die aktivitätsorientierte Fraktionierung eines Olivenöls ergab, dass sowohl Triglyceride und Diglyceride als auch freie Fettsäuren einen fettigen Geschmackseindruck in einer fettsäurefreien Lipid-Matrix induzierten. Sensorische Studien an einzelnen Fettsäuren und Triglyceriden in Abhängigkeit der eingesetzten Matrix zeigten erstmals, dass diese Verbindungen offensichtlich chemosensorisch detektierbar sind. Für ungesättigte Fettsäuren ergaben sich Schwellenwerten von 0,1 bis 0,4 mmol/L für einen fettigen Geschmackseindruck, während eine kratzige Qualität der Fettsäuren erst bei höheren Konzentrationen wahrgenommen wurde. Im Vergleich dazu wurden gesättigte Fettsäuren und Fettsäurealkohole lediglich als unangenehm kratzig beschrieben. Zudem wurde erstmals gezeigt, dass die fettige Geschmackswahrnehmung der ungesättigten Fettsäuren

lipid-ähnliche Texturempfindungen voraussetzt. Diese Daten machen es wahrscheinlich, dass die orosensorische Fettwahrnehmung sowohl aus chemosensorischer Detektion der Fettsäuren als auch aus mechanosensorischer Detektion einer lipid-ähnlichen Textur zusammengesetzt ist.

Unter Anwendung drei verschiedener Bestimmungsmethoden zur Erfassung freier Fettsäuren konnten in Inkubaten von Speichelproben und Trioleat keinerlei signifikante Freisetzung der freien Fettsäuren gemessen werden. Im Gegensatz zu den Befunden bei Nagetieren deuten diese Ergebnisse die Abwesenheit oder nur eine vergleichsweise geringe Aktivität der linguale Lipase beim Menschen an. Auch In-mouth-Experimente ergaben keine Hinweise für eine signifikante Lipaseaktivität. Derzeit laufen Experimente zur Aktivität der lingualen Lipase aus Speichelproben der Von-Ebner-Drüsen foliater Geschmackspapillen um herauszufinden, ob evtl. im Umfeld von Geschmackspapillen lokale Konzentrationsgradienten an Lipase auftreten, die zur signifikanten Freisetzung von Fettsäuren aus Triglyceriden in der Lage sind.

Da bislang keine Kenntnisse über die chemische Zusammensetzung und die Struktur der nach Verzehr fetthaltiger Lebensmittel verbleibenden oralen Lipidfilme existieren, wurden orale Lipidfilme mit wässrig-ethanolischen Lösungen isoliert und mittels HPLC auf deren Zusammensetzung untersucht. Dabei zeigte sich, dass die oralen Fettfilme im Wesentlichen die Triglyceridverteilung des Speißeöls widerspiegeln und offenbar keinerlei Spezifität in der Ausbildung des Fettfilms vorliegt.

Mit dem Ziel, die Bedeutung der fettigen Mundbelegung für die Fett-Perzeption während des Verzehrs von Lebensmitteln zu studieren, wurde mittels In-mouth-Fluoreszenzmessung die Ausbildung oraler Lipidfilme auf der Zunge gemessen. Erste Messungen haben große interindividuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Panelisten offen gelegt. Die Fettfilmschichtdicke liegt direkt nach der Ölaufnahme in einem Bereich von 25-190  $\mu\text{m}$  und halbiert sich innerhalb einer Minute. Nach ca. fünf Minuten ist der Fettfilm auf  $< 20 \mu\text{m}$  abgesunken. Derzeit laufen Studien zur Korrelation der wahrgenommenen Fettgeschmacks und des Time/Intensity-Verlaufs der Entwicklung oraler Lipidfilme.

## Literatur

- [1] Collomb M, et al. (2003). Dosage des acides gras libres dans le fromage par chromatographie gaz-liquide: Précision de la méthode et différences saisonnières de la lipolyse dans divers fromages suisses *Mitt. Lebensm. Hyg;* 94, 212-229.
- [2] Drewnowski Adam (1997). Why do we like fat? *J. Am. Diet Assoc,* 97, S58-S62.
- [3] Fushiki Tohuru and Kawai Takayuki (2005). Chemical Reception of Fats in the Oral Cavity and the Mechanism of Addiction to Dietary Fat *Chem. Senses,* 30, i184-i185.
- [4] Kaluzny MA et al. (1985). Rapid separation of lipid classes in high yield and purity using bonded phase columns. *Journal of Lipid Research.* 28; 135-140.
- [5] Kawai T, Fushiki T. (2003). Importance of lipolysis in oral cavity for orosensory detection of fat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 285: R447-454.
- [6] Kirkmeyer Sarah V. and Tepper Beverly J. (2003). Understanding Creaminess Perception of Dairy Products Using Free-Choice Profiling and Genetic Responsivity to 6-n-Propylthiouracil. *Chem. Senses,* 28, 527-536.
- [7] Pivk Urska, Ulrich Natasa Poklar, Juillerat Marcel-Alexandre and Raspor Peter (2008). Assessing lipid coating of the human oral cavity after ingestion of fatty, *J. Agric. Food Chem.,* 56, 507-511.
- [8] Richardson N.J., Booth D.A., Stanley N.L. (1993). Effect of Homogenization and Fat Content on Oral Perception of Low and High Viskosity Model Creams *J. Sens. Stud.* 8: 133–143.
- [9] Spielman A.I., D'Abundo S., Field R.B. and Schmale H. (1993). Protein Analysis of Human von Ebner Saliva and a Method for its Collection from the Foliate Papillae. *J. Dent. Res.,* 72, 1331-1335.
- [10] Stewart JE et al. (2010). Oral sensitivity to fatty acids, food consumption and BMI in human subjects. *British Journal of Nutrition.*
- [11] Wood FW, Goff TC. (1973). The Determination of the Effective Shear Rate in the Brabender Viscograph and in other Systems of Complex Geometry. *Starch - Stärke.* 25: 89-91.

## Summary Sub-Project 6 A

### Identification of retronasal-olfactory und orosensory active modulators of fat taste of dietary oils

Activity-guided fractionation of extra virgin olive oil led to the identification of free fatty acids di- and triglycerides as ingredients, which are able to induce a fatty taste impression in a fatty acid-free, but lipid-like matrix (TFL-matrix). For the first time, it was possible to show that fatty acids and triglycerides can be detected by human subjects chemosensorially. In sensory tests the subjects described unsaturated fatty acids with a fatty taste impression and in higher concentrations as unpleasant raspy. The thresholds ranged between 0,1 bis 0,4 mmol/L for the fatty taste. In contrast, saturated fatty acids and the fatty acid alcohols were only described as raspy, whereas any fatty perception was lacking. Furthermore it was demonstrated for the first time, that a lipid-like texture is necessary in order to taste unsaturated fatty acids in a fatty way. These data support the idea that the perception of fat taste by human subjects is due to a convergence of receptor-mediated detection of free fatty acids and mechanosensory inputs.

Moreover, the activity of human lingual lipase was investigated using three different analytical approaches. Independent on the method used, we were not able to detect any significant release of free fatty acids from triglycerides when incubated with human saliva. Compared to the lipase activity published for rodents, our data indicate the absence or just a marginal activity of the human lingual lipase; this was confirmed even by human *in-mouth* incubation experiments. Current experiments are targeting the activity of the lingual lipase secreted from the "van Ebner glands" of the foliate papillae to investigate a potential local concentration gradient of the lipase in the area of the taste papillae, which might release fatty acids from triglycerides in close proximity to the fatty acid receptors.

As there was no information available on the chemical composition and the structure of the oral lipid film remaining after fatty food consumption, oral lipid films were isolated with an aqueous ethanolic solution and analyzed by HPLC. Thereby, it was obvious that the oral lipid films reflect the triglyceride pattern of the used edible oil and that there is, apparently, no specificity at all in the formation of the lipid films. In order to study the relevance of the lipid coating in fat perception while consuming fatty food, *in-mouth* fluorescence measurements were developed and applied on lipid films on the tongue; first data reveal large inter-individual differences between the panellists with a thickness between 25-190  $\mu\text{m}$  shortly after the oil intake. Already after one minute the thickness of the lipid film decreased by 50% and reached a value of  $< 20 \mu\text{m}$  after about five minutes. Currently, studies are conducted to correlate the perceived fat taste and the time-dependent thickness of the oral lipid coating in human subjects.



## Teilprojekt 6 B (DFG)

# Identifizierung retronasal-olfaktorisch und orosenso- risch wirksamer Modulatoren des Fettgeschmacks von Nahrungsfetten

**Prof. Dr. Dr. Peter Schieberle**

Technische Universität München

Department Chemie

Lehrstuhl für Lebensmittelchemie

## Einführung

1991 entdeckten die Wissenschaftler Linda Buck und Richard Axel olfaktorische Rezeptoren im menschlichen Riechsystem [1], für deren Erforschung sie im Jahr 2004 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet wurden. Diese Rezeptoren gehören zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und bilden vermutlich die größte Genfamilie im menschlichen Körper. Die speziellen Liganden, die an diese Rezeptoren binden, sind sogenannte Aromastoffe, von denen in der Natur bislang ca. 10.000 identifiziert worden sind.

Im Laufe der letzten Jahre fanden Wissenschaftler jedoch heraus, dass die Expression olfaktorischer Rezeptoren nicht nur auf unser Riechsystem beschränkt ist. Deren Expression in anderen Organen wird deshalb auch als „ektopisch“ (griech.: *ektos* = außen; *topos* = Ort) bezeichnet. Dieser Begriff beschreibt üblicherweise das Vorkommen eines Gewebes an einer für dieses Gewebe untypischen Stelle des Organismus. Beispiele für solche untypischen Gewebe sind u.a. die Leber, das Herz, die Lunge und die Hoden [2-4]. In einer Arbeit von BRAUN et al. [5] wurde mittels RT-PCR gezeigt, dass vier verschiedene olfaktorische Rezeptorgene in enterochromaffinen Zellen des Darms exprimiert werden. Außerdem veröffentlichten die Autoren, dass der Duftstoff Thymol eine konzentrationsabhängige Serotonin-Freisetzung in enterochromaffinen Zellen bewirkt. Phenol – eine strukturell sehr ähnliche Verbindung, aber kein typischer Aromastoff – zeigte keine Wirkung.

In der Literatur finden sich demnach einige wichtige Ansätze darüber, dass olfaktorische Rezeptoren nicht nur im Bereich der menschlichen Nase, sondern auch in anderen Geweben exprimiert werden. Es bestehen allerdings keine Erkenntnisse über deren Aufgaben und Wirkungen. Genauso wenig ist darüber bekannt, ob und wie lipide Verbindungen (z.B. Aromastoffe) aus der unverseifbaren Fraktion von Nahrungsfetten nach dem Verzehr in unseren Körper wirken. Bis dato gibt es zwar keinen wissenschaftlichen Beleg dafür, dass lipide Verbindungen

an der Sättigungsregulation beteiligt sein könnten. Jedoch führte die Entwicklung von fettreduzierten Lebensmitteln nicht dazu, dass das Übergewicht in der Bevölkerung gesenkt werden konnte. Der Verzehr dieser Light-Produkte führte im Tierversuch eher zu einer erhöhten Verzehrsmenge [6]. Möglicherweise könnten also lipide Verbindungen wie Aromastoffe, die bei Light-Produkten durch die Fettreduktion entfernt werden, mit olfaktorischen Rezeptoren in unserem Gastrointestinaltrakt reagieren und bestimmte Reaktionen auslösen, wie z.B. die Ausschüttung von Hormonen, wie Serotonin. Vielleicht wäre es somit möglich, fettreduzierte Lebensmittel durch lipide Zusatzstoffe so zu optimieren, dass sie einen ausreichend sättigenden Effekt zeigen, aber gleichzeitig weniger Energiegehalt aufweisen.

Ziel dieses Teilprojektes war es deshalb, die flüchtigen lipoiden Verbindungen der in der Humanstudie eingesetzten Fette bzw. Öle zu charakterisieren. Außerdem sollten Extrakte der flüchtigen Fraktion für die In-vitro-Studien der Arbeitsgruppe von Prof. Somoza hergestellt werden. In diesen Studien wurde u.a. die Wirkung der Extrakte auf die Glucose- bzw. Fettsäureaufnahme in die Zellen getestet (siehe Teilprojekt 3).

## Ergebnisse

Aufgrund der Ergebnisse der ersten Humanstudie im Rahmen von Teilprojekt 3 beschränken sich die im Folgenden aufgeführten Ergebnisse auf die Untersuchung von kaltgepresstem Olivenöl. Im Gegensatz zu den anderen Nahrungsfetten, die in dieser Studie eingesetzt wurden, zeigte das Olivenöl nach dem drei Monate andauernden täglichen Verzehr als einziges Additiv positive physiologische Effekte.

### Extraktion der flüchtigen Verbindungen aus Olivenöl

Für die Extraktion der flüchtigen Fraktion aus Olivenöl, die neben nicht aromatischen Verbindungen auch die für den typischen Geruch des Öls verantwortlichen Aromastoffe enthält, wurde die Methode der sogenannten Dünnschichtdestillation gewählt. Im Gegensatz zur SAFE (solvent assisted flavour evaporation), die sich im Bereich der Aroma-Analytik seit Jahrzehnten angewendet wird, hat die Dünnschichtdestillation den Vorteil, dass die Probe vorher nicht mit leicht siedenden, toxischen Lösungsmitteln, wie z.B. Diethylether, extrahiert werden muss, um die Aromastoffe zu isolieren. Dies war die Voraussetzung dafür, den Extrakt für die In-vitro-Studien des Teilprojektes 3 einsetzen zu können, da die Zellkulturen nur bei Einsatz sehr geringer Konzentrationen an bestimmten Lösungsmitteln intakt bleiben. **Abb. 1** zeigt eine Dünnschichtdestillationsanlage der Firma VTA (Deggendorf), wie sie an der Deutschen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie betrieben wird. Zum besseren Überblick sind in **Abb. 2** die schematischen

Querschnitte eines Dünnschichtdestillators von vorne (links) und von oben (rechts) dargestellt.

Das Funktionsprinzip des Gerätes ist relativ einfach. Dünnschicht-Destillatoren sind mit vertikal ausgerichteten zylindrischen Flächen für die Verdampfung ausgestattet. Das zu destillierende Öl wird durch eine Pumpe automatisch in die Destillationsapparatur gefördert und mit Hilfe eines Wischsystems gleichmäßig verteilt.

Dieses speziell entwickelte Wischsystem verteilt das zu destillierende Material gleichmäßig auf der Verdampferwand und bewirkt eine permanente Durchmischung. Das Rollenwischsystem besteht aus Teflonrollen, die durch die Zentrifugalkraft in den abwärts fließenden Film gedrückt werden. Das gleichmäßig verteilte Öl fließt als dünner Film abwärts, wobei – in Abhängigkeit von der Temperatur, der beheizten Fläche und des im Apparat vorherrschenden Drucks – die flüchtigen Komponenten aus dem Ölfilm heraus verdampft werden. Um die flüchtigen Verbindungen der Öle abzufangen, ist zwischen dem Dünnschicht-Destillator und der Hochvakuumpumpe eine Kühlfalle eingebaut, die mit flüssigem Stickstoff befüllt werden kann (**vgl. Abb. 1 rechts**). An diesem sogenannten Kühlfinger werden die flüchtigen Verbindungen ausgefroren. Nach der Destillation kann der Extrakt abgenommen und mittels Gaschromatographie-Olfaktometrie bzw. Gaschromatographie-Massenspektrometrie analysiert werden oder direkt für die In-vitro-Studien eingesetzt werden. Der Rückstand des Öles fließt an der äußeren Verdampferfläche nach unten und wird dort in einem Rundkolben gesammelt.

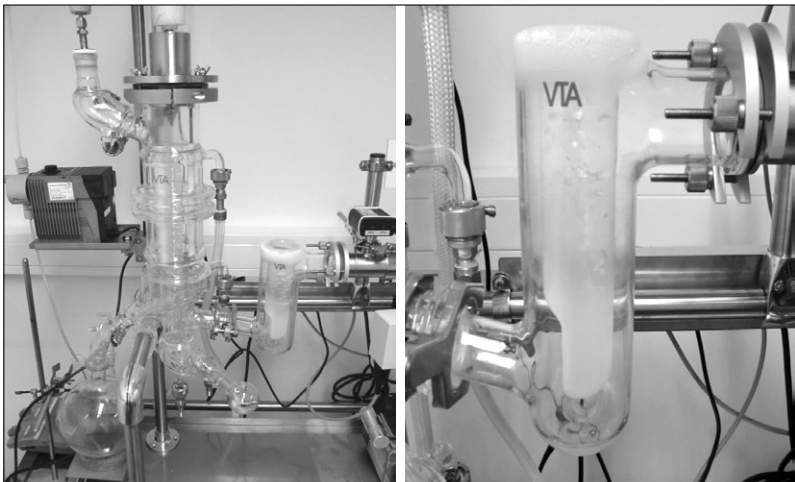


Abb. 1: Dünnschichtdestillationsanlage der Firma VTA in Deggendorf (links) sowie eine Detailabbildung der speziellen Kühlfalle der Anlage (rechts).

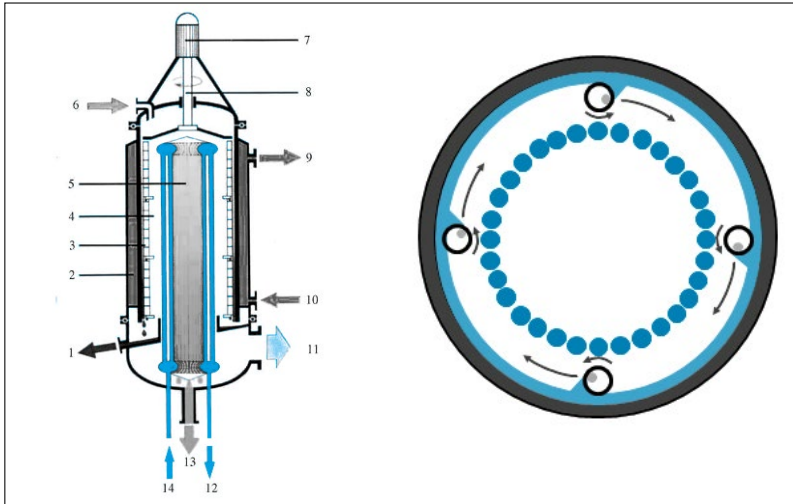


Abb. 2: Schematischer Querschnitt eines Dünnschichtdestillators von vorne (links) und von oben (rechts).

- 1 Rückstandstasse und kontinuierliche Ausföderung des Rückstands
- 2 Beheizbarer Mantel: Beheizung über Thermoöl (20 – 250 °C)
- 3 Teflonrollen zur Verteilung des herabfließenden Films
- 4 Vakuum (ca. 10<sup>-4</sup> mbar)
- 5 Innenkondensator
- 6 Kontinuierliche Einföderung des zu destillierenden Materials
- 7 Antrieb des Wischsystems
- 8 Antriebswelle und Vakuum-Durchföhrung (Gleitringdichtung)
- 9/10 Ein- und Ausfluss des heißen Thermoöls
- 11 Vakuumanschluss
- 12/14 Ein- und Ausfluss des Kfhlmediums
- 13 Kontinuierliche Ausföderung des Destillats

## Identifizierung und Quantifizierung wichtiger Aromastoffe in kalt gepressten Olivenölen

Die Identifizierung und Quantifizierung wichtiger Aromastoffe in dem kalt gepressten Olivenöl aus der Toskana erfolgte mit den Methoden der Molekularen Sensorik (vgl. **Abb. 3**). Dabei wird wie folgt vorgegangen: Zuerst werden die flüchtigen Verbindungen, darunter die Aromastoffe, mittels Dünnschichtdestillation aus dem Olivenöl extrahiert. Der erhaltene Extrakt wird anschließend einem Aromastoffscreening unterzogen, der sogenannten Aromaextraktverdünnungsanalyse. Dabei wird die flüchtige Fraktion durch eine Kapillarsäule gaschromatographisch aufgetrennt, wobei das Säuleneluat aufgetrennt wird. Ein Teil wird an einem Flammenionisationsdetektor detektiert, der andere Teil kann parallel dazu an einem sogenannten „sniffing-port“ abgerochen werden, wodurch geruchsak-

tive Bereiche von nicht geruchsaktiven differenziert werden können. Durch die sukzessive Verdünnung des Extraktes mit Lösungsmittel kann jedem Aromastoff ein FD-Faktor zugeordnet werden. Je höher der FD-Faktor, umso höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass der Aromastoff zum Gesamtaroma der Probe beiträgt.

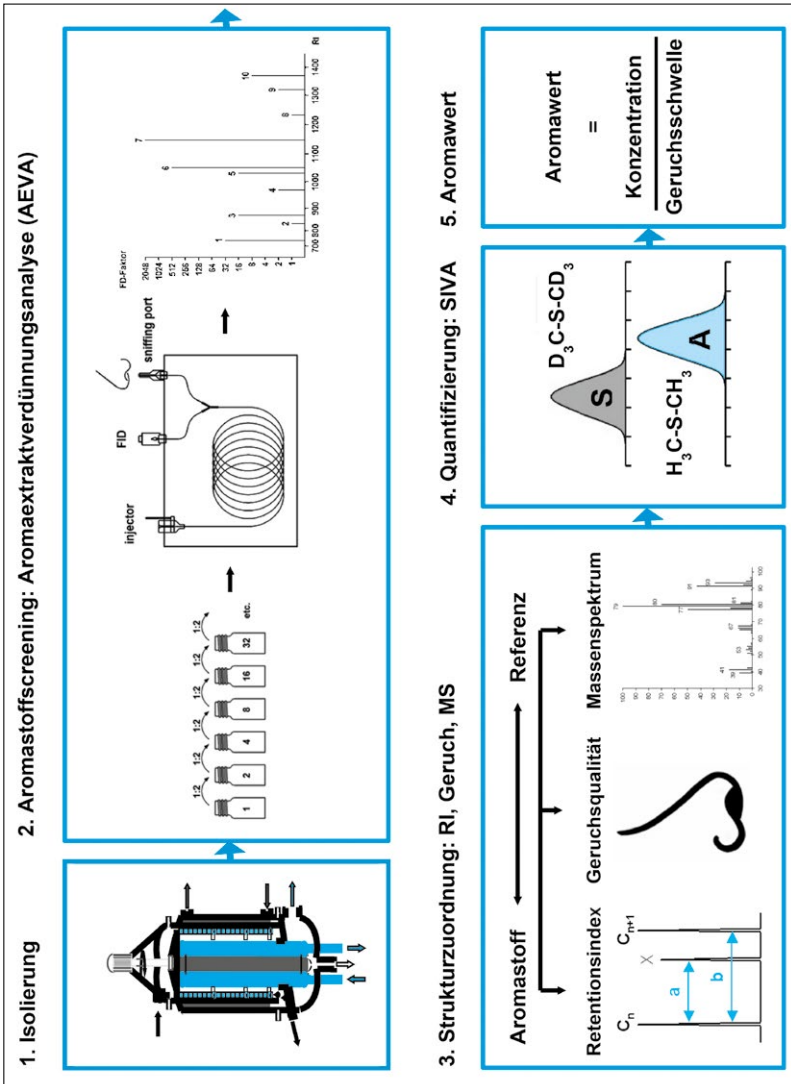


Abb. 3: Schematische Darstellung der Methoden der Molekularen Sensorik.

Die Identifizierung der Aromastoffe erfolgte durch Vergleich ihrer Retentionsindices (RI), Geruchsqualitäten und Massenspektren (MS-EI, MS-CI) mit Referenzsubstanzen auf zwei Kapillarsäulen unterschiedlicher Polarität. Nach Abschluss der Quantifizierung erfolgte die Quantifizierung ausgesuchter Verbindungen mittels Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA) [7]. Dabei werden dem Olivenöl vor der Destillation isotopenmarkierte Standards bekannter Konzentration zugesetzt, über die nach der Messung an einem Gaschromatograph, gekoppelt mit einem Massenspektrometer, die Konzentration des Aromastoffes berechnet werden kann. Auf Basis der quantitativen Daten kann für jede Verbindung ein sogenannter Aromawert berechnet werden, der definiert ist als Quotient der Konzentration in der Probe und deren spezifischer Geruchsschwelle in einer geeigneten Matrix, in diesem Fall raffiniertes Sonnenblumenöl. Man geht davon aus, dass ein Aromastoff zum Geruchseindruck des Lebensmittels beiträgt, wenn der Aromawert  $\geq 1$  ist.

In **Abb. 4** ist ein Gaschromatogramm abgebildet, wie man es bei der Analyse eines Extraktes der flüchtigen Fraktion von kalt gepresstem, italienischem Olivenöl erhält. Zur Veranschaulichung sind beispielhaft die aromaaktiven Bereiche von fünf Verbindungen angegeben. Bei diesen Substanzen handelt es sich um Hexanal, (E)-2-Hexenal, (Z)-3-Hexenylacetat, 1-Hexanol und (Z)-3-Hexenol (von links). Sie entstehen aus dem enzymatischen Abbau von Linol- bzw.  $\alpha$ -Linolensäure [9], dem sogenannten *Lipoxygenase Pathway*, und weisen Geruchsqualitäten wie *grün, nach Gras* (Hexanal, 1-Hexanol, (Z)-3-Hexenol), *nach grüner Banane* ((Z)-3-Hexenylacetat) und *nach grünem Apfel* ((E)-2-Hexenal) auf.

**Tab. 1** zeigt die wichtigsten Aromastoffe (FD  $\geq 16$ ) in kalt gepresstem Olivenöl aus der Toskana, das auch in der ersten Humanstudie neben Rapsöl, Milchfett und Schweineschmalz eingesetzt worden ist.

Insgesamt konnten mit den Methoden der Molekularen Sensorik 19 aromaaktive Verbindungen mit einem FD-Faktor  $\geq 16$  identifiziert werden. Mit den höchsten FD-Faktoren konnten Verbindungen aus dem *Lipoxygenase Pathway* charakterisiert werden ((E)-2-Hexenal, FD 2048; (Z)-3-Hexenal, FD 1024 und Hexanal, FD 512). Auch einen FD-Faktor von 512 wies das metallisch riechende trans-4,5-Epoxy-(E)-2-decenal auf, welches bei der Lipidperoxidation entsteht. Als weitere Lipidabbauprodukte konnten (E,E)-2,4-Decadienal, (E,E)-2,4-Nonadienal - beide mit einer fettigen Geruchsnote - und das an Pilze erinnernde 1-Octen-3-on mit einem FD-Faktor von 128 identifiziert werden. Außerdem zählen die Verbindungen 2-Phenylethanol, (E,Z)-2,4-Decadienal, 4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd (=Vanillin) und Octanal mit einem FD-Faktor von 64 zu den wichtigen Aromastoffen, die dem kalt gepresstem Olivenöl seinen charakteristischen Geruch verleihen.

Tab. 1: Wichtige Aromastoffe in kalt gepresstem Olivenöl aus Italien (Toskana)

| Nr. | Verbindung <sup>a)</sup>                  | Geruchsqualität <sup>b)</sup> | RI <sup>c)</sup> |      |                  |
|-----|---|-------------------------------|------------------|------|------------------|
|     |   |                               | FFAP             | DB-5 | FD <sup>d)</sup> |
| 1   | (E)-2-Hexenal                             | grüner Apfel                  | 1215             | 854  | 2048             |
| 2   | (Z)-3-Hexenal                             | grün, nach Gras               | 1140             | 804  | 1024             |
| 3   | <i>trans</i> -4,5-Epoxy-(E)-2-decenal     | metallisch                    | 1997             | 1382 | 512              |
| 4   | Hexanal                                   | grün, nach Gras               | 1078             | 800  | 512              |
| 5   | (E,E)-2,4-Decadienal                      | fettig, frittiert             | 1801             | 1317 | 128              |
| 6   | (E,E)-2,4-Nonadienal                      | fettig, grün                  | 1699             | 1216 | 128              |
| 7   | 1-Octen-3-on                              | pilzartig                     | 1293             | 979  | 128              |
| 8   | 2-Phenylethanol                           | blumig, honigartig            | 1905             | 1116 | 128              |
| 9   | (E,Z)-2,4-Decadienal                      | fettig, grün                  | 1750             | 1293 | 64               |
| 10  | 4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd (Vanillin) | vanilleartig, süß             | 2569             | 1406 | 64               |
| 11  | Octanal                                   | citrusartig                   | 1280             | 1003 | 64               |
| 12  | 2/3-Methylbutanal                         | malzartig                     | 933              | 652  | 32               |
| 13  | 2/3-Methylbuttersäure                     | schweißig, fruchtig           | 1660             | 872  | 32               |
| 14  | (E,Z)-2,6-Nonadienal                      | gurkenartig                   | 1575             | 1153 | 32               |
| 15  | Nonanal                                   | citrusartig, nach Seife       | 1389             | 1103 | 32               |
| 16  | (E)-2-Nonenal                             | fettig, grün                  | 1527             | 1160 | 32               |
| 17  | Phenyllessigsäure                         | honigartig, Bienenwachs       | 2553             | 1261 | 32               |
| 18  | (E)-2-Decenal                             | fettig                        | 1633             | 1261 | 16               |
| 19  | (E)-2-Octenal                             | fettig, nussig                | 1422             | 1059 | 16               |

a) Der Aromastoff wurde nach oben erwähnten Kriterien identifiziert.

b) Geruchsqualität, die während der GC/O am Sniffing-Port wahrgenommen wurde.

c) RI = Retentionsindex auf einer polaren (FFAP) und apolaren (DB-5) Säule

d) FD = Flavour Dilution Faktor

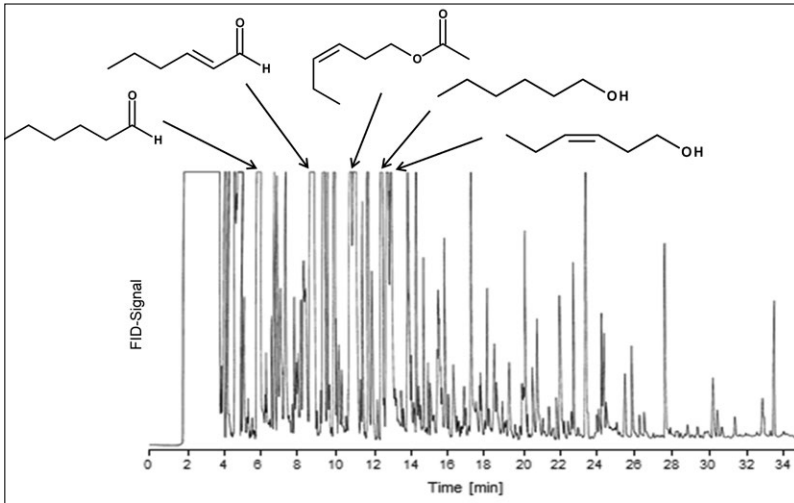


Abb. 4: Gaschromatogramm des unverdünnten Extraktes von kalt gepresstem Olivenöl aus Italien (Toscana).

