

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und molekulare Sensorik

Studien zum Einfluss von Proteinzusätzen auf die Geschmacksstoffe von
Schwarzteegetränken

Christina Schmidt

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung,
Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen
Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. M. Rychlik

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Th. F. Hofmann
2. Univ.-Prof. Dr. P. Schieberle

Die Dissertation wurde am 13.12.2011 bei der Technischen Universität München eingereicht und
durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt
am 15.03.2012 angenommen.

DANKSAGUNG

Der praktische Teil der vorliegenden Arbeit wurde im Zeitrahmen von Juni 2007 bis Juli 2010 unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Hofmann am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und molekulare Sensorik der Technischen Universität München durchgeführt. Meinem Doktorvater Prof. Dr. Thomas Hofmann danke ich herzlich für das Anvertrauen der interessanten Thematik, die hervorragende wissenschaftliche Betreuung, die wertvollen Ratschläge und die Möglichkeiten zur freien Entfaltung.

Bei allen Mitarbeitern des Lehrstuhls bedanke ich mich für das angenehme Arbeitsklima, die Hilfsbereitschaft und die stets gute Zusammenarbeit. Ganz besonderer Dank gilt meinen Laborkolleginnen und Kollegen aus Labor III Corinna Dawid, Nadine Wollmann, Anika Wahl, Fotios Zigouris, Dr. Roman Lang, Andreas Degenhardt, Katharina Lorenz und vor allem meinem „langjährigen“ Sitznachbarn, Peter Kornas, für die schönen Promotionsjahre in Freising.

Außerdem danke ich den Anhängern der „Coffee meets Tea“ Arbeitsbesprechungsgruppe für die „Integration“ meines Themas und die vielen hilfreichen Kaffeediskussionen, auch nach den Besprechungen.

Mein Dank gilt zudem Dr. Oliver Frank, Barbara Süß sowie Dr. Rainer Kerssebaum für die Durchführung der NMR Experimente. Den immer hilfsbereiten MS-Operatoren danke ich für das Engagement bei den LC-MS-Messungen.

Bei allen fleißigen TeaTastern bedanke ich mich für die Teilnahme an den Teesensoriken.

Für das Begleiten durch zahlreiche Höhen und Tiefen der Promotionszeit danke ich ganz besonders Stefanie Kreppenhofer, Daniel Festring, Caroline Hellfritsch, Barbara Süß, Dr. Gesa Haseleu und Dr. Daniel Intelmann.

Bei Xenia Schmidt, Caroline Hellfritsch, Barbara Süß und Dr. Gesa Haseleu bedanke ich mich ebenso für das Bemühen beim Korrekturlesen und die wertvollen Anmerkungen zu diesem Manuskript.

Barbara Süß möchte ich zusätzlich für die drei schönen gemeinsamen Pendlerjahre zwischen Freising und München und für dein stets offenes Ohr in Bezug auf die Protein/Polyphenol Problematik danken.

Nicht zuletzt bedanke ich mich ganz besonders bei meinen Eltern und bei meiner Schwester, die mich jederzeit und bedingungslos unterstützt haben, sowie bei meinen Freunden für die unentbehrliche Ablenkung und Unterstützung.

INHALTSVERZEICHNIS

1	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	ALLGEMEINES ZUM TEE	1
1.2	TEEINHALTSSTOFFE UND DEREN BEDEUTUNG FÜR DEN GESCHMACK	5
1.3	GRUNDLAGEN DER GESCHMACKSWAHRNEHMUNG	19
1.3.1	BITTERGESCHMACK	20
1.3.2	WAHRNEHMUNG DER ADSTRINGENZ	22
1.4	ANALYTIK VON GESCHMACKSSTOFFEN	23
1.5	PROTEIN/POLYPHENOL-WECHSELWIRKUNGEN	25
1.6	PROBLEMSTELLUNG	30
2	<u>ERGEBNISSE</u>	31
2.1	GESCHMACKSSTOFFE IN SCHWARZEM TEE	31
2.1.1	SENSORISCHE ANALYSE	31
2.1.2	IDENTIFIZIERUNG UND QUANTIFIZIERUNG ADSTRINGIERENDER UND BITTERER SCHLÜSSELGESCHMACKSSTOFFE	32
2.1.2.1	FLAVAN-3-OLE UND PURINALKALOIDE	33
2.1.2.2	THEAFLAVINE	35
2.1.2.3	FLAVONOLGLYKOSIDE	41
2.1.3	GESCHMACKSSCHWELLENWERTE UND DIE BEWERTUNG DES GESCHMACKSBEITRAGES EINZELNER VERBINDUNGEN ZUM TEEGESCHMACK	43
2.1.4	REKOMBINATIONSEXPERIMENTE	46
2.1.5	DISKUSSION	47
2.2	EINFLUSS VON PROTEINEN AUF DIE GESCHMACKSSTOFFE IN SCHWARZEM TEE	52
2.2.1	EINFLUSS VON MAGERMILCHPULVER AUF GESCHMACKSSTOFFE IN SCHWARZEM TEE	52
2.2.1.1	VERGLEICHENDE GESCHMACKSPROFILANALYSE VON TEEGETRÄNKEN VOR UND NACH MAGERMILCHPULVER-ZUSATZ	52
2.2.1.2	EINFLUSS VON MAGERMILCHPULVER-ZUSÄTZEN AUF DIE GEHALTE VERFÜGBARER GESCHMACKSSTOFFE IN TEEGETRÄNKEN	54
2.2.1.3	EINFLUSS VON MAGERMILCHPULVER-ZUSÄTZEN AUF DEN GESCHMACKSBEITRAG BITTERER UND ADSTRINGIERENDER TEEINHALTSSTOFFE	57
2.2.1.4	DISKUSSION	61

2.2.2	EINFLUSS EINZELNER MILCH- BZW. MOLKENPROTEINE AUF GESCHMACKSSTOFFE IN SCHWARZEM TEE	63
2.2.2.1	EINFLUSS VON β -CASEIN AUF FLAVAN-3-OLE UND THEAFLAVINE IM TEEGETRÄNK	65
2.2.2.2	EINFLUSS VON MILCHPROTEINEN AUF DIE BINDUNG EINZELNER GESCHMACKSSTOFFE	67
2.2.2.3	DISKUSSION	70
2.2.3	STUDIEN ZU STRUKTUR/WIRKUNGSZUSAMMENHÄNGEN DER POLYPHENOL/PROTEIN-INTERAKTION	73
2.2.3.1	EINFLUSS DER POLYPHENOLSTRUKTUR	73
2.2.3.2	EINFLUSS DER PROTEINSTRUKTUR	78
2.2.3.3	NMR-SPEKTROSKOPISCHE UNTERSUCHUNG DER BINDUNGSSTELLEN VON (-)-EPIGALLOCATECHIN-3-GALLAT	82
2.2.3.4	DISKUSSION	85
2.2.4	EINFLUSS DER STRUKTUR VON POLYAMINOSÄUREN AUF DIE BINDUNG AUSGEWÄHLTER POLYPHENOLE	88
2.2.4.1	BINDUNGSSTUDIEN MIT MODELLPROTEINEN (POLYAMINOSÄUREN), β -CASEIN, PROTAMIN UND POLYAMID	88
2.2.4.2	DISKUSSION	93
3	EXPERIMENTELLER TEIL	101
3.1	UNTERSUCHUNGSMATERIAL	101
3.2	MATERIALIEN UND REAGENZIEN	101
3.2.1	CHEMIKALIEN	101
3.2.2	SYNTHESE DER THEAFLAVINE	104
3.3	ZUBEREITUNG EINES STANDARDTEEGETRÄNKES	106
3.4	EINFLUSS VON ADDITIVEN AUF DIE SENSORISCHE UND QUANTITATIVE CHARAKTERISIERUNG VON TEEINHALTSSTOFFEN	107
3.4.1	MAGERMILCHPULVER	107
3.4.2	LAKTOSE	107
3.5	AMINO-FUNCTIONALIZED MAGNETIC BEADS	107
3.5.1	PROTEINIMMOBILISIERUNG	107
3.5.2	BESTIMMUNG DER PROTEINKOPPLUNGSEFFIZIENZ MITTELS BCA-ASSAY	108
3.5.3	PROBENVORBEREITUNG FÜR PROTEINAKTIVIERTE MAGNETIC BEADS	109
3.5.4	BESTIMMUNG DER HALBMAXIMALEN BINDUNGSKONZENTRATION MITTELS AMINO-FUNCTIONALIZED MAGNETIC BEADS	112
3.5.4.1	FLAVAN-3-OLE	112
3.5.4.2	PYROGALLOL, GALLUSSÄURE, GALLUSSÄUREESTER, PENTAGALLOYLGLUKOSE	113

3.6	BINDUNGSSTUDIEN MIT POLYAMINOSÄUREN	114
3.6.1	PROBENVORBEREITUNG MITTELS ULTRAFILTRATION	114
3.6.2	BESTIMMUNG DER BINDUNGS-AFFINITÄT VON (-)-EPIGALLOCATECHIN-3-GALLAT MIT PROTAMIN	116
3.6.3	EINFLUSS DES pH-WERTES AUF DIE BINDUNGS-AKTIVITÄT VON (-)-EPIGALLOCATECHIN-3-GALLAT MIT PROTAMIN	117
3.7	QUANTITATIVE BESTIMMUNGEN DER GESCHMACKSSTOFFE IN SCHWARZEM TEE VOR UND NACH ZUGABE VON MAGERMILCHPULVER	117
3.7.1	FLAVAN-3-OLE	117
3.7.2	PURINALKALOIDE	118
3.7.3	FLAVONOLGLYKOSIDE	119
3.7.4	THEAFLAVINE	121
3.8	SENSORISCHE ANALYSE	122
3.8.1	SENSORIKPANEL	122
3.8.2	GESCHMACKSPROFILANALYSE	123
3.8.3	VERGLEICHENDE GESCHMACKSPROFILANALYSE	123
3.8.3.1	ZUSATZ VON MAGERMILCHPULVER ZUM STANDARDTEEGETRÄNK	123
3.8.3.2	ZUSATZ VON LAKTOSE ZUM STANDARDTEEGETRÄNK	124
3.8.4	ERSTELLEN UND SENSORISCHE BEURTEILUNG VON REKOMBINATEN	124
3.9	HOCHDRUCKFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE (HPLC)	124
3.10	SPEKTROSKOPISCHE METHODEN	125
3.10.1	UV/VIS SPEKTROSKOPIE	125
3.10.2	HOCHDRUCKFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE/MASSENSPEKTROMETRIE (LC/MS)	126
3.10.3	KERNRESONANZSPEKTROSKOPIE	126
3.10.3.1	¹ H-NMR	127
3.10.3.2	STD-NMR	127
4	ZUSAMMENFASSUNG	129
5	LITERATUR	133
6	ANHANG	145

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Ala	Alanin
amu	Atomic Mass Unit
ATP	Adenosintriphosphat
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
BCA	Bicinchoninic acid
BC ₅₀	Halbmaximale Bindungskonzentration
CEP	Cell Entrance Potential
CXP	Cell Exit Potential
Cys	Cystein
d	Duplett
Da	Dalton
DAD	Diodenarraydetektor
DAG	Diacylglycerin
ddd	Duplett von Duplett von Duplett
DoT	Dose-over-Threshold
DP	Declustering Potential
ESI	Electron Spray Ionisation
FOP	Flowery Orange Pekoe
gal	Galactosid
GBOP	Golden Broken Orange Pekoe
GFBOP	Golden Flowery Broken Orange Pekoe
glc	Glucosid
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
GVA	Geschmacksverdünnungsanalyse
GV-Faktor	Geschmacksverdünnungsfaktor
Gly	Glycin
His	Histidin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
hTAS2R	human TASTE 2 Receptor
IEP	isoelektrischer Punkt

Ile	Isoleucin
IP ₃	Inositoltriphosphat
IP ₃ R	Inositoltriphosphatrezeptor
kDa	Kilodalton
LC/MS	Liquid Chromatography/Mass Spectrometry
LC	Liquid Chromatography
Leu	Leucin
Lys	Lysin
m	Multipllett
Met	Methionin
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Massenspektrometer/massenspektrometrisch
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NMWL	Nominal Molecular Weight Limit
n.a.	nicht analysiert
n.b.	keine Bindung
n.d.	nicht detektierbar
n.w.	nicht wahrnehmbar
P	Signifikanzwert
Panx	Pannexin
Phe	Phenylalanin
PIP ₂	Phosphatidyl-inositoldiphosphat
PLCβ2	Phospholipase C Subtyp
Pro	Prolin
PROP	Propylthiouracil
PTC	Phenylthiocarbamid
rha	Rhamnosid
RP	Reversed Phase
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
Ser	Serin
STD	Saturation Transfer Difference
TGFOP	Tippy Golden Flowery Orange Pekoe
Thr	Threonin
TIC	Total Ion Chromatogram
Trp	Tryptophan
TrpM	Transient receptor potential cation channel

Tyr	Tyrosin
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV/Vis	Ultraviolet/Visible-Spectroscopy
Val	Valin

SYMBOLE

δ	chemische Verschiebung [ppm]
λ	Wellenlänge [nm]
J	Kopplungskonstante [Hz]
m/z	Verhältnis Masse zu Ladung

1 Einleitung

Als Tee oder Teemischungen werden die nach den in den Ursprungsländern üblichen Verfahren zubereiteten Blattknospen, jungen Blätter und jungen Triebe des Teestrauchs der Gattung *Camellia sinensis* bezeichnet. Tee ist eines der meist konsumierten Getränke dessen Popularität zum Einen auf der beruhigenden und anregenden Wirkung, zum Anderen auf seinem charakteristischen Geschmack beruht. Zusätzlich zu frisch zubereiteten Tees wächst der Marktanteil an in Flaschen oder Dosen abgefüllten „Ready-to-Drink“-Teegetränken, welche oft Additive in Form von Milchprodukten enthalten. Das Geschmacksprofil dieser Teegetränke wird jedoch deutlich von den verwendeten Zusätzen bestimmt und unterscheidet sich eindeutig von dem eines frisch zubereiteten Getränks.

1.1 Allgemeines zum Tee

Der Teestrauch wurde bereits in vorchristlicher Zeit in China und Japan kultiviert und wird unter anderem in Indien, Pakistan, Sri Lanka und Indonesien angebaut. Der immergrüne Teestrauch (*Camellia sinensis*) wird als *var. sinensis* (kleine Blätter) und als *var. assamica* (große Blätter) kultiviert, erreicht wildwachsend eine Höhe von bis zu 9 m, wird aber auf den Plantagen und in den Teegärten durch ständiges Beschneiden in Form von 1-1,5 m hohen Büschen gehalten. Der Teestrauch wird aus Setzlingen gezogen und gedeiht im tropischen und subtropischen Klima bei ausreichender Luftfeuchtigkeit. Nach 4-5 Jahren liefert er die ersten Vollernten, seine durchschnittliche Nutzungsdauer liegt bei 60-70 Jahren. Die vielfältigen Handelssorten werden bestimmt durch Herkunft, klimatische Verhältnisse, Alter, Verarbeitungsart und Sortierung der Blätter. Je jünger die Teeblätter sind, desto besser ist die Qualität eines Tees (FELDHEIM, 1994).

Die weiteren Verarbeitungsschritte des gepflückten Materials finden in der sogenannten Teemanufaktur statt. Die Blätter werden überwiegend zu drei Produkten verarbeitet, dem grünen Tee, dem Oolong Tee und dem schwarzen Tee (Abbildung 1).