Da der Magermilchjogurt, der 8% dieses kalt gepressten Olivenöles enthielt, sowohl die subjektive Sättigung der Studienteilnehmer der ersten Humanstudie verbesserte als auch die Plasmakonzentrationen des die Sättigung regulierenden Neurotransmitters Serotonin erhöhte, wurden die weiteren Untersuchungen auf kalt gepresste Olivenöle fokussiert.

Dazu wurden neben dem italienischen Olivenöl (I) vier weitere kalt gepresste Olivenöle ausgesucht, die sich geruchlich signifikant unterschieden. Dies wurde durch ein geschultes Sensorikpanel in Triangeltests bestätigt (Signifikanzniveau  $\alpha = 0,001$ , d.h. der sensorische Unterschied der Öle war hoch signifikant). Die zusätzlichen Olivenöle kamen aus Australien (A), Frankreich (F), Griechenland (G) und Spanien (S).

Um die Aromastoffe zu charakterisieren, die für den orthonasalen Unterschied der Olivenöle verantwortlich waren, wurde eine vergleichende Aromaextraktverdünnungsanalyse (vAEVA) durchgeführt. Sie dient der direkten Gegenüberstellung wichtiger Aromastoffe in mehreren Proben. In **Tab. 2** sind die wichtigsten Unterschiede in den FD-Faktoren aufgeführt, die mittels GC-Olfaktometrie ermittelt wurden.

Anschließend wurden die in **Tab. 2** aufgeführten Aromastoffe mittels Stabilisotopenverdünnungsanalyse quantifiziert. Dazu wurden die jeweiligen isotonenmarkierten Analoga der Aromastoffe ( $^2\text{H}$  oder  $^{13}\text{C}$ ) als interne Standards verwendet.



Tab. 2: Ergebnis der vAEVA von fünf kalt gepressten Olivenölen unterschiedlicher Herkunft

| Verbindung                      | Geruchsqualität        | FD-Faktor |     |     |      |     |
|---------------------------------|------------------------|-----------|-----|-----|------|-----|
|                                 |                        | A         | F   | G   | I    | S   |
| 2- und 3-Methylbutanal          | malzartig              | 4         | 32  | 32  | 32   | 64  |
| Ethyl-2-methylbutanoat          | fruchtig               | 2         | 4   | 4   | <1   | 64  |
| Ethyl-3-methylbutanoat          | fruchtig               | 4         | 8   | 4   | 2    | 64  |
| Hexanal                         | grün, nach Gras        | 512       | 256 | 256 | 512  | 32  |
| 4-Methoxy-2-methyl-2-butanthiol | schwarze Johannisbeere | <1        | <1  | <1  | <1   | 128 |
| (E)-2-Hexenal                   | grüner Apfel           | 64        | 64  | 64  | 2048 | 4   |
| (Z)-3-Hexenylacetat             | grüne Banane           | 2         | 64  | 128 | <1   | 128 |
| (Z)-3-Hexenol                   | grün, nach Gras        | 4         | 64  | 32  | 2    | 4   |
| 3-Methyl-2,4-nonandion          | strohartig             | 64        | <1  | <1  | <1   | <1  |
| 4-Methylphenol                  | fäkalisch              | <1        | <1  | <1  | <1   | 32  |

a) Der Aromastoff wurde nach oben erwähnten Kriterien identifiziert.

b) Geruchsqualität, die während der GC/O am Sniffing-Port wahrgenommen wurde.

c) RI = Retentionsindex auf einer polaren (FFAP) und apolaren (DB-5) Säule

d) FD = Flavour Dilution Faktor

In **Tab. 3** sind die quantitativen Ergebnisse zusammengefasst, die das Ergebnis der vergleichenden Aromaextraktverdünnungsanalyse bestätigen.

Tab. 3: Konzentration ausgewählter Aromastoffe in kalt gepressten Olivenölen unterschiedlicher Herkunft

| Verbindung                      | Gehalt [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ] <sup>a)</sup> |      |      |      |      |
|---------------------------------|--|------|------|------|------|
|                                 | A  | F    | G    | I    | S    |
| 2- und 3-Methylbutanal          | 15   | 43   | 43   | 39   | 56   |
| Ethyl-2-methylbutanoat          | 0,4  | 1,8  | 1,1  | 0,2  | 15   |
| Ethyl-3-methylbutanoat          | 0,1  | 0,3  | 0,9  | 0,2  | 3,1  |
| Hexanal                         | 1618   | 1341 | 1135 | 1003 | 564  |
| 4-Methoxy-2-methyl-2-butanthiol | n.d.   | n.d. | n.d. | n.d. | 0,17 |
| (E)-2-Hexenal                   | 3089   | 3726 | 4049 | 5448 | 146  |
| (Z)-3-Hexenylacetat             | 73   | 233  | 272  | 48   | 301  |
| (Z)-3-Hexenol                   | 508  | 1448 | 1080 | 220  | 730  |
| 3-Methyl-2,4-nonandion          | 16   | 0,7  | 0,9  | 0,2  | 3,6  |
| 4-Methylphenol                  | 14   | 11   | 17   | 4,6  | 67   |

a) Mittelwert aus 2-3 Bestimmungen; Standardabweichung < 12 %

Aufgrund der Ergebnisse lässt sich ableiten, dass wahrscheinlich die quantitativen Unterschiede einiger Aromastoffe unterschiedlicher Geruchsqualität für die Unterschiede im Gesamtaroma der Olivenöle verantwortlich sind. Vor allem das spanische Olivenöl zeigte signifikante Unterschiede in den Konzentrationen von Hexanal und (E)-2-Hexenal, was auch sensorisch deutlich wahrgenommen werden konnte. Aufgrund der quantitativen Unterschiede in den verschiedenen Verbindungen der Öle wurden die Extrakte der Olivenöle unterschiedlicher Herkunft teilweise in die In-vitro-Studien des Teilprojektes 3 mit eingebunden, um zu sehen, ob sich daraus auch unterschiedliche Wirkungen hinsichtlich der Glucose- und Fettsäureaufnahme im Zellsystem ergeben.

## Literatur

- [1] Buck, L.; Axel, R. A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition. *Cell* 1991, *65*, 175-187.
- [2] Vanderhaeghen, P.; Schurmans, S.; Vassart, G.; Pramentier, M. Molecular Cloning and Chromosomal Mapping of Olfactory Receptor Genes Expressed in the Male Germ Line: Evidence for Their Wide Distribution in the Human Genome. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1997, *237*, 283-287.
- [3] Feldmesser, E.; Olender, T.; Khen, M.; Yanai, I.; Ophir, R.; Lancet, D. Widespread ectopic expression of olfactory receptor genes. *Genomics* 2006, *7*, 121-138.
- [4] De La Cruz, O.; Blekhman, R.; Zhang, X.; Nicolae, D.; Firestein, S.; Gilad, Y. A Signature of Evolutionary Constraint on a Subset of Ectopically Expressed Olfactory Receptor Genes. *Mol. Biol. Evol.* 2009, *26* (3), 491-494.
- [5] Braun, T.; Volland, P.; Kunz, L.; Prinz, C.; Gratzl, M. Enterochromaffin Cells of the Human Gut: Sensors for Spices and Odorants. *Gastroenterology* 2007, *132*, 1890-1901.
- [6] Pierce, D. W.; Heth, C. D.; Owczarczyk, J. C.; Russel, J. C.; Proctor, S. D. Overeating by young obesity-prone and lean rats caused by tastes associated with low energy foods. *Obesity* 2007, *15*, 1969-1979.
- [8] Schieberle P (1995) in: Characterization of food: emerging methods (Goankar A, ed) Elsevier, pp 403-431.
- [9] Olías, J. M.; Pérez, A. G.; Ríos, J. J.; Sanz, L. C. Aroma of Virgin Olive Oil: Biogenesis of the "Green" Odor Notes. *J. Agric. Food Chem.* 1993, *41*, 2368-2373.

---

Im Rahmen des DFG/AIF-Clusters „Fettwahrnehmung und Sättigungsregulation: Ansatz zur Entwicklung fettreduzierter Lebensmittel“ wurde das Teilprojekt 6B über die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) gefördert.

## Summary Sub-Project 6 B

### Identification of retronasal-olfactory und orosensory active modulators of fat taste of dietary oils

In the framework of the collective research program, we wanted to investigate whether lipoid compounds of the unsaponifiable matter of food lipids could have a postprandial satiable effect. Fat-reduced food lacking these compounds, however, showed an increased amount of consumption in animal experiment.

Because the results of several publications show the evidence, that olfactory receptor expression was also found in the human gastrointestinal tract, the idea was, that aroma compounds, which are present in the unsaponifiable matter, could be involved in the regulations of satiety, for instance by the release of hormones like serotonin. Possibly, fat-reduced food could be optimized by lipoid additives, which indicate a satiable effect, but have less energy density.

In the first human intervention study, the most positive physiological effects were observed for olive oil, so the results of this plant oil are pointed out here.

For the extraction of the volatiles we needed a solvent-free method, because the volatile fraction had to be applied in *in-vitro* studies. Therefore, we adopted the so-called thinfilm-distillation without using any solvent. For the characterisation of the volatile fraction of the olive oil, the methods of the molecular sensory science concept were applied. The results of AEDA (aroma extract dilution analysis) revealed 19 odour-active compounds with FD  $\geq$  16, among them C<sub>6</sub>-aldehydes like (E)-2-hexenal, (Z)-3-hexenal and hexanal which are enzymatically generated from linoleic- and  $\alpha$ -linolenic acid (= *lipoxygenase pathway*). They were analysed as the main contributors to the grassy, green apple smelling note of cold pressed olive oil based on high FD-factors (2048, 1024 and 512, respectively). Because of the positive effects of olive oil in the first human intervention study, we concentrated on this plant oil. The comparison of five cold pressed olive oils with significant difference in its overall aroma showed clear variances in its volatile composition, which are not only qualitative, but quantitative. For example, the concentrations of hexanal and (E)-2-hexenal were much lower in the selected olive oil from Spain than in the virgin olive oils from other countries. The quantitative data of the different olive oils provide a basis for a bioactivity-guided screening in cell systems with regard to glucose- and fatty acid uptake.



## Teilprojekt 7 (DFG)

# Molekulare Mechanismen der Fettgeschmackswahrnehmung

**Prof. Dr. Wolfgang Meyerhof**

**Dr. Maik Behrens**

**Dr. Maria-Mercedes Galindo**

**Nadine Voigt**

Deutsches Institut für Ernährungsforschung (DIfE), Nuthetal  
Abteilung Molekulare Genetik

## Motivation

Zusammen mit den Kohlenhydraten und Proteinen sind Nahrungsfette die Hauptenergieträger in der heutzutage üblichen Ernährung der Bevölkerung von Industrienationen. Die übermäßige Aufnahme kalorienreicher Nahrungsmittelkomponenten stellt einen wesentlichen Risikofaktor für die explosionsartig anwachsende Zahl fettleibiger Menschen in diesen Ländern dar. Während die stetige Entwicklung von Zuckeraustauschstoffen bereits vielfältige Möglichkeiten bereitstellt, wohlschmeckende, kalorienreduzierte Nahrungsmittel zu produzieren, ist die Reduzierung des Fettanteils bislang nur in Einzelfällen erfolgreich gewesen, da Konsumenten den Geschmackseindruck derartiger Lebensmittel häufig nicht als überzeugend bewerten.

Es ist daher wichtig, sowohl die Bestandteile von Nahrungsfetten, welche den eigentlichen Fettgeschmack auslösen, zu bestimmen, als auch die dazu gehörenden Rezeptormoleküle zu identifizieren. Da Nahrungsfette aus vielen verschiedenen Komponenten bestehen, galt es, in Zusammenarbeit mit den anderen Partnern des Clusters den multifaktoriellen Geschmackseindruck von Nahrungsfetten zu analysieren und Strategien zu entwickeln, um auf allen Wahrnehmungsebenen grundlagen- sowie anwendungsorientierte Fortschritte zu erzielen.

Die sensorischen Organe des Geschmacks sind die Geschmacksknospen in den verschiedenartigen Geschmackspapillen, die sich hauptsächlich auf unserer Zungenoberfläche befinden (**Abb. 1**). Für jede unserer Grundgeschmacksqualitäten (u.a. süß, bitter, sauer) befindet sich in den Geschmacksknospen eine eigene Gruppe von Geschmackszellen mit spezialisierten Geschmacksrezeptoren [1]. Über diese Rezeptoren werden geschmacksspezifische Signale in den Zellen hervorgerufen, die über Nervenbahnen in entsprechende geschmacksverarbeitende Hirnareale weitergeleitet werden.

Während lange Zeit angenommen wurde, dass die Wahrnehmung von Nahrungsfetten im Wesentlichen durch Textur, Geruch sowie postprandiale Erkennung der Fettkomponenten zustande kommt und weniger durch die Stimulation des Geschmackssinns, zeichnen neuere Daten aus Nagetier- und Humanstudien ein anderes Bild. In den erwähnten Nagetierstudien gelang es nicht nur zu ermitteln, dass freie langkettige Fettsäuren der bevorzugte Stimulus für die gustatorische Erkennung von Fettkomponenten sind, sondern es wurden bereits mehrere Kandidaten für daran beteiligte Rezeptoren ermittelt [2, 3, 4]. Für drei dieser Kandidaten existieren bereits Daten über das Verhalten von Mausmodellen bei denen die Rezeptorkandidaten genetisch ablatiert wurden (Knock-out Modelle). Vergleichbare Analysen beim Menschen existieren derzeit jedoch nicht.

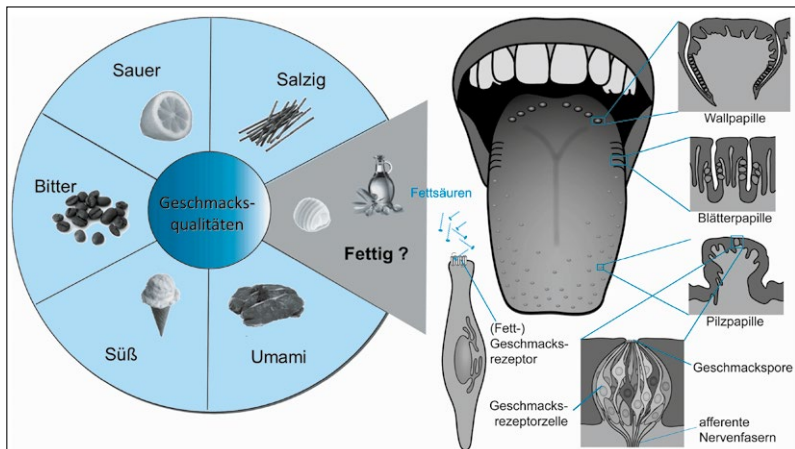


Abb. 1: Geschmacksqualitäten und die sensorischen Organe des Geschmackssinns. Linke Bildhälfte nach [5], verändert; rechte Bildhälfte mit freundlicher Genehmigung von J. Töle.

## Vergleichende Analyse der pharmakologischen Eigenschaften von fettsäuresensitiven Rezeptoren mit der (Fett-) Geschmackswahrnehmung

Untersuchungen an Nagetieren und die in der Arbeitsgruppe Hofmann (TUM, Teilprojekt 6 A) durchgeführten sensorischen Studien an menschlichen Probanden zeigten, dass langkettige, freie Fettsäuren als eigentlicher Stimulus für die Fettwahrnehmung verantwortlich sind. Beim Menschen ist ihre Wahrnehmung als „fettig“ jedoch an die gleichzeitige Anwesenheit einer fettähnlichen Matrix gekoppelt. Von den in der Literatur beschriebenen fettsäuresensitiven G-Protein-gekoppelten Rezeptoren sind zwei, der GPR40 und der GPR120, sehr selektiv

für langkettige Fettsäuren [6,7] und erfüllen daher notwendige Kriterien für potentielle Fettsensoren.

Wir haben in In-vitro-Expressionsstudien die in Frage kommenden Rezeptoren pharmakologisch charakterisiert und mit den sensorischen Untersuchungen korreliert. Hierfür wurden die für langkettige Fettsäuren spezifischen Rezeptoren GPR40 und GPR120 in Säugerzellen exprimiert und mit einer Auswahl an Fettsäuren stimuliert. Ebenso wie in den sensorischen Analysen der Arbeitsgruppe Hofmann wurde eine Batterie von Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlängen eingesetzt. Nur Rezeptoren, deren Erkennungseigenschaften eng mit den tatsächlichen Wahrnehmungscharakteristika menschlicher Probanden korreliert sind, können als Kandidaten für Fettrezeptoren aufrechterhalten werden.

Da kurzkettige Fettsäuren keinen „fettigen“, sondern nur einen „kratzigen“ Eindruck bei Probanden hervorriefen (vgl. Teilprojekt 6A), kommen Rezeptoren mit ausgeprägten Spezifitäten für kurzkettige Fettsäuren, wie etwa GPR41 und GPR43, für die Fettwahrnehmung nicht in Frage. Anders liegt der Fall bei den Rezeptoren GPR40 und GPR120, die Fettsäuren ab einer mittleren Kettenlänge, aber insbesondere langkettige Fettsäuren, erkennen. Diese Erkennungsspektren überlappen in der Tat bemerkenswert mit den von Menschen wahrgenommenen Fettstimuli. Um die In-vitro-Aktivierung der Rezeptoren in noch größerem Detail zu studieren, wurden vollständige Dosis-Wirkungsbeziehungen für Fettsäuren mit Kettenlängen zwischen C10 und C20 und den Rezeptoren GPR40 und GPR120 aufgezeichnet (**Abb. 2 A und B**). Insbesondere die gute Aktivierung des GPR40 mit Dekansäure (C10), welche in der menschlichen Sensorik nicht das Attribut „fettig“ erhielt, macht diesen Rezeptor zu einem weniger geeigneten Kandidaten als GPR120, welcher durch Dekansäure deutlich schwächer aktiviert wird. Da alle getesteten Fettsäuren in hohen Konzentrationen das Attribut „kratzig“ erhielten und nur die niedrigen Konzentrationen langkettiger Fettsäuren mit „fettig“ beschrieben wurden, erhob sich die Frage, ob die untersuchten Rezeptoren gar mit der Wahrnehmung „kratzig“ und nicht „fettig“ assoziiert sein könnten. Dies konnte durch die Untersuchung der Aktivierbarkeit von GPR40 und GPR120 durch Fettalkohole, die sich beispielsweise von Linolsäure ableiten, zweifelsfrei geklärt werden (**Abb. 2 C**). Während beide Rezeptoren auf die Fettsäure reagierten, blieb eine zelluläre Antwort nach Stimulation mit dem entsprechenden Fettalkohol aus. Somit ist die Aktivierung der Rezeptoren mit Stimuli, die den Eindruck „kratzig“ in menschlichen Probanden hervorrief, nicht möglich.

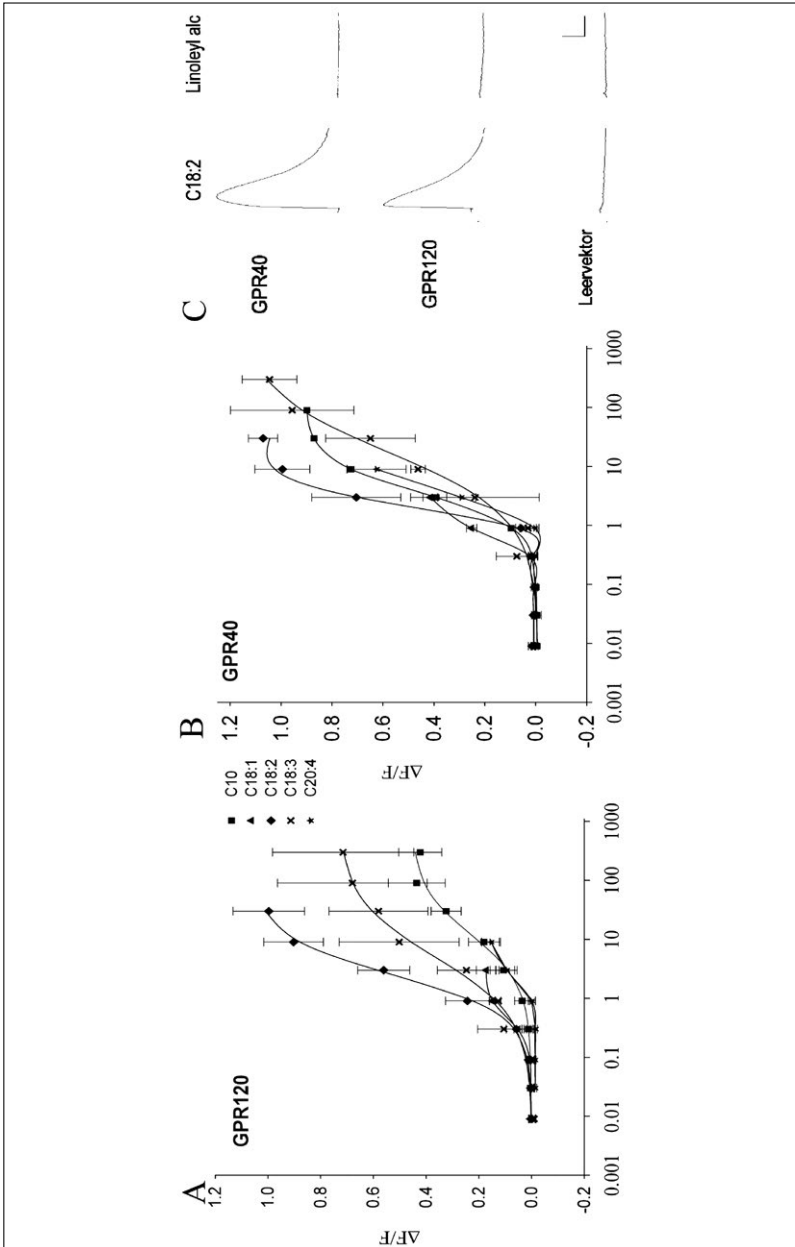


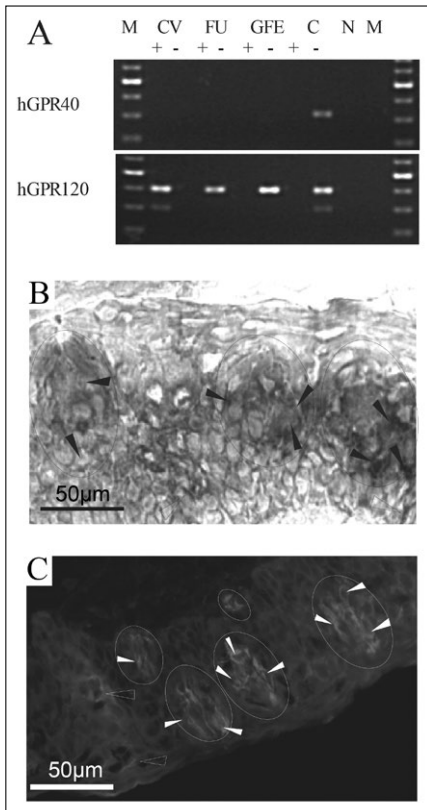
Abb. 2: Pharmakologische Charakterisierung fettsäuresensitiver G-Protein-gekoppelter-Rezeptoren.



## Expression fettsäuresensitiver G-Protein-gekoppelter Rezeptoren in menschlichem Zungengewebe

Der nächste Schritt zur Aufklärung der potentiellen Beteiligung der fettsäuresensitiven Rezeptoren an der Erkennung von Nahrungsfetten war die Überprüfung ihres Vorkommens in menschlichem Zungengewebe.

Hierzu wurde zunächst das Vorkommen von messenger-(m)RNA dieser beiden Rezeptoren mittels RT-PCR geprüft (**Abb. 3 A**). Wir fanden die mRNA des GPR120 in allen 3 untersuchten Gewebstücken, den circumvallaten Geschmackspapillen (CV), den fungiformen Geschmackspapillen (FU) sowie in geschmackszell-freiem Zungenepithel (GFE). Dies bedeutet, dass das Gen des GPR120 auf der Zungenoberfläche großflächig exprimiert wird. Im Gegensatz dazu konnte die mRNA des Rezeptors GPR40 nicht detektiert werden und eine Bedeutung dieses Moleküls für die gustatorische Fettwahrnehmung somit ausgeschlossen werden.



Um genaueren Aufschluss über die zelluläre Expression des GPR120-Gens zu erhalten, wurden die GPR120-mRNA und das GPR120-Protein auf menschlichen Gewebsschnitten durch die Methoden der In-situ-Hybridisierung (**Abb. 3 B**) und der Immunhistochemie (**Abb. 3 C**) analysiert. Es zeigte sich, dass sowohl die mRNA, als auch das Protein des fettsäuresensitiven GPR120 in den Geschmacksknospen und dem umliegenden Epithel nachweisbar waren. Dieser Befund deutet auf eine mögliche Beteiligung des Rezeptors GPR120 bei der gustatorischen Fettwahrnehmung hin.

Abb. 3: Analyse der mRNA- und Protein-Expression G-Protein-gekoppelter Rezeptoren in humanem Geschmacksgewebe.

## Analyse der G-Protein-Selektivität von GPR120

Ein weiterer wichtiger Parameter für die Qualifikation eines potentiellen Fettgeschmacksrezeptors ist, neben seinem Vorkommen in Geschmacksknospen, seine Eigenschaft, mit den heterotrimeren G-Proteinen zu interagieren, die in Geschmackszellrezeptorzellen vorliegen. Während die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten dieser G-Proteinkomplexe für die Aktivierung nachgeschalteter Signaltransduktionskomponenten wichtig sind, ist die  $\alpha$ -Untereinheit zusätzlich auch für die Kontaktaufnahme mit den aktivierten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren von Bedeutung. Das wohl bekannteste und am besten untersuchte  $G\alpha$ -Protein in Geschmackszellen von Säugetieren ist das  $\alpha$ -Gustducin [8]. Die  $G\alpha$ -Proteine lassen sich in die Gruppen  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_q$  und  $G\alpha_{12/13}$  aufteilen [9]. Die Möglichkeit der Untersuchung von G-Proteinchimären, die unterschiedliche Interaktionseigenschaften besitzen, aber gleichermaßen in der Lage sind, Calciumsignalwege in der Zelle zu aktivieren [10], haben wir uns zu Nutze gemacht, um die Kopplungseigenschaften des GPR120 im Vergleich zu GPR40 zu untersuchen. Die untersuchten  $G\alpha$ -Proteine/ $G\alpha$ -Proteinchimären waren:  $G\alpha_{15}$ , eine mit zahlreichen unterschiedlichen Rezeptoren koppelnde  $G\alpha_q$ -Untereinheit aus Maus;  $G\alpha_{15}gi3$ , eine  $G\alpha_q$ -Untereinheit mit dem Carboxylende eines  $G\alpha_i$ -Proteins;  $G\alpha_{15}gust44$ , das menschliche Orthologe zum Maus  $G\alpha_{15}$  mit dem Carboxylende des  $\alpha$ -Gustducins;  $G\alpha_{155/Olf}$ ,  $G\alpha_{15}$  mit dem Carboxylende eines  $G\alpha_s$ -Proteins. Da jede eukaryontische Zelllinie auch endogenen  $G\alpha$ -Proteine besitzt, kam es darauf an zu beobachten, ob die zusammen mit den Rezeptoren eingebrachten G-Proteinkonstrukte eine bessere, schlechtere oder unveränderte Aktivierung des Calciumsignalweges zur Folge hatten.

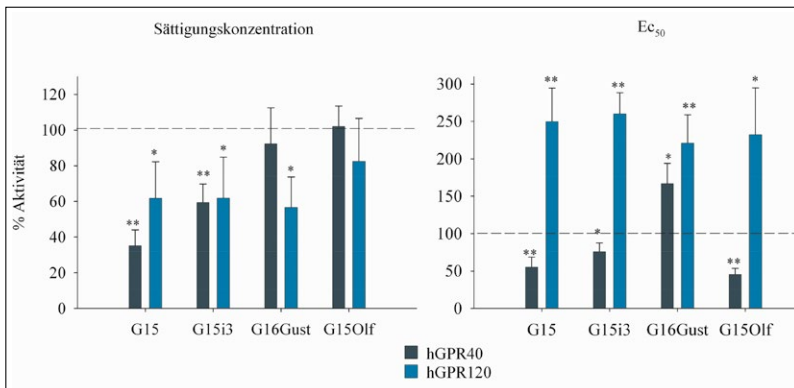


Abb 4: Funktionelle Überprüfung der G-Protein-Selektivität von GPR120 im Vergleich zu GPR40.

Während die Kotransfektionen von GPR120-cDNA und den verschiedenen  $G\alpha$ -Proteinkonstrukten keine nennenswerten Unterschiede offenbarten, zeigte sich beim GPR40 eine stärker ausgeprägte Selektivität (**Abb. 4**). Die Kotransfektionen mit  $G\alpha_{15}$ ,  $G\alpha_{15}g\beta 3$  und  $G\alpha_{15}S$  verringerten die Signalamplituden etwas, wohingegen die Koexpression mit der  $G\alpha_{16}gust44$ -Chimäre die Signalstärke etwas erhöhte. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass GPR40 im Vergleich zu GPR120 eine stärker ausgeprägte Selektivität gegenüber  $G\alpha$ -Untereinheiten zeigte. Darüber hinaus interagieren beide Rezeptoren mit dem im Geschmackssystem vorhandenen  $\alpha$ -Gustducin. Diese Daten würden also einer potentiellen Rolle des GPR120-Rezeptors im Geschmackssystem des Menschen nicht widersprechen.

## Expression und Aktivität von GPR120-Spleißvarianten

Für die mRNA des menschlichen GPR120-Gens wurden zwei verschiedene, durch alternatives Spleißen hervorgerufene Varianten beschrieben [7, 11]. Die längere Variante enthält im Gegensatz zur kurzen Variante das Exon 3, welches für 16 zusätzliche Aminosäuren in der 3. intrazellulären Schleife des Rezeptorproteins kodiert. Dies warf die Frage auf, ob es pharmakologische Unterschiede zwischen den daraus resultierenden Rezeptorvarianten gibt und welche dieser Varianten im Geschmacksepithel vorhanden ist. Wir haben daher verschiedene gustatorische und nicht-gustatorische Bereiche des menschlichen Zungenepithels mit Hilfe der Methode der RT-PCR untersucht. Bei der RT-PCR benutzten wir ein Oligonukleotidpaar, das beide Spleißvarianten gleichermaßen amplifizieren konnte, sowie ein weiteres Oligonukleotidpaar, das spezifisch für die längere Variante war. Als Kontrolle diente RNA aus menschlichem Dickdarmgewebe, da hier die lange Spleißvariante bereits beschrieben wurde. Unsere Analyse ergab, dass, sowohl im nicht-gustatorischen Zungenepithel als auch in fungiformen und circumvallaten Papillen ausschließlich die kürzere Form des GPR120 nachweisbar war (**Abb. 5 A**). Wie erwartet wurde im Dickdarmgewebe die lange Variante der GPR120-mRNA zusätzlich neben der kurzen Variante detektiert.

Demnach ist die kurze Variante des GPR120 als potentieller Rezeptor für den Fettsäuregeschmack interessant.

Mit der Beobachtung von Unterschieden in den Expressionsmustern der GPR120 Spleißvarianten ergab sich auch die Frage, ob es pharmakologische Unterschiede zwischen diesen Varianten gibt. Der Vergleich der Dosis-Wirkungskurven, die mit langkettigen Fettsäuren durchgeführt wurden (**Abb. 5 B-D**), zeigte, dass bei langkettigen Fettsäuren nur geringe funktionelle Unterschiede zwischen beiden Spleißvarianten des GPR120 messbar waren.

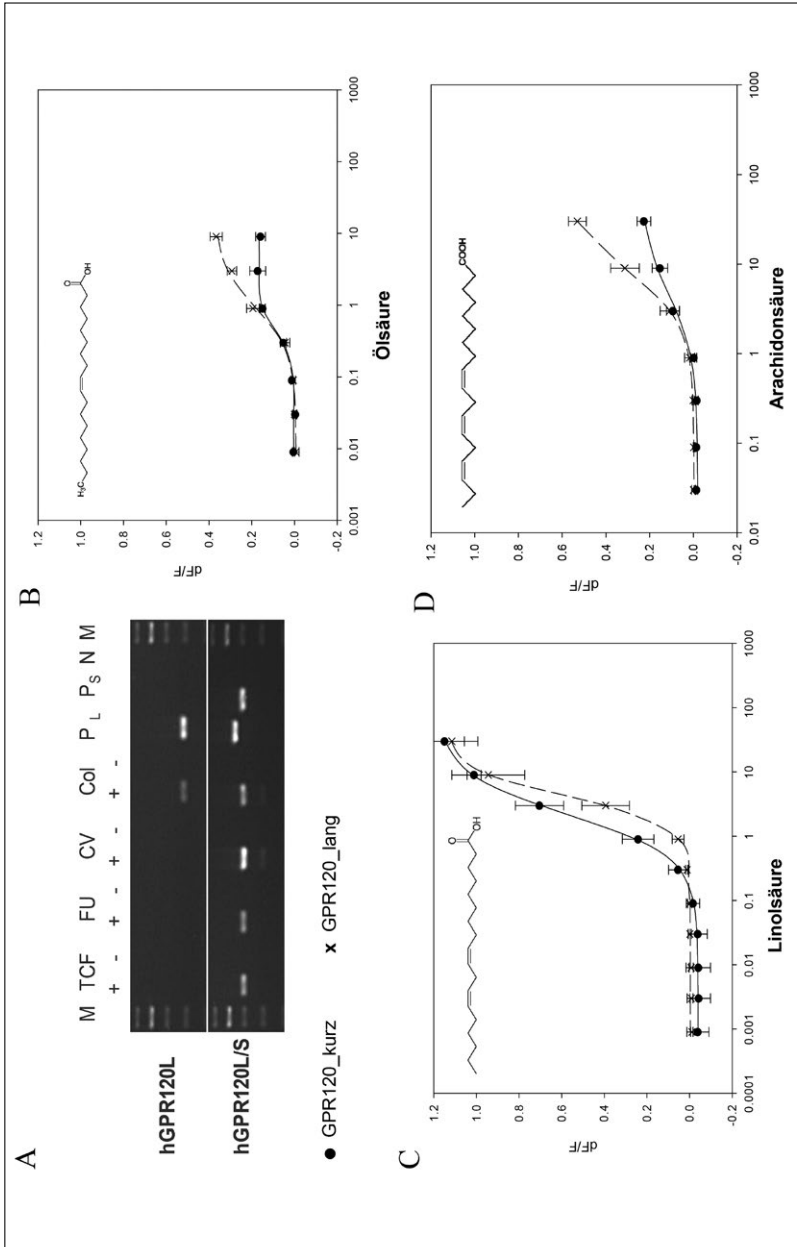


Abb. 5: Expressions- und Funktionsanalyse von GPR120-Spleißvarianten.

## Literatur

- [1] Galindo, M.M., Schneider N.Y., Stähler F., Töle J., Meyerhof W. (2012) Taste Preferences. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 108, 383-426.
- [2] Gaillard, D., Laugerette, F., Darcel, N., El-Yassimi, A., Passilly-Degrace, P., Hichami, A., Khan, N.A., Montmayeur, J.P. and Besnard, P. (2008) The gustatory pathway is involved in CD36-mediated orosensory perception of long-chain fatty acids in the mouse. *Faseb J*, 22 (5), 1458-68.
- [3] Cartoni, C., Yasumatsu, K., Ohkuri, T., Shigemura, N., Yoshida, R., Godinot, N., le Coutre, J., Ninomiya, Y. and Damak, S. (2010) Taste preference for fatty acids is mediated by GPR40 and GPR120. *J Neurosci*, 30, 8376-8382.
- [4] Laugerette, F., Passilly-Degrace, P., Patris, B., Niot, I., Febbraio, M., Montmayeur, J.P. and Besnard, P. (2005) CD36 involvement in orosensory detection of dietary lipids, spontaneous fat preference, and digestive secretions. *J Clin Invest*, 115, 3177-3184.
- [5] Chaudari N., Roper S.D. (2010) The cell biology of taste. *J Cell Biol*, 190 (3), 285-296.
- [6] Briscoe, C.P., Tadayyon, M., Andrews, J.L., Benson, W.G., Chambers, J.K., Eilert, M.M., Ellis, C., Elshourbagy, N.A., Goetz, A.S., Minnick, D.T., Murdock, P.R., Sauls, H.R., Jr., Shabon, U., Spinage, L.D., Strum, J.C., Szekeres, P.G., Tan, K.B., Way, J.M., Ignar, D.M., Wilson, S. and Muir, A.I. (2003) The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids. *J Biol Chem*, 278, 11303-11311.
- [7] Hirasawa, A., Tsumaya, K., Awaji, T., Katsuma, S., Adachi, T., Yamada, M., Sugimoto, Y., Miyazaki, S. and Tsujimoto, G. (2005) Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat Med*, 11, 90-94.
- [8] McLaughlin, S.K., McKinnon, P.J. and Margolskee, R.F. (1992) Gustducin is a taste-cell-specific G protein closely related to the transducins. *Nature*, 357, 563-569.
- [9] Offermanns, S. (2001) In vivo functions of heterotrimeric G-proteins: studies in G $\alpha$ -deficient mice. *Oncogene*, 20, 1635-1642.
- [10] Offermanns, S. and Simon, M.I. (1995) G $\alpha$  15 and G $\alpha$  16 couple a wide variety of receptors to phospholipase C. *J Biol Chem*, 270, 15175-15180.
- [11] Moore, K., Zhang, Q., Murgolo, N., Hosted, T. and Duffy, R. (2009) Cloning, expression, and pharmacological characterization of the GPR120 free fatty acid receptor from cynomolgus monkey: comparison with human GPR120 splice variants. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 154, 419-426.

## Summary Sub-Project 7

### Molecular mechanisms of human fat taste perception

The objective of this sub-project was to investigate the molecular mechanisms underlying human taste perception of fat, in order to characterize the multifactorial flavor evoked by fats in cooperation with other cluster participants. Besides carbohydrates and proteins, fats are the main energy providing food components and are considered as one of the main riskfactors for the development of obesity and related diseases in industrialized countries. Risk-lowering strategies including the reduction of fat contents in dietary products did not succeed so far because consumers were left with unsatisfying taste impressions.

For a long time the recognition of fat was believed to rely mostly on textural, olfactory and post-ingestive cues. However, during the recent years research performed in rodent models revealed an additional gustatory component for the detection of, in particular, long-chain fatty acids. In contrast to this, much less is known about fat taste perception in humans. In agreement with the above mentioned rodent studies, sensory studies performed by the group of Prof. Hofmann (sub-project 6 A) revealed long-chain fatty acids as predominant fat taste stimuli also for human individuals.

Therefore, we screened candidate fatty acid receptors in *in vitro* expression studies to correlate their pharmacological properties with the sensory results. It turned out that the pharmacological characteristics of the long-chain fatty acid receptors GPR40 and GPR120 are well correlated with the sensory properties assessed in sub-project 6 A. Especially the activation pattern of GPR120 matched specifically the “fatty” sensation elicited by long-chain fatty acids in sensory studies and is not responsible for the “scratchy” sensation of fatty acids and their alcohols. Further, we analyzed different human taste tissues and found the GPR120 receptor expressed in circumvallate and fungiform papillae. The receptor’s messenger (m)RNA and protein indeed were localized in taste bud cells as well as surrounding tongue epithelium. We demonstrated that a short splice variant, but not the long variant of GPR120, is expressed in taste tissue. We could also show that this variant is able to couple to different G-Proteins, among them Gustducin, which transduces signals in taste cells.

Consequently, the results of this project show that GPR120 indeed represents one of the receptor participating likely in human gustatory fatty acid perception. In the future this knowledge should help to design better acceptable low-fat foods.

---

Im Rahmen des DFG/AIF-Clusters „Fettwahrnehmung und Sättigungsregulation: Ansatz zur Entwicklung fettreduzierter Lebensmittel“ wurde das Teilprojekt 7 über die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) gefördert.

## Teilprojekt 8 (AiF)

# Simulation und Vorhersage des mechanisch induzierten Mundgefühls beim Verzehr von fettreduzierten, nicht stückigen, fließfähigen Lebensmitteln (AiF 15962 N)

**Prof. Dr. Antonio Delgado**

**Dr. Cornelia Rauh**

Universität Erlangen-Nürnberg

Department für Chemie- und Bioingenieurwesen

Lehrstuhl für Strömungsmechanik (LSTM)

## Einführung

Um die zu erwartende Kundenakzeptanz eines fettreduzierten Milchprodukts vor seiner Einführung in den Markt abschätzen zu können, kommen in der Industrie sensorische Untersuchungen zum Einsatz. Mit Hilfe dieser etablierten Methoden lassen sich einzelne Parameter, wie beispielsweise die Textur eines Lebensmittels und das resultierende Mundgefühl, gezielt abfragen und den Kundenvorstellungen anpassen. Ein repräsentatives Ergebnis erfordert jedoch einen relativ hohen Aufwand, der in zahlreichen und kostenaufwendigen Untersuchungen unter Einsatz von sensorischen Panels besteht. Die A-priori-Prognose des Mundgefühls völlig neuer Rezepturen bleibt bei dieser sensorischen Verkostung naturgemäß außer Acht. Insbesondere neu entwickelte fettarme Produkte müssen von der ersten Kostprobe an den Kunden nicht nur durch ihren gesundheitlichen Mehrwert, sondern auch durch ihr Mundgefühl überzeugen.

Dieses Teilprojekt trägt zur Aufklärung der bislang unzureichend bekannten Zusammenhänge zwischen Fließvorgängen und den von diesen induzierten mechanischen Reizen im Mund beim Verzehr von fettreduzierten Lebensmitteln bei. Dies erfordert Kenntnisse über das Ausmaß der Beanspruchung einzelner Bereiche auf der Zunge und dem Gaumen durch die Strömung im Mund. Dabei haben unterschiedliche Textur- und Matrixcharakteristika einen entscheidenden Einfluss auf die Strömungsmuster. Aus dem Einfluss der Fluidodynamik im Mund lassen sich somit mechano-sensorische Empfindungen ableiten, die in der Lebensmittelindustrie bislang aus sensorischen Beurteilungen von Lebensmitteln in Form von qualitativ linguistischen Merkmalen resultieren.

Numerische Simulationen dienen zur Nachbildung, Visualisierung und Analyse der Strömungsvorgänge hinsichtlich mechanischer Beanspruchungen im Mund. Die Kopplung der Erkenntnisse aus den numerischen Simulationen mit

den durch ein sensorisches Panel mittels qualitativer linguistischer Aussagen beschriebenen sensorischen Beurteilungen erfolgt mittels kognitiver Algorithmen innerhalb eines hybriden Expertensystems (Hybrid aus numerischer Simulation, Experiment und kognitiven Algorithmen). Das entwickelte hybride Expertensystem besitzt einerseits die Fähigkeit, aus rheologischen Produkteigenschaften bzw. fluidmechanisch induzierten Beanspruchungen der Mundoberfläche Textureigenschaften (z.B. „oral viscosity“ und „Cremigkeit“) vorhersagen zu können, sowie andererseits umgekehrt bei vorgegebenen textuellen sensorischen Eigenschaften Produktzusammensetzungen vorschlagen zu können.

## Zielsetzung

Das Hauptziel dieses Teilprojektes bestand in der Erarbeitung verbesserter Grundlagen zur Beurteilung der sich beim Verzehr von fettreduzierten, fließfähigen, nicht stückigen Lebensmitteln (zum Beispiel Joghurt) im Mundraum ergebenden mechanischen Reize sowie darin, deren Kopplung mit dem Mundgefühl zu schaffen, um (a) diesem Produktsektor zu einer Steigerung der Kundenakzeptanz zu verhelfen, (b) hiermit einem breiteren Teil der Gesellschaft den Zugang zu einer gesundheitsbewussten Ernährung zu erleichtern, (c) die Entwicklung von Lebensmitteln zu beschleunigen, (d) herstellereitig rasch auf neue Markttrends reagieren zu können, (e) das Risiko für Fehlproduktentwicklungen zu verringern und (f) den Einsatz von Ressourcen bei der Produktentstehung möglichst gering zu halten.

Das Erreichen dieses Hauptziels erforderte in erster Linie die Erarbeitung eines vertieften Verständnisses der mechanischen Effekte inklusive ihrer Quantifizierung beim Verzehr ausgewählter fettreduzierter Lebensmittel mittels numerischer Simulation. Basierend auf einer - durch die am vorliegenden Cluster-vorhaben beteiligten Arbeitsgruppen Hinrichs (TP1), Schuchmann (TP2) und Busch-Stockfisch (TP9) zur Verfügung gestellten - Datenbank für konstitutionelle und rheologische Eigenschaften verschiedener fettreduzierter Joghurts definierter Zusammensetzung, Mikrostruktur und technologischer Verarbeitung bestand das abgeleitete Ziel in der Entwicklung eines hybriden Expertensystems. Dieses sollte eine objektivierte Prognose des Mundgefühls auf Grundlage der numerischen, rheologischen und sensorischen Daten mittels eines künstlichen neuronalen Netzes und Fuzzy Logic ermöglichen. Darauf aufbauend zielte eine Erweiterung des hybriden Expertensystems auf die konstitutionelle Produktgestaltung eines Lebensmittels mit festgelegten sensorischen Eigenschaften ab.



## Ergebnisse und Diskussion

### 1. Numerische Simulation der Fließvorgänge im Mundraum

Die in diesem Teilprojekt erarbeiteten Ergebnisse numerischer Simulationen intra-oraler Fließvorgänge beim Lebensmittelverzehr fließfähiger, nicht stückiger Lebensmittel in einem der menschlichen Anatomie sehr ähnlichen Modell des Mundes bilden die Grundlage für theoretische Beschreibungen der auftretenden Scher- und Dehnspannungen, die zu einem mechanischen Reiz und damit zu einem bestimmten Mundgefühl führen. Es findet hierbei unter anderem die Implementierung rheologischer Modelle der Produkte sowie die Auflösung zeit- und raumabhängiger Spannungsgrößen besondere Berücksichtigung. Ein wichtiges Ergebnis besteht zudem in der Erstellung von Korrelationen zwischen den physikalischen Mechanismen im Mund und sensorischen Analysen (Gruppe Busch-Stockfisch, Teilprojekt 9).

#### Erstellung des mathematischen Modells

In der Literatur existiert die Betrachtung des Mundes als Prozessmaschine. Im Prinzip nimmt sie die Nahrung auf, zerkleinert sie in Stücke, befeuchtet sie durch Zugabe von Speichel, wandelt sie in einen Speisebrei um und schluckt sie. Dabei misst der Mund jede Stufe des Prozesses vom Aufbrechen bis zur Befeuchtung. Gleichzeitig nehmen die Menschen wahr, dass Lebensmittel eine bestimmte Textur besitzen. Das Ergebnis dieses Prozesses ist hauptsächlich gelernt und resultiert darin, ob das Lebensmittel akzeptiert oder abgelehnt wird. Zwei Ebenen werden für die Charakterisierung des Wechsels der Lebensmittelstruktur und Zusammensetzung verwendet. Die Partikelgröße muss auf ein bestimmtes Niveau reduziert werden, welches innerhalb eines bestimmten Größenbereichs liegt bzw. soll die Nahrung ein bestimmtes Mundgefühl aufweisen, bevor geschluckt wird. Die zweite Ebene ist der Befeuchtungsgrad. Eine bestimmte Befeuchtungsmenge muss vorhanden sein, bevor das Lebensmittel geschluckt werden kann. Dies kann durch Speichel oder durch Öle und Fette erfolgen. Menschen erkennen, ob das Lebensmittel ausreichend cremig oder glitschig/glatt ist.

Im vorliegenden Vorhaben lag der Fokus auf der Objektivierung des Mundgefühls (Textur) durch Kopplung mechanisch induzierter Reize mit sensorischen Attributen während des Schluckens fettreduzierter, nicht stückiger, fließfähiger Lebensmittel. Durch die Fokussierung auf den Schluckvorgang nicht stückiger, fließfähiger Materie blieb die Untersuchung des Zerkleinerungsprozesses sowie des Befeuchtungsprozesses zunächst unberücksichtigt. Aufgrund der komplexen Strömung im Mundraum existieren derzeit keine analytischen Lösungen der Bewegungsgleichungen. Deshalb bieten numerische Simulationen die Möglichkeit, erste Einblicke in sowie ein besseres Verständnis von den Geschwindigkeits- und Druck- und Spannungsverteilungen im Fluid während des Schluckvorgangs zu erhalten.

Hierzu bedurfte es zunächst der mathematischen Modellierung der geometrischen Abmessungen des Mundraums. Zu diesem Zweck diente ein vereinfachtes Zunge-Gaumen-Modell. Als Basis für das Zungen-Gaumen-Modell dienten Gaumenabdrücke von vier Personen, deren Geometrien über Rotationsellipsoide angenähert werden. Hieraus entstand ein Modell mit den mittleren Radien dieser Ellipsoide, mit anschließender Generierung eines hexaedrischen Berechnungsgitters (**Abb. 1**). Zusätzlich dazu erfolgt die Definition der Bewegung der Zunge während des Schluckvorgangs und der entsprechenden Randbedingungen.

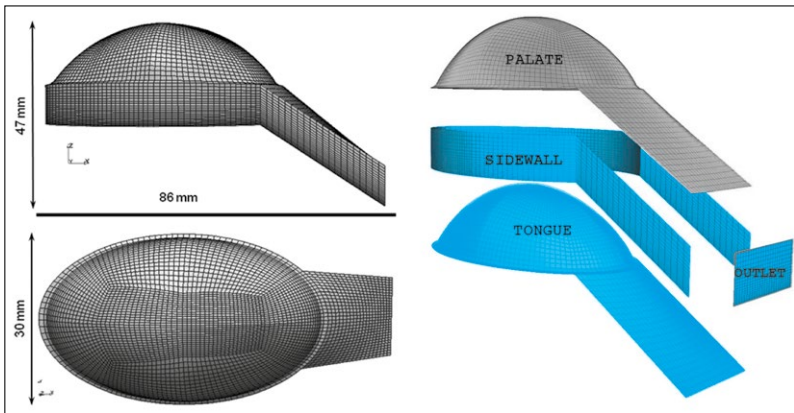


Abb. 1: Zunge-Gaumen-Modell der Numerischen Simulationen.

Das Schlucken eines Speisebreis stellt eine hoch komplexe zeit- und ortsabhängige Interaktion von Zunge und Gaumen dar. Aufgrund dessen resultiert die Notwendigkeit der Reduktion dieser Komplexität durch Annäherung der Anatomie und Bewegung durch eine Quetschströmung zwischen zwei Rotationsellipsoiden. Die Quetschbewegung entsteht durch eine Drehbewegung der Zunge (unterer Ellipsoid) um einen festen Punkt auf den Gaumen zu, mit einer nach oben gerichteten Geschwindigkeit der Zungenspitze von 1 cm/s. Die Bewegungsgleichungen für die inkompressible und laminare Strömung werden numerisch über ein bewegtes Gitter innerhalb einer physikalischen Zeit von 1 Sekunde simuliert. Da der Schluckvorgang einen instationären Vorgang darstellt, zeigt sich die Definition von Anfangsbedingungen in allen Gitterpunkten als unerlässlich. Hierfür wird ein in Ruhe befindliches Fluid vorausgesetzt. Alle Anfangsbedingungen, sowohl vektorielle oder skalare Größen im Gitter, erhalten den Wert Null.

Zum Zweck der Anwendung physikalischer Randbedingungen erfolgte die Aufteilung der Randgebiete in vier nicht überlappende Randflächen (**Abb. 1**). Die

Randbedingungen der Randflächen GAUMEN (Palate), SEITE (Sidewall) und ZUNGE (Tongue) werden als Wände behandelt, OUTLET hingegen als Auslass. Durch die Aufwärtsbewegung der Zunge quetscht diese das Fluid durch den Auslass hinaus. Das Resultat der numerischen Simulation ist die orts- und zeitaufgelöste Beschreibung der Druck-, Geschwindigkeits- und Spannungsverteilung. An den Wänden gilt dabei stets für die Geschwindigkeit das Prinzip der Wandhaftung sowie ein Druckgradient gleich Null. Da das Fluid aus dem OUTLET ohne Widerstand fließen soll, erfolgt die Vorgabe eines Geschwindigkeitsgradienten gleich Null und ein Relativdruck von Null.

### Geschwindigkeits-, Druck- und Schubspannungsverteilungen während des Schluckvorgangs

Das oben beschriebene Simulationsmodell diente zur Simulation des Schluckvorgangs von Newtonschen und nicht-Newtonschen Modelllebensmitteln, um eine Kopplung zwischen mechanischen Beanspruchungen und sensorischen Eindrücken erreichen zu können. Die Unterscheidung zwischen Newtonschen und nicht-Newtonschen Modelllebensmitteln entsteht aus der Tatsache heraus, dass die Bewegungsgleichungen ein Fließgesetz benötigen, das Schubspannungen und die entstehende Deformation miteinander in Verbindung setzt, um das Fließverhalten bestimmen zu können. Newtonsche Fluide, wie Wasser, Milch oder Honig, zeichnen sich durch einen linearen Zusammenhang zwischen der Schubspannung und der Scherrate aus. Die Proportionalitätskonstante oder Steigung des Graphen zwischen Schubspannung und Deformation/Scherrate, auch als dynamische Viskosität bezeichnet, lässt sich als quantitatives Maß für den Widerstand deuten, den das Fluid gegen Deformationen aufbringt.

Fluide mit nicht-Newtonischem Verhalten, wie Joghurt oder andere halb feste Lebensmittel, folgen nicht dieser linearen Beziehung zwischen Schubspannung und Scherrate. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Reaktionen auf aufgeprägte Schubspannungen existiert kein universelles Modell, um diese Fluide zu beschreiben. Vielmehr gibt es eine Vielzahl an unterschiedlichen Fließgesetzen, welche eine große Bandbreite an nicht-Newtonschen Fluiden beschreiben. Unter diesen beschreibt das Herschel-Bulkley-Modell und das Bingham-Modell das Fließverhalten des verwendeten Modell-Joghurts. Herschel-Bulkley-Fluide und Bingham-Fluide zeigen eine sogenannte Fließgrenze. Überschreitet die Schubspannung im Fluid diesen Wert, so beginnt das Fluid zu fließen und zeigt dann scherverdünnendes Verhalten (Herschel-Bulkley), d.h. die scheinbare Viskosität nimmt mit steigenden Scherraten ab, bzw. Newtonsches Verhalten (Bingham).

Die aus den numerischen Simulationen erhaltenen Strömungsfelder wurden in zwei Ebenen evaluiert, und zwar in der Sagittal- und Frontalebene (**Abb. 2**). Alle im Folgenden dargestellten Abbildungen entsprechen etwa 50% der Schluckzeit, d.h. 0,5 s.

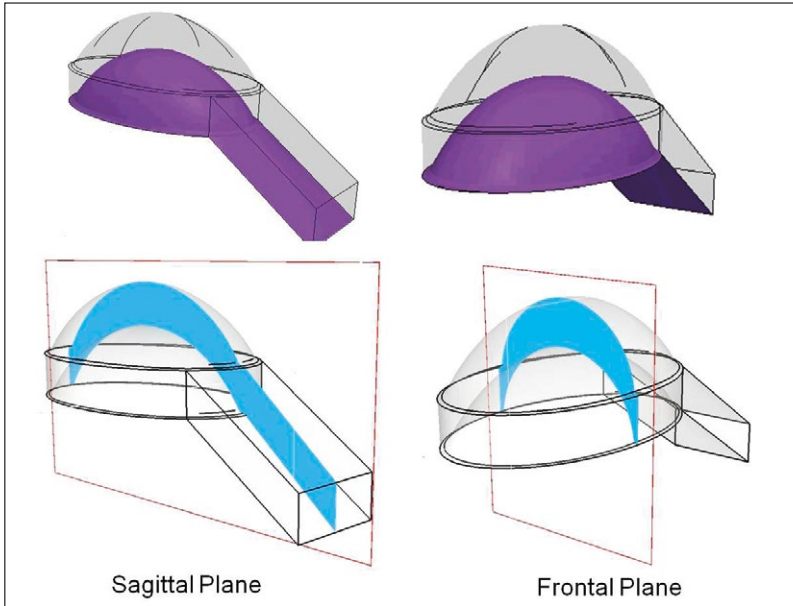


Abb. 2: Auswertung der numerischen Simulationen auf charakteristischen Schnittebenen: Sagittalebene (links); Frontalebene (rechts).

Während sich die Zunge nach oben bewegt, wird eine Strömung induziert. Mit der Aufwärtsbewegung beschleunigt die Strömung an der Zungenspitze, so dass eine Bulkströmung in der Mitte entsteht (**Abb. 3** und **4**). Der Geschwindigkeitsgradient senkrecht zur Wand überwiegt den Gradienten in Strömungsrichtung. Die Geschwindigkeit steigt in Richtung des Rachens aufgrund der räumlichen Verengungen an. Dies hängt zudem von der Fluidviskosität ab. Um den Effekt der Viskosität von zwei Newtonschen Flüssigkeiten zu erforschen, wurden Wasser und eine Flüssigkeit mit 1.000-facher Wasserviskosität betrachtet. Wie in **Abb. 3** und **4** gezeigt, kommt es mit zunehmender Viskosität in der Frontalebene im Kern der Flüssigkeit zu einer Bewegung mit einer höheren Geschwindigkeit. Die Fluidgeschwindigkeit an der Zungenoberfläche besitzt den gleichen Wert wie die Zunge selbst. Die Grenzschichtdicke des Fluids nimmt jedoch mit zunehmender Viskosität zu. Dies hat zur Folge, dass das Fluid im Kern der Strömung höhere Werte annehmen muss, um den gleichen Massenstrom zu befördern.

Im Fall von nicht-Newtonschen Fluiden (**Abb. 5**) kann das strukturviskose Verhalten des Materials auf der Zunge und auf dem Gaumen beobachtet werden. Bei Scherspannungen oberhalb der Fließgrenze setzt ein Fließen des Mediums ein. Somit strömt das Fluid in Wandnähe, im Kern der Strömung tritt jedoch eine Pfropfenströmung auf.

Mithilfe strömungsmechanischer Kennzahlen (Reynoldszahl, Deborahzahl, Druck, Schubspannungen) werden sowohl die entstehende Strömung während des Schluckens als auch die mechanischen Einwirkungen auf den Mundinnenraum analysiert.

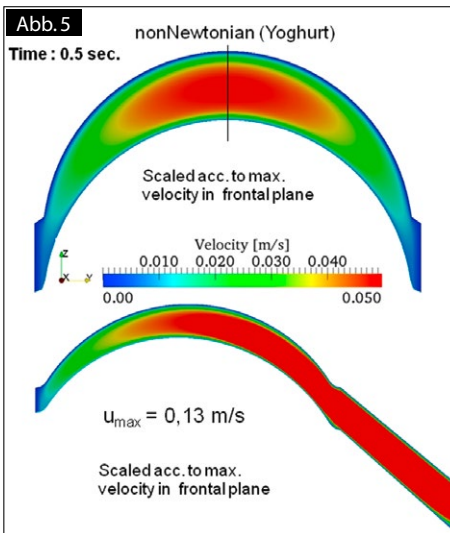
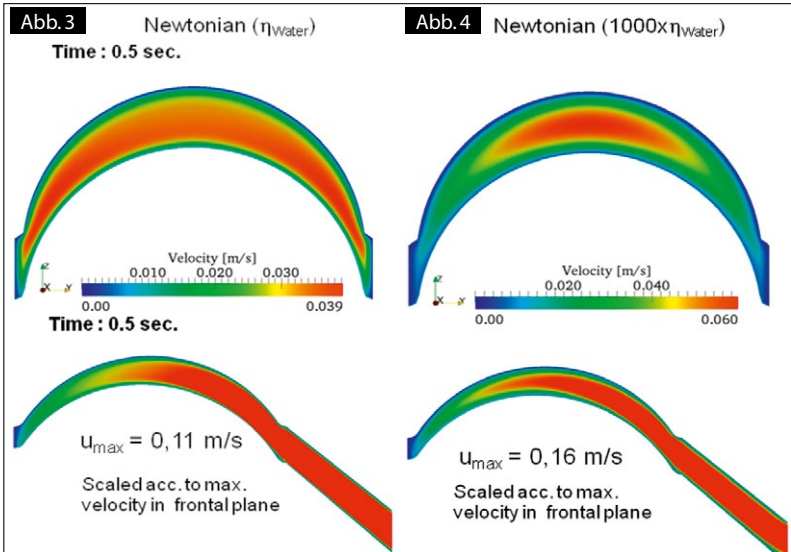


Abb. 3: Geschwindigkeitsverteilung für Newtonsches Fluid.