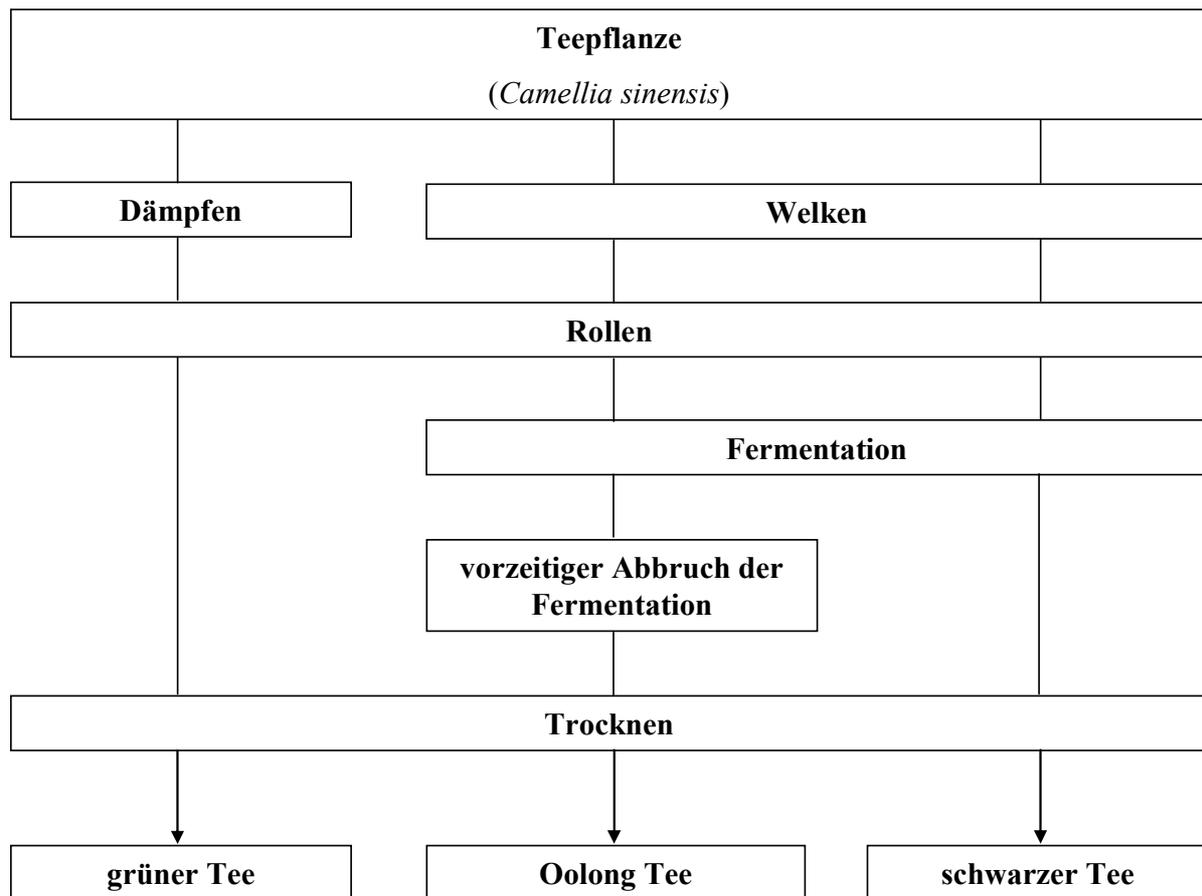


Abbildung 1: Unterschiede in der Herstellung der Teesorten grüner, schwarzer und Oolong Tee.

Grüner Tee – Bei dem vor allem in China und Japan hergestellten grünen Tee findet als entscheidendes Charakteristikum keine Fermentation der Teeblätter statt. Beim ursprünglichen Verfahren in Japan werden die Blätter zunächst auf Matten über siedendem Wasser oder im eigenen Saft zur Inaktivierung der Enzyme gedämpft, wodurch die Oxidation der phenolischen Verbindungen verhindert wird und das Chlorophyll erhalten bleibt (FELDHEIM, 1994). In China werden die Teeblätter hingegen in flachen eisernen Pfannen bei Temperaturen von bis zu 230 °C erhitzt. Anschließend werden sowohl in China als auch in Japan die Blätter an der Sonne ausgebreitet, gerollt und getrocknet (WANG und HO, 2009). Bei einem weiteren Verfahren wird das Erntegut unmittelbar nach dem Pflücken in rotierenden zylindrischen Behältern unter Druck gedämpft und in mehreren Stufen gerollt und getrocknet. Grüner Tee liefert sehr helle, klare, bitter schmeckende Aufgüsse.

Oolong Tee – Eine Mittelstellung zwischen schwarzem und grünem Tee nimmt der Oolong Tee ein. Die Teeblätter werden zwar nach dem Welken und Rollen einer Fermentation unterzogen, diese wird jedoch vorzeitig abgebrochen (WANG und HO, 2009).

Schwarzer Tee – Eine schematische Darstellung der einzelnen Verarbeitungsschritte vom frisch gepflückten Teeblatt bis hin zum Handelsprodukt gibt Abbildung 2 wieder. Frisch gepflückte Teeblätter, welche 75-80 % Wasser enthalten, werden zunächst dem Vorgang des Welkens in Welkhäusern oder Welktrommeln unterzogen. Nach dem Welken (Withering) sinkt der Wassergehalt auf 62-64 %. Beim Ceylontee zum Beispiel beträgt der Wassergehalt 58 %, beim Assamtee dagegen 66-67 %. Das Welken kann dabei durch Auslegen der Blätter in dünnen Schichten bei Raumtemperatur auf Horden erfolgen. Um die Welkzeit zu verkürzen wurden verschiedene Verfahren entwickelt. So lässt sich durch Welken in Trommeln (mit einem Fassungsvermögen von 700 kg Blättern und Einblasen von Warmluft) der Vorgang erheblich beschleunigen. Aber auch das Trocknen in Hallen mit Belüftung macht das Welken von der Witterung unabhängig. Bei diesem Verarbeitungsschritt werden in den Blättern Proteine zu Aminosäuren abgebaut und diese durch Transaminierung in Ketosäuren umgewandelt, welche bei der späteren Fermentation einen Teil der Aromastoffe des Tees ergeben. Anschließend erfolgt das Rollen der Blätter, früher durch Rollen zwischen den Handflächen ausgeführt, heutzutage mechanisch. Hierbei werden die Zellwände aufgebrochen und die normalerweise im Blatt ablaufenden biochemischen Reaktionen, einschließlich der Respiration, unterbrochen. Der gesamte Rollvorgang der gewelkten Blätter dauert 30 bis 60 min, dabei laufen bereits Fermentationsvorgänge ab. Die in verschiedenen Blattkompartimenten enthaltenen Polyphenole und die an der Fermentation beteiligten blatteigenen Enzyme können miteinander reagieren. Bei dieser Reaktion ändert sich die grüne Farbe des Teeblattes nach braun oder kupferfarben und es kommt zu einem Anstieg der Blatttemperatur (25-30 °C). Diese chemischen Umsetzungen, vornehmlich oxidative enzymatische Reaktionen, erreichen ihr Maximum während der eigentlichen Fermentation. In Abhängigkeit von der Blattqualität und den vorliegenden Bedingungen erfolgt der Hauptteil der Fermentation mit einem durchschnittlichen Zeitbedarf von zwei bis fünf Stunden, bei Raumtemperatur und bei einer Luftfeuchtigkeit von 90-98 % unter ständiger Luftzufuhr. Beim nächsten Schritt werden die Blätter in Heißlufttrocknern Temperaturen von bis zu 90-95 °C für 20-25 min ausgesetzt, wodurch die Fermentationsvorgänge unterbrochen werden und die Feuchtigkeit des Blattes von etwa 50 % auf 3-4 % sinkt. Die Teeblätter ändern unter dem Hitzeeinfluss ihre Farbe nach dunkelbraun bis schwarz. Die Qualität des Tees wird durch die Bedingungen der Trocknung entscheidend mitbestimmt.

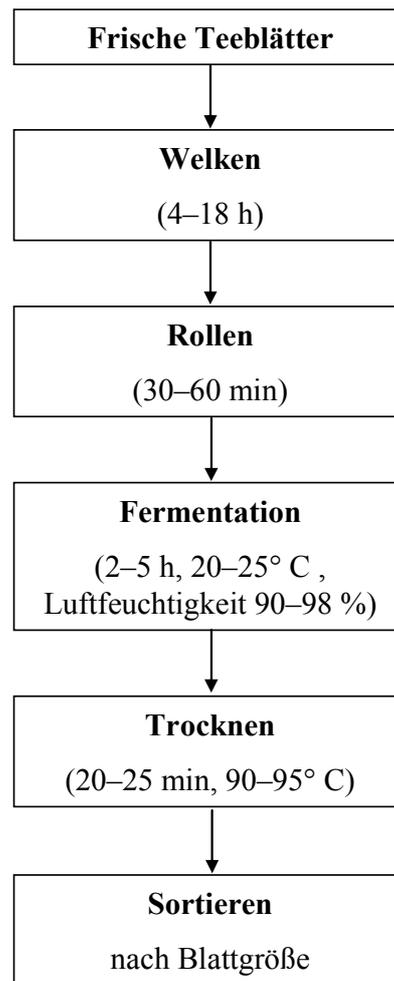


Abbildung 2: Klassisches Verfahren der Herstellung von schwarzem Tee (FELDHEIM, 1994).

Zur Herstellung von kleinblättrigen Teesorten, die insbesondere für die Teebeutelherstellung von Interesse sind, wurde ein neues Verfahren entwickelt, das sich von der traditionellen Methode unterscheidet. Beim CTC-Verfahren (C = crashing (zerquetschen), T = tearing (zerreißen), C = curling (rollen)) werden die Teeblätter nach dem Welken und einer verkürzten Rollzeit von etwa 30 min mechanisch zerrissen, wodurch die Fermentationszeit verkürzt wird (FELDHEIM, 1994).

Im Anschluss an die eigentliche Schwartee-Herstellung, erfolgt das Sortieren. Mit Hilfe mechanischer Siebvorrichtungen verschiedener Größe werden die diversen Blattgrößen, die während der Verarbeitung entstehen, fraktioniert. Pekoe, Orange Pekoe und Flowery Pekoe sind Bezeichnungen für großblättrige Tees, die jeweils verschiedene Feinheitsgrade aufweisen. Pekoe kommt vom chinesischen pekho und bezieht sich auf die mit feinen, flaumigen Haaren bedeckte Unterseite der jungen Blätter und der Knospe. Flowery Pekoe

wird ausschließlich von den zartesten Spitzen der Frühjahrslese gewonnen. Ein fein gebrochener Tee mit den feinsten Blattspitzen junger Teeblätter (Tips; two leaves and the bud) wird als Broken Orange Pekoe bezeichnet. Der Begriff Orange wird darauf zurückgeführt, dass diese früher in China getrunkenen Tees mit Orangenblüten parfümiert wurden. Broken Pekoe ist die durch Schneiden aus den größeren Blättern erhaltene Sortierung, die einen kräftigen Teeaufguss liefert. Dagegen drückt die Angabe Broken Orange Pekoe Fannings die Aussiebungen aus den noch nicht geschnittenen Blättern aus. Dust ist die Benennung für die feinste Aussiebung. Dieser sowie Flannings werden besonders bei der Teebeutelherstellung verwendet (FELDHEIM, 1994).

Besonders hochwertig sind die aus der Provinz Darjeeling am Himalaya und aus dem Hochland von Sri Lanka stammenden Teesorten. Zur Erhaltung der Qualität von Tee werden weltweit Teemischungen hergestellt.

Die Extraktion der Teeinhaltsstoffe erfolgt bei der Herstellung des Teegetränkes durch das Aufgießen der Teedroge mit heißem Wasser. Die verwendete Menge der Teedroge und die Art des Blattmaterials sind dabei für die sensorische Qualität eines Getränkes entscheidend. Eine Standardteeinfusion ist demnach durch das Verwenden von 1,0-1,3 g Teedroge/100 mL Wasser und mit einer durchschnittlichen Brühzeit von bis zu 5 min herzustellen (FELDHEIM, 1994).

1.2 Teeinhaltsstoffe und deren Bedeutung für den Geschmack

Der charakteristische Geschmack von schwarzem Tee wird geprägt durch ein ausgewogenes Verhältnis von Adstringens und Bitterkeit. Diverse Substanzklassen tragen dabei zum Gesamtgeschmack bei.

Die chemische Zusammensetzung des Teeblattes schwankt je nach Herkunft, Alter und Behandlung innerhalb weiter Grenzen. Einen Überblick über die Bestandteile frischer sowie fermentierter Blätter gibt Tabelle 1. Die meisten Teeinhaltsstoffe wie phenolische Verbindungen, Aminosäuren, Mineralstoffe oder das Koffein können aus der Teedroge in das Teegetränk extrahiert werden. Lipide und Pigmente besitzen hingegen eine sehr schlechte Extrahierbarkeit, genau wie Proteine und Rohfasern, so dass diese Bestandteile höchstens in Spuren im Teegetränk vorkommen.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Trockensubstanz (%) von frischen und fermentierten Teeblättern und von Teeaufguss (BOKUCHAVA und SKOBELEVA, 1980, BELITZ et al., 2001).

Bestandteil	Frisches Material	Schwarzer Tee	Teeaufguss ^a
Phenolische Verbindungen ^b	30	5	4,5
Oxidierter phenolischer Verbindungen ^c	0	25	15
Proteine	15	15	+ ^d
Aminosäuren	4	4	3,5
Koffein	4	4	3,2
Rohfaser	26	26	0
Andere Kohlenhydrate	7	7	4
Lipide	7	7	+ ^d
Pigmente ^e	2	2	+ ^d
Flüchtige Verbindungen	0,1	0,1	0,1
Mineralstoffe	5	5	4,5

^a Brühzeit 3 min. ^b Vorwiegend Flavanole. ^c Vorwiegend Thearubigene, weniger Theaflavine. ^d Spuren. ^e Chlorophyll und Carotinoide.

25-35 % der Trockenmasse von frischen jungen Teeblättern sind phenolische Verbindungen, 80 % davon Flavanole (Tabelle 2). Bei den Hauptvertretern der Flavanole handelt es sich um (-)-Epigallocatechingallat, (-)-Epicatechingallat und (-)-Epigallocatechin, gefolgt von (+)-Gallocatechin, (-)-Epicatechin sowie (+)-Catechin (Tabelle 2).

Darüber hinaus konnten Procyanidine, phenolische Säuren, Flavonoide, Flavonolglykoside und Flavone als Komponenten der Teeblätter sowie Bestandteile im Teegetränk identifiziert, quantifiziert sowie deren Beitrag zum Geschmack von Tee analysiert werden (ROBERTS et al., 1957, FINGER et al., 1992, BRONNER und BEECHER, 1998, DEL RIO et al., 2004, SCHARBERT et al., 2004a, SCHARBERT und HOFMANN, 2005).

Tabelle 2: Phenolische Verbindungen in frischen Teeblättern (% der Trockenmasse) (BOKUCHAVA und SKOBELEVA, 1980, BELITZ et al., 2001).

Verbindung	Menge
(-)-Epicatechin	1-3
(-)-Epicatechingallat	3-6
(-)-Epicatechindigallat	+ ^a
(-)-Epigallocatechin	3-6
(-)-Epigallocatechingallat	9-13
(-)-Epigallocatechindigallat	+ ^a
(+)-Catechin	1-2
(+)-Galocatechin	3-4
Flavonole und Flavonolglykoside (u.a. Quercetin, Kämpferol)	+ ^a
Flavone (u.a. Vitexin)	+ ^a
Leukoanthocyane	2-3
Phenolcarbonsäuren und Ester (u.a. Gallussäure, Chlorogensäuren, p-Cumaroylchinasäuren, Theogallin)	~ 5
Phenole insgesamt	25-35

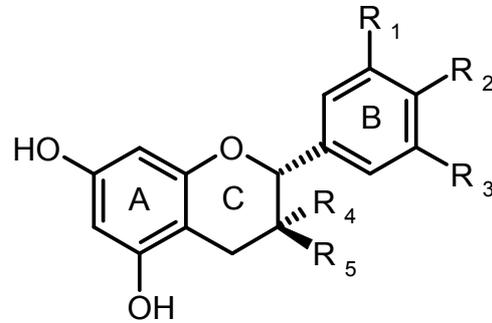
^a keine quantitativen Daten vorhanden.

Die chemischen Strukturformeln der Flavan-3-olderivate, welche auch Catechine genannt werden, zeigt [Abbildung 3](#).