Abb. 4: Geschwindigkeitsverteilung für hochviskoses Newtonsches Fluid.

Abb. 5: Geschwindigkeitsverteilung für nicht-Newtonsches Fluid (Herschel-Bulkley:  
 $\tau_0 = 12,412 \text{ Pa}$ ;  $K = 12,784 \text{ Pa s}^n$ ;  $n = 0,303$ ).

Die Reynoldszahl lässt sich als das Verhältnis von Trägheitskräften zu viskosen Kräften auffassen. Bezüglich der Texturwahrnehmung besitzen viskose Kräfte eine größere Bedeutung als Trägheitskräfte. Im Fall Newtonscher Flüssigkeiten nimmt mit fortschreitender Zeit die Reynoldszahl ab (nicht gezeigt). Im Fall niedrigviskoser Newtonscher Medien (Wasser) weisen die Trägheitskräfte sehr hohe Werte im Vergleich zu den viskosen Kräften auf. Bis zum Ende des Schluckvorgangs nimmt daher zwar die Rolle der viskosen Kräfte zu, übernimmt jedoch nicht die Dominanz. Bei nicht-Newtonschen Medien lässt sich beobachten, dass zunächst die Reynoldszahl sinkt und nach Erreichen eines Minimums bis zum Ende des Schluckvorgangs ansteigt. Für die betrachteten hochviskosen, nicht-Newtonschen Medien bedeutet dies, dass den viskosen Kräften während des gesamten Schluckvorgangs die größte Bedeutung zukommt. Zu Beginn der Schluckbewegung tritt dieser Effekt noch betonter auf.

Die Deborahzahl charakterisiert in der Rheologie das Fließverhalten eines Mediums, indem es das Verhältnis zwischen inneren Zeiten zu äußeren Zeiten angibt. Je kleinere Werte die Deborahzahl aufweist, desto kürzere Reaktionszeiten besitzt ein Material auf eine Anregung. Mit zunehmendem Schluckverlauf nimmt für alle Fluide (Newtonsch und nicht-Newtonsch) die Deborahzahl ab, d.h. die Fließfähigkeit nimmt zu. Newtonsche und nicht-Newtonsche Medien unterscheiden sich in der Anfangsphase des Schluckvorgangs. Die Deborahzahl sinkt dabei für nicht-Newtonsche Fluide stärker als für Newtonsche Medien.

Die Druckverteilungen in **Abb. 6** zeigen, dass der maximale Druck auf der Zungenspitze auftritt und entlang der Strömung abfällt. Der Wert des maximalen Drucks auf der Zungenspitze steigt mit zunehmender Viskosität an. Bei nicht-Newtonschen Lebensmitteln liegt der beobachtete Druck im Bereich des in der Literatur genannten Schwellwertes menschlicher Druckwahrnehmung (2 kPa) [RAUH et al., 2012; ZUR et al., 2004].

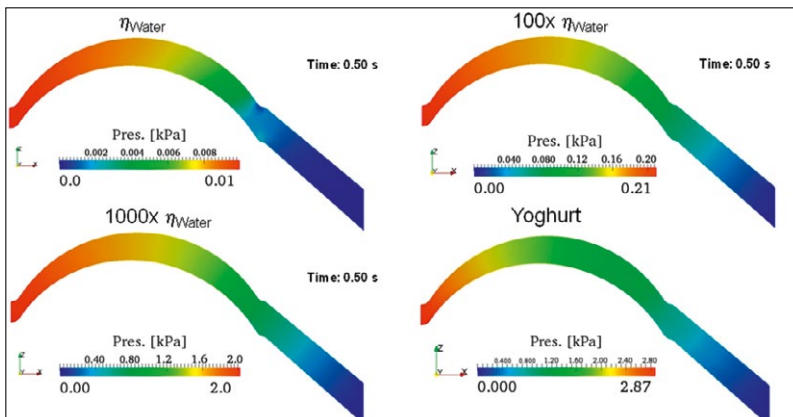


Abb. 6: Druckverteilung für Newtonsche und nicht-Newtonsche Fluide.

Die Literatur berichtet, dass für flüssige Lebensmittel mit geringer Viskosität der Stimulus für viskositätsbezogene Texturmerkmale in den Scherraten besteht, die bei etwa konstanter Schubspannung von 10 Pa hervorgerufen werden. Für Flüssigkeiten mit hoher Viskosität besteht der Stimulus in der Schubspannung, die bei konstanten Scherraten von etwa  $10 \text{ s}^{-1}$  hervorgerufen werden. Der menschliche Wahrnehmungsbereich für Scherraten liegt zwischen  $10 \text{ s}^{-1}$  und  $1.000 \text{ s}^{-1}$ , wohingegen für Schubspannungen zwischen 10 und 1.000 Pa [SHAMA & SHERMAN, 1973]. Da Joghurt - worauf der Schwerpunkt dieser Untersuchungen lag - eine hochviskose Flüssigkeit ist, erfolgte die Analyse der Schubspannungsverteilungen auf der Zunge, am Gaumen und auf den Seitenwänden. Für Wasser (nicht gezeigt) nahm die Schubspannung erwartungsgemäß im gesamten Bereich der Zungenoberfläche sehr geringe Werte an. Newtonsche Flüssigkeiten mit einer hohen Viskosität (1.000-fache Wasserviskosität) erzeugten beim Schlucken Schubspannungen im erwähnten Wahrnehmungsbereich (bis 100 Pa), wobei die höchsten Werte auf der Zunge hauptsächlich in der Nähe des Rachens auftraten (**Abb. 7**). Auch bei nicht-Newtonschen hochviskosen Medien traten Schubspannungen innerhalb des Wahrnehmungsbereiches auf. Hier wies jedoch annähernd die gesamte Zungenoberfläche diese Werte auf (**Abb. 8 und 9**).

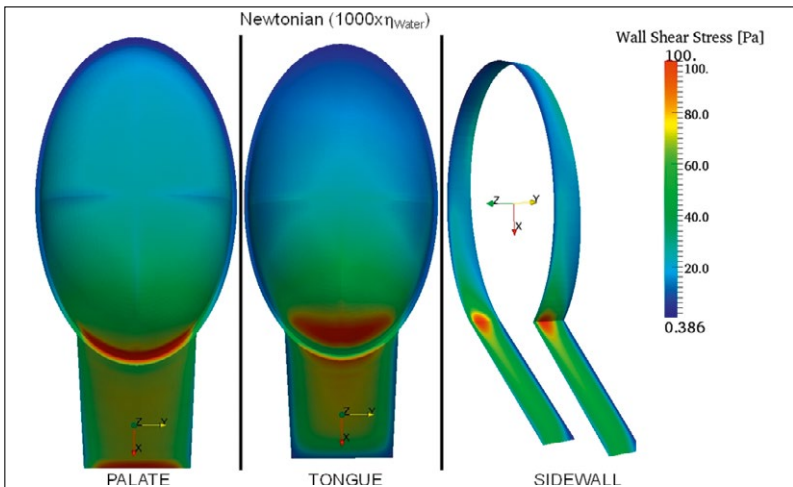


Abb. 7: Wandschubspannungsverteilung für hochviskoses Newtonsches Fluid ( $1000 \eta_{\text{Wasser}}$ )

Um eine Datenbasis für die Kopplung der mechanisch induzierten Texturwahrnehmung und der sensorischen Wahrnehmung zu erstellen, erfolgte eine systematische Charakterisierung unterschiedlicher Joghurtproben mittels experimenteller Methoden (rheologisch: Arbeitsgruppe Hinrichs (TP1); sensorisch: Arbeitsgruppe Busch-Stockfish (TP9)) und numerischer Simulationen. Hierbei variieren u.a. der Fett- und Proteingehalt.



Es fällt deutlich auf, dass für unterschiedliche Joghurtproben ein typisches Verteilungsmuster der Schubspannungen auf der Munderoberfläche auftritt. Diese Tatsache macht sich das entwickelte hybride Expertensystem zunutze.

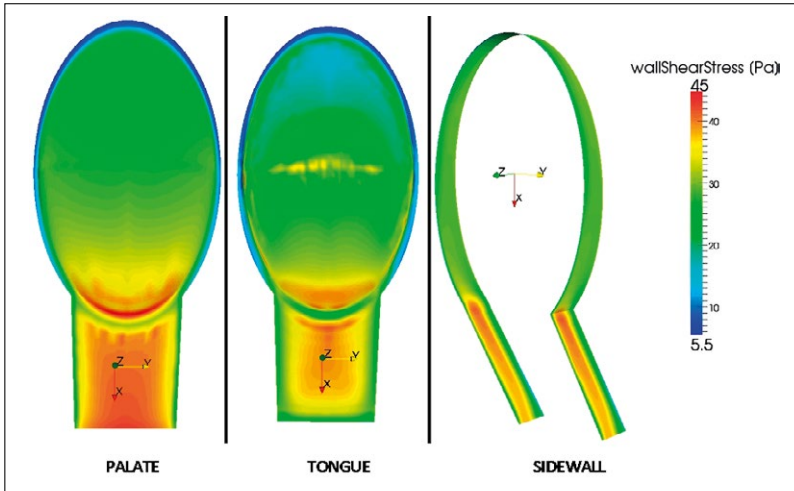


Abb. 8: Wandschubspannung für Joghurt (0,1 % Fett, 3,5 % Protein, 1,5 % Casein-Molkenprotein-Verhältnis) modelliert als Bingham-Medium ( $\tau_0 = 28,158 \text{ Pa}$ ,  $K = 0,0558 \text{ Pas}$ ).

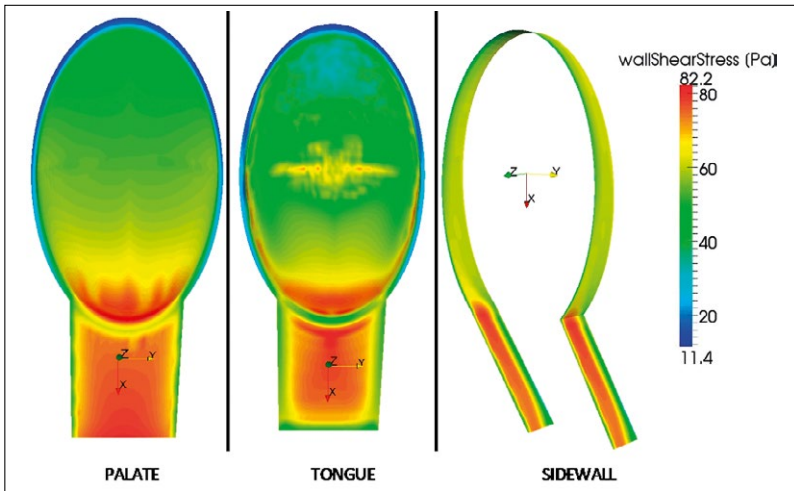


Abb. 9: Wandschubspannung für Joghurt (6 % Fett, 3,5 % Protein, 0,7 % Casein-Molkenprotein-Verhältnis) modelliert als Bingham-Medium ( $\tau_0 = 59,346 \text{ Pa}$ ,  $K = 0,0833 \text{ Pas}$ ).



## 2. Entwicklung eines hybriden Systems zur objektivierten Beschreibung des Mundgefühls

Ein weiteres angestrebtes Forschungsergebnis bestand in der Entwicklung eines effektiven Prognosewerkzeugs, welches die experimentell (Arbeitsgruppen Hinrichs (TP1) und Schuchmann (TP2)), numerisch (Arbeitsgruppe Delgado (TP8)) und sensorisch (Arbeitsgruppe Busch-Stockfisch (TP9)) erlangten Informationen bezüglich Mundgefühl, Produktzusammensetzung, Mikro- und Makrostruktur sowie Strömungsmechanik und Mechanik verarbeitet. Das als hybrides Expertensystem konzipierte Prognoseinstrument basiert auf künstlichen neuronalen Netzen (KNN) und Fuzzy Logic und ermöglicht eine rasche Prognose (unter 1 ms) des mechanisch induzierten Mundgefühls. Es schafft die Grundlage sowohl für eine Modifikation bestehender sowie für ein Design neuartiger Produkte. Nach dem erfolgreichen Abschluss des Trainings und der Validierung mittels zur Verfügung stehender Datensätze besitzt das hybride Modell die Fähigkeit, auf Basis ausschließlich physikalischer und chemischer Eingangsdaten das zu erwartende Mundgefühl vorherzusagen.

### Konzeption

Die Erarbeitung des hybriden Expertensystems zur objektiven Beschreibung des Mundgefühls bedurfte zuerst der Konzeption der Eingangs- und Ausgangsgrößen. Zu den Eingangsgrößen gehören strömungsmechanische Kennzahlen aber auch produkt- und prozessspezifische Eckdaten (Fettgehalt, Proteingehalt, CMV: Casein-Molken-Verhältnis). Zur Bestimmung der strömungsmechanischen Kennzahlen dienen die Definition dimensionsloser Kennzahlen (Reynoldszahl, Deborahzahl) und die Ermittlung charakteristischer strömungsmechanischer Variablen (Wandschubspannungen, Druck). Wie bereits erwähnt, erzeugt jedes der untersuchten Lebensmittel bei dessen Schluckvorgang ein typisches Muster an strömungsmechanischen Kennzahlen auf der Zungenoberfläche. Diese werden nach Aufteilung der Zungenoberfläche in 10 charakteristische Flächen in der Datenbasis hinterlegt.

Das hybride Expertensystem besteht aus einem künstlichen neuronalen Netz (zur Vorhersage des Attributs „oral viscosity“) und einem nachgeschalteten adaptiven Neuro-Fuzzy-System. Eingabegrößen sind dabei Fettgehalt, Proteingehalt, CMV und die Bingham- bzw. Herschel-Bulkley-Parameter des Produkts. Das Expertensystem ermittelt daraus die sensorischen Attribute „Cremigkeit“, „Griesigkeit“, „belegend“ und „adstringierend“.

Das künstliche neuronale Netz zur Vorhersage der „oral viscosity“ verwendet als Eingangsgrößen die durch die Simulationen ermittelten 10 zonenspezifischen Schubspannungen auf der Zunge. Für die Genauigkeit der Vorhersage ergab sich eine mittlere Abweichung von 6,4%, eine maximale Abweichung von 17,4% und eine Standardabweichung von 4% (**Abb. 10**). Diese Abweichungen liegen im Rahmen der Ungenauigkeiten der sensorischen Experimente. Alternativ besteht auch die Möglichkeit, mit guter Genauigkeit direkt aus den rheologischen

Parametern die „oral viscosity“ mithilfe eines eigenen KNN vorherzusagen (hier nicht gezeigt).

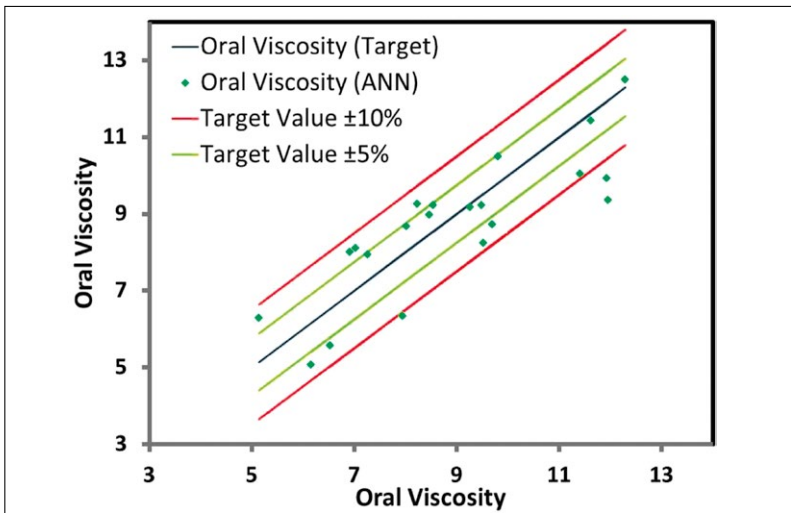


Abb. 10: Vorhersage der „oral viscosity“ aus zonenspezifischen Schubspannungen auf der Zungenoberfläche.

Darüber hinaus lag bezüglich der Zusammenhänge zwischen rheologischen Parametern und der Zusammensetzung der Joghurtproben (Fettgehalt, Proteingehalt, CMV) Expertenwissen der Arbeitsgruppen Hinrichs (TP1) und Busch-Stockfisch (TP9) vor. Diese wurden in Regeln für ein Fuzzy-System überführt – z. B. (in Auszügen):

- WENN geringer Proteingehalt, DANN ist die Intensität im Attribut *adstringierend* hoch UND die Intensität des Attributs *Griesigkeit* niedrig.
- WENN geringer Fettgehalt, DANN ist Intensität im Attribut *adstringierend* hoch UND die Intensität im Attribut *Griesigkeit* niedrig.
- WENN hoher Proteingehalt, DANN ist Intensität im Attribut *cremig* hoch.
- WENN hoher Fettgehalt, DANN ist der Einfluss des Proteingehalts klein bzgl. *cremig*.
- WENN geringer Fettgehalt UND mittleres CMV, DANN wurden die geringsten  $\tau_{50s-1}$ -Werte ermittelt.

Ein derart gebildetes Fuzzy-System vermag es nicht, die sensorischen Attribute des Mundgefühls lediglich aus den Produktionsdaten des Produkts mit hinreichender Genauigkeit zu beschreiben bzw. abzuschätzen. Es erweist sich vor al-

lem für komplexe sensorische Parameter als unabdingbar, Informationen bzgl. mechanischer Reize im Mundraum zu integrieren. Hierzu wurden die Ergebnisse aus der Vorhersage der „oral viscosity“ aus zonenspezifischen Schubspannungen auf der Zungenoberfläche durch ein KNN (siehe oben) mit dem vorliegenden Expertenwissen in einem hybriden System kombiniert: Zur Zusammenführung und Auswertung aller Daten dienen adaptive Neuro-Fuzzy-Systeme mit den Parametern Fettgehalt, Proteingehalt, CMV und „oral viscosity“. Das Attribut „oral viscosity“ wurde aus den Bingham- bzw. Herschel-Bulkley-Parametern und den in numerischen Simulationen errechneten zonenspezifischen Schubspannungen auf der Zungenoberfläche per KNN abgeschätzt und als Eingabeparameter zur Verfügung gestellt. Das Regelset besteht aus fest definierten Regeln nach obig beschriebenem Expertenwissen und aus automatisch generierten lernenden Regeln, die im Wesentlichen den Zusammenhang zwischen „oral viscosity“ und den weiteren sensorischen Attributen darstellen sollen.

## Grundlagen

Künstliche neuronale Netze basieren auf einer mehrfachen Verknüpfung (Synapsen) von Ansatzfunktionen (Neuronen). Den Synapsen sind dabei Gewichte zugeordnet, die im Laufe des Trainings von den künstlichen neuronalen Netzen ermittelt werden. Das Netz wird durch vorhandene Datensätze (Eingangswerte und Ausgangswerte) angelehrt bzw. trainiert.

Fuzzy-Systeme beschreiben einen Formalismus, der menschlicher „Wenn-Dann“-Argumentation nachempfunden ist. Der Formalismus lässt Abstufungen zwischen „ist erfüllt“ (1) und „ist nicht erfüllt“ (0) als Grad der Erfüllung zu. Ein Fuzzy-System folgt drei allgemeinen Hauptschritten: a) der sogenannten Fuzzifizierung der exakten Eingabewerte, b) der Verarbeitung der Fuzzy-Regeln und c) der Defuzzifizierung der aus den Regeln gewonnenen Ergebnisse in exakte Ausgabewerte. Die Fuzzifizierung und Defuzzifizierung benötigt sogenannte Zugehörigkeitsfunktionen, die - wie bereits erwähnt - Abstufungen zwischen „ist erfüllt“ (1) und „ist nicht erfüllt“ (0) zulassen. Damit werden unter anderem die Eingabewerte unscharfen Mengen zugeordnet. Die Fuzzy-Regeln beziehen sich auf die Zuordnung der Werte zu diesen Mengen. Die Fuzzy-Regeln folgen der menschlichen Argumentation mit Bezug auf die Zugehörigkeitsfunktion zu bestimmten Mengen. Zur Ermittlung des konkreten Ausgabewertes, der Defuzzifizierung, werden die Wahrheitswerte und die Zugehörigkeitsfunktionen der den Wahrheitswerten zugeordneten Mengen herangezogen. Dabei werden die entsprechenden Wahrheitswerte für die Eingabewerte und die Anwendung des Regelsets den so entstandenen skalierten Funktionen in einer Ausgabe- bzw. Defuzzifizierungsfunktion überlagert.

Ein adaptives Neuro-Fuzzy-System bedient sich wie ein künstliches neuronales Netz des Trainings mit vorhandenen Daten. Dabei werden im Extremfall alle Zugehörigkeitsfunktionen, Regeln und Defuzzifizierungsfunktionen statistisch oder über Clusterverfahren ermittelt und deren Parameter und Formen anhand

der Daten trainiert. Es sind aber auch Mischformen möglich, d.h. beispielsweise festgelegte Zugehörigkeiten zu Mengen, im festgelegten Rahmen freie Parameter der Formen und ein Regelsatz bestehend aus fest definierten Regeln und generierten Regeln.

### Topologie, Training, Validierung und Ergebnisse

Wie bereits beschrieben, setzt sich die Topologie des adaptiven Neuro-Fuzzy-Systems aus den vier Eingabeparametern Fettgehalt, Proteingehalt, CMV und „oral viscosity“ und dem Regelset zusammen. Bedingt durch das Training und den damit verbundenen Algorithmen kann ein System nur eine Ausgangsgröße beschreiben, d.h. für jedes Attribut „Cremigkeit“, „Griesigkeit“, „Belegend“ und „Adstringierend“ wurde jeweils ein eigenes System erstellt. **Abb. 11** stellt die Topologie für das Attribut „Cremigkeit“ exemplarisch dar.

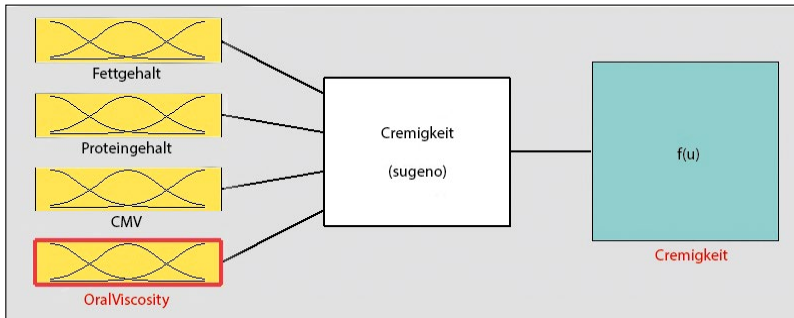


Abb. 11: Topologie des adaptiven Neuro-Fuzzy-Systems für das Attribut „Cremigkeit“.

Die Systeme wurden aus einem Verkostungsdatensatz mit 672 Einträgen (13 Produkte) trainiert und validiert. 22 Prozent (149 Datensätze, 3 Produkte) davon wurden zur Validierung abgetrennt.

Die Validierung wertet für die sensorischen Attribute die Abweichung zwischen den mithilfe des hybriden Expertensystems vorhergesagten Werten und den tatsächlichen Ergebnissen der Verkostungsdaten aus. Die Auswahl der Validierungsdatensätze erfolgte bedingt zufällig, d.h. es wurde jeweils aus den Bereichen mit niedrigem, mittlerem und hohem Fettgehalt ein Produkt zufällig ausgewählt und die Daten wurden aus dem Trainingsdatensatz entfernt. Im Folgenden (**Tab. 1 - 4**) werden die tatsächlichen Werte der Attribute mit den abgeschätzten verglichen. Mögliche Angaben für die Verkoster waren für die Bewertung der Attribute die Werte von 0 - sehr geringe Intensität - bis 10 - sehr hohe Intensität.

Tab. 1: Fehleranalyse der Validierungsdatensätze für das Attribut „Cremigkeit“

| Produkt Joghurt                       | Attribut „Cremigkeit“<br>Sensorik | Attribut „Cremigkeit“<br>Hybrides System | Fehler     |
|---------------------------------------|-----------------------------------|--|------------|
| 0,1 % Fett, 4,5 % Protein,<br>0,7 CMV | 0,2                               | 0,1                                      | 0,1        |
| 6 % Fett, 6 % Protein,<br>0,7 CMV     | 1,6                               | 2,1                                      | 0,5        |
| 12 % Fett, 3,5 % Protein,<br>1,5 CMV  | 5,3                               | 5,2                                      | 0,1        |
| <b>maximaler Gesamtfehler</b>         |                                   |  | <b>0,5</b> |

Tab. 2: Fehleranalyse der Validierungsdatensätze für das Attribut „Griesigkeit“

| Produkt Joghurt                       | Attribut „Griesigkeit“<br>Sensorik | Attribut „Griesigkeit“<br>Hybrides System | Fehler     |
|---------------------------------------|------------------------------------|---|------------|
| 0,1 % Fett, 4,5 % Protein,<br>0,7 CMV | 9,6                                | 10,0                                      | 0,4        |
| 6 % Fett, 6 % Protein,<br>0,7 CMV     | 9,6                                | 9,1                                       | 0,5        |
| 12 % Fett, 3,5 % Protein,<br>1,5 CMV  | 5,9                                | 5,1                                       | 0,8        |
| <b>maximaler Gesamtfehler</b>         |                                    |   | <b>0,8</b> |

Tab. 3: Fehleranalyse der Validierungsdatensätze für das Attribut „belegend“

| Produkt Joghurt                       | Attribut „belegend“<br>Sensorik | Attribut „belegend“<br>Hybrides System | Fehler     |
|---------------------------------------|---------------------------------|--|------------|
| 0,1 % Fett, 4,5 % Protein,<br>0,7 CMV | 2,4                             | 2,6                                    | 0,2        |
| 6 % Fett, 6 % Protein,<br>0,7 CMV     | 7,0                             | 6,2                                    | 0,8        |
| 12 % Fett, 3,5 % Protein,<br>1,5 CMV  | 7,2                             | 6,6                                    | 0,6        |
| <b>maximaler Gesamtfehler</b>         |                                 |  | <b>0,8</b> |

Tab. 4: Fehleranalyse der Validierungsdatensätze für das Attribut „adstringierend“

| Produkt Joghurt                       | Attribut „ad-<br>stringierend“<br>Sensorik | Attribut „ad-<br>stringierend“<br>Hybrides System | Fehler     |
|---------------------------------------|--|---|------------|
| 0,1 % Fett, 4,5 % Protein,<br>0,7 CMV | 1,2  | 2,7   | 1,5        |
| 6 % Fett, 6 % Protein,<br>0,7 CMV     | 1,2  | 1,4   | 0,2        |
| 12 % Fett, 3,5 % Protein,<br>1,5 CMV  | 2,0  | 1,8   | 0,2        |
| <b>maximaler Gesamtfehler</b>         |  |   | <b>1,5</b> |

Es lässt sich für alle vier Attribute eine sehr gute Vorhersagequalität beobachten, die im Rahmen der Genauigkeit der sensorischen Analysen liegt. Eine Vorhersage bzw. Objektivierung der Beschreibung des Mundgefühls ist mit dem vorgestellten System möglich. Das System zeigt sich äußerst robust gegenüber störenden Einflüssen an den Datenschnittstellen bei der Kombination der Teilkomponenten des Hybrids. Eine Variation der „oral viscosity“ als Nachstellung einer solchen Störung erhöht dabei den maximalen Gesamtfehler lediglich von 1,5 auf 1,7.

### **3. Expertensystem zur sensorisch zielgerichteten Produktgestaltung zu entwickelnder Lebensmittel**

Eine Erweiterung des hybriden Systems zur objektivierten Beschreibung des Mundgefühls aus (b) dient dazu, Zielvorgaben hinsichtlich sensorischer Eigenschaften von Lebensmitteln durch gezielte Einstellung von Produktparametern zu erreichen. Aufbauend auf produktbezogenen und experimentellen technologischen Informationen der Arbeitsgruppen Hinrichs (TP1) und Busch-Stockfisch (TP9) erfolgte die Erstellung eines Expertensystems, das bei vorgegebenen sensorischen Eingangsdaten Empfehlungen für konstitutionelle Parameter treffen kann.

#### **Konzeption**

Aufgrund der mathematischen Gegebenheiten erweist es sich als nicht möglich, Daten invers durch künstliche neuronale Netze und Fuzzy-Systeme zu propagieren. Ein Training des hybriden Systems in dieser Richtung ist wegen des fehlenden Determinismus schlecht möglich. Betrachtet man z.B. ein einzelnes Modul des Fuzzy-Systems, so müssten aus einer einzigen Größe vier Größen bestimmt werden. Eine sogenannte Vorwärts-Suche erweist sich hier als Lösungsansatz.

Die Vorwärts-Suche variiert die Eingangsparameter so lange – im vorliegenden Fall die Produktparameter – bis die Ausgangsgrößen – hier das Mundgefühl – das gewünschte Ergebnis liefern. Die möglichen Kombinationen bilden den Suchraum. Aus diesem müssen unter Berücksichtigung von technologischen Randbedingungen die optimalen Eingangsparameter ermittelt werden. Dies erfordert die Anwendung eines Suchalgorithmus zur Bestimmung der optimalen Lösung. In diesem Teilprojekt kam das Simulated-Annealing-Verfahren zum Einsatz.

Das Simulated-Annealing-Verfahren leitet sich von einem Konzept aus der Metallverarbeitung ab: das Anglühen eines Werkstücks und die anschließende kontrollierte Kühlung zum Zweck der Härtung. Die Hitze lässt Atome frei durch das Material wandern. Die langsame Kühlung gibt ihnen die Möglichkeit, eine Konfiguration mit geringerer innerer Energie zu finden. Im Suchalgorithmus entspricht – vereinfacht – die Temperatur der Entfernung von der gewünschten Lösung bestimmt durch eine Fitnessfunktion. Das Wandern des Atoms durch die Schmelze entspricht jeweils einer zufälligen Änderung einer Eingangs- bzw. Prozessgröße. Wird die Temperatur dadurch niedriger, d.h. der Abstand zur ge-

wünschten Lösung sinkt, so wird auf diese Temperatur „abgekühlt“. Das Atom bzw. die Lösung wandert dann von dieser Stelle weiter. Wird die Temperatur durch die Bewegung, d.h. die Änderung einer Eingangsgröße, erhöht oder bleibt gleich, wird ein anderer Parameter zufällig variiert.

Die Lösungssuche benötigt eine sogenannte Fitnessfunktion zur Bewertung der jeweils gerade untersuchten Lösungen. Die Fitnessfunktion ist die mathematische Beschreibung der Fragestellung. Sie soll den Abstand des Ergebnisses der vom Suchalgorithmus aktuell betrachteten Lösung zur gewünschten Lösung ausdrücken. Dazu bietet sich eine Bewertung auf Basis der Bildung einer Fehlerquadratsumme an. Die Fitnessfunktion erhält vom Suchalgorithmus im Sinne der Vorwärts-Suche die Prozessparameter (also Fett-/Proteingehalt und CMV) und vom hybriden Expertensystem das erwartete Mundgefühl und bewertet dann den Vergleich zum gewünschten Mundgefühl. Zum Beispiel ergibt sich für ein Ziel-Mundgefühl von „Cremigkeit“ 6, „Griesigkeit“ 2, „belegend“ 6, „adstringierend“ 3 und „oral viscosity“ 6 folgende Fitnessfunktion (mit C: Cremigkeit, G: Griesigkeit, B: belegend, A: adstringierend, OV: oral viscosity (berechnet über das hybride Expertensystem zur objektiven Beschreibung des Mundgefühls))

$$\text{Fitness} = (C - 6)^2 + (G - 2)^2 + (B - 6)^2 + (A - 3)^2 + (OV - 6)^2$$

Einzelne Komponenten können noch zusätzlich betont werden, z. B. durch die Wahl eines Exponenten = 4 (statt 2). Auch lassen sich durch Einführung von Straftermen oder Strafbedingungen zusätzliche Grenzbedingungen einführen.

### Validierung und Ergebnisse

Zur Validierung der Leistung des Suchalgorithmus wurden Joghurtproben mit bekanntem Mundgefühl und zugeordneten Produktparametern herangezogen. Dem Suchalgorithmus wird das bekannte Mundgefühl vorgegeben und die Aufgabe gestellt, die dazugehörige Produktzusammensetzung vorzuschlagen. Die Beurteilung der Qualität der Vorhersage erfolgt durch einen Vergleich mit der tatsächlichen Zusammensetzung. **Tab. 5** gibt einen Überblick über die Vorhersagequalität für verschiedene Produkte.

Tab. 5: Validierung des Simulated-Annealing-Verfahrens durch Gegenüberstellung der tatsächlichen (zweite, dritte und vierte Spalte) und der vorhergesagten Werte

| Joghurtprobe | Fett [%] | Protein [%] | CMV | Fett [%] | Fehler Fett [%] | Protein [%] | Fehler Protein [%] | CMV  | Fehler CMV |
|--------------|----------|-------------|-----|----------|-----------------|-------------|--------------------|------|------------|
| Produkt A    | 6        | 3,5         | 4   | 5,26     | 0,74            | 3,97        | 0,47               | 3,96 | 0,04       |
| Produkt C    | 0,1      | 4,5         | 4   | 0,55     | 0,45            | 4,22        | 0,28               | 3,78 | 0,22       |
| Produkt D    | 3,5      | 4,5         | 4   | 4,15     | 0,65            | 4,99        | 0,49               | 3,93 | 0,07       |
| Produkt E    | 0,1      | 3,5         | 1,5 | 0,87     | 0,77            | 3,52        | 0,02               | 1,43 | 0,07       |
| Produkt F    | 0,1      | 6           | 1,5 | 1,05     | 0,95            | 5,75        | 0,25               | 1,82 | 0,32       |
| Produkt G    | 6        | 3,5         | 0,7 | 5,72     | 0,28            | 4,19        | 0,69               | 1,06 | 0,36       |
| Produkt H    | 6        | 6           | 0,7 | 5,91     | 0,09            | 5,94        | 0,06               | 0,88 | 0,18       |
| Produkt I    | 6        | 4,5         | 1,5 | 8,27     | 2,27            | 3,96        | 0,54               | 1,79 | 0,29       |
| Produkt J    | 12       | 4,5         | 4   | 10,98    | 1,02            | 4,70        | 0,20               | 3,71 | 0,29       |
| Produkt K    | 0,1      | 4,5         | 0,7 | 0,33     | 0,23            | 4,55        | 0,05               | 0,79 | 0,09       |
| Produkt L    | 12       | 4,5         | 0,7 | 11,81    | 0,19            | 4,45        | 0,05               | 0,73 | 0,03       |
| Produkt M    | 12       | 3,5         | 1,5 | 11,19    | 0,81            | 4,05        | 0,55               | 1,56 | 0,06       |
| Produkt N    | 12       | 6           | 1,5 | 11,69    | 0,32            | 5,39        | 0,61               | 1,34 | 0,16       |

Aus den Werten in der Tabelle ist ersichtlich, dass das erweiterte hybride Expertensystem aus gegebenen sensorischen Attributen eine gute Vorhersage bezüglich der notwendigen Produktzusammensetzung leisten kann. Das mit Suchalgorithmen erweiterte hybride Expertensystem befindet sich in der Lage, zielgerichtet konkrete Aufgaben des Produktdesigns zu unterstützen. Übergibt man das konkrete Beispiel an den Suchalgorithmus: „Welcher Proteingehalt und welches CMV ist für einen Low-Fat-Joghurt (0,1% Fett), bei möglichst hoher „Cremigkeit“ und „oral viscosity“, möglichst niedrigem Attribut „belegend“ und „adstringierend“ sowie mittlerer „Griesigkeit“ zu wählen?“, so resultiert folgendes Ergebnis: Protein 6,0; CMV 4,0 (erwartete sensorische Attribute: Cremigkeit: 4,9; oral viscosity 8,9; Griesigkeit 0,5; belegend 4,6; adstringierend 0,9).

Diese Vorschläge zur Produktzusammensetzung und Vorhersagen zu erwartender sensorischer Eigenschaften unterstützen die Suche der Produktentwickler nach relevanten Parameterbereichen und ihren Auswirkungen auf die Sensorik. Die finale, jedoch nun im Aufwand stark reduzierte sensorische Produkt-/Qualitätskontrolle übernimmt dann wieder ein Sensorikpanel.



## Zusammenfassung

Das vorliegende Teilprojekt untersuchte mithilfe numerischer Simulationen das mechanisch induzierte Mundgefühl beim Verzehr von fettreduzierten, nicht stückigen, fließfähigen Lebensmitteln (z.B. Joghurt). Des Weiteren standen eine Objektivierung sensorischer textueller Eindrücke sowie deren Vorhersage im Fokus des Projektes. Hierzu bedurfte es 1.) der Ermittlung der das mechanisch induzierte Mundgefühl verursachenden Fließvorgänge beim Verzehr fettreduzierter, nicht stückiger, fließfähiger Lebensmittel mittels numerischer Simulationen, 2.) der Erarbeitung eines hybriden Systems zur objektivierten Beschreibung des Mundgefühls und 3.) darauf aufbauend der Entwicklung eines Expertensystems zur sensorisch zielgerichteten Produkt- und Prozessgestaltung zu entwickelnder Lebensmittel. Die Verknüpfung sensorischen, technologischen und strömungsmechanischen Wissens basiert auf einer engen Zusammenarbeit mit humanensorisch orientierten Forschungsstellen des Clustervorhabens (Busch-Stockfisch, TP9, (Hochschule Hamburg)) sowie Forschungsstellen aus der Technologie und Verfahrenstechnik (Hinrichs, TP1, (Universität Hohenheim), Schuchmann, TP2, (Universität Karlsruhe)).

Mithilfe numerischer Simulationen des Schluckvorgangs wurde für unterschiedliche Produktklassen eine Charakterisierung der daraus resultierenden mechanischen Belastungen des Mundinnenraums (Zunge, Gaumen) erarbeitet. Die Produkte deckten dabei eine Spanne von leichtviskosen Newtonschen Modelllebensmitteln (z.B. Wasser) bis hin zu hochviskosen nicht-Newtonschen Lebensmitteln (Joghurtproben unterschiedlicher Fettgehalte von 0,1% bis 10%) ab. Numerische Simulationen in einer Modellmundhöhle ermitteln und visualisieren die im Mund ablaufenden Fließvorgänge von Lebensmitteln sowie Normal- und Scherspannungen, die an den Mechanorezeptoren einen Reiz auslösen. Diese Größen wurden in charakteristischen strömungsmechanischen Kennzahlen (z.B. Reynoldszahl, Deborahzahl, Beschleunigungs-, Druck- und Reibungskräfte) abgebildet. Die Analyse des Strömungsfeldes hinsichtlich der induzierten mechanischen Spannungen erfolgt einzeln in voneinander unabhängigen Bereichen auf der Zungenoberfläche, um so einen „Fingerprint“ der mechanischen Spannungsverteilung und somit in einem vereinfachten System eine Objektivierung der mechanischen Vorgänge bei der sensorischen Wahrnehmung zu erhalten. Es konnte unter anderem gezeigt werden, dass die Bereiche der stärksten mechanischen Belastung in der Nähe des Rachens liegen.

Diese Erkenntnisse zu zonenspezifischen mechanischen Belastungen wurden mit experimentell bestimmten sensorischen, textuellen Daten der Gruppe Busch-Stockfisch (TP9) und rheologischen und technologischen Daten der Gruppe Hinrichs (TP1) korreliert. Systeme wie die sensorische Texturwahrnehmung, bei denen eine hohe Komplexität vorliegt und die sich nicht mittels mathematischer Gleichungen beschreiben lassen, können sich zur Vorhersage kognitiver Algorithmen bedienen. Dieses Vorhaben setzte im Wesentlichen künstliche neuronale Netze und ein hybrides Neuro-Fuzzy-System ein. Künstliche neuro-

nale Netze (KNN) sind mathematische Algorithmen, die - ähnlich wie bei einem Lernvorgang eines Menschen - aus Datensätzen (Eingangs- und Ausgangsdaten) Zusammenhänge über ein Training erlernen. Hierbei werden Verknüpfungen und Gewichtungen zwischen sogenannten Neuronen innerhalb des Trainings bestimmt. Nach erfolgreichem Training, das durch eine Validierung mit realen, noch dem System unbekanntem Daten bestätigt wird, ist das KNN in der Lage, aus Eingangsdaten Vorhersagen über Ausgangsdaten zu treffen. Ein Neuro-Fuzzy-System bedient sich wie ein künstliches neuronales Netz einem Training mit vorhandenen Daten. Zudem kommen im Fuzzy-Anteil aber noch von Experten formulierte Regeln zum Einsatz, welche die Form einer Wenn-Dann-Logik besitzen. Diese Regeln wurden von den Gruppen Busch-Stockfisch und Hinrichs zur Verfügung gestellt.

Es konnte gezeigt werden, dass ein KNN, das als Eingangsdaten mechanische Kenngrößen der numerischen Simulation (zonenspezifische Schubspannungen auf der Zunge) erhalten hat, für ein spezifisches Produkt sehr gute Vorhersagen über das sensorische Attribut „oral viscosity“ treffen konnte. Die Erweiterung mit den Experten-Regeln in Form des hybriden Neuro-Fuzzy-Systems (= hybrides Expertensystem) konnte sehr gute Vorhersagen zu „Cremigkeit“, „Grießigkeit“, „adstringierend“ und „belegend“ erstellen. Das gesteckte Ziel einer objektivierten Beschreibung des zu erwartenden Mundgefühls konnte somit basierend auf strömungsmechanisch induzierten Belastungen des Mundinnenraums mittels eines hybriden Systems erreicht werden. Die Ergänzung des hybriden Expertensystems um Suchalgorithmen und Optimierungsverfahren führte zudem dazu, auch umgekehrt gezielt für vorgegebene sensorische Anforderungen Produktzusammensetzungen vorschlagen zu können. Die Validierung zeigte auch hierfür eine sehr gute Vorhersagegenauigkeit. Dies zeigt, dass das erstellte hybride Expertensystem ein hohes Potential besitzt, Sensorikpanels und Produktentwickler in der Praxis bei der Auswahl von erfolgversprechenden Sensorik-Produkt-/Prozessparameter-Kombinationen zu unterstützen.

## Literatur

- [1] Rauh C, Singh J, Nagel M, Delgado A (2012). Objective analysis and prediction of texture perception of yoghurt by hybrid neuro-numerical methods. *International Dairy Journal*, 26 (1), 2-14.
- [2] Shama F, Sherman P (1973). Identification of stimuli controlling the sensory evaluation of viscosity. *Journal of Texture Studies*, 4, 111-118.
- [3] Zur K B, Genden E M, Urken M L (2004). Sensory topography of the oral cavity and the impact of free flap reconstruction: a preliminary study. *Head and Neck*, 26, 884-889.

---

Im Rahmen des DFG/AiF-Clusters „Fettwahrnehmung und Sättigungsregulation: Ansatz zur Entwicklung fettreduzierter Lebensmittel“ wurde das Teilprojekt 8 des Forschungskreises der Ernährungsindustrie e.V. (FEI) über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung und -entwicklung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.

## Summary Sub-Project 8

### Simulation and prediction of mechanically induced mouthfeel during consumption of low-fat, non-lumpy food capable of flowing

The present sub-project investigated by means of numerical simulations the mechanically induced mouth feel during the intake of fat reduced foods, that are capable of flowing and are not containing pieces (e.g. yoghurt). Furthermore, objectification as well as prediction of sensorial textural perception is in the focus of the project. For this purpose it was required to 1.) determine by numerical simulations the flow processes during the intake of fat reduced foods, that are capable of flowing and are not containing pieces, leading to the mechanically induced mouth feel, 2.) generate a hybrid system for the objectified description of the mouth feel, and based on this 3.) develop an expert system for the targeted sensorial product and process design of newly developed foods. The connection of sensorial, technological, and fluid mechanical knowledge was based on a close cooperation with human sensorial oriented groups of the present cluster project (Busch-Stockfisch (HAW Hamburg)) and groups working on technological and process engineering aspects (Hinrichs (Universität Hohenheim), Schuchmann (KIT)).

Numerical simulations of the swallowing process characterize the resulting mechanical stresses at the inner mouth surface (tongue, palate) for different product classes. The products range from low-viscous Newtonian model foods (e.g. water) to high-viscous non-Newtonian foods (yoghurt probes with different fat content of 0.1% up to 10%). The numerical simulations in an oral cavity model quantify and visualize the present flow processes of the foods as well as normal and shear stresses in the mouth leading to stimuli at the mechano receptors. These quantities are expressed in terms of characteristic fluid mechanical numbers (e.g. Reynolds number, Deborah number, and acceleration, pressure, and friction forces). The analysis of the flow field regarding the induced mechanical stresses takes place in independent areas at the tongue surface. By this, a "finger print" of the mechanical stress distribution is gained and, therefore, an objectification of the mechanical effects related to the sensorial perception in a simplified system. Amongst others, it could be shown that the areas facing the highest mechanical load are located near the throat.

The findings regarding zone specific mechanical stresses were correlated with experimentally determined sensorial texture perception data of the group Busch-Stockfisch and rheological and technological data of the group Hinrichs. In processes like the sensorial texture perception, that feature a high complexity and, therefore, do not allow a mathematical equation based description, cognitive algorithms can be applied for prediction purpose. This sub-project used

mainly Artificial Neural Networks (ANN) and a hybrid Neuro-Fuzzy-system. Artificial Neural Networks are mathematical algorithms, that – similar to the learning procedure of humans – learn relations in data sets (input and output data) by a training step. During this training step connections and weight factors are determined between so called neurons. After a successful training a validation - by real data that have not been introduced into the ANN before – proves the ability of the ANN to predict output data based on input data. Similar to the ANN, the Neuro-Fuzzy-system is based on training with available data. Additionally, the Fuzzy-part includes rules formulated by experts. These rules follow an IF-THEN-logic. These rules have been provided, here, by the groups Busch-Stockfisch and Hinrichs.

It could be shown, that an ANN having mechanical quantities of the numerical simulations (zone specific shear stresses at the tongue) as input data gives very good predictions of the sensorial attribute “oral viscosity” for a specific product. Furthermore, the extension by the expert rules in terms of the Neuro-Fuzzy-system (= hybrid expert system) leads to a high prediction quality of the attributes “creaminess”, “heterogeneity”, “adstringency”, and “mouthcoating”. The target of an objectified description of the expected mouth feel has been reached based on the fluid mechanical induced stresses at the inner mouth surface by a hybrid system. Additionally, the extension of the hybrid expert system by searching algorithms and optimization approaches resulted in the targeted proposition of product compositions based on given sensorial constraints. The validation proves also for this case good prediction accuracy. It can be concluded that the developed hybrid expert system possesses a high potential to assist sensorial panels and product development in practical applications in the selection of promising sensory-product/process parameter-combinations.



## Teilprojekt 9 (AiF)

# Analytische und konsumentenorientierte sensorische Untersuchungen und Wahrnehmungen an ausgewählten Matrices und Lebensmitteln mit unterschiedlichen Fettgehalten (AiF 15963 N)

**Prof. Dr. Mechthild Busch-Stockfisch**

**Dipl. oec. troph. Maja Tomaschunas**

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg

Fakultät Life Sciences

Department Ökotrophologie

## Einführung

Mit steigendem Gesundheitsbewusstsein steigt auch die Nachfrage nach fettreduzierten Lebensmitteln mit hoher Qualität, welche den normal fetthaltigen Produkten in ihrer sensorischen Qualität in nichts nachstehen. Fett übt jedoch entscheidenden Einfluss auf die sensorischen Eigenschaften (Aussehen, Geschmack und Textur) von Lebensmitteln sowie auf deren Akzeptanz beim Konsumenten aus [1]. Die Wahrnehmung von Fett in Lebensmitteln ist jedoch produktabhängig [2, 3]. Demnach ist zu untersuchen, wie sich Fett bzw. eine Fettreduzierung in bestimmten Lebensmittelmatrices auf die sensorischen Eigenschaften sowie die Konsumentenakzeptanz auswirkt.

Im Rahmen des Clustervorhabens sollte im Teilprojekt 9 festgestellt werden, inwieweit sich Fett, Fettreduzierung und unterschiedliche Methoden zur Fettreduzierung auf das sensorische Profil (Aussehen, Geruch, Geschmack und Textur) von ausgewählten Produkten auswirken. Hierfür wurde ein sensorisches Prüferpanel nach DIN-Norm aufgebaut [4], welches im Laufe des Forschungsprojektes insbesondere darauf geschult wurde, unterschiedlich fetthaltige Produkte sensorisch zu bewerten. Auch die Konsumentenakzeptanz wurde zum Teil untersucht. Des Weiteren wurde die Methodik der Langzeitakzeptanz-Messung angewandt, um zu untersuchen, ob bzw. wie sich der Fettgehalt eines Lebensmittels langfristig auf die Konsumentenakzeptanz auswirkt. Untersucht wurden insbesondere fett-haltige und unterschiedlich fettreduzierte Produkte aus dem Bereich Milch- und Milchprodukte (Joghurt, Pudding) sowie Modellsubstanzen (Emulsionen).

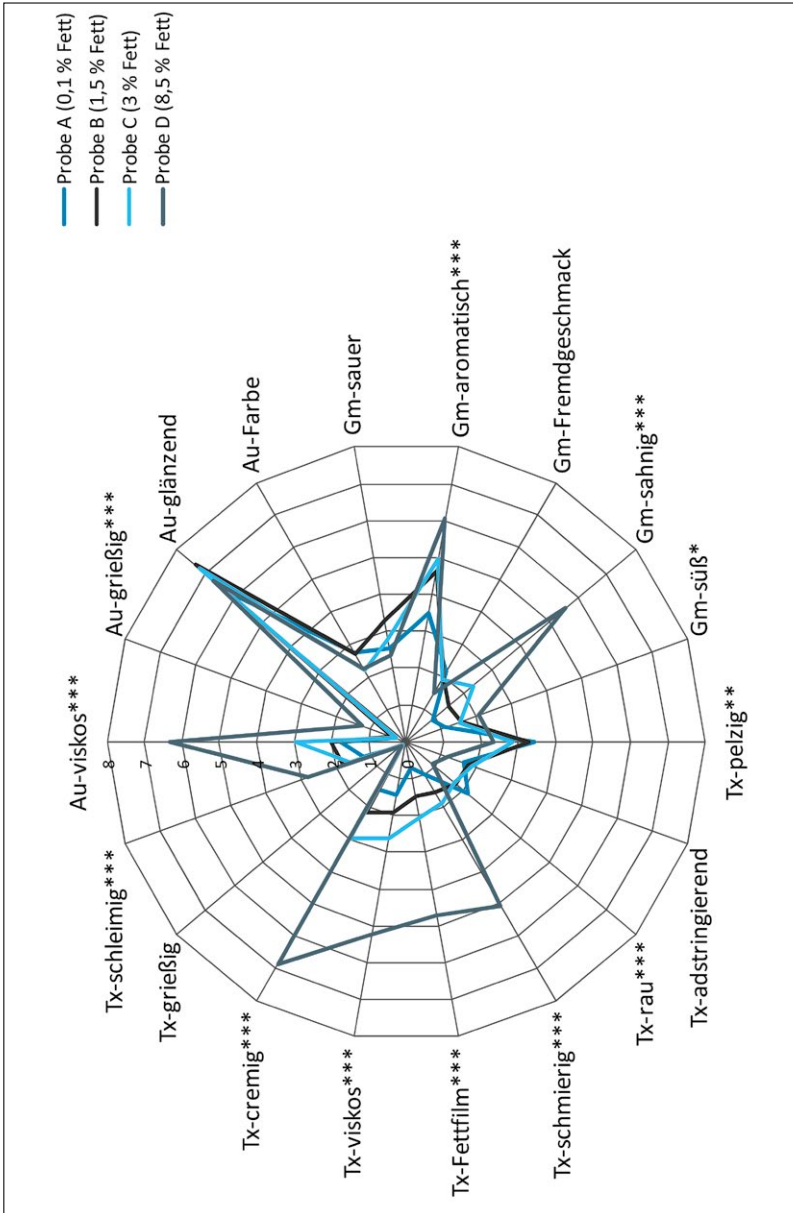


Abb. 1: Sensorisches Profil von Naturjoghurts unterschiedlichen Fettgehalts.

Au = Aussehen, Gm = Geschmack, Tx = Textur

\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ .



## Einfluss von Fett auf die sensorischen Eigenschaften von Naturjoghurt

Durch ihre geschmacklichen Eigenschaften sowie ihren ernährungsphysiologischen Nutzen ist der Konsum fermentierter Milchprodukte, wie beispielsweise Naturjoghurt, in den letzten Jahren stark gestiegen [5]. Die Konsumentenakzeptanz von Milchprodukten wird stark durch ihre textuellen Eigenschaften sowie durch ihren Fettgehalt beeinflusst [6; 7].

Im Rahmen des Clusterprojektes wurden Joghurts mit variierendem Fettgehalt (0,1 %, 1,5 %, 3,0 % und 8,5 %) hergestellt (AK Hinrichs, Teilprojekt 1) und sensorisch mittels konventioneller Profilprüfung [8] untersucht. Die statistische Auswertung erfolgte durch Anwendung von Varianzanalyse (ANOVA) und Tukey-Test ( $P < 0.05$ ) zur Bestimmung signifikanter Unterschiede zwischen den vier Proben (**Abb. 1**).

In den Attributen glänzend, Farbe, sauer, Fremdgeschmack, adstringierend und grießig (Textur) konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Joghurts unterschiedlichen Fettgehalts festgestellt werden. Zusammenfassend kann für die Attribute viskos (Aussehen und Textur), aromatisch, sahnig, Fettfilm und cremig geschlossen werden, dass die Intensitäten hier mit steigendem Fettgehalt jeweils anstiegen. In der optischen und textuellen Viskosität stieg die Intensität mit steigendem Fettgehalt zwar an, jedoch konnte kein Unterschied zwischen den Joghurts mit 0,1 % und 1,5 % Fett festgestellt werden. Der Joghurt mit 8,5 % Fett war signifikant grießiger (Aussehen), schmieriger und schleimiger als die anderen drei Proben. Im Geschmacksattribut aromatisch traten signifikante Unterschiede auf zwischen den Proben mit 0,1 % und 3,0 % Fett, den Proben mit 0,1 % und 8,5 % Fett sowie zwischen den Proben mit einem Fettgehalt von 1,5 % und 8,5 %. Im sahnigen Geschmack, Fettfilm und in der Cremigkeit gab es keinen Unterschied zwischen den Fettgehalten 0,1 % und 1,5 %, sowie zwischen 1,5 % und 3,0 %. In der Süße zeigte der Joghurt mit 8,5 % Fett lediglich zur Probe mit 0,1 % Fett einen signifikanten Unterschied.

In den Attributen pelzig und rau hingegen sanken die Intensitäten mit steigendem Fettgehalt, wobei lediglich signifikante Unterschiede zwischen den beiden Proben mit geringstem Fettgehalt (0,1 % und 1,5 %) im Vergleich zum Joghurt mit 8,5 % Fett auftraten.

Insgesamt traten Unterschiede insbesondere zwischen Proben mit großen Unterschieden im Fettgehalt auf.

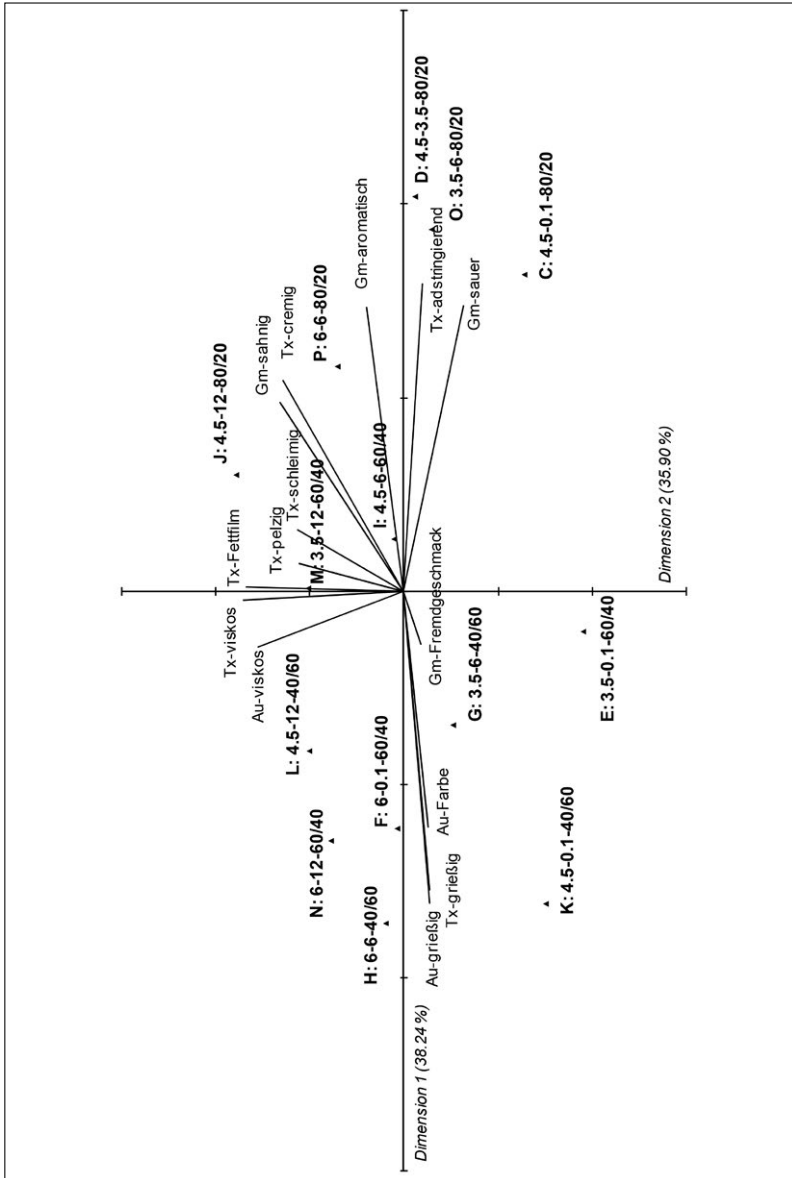


Abb. 2: HKA-Biplot nach Varimax-Rotation.

Die Proben sind in der Reihenfolge Probenbezeichnung, Proteingehalt, Fettgehalt und CMV (Casein-Molkenprotein-Verhältnis) dargestellt.

Au = Aussehen, Gm = Geschmack, Tx = Textur.

## Einfluss von Fett, Protein und des Casein-Molkenprotein-Verhältnis auf die sensorischen Eigenschaften von Naturjoghurt

Das Zusetzen von Milchinhaltsstoffen, wie beispielsweise Protein oder Molkenprotein, stellt eine Alternative zur Beeinflussung der Textur von Milchprodukten dar. In dieser Studie wurde untersucht, wie sich Variationen des Fett- und Proteingehalts sowie des Casein-Molkenprotein-Verhältnisses (CMV) auf die sensorischen Eigenschaften von Naturjoghurt auswirken und wie diese in Wechselwirkung miteinander stehen. Des Weiteren wurde untersucht, ob die Intensitäten in fettbezogenen Eigenschaften mittels Variation von Proteingehalt und CMV erhöht werden können.

Es wurden 14 unterschiedliche Naturjoghurts mit variierendem Proteingehalt (4,5 - 6,0%), Fettgehalt (0,1 - 12,0%) und Casein-Molkenprotein-Verhältnis (CMV) (80/20, 60/40 und 40/60) hergestellt (AK Hinrichs, Teilprojekt 1), welche bereits bzgl. ihrer mikrostrukturellen und physikalischen Eigenschaften untersucht wurden [9].

Zur sensorischen Untersuchung wurde die konventionelle Profilprüfung angewandt [4]. Mittels ANOVA und Tukey-Test wurden signifikante Unterschiede zwischen den Proben ermittelt. Durch Anwendung der Clusteranalyse wurden die 14 Joghurts in Gruppen ähnlicher sensorischer Eigenschaften eingeteilt. Mittels Hauptkomponentenanalyse (HKA) wurden die Ergebnisse der sensorischen Untersuchung verdeutlicht und in einem Biplot abgebildet (Abb. 2).

ANOVA und Tukey-Test ergaben signifikante Unterschiede in allen abgefragten Attributen. Die Clusteranalyse teilte die Joghurts in vier Cluster ein. Cluster 1 (Proben A, C und D) beinhaltet Proben mit hohem CMV (80/20). Hingegen bestanden Cluster 2 (Proben E, G und K) und Cluster 3 (Proben F, H und N) aus Joghurts mit niedrigeren CMVs (60/40 und 40/60), wobei die Joghurts in Cluster 3 zusätzlich hohe Proteingehalte (6,0%) aufwiesen. Cluster 4 (Proben B, I, J, L und M) war durch Proben mit höherem Fettgehalt (6,0% und 12,0%) charakterisiert.