Das Grundgerüst der Flavan-3-ole besteht aus zwei aromatischen Ringen (A- und B-Ring), welche über einen O-heterozyklischen Ring (C-Ring) verbunden sind. Das gemeinsame Strukturelement dieser Substanzklasse stellt hierbei der dihydroxylierte A-Ring dar, welcher bei allen gezeigten Catechinen gleich ist. Unterschiedliche Substitutionsmuster weist dagegen der B-Ring auf, dieser kann entweder dihydroxyliert wie zum Beispiel bei (-)-Epicatechin (**1**) oder trihydroxyliert wie beispielsweise bei (-)-Epigallocatechin (**5**) vorliegen. Durch Veresterung des C-Rings mit Gallussäure entstehen die galloylierten Derivate **3**, **4**, **7** und **8**, die nicht-galloylierten Catechine weisen dagegen einen monohydroxylierten C-Ring auf.

Bei den Flavan-3-olen **1** und **2**, **3** und **4**, **5** und **6** sowie **7** und **8** handelt es sich um Epimere. Diese Moleküle unterscheiden sich lediglich am Stereozentrum an Position 3. Außer den

(-)-Enantiomeren der Flavan-3-ole, wie in Abbildung 3 dargestellt, sind auch (+)-Enantiomere bekannt (Tabelle 2).



	R ₁ (B-Ring)	R ₂ (B-Ring)	R ₃ (B-Ring)	R ₄ (C-Ring)	R ₅ (C-Ring)
1	OH	OH	H	OH	H
2	H	OH	OH	H	OH
3	OH	OH	H	OCOC ₆ O ₃ H ₅ (D-Ring)	H
4	H	OH	OH	H	OCOC ₆ O ₃ H ₅ (D-Ring)
5	OH	OH	OH	OH	H
6	OH	OH	OH	H	OH
7	OH	OH	OH	OCOC ₆ O ₃ H ₅ (D-Ring)	H
8	OH	OH	OH	H	OCOC ₆ O ₃ H ₅ (D-Ring)

Abbildung 3: Strukturformeln der Flavan-3-ole: (-)-Epicatechin (1), (-)-Catechin (2), (-)-Epicatechin-3-gallat (3), (-)-Catechin-3-gallat (4), (-)-Epigallocatechin (5), (-)-Gallocatechin (6), (-)-Epigallocatechin-3-gallat (7) und (-)-Gallocatechin-3-gallat (8).

Die Biosynthese der Flavanoide (GRIESEBACH und BARZ, 1969, PUNYASIRI et al., 2004) in den Blättern der Teepflanze erfolgt durch eine stufenweise Kondensation einer aktivierten Hydroxyzimtsäure mit drei aktivierten Malonsäuren, die ihren Ursprung im Fettsäure-Stoffwechsel haben. Die Bildung der Hydroxyzimtsäure erfolgt über Zimtsäure, deren Bildung durch Desaminierung aus L-Phenylalanin durch das Enzym Phenylalaninammoniumlyase katalysiert wird. Der A-Ring bildet sich durch eine „Kopf-Schwanz“-Verknüpfung von Malonat-Einheiten, während der B-Ring einschließlich der C-Atome C2, C3 und C4 aus Hydroxyzimtsäure-Einheiten (C₆-C₃) stammt. Das primär resultierende Chalkon kann durch Umlagerung in das Flavanon überführt werden, das Gleichgewicht liegt jedoch weit auf der Seite des Flavanons (Abbildung 4).

Vom Flavanon aus können einerseits die Flavone und andererseits die Flavanone entstehen. Von letzteren führen Bildungswege zu den Flavandiolen, Flavanolen und Flavonolen.

Bereits 1969 konnten MILLIN et al. zeigen, dass die Flavan-3-ole Epicatechingallat, Epigallocatechingallat, Epicatechin, Epigallocatechin und Galocatechin in Wasser einen adstringierenden und metallischen Geschmack aufweisen. Es wurde zudem beobachtet, dass Epigallocatechin eine süßliche Note aufwies. Diese Erkenntnisse unterstützen die Bedeutung des Geschmackseindrucks adstringierend für den typischen Geschmack von schwarzem Tee. SCHARBERT et al. (2004a) beschrieben zudem die Flavan-3-ole (-)-Catechin (**2**) und (-)-Epigallocatechingallat (**7**) als Schlüsselgeschmacksstoffe im Darjeeling Teegetränk und konnten zeigen, dass alle Flavan-3-ole eine raue Adstringenz mit Schwellenwerten im Konzentrationsbereich von 190-540 µmol/L Wasser aufweisen.

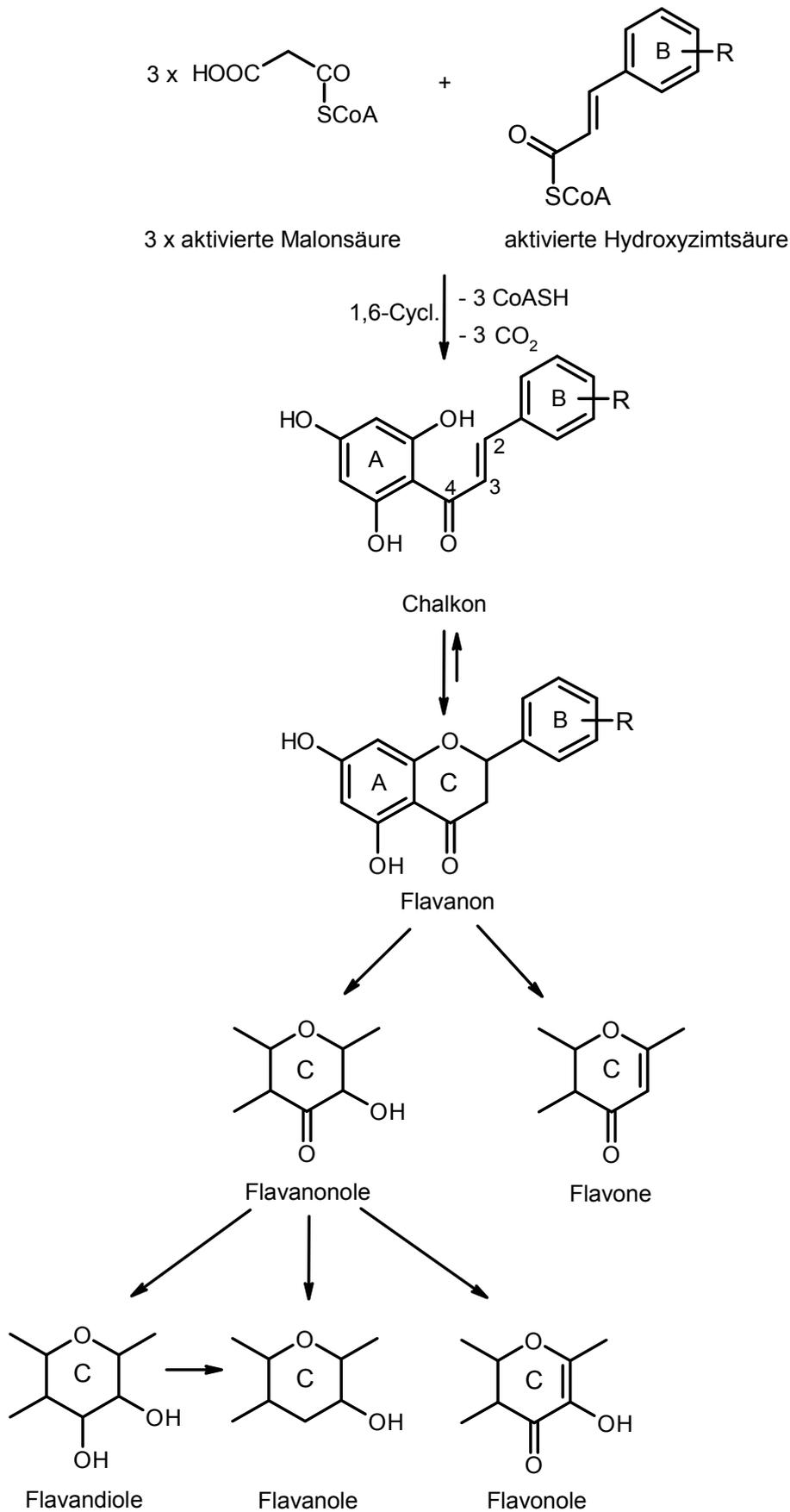


Abbildung 4: Biosynthese der Flavanoide (GRIESEBACH und BARZ, 1969, BELITZ et al., 2001).

Während der Fermentation der Teeblätter werden die Flavan-3-ole enzymatisch oxidiert. Die Reaktion verläuft unter Sauerstoffverbrauch und wird durch das Enzym Polyphenoloxidase katalysiert. Bislang ist lediglich bekannt, dass die sogenannten Theaflavine, welche eine raue Adstringenz im hinteren Rachenbereich hervorrufen, durch oxidative Kondensation eines am B-Ring ortho-dihydroxylierten und eines am B-Ring ortho-trihydroxylierten Flavan-3-ols entstehen. Die entsprechenden o-Chinone fungieren als Zwischenprodukte zu den Benzotropolonderivaten, welche nach abschließender Decarboxylierung gebildet werden können (ROBERTS, 1958, ROBERTS und MYERS, 1959, TAKINO et al., 1964, SCHARBERT et al., 2004b, [Abbildung 5](#)). Zur vereinfachten schematischen Darstellung des Bildungsmechanismus zeigt [Abbildung 5](#) lediglich die an der Reaktion beteiligten di- und trihydroxylierten B-Ringe der zwei Flavan-3-olmoleküle. Der Rest der jeweiligen Struktur wird mit R abgekürzt angegeben.

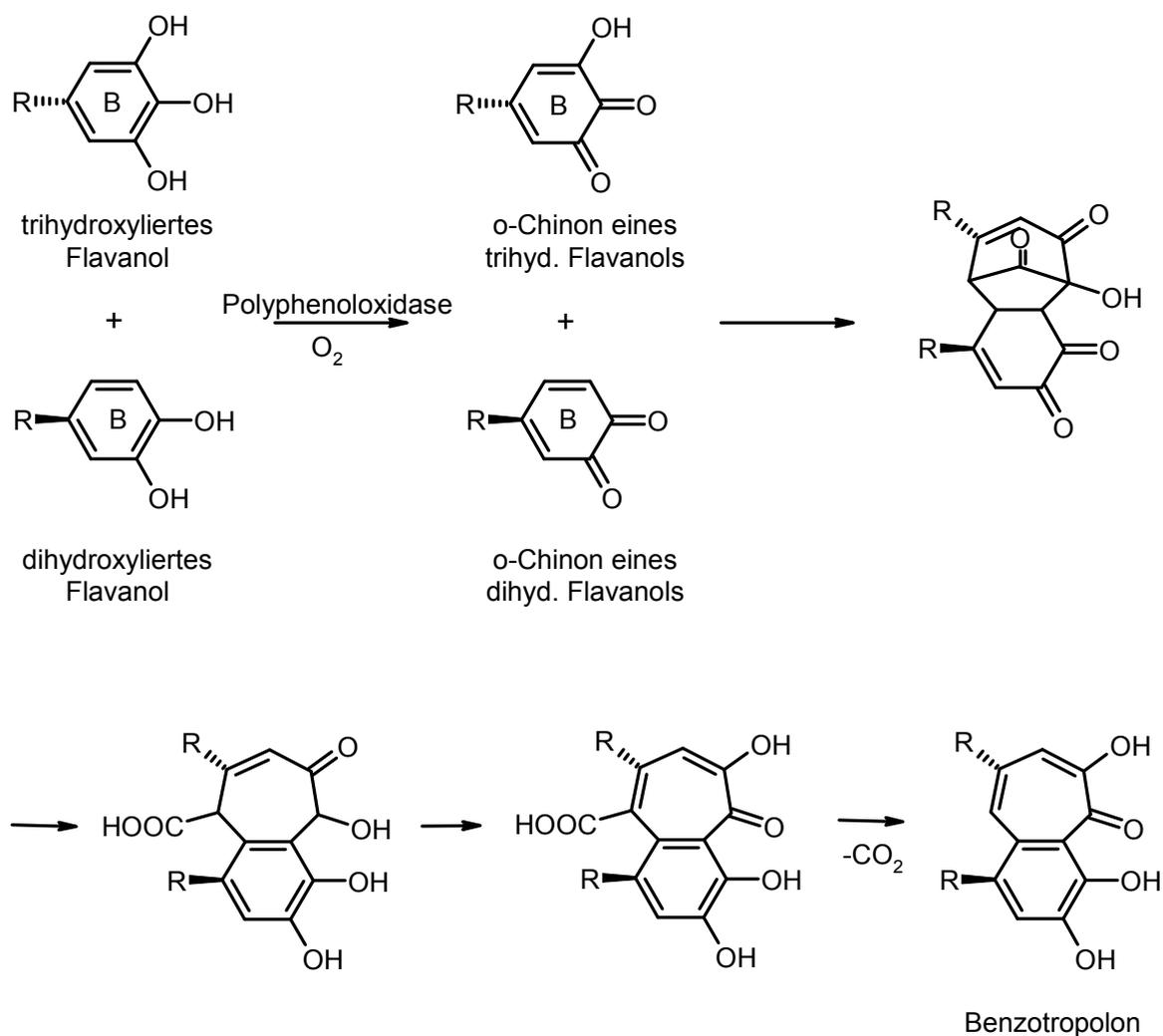


Abbildung 5: Allgemeine Bildung eines Benzotropolons durch oxidative Kondensation zweier Flavan-3-ol Moleküle (TAKINO et al., 1964).

Je nachdem welche Flavan-3-ole an der Reaktion beteiligt sind, entstehen Benzotropolonderivate mit unterschiedlichen Substitutionsmustern (Abbildung 6). Die Ausgangssubstanzen für die jeweilige Synthese sind in Tabelle 14 (Kapitel 3.2.2) zusammengefasst.

Zusätzlich zu Theaflavin (10) konnten weitere Gallussäurederivate der Theaflavine wie Theaflavin-3-gallat (11), Theaflavin-3'-gallat (12) und Theaflavin-3,3'-digallat (13) im Tee nachgewiesen werden (ROBERTS, 1958, BRYCE et al., 1970, ROBERTSON und BENDALL, 1983, SCHARBERT et al., 2004b). In weiteren Studien konnten zudem methylierte Theaflavinderivate wie z. B. das Theaflavin-3-O-(3-O-methyl)gallat als Bestandteile von schwarzem Tee aufgeklärt werden (NISHIMURA et al., 2007).

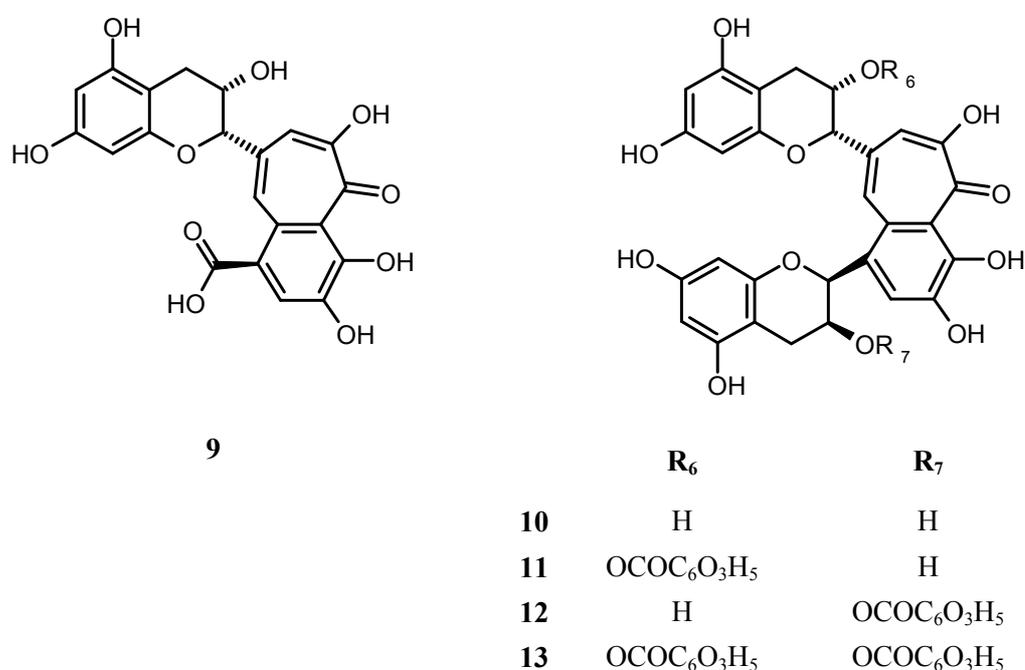


Abbildung 6: Strukturformeln der Theaflavine: Theaflavinsäure (9), Theaflavin (10), Theaflavin-3-gallat (11), Theaflavin-3'-gallat (12) und Theaflavin-3,3'-digallat (13).

Theaflavine wurden bereits von ROBERTS (1958) als qualitätsgebende, sich vom grünen Tee abgrenzende Parameter im schwarzen Tee angesehen. So beschrieben auch MILLIN et al. (1969) diese Substanzklasse als wertgebend für den adstringierenden Geschmack des schwarzen Tees. DING et al. (1992) untersuchten die Korrelation der Gehalte von vier Theaflavinen zum sensorisch ermittelten adstringierenden Geschmack in zahlreichen Tees, sie konnten jedoch keine Korrelation zwischen Theaflavingehalt und adstringierendem

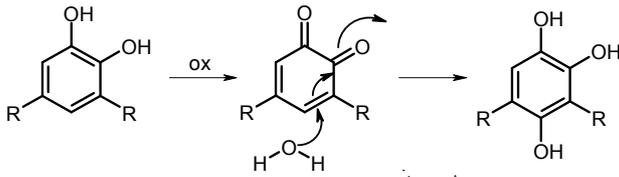
Geschmack von Tee beobachten. WRIGHT et al. postulierten hingegen 2000 einen Korrelationskoeffizienten bezogen auf den Zusammenhang des Gesamtgehaltes der Theaflavine und der Qualität eines Tees. Hingegen zeigten molekular-sensorische Studien von SCHARBERT und HOFMANN (2005), dass die Theaflavinderivate keine Schlüsselgeschmacksstoffe im Darjeeling Teegetränk darstellen.

Neben den niedermolekularen Theaflavinen wurden im schwarzen Tee auch hochpolymere Thearubigene beschrieben (ROBERTS, 1958). Diese orange-braun gefärbte Pigmentgruppe entsteht ebenfalls enzymatisch während der Fermentation der Teeblätter aus den Flavan-3-olen. Sie sind eine heterogene Gruppe von Verbindungen, deren Struktur bislang wenig charakterisiert wurde.

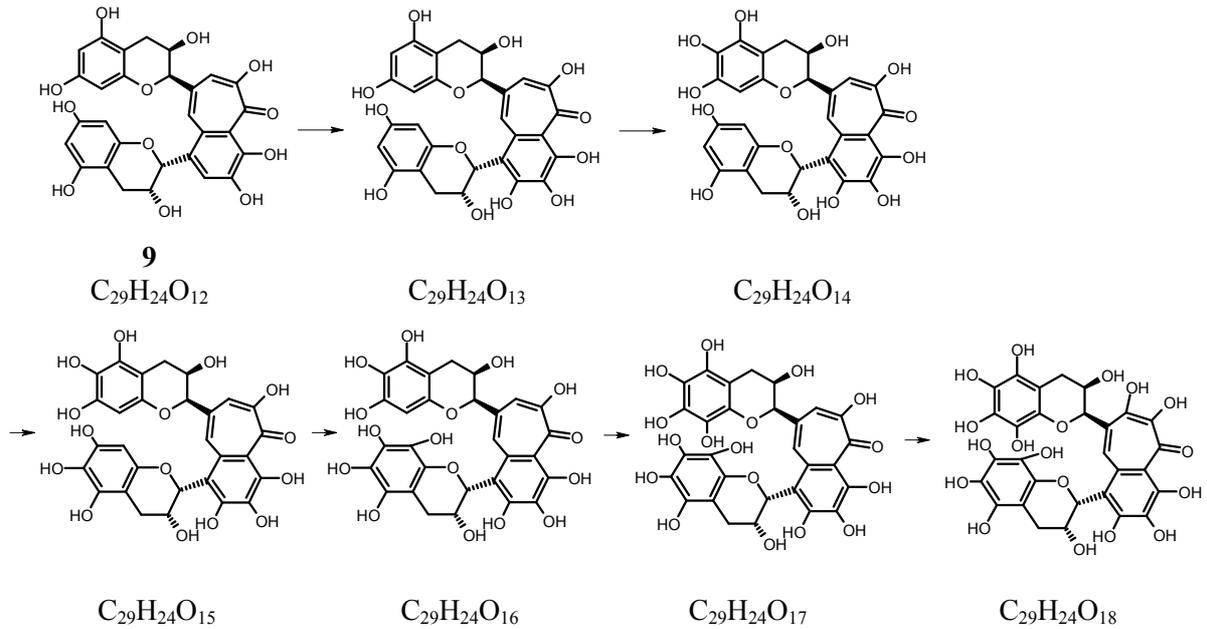
2010 gelang es KUHNERT anhand diverser Methoden wie Verbrennungsanalyse, IR-, NMR-, MS- und UV/VIS Spektroskopie erste Einblicke in die Strukturen der Thearubigenfraktionen zu erhalten. Diese Thearubigenfraktionen wiesen sowohl intakte Flavan-3-olstrukturen als auch Benzotropolon- und *ortho*-Chinoneinheiten auf. Das maximale Molekulargewicht der untersuchten Thearubigene betrug 2000 Da und es konnte zudem ein erhöhter Sauerstoffgehalt ermittelt werden (KUHNERT, 2010). Unter anderem konnten aus Theaflavin (9) sechs neuartige oxidierte Produkte, die mit Summenformeln zwischen $C_{29}H_{24}O_{13}$ und $C_{29}H_{24}O_{18}$ beschrieben wurden, als Hydroxytheaflavine charakterisiert werden (Abbildung 7B). Der vorgeschlagene Bildungsweg dieser oxidierten Produkte nach KUHNERT ist in Abbildung 7A dargestellt. Durch Hydrierung/Dehydrierung von oxidiertem Theanaphthochinon $C_{28}H_{24}O_{16}$ wurde zudem die Bildung der sogenannten Oxo-Theanaphthochinone mit Summenformeln $C_{28}H_{22}O_{16}$, $C_{28}H_{20}O_{16}$ und $C_{28}H_{18}O_{16}$ gezeigt (Abbildung 7C). Unter Zusammenfassung der aufgenommenen Daten konnte von KUHNERT gezeigt werden, dass Thearubigene mehrere tausend Verbindungen beinhalten und keine Polymere, sondern Oligomere der Flavan-3-ole sind.

Um den Beitrag der polymeren Thearubigene zum Gesamtgeschmack von Darjeeling Tee beurteilen zu können, nutzte SCHARBERT (2005) die Fraktionierung des Tees durch mehrstufige Ultrafiltration. Es gelang hierbei drei verschiedene Fraktionen zu erhalten: Fraktion I enthielt Substanzen > 10 kDa, Fraktion II, die Verbindungen mit Molekulargewichten zwischen 1 und 10 kDa aufwies, und Fraktion III mit Verbindungen < 1 kDa. Nach humansensorischen Untersuchungen auch anhand von Rekombinations- und Omissionsexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Thearubigene in Fraktion I keinen maßgeblichen Beitrag zum Geschmack des Darjeeling Teegetränkes leisteten (SCHARBERT, 2005).

A



B



C

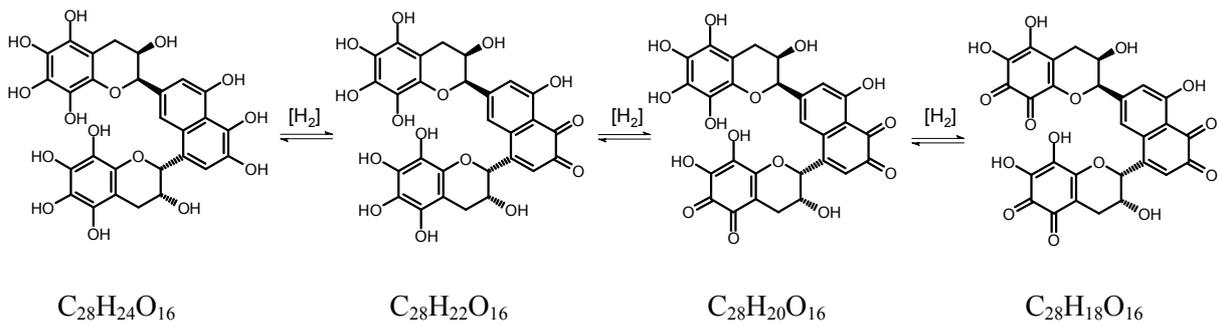
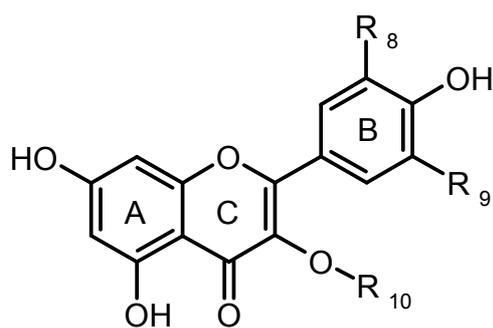


Abbildung 7: Modelle oxidierter Thearubigenstrukturen nach KUNERT (2010): A = vorgeschlagener Bildungsweg oxidierter Thearubigene. B = Hydroxytheaflavine mit Theaflavin (9). C= Oxo-Theanaphthochinone mit Theanaphthochinon ($C_{28}H_{24}O_{16}$)

Eine weitere Substanzklasse der phenolischen Verbindungen sind die Flavon-3-olglykoside, ebenfalls bedeutende Komponenten des Teeblattes. Diese Substanzen weisen eine samtartige, austrocknend adstringierende Geschmackswahrnehmung auf. Als Aglykon wurden Myricetin, Quercetin und Kämpferol nachgewiesen, als Zuckerbestandteile treten Glukose, Rhamnose, Galaktose und Fruktose auf (ROBERTS et al., 1956). Es konnten Mono-, Di- und Triglykoside aufgeklärt werden (ENGELHARDT et al., 1992). Die chemischen Strukturformeln ausgewählter Flavon-3-olglykoside sind in Abbildung 8 gezeigt. Die Aglykone Kämpferol (monohydroxylierter B-Ring), Quercetin (dihydroxylierter B-Ring) und Myricetin (trihydroxylierter B-Ring) treten hierbei verestert am C-Ring mit verschiedenen Zuckerresten wie beispielsweise Glukose, Galaktose oder Rhamnose auf. Dabei entstehen Mono- (**14 15, 19, 20, 24, 25**), Di- (**16, 21, 26**) sowie Triglykoside (**17, 18, 22, 23**).

Da Flavon-3-olglykoside durch Polyphenoloxidasen fast nicht verändert werden, ist ihr Gehalt im frischen Teeblatt und im fermentierten Tee, bezogen auf die Trockenmasse, nahezu gleich. Bei Untersuchungen identifizierten und quantifizierten ENGELHARDT et al. (1992) 14 Flavon-3-olglykoside. Der Gesamtgehalt der identifizierten Substanzen lag bei dieser Untersuchung zwischen 0,4 und 1,7 g/100 g Teetrockenmasse. Das Vorhandensein dieser 14 Flavon-3-olglykoside im Darjeeling Teegetränk konnte 2005 von SCHARBERT und HOFMANN bestätigt werden. Zudem wurden von diesen 14 Flavon-3-olglykosiden neun Flavon-3-olglykoside (**14-16, 19-21, 23-25, Abbildung 8**) als Schlüsselgeschmacksstoffe im Darjeeling Teegetränk postuliert. Außerdem gelang es Apigenin-8-C-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-O- β -D-glucopyranosid] erstmals im Teegetränk zu identifizieren (SCHARBERT et al., 2004a). Auch DEL RIO et al. (2004) beschrieben den Gehalt an Quercetin und Kämpferol-mono-, di- und triglykosiden im schwarzen Tee mit 8,6 %. Die gelbfarbenen Flavon-3-olglykoside tragen zur Farbe der Aufgüsse von schwarzem, jedoch vor allem von grünem Tee bei.



	R_8	R_9	R_{10}
14	H	H	$-\beta\text{-D-glc}$
15	H	H	$-\beta\text{-D-gal}$
16	H	H	$-\alpha\text{-L-rha-(1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-glc}$
17	H	H	$-\beta\text{-D-glc-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-L-rha-(1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-glc}$
18	H	H	$-\beta\text{-D-glc-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-L-rha-(1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-gal}$
19	OH	H	$-\beta\text{-D-glc}$
20	OH	H	$-\beta\text{-D-gal}$
21	OH	H	$-\alpha\text{-L-rha-(1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-glc}$
22	OH	H	$-\beta\text{-D-glc-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-L-rha-(1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-glc}$
23	OH	H	$-\beta\text{-D-glc-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-L-rha-(1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-gal}$
24	OH	OH	$-\beta\text{-D-glc}$
25	OH	OH	$-\beta\text{-D-gal}$
26	OH	OH	$-\alpha\text{-L-rha-(1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-glc}$

Abbildung 8: Strukturformeln der Flavonolglykoside: Kämpferol-3-O- β -D-glucopyranosid (14), Kämpferol-3-O- β -D-galactopyranosid (15), Kämpferol-3-O- $[\alpha\text{-L-rhamnopyranosyl-(1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-glucopyranosid}]$ (16), Kämpferol-3-O- $[\beta\text{-D-glucopyranosyl-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-L-rhamnopyranosyl-(1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-glucopyranosid}]$ (17), Kämpferol-3-O- $[\beta\text{-D-glucopyranosyl-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-L-rhamnopyranosyl-(1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-galactopyranosid}]$ (18), Quercetin-3-O- β -D-glucopyranosid (19), Quercetin-3-O- β -D-galactopyranosid (20), Quercetin-3-O- $[\alpha\text{-L-rhamnopyranosyl-(1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-glucopyranosid}]$ (21), Quercetin-3-O- $[\beta\text{-D-glucopyranosyl-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-L-rhamnopyranosyl-(1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-glucopyranosid}]$ (22), Quercetin-3-O- $[\beta\text{-D-glucopyranosyl-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-L-rhamnopyranosyl-(1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-galactopyranosid}]$ (23), Myricetin-3-O- β -D-glucopyranosid (24), Myricetin-3-O- β -D-galactopyranosid (25) und Myricetin-3-O- $[\alpha\text{-L-rhamnopyranosyl-(1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-glucopyranosid}]$ (26).

Eine weitere Substanzgruppe, die für den charakteristischen bitteren Geschmack von Teeinfusionen verantwortlich gemacht wird, bilden die Purinalkaloide. Die Vertreter dieser Gruppe sind Theobromin (3,7-Dimethylxanthin (**27**)) und Koffein (1,3,7-Trimethylxanthin (**28**)) (Abbildung 9).

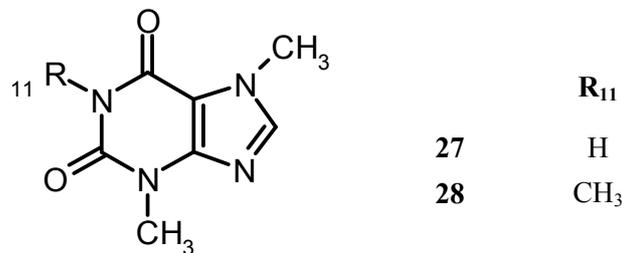


Abbildung 9: Strukturformeln der Purinalkaloide: Theobromin (27) und Koffein (28).