Bei einer Gesamtvarianz der HKA von 74,1% erklärte Dimension 1 38,2% und Dimension 2 35,9% der Varianz (Abb. 2).

Die Attribute grießig (Aussehen und Textur) sowie Farbe korrelierten negativ mit der ersten Dimension, wobei die „typisch Joghurt“-Attribute adstringierend, sauer und aromatisch positiv mit der ersten Dimension korrelierten. Die zweite Dimension war charakterisiert durch die fettbezogenen Attribute cremig, sahnig, viskos (Aussehen und Textur) und Fettfilm, welche positiv mit ihr korrelierten.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Proben aus Cluster 1 (hoher CMV) die höchsten Intensitäten in den „typisch Joghurt“-Attributen aufwiesen, sowie die geringsten Intensitäten in der Grießigkeit und der Farbe. In den fettbezogenen Attributen zeigten sie mittlere Ausprägungen. Im Gegensatz dazu

waren die Proben aus Cluster 2 (geringeres CMV) und Cluster 3 (geringeres CMV, hoher Proteingehalt) durch intensive Grießigkeit, eine intensiv gelbe Farbe sowie geringe Intensitäten in den „typisch Joghurt“-Attributen beschrieben. Die Joghurts aus Cluster 3 zeigten dabei höhere Intensitäten in den fettbezogenen Attributen als die Proben aus Cluster 2. Die Naturjoghurts aus Cluster 4 (hoher Fettgehalt) zeigten sehr hohe Ausprägungen in den fettbezogenen Attributen und niedrige bis mittlere Intensitäten in den „typisch Joghurt“-Attributen sowie in der Grießigkeit und der Farbe.

Weitere Auswertungen mittels gängiger Software zur statistischen Versuchsplanung wurden durchgeführt, um Einflüsse, Wechselwirkungen und die Höhe der Einflüsse zu ermitteln. Dabei wurden CMV, Fett- und Proteingehalt als unabhängige Variablen genutzt und die Faktorladungen der beiden ersten Dimensionen als abhängige Variablen. Die Ergebnisse zeigten bezüglich der Attribute der ersten Dimension signifikante Unterschiede des CMV und Proteingehalts einen quadratischen Effekt des Fettgehalts sowie eine signifikante Wechselwirkung zwischen Fett und CMV. Dabei war der Effekt des CMV etwa zweimal so hoch wie die anderen Effekte. Generell wurden Grießigkeit und Farbe durch steigenden Protein- und Molkenproteingehalt erhöht, während die Intensitäten in den „typisch Joghurt“-Attributen verringert wurden. Fett wirkte sich mittels quadratischen Terms aber auch mittels Interaktion mit dem CMV signifikant aus. Die Interaktion implizierte einen reduzierten Effekt des CMV bei gleichzeitig hohem Fettgehalt. Somit konnten die schwächste Grießigkeit und gelbe Farbe sowie die höchsten Intensitäten in „typisch Joghurt“-Attributen in Joghurts mit hohem CMV und hohem Fettgehalt bestimmt werden. Ein gegensätzlicher Effekt wurde hingegen in Joghurts mit niedrigem CMV und niedrigem Fettgehalt gezeigt.

Bezüglich der Attribute der zweiten Dimension wurden in absteigender Reihenfolge signifikante Effekte von Fett, Protein und CMV ermittelt sowie eine Wechselwirkung zwischen Protein und Fett. Eine Erhöhung von Fett, Protein oder CMV führte zu höheren Intensitäten in fettbezogenen Attributen. Somit zeigten Joghurts mit hohem Fett- und Proteingehalt sowie hohem CMV die höchsten Intensitäten in den Attributen sahnig, cremig, viskos und Fettfilm. Die Wechselwirkung zwischen Protein und Fett ließ darauf schließen, dass der Einfluss von Protein mit steigendem Fettgehalt geringer wurde. Die Intensitäten der Attribute sahnig, cremig, viskos und Fettfilm bei niedrigem bis mittlerem Fettgehalt können durch hohen Proteingehalt erhöht werden. Sehr hohe Intensitäten können jedoch nur durch einen hohen Fettgehalt erreicht werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass hohe Ausprägungen in „typisch Joghurt“-Attributen und geringe Ausprägungen in der Grießigkeit und der gelben Farbe in einem Magermilchjoghurt durch hohen CMV sowie durch niedrigen Proteingehalt erreicht werden können. Intensitäten in fettbezogenen Eigenschaften können durch ein hohes CMV und einen hohen Proteingehalt erzielt werden. Da Grießigkeit jedoch mit steigendem Proteingehalt steigt, wird ein mittlerer Proteingehalt empfohlen.

## Einfluss von Fettgehalt und Fettart auf sensorische Eigenschaften und Konsumentenakzeptanz von Vanillepudding auf Stärkebasis

Vanillepudding ist in Europa ein weitverbreitetes Dessert und ist v.a. wegen seiner sensorischen Eigenschaften beim Konsumenten sehr beliebt [10]. Wegen der relativ geringen Anzahl an Inhaltsstoffen (Milch, Zucker, Dickungsmittel, Farbstoffe und Aroma) und einem dadurch wenig komplexen System stellt Vanillepudding eine geeignete Modells substanz für halb feste Lebensmittel dar.

Anhand dieser Untersuchung wurde der Einfluss der quantitativen aber auch der qualitativen Veränderung von Fett auf die sensorischen Eigenschaften und die Konsumentenakzeptanz von Vanillepudding auf Stärkebasis untersucht. Hierfür wurden sechs unterschiedliche Vanillepuddings hergestellt, die durch Verwendung unterschiedlich fetthaltiger Milch, Zugabe von Sahne oder Zugabe einer Pflanzenfettcreme in Fettart und Fettgehalt (0,1 - 15,8%) variierten. Die sensorische Untersuchung erfolgte mittels konventioneller Profilprüfung [8]. Signifikante Unterschiede in den sensorischen Attributen und der Konsumentenakzeptanz wurden mittels ANOVA und Tukey-Test bestimmt. Eine Hauptkomponentenanalyse (HKA) diente der Verdeutlichung und Visualisierung der Ergebnisse aus der Profilprüfung.

Zwischen den sechs Proben wurden signifikante Unterschiede in allen Attributen, außer Vanillegeruch und Süße, ermittelt. Die Ergebnisse sind, separiert nach Aussehen, Geschmack und Textur, in den Biplots der jeweiligen Hauptkomponentenanalysen abgebildet (Abb. 3, 4 a/b und 5).

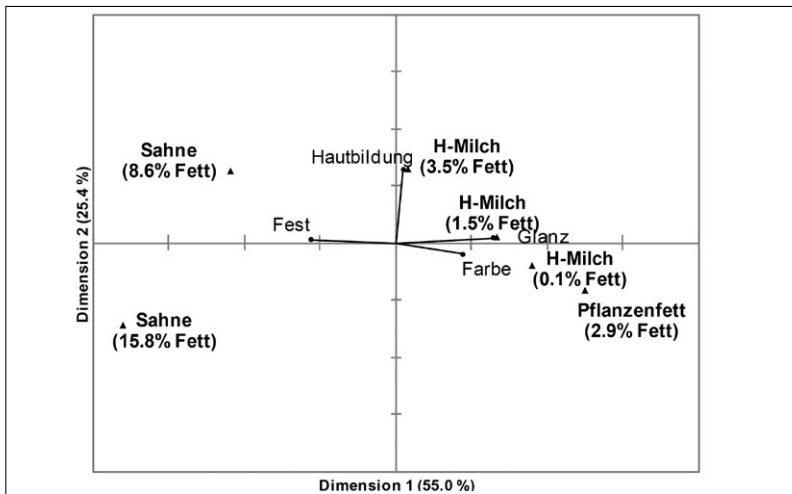


Abb. 3: HKA-Biplot für Attribute des Aussehens.

**Aussehen:** Die Farbintensität (gelb) sank mit steigendem Fettgehalt, jedoch ohne signifikanten Unterschied zwischen den beiden Sahneproben. Bei größeren Unterschieden im Fettgehalt wurden die Proben mit steigendem Fettgehalt matter und optisch fester. In der Hautbildung traten lediglich zwischen den Probe Sahne (15,8% Fett) und den Proben H-Milch (3,5% Fett) und Sahne (8,6% Fett) signifikante Unterschiede auf, wobei Sahne 15,8% Fett eine dünnere Haut aufwies.

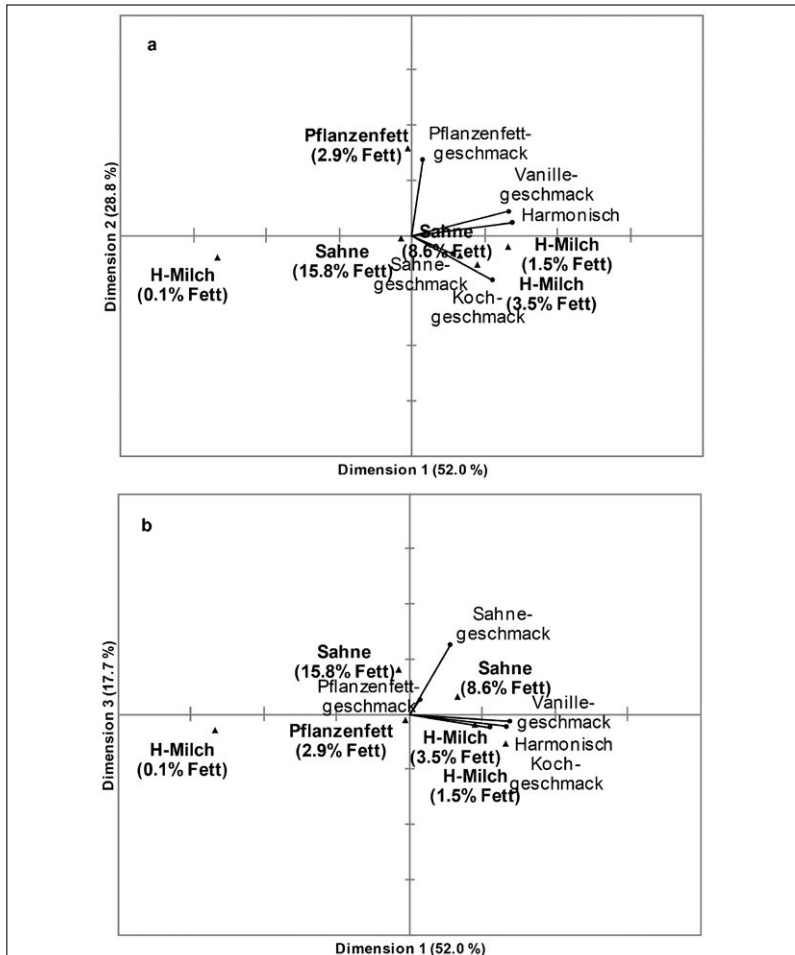


Abb. 4. HKA-Biplot für Geschmacksattribute.

Der Einsatz der Pflanzenfettcreme führte zu einer weniger gelben Farbe und einer optisch weicheren Textur.

**Geschmack:** Durch Zugabe von Sahne stieg auch die Intensität des Sahnegeschmacks. Der Sahnegeschmack war jedoch auch in der Probe H-Milch (3,5% Fett) signifikant intensiver als in der Probe H-Milch (0,1% Fett). Generell waren die Intensitäten in den Attributen Vanillegeschmack, Kochgeschmack und harmonisch in der Probe mit 0,1% Fett signifikant schwächer als in allen anderen Puddingproben.

Die Pflanzenfettcreme sorgte für einen intensiven Pflanzenfettgeschmack und signifikant weniger Kochgeschmack.

**Textur:** Im Attribut gelatineartig zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der H-Milch Probe mit 0,1% Fett und den anderen Proben, wobei diese eine intensiv gelatineartige Textur aufwies. Die Intensitäten in den Attributen schmierig, klebrig und cremig stiegen mit steigendem Fettgehalt an, wobei die größten Unterschiede zwischen den Fettgehalten 0,1% und den weiteren Proben auftraten.

Durch Zugabe der Pflanzenfettcreme wurde die Textur des Puddings cremiger, klebriger, schmieriger und weicher sowie weniger gelatineartig.

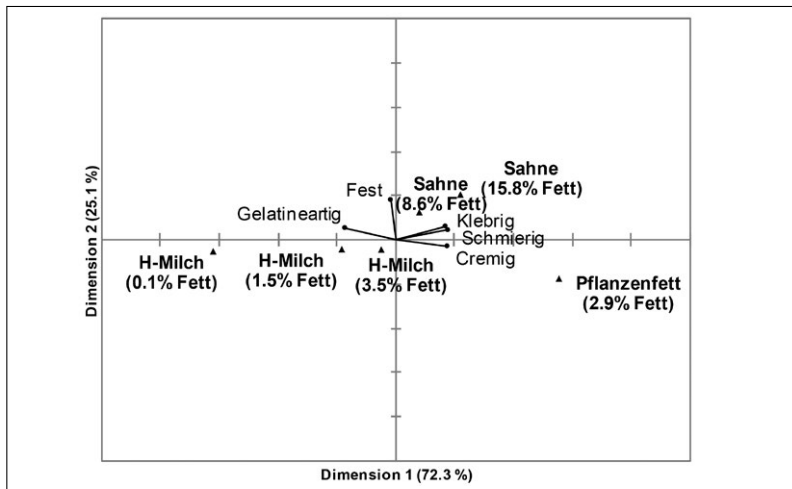


Abb. 5. HKA-Biplot für Texturattribute.

**Konsumentenakzeptanz:** Für die Beliebtheit des Aussehens sowie die Gesamtbeliebtheit konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Proben ermittelt werden. Jedoch traten signifikante Unterschiede in der Beliebtheit des Geschmacks und der Konsistenz auf. Der Geschmack der Proben mit 0,1% und 15,8% Fett war am wenigsten akzeptiert, während die anderen Proben am beliebtesten waren. Die Textur der Probe mit der Pflanzenfettcreme war am beliebtesten, gefolgt von der Sahneprobe mit 8,6% Fett und schließlich den Proben mit

1,5% und 3,5% Fett. Auch hier wurden die Proben mit dem geringsten (0,1%) und höchsten Fettgehalt (15,8%) am wenigsten akzeptiert.

## Einfluss des Fettgehalts auf die Langzeitakzeptanz von Naturjoghurt und Vanillepudding

Langeweile kann ein produktbezogenes Problem sein, welches sich beispielsweise auf einen Produktfehler, das Marketingkonzept, inadäquate Verbraucherbefragungen oder die intrinsischen sensorischen Eigenschaften eines Produktes zurückführen lässt [11]. Es ist sogar möglich, dass eine Eigenschaft, die das Produkt anfangs für den Verbraucher interessant macht, später die Eigenschaft ist, die den Verbraucher langweilt [12]. Um Produktflops zu vermeiden, ist die Messung der Akzeptanz eines Produktes über einen längeren Zeitraum von großer Bedeutung.

Im Rahmen des Forschungsprojektes wurde ein sog. Langweilettest zur Untersuchung der Langzeitakzeptanz von Naturjoghurts und Vanillepuddings mit unterschiedlichen Fettgehalten (Naturjoghurt: 0,1 %, 1,5 %, 3,0 % und 8,5 %; Vanillepudding: 0,1 %, 1,5 %, 2,9 % und 8,5 %) durchgeführt. Dabei sollte untersucht werden, ob bzw. wie sich der Fettgehalt auf die langfristige Akzeptanz zweier unterschiedlicher Produkte auswirkt. Die vier Produkte wurden dabei in zwei voneinander unabhängigen Untersuchungen jeweils über drei Wochen untersucht. Die Proben blieben über den gesamten Versuchszeitraum identisch, jedoch mit variierenden dreistelligen Zufalls-codes, wobei jeder Prüfer je Versuchstag alle vier Produkte beurteilte. Den Konsumenten war jedoch nicht bekannt, dass es sich fortgesetzt um die gleichen Produkte handelte. Es wurden jeweils Fragen zur momentanen Lust auf Naturjoghurt/Pudding, zum Gesamtgefallen sowie zum Gefallen von Aussehen, Geschmack und Konsistenz beantwortet. Abschließend wurde abgefragt, welche der vier Proben am besten gefallen hat. Die statistische Auswertung erfolgte mittels deskriptiver Statistik, Kovarianzanalyse (ANCOVA), Fischer-LSD-Test, Cluster-Analyse und Chi-Quadrat-Test.

**Vanillepudding:** Zusammenfassend war festzustellen, dass die Lust auf Pudding über die Zeit signifikant abnahm. Der Pudding mit 2,9% Fett war sowohl bei den Produktmittelwerten als auch bei der Präferenzabfrage mit 63% Anteil die beliebteste Probe. Der Pudding mit 8,6% Fett lag in den gleichen Kategorien direkt hinter dem Pudding mit 2,9%. Hier lag der Beliebtheitsanteil bei 29%. Über die Zeit nahm der Pudding mit 8,6% teilweise an Akzeptanz zu oder blieb konstant. Auch der Pudding mit 2,9% Fett war in den Bewertungen relativ stabil. Die Proben mit 0,1% und 1,5% Fettgehalt lagen im Gegensatz dazu weit dahinter. Besonders schlecht wurde dabei der Pudding mit 0,1% Fett bewertet, welcher auch über die Zeit deutlich an Akzeptanz verlor.



Aus den berechneten Korrelationen wurde deutlich, dass die Anzahl an negativen Korrelationen mit steigendem Fettgehalt abnahm. Im Gegenzug erhöhte sich mit steigendem Fettgehalt die Anzahl an positiven Korrelationen. Die Lust auf Pudding nahm bei 51 Konsumenten über die Zeit signifikant ab. Mittels Kovarianzanalyse wurde gezeigt, dass sich alle Produkte signifikant voneinander unterschieden. Das Modell und die Produkte waren für jede Variable signifikant und auch die Zeit hatte, mit Ausnahme der Textur, einen signifikanten Einfluss auf die Prüferurteile. Der Wirkungsgrad der Zeit war jedoch relativ gering.

Mittels Clusteranalyse wurde für die Variable Lust auf Pudding eine Einteilung in zwei Cluster vorgenommen. Cluster 1 beinhaltete 57 Personen, die eine abnehmende Lust auf Pudding zeigten. 22 Konsumenten in Cluster 2 wiesen eine konstante Lust auf Pudding auf. Für jedes Produkt konnte eine Unterteilung in drei Gruppen je Variable identifiziert werden. Cluster 1 enthielt die Personen, die eine geringe Korrelation aufwiesen, Cluster 2 beinhaltete die Konsumenten mit positiver Korrelation und Cluster 3 diejenigen mit negativer Korrelation. Der Pudding mit 0,1 % Fett zeigte die größte Anzahl an negativen und die geringste Anzahl an positiven Korrelationen. Die Proben mit 1,5 % und 2,9 % Fett lagen im mittleren Bereich der Bewertungen. Der Pudding mit 8,6 % Fett hatte bei den Attributen Geschmack, Textur und Gesamtgefallen die wenigsten negativen Korrelationen. Insgesamt zeigte er die größte Anzahl positiver Korrelationen.

In den Kontingenztabelle wurde die Variable Lust auf Pudding den vier einzelnen Variablen je Produkt gegenübergestellt. Die so erstellten Kontingenztabelle wurden mit dem Chi-Quadrat-Test auf Signifikanz geprüft. Aus den errechneten p-Werten des Chi-Quadrat-Testes ließ sich schließen, dass keine Abhängigkeit zwischen der abnehmenden Lust auf Pudding und einer veränderten Bewertung nachweisbar ist.

**Naturjoghurt:** Zusammenfassend wurde festgestellt, dass die Lust auf Joghurt über den Verkostungszeitraum kaum abnahm. Der Joghurt mit 8,5 % Fett wurde von den Konsumenten insgesamt am besten bewertet. Nicht nur bei den Produktmittelwerten, auch bei der Präferenzabfrage war er mit 54 % der Prüfpersonen Anteil die beliebteste Probe. Der Joghurt mit 3,0 % Fett lag in den gleichen Kategorien direkt hinter dem Joghurt mit 8,5 %. Hier lag der Beliebtheitsanteil bei 23 % der Prüfpersonen. Über die Zeit nahm der Joghurt mit 8,5 % an Akzeptanz teilweise zu oder blieb konstant. Auch der Joghurt mit 3,0 % war in den Bewertungen stabil. Die Beliebtheit der Proben mit einem Fettgehalt von 0,1 % und 1,5 % war im Vergleich etwas niedriger. Besonders schlecht wurde dabei der Joghurt mit 0,1 % Fett bewertet. Dieser verlor auch über die Zeit deutlich an Akzeptanz, während der Joghurt mit 1,5 % nur sehr leicht an Beliebtheit verlor.

Aus den berechneten Korrelationen wurde deutlich, dass die Anzahl an negativen Korrelationen mit steigendem Fettgehalt abnahm. Im Gegenzug erhöhte sich mit steigendem Fettgehalt die Anzahl an positiven Korrelationen. Einzige Ausnahme davon war der Joghurt mit 0,1 % Fett. Dieser hatte die zweithöchst-

te Anzahl an positiven Korrelationen. Die Lust auf Joghurt nahm lediglich bei 3 Konsumenten über die Zeit signifikant ab. Anhand der Kovarianzanalyse wurde gezeigt, dass sich alle Produkte signifikant voneinander unterschieden. Das Modell und die Produkte waren für jede Variable signifikant. Auch die Zeit hatte, mit Ausnahme des Aussehens, einen signifikanten Einfluss auf die Prüferurteile. Der Einfluss der Zeit auf die Prüferbewertungen war bei den Variablen Gefallen insgesamt und Geschmack am größten.

In der Clusteranalyse wurde für die Variable Lust auf Joghurt eine Einteilung in zwei Cluster vorgenommen. Cluster 1 beinhaltete 33 Personen, die eine abnehmende Lust auf Joghurt zeigten. 32 Konsumenten in Cluster 2 wiesen eine konstante Lust auf Joghurt auf. Für jedes Produkt konnte eine Unterteilung in drei Gruppen je Variable identifiziert werden. Cluster 1 enthielt die Personen, die eine geringe Korrelation aufwiesen, Cluster 2 beinhaltete die Konsumenten mit positiver Korrelation und Cluster 3 die mit negativer Korrelation. Der Joghurt mit 0,1 % Fett zeigte die geringste Anzahl an positiven und, bis auf die Textur, die größte Anzahl an negativen Korrelationen. Die Joghurts mit 1,5 % und 3,0 % lagen im mittleren Bereich der Bewertungen. Der Joghurt mit 8,5 % Fett hatte bei den Attributen Aussehen und Gefallen insgesamt die wenigsten negativen Korrelationen. Insgesamt zeigte er die größte Anzahl positiver Korrelationen.

In Kontingenztabellen wurde die Variable Lust auf Joghurt den vier einzelnen Variablen je Produkt gegenübergestellt. Aus den errechneten p-Werten des Chi-Quadrat-Testes ließ sich schließen, dass keine Abhängigkeit zwischen der abnehmenden Lust auf Joghurt und einer veränderten Bewertung nachweisbar ist. Die p-Werte sanken jedoch mit steigendem Fettgehalt der Produkte ab. Der Joghurt mit 8,5 % Fett hatte einen p-Wert von 0,1. Dieser war zwar nicht signifikant, aber dennoch sehr niedrig und könnte einen Hinweis (Trend) auf einen Einfluss der Lust auf Joghurt auf die Prüferbewertung geben.

**Vergleich der beiden Produkte:** Die generelle Akzeptanz des Vanillepuddings war mit der des Naturjoghurts vergleichbar. Beide wurden gerne bis sehr gerne gegessen. In der Verwendungshäufigkeit lag der Naturjoghurt jedoch weiter vorne. Er wurde zwischen 1mal bis mehrmals pro Woche und 1mal pro Woche bis 1mal pro Monat konsumiert. Der Vanillepudding hingegen wurde vom Großteil der Verbraucher 1mal pro Woche bis 1mal pro Monat verwendet.

Der Abfall des Interesses für das Produkt Vanillepudding war über die Zeit wesentlich größer als für Naturjoghurt. Aufgrund dessen könnte man annehmen, dass Naturjoghurt ein Produkt ist, welches weniger anfällig für Langeweile ist. Trotz des relativ stabilen Interesses für das Produkt war die aufkommende Langeweile anhand der berechneten Korrelationen beim Naturjoghurt jedoch nicht geringer als beim Vanillepudding. Ein Zusammenhang zwischen der abnehmenden Lust auf das Produkt und den Konsumentenurteilen konnte demnach nicht nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der durchgeführten Versuche waren ein Indiz dafür, dass das Aufkommen von Langeweile unabhängig von dem angegebenen Interesse an dem Produkt ist. Die Abnahme der Akzeptanz über die Zeit war bei beiden Tests relativ gleich. Die Produkte mit dem geringsten Fettgehalt verloren am meisten an Beliebtheit. Die mit 1,5 % Fett verloren ebenfalls an Beliebtheit, jedoch in kleinerem Maß. Der Pudding mit 2,9% Fett und der Joghurt mit 3,0% Fett blieben über die Zeit relativ konstant, während die fettreichsten Produkte sogar teilweise etwas besser bewertet wurden.

Die Produktmittelwerte der Vanillepuddings lagen jedoch wesentlich weiter auseinander als die der Naturjoghurts. Das heißt, dass sich die Naturjoghurts in ihrer Beliebtheit weniger stark voneinander unterschieden als die Vanillepuddings. Das beliebteste Produkt des Langeweiletests mit Pudding war nicht die fettreichste Probe, sondern der Vanillepudding mit 2,9% Fett. Im Gegensatz dazu, war das beliebteste Produkt des Langeweiletests mit Joghurt der fettreichste Naturjoghurt mit 8,5% Fett. Der Schätzwert für die Reliabilität der Beliebtheitsurteile, also die mittlere Rangabweichung beider hier durchgeführten Tests, lag bei 0,06. Dies ist ein Indikator dafür, dass die Prüfer in beiden Versuchsreihen innerhalb des Tests sehr konsistent geurteilt haben.

Die Kovarianzanalyse zeigte für beide Tests ähnliche Ergebnisse. Bei dem Vanillepudding war der Einfluss der Zeit auf die Verbraucherurteile geringer als beim Naturjoghurt. Dies bedeutet, dass die Konsumentenurteile durch die Zeit beim Naturjoghurt wesentlich stärker beeinflusst wurden.

In beiden Versuchsreihen konnten mit Hilfe des agglomerativen hierarchischen Clustering die gleichen Clustereinteilungen vorgenommen werden. Die damit ermittelten Daten waren mit den Ergebnissen aus den berechneten Korrelationen vergleichbar. Auch hier kann die Aussage getroffen werden, dass sich mit steigendem Fettgehalt der Produkte ihre aufkommende Produktlangeweile verringerte. Anhand des Chi-Quadrat Tests konnte für beide Produkte nicht nachgewiesen werden, dass die Abnahme der Beliebtheit durch eine geringere Lust auf das Produkt erklärt werden kann. Lediglich beim Joghurt mit 8,5% Fett konnte eine Tendenz dafür erkannt werden, dass die abnehmende Lust auf Joghurt die Beliebtheitsurteile beeinflusst.

Die Ergebnisse zeigen, dass der Fettgehalt eines Produktes einen starken Einfluss auf die Entstehung von Langeweile hat. Je geringer der Fettgehalt, desto eher leidet ein Produkt hier unter Langeweile. Durch Fettreduktion steigt also die Tendenz zur Langeweile. Die Unterschiede zwischen einem Produkt mit 3,0% und einem mit 8,5% Fett waren jedoch nicht sehr groß. Die größten Unterschiede traten somit zwischen non-fat- und höher fetthaltigen Produkten auf. Die Produkte mit 2,9% bzw. 3,0% Fett waren relativ stabil gegen aufkommende Produktlangeweile, nahmen über die Zeit jedoch nicht an Beliebtheit zu.

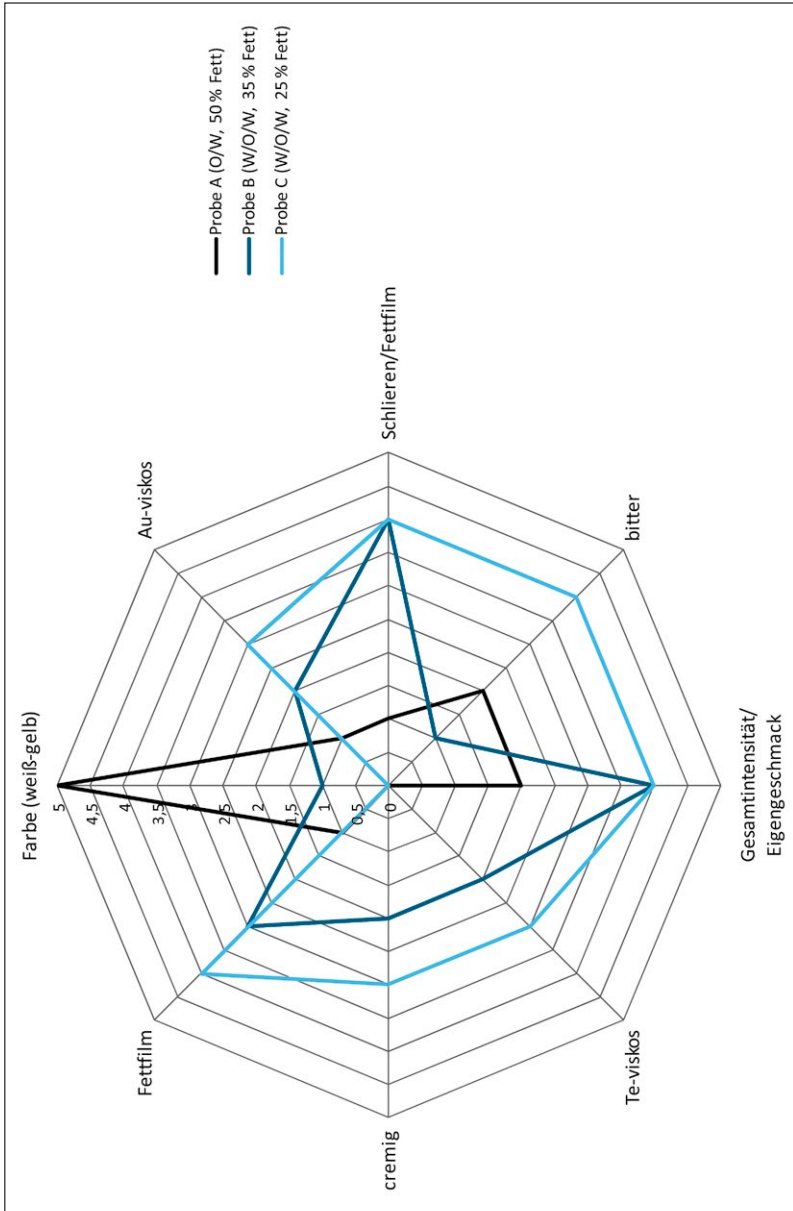


Abb. 6: Ergebnisse der Konsensprofilprüfung (Spiderweb-Diagramm) zum Vergleich von O/W- und W/O/W-Emulsionen.