Schwarzer Tee enthält ca. 40-60 % weniger Purinalkaloide als grüner Tee (DEL RIO et al., 2004). Der Koffeingehalt von Schwarzteeblättern liegt zwischen 2,6 und 4,5 g/100 g Trockenmasse. Aufgrund der physiologischen Effekte auf das Nerven- und Herz-Kreislaufsystem ist Koffein (**28**) für die anregende und belebende Wirkung des Tees bekannt. Verschiedene Studien weisen dem Koffein (**28**) eine Schlüsselfunktion in Bezug auf die Bitterkeit von Tee zu (MILLIN et al., 1969, SCHARBERT und HOFMANN, 2005, HENZE, 2009).

Humansensorische Studien eines Darjeeling Teegetränkes von SCHARBERT und HOFMANN (2005) zeigten zudem erstmalig, dass die Flavonolglykoside einen Einfluss auf die Bitterkeit des Koffeins (**28**) besitzen und den Geschmack bitterer Substanzen deutlich verstärken, ohne selbst einen bitteren Geschmack aufzuweisen.

Weiterführende Studien an grünem Tee von HENZE (2009) zeigten, dass das Flavonolglykosid Quercetin-3-O- $[\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosid (**21**, Rutin) in der Lage ist mit dem Bitterstoff Koffein (**28**) Komplexe zu bilden. Die Verifizierung der Komplexbildung erfolgte mit Hilfe einer ¹H-NMR Titration mit einer konstanten Rutinkonzentration und einer steigenden Koffeinkonzentration und der damit verbundenen Änderung der chemischen Verschiebungen der Protonensignale (Abbildung 10). Die aromatischen Protonen H-C(6) und H-C(8) am A-Ring von **21** zeigten durch die Komplexbildung mit Koffein (**28**) eine starke Hochfeldverschiebung (Abbildung 10A). Dagegen konnten nur geringfügige Veränderungen der chemischen Verschiebungen der Protonen H-C(2'), H-C(5') und H-C(6') und keine

Veränderung für die Resonanz der Protonen der Zuckereinheit detektiert werden, so dass eine sogenannte „*face-to-face* π,π -stacking“ Anordnung des Koffeins (**28**) und des A-Rings von Rutin (**21**) vermutet wurde. Auch bestätigt dadurch, dass im Koffeinmolekül sowohl für die Methylprotonen N(1)-CH₃, N(3)-CH₃ und N(7)-CH₃, als auch für H-C(8) Verschiebungen der jeweiligen Signale festgestellt werden konnten (Abbildung 10B).

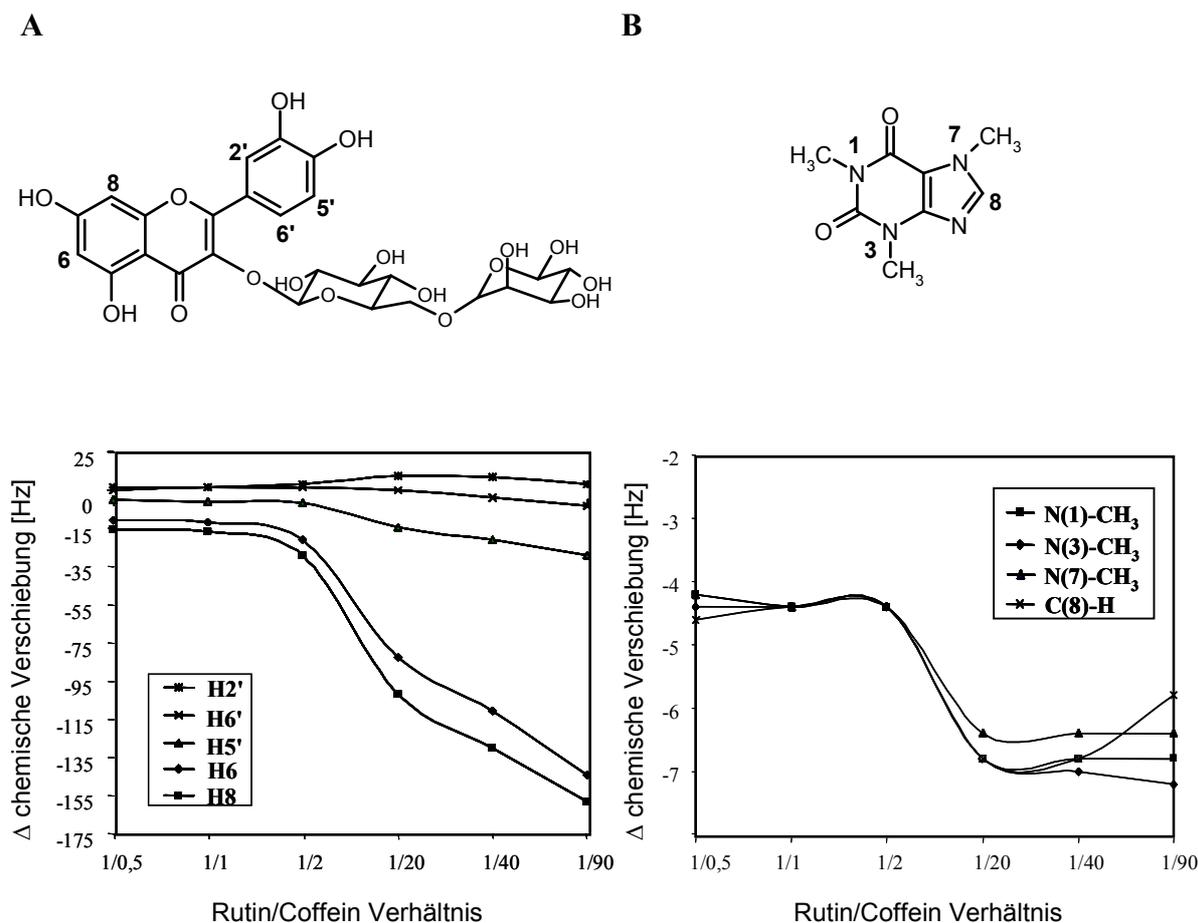


Abbildung 10: Differenz der chemischen Verschiebung der Protonensignale von Rutin (A) und Koffein (B) durch steigende Koffeinkonzentration (HENZE, 2009).

Auch konnte von HENZE postuliert werden, dass eine Steigerung der Koffein-Bitterkeit in Gegenwart von Flavon-3-olglykosiden, jedoch nicht in Anwesenheit eines Flavon-4'-olglykosides zu beobachten war. Die Anzahl der Zucker hatte keinen Einfluss auf die Steigerung der Bitterkeit. Auf der Seite des Bitterstoffs zeigte Koffein (**28**) im Triangel-Test die höchste Signifikanz im Vergleich zu Theobromin (**27**) und Theophyllin (HENZE, 2009).

1.3 Grundlagen der Geschmackswahrnehmung

Beim Verzehr von Lebensmitteln ergänzen sich der Geruchssinn, der Geschmackssinn und das Tastempfinden zu einem Gesamtsinnesindruck. Dabei ist der Geruchssinn für die Wahrnehmung flüchtiger Substanzen zuständig. Zum Einen erfolgt die Aufnahme der Duftstoffe olfaktorisch über die Riechschleimhaut im Nasendach (orthonasal) und zum Anderen retronasal durch Zerkauen eines Lebensmittels im Mund (HILDEBRANDT, 2008).

Geschmacksstoffe sind hingegen im Allgemeinen nichtflüchtige, polare und wasserlösliche Verbindungen, welche durch Rezeptoren auf der Zunge wahrgenommen werden. Die Geschmackspapillen, die sich auf der Zungenoberfläche befinden, werden nach ihrer Form in drei Typen eingeteilt. Dabei handelt es sich um Pilzpapillen, diese tragen 3-5 Geschmacksknospen, welche als die eigentlichen Geschmacksorgane bezeichnet werden. Weitere Formen sind die Wallpapillen mit etwa 100 Geschmacksknospen sowie die Blätterpapillen, welche etwa über 50 Geschmacksknospen verfügen (BAJEC und PICKERING, 2008). Bisher konnten spezifische Rezeptoren für insgesamt fünf Geschmacksqualitäten detektiert werden: süß, salzig, sauer, bitter und umami. Die Signaltransduktion für die Wahrnehmung der verschiedenen Geschmacksqualitäten ist umfangreich, da sie auf grundsätzlich unterschiedlichen Prozessen beruht.

Die Vermittlung des salzigen und sauren Geschmacks verläuft ionotrop mittels Membrankanälen. Nach heutigem Kenntnisstand erfolgt die Vermittlung des salzigen (Na^+) Geschmacks durch die Aktivierung der speziellen Natriumionenkanäle wie ENaC („epithelial sodium channel“) (BACHMANOV und BEAUCHAMP, 2007), wobei auch das Vorhandensein weiterer Rezeptoren in der Literatur diskutiert wird (CHAUDHARI und ROPER, 2010). Nach ISHIMARU et al. (2006) verläuft die Wahrnehmung des Sauergeschmacks hingegen über die Proteine PKD2L1 („polycystic kidney disease 2-like 1“) und PKD1L3 („polycystic kidney disease 1-like 3“).

Die Geschmacksqualitäten süß, bitter und umami werden hingegen metabotrop vermittelt. Die Wahrnehmung dieser Geschmacksqualitäten erfolgt durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR). Die Rezeptoren für den Umami- und Süßgeschmack sind aus Heterodimeren der hTAS1R-Familie aufgebaut, während die Wahrnehmung der Bitterkeit durch eine Vielzahl an Rezeptoren der hTAS2R-Familie erfolgt (BACHMANOV und BEAUCHAMP, 2007, BEHRENS et al., 2007, CHAUDHARI und ROPER, 2010).

Zusätzlich sind trigeminale Empfindungen wie adstringierend, scharf, beißend und kühlend bekannt (BAJEC und PICKERING, 2008, CHAUDHARI und ROPER, 2010). Für den Beginn der Wahrnehmung sind dabei die Rezeptoren in der Membran der Sinneszelle, welche mit den jeweiligen Geschmacksstoffen interagieren, verantwortlich. Der entsprechende Nervenimpuls wird ausgelöst, indem dieser Geschmacksstoff eine Polarisierung der Membran induziert. Dabei innerviert das hintere Drittel der Zunge den Zungen-Rachen-Nerv (*Nervus glossopharyngeus*, 9. Hirnnerv) während die vorderen zwei Drittel der Zunge den Gesichtsnerv (*Nervus facialis*, 7. Hirnnerv) über die *Chorda tympani* anregen (HILDEBRANDT, 2008).

1.3.1 Bittergeschmack

Die Wahrnehmung der Bitterkeit wird bei Menschen durch die Rezeptorfamilie hTAS2R mit etwa 25 G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) vermittelt (ADLER et al., 2000, MATSUNAMI et al., 2000, BUFE et al., 2002, PRONIN et al., 2004, BEHRENS und MEYERHOF, 2006, BEHRENS et al., 2007, CHAUDHARI und ROPER, 2010).

Beim Großteil der bisher identifizierten Agonisten handelt es sich um synthetische Bitterstoffe oder Arzneistoffe (BEHRENS et al., 2004, BROCKHOFF et al., 2007, MEYERHOF et al., 2010). So wird zum Beispiel der Rezeptor hTAS2R38 von Phenylthiocarbamid (PTC) und Propylthiouracil (PROP) aktiviert (BUFE et al., 2005, SANDELL und BRESLIN, 2006). Nur wenigen Schlüsselbitterstoffen aus Lebensmitteln konnten bislang die jeweiligen Bitterrezeptoren zugewiesen werden. So fungieren zum Beispiel die künstlichen Süßstoffe Saccharin und Acesulfam K als Agonisten für die Bitterrezeptoren hTAS2R43 und hTAS2R44 (KUHN et al., 2004). BUFE et al. (2002) postulierten erstmals, dass die bitteren β -Glucopyranoside als Agonisten für den hTAS2R16 agieren, während die drei Bitterrezeptoren hTAS2R1, hTAS2R14 und hTAS2R40 durch die in Bier vorkommenden iso- α -Säuren aktiviert werden (INTELMANN et al., 2009). Das auch in Tee detektierte Koffein ist dagegen in der Lage insgesamt fünf Bitterrezeptoren (hTAS2R7, hTAS2R10, hTAS2R14, hTAS2R43 und hTAS2R46) zu aktivieren (MEYERHOF et al., 2010). Es wird deutlich, dass einige Rezeptoren von sehr vielen Bitterstoffen aktiviert werden (z. B. hTAS2R46), während andere sehr spezifisch auf bestimmte Verbindungen ansprechen.

Bei der Signaltransduktion der Bitterstoffe (Abbildung 11) über G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die aus sieben helikalen Transmembrandomänen bestehen, werden die Geschmacksstoffe an die Rezeptoren gebunden. Daraufhin aktivieren diese G-Protein

gekoppelten Rezeptoren die heterotrimeren GTP (Guanosintriphosphat)-Bindungsproteine. Dies hat zur Folge, dass das G-Protein in die α -Untereinheit sowie in ein Dimer aus β - und γ -Untereinheiten dissoziiert. Der Hauptweg der Übertragung der Geschmackswahrnehmung verläuft hierbei über das Dimer $G\beta\gamma$. Die β - und γ -Untereinheiten aktivieren im nächsten Schritt die Phospholipase C β 2, die das membrangebundene Phosphatidyl-inositoldiphosphat (PIP $_2$) in das weiterhin an die Membran gebundene Diacylglycerin (DAG) und das Inositoltriphosphat (IP $_3$) spaltet. Durch das Öffnen der IP $_3$ R3 Ionenkanäle des Endoplasmatischen Retikulums der Zelle bewirkt das IP $_3$ eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration. Das calciumabhängige Öffnen des Kationenkanals TrpM5 (transient receptor potential cation channel) führt zum Natriumeinstrom und zur Depolarisation der Zelle. Durch Erhöhung der Calciumkonzentration wird zudem die Ausschleusung von ATP durch Panx1 aus der Zelle induziert. Das freigesetzte ATP fungiert als Neurotransmitter und stimuliert hierbei ableitende (afferente) Nervenfasern, die für die Weiterleitung der Information zum Gehirn zuständig sind (CHAUDHARI und ROPER, 2010).

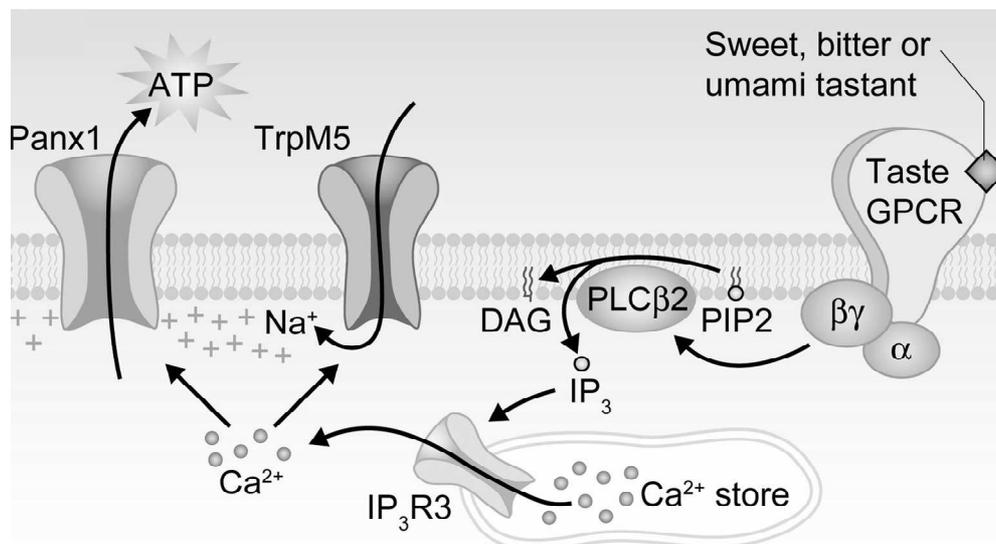


Abbildung 11: Signaltransduktion der Geschmacksqualitäten Süß, Umami und Bitter mit Beteiligung der G-Protein gekoppelten Rezeptoren in die Geschmackszelle nach CHAUDHARI und ROPER (2010). GPCR: G-Protein gekoppelte Rezeptoren. α , β , γ : Untereinheiten des G-Proteins. PLC β 2: Phospholipase C Subtyp. DAG: Diacylglycerin. PIP $_2$: Phosphatidyl-inositoldiphosphat. IP $_3$: Inositoltriphosphat. IP $_3$ R: Inositoltriphosphatrezeptor. TrpM5: Transient receptor potential cation channel. Panx1: Pannexin 1. ATP: Adenosintriphosphat.

1.3.2 Wahrnehmung der Adstringenz

Der Begriff „Adstringenz“ bzw. „adstringierender Geschmackseindruck“ stammt aus dem Lateinischen *ad stingere* („zu binden“) und beschreibt das Gefühl der langanhaltenden Trockenheit und des Zusammenziehens im gesamten Mundraum. JOSLIN und GOLDSTEIN postulierten bereits 1964 vier Gruppen adstringierender Verbindungen. Dazu zählen Aluminiumsalze, dehydrierende Mittel wie Aceton und Ethanol, organische und anorganische Säuren sowie Polyphenole.

Die Wahrnehmung der Adstringenz ist bislang noch nicht vollständig geklärt. BATE-SMITH (1954) beschreibt Adstringenz als eine taktile Erscheinung, die auf einer Reizung der Mechanorezeptoren beruht. Diese sind in der Lage die einwirkenden mechanischen Kräfte in Nervenregung umzuwandeln. Neben dem adstringierenden Geschmack werden auch die Wahrnehmungen von brennend, scharf, beißend oder kühlend über den *Nervus trigeminus* (Drillingsnerv: Augen-, Ober- und Unterkiefernerve) vermittelt. Der *Nervus trigeminus* ist ein multimodaler Nerv, er spricht sowohl auf taktile, thermische und Schmerzreize als auch auf chemische Reize in der Gesichtsregion an. Die Reizaufnahme erfolgt in den freien sensiblen Endbereichen des Neurons, die in der Haut bzw. Schleimhaut enden (HILDEBRANDT, 2008). Die taktile Empfindung der Adstringenz wird verursacht durch die Interaktion und Komplexbildung der Polyphenole, welche aus verschiedenen Lebensmitteln stammen können, mit Speichelproteinen. Die Gleitfähigkeit des Speichels wird dadurch vermindert, was dann als Reibung empfunden wird (LUCK et al., 1994, YAN und BENNICK, 1995, KALLITHRAKA et al., 1998, BENNICK, 2002, JÖBSTL et al., 2004b, BAJEC und PICKERING, 2008). Hierzu beschrieben BATE-SMITH und SWAIN (1962), dass wasserlösliche phenolische Verbindungen mit einem Molekulargewicht von 500 bis 3000 Da in der Lage sind Proteine auszufällen, so den Speichelfluss zu reduzieren und einen adstringierenden Geschmackseindruck zu verursachen. Im Gegensatz dazu stehen die Studien von PELEG et al. (1999), welche belegen, dass adstringierende Mono-, Di- und Triflavanole keinen Effekt auf den Speichelfluss ausüben. HOFMANN et al. postulierten 2006, dass phenolische Verbindungen, wie zum Beispiel die Substanzgruppe der Flavon-3-olglykoside, die keine Bindung mit den Speichelproteinen eingingen, über äußerst geringe Schwellenwerte verfügten. Diese Studien wurden von SCHWARZ und HOFMANN 2008 vertieft. Sie untersuchten hierbei die Eignung einfacher Protein/Polyphenol Bindungsassays als geeignetes Mittel zur Prognose der Wahrnehmung von Adstringenz bei sekundären Pflanzenstoffen. Im Fokus der Arbeit stand die Beziehung der sensorischen Aktivität einzelner Verbindungen mit ihrer

Proteinbindungsaffinität. Die Messung der Bindungsaffinität unterschiedlicher adstringierender Substanzen anhand der Bestimmung der halbmaximalen Bindungskonzentrationen (BC_{50} -Werte) mit Speichelproteinen ermöglichte auch den Vergleich mit den sensorischen Schwellenwerten dieser Verbindungen. Die Ergebnisse der Untersuchung zeigten eine erhöhte Affinität der galloylierten Polyphenole zu prolinreichen Speichelproteinen, im Gegensatz zu nicht-galloylierten Catechinen und Flavon-3-olglykosiden.

Es existieren jedoch auch Publikationen, die Adstringenz dagegen als eine Geschmacksempfindung beschreiben. Elektrophysiologische Studien von SCHIFFMAN et al. (1992) zeigten, dass Verbindungen wie Tanninsäure, Gallussäure oder auch Aluminiumsalze den *Chorda tympani* Nerv stimulieren, jedoch nicht den Zungennerv. Es wurden auch Interaktionen von adstringierenden Verbindungen mit Ionenkanälen beobachtet (SIMON et al., 1992). Einen möglichen Rezeptor für die adstringierende Wahrnehmung von phenolischen Verbindungen beschreiben TACHIBANA et al. (2004). Es handelt sich um den Mammalian 67 kDa Laminin-Rezeptor, welcher durch (-)-Epigallocatechin-3-gallat aktiviert werden konnte und auch als Rezeptor der Mundschleimhaut bekannt ist (HÄKKINEN et al., 2000). Diese Ergebnisse zeigen Möglichkeiten für adstringierende Verbindungen auf Interaktion mit Rezeptoren, sie verwerfen jedoch nicht die Theorie der taktilen Wahrnehmung, so dass sowohl die mechanische als auch die chemische Stimulation zur Wahrnehmung dieser Geschmackswahrnehmung beitragen können.

1.4 Analytik von Geschmacksstoffen

Geschmacksstoffe sind bei Zimmertemperatur im Allgemeinen nicht flüchtige Verbindungen, welche mit Hilfe der Geschmacksrezeptoren wahrgenommen werden können (BELITZ et al., 2001). Um die wichtigsten geschmacksaktiven Verbindungen aus einer komplexen Lebensmittelmatrix isolieren und identifizieren zu können, bedient sich die „molekulare Sensorik“ instrumentell-analytischer Screeningverfahren in Kombination mit sensorischen Methoden.

Zu diesem Zweck wurde von FRANK et al. (2001) ein Verfahren zur aktivitätsorientierten Fraktionierung, die sogenannte Geschmacksverdünnungsanalyse (GVA), entwickelt. Bei der Durchführung der GVA werden alle durch Chromatographie erhaltenen Fraktionen eines Lebensmittelextraktes in dem gleichen Volumen an Wasser gelöst und anschließend sukzessive 1 + 1 mit Wasser verdünnt. Die entstandenen Verdünnungsreihen werden in einem

Duo- bzw. Triotest in aufsteigender Konzentration von einem geschulten Panel verkostet. Die Verdünnungsstufe bis zu der ein Geschmackseindruck wahrgenommen wird, wird als der Geschmacksverdünnungsfaktor (GV-Faktor) bestimmt. Diese Methode ermöglicht es das weitere Vorgehen auf Verbindungen mit hohem Geschmackseinfluss zu fokussieren, denn je höher der GV-Faktor ist, desto höher ist der Geschmacksbeitrag der untersuchten Fraktionen. In der Literatur finden sich zahlreiche Beispiele, die die Aufklärung geschmacksaktiver Verbindungen mit Hilfe der Geschmacksverdünnungsanalyse zeigen. So gelang CZEPA und HOFMANN (2003) die Definition des bitteren Fehlgeschmacks von Karottenprodukten. SCHARBERT et al. (2004a) beschrieben erfolgreich die adstringierenden und bitteren Schlüsselgeschmacksstoffe im Darjeeling Teegetränk. HASELEU et al. (2009) gelang die Charakterisierung der aus β -Säuren des Hopfens (*Humulus lupulus* L.) gebildeten Bitterstoffe und schließlich erreichte LAGEMANN (2010) durch aktivitätsorientierte Fraktionierung die Identifizierung der Schlüsselgeschmacksstoffe im Spinat (*Spinacia oleracea*).

Um den Beitrag einzelner Verbindungen zum Gesamtgeschmack ermitteln zu können, wurde von WARMKE et al. (1996) erstmals der sogenannte Geschmacksaktivitätswert (GAW) eingeführt. Bei dieser Theorie geht man vereinfacht davon aus, dass zwischen der Geschmacksintensität und der Konzentration eines Geschmacksstoffes ein linearer Zusammenhang besteht. Da bei dieser Betrachtung jedoch die Wechselwirkungen der geschmacksaktiven Verbindung mit anderen Lebensmittelinhaltsstoffen und der ebenfalls mögliche nicht-lineare Verlauf unberücksichtigt bleiben, wurde der GAW von SCHARBERT et al. (2004b), sowie SCHARBERT und HOFMANN (2005) durch den Begriff des sogenannten DoT (Dose-over-Threshold)-Faktors ersetzt. Hierzu ist es notwendig den Geschmacksschwellenwert jeder Verbindung vorab zu definieren. Dabei handelt es sich um die Konzentration, bei der ein Geschmacksstoff in wässriger Lösung gerade noch wahrnehmbar ist. Nach Ermittlung des Geschmacksschwellenwertes kann der DoT-Faktor berechnet werden. Dieser gibt an, um welchen Faktor über ihrem Schwellenwert die Verbindung in der vorliegenden Matrix vorkommt und ist definiert als der Quotient aus der Konzentration des Geschmacksstoffes und der Konzentration des dazugehörigen Geschmacksschwellenwertes (SCHARBERT et al., 2004b, SCHARBERT und HOFMANN, 2005, STARK et al., 2006). Ist der DoT-Faktor einer geschmacksaktiven Verbindung ≥ 1 , so geht man davon aus, dass diese Verbindung einen direkten Beitrag zum Gesamtgeschmack eines Lebensmittels leistet. Die Betrachtung der additiven Effekte der einzelnen Substanzen ermöglicht diese Methodik hingegen nicht.

Um den Geschmacksintensitätsverlauf in Abhängigkeit der Konzentration eines Geschmacksstoffes ermitteln zu können, wurden von STARK und HOFMANN (2005) erstmals sogenannte Dose-Response-Kurven (Dosis/Wirkungskurven) der Schlüsselgeschmacksstoffe in geröstetem Kakao aufgenommen. Der Verlauf der einzelnen Dose-Response-Kurven kann dabei stark variieren. Sie geben zusätzlich die Möglichkeit zur Abschätzung des Beitrages der einzelnen Geschmacksstoffe zum Gesamtgeschmack eines Lebensmittels.

Zur eindeutigen Bestätigung der ermittelten analytischen und sensorischen Daten sowie zur abschließenden Überprüfung der Relevanz der einzelnen Substanzen wurden von WARMKE et al. (1996) und SCHLICHTERLE-CERNY und GROSCH (1998) sogenannte Rekombinations- und Omissionsexperimente eingeführt. Unter Verwendung der vollständigen quantitativen Daten wird ein Gesamtrekombinat erstellt und anschließend durch sensorische Bewertung im Vergleich zum authentischen Lebensmittelextrakt betrachtet. Durch das Weglassen von Substanzgruppen oder von Einzelverbindungen kann die Relevanz der omittierten Substanzen für den Geschmack des Lebensmittelextraktes sensorisch beurteilt werden.

Aktivitätsorientierte Fraktionierung zur Identifizierung und Isolierung der Geschmacksstoffe in einer komplexen Lebensmittelmatrix, die Bestimmung der DoT-Faktoren, die sensorische Evaluierung mit Hilfe der Rekombinations- und Omissionsexperimente, sowie die Aufnahme von Dose-Response-Kurven stellen heute unerlässliche Hilfsmittel zur Charakterisierung der Schlüsselgeschmacksstoffe von Lebensmitteln auf molekularer und sensorischer Ebene dar.

1.5 Protein/Polyphenol-Wechselwirkungen

Polyphenole sind sekundäre Pflanzenstoffe und die wichtigsten Vertreter adstringierend schmeckender Substanzen. Sie tragen zum adstringierenden Geschmack von Tee, Kaffee und Wein, aber auch Kakao bei. Wie bereits in Abschnitt 1.3.2 beschrieben, verursachen die Polyphenole durch Interaktion mit Speichelproteinen eine taktile Empfindung, welche als Adstringenz bekannt ist. Die Reduzierung der Gleitfähigkeit des Speichels wird hierbei als Reibung empfunden (LUCK et al., 1994, YAN und BENNICK, 1995, KALLITHRAKA et al., 1998, BENNICK, 2002, JÖBSTL et al., 2004b, BAJEC und PICKERING, 2008).

Das Vorhandensein diverser phenolischer Gruppen, auch in Form von Galloylgruppen (3,4,5-Trihydroxybenzoylgruppen), ist ein charakteristisches Merkmal der Polyphenole. Diesen Gruppen wird auch die Fähigkeit zugeschrieben mit Proteinen zu interagieren und lösliche sowie unlösliche Komplexe zu bilden (BROWN und WRIGHT, 1962, HAGERMAN und BUTLER, 1981, SPENCER et al., 1988, LUCK et al., 1994, BAXTER et al., 1997, HAGERMAN et

al., 1998, SIEBERT, 1999, BENNICK, 2002, CHARLTON et al., 2002a, JÖBSTL et al., 2004b, PAPADOPOULOU und FRAZIER, 2004, RAWEL et al., 2005, FERRUZZI und GREEN, 2006, HOFMANN et al., 2006). Weitere wichtige Eigenschaften zur Ausbildung von Protein/Polyphenol Wechselwirkungen sind nach SPENCER et al. (1988) die Polarität, das Molekulargewicht sowie sterische Verfügbarkeit der Polyphenole. Sie sind weiterhin besonders als Komplexierungspartner geeignet, da sie als multidentale Liganden über eine Vielzahl von möglichen Bindungsstellen (OH-Gruppen, aromatische Ringe), die in direkter Nachbarschaft innerhalb eines Moleküls vorliegen, verfügen (SPENCER et al., 1988). Polyphenolmoleküle sind auch in der Lage Proteinmoleküle an mehr als einer Stelle zu binden (JÖBSTL et al., 2004b, SIEBERT et al., 1996).

Gemäß SPENCER et al. (1988) und BAXTER et al. (1997) entstehen Wechselwirkungen von Polyphenolen mit Proteinen durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen phenolischen Hydroxygruppen und der Carbonylfunktion der Peptidbindung einerseits und durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen unpolaren Aminosäureresten und aromatischen Ringen der Polyphenole andererseits. Jedoch können auch kovalente und ionische Bindungen einen Beitrag zu Protein/Polyphenol-Interaktionen leisten (BENNICK, 2002).

Die Bindungsaffinität ist auch von den Proteineigenschaften wie dem isoelektrischen Punkt, der Sekundär- bzw. der Tertiärstruktur sowie der Aminosäurezusammensetzung in der Primärstruktur abhängig (HAGERMAN und BUTLER, 1981). Bei der Mehrzahl der bisher publizierten Studien wird der Aminosäure Prolin eine besondere Bedeutung zugeschrieben. HAGERMAN und BUTLER veröffentlichten bereits 1981, dass prolinreiche Proteine eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber Tanninen aufweisen. Der Grund für die hohe Bindungsaffinität prolinreicher Proteine liegt in der Unterbrechung der regulären Sekundärstruktur durch diese Aminosäure. Die Carbonylfunktion von Prolin, aber auch benachbarter Aminosäuren sind so besonders gut für Liganden zugänglich und ermöglichen zum Beispiel die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen. Auch BAXTER et al. (1997) beschrieben Prolin als eine essentielle Bindungsstelle für Polyphenole, jedoch wird hier auch die vorangehende Amidbindung und die vorangehende Aminosäure als entscheidend dargestellt. Demnach spielen die Aminosäuren in direkter Nachbarschaft des Prolins eine ebenso wichtige Rolle in der Protein/Polyphenol-Interaktion. CHARLTON et al. (2002a) konnten die Bedeutung von Prolin als wichtige Bindungsstelle bestätigen, sie beobachteten zudem Wechselwirkungen mit Arginin und Phenylalanin. YAN und BENNICK (1995) postulierten dagegen Wechselwirkungen zwischen Tanninen und histidinreichen Proteinen wie den Speichelproteinen Histatinen. Diese

Studie ist insofern von Bedeutung, da Histatine kein Prolin enthalten, dafür jedoch reich an basischen Aminosäuren sind.