## Vergleich ausgewählter Eigenschaften von Einfach- und Doppelemulsionen

Mit dem Hintergrund, dass die Herstellung von Doppelemulsionen eine Möglichkeit zur Fettreduzierung darstellt, da damit Eigenschaften in fettbezogenen Textureigenschaften erhöht werden können, wurden entsprechende Untersuchungen mit Einfach- und Doppelemulsionen im Vergleich durchgeführt. Die Proben wurden im AK Schuchmann (Teilprojekt 2) hergestellt und schließlich mittels Paarweiser Vergleichsprüfung [13] sowie Konsensprofilprüfung [14] sensorisch untersucht. Ziel der Untersuchungen war die Bestimmung sensorischer Unterschiede zwischen einer einfachen (O/W) und zweier Doppelemulsionen (W/O/W).

Mittels Paarweiser Vergleichsprüfung wurden die folgenden Proben untersucht:

**Probe A** Einfache O/W-Emulsion (50 % Fett)

**Probe B** Doppelemulsion 1 W/O/W (verdünnt, 23,3 % Fett)

**Probe C** Doppelemulsion 2 W/O/W (verdünnt, 18,8 % Fett)

Hierbei wurden die beiden Doppelemulsionen in ihrer Viskosität an die Viskosität der Probe A angepasst und somit verdünnt. Alle drei Proben wurden jeweils miteinander verglichen, wobei jeweilig die Attribute Cremigkeit, Viskosität und Fettfilm beurteilt wurden.

Die Ergebnisse der paarweisen Vergleichsprüfung zeigten, dass die Proben trotz unterschiedlicher Fettgehalte keine Unterschiede in der Viskosität, der Cremigkeit und dem Fettfilm aufwiesen. Da die beiden Doppelemulsionsproben deutlich geringere Fettgehalte aufwiesen als die einfache Emulsion und hier trotz dieser Unterschiede im Fettgehalt keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden konnten, sprechen die Ergebnisse für die Vorteile der Herstellung von Doppelemulsionen.

Folgende Proben wurden mittels Konsensprofilprüfung (sechstufige Kategorieskala) untersucht:

**Probe A** Einfache O/W-Emulsion (50 % Fett)

**Probe B** Doppelemulsion 1 W/O/W (unverdünnt, 35 % Fett)

**Probe C** Doppelemulsion 2 W/O/W (unverdünnt, 25 % Fett)

Die Viskosität der Doppelemulsionsproben wurde hier nicht verändert.

Die Ergebnisse zeigten deutliche Unterschiede zwischen den drei Emulsionen auf (**Abb. 6**). Im Attribut Farbe zeigte die einfache Emulsion (Probe A) eine deutlich gelbere Farbe als die beiden Doppelemulsionsproben auf. Probe B unterschied sich zu Probe C mit einem Skalenpunkt und wurde dabei als etwas gelber eingestuft. In der optischen sowie textuellen Viskosität wurde Probe A als dünnflüssigste Probe beurteilt, gefolgt von Probe B und Probe C, die sich ebenfalls voneinander unterschieden. Im Attribut Schlieren/Fettfilm unterschieden sich

die Proben B und C nicht voneinander. Probe A hingegen zeigte deutlich weniger Fettfilm/Schlieren. Probe B wies die am wenigsten intensive Bitterkeit auf, gefolgt von Probe A und Probe C. Im Eigengeschmack konnte zwischen den Proben B und C kein Unterschied festgestellt werden. Probe A schmeckte hingegen deutlich fader. Die Cremigkeit und die Intensität des Fettfilms stiegen von Probe A zu Probe B und zu Probe C an.

Die Ergebnisse der Konsensprofilierung stützen die Ergebnisse der paarweisen Vergleichsprüfung. Die beiden Doppelemulsionsproben zeigten trotz geringerer Fettgehalte als die einfache Emulsion höhere Intensitäten in fett- bzw. textur-relevanten Attributen (Viskosität, Cremigkeit, Fettfilm). Hierbei wurde die fett-ärmste Probe C in den abgefragten Attributen sogar als intensiver eingestuft, was für die Herstellung von Doppelemulsionen spricht.

## Literatur

- [1] Drewnowski, A. (1987). Fats and food acceptance: Sensory, hedonic and attitudinal aspects. In: J. Solms, D.A. Booth, R.M. Pangborn, & O. Raunhardt (Eds.), Food acceptance and nutrition (pp. 189-204). New York: Academic Press.
- [2] Drewnowski, A., Shraer, E.E., Lipsky, C., Stellar, E. & Greenwood, M.R.C. (1989). Sugar and fat: Sensory and hedonic evaluation of liquid and solid foods. *Physiology & Behaviour* 45, 177-183.
- [3] Mela, D. & Sacchetti, D.A. (1991). Sensory preferences for fat: relationships with diet and body composition, *Am. J. Clin. Nutr.* 53, 908-915.
- [4] DIN 10961:1996-08. Schulung von Prüfpersonen für sensorische Prüfungen.
- [5] Kaminarides, S., Stamou, P. & Masouras, T. (2007). Comparison of the characteristics of set type yoghurt made from ovine milk of different fat content. *International Journal of Food Science and Technology*, 42, 1019-1028.
- [6] Frost, M.B. & Janhoj, T. (2007). Understanding creaminess. *International Dairy Journal*, 17, 1298-1311.
- [7] Folkenberg, D.M. & Martens, M. (2003). Sensory properties of low fat yoghurts. Part B: Hedonic evaluations of plain yoghurts by consumers correlated to fat content, sensory profile and consumer attitudes. *Milchwissenschaft*, 58, 154-157.
- [8] DIN 10967-1: 2000-07-01. Sensorische Prüfverfahren - Profilprüfung-Teil 1: Konventionelles Profil.
- [9] Krzeminski, A., Großhable, K., & Hinrichs, J. (2011). Structural properties of stirred yoghurt as influenced by whey proteins. *LWT – Food Science and Technology*, 44, 2134-2140.

- [10] Tárrega, A. & Costell, E. (2007). Colour and consistency of semi-solid dairy desserts: Instrumental and sensory measurements. *J. Food Eng.* 78, 655-661.
- [11] Köster, E.P. & Mojet, J. (2007). Boredom and the reasons why some new products fail. In H. MacFie (Ed.) *Consumer-led food product development*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England, 262-280.
- [12] Moskowitz, H. (2000). Engineering out food boredom: a product development approach that combines home use tests and time-preference analysis. *Food Quality and Preference* 11. 445-456.
- [13] DIN EN ISO 5495:2007-10. Sensorische Analyse – Prüfverfahren - Paarweise Vergleichsprüfung.
- [14] DIN 10967-2:2000-10. Sensorische Prüfverfahren – Profilprüfung – Teil 2: Konsensprofil.

---

Im Rahmen des DFG/AiF-Clusters „Fettwahrnehmung und Sättigungsregulation: Ansatz zur Entwicklung fettreduzierter Lebensmittel“ wurde das Teilprojekt 9 des Forschungskreises der Ernährungsindustrie e.V. (FEI) über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung und -entwicklung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.

## Summary Sub-Project 9

### Analytical and consumption-oriented sensory studies and perceptions on matrices and foods with varying fat contents

Due to the growing consumer interest of energy and fat reduced products, it is necessary to replace fat in food without decreasing the food quality and eating pleasure and this is one of the leading priorities of researchers in the food industry. With the intention of reducing fat in food, a full understanding of the impact of fat on sensory properties in a certain food matrix and how it can be replaced is required. Furthermore, it has to be examined, how fat affects consumer liking.

The objective of the present research project was to evaluate the effect of fat and different ways of fat reduction on sensory properties (and consumer acceptance) of plain stirred yoghurt, model vanilla custards and emulsions.

In a study with stirred yoghurts, varying in fat content (0.1 – 8.5%), results revealed an increasing effect of fat concerning the attributes viscous (appearance and texture), aromatic, creamy flavor, fatty mouth feel and creamy. On the opposite, intensities in texture attributes furred tongue and rough decreased. Attributes surface shine, yellow color, sour, off-flavor, astringent and grainy texture, were unaffected.

An examination of yoghurts varying the milk components fat ( $C_f = 0.1 - 12.0\%$ ), protein ( $C_p = 3.5 - 6.0\%$ ) and casein-to-whey protein ratio ( $c/w = 80/20, 60/40$  and  $40/60$ ) showed decreasing effects concerning the attributes aromatic, sour and astringent, and increasing effects regarding graininess and yellow color, with decreasing  $c/w$  and increasing  $C_p$ . An enhancement of  $C_f$  reduced the effect of  $c/w$ . Fat-related properties, creamy taste and texture, visual and textural viscosity, as well as fatty mouth feel, increased with increasing  $C_f$ ,  $C_p$  and  $c/w$ . The effect of protein decreased with increasing fat. An increase in  $C_p$  enhanced fat-related sensory properties whereas whey protein addition resulted in the opposite effect.

Fat did not affect attributes vanilla aroma and sweet in model vanilla custards. But an enhanced amount of fat caused increased intensities in visual and oral thickness, creamy flavor and fat-related texture properties (fatty, creamy and sticky). Intensities in yellow color, surface shine, and attribute jelly decreased. Non-fat custards showed the lowest intensities in pudding-like flavor (vanilla, cooked and harmonious). The addition of a vegetable fat cream caused lower intensities in yellow color, cooked flavor, thick and jelly texture, whereas intensities in vegetable fat flavor, creamy and fatty texture increased. Consumers preferred custards with medium fat contents, and disliked the non-fat custard and custards with the highest fat content (15.8%) due to their flavor and texture properties.



A study, examining and comparing the long-term acceptance of yoghurts and custards, which varied in fat content, showed the highest decrease in liking for samples with low fat contents. The less fat, the more susceptible was a product to product boredom. Liking of samples with medium fat contents remained relatively constant. Liking of samples with high fat contents increased by trend. Differences in liking between samples with different fat contents were smaller concerning yoghurts than concerning custards.

Sensory evaluations of single and double emulsions, varying in fat content, showed that double emulsions with lower fat contents were higher or did not differ significantly in texture attributes creamy, viscous and fatty mouth feel than single emulsions with higher fat contents.



## Ziele und Ergebnisse des Clusterprojektes (Zusammenfassung)

### Hintergrund

Gesellschaftliche Veränderungen, z.B. im Bereich der Berufstätigkeit, haben in den vergangenen vier Jahrzehnten zu signifikanten Veränderungen in den Ernährungsgewohnheiten geführt. So wurde die individuelle, zeitaufwändige Nahrungszubereitung im Haushalt mehr und mehr ersetzt durch die zeitsparende Zubereitung von industriell vorgefertigten Lebensmitteln (*convenience food*). Der übermäßige Verzehr von Lebensmitteln mit hoher Energiedichte wird aber – neben einer zu geringen körperlichen Aktivität – als eine der Hauptursachen für Übergewicht bis hin zu ernährungsbedingten Krankheiten gesehen. Laut Daten der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE) sind bereits mehr als 65 % der Männer und 55 % der Frauen in Deutschland übergewichtig. Da in Europa auch bereits ein hoher Anteil an Kindern übergewichtig ist, werden Übergewicht und Fettleibigkeit inzwischen auch von der Politik als gesellschaftliches Problem angesehen. Insbesondere die daraus für die Gesundheitssysteme resultierenden Kosten sind eine große Herausforderung für das Gesundheitswesen, aber auch die Wirtschaft in Deutschland und Europa.

Da Fette eine mehr als doppelt so hohe Energiedichte haben wie Proteine und Kohlenhydrate, stellt in der industriellen Lebensmittelproduktion die Reduktion des Fettanteils in der Rezeptur von Lebensmitteln einen geeigneten Ansatz zur Reduktion der Energieaufnahme dar. Es ist allerdings auch bekannt, dass solche „fettreduzierten“ Produkte nur vom Verbraucher akzeptiert werden – und somit zur Gewichtskontrolle geeignet sind – wenn sich diese in ihren qualitätsbestimmenden Eigenschaften (z.B. Aroma, Geschmack, Textur) von „normalen“ fettreichen Produkten nicht unterscheiden. Neben diesen, vom Verbraucher direkt beim Verzehr detektierbaren Eigenschaften müssen die Produkte zudem auch in der Lage sein, ein anhaltendes Sättigungsgefühl zu erzeugen.

Im Vergleich zur Reduktion des Anteils von Kohlenhydraten in der Ernährung durch den Einsatz von „kalorienfreien“ Süßstoffen sind derzeit auf dem Markt befindliche, fettreduzierte Produkte, insbesondere im Hinblick auf die o.g. Eigenschaften, häufig nicht äquivalent zu den fettreicheren Vergleichsprodukten. Sie werden daher vom Verbraucher offenbar nicht in ausreichendem Umfang zur Gewichtskontrolle verwendet. Zudem ist aus Tierstudien bekannt, dass fettreduzierte Lebensmittel – im Vergleich zu fetthaltigen – sogar in höherer Menge verzehrt werden.

In Anbetracht der hohen gesellschaftlichen Bedeutung von Übergewicht und Fehlernährung ist daher die Klärung derjenigen Lebensmittelinhaltsstoffe, die einerseits die Akzeptanz von Lebensmitteln ursächlich hervorrufen sowie andererseits an der postprandialen Sättigungsregulation beteiligt sind, die entschei-

dende Erkenntnis auf dem Weg zur Entwicklung innovativer, kalorienreduzierter Lebensmittel. Diese bioaktiven Komponenten müssen sowohl eine vom Verbraucher direkt detektierbare Genussfunktion ausüben können (Textur, Aroma, Geschmack) als auch im Organismus eine sättigungsregulierende Wirkung erzeugen.

Da gemäß statistischer Daten durch die Reduktion von Fett in Lebensmitteln bisher kein Erfolg hinsichtlich einer statistisch messbaren Gewichtsreduktion in der Bevölkerung erzielt werden konnte, lag die Vermutung nahe, dass nicht das Fett selbst, sondern bisher unbekannte Fettbegleitstoffe, die in fettreduzierten Lebensmitteln ebenfalls fehlen, eine entsprechende Bioaktivität besitzen. Da solche Fett-Begleitstoffe (Lipide) einerseits sensorisch wirksam sind (Fettwahrnehmung) und damit die Akzeptanz solcher Produkte erhöhen, aber andererseits auch sättigungsregulierend sein könnten, könnten solche Kenntnisse ein weites Feld für die Produktion innovativer, gesundheitsfördernder Lebensmittel eröffnen.

## Ziele und Projektübersicht

Eine wichtige Funktion der Lipide bzw. Lipide ist deren Eignung zur Emulsions- und damit zur Texturbildung. Es ist bekannt, dass sich beim Verzehr von Lebensmitteln, je nach Fettgehalt, das sogenannte Mundgefühl ändert, zu dem u.a. die rheologischen Eigenschaften (Fließfähigkeit, Viskosität) und die Fähigkeit zur Bildung eines Fettfilms auf der Mundschleimhaut beitragen. Versuche zur „Imitierung“ dieser technofunktionellen Eigenschaften erfolgten bei fettreduzierten Lebensmitteln bisher im Wesentlichen durch *trial and error*, wohingegen systematische Untersuchungen, z.B. zum Einfluss auf die trigeminale (mechano-sensorische) Wahrnehmung der Textur, nur selten zu finden sind.

Weiterhin stellen Fette im Gegensatz zu Proteinen und Kohlenhydraten ein wichtiges „Lösungsmittel“ für zahlreiche lipophile Aroma- und Geschmacksstoffe in Lebensmitteln dar. Kenntnisse darüber, welche geruchs- bzw. geschmacksaktiven Verbindungen, die **natürlich** in solchen komplex zusammengesetzten Fraktionen vorkommen, sind derzeit allerdings noch lückenhaft. Ebenso ist über die Funktion von Fettbegleitstoffen (Lipiden) in der post-prandialen Sättigungsregulation nur sehr wenig bekannt.

Das generelle Ernährungsverhalten des Menschen wird durch komplexe neuronale und endokrine Mechanismen kontrolliert, wobei den sogenannten „Sättigungshormonen“ Ghrelin, Serotonin sowie Insulin, dem aus dem Fettgewebe stammenden Leptin sowie verschiedenen Peptiden eine zentrale Bedeutung für die homeostatische Regulation zwischen Hunger und Sättigung zugeschrieben wird.

In Anbetracht der hohen gesellschaftlichen Bedeutung im Spannungsfeld von Übergewicht und industriell gefertigten Lebensmitteln hatte das vorliegende

Clusterprojekt daher zwei generelle Zielrichtungen, die beide von einer möglichen, bisher ungeklärten Bioaktivitätsfunktion der Lipide ausgingen. So war hinsichtlich der Akzeptanz von Lebensmitteln einerseits der Einfluss von Fetten bzw. Fettbegleitstoffen auf die olfaktorische, gustatorische und mechano-sensorische Wahrnehmung fettreicher Lebensmittel auf molekularer Ebene zu klären. Andererseits sollten Kenntnisse über Lipide und Lipide erarbeitet bzw. vertieft werden, die an der postprandialen Regulation der Sättigung beteiligt sind.

Der Fokus des vorliegenden Clusterprojekts auf Fettbegleitstoffe resultierte aus der Tatsache, dass die Gesamtfettreduktion bei Lebensmitteln bisher keinen Erfolg in der Gewichtsreduktion gezeigt hat. Es lag daher nahe, anzunehmen, dass bei der Reduktion der „Fettkalorien“ (Triacylglyceride) in der Rezeptur auch eine Reduktion anderer, bioaktiver Stoffe aus der Lipoidfraktion erfolgt.

## Die Ergebnisse in der Übersicht

Die im Clusterprojekt durchgeführten Untersuchungen gingen, wie oben erwähnt, zum Einen von der Hypothese aus, dass nicht die Triacylglyceride (kalorienliefernde Fette) selbst, sondern bisher weitgehend unbekannte Komponenten in der Fraktion der Lipide an der Akzeptanz von Lebensmitteln (Aroma, Geschmack) sowie gleichzeitig an Mechanismen der Sättigungsregulation beteiligt sind. Eine zweite Arbeitshypothese war der Einfluss der Textur auf die Akzeptanz von Lebensmitteln, da Fette nicht in reiner Form verzehrt werden, sondern in der Regel in Form von komplexen Emulsionen bzw. Fest/Flüssig-Systemen vorliegen. Da durch eine gezielte Variation der Rezeptur und der mechanischen Behandlung Phasengleichgewichte und z.B. die Tröpfchengröße variiert werden können, kann somit auch die Antwort der Mechanosensoren im Mund gezielt beeinflusst werden, wodurch Mundgefühl, Viskosität oder der auf der Mucosa entstehende Fettfilm verändert werden.

Im Clusterprojekt wurden daher verschiedene, sich ergänzende Arbeitsrichtungen verfolgt. **In den Teilprojekten 1 und 2** wurden systematische Studien zur Beeinflussung der Makro- und Mikrostruktur von fettreduzierten Rezepturen durch Vergleich der fetthaltigen mit fettarmen Modell-Milchprodukten durchgeführt. Die Daten wurden korreliert mit den Daten eines Fluid-Messsystems zur Messung und Vorhersage der rheologischen Eigenschaften (**Teilprojekt 8**) sowie mit den Daten aus der humansensorischen Beurteilung der Textureigenschaften (**Teilprojekt 9**).

In **Teilprojekt 1** wurden Milchproduktmatrices systematisch mittels physikalischer Methoden, deren Parameter an die Belastung im Mundraum adaptiert wurden, charakterisiert. Dazu wurde die Zusammensetzung und technologische Behandlung der Milchproduktmatrix variiert, um unterschiedliche Mikro- und Makrostrukturen aufzubauen. Die Produkte wurden einerseits einer sensorischen Analyse (**Teilprojekt 9**) unterzogen, um diese mit den Strukturdaten zu

korrelieren. Im **Teilprojekt 8** wurde parallel anhand von rheologischen Messergebnissen die Vorhersage textueller Mundgefühlsattribute durch numerische Simulation geprüft. In Kooperation (**Teilprojekte 2 bis 4**) wurden fettreduzierte Matrices gestaltet; diesen wurden neue Verbindungen und „Sättigungsbotenstoffe“ zugesetzt und hinsichtlich ihrer Fettwahrnehmung bzw. Sättigungswirkung beurteilt. Mit diesen Erkenntnissen war es möglich, eine Regressionsgleichung für die textuelle Cremigkeit aufzustellen, aus der Steuergrößen für cremige pastöse Milchprodukte abgeleitet werden können.

In **Teilprojekt 2** wurden W/O/W-Doppelemulsionen mit gezielt einstellbaren Strukturen in Lebensmittelqualität hergestellt. Die Ergebnisse zeigten, dass es prinzipiell möglich ist, die innere Emulsion ohne die Verwendung von in Lebensmitteln nur beschränkt zugelassenen Emulgatoren zu stabilisieren. Zur Realisierung kam ein Hochdruckhomogenisator mit Lochblenden zum Einsatz. Für die weiteren Untersuchungen wurden die inneren Emulsionen mithilfe des Emulgators Polyglycerin-Polyricinoleat (PGPR) im zugelassenen Konzentrationsbereich stabilisiert und mit einer Kolloidmühle hergestellt. So konnten Tropfen  $< 1 \mu\text{m}$  erzeugt und stabilisiert werden. Weiterhin wurde untersucht, ob sich auch großtechnisch einsetzbare Emulgierverfahren – Rotor-Stator-Maschinen (Zahnkranzdispergiermaschine, Kolloidmühle) und Hochdruckhomogenisatoren – zur Herstellung von Doppelemulsionen eignen. Es zeigte sich, dass der höchste Erhalt der inneren Tropfen bei vergleichbarer äußerer Tropfengröße durch den Einsatz einer Kolloidmühle realisiert werden kann.

In Kooperation mit **Teilprojekt 9** wurden schließlich sowohl konventionelle Vollfett- als auch fettreduzierte Doppelemulsionen sensorisch untersucht. Es zeigte sich, dass trotz deutlich variierendem Fettgehalt (19, 23 und 50%) keine Unterscheidung der Proben möglich war. Somit konnte generell gezeigt werden, dass sich Doppelemulsionen zur gezielten Fettreduktion in Lebensmitteln ohne sensorisch wahrnehmbaren Verlust an konsumentenrelevanten Eigenschaften eignen.

In **Teilprojekt 8** wurde mithilfe numerischer Simulationen das mechanisch induzierte Mundgefühl beim Verzehr von fettreduzierten, nicht stückigen, fließfähigen Lebensmitteln (z.B. Joghurt) untersucht. Mithilfe numerischer Simulationen des Schluckvorgangs wurde zunächst für unterschiedliche Produktklassen eine Charakterisierung der daraus resultierenden mechanischen Belastungen des Mundinnenraums (Zunge, Gaumen) erarbeitet. Numerische Simulationen in einer Modellmundhöhle ermitteln und visualisieren die im Mund ablaufenden Fließvorgänge von Lebensmitteln sowie Normal- und Scherspannungen, die an den Mechanorezeptoren einen Reiz auslösen. Damit kann in einem vereinfachten System eine Objektivierung der mechanischen Vorgänge bei der sensorischen Wahrnehmung erzielt werden. Es konnte unter anderem gezeigt werden, dass die Bereiche der stärksten mechanischen Belastung in der Nähe des Rachens liegen.

Systeme, bei denen eine hohe Komplexität vorliegt und die sich nicht mittels mathematischer Gleichungen beschreiben lassen, können sich zur Vorhersage kognitiver Algorithmen bedienen. Dieses Vorhaben setzt im Wesentlichen künstliche neuronale Netze und ein hybrides Neuro-Fuzzy-System ein. Künstliche neuronale Netze (KNN) sind mathematische Algorithmen, die – ähnlich wie bei einem Lernvorgang eines Menschen – aus Datensätzen (Eingangs- und Ausgangsdaten) Zusammenhänge über ein Training erlernen. Es konnte gezeigt werden, dass ein KNN, das als Eingangsdaten mechanische Kenngrößen der numerischen Simulation (zonenspezifische Schubspannungen auf der Zunge) erhalten hat, für ein spezifisches Produkt sehr gute Vorhersagen über das sensorische Attribut oral viscosity treffen kann. Die Erweiterung mit den Experten-Regeln in Form des hybriden Neuro-Fuzzy-Systems (= hybrides Expertensystem) konnte sehr gute Vorhersagen zu „Cremigkeit“, „Grießigkeit“, „Adstringenz“ und „Belegend“ erstellen. Das gesteckte Ziel einer objektivierten Beschreibung des zu erwartenden Mundgefühls konnte somit basierend auf strömungsmechanisch induzierten Belastungen des Mundinnenraums mittels eines hybriden Systems erreicht werden. Das erstellte hybride Expertensystem besitzt somit ein hohes Potential, Sensorikpanels und Produktentwickler in der Praxis bei der Auswahl von erfolgversprechenden Sensorik-Produkt-/Prozessparameter-Kombinationen zu unterstützen.

Eine weitere Arbeitsrichtung verfolgte konzeptionell das Ziel, bioaktive Moleküle in der Fraktion von Fettbegleitstoffen (Lipoiden) zu charakterisieren. Dabei stand die olfaktorische und gustatorische Aktivität im Focus. Die Arbeiten der beiden chemisch arbeitenden Gruppen (**Teilprojekte 6 A und B**) zielten dabei auf die Identifizierung der geruchs- und geschmacksaktiven Verbindungen ab, im **Teilprojekt 7** stand die Charakterisierung potentieller Fettrezeptoren im Vordergrund. In **Teilprojekt 6** wurde neben der Klärung der Bedeutung nichtflüchtiger Lipide für die Fettwahrnehmung auch die Ausbildung oraler Fettfilme untersucht (**Teilprojekt 6 A**). In **Teilprojekt 6 B** wurden die flüchtigen Lipide hinsichtlich ihres bioaktiven Potentials bewertet.

Untersuchungen an Olivenöl ergaben zunächst, dass Triacyl- und Diacylglyceride sowie auch freie Fettsäuren einen fettigen Geschmackseindruck in einer Modell-Matrix induzieren, d.h. diese Verbindungen sind offensichtlich chemosensorisch detektierbar. Weitere Daten machten es wahrscheinlich, dass die Fettwahrnehmung im Mund sowohl aus chemosensorischer Detektion der Fettsäuren, als auch aus mechanosensorischer Detektion einer lipid-ähnlichen Textur besteht. Im Gegensatz zu Befunden der Literatur bei Nagetieren konnte allerdings keine Freisetzung von Fettsäuren durch Humanlipase gefunden werden. Auch *in-mouth*-Experimente ergaben keine Hinweise für eine signifikante Lipaseaktivität im menschlichen Speichel. Da bislang keine Kenntnisse über die chemische Zusammensetzung und die Struktur der nach Verzehr fetthaltiger Lebensmittel verbleibenden oralen Lipidfilme existieren, wurden in weiteren Studien orale Lipidfilme analytisch untersucht. Dabei zeigte sich, dass die oralen

Fettfilme im Wesentlichen die Triacylglyceridverteilung des Speiseöls widerspiegeln und offenbar keinerlei Spezifität in der Ausbildung des Fettfilms vorliegt. Mit dem Ziel, die Bedeutung der fettigen Mundbelegung für die Fettwahrnehmung während des Verzehrs von Lebensmitteln zu studieren, wurde daher mittels *in-mouth*-Fluoreszenzmessung die Ausbildung oraler Lipidfilme auf der Zunge gemessen. Erste Messungen zeigten große interindividuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Panelisten. Derzeit laufen Studien zur Korrelation der wahrgenommenen Fettgeschmacks und des *Time/Intensity*-Verlaufs der Entwicklung solcher Lipidfilme.

Gestützt durch erste Untersuchungen der Literatur ging **Teilprojekt 6 B** von der Annahme aus, dass die flüchtigen Komponenten der Lipidfraktion neben ihrer Geruchswirksamkeit auch eine postprandiale Wirkung entfalten. Da Olivenöl in einer Humanstudie des **Teilprojektes 3** eine signifikante Wirkung hinsichtlich der Körperfettreduktion gezeigt hatte, wurden die Geruchsstoffe in einem italienischen Olivenöl durch Methoden der molekularen Sensorik charakterisiert. Dabei konnten 19 Geruchsstoffe identifiziert werden. In Kooperation mit **Teilprojekt 3** konnte dann gezeigt werden, dass darunter insbesondere Hexanal und (E)-2-Hexenal *in vitro* sättigungsregulierende Wirkung entfalten. Zur Isolierung entsprechender Mengen der flüchtigen Fraktion aus 200 Litern Olivenöl für eine weitere Humanstudie (**Teilprojekt 3**) wurde ein Vakuumdestillationsverfahren entwickelt.

Aus Untersuchungen an Nagern war bekannt, dass langkettige Fettsäuren an die beiden G-Protein gekoppelte Rezeptoren GPR 40 und GPR 120 binden können. In **Teilprojekt 6 A** wurde zudem gezeigt, dass Probanden freie Fettsäuren orosensorisch wahrnehmen können. In **Teilprojekt 7** wurden daher die beiden Rezeptoren in Zellen exprimiert und mit verschiedenen Fettsäuren stimuliert. Die Dosis/Wirkungskurven zeigten eindeutig, dass langkettige Fettsäuren durch Rezeptoren detektiert werden. Da weiterhin die mRNA für den Rezeptor GPR 120 sowie auch das entsprechende Protein im humanen Zungenepithel nachgewiesen werden konnte, wurde somit erstmals das Vorhandensein eines Fettrezeptors auf der menschlichen Zunge bewiesen.

Ziel der medizinisch-ernährungswissenschaftlich ausgerichteten Teilprojekte (**Teilprojekte 3 und 4**) war es, den Einfluss von Fetten und isolierten Lipoiden auf die postprandiale Sättigungsregulation zu untersuchen.

Die Ergebnisse von **Teilprojekt 4** deuten daraufhin, dass nur fettreicher Joghurt zu einer Abnahme des *cerebral blood flow* (CBF) im Hypothalamus führt. Verantwortlich für diese spezifischen Veränderungen dürften postprandiale metabolische und endokrine Prozesse sein, die unabhängig vom subjektiven Hungergefühl zu beobachten sind. Dafür sprechen auch die stärkeren Zunahmen in der Insulinausschüttung beim fettarmen Joghurt gegenüber der fettreichen Variante. Eine verzögerte gastrische Entleerung bei hoher Fettkonzentration oder eine über den Hypothalamus gesteuerte veränderte Insulinkonzentration kommen



dabei als mögliche Mediatoren in Frage. Unterstützt wird diese Annahme durch gleichbleibende Glukosewerte im postprandialen Zustand sowie den nicht unterschiedlichen Kohlenhydratmengen in beiden Joghurtarten. Weiterhin konnte eine Zunahme der Aktivität im insulinären Kortex 120 Minuten nach Einnahme des fettarmen Joghurts beobachtet werden. Die Aktivitätszunahme korrelierte dabei negativ mit den Veränderungen im Hungergefühl zwischen 30 und 120 Minuten. Es scheinen dabei aber eher gustatorische als metabolische Prozesse eine Rolle zu spielen, da keine Zusammenhänge mit der Insulinkonzentration gefunden wurden. Wird die Aktivität in der Insel und im Hypothalamus in ihrem Zusammenspiel betrachtet, so zeigte sich, dass es nur in der fettreichen Bedingung zu einer Korrelation zwischen den Aktivierungsabnahmen im Hypothalamus im postprandialen Zustand und den Aktivierungszunahmen im insulinären Kortex nach 120 Minuten gab. Dies lässt darauf schließen, dass nicht die Joghurteinnahme *per se*, sondern der Fettgehalt des Joghurts die neuronale Verschaltung zwischen Inselregion und Hypothalamus moduliert. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse des **Teilprojektes 4**, dass zu viel Fett in der Nahrung die Entstehung von Übergewicht fördert. Tierstudien haben gezeigt, dass sich insbesondere gesättigte Fettsäuren negativ auf den Blutzucker, die Gehirnaktivität und die körperliche Bewegung auswirken, welches eine weitere Körpergewichtszunahme unterstützt. Anzumerken ist jedoch, dass aus Tierstudien an Nagern kein direkter Rückschluss auf die Situation beim Menschen gezogen werden kann. Zur endgültigen Bewertung der Relevanz der Datenlage hinsichtlich der menschlichen Ernährung sind Folgearbeiten notwendig.

In **Teilprojekt 3** wurde die sättigende Wirkung von Nahrungsfetten und deren Inhaltsstoffen in Modell-Joghurt anhand physiologischer Parameter und anhand der subjektiven Einschätzung der Sättigung bewertet. Dies erfolgte u.a. sowohl durch humane Interventionsstudien als auch anhand von Zellkulturstudien mit Leberzellen (HepG2) und Adipozyten (3T3-L1).

Auf der Basis der Daten einer ersten Humanintervention und parallelen Zellkulturstudien wurde in enger Kooperation mit **Teilprojekt 6 B** insbesondere Olivenöl und die hieraus isolierte Fraktion der flüchtigen Aromastoffe als wirksam identifiziert, sowohl die gewählten, mit der Sättigung assoziierten Parameter positiv zu beeinflussen, als auch in einer dreimonatigen Intervention den Körperfettgehalt von gesunden Probanden signifikant zu verringern. In einem weiteren Studienteil wurde daher die Aroma- und Geschmacksstofffraktion des Olivenöls getestet. Schließlich konnten in Zellkulturexperimenten für die Lipide Hexanal und (E)-2-Hexenal als Aromastoffe in Olivenöl konnte ein hemmender Effekt auf die Glucoseaufnahme in humanen Leberzellen gezeigt werden. Dieses Ergebnis deutet entsprechend der gluco-statischen Theorie auf eine positive Wirkung bei der Sättigungsregulation hin. Es konnte somit erstmals ein Zusammenhang zwischen dem sättigenden Effekt von Olivenöl und den hierin enthaltenen Aromastoffen Hexanal und (E)-2-Hexenal aufgezeigt werden.

## Wirtschaftliche Bedeutung

Die Lebensmittelindustrie ist traditionell stark geprägt von kleinen und mittleren Unternehmen (KMU). Im Jahr 2011 betrug der Umsatz der Branche 163 Mrd. € und wurde von rund 5.900 Betrieben mit 550.000 Mitarbeitern erzielt, wobei 55 % der Betriebe weniger als 50 und 98 % der Betriebe weniger als 500 Mitarbeiter hatten. Dabei nimmt der Anteil kleiner Unternehmen insbesondere bei Herstellern von Massenprodukten aufgrund der kleinen Deckungsbeiträge stetig ab. Stellvertretend soll hier das Beispiel der Milchwirtschaft aufgezeigt werden: Von 360 Unternehmen (1990) ging die Anzahl der milchverarbeitenden Unternehmen auf 143 (2011) zurück. Gerade mittelständische Unternehmen sind daher verstärkt auf Nischenmärkte angewiesen. Der Bereich fettreduzierter Spezialprodukte bietet deshalb insbesondere für diese eine besondere Chance.

Die im Rahmen des vorliegenden Projekts erzielten Ergebnisse aus Grundlagen- und anwendungsorientierter Forschung tragen maßgeblich zur Entwicklung neuer fettreduzierter Lebensmittel bei, die aus Sicht der Konsumenten nicht nur hinsichtlich Textur, Aroma und Geschmack attraktiv sind, sondern auch eine verbesserte Sättigungswirkung aufweisen.

Neben der milchverarbeitenden Industrie sind auch die Hersteller von Fleischprodukten, diätetischen Lebensmitteln, Süßwaren und Kindernährmitteln mögliche Nutzerkreise der erzielten Ergebnisse. Des Weiteren hat das Projekt auch große wirtschaftliche Bedeutung für Hersteller von Rohstoffen und Zusatzstoffen.

## Aims and Results of the Cluster Project (Summary)

### Background

Social changes over the past four decades, e.g. in the area of employment, have led to significant changes in lifestyles and eating habits. Individual, time-consuming food preparations at home have been more and more replaced by industrially prefabricated foods (convenience foods). The consumption of food with high energy density is – beneath insufficient human activity – seen as one of the main causes of obesity and other diet related diseases. According to latest data of the German Nutrition Society, more than 65 % of men and 55 % of women in Germany are overweight. In Europe, already a high proportion of children are obese, and overweight and obesity are now recognized by governments as a major socio-economic problem. The resulting costs for health care systems are becoming a major challenge for the European economies.

Since fats have more than twice the energy density of proteins and carbohydrates in industrial food production, the reduction of the fat content in food formulations represents a suitable approach for reducing energy consumption. However, it is well known that "low fat foods" are only accepted by the consumer and, thus, suitable for weight control, if they do not differ from "normal" fatty foods in their quality-determining characteristics, e.g. flavor, taste and texture. Besides these characteristics that are immediately recognized by the consumer after intake, the optimal product also should evoke a lasting satiating effect.

In comparison to commercially available „low-carbohydrate, non-caloric sweeteners“, that help to reduce the proportion of carbohydrates in the diet, the sensory quality of „low-fat“ products in the market often is not the same as that of equivalent fat-rich products. So far, „low-fat“ products have not been demonstrated to be attractive for consumers who like to maintain or achieve a healthy body weight. Furthermore, in animal studies, it has been shown that reduced-fat chows, compared to normal fat diets, are consumed even in greater quantity when administered ad libitum.

Given the high social importance of maintaining a healthy diet and reducing the risk and prevalence of overweight, the identification of food ingredients that ensure an optimum sensory acceptance with regard to texture, flavor and aroma of a food formulation and, at the same time, evoke a lasting postprandial satiating effect, is of major importance for the development of innovative, low-calorie foods.

Since, according to statistical data, the reduction of the fat content in foods and the increasing amount of „low-fat“ products in the market did not result in a statistically measurable reduction in overweight prevalence and incidence in Western populations, we assumed that it is not the fat itself, but rather a yet unknown fat-related compounds (so-called lipoids) that are also not present in

fat-reduced foods might contribute to the sensory quality and to the satiating effects of foods. Since these lipoids are sensorically active (fat perception), thereby increasing the consumer's acceptance of products, and might also regulate postprandial mechanisms of satiety, the identification of such bioactive such structures would open a wide field for the production of innovative, health-promoting foods.

## Aims and project overview

An important function of lipids or lipoids is their ability to form emulsions and, thus, determine a foods' texture. Consumption of high-fat foods is associated with a characteristic mouthfeel, to which the rheological properties (flowability, viscosity) and the ability of the food to form a fatty film on the oral mucosa chiefly contribute. Attempts to "imitate" the techno-functional properties responsible for the characteristic mouthfeel of high-fat foods so far have been carried out using foods with varying fat contents mainly by "trial and error" approaches. Systematic studies, e.g. including the influence on the trigeminal (mechano-sensory) perception of texture are rare.

Furthermore, fats are, in contrast to proteins and carbohydrates, an important "solvent" for many lipophilic aroma and flavor compounds in foods. However, knowledge of which odor or flavor-active compounds naturally occur in such complex lipid fractions is still limited. Similarly, the function of fat-soluble food components in mechanisms regulating postprandial satiety is unknown.

The overall dietary behavior of humans is controlled by a complex network of neural and endocrine mechanisms. Among these, the so-called "satiety" hormones ghrelin, serotonin, insulin, and the adipose tissue-derived leptin play a central role in the homeostatic regulation of hunger and satiety.

Given the high social importance of the conflicting priorities between obesity and industrially produced food, the here presented cluster project had two main aims, both emanating from a yet unexplained bioactivity of lipids and lipid compounds. The first aim was to identify the olfactory, gustatory and mechano-sensory mechanisms of the perception of fat-rich foods on a molecular level. The second aim was to identify lipids and lipoids involved in mechanisms regulating postprandial satiety.

The focus of this cluster project on fat-soluble substances resulted from the fact that the increased commercial availability of low-fat foods was not reflected by decreasing numbers of overweight consumers. We, therefore, assumed that a reduction of "fat calories" (triacylglycerols) is associated with the reduction of other bioactive substances present in the lipid fraction of foods.

## Overview of the results

The here presented cluster project was, as mentioned above, based on the hypothesis that not the triacylglycerides themselves as energy-providing nutrients rather yet unknown components in the lipid fraction of fats determine the sensory acceptance of foods (flavor, aroma) and, at the same time, regulate mechanisms of satiety. Another working hypothesis was that a foods' texture has a major impact on its sensory properties since fats are generally consumed in the form of complex emulsions and solid /liquid systems. As phase equilibria of the formulation and, e.g., the droplet size can be directed by varying the recipe and the mechanical treatment, the response of mechanosensors in the mouth can be selectively altered through changes in viscosity which results in differences in the film of fat on the mucosa and mouthfeel.

In the cluster project presented here, different but complementary research directions were followed. In the **sub-projects 1 and 2**, systematic studies on the effect of the macro- and microstructure of low-fat recipes were performed by comparing high-fat with low-fat dairy model products. The data were correlated with data obtained from fluid measurement systems for measuring and predicting the rheological properties (**sub-project 8**), and with data from sensory evaluations of textural properties by human volunteers (**sub-project 9**).

In **sub-project 1**, milk product formulations were systematically characterized by physical methods whose parameters had been adapted to the formulation's load in the oral cavity. In order to generate different micro- and macrostructures, the composition of the milk product formulations and the technological treatment were varied. The resulting products were subjected to sensory analyses (**sub-project 9**) and correlated with the structural data. In parallel, rheological measurements were performed to predict the textural mouthfeel attributes by numerical simulation (**sub-project 8**). In cooperation with the **sub-projects 2 to 4**, reduced-fat matrices were designed by adding novel compounds as well as "saturation messengers", and evaluated by healthy volunteers their perception and/or satiating effects. With these findings, it was possible to develop a regression equation for the textural creaminess that can be used to define control values for creamy pasty dairy products.

In **sub-project 2**, W/O/W double emulsions with specifically adjustable structures in food-grade quality were prepared. The results showed that it is possible to stabilize the inner emulsion without the use of emulsifiers that received only limited approval for their use in foods. This sub-project aim was realized by use of a high pressure homogenizer with pinholes. For further investigations, the internal emulsions were generated and stabilized by using the emulsifier polyglycerol polyricinoleate (PGPR) in food-approved concentrations. By using a colloid mill, droplets <1 micron were achieved. It was also investigated whether industrially applicable emulsification techniques, using rotor-stator machines (toothed-wheel dispersing machines, colloid mills) and homogenizers are suitable for the

production of double emulsions. It was found that the highest conservation of inner droplets with comparable outer droplet size can be achieved by means of a colloid mill.

In cooperation with **sub-project 9**, two conventional full-fat and reduced-fat double emulsions were sensorically analyzed by a test panel. It turned out that these samples could not be differentiated from each other, despite significantly varying fat contents (19, 23 and 50%). Thus, it could be shown that double emulsions are suitable formulations for targeted fat reduction in foods, without sensorically perceptible losses of consumer-relevant quality indicators.

In **sub-project 8**, the mechanically-induced mouthfeel during the intake of low-fat, non-particulate, flowable foods (e.g. yoghurt) was studied by means of numerical simulations. Using these numerical simulations of the swallowing process, the mechanical stresses of the oral cavity (tongue, palate) were characterized for different products. Numerical simulations in a model mouth identify and visualize the flow processes of food as well as the normal and shear stresses that trigger a stimulus on the mechanoreceptors occurring in the oral cavity. Using this simplified system, the mechanical processes involved in sensory perception can be objectified. Inter alia, it could be shown that the areas of the highest mechanical stress after product intake are in the back of the oral cavity, close to vicinity of the throat.

Highly complex systems that can not be described by mathematical equations instead may serve for the prediction of cognitive algorithms. In this sub-project, artificial neural networks (ANN) and a hybrid neuro-fuzzy system have been applied. Artificial neural networks (ANN) are mathematical algorithms that 'learn' associations from data sets (input and output data) after training - similar to a learning process of a human being. It was shown that an ANN, which had received mechanical parameters of the numerical simulation (zone specific shear stresses on the tongue) as input data, was able to predict the sensory attribute "oral viscosity" for a specific product. An extension of the expert rules by means of the hybrid neuro-fuzzy system (= hybrid expert system) revealed very good predictions of "creaminess", "grittiness", "astringency" and "loading". Thus, the aim to achieve an objectified description of the expected mouthfeel evoked by the intake of a specific food was achieved by means of a hybrid system that is based on parameters of fluidic-induced stress in the oral cavity. The here developed hybrid expert system has a high potential to support sensory panels and product designers in the selection of promising processing parameters that determine the sensory characteristics of a given product.

Another part of this cluster project was aimed to characterize olfactory-active and gustatory-active molecules in the fat fraction of foods, with special emphasis on lipid structures. Here, food chemists identified (**sub-projects 6 A and B**) taste and odor-active compounds which were studied for their binding affinity

to fat receptors in the oral cavity by partners of **sub-projects 7**. In addition to the clarification of the role of non-volatile lipids and lipoids for fat perception, also the formation of fat layers were studied in **sub-project 6 A**, whereas **sub-project 6 B** focused on the role of volatile compounds present in fat fractions.

Initial investigations on olive oil revealed that triacyl and diacylglycerides, and also free fatty acids in a model matrix induce a fatty taste impression, showing that these compounds are chemosensorially detectable. Additional evidence from these sub-projects indicates that the mechanism of fat perception of the mouth comprises both, the chemosensorial detection of fatty acids, as well as the mechano-sensorial detection of a lipoid-like texture. However, in contrast to findings in rodents, no release of fatty acids was found in the presence of human saliva lipase, neither in *in-vitro* experiments, nor in *in-mouth* experiments using human saliva samples. Since there was no knowledge about the chemical composition and structure of the lipid layers formed in the oral cavity after consumption of fat-containing foods, those lipid layers were analytically characterized. It was found that these lipid layers mainly reflect the pattern of triacylglycerides of the dietary fat, but do not show any specificity for the formation of the lipid layer formed in the oral cavity. In order to identify the importance of this lipid layer in the oral cavity for fat perception, in-mouth-fluorescence measurements were applied to characterise the formation of lipid layers on the tongue during consumption of foods. Initial experiments demonstrated large inter-individual differences between panelists. However, ongoing experiments are focused on correlations between the perceived fat taste and the time/intensity profiles that determine the development of these lipid layers.

Supported by preliminary studies in the literature, **sub-project 6 B** was based on the assumption that volatile components of the fat fraction are not only taste-active, but also unfold a postprandial satiating effect. Since administration of olive oil added to low-fat yoghurt was shown to reduce the amount of body fat in subjects participating in a human trial after a three month intervention period (**sub-project 3**), 19 odor-active compounds were identified in an Italian olive oil by methods of molecular sensing. Among these odor-active compounds, hexanal and (E)-2-hexenal evoked to most pronounced effects on mechanisms regulating satiety in cell culture experiments carried out in **sub-project 3**. In order to prove the satiating effect of the odor-active fraction of olive oil in a follow-up human intervention study (**sub-project 3**), a vacuum distillation process was developed and used for the isolation of appropriate amounts of the volatile fraction from 200 liters of olive oil.

From studies in rodents it is known that long-chain fatty acids bind to the G-protein-coupled receptors GPR 40 and GPR 120. Since it was demonstrated in **sub-project 6 A** that healthy subjects are able to recognize free fatty acids orosensorially, these two receptors were expressed in cells and exposed to various fatty acids (**sub-project 7**). Here, dose/response experiments revealed clear results, demonstrating that long-chain fatty acids indeed bind to these recep-

tors. Furthermore, the mRNA for the GPR 120 receptor and also the corresponding protein was detected in human tongue epithelia. With these results, the presence of a fat receptor on the human tongue was demonstrated for the first time.

The aim of medical and nutritional science oriented **sub-projects 3 and 4** was to investigate the influence of fats and lipids on mechanisms of postprandial regulation of satiety.

The results of **sub-project 4** indicate that only high-fat yoghurt, compared with low-fat yoghurt, is able to decrease the cerebral blood flow (CBF) in the hypothalamus. Responsible for these specific changes are likely to be postprandial metabolic and endocrine processes that can be observed regardless of the subjective feeling of hunger. This hypothesis is supported by a greater increase in insulin secretion after administration of low-fat yogurt compared to that of a comparable high-fat product. Delayed gastric emptying after high fat intake or changes in insulin secretion controlled by the hypothalamus are possible factors of influence. This assumption is supported by constant glucose levels in the postprandial state, and comparable amounts of carbohydrates in high-fat and low-fat yoghurt. Furthermore, an increased activity in the insular cortex was observed 120 minutes after ingestion of low-fat yoghurt alone. This increased activity correlated negatively with changes in hunger feelings reported 30 and 120 minutes after yoghurt intake. However, it seems that this result is predominantly based on gustatory effects rather than on metabolic processes, as no correlations were found with insulin concentrations. When the activities in the insula and in the hypothalamus were considered together, it was shown that only the administration of the high-fat yoghurt resulted in a correlation between the activation decreases in the hypothalamus in the postprandial state and the activation increases in the insular cortex 120 minutes after intake. This may suggest that not the intake of yoghurt per se, but the fat content of yoghurt modulates the neuronal circuit between the island region and the hypothalamus. In summary, the results of the **sub-project 4** demonstrated that too much fat in the diet promotes the development of obesity. Results from animal studies demonstrated that saturated fatty acids, in particular, elicit negative effects on blood sugar, brain activity and physical activity, which supports a further increase in body weight. However, no direct conclusion can be drawn from animal studies in rodents to the situation in humans. For the final evaluation of the relevance of the available data for human nutrition, follow-up studies are necessary.

**Sub-project 3**, the satiating effects of dietary fat administered with a low-fat yoghurt to healthy volunteers were evaluated by means of subjective ratings of hunger and satiety and biochemical parameters of mechanisms involved in the regulation of postprandial satiety. Furthermore, mechanistic studies were carried out in cell culture experiments using liver cells (HepG2) and adipocytes (3T3-L1).



Based on the data of the human intervention studies and parallel cell culture experiments, olive oil and also its aroma fraction were identified as dietary lipoids that not only modulate mechanisms of satiety but also were able to reduce the total amount of body fat after a three month intervention in healthy volunteers. The subsequent identification of the satiating aroma components in olive oil was carried out in close cooperation with **sub-project 6 B**. Here, cell culture experiments revealed an inhibitory effect on glucose uptake in human liver cells for the lipoids hexanal and (E)-2-hexenal as aroma compounds present in olive oil. According to the glucostatic theory of satiation, this result indicates a positive impact on the regulation of postprandial satiety. With these results, a relationship between the satiating effects of olive oil and its aroma compounds hexanal and (E)-2-hexenal has been demonstrated for the first time.

## Economic significance

The food industry is dominated by small and medium enterprises (SMEs). In 2011, for example, sales of € 163 billion were achieved by 5,900 enterprises with 550,000 employees. Among those, 55 % of enterprises had less than 50 and 98 % of enterprises had less than 500 employees. Moreover, the share of SMEs in the manufacture of mass-produced items decreases constantly due to small profit margins. One example of this trend can be found in the dairy industry: from 360 companies registered in Germany in 1990, the number of dairies decreased to 143 (2011). Therefore, SMEs, and in particular those of the dairy industry, rely more and more on niche markets. The market segment of reduced-fat products especially offers a unique opportunity for dairy SMEs.

In the context of the here presented project, results from fundamental and applied research provide original evidence for the development of low-fat foods that are attractive from the viewpoint of consumers not only in texture, flavor and taste, but also have an improved satiety effect.

In addition to the dairy industry, manufacturers of meat products, dietetic foods, sweets and baby food are potential enterprises that may translate the outcome of the here presented project into market products. Furthermore, the project's results are also highly valuable for manufacturers of raw materials and additives.

## Publikationen aus dem Clusterprojekt (Auswahl)\*

- [1] Balzer, M., Rubach, M., Heni, M., Ketterer, C., Scholl, L., Fritsche, A., Schieberle, P. & Somoza, V.: Humane Interventionsstudie zum Einfluss von tierischen und pflanzlichen Nahrungsfetten auf die Sättigungsregulation. *Proc. Germ. Nutr. Soc.* 17, 29 (2012).
- [2] Balzer, M., Rubach, M., Heni, M., Ketterer, C., Scholl, L., Steinritz, D., Schieberle, P., Fritsche, A. & Somoza, V.: The Impact of Lard, Milk Fat, Canola and Olive Oil on the Regulation of Satiation – a Human Intervention Study. *Am. J. Clin. Nutr.* (in preparation).
- [3] Frank, S., Linder, K., Kullmann, S., Heni, M., Ketterer, C., Cavusoglu, M., Krzeminski, A., Fritsche, A., Häring, H. U., Preissl, H., Hinrichs, J. & Veit, R.: Fat intake modulates cerebral blood flow in homeostatic and gustatory brain areas in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 95 (6), 1342-1349 (2012).
- [4] Galindo, M. M., Voigt, N., Stein, J., Raguse, J.-D., Hofmann, T., Meyerhof, W. & Behrens, M.: A role of fatty acids and their receptors in human fat taste? In: *Proc. 9<sup>th</sup> Wartburg Symp. Flav. Chem. Biol.* (eds.: Hofmann, T., Meyerhof, W., Schieberle, P.), Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Garching, 8-14 (2011).
- [5] Galindo, M. M., Voigt, N., Stein, J., van Lengerich, J., Raguse, J.-D., Hofmann, T., Meyerhof, W. & Behrens, M.: G protein-coupled receptors in human fat taste perception. *Chem. Senses* 37, 123-139 (2012).
- [6] Guan, X., Hailu, K., Guthausen, G., Wolf, F., Bernewitz, R. & Schuchmann, H. P.: PFG-NMR on  $W_1/O/W_2$ -emulsions: Evidence for molecular exchange between water phases. *Eur. J. Lipid Sci.* 112, 828-837 (2010).
- [7] Hahn, C., Krzeminski, A., Wille, S., Weiss, J. & Hinrichs, J.: Simultaneous particle size and shape analysis in fermented milk products as influenced by composition and processing. *Milchwiss./Milk Sci. Intern.* 67 (1), 6-9 (2012).
- [8] Krzeminski, A., Großhable, K. & Hinrichs, J.: Structural properties of stirred yoghurt as influenced by whey proteins. *LWT - Food Sci. Technol.* 44 (10), 2134-2140 (2011).
- [9] Krzeminski, A., Großhable, K., Tomaschunas, M., Busch-Stockfisch, M. & Hinrichs, J.: Structural properties and sensory perception of stirred yoghurt systems. *EDM – Eur. Dair. Mag.* 23, 12-17 (2011).
- [10] Krzeminski, A., Tomaschunas, M., Busch-Stockfisch, M., Weiss, J. & Hinrichs, J.: Improved modeling of texture perception of semisolid milk products by

---

\* Stand: November 2012

- friction tests. Abstr. Book, 6<sup>th</sup> Intern. Symp. Food Rheol. Struct. (ISFRS) 2012 (eds.: P. Fischer, E. J. Windhab), ETH Zürich, 38 (2012).
- [11] Krzeminski, A., Tomaszunas, M., Köhn, E., Busch-Stockfish, M. & Hinrichs, J.: Relating creamy perception of whey protein enriched yogurt systems to instrumental data by means of multivariate data analysis. *J. Food Sci.* (submitted).
- [12] Krzeminski, A., Wohlhüter, S., Heyer, P., Utz, J. & Hinrichs, J.: Measurement of lubricating properties in a tribosystem with different surface roughness. *Intern. Dair. J.* 26 (1), 23-30 (2012).
- [13] Krzeminski, A., Wohlhüter, S., Weiss, J. & Hinrichs, J.: The role of friction in texture perception of semisolid milk products. *German Dair. Mag. (DMZ) Special Edition* 19, 18-20 (2012).
- [14] Krzeminski, A., Wohlhüter, S., Weiss, J. & Hinrichs, J.: Tribologie und texturale Wahrnehmung halbfester Milchprodukte. *Dt. Molkereizeit. (DMZ) Spezial-Ausgabe* 19, 30-32 (2012).
- [15] Kutter, A., Hanesch, C., Rauh, C. & Delgado, A.: Impact of proprioception and tactile sensations in the mouth on the perceived thickness of semisolid foods. *Food Qual. Pref.* 22 (2), 193–197 (DOI:10.1016/j.foodqual.2010.09.006) (2011).
- [16] Kutter, A., Singh, J. P., Rauh, C. & Delgado, A.: Improvement of the prediction of mouthfeel attributes of liquids foods by a Posthumus Funnel. *J. Text. Studies.* 42 (3), 217-227 (DOI: 10.1111/j.1745-4603.2011.00291.x) (2011).
- [17] Meyerhof, W. & Nachtsheim, R.: Fettig - die sechste Geschmacksqualität? *J. Culinaire - Kultur und Wissenschaft des Essens* 14, 8-12 (2012).
- [18] Pollner, G. & Schieberle, P.: Charakterisierung flüchtiger Verbindungen in kaltgepresstem Rapsöl. *Jahresbericht Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie* (ISBN 978-3-938896-35-8), 48-52 (2010).
- [19] Pollner, G. & Schieberle, P.: Quantifizierung wertgebender Aromastoffe in kaltgepresstem Rapsöl. *Jahresbericht Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie* (ISBN 978-3-938896-49-5), 40-44 (2011).
- [20] Rauh, C., Singh, J., Nagel, M. & Delgado, A.: Objective analysis and prediction of texture perception of yoghurt by hybrid neuro-numerical methods. *Intern. Dair. J.* 26 (1), 2-14 (DOI: 10.1016/j.idairyj.2012.03.006) (2012).
- [21] Sartorius, T., Ketterer, C., Kullmann, S., Balzer, M., Rotermund, C., Binder, S., Hallschmid, M., Machann, J., Schick, F., Somoza, V., Preissl, H., Fritsche, A., Häring, H. U. & Hennige, A. M.: Monounsaturated fatty acids prevent the aversive effects of obesity on locomotion, brain activity, and sleep behavior. *Diabetes* 61, 1669-1679 (2012).

- [22] Scholl, L., Rubach, M., Balzer, M., Schieberle, P. & Somoza, V.: Impact of fatty acids and their biomimetic combinations on glucose uptake in 3T3-L1 and in HepG2 cells. *J. Nutr. Biochem.* (in preparation).
- [23] Scholl, L., Rubach, M., Schieberle, P. & Somoza, V.: Einfluss von Fettsäuren und biomimetischen Fettsäuregemischen auf die Glucoseaufnahme in Adipozyten und Hepatozyten. *Proc. Germ. Nutr. Soc.* 17, 106 (2012).
- [24] Schuch, A., Köhler, K. & Schuchmann, H. P.: Differential scanning calorimetry (DSC): A method to characterize the stability of inner droplets in multiple W/O/W emulsions. *Therm. Anal. Calor.* (submitted).
- [25] Tomaschunas, M., Hinrichs, J., Köhn, E. & Busch-Stockfisch, M.: Effects of casein-to-whey protein ratio, fat and protein content on sensory properties of stirred yoghurt. *Intern. Dair. J.* 26 (1), 31-35 (2012).
- [26] Tomaschunas, M., Hinrichs, J., Köhn, E. & Busch-Stockfisch, M.: Variation of casein to whey protein ratio, fat and protein content in stirred yoghurts: a sensory evaluation. *Intern. Dair. J., Special Issue 7<sup>th</sup> NIZO Dairy Conference* (submitted).
- [27] Wolf, F., Gmoser, F. & Schuchmann, H. P.: Stabilization of Water Droplets in an Oily Matrix Exclusively by Gel Formation. *Chem. Engin. Technol.*, 754-760 (2011).
- [28] Wolf, F., Köhler, K. & Schuchmann, H. P.: Stabilization of Water Droplets in Oil with PGPR for use in oral or dermal applications. *J. Food Proc. Engin.* (DOI: 10.1111/j.1745-4530.2012.00688.x) (2012).
- [29] Wolf, F., Schuch, A., Köhler, K. & Schuchmann, H. P.: Ansatz zur Beschreibung der zerkleinerungsrelevanten Strömungsverhältnisse beim Emulgieren von W/O-Emulsionen mit Lochblenden. *Chemie Ingenieur Technik* 5 (2011) (in press).



Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)  
Godesberger Allee 142-148 · 53175 Bonn  
Telefon: 0228 – 37 20 31  
Telefax: 0228 – 37 61 50  
E-Mail: fei@fei-bonn.de

Weiterführende Informationen:  
**[www.fei-bonn.de](http://www.fei-bonn.de)**

Copyright ©2012  
Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn

ISBN 978-3-925032-51-6