Die Bindung zwischen prolinreichen Proteinen und Polyphenolen wird in der Literatur in drei verschiedene Phasen eingeteilt (Abbildung 12). Das zufällig angeordnete Protein wird in der ersten Phase nach Bindung mit dem Polyphenol kompaktiert. Nach Addition von weiteren Polyphenolmolekülen in der zweiten Phase, führt die Aggregation in der dritten und letzten Phase zum Ausfällen des entstandenen Komplexes (CHARLTON et al., 2002a, JÖBSTL et al., 2004b).

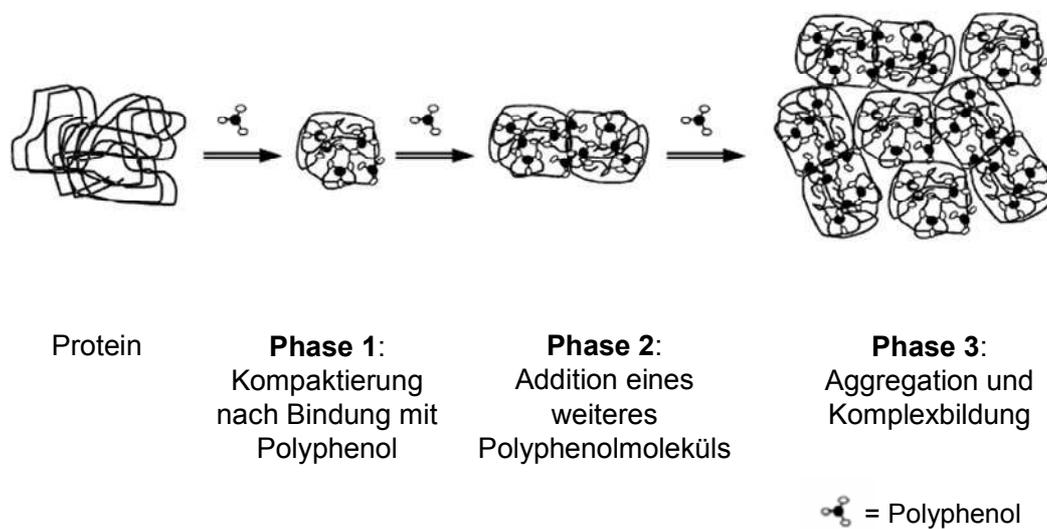


Abbildung 12: 3-Phasen-Modell der Bindung prolinreicher Proteine mit Polyphenolen nach CHARLTON et al., 2002a, JÖBSTL et al., 2004b.

In der Literatur sind diverse Methodiken zur Erforschung der Protein/Polyphenol-Wechselwirkungen beschrieben. Diese beinhalten spektroskopische, thermodynamische und chemische Untersuchungen (MURRAY et al., 1994, BAXTER et al., 1997, HAGERMAN et al., 1998, CHARLTON et al., 2002a, 2002b, BÖHM und SCHNEIDER, 2003, JÖBSTL et al., 2004a, 2004b, HAYASHI et al., 2004). Die Verwendung der Kernresonanzspektroskopie (NMR) ermöglicht es hierbei Wechselwirkungen zwischen biologischen Makromolekülen wie zum Beispiel Proteinen oder länger-kettigen Peptiden und natürlichen oder synthetischen Liganden auf direktem Weg zu analysieren (MAYER und MEYER, 1999, 2001, MAURER, 2005, CLAASEN et al., 2005). Eine äußerst vielversprechende Herangehensweise postulierten MAYER und MEYER (1999, 2001) mit der sogenannten Saturation Transfer Difference (STD) NMR. Diese Methode ermöglicht es bei Mischungen von potentiellen Liganden mit Proteinen, bereits bei

Konzentrationen kleiner 1 nmol, mit Hilfe von 1D und 2D NMR-Spektren ausschließlich die Signale des zu messenden Moleküls zu beobachten, welche eine Bindungsaffinität besitzen.

Da für die Zubereitung der „Ready-to-Drink“-Teegetränke oft Additive in Form von Milchprodukten verwendet werden, sollen im Folgenden die charakteristischen Merkmale der Milchproteine erläutert werden. Nach BELITZ et al. (2001) bildet die Caseinfraktion den Hauptanteil (80 %) der Gesamtproteine in der Kuhmilch, welche als Lebensmittel die größte Bedeutung hat. Tabelle 3 gibt einen Überblick über die genetischen Varianten, den mittleren Anteil der Fraktionen, angegeben in Prozent des Gesamtproteins von Magermilch, den isoionischen Punkt, das Molekulargewicht sowie den Phosphorgehalt. Die wichtigsten Komponenten dieser Fraktion sind α_{s1} -Caseine mit einem mittleren Anteil von 34 %, β -Caseine mit 25 % und κ -Caseine mit einem Anteil von 9 %. Zudem sind α_{s2} -Caseine (8 %) und γ -Caseine (4 %) bekannt. Die Caseinfraktion zeigt Molekulargewichte in einem Bereich von ca. 12-25 kDa. Aufgrund der fehlenden Tertiärstruktur sind Caseine nicht denaturierbar. β -Casein ist das am stärksten hydrophobe Casein. κ -Casein kommt in Form einer kohlenhydratfreien Hauptkomponente und mindestens sechs Nebenkomponten vor, die wechselnde Mengen an Kohlenhydraten enthalten. Diese sind über Threonin 131, 133, 135 oder 136 an die Peptidkette gebunden. Eine gemeinsame charakteristische Eigenschaft der Caseine ist ihre Unlöslichkeit im schwach sauren Bereich (pH 4,6 bei 20 °C), während die Molkenproteine in Lösung verbleiben. Hauptkomponenten der Molkenproteine sind die β -Lactoglobuline mit einem mittleren Anteil von 9 % und die genetisch unterschiedlichen α -Lactalbumine A und B (Gln \rightarrow Arg) mit 4 %. Die übrigen Komponenten dieser Fraktion treten stark zurück (BELITZ et al., 2001).

Tabelle 3: Genetische Varianten, mittlerer Anteil, isoelektrischer Punkt, Molekulargewicht und Phosphorgehalt [%] der verschiedenen Fraktionen der Kuhmilchproteine nach BELITZ et al. (2001).

Fraktion	genetische Varianten	Mittlerer Anteil ^a	Isoion. Punkt	Molekulargewicht ^b (x 10 ⁻³)	Phosphorgehalt (%)
<i>Caseine</i>		80	-	-	0,9
α_{s1} -Caseine	A, B, C, D, E	34	4,95-5,35	23,6 ^f	1,1
α_{s2} -Caseine	A, B, C, D	8		25,2 ^g	1,4
κ -Caseine	A, B, C, E	9	5,77-6,07	19 ^h	0,2
β -Caseine	A ¹ , A ² , A ³ , B, C, D, E	25	5,20-5,85	24	0,6
γ -Caseine		4	5,80-6,00	12-21	0,1
γ_1 -Caseine	A ¹ , A ² , A ³ , B			20,5	
γ_2 -Caseine	A ¹ /A ² , A ³ , B			11,8	
γ_3 -Caseine	A ¹ /A ² /A ³ , B			11,6	
<i>Molkenproteine</i>		20	-	-	
β -Lactoglobuline	A, B, C, D, E, F, G	9	5,35-5,41	18,2	
α -Lactalbumine	A, B	4	4,20-4,50 ^e	14,2	
Serumalbumin	A	1	5,13	66,3	
Immunoglobuline		2			
IgG ₁			5,50-6,80	162	
IgG ₂			7,50-8,30	152	
IgA			-	400 ^c	
IgM			-	950 ^d	
FSC(s) ⁱ				80	
Proteose-Pepton		4	3,30-3,70	4-41	

^a In % des Gesamtproteins von Magermilch. ^b Monomere. ^c Dimere. ^d Pentamer. ^e Isoelektr. Punkt. ^f Var. B. ^g Var. A.

^h Var. A. ⁱ Free secretory component.

1.6 Problemstellung

Der Marktanteil an „Ready-to-Drink“-Teegetränken verzeichnet starke Zuwächse. Aufgrund von Milchzusätzen unterscheidet sich das Geschmacksprofil dieser Teegetränke jedoch meist deutlich von dem eines frisch zubereiteten Getränks.

Um das Geschmacksprofil dieser Teegetränke künftig zielorientiert einstellen zu können, sollen im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Auswirkungen von Proteinzusätzen auf die geschmacksaktiven Schlüsselverbindungen von Schwarzteegetränken auf sensorischer und molekularer Ebene untersucht werden. Dabei soll zunächst der Einfluss des Zusatzes von Milchproteinen auf die sensorisch verfügbaren bitteren und adstringierend schmeckenden Polyphenole im Teegetränk instrumentell-analytisch gemessen werden und anhand von Rekombinationsexperimenten human-sensorisch validiert werden.

Unter Anwendung eines auf Magnetic Beads-basierenden Bindungsassays soll anschließend das Bindungsverhalten einzelner phenolischer Geschmacksstoffe an verschiedenen Proteinen anhand der Bestimmung halbmaximaler Bindungskonzentrationen studiert werden. Studien zu Struktur/Wirkungszusammenhängen sollen den Einfluss der Polyphenol- sowie der Proteinstruktur auf deren Interaktion beleuchten.

NMR-spektroskopische Untersuchungen sowie der Einsatz von Polyaminosäuren als Modellproteine sollen abschließend tiefere Einblicke in die Art der intermolekularen Wechselwirkungen zwischen Protein und Polyphenol ermöglichen.

2 Ergebnisse

Um den Einfluss von Proteinzusätzen auf die Geschmackswahrnehmung von schwarzem Tee auf molekularer Ebene zu studieren, sollten zunächst die von SCHARBERT et al. (2004a, 2004b) sowie SCHARBERT und HOFMANN (2005) in Darjeeling-Tee identifizierten Geschmacksstoffe in vollfermentiertem schwarzem Tee verifiziert werden.

2.1 Geschmacksstoffe in schwarzem Tee

2.1.1 Sensorische Analyse

Um einen Einblick in die charakteristischen Geschmacksstoffe eines vollfermentierten schwarzen Teegetränkes erhalten zu können, wurden mit Hilfe der Geschmacksprofilanalyse fünf verschiedene schwarze Tees auf ihre Geschmackseindrücke untersucht. Dabei handelt es sich um folgende Assamtees: *Difloo TGFOP (First Flush)*, *Tippy Assam TGFOP*, *Assam Broken Goldspitzen GFBOP (Second Flush)*, *Ostfriesen Broken Auslese GBOP (Second Flush)* und *Ostfriesen Blattmischung FOP (Autumnal)*.

Für die Zubereitung der Standardteegetränke wurde jeweils 1 g der Teedroge mit 100 mL kochendem Wasser für eine Infusionszeit von 4 min versetzt. Nach anschließender Filtration und Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die einzelnen Assamtees von einem geschulten Sensorikpanel bewertet. Dabei galt es die Geschmackseindrücke adstringierend, bitter, süß, umami, salzig und sauer auf einer Bewertungsskala von 0 (kein Geschmack wahrnehmbar) bis 5 (starker Geschmackseindruck) einzuordnen.

Abbildung 13 zeigt die Ergebnisse der Profilanalysen der oben aufgeführten fünf Standardteegetränke. Es wird ersichtlich, dass in allen untersuchten Teegetränken die Geschmacksmodalitäten adstringierend und bitter dominieren. Diese wurden mit Intensitäten zwischen 1,7 und 2,2 für Adstringenz und zwischen 1,6 und 2,1 für die Bitterkeit bewertet, gefolgt von der sauren und der süßen Geschmacksnote mit Intensitäten zwischen 0,3 und 0,6 für die Säure sowie mit Intensitäten zwischen 0 und 0,4 für die wahrgenommene Süße. Der Geschmackseindruck umami wurde mit sehr geringen Intensitäten zwischen 0 und 0,2 bewertet, während die salzige Note vom Sensorikpanel in keinem Standardteegetränk wahrgenommen werden konnte.

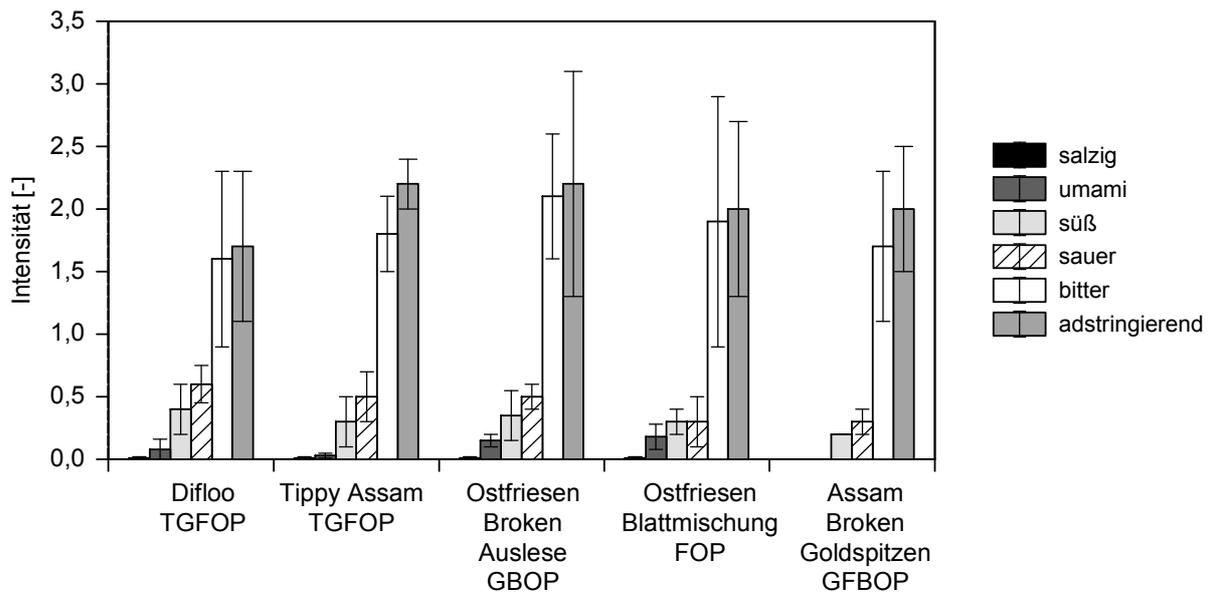


Abbildung 13: Geschmacksprofile der Standardteegetränke verschiedener Assamtees. Bewertungsskala von 0 (nicht wahrnehmbar) bis 5 (stark wahrnehmbar). Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Die untersuchten Assamtees zeigten bei sensorischer Evaluierung keine wesentlichen Unterschiede in Bezug auf die Geschmackseindrücke adstringierend und bitter, so dass alle weiteren qualitativen und quantitativen Untersuchungen exemplarisch mit dem *Assam Broken Goldspitzen GFBOP (Second Flush)* durchgeführt wurden.

2.1.2 Identifizierung und Quantifizierung adstringierender und bitterer Schlüsselgeschmacksstoffe

Zur Quantifizierung der bekannten Schlüsselgeschmacksstoffe im Tee, namentlich Flavan-3-ole, Purinalkaloide, Theaflavine sowie Flavon-3-olglykoside wurden die von SCHARBERT et al. (2004a, 2004b) und SCHARBERT und HOFMANN (2005) publizierten RP-HPLC Methodiken modifiziert verwendet.

Da ein oxidativer Abbau phenolischer Verbindungen durch Zugabe von Ascorbinsäure weitgehend verhindert werden kann (SCHARBERT und HOFMANN, 2005), wurde dem Standardteegetränk vor qualitativen und quantitativen Analysen Ascorbinsäure (0,5 g/L) zugegeben.

2.1.2.1 Flavan-3-ole und Purinalkaloide

In der Teeinfusion wurden die bekannten Flavan-3-ole, Purinalkaloide sowie Gallussäure mittels RP-HPLC-DAD untersucht (Abbildung 14).

Der Vergleich der chromatographischen und spektroskopischen Daten sowie Co-Chromatographie mit Referenzsubstanzen ergab die Identifizierung von Gallussäure (**29**, Abbildung 15) und Theogallin (**30**, Abbildung 15), der Flavan-3-ole (-)-Epicatechin (**1**), (-)-Catechin (**2**), (-)-Epicatechin-3-gallat (**3**), (-)-Catechin-3-gallat (**4**), (-)-Epigallocatechin (**5**), (-)-Gallocatechin (**6**), (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**) und (-)-Gallocatechin-3-gallat (**8**), sowie der Purinalkaloide Theobromin (**27**) und Koffein (**28**) als Inhaltsstoffe von schwarzem Tee.

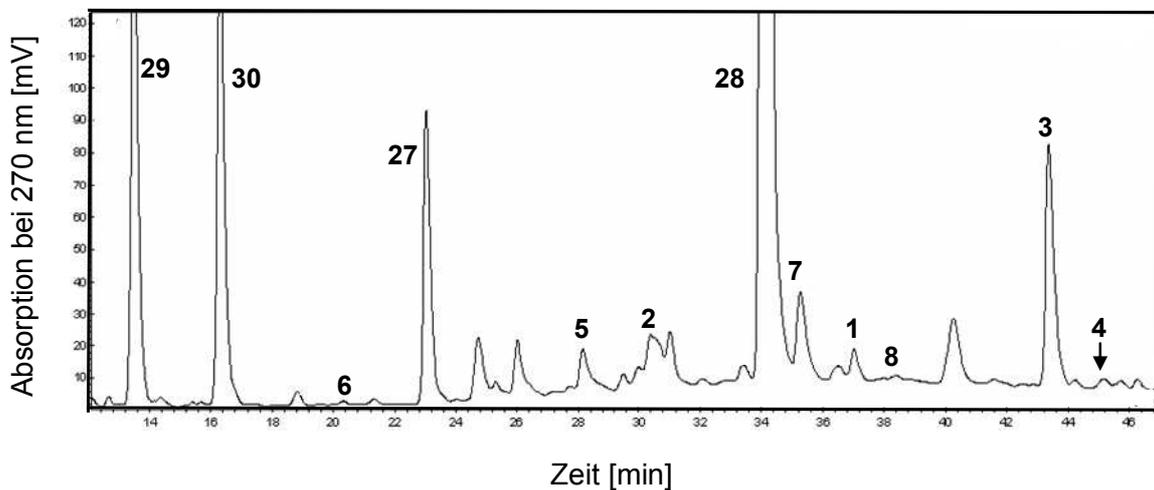


Abbildung 14: HPLC-UV-Chromatogramm eines Standardteegetränkes (*Assam Broken Goldspitzen GFBOP*) der Flavan-3-ole: (-)-Epicatechin (**1**), (-)-Catechin (**2**), (-)-Epicatechin-3-gallat (**3**), (-)-Catechin-3-gallat (**4**), (-)-Epigallocatechin (**5**), (-)-Gallocatechin (**6**), (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**), (-)-Gallocatechin-3-gallat (**8**), Purinalkaloide: Theobromin (**27**), Koffein (**28**) sowie Gallussäure (**29**) und Theogallin (**30**). Bezifferung der Substanzen bezieht sich auf die Strukturen in Abbildungen 3, 9 und 15.

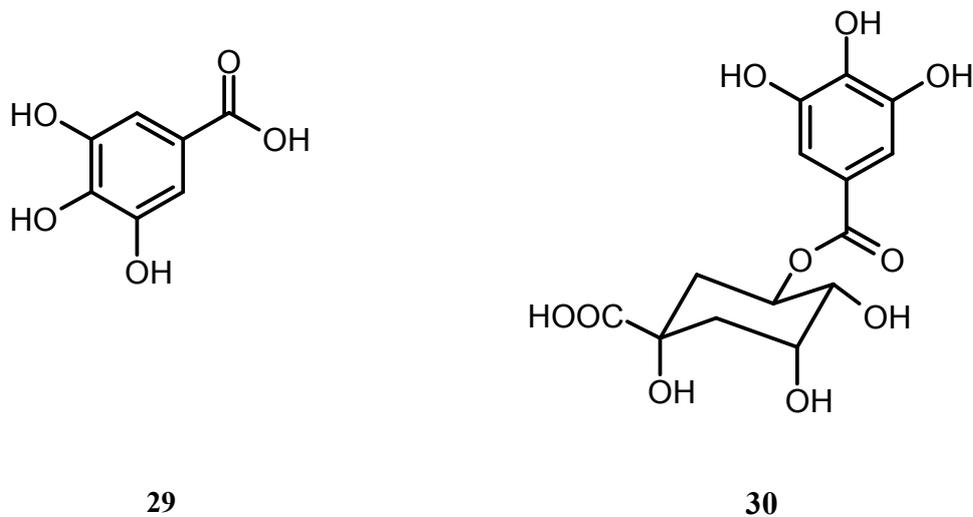


Abbildung 15: Strukturformeln der Gallussäure (29) und der 5-Galloyl-Chinasäure (Theogallin, 30).

Die Konzentrationen der identifizierten Flavan-3-ole und Purinalkaloide wurden mit Hilfe externer Kalibration mittels HPLC-DAD ermittelt (Tabelle 4).

Die erhaltenen Werte für die galloylierten Catechine **3-4** und **7-8** lagen im Standardteegetränk zwischen 9 und 84 $\mu\text{mol/L}$, während die nicht-galloylierten Catechine **1-2** sowie **5-6** geringere Gehalte in einem Bereich von 6 bis 67 $\mu\text{mol/L}$ aufwiesen. Die höchsten Gehalte zeigten dabei (-)-Epicatechin-3-gallat (**3**), (-)-Epigallocatechin (**5**) und (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**).

Die Konzentration von Koffein (**28**) lag im Standardteegetränk bei 1378 $\mu\text{mol/L}$, während der Gehalt von Theobromin (**27**) 130 $\mu\text{mol/L}$ betrug.

Tabelle 4: Gehalte [$\mu\text{mol/L}$] der Flavan-3-ole und Purinalkaloide im Standardteegetränk.

Substanz (Nr.)^a	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$] im Standardteegetränk
(-)-Epicatechin (1)	$35,23 \pm 2,75^b$
(-)-Catechin (2)	$14,57 \pm 1,27^b$
(-)-Epicatechin-3-gallat (3)	$84,32 \pm 2,92^b$
(-)-Catechin-3-gallat (4)	$10,81 \pm 0,90^b$
(-)-Epigallocatechin (5)	$67,36 \pm 1,44^b$
(-)-Gallocatechin (6)	$6,20 \pm 0,03^b$
(-)-Epigallocatechin-3-gallat (7)	$50,83 \pm 1,03^b$
(-)-Gallocatechin-3-gallat (8)	$9,03 \pm 0,46^b$
Theobromin (27)	$130,67 \pm 2,36^b$
Koffein (28)	$1378,00 \pm 61,00^b$

^a Bezifferung der Substanzen bezieht sich auf die Strukturen in Abbildungen 3 und 9. ^b Standardabweichung.

2.1.2.2 Theaflavine

Um Untersuchungen bezüglich der Theaflavinderivate im Standardteegetränk durchführen zu können, wurden zunächst die entsprechenden Referenzsubstanzen synthetisiert.

Die Synthese der Benzotropolone wurde in Anlehnung an die beschriebene Synthese von TAKINO et al. (1964) und SCHARBERT et al. (2004b) durchgeführt. Abbildung 16 zeigt die Bildung eines Benzotropolonderivates am Beispiel von Theaflavin (10) durch oxidative Kondensation aus (-)-Epigallocatechin (5) und (-)-Epicatechin (1) durch Katalyse des Enzyms Polyphenoloxidase (Tyrosinase).

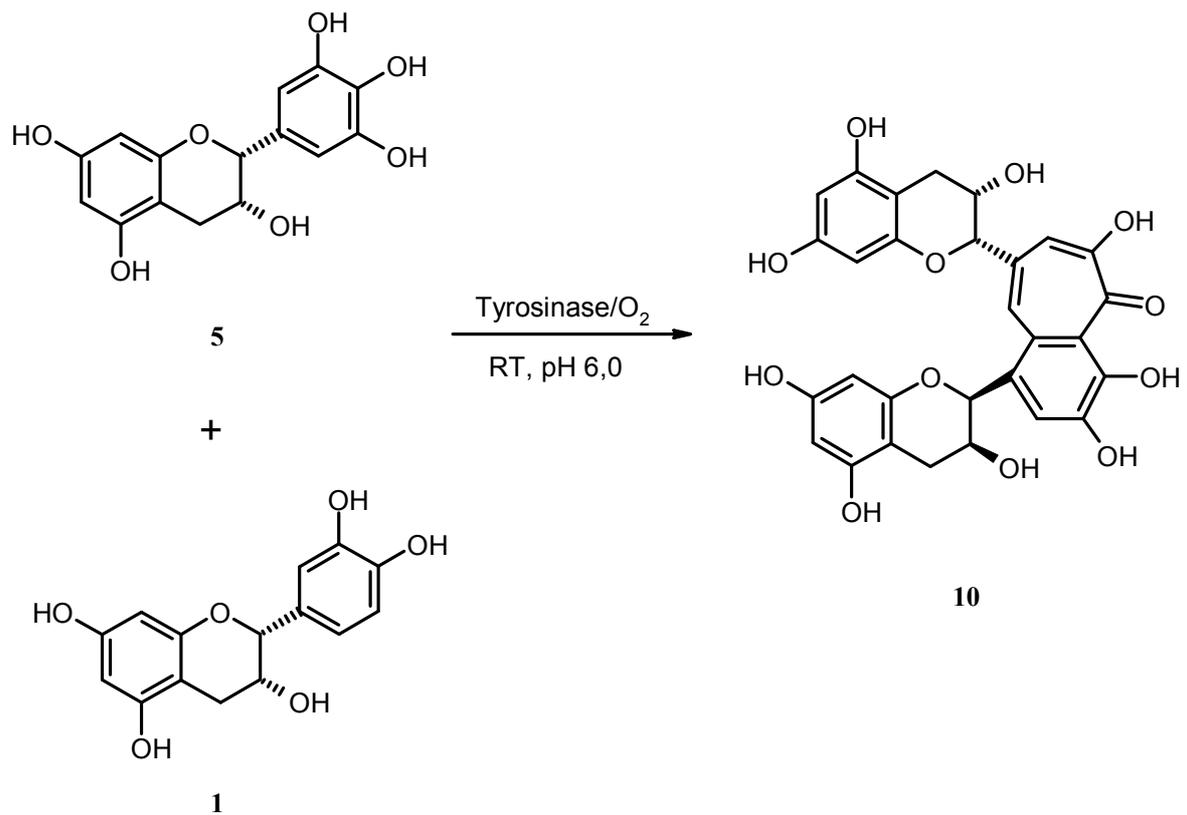


Abbildung 16: Polyphenoloxidase-katalysierte oxidative Kondensation von (-)-Epigallocatechin (5) und (-)-Epicatechin (1) zu Theaflavin (10).

Entsprechend dem zu synthetisierenden Theaflavinderivat (Abbildung 17) wurden binäre Mischungen aus den Flavan-3-olen (Abbildung 3) zur oxidativen Kondensation eingesetzt. Insgesamt wurden 4 Derivate synthetisch hergestellt, hierbei handelt es sich um Theaflavinsäure (9), Theaflavin (10), Theaflavin-3-gallat (11) und Theaflavin-3'-gallat (12).

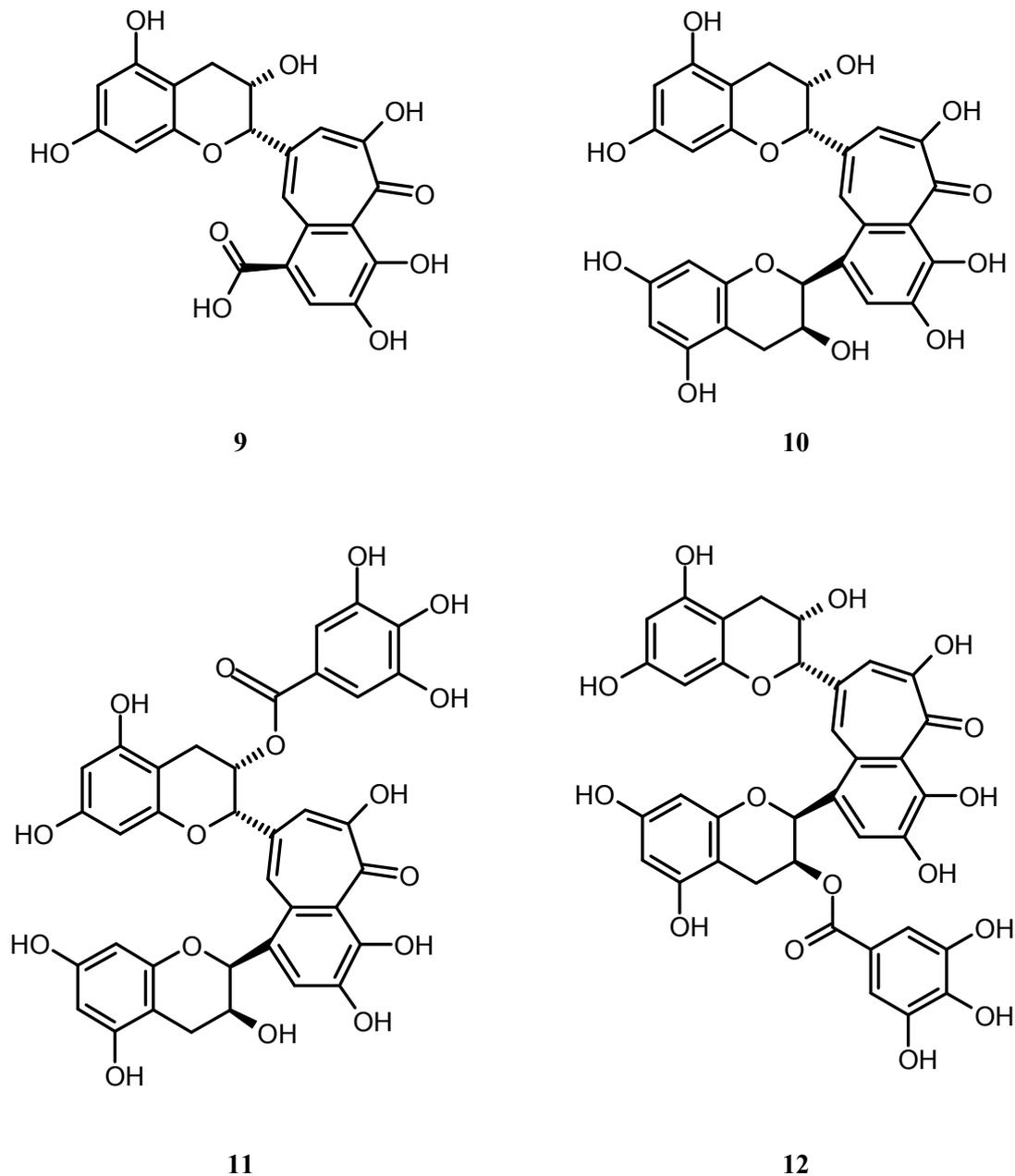


Abbildung 17: Strukturen der synthetisierten Benzotropolone Theaflavinsäure (9), Theaflavin (10), Theaflavin-3-gallat (11) und Theaflavin-3'-gallat (12).

Die Isolierung und Aufreinigung der Theaflavinderivate erfolgte semipräparativ mittels RP 8-HPLC-Analyse. Zur Verifizierung der Benzotropolonstruktur der synthetisierten Verbindungen wurden die isolierten Produkte mittels UV/Vis-, LC-MS/MS- ([Abbildung 18](#)) sowie NMR-Spektroskopie analysiert. Wie in [Abbildung 18](#) gezeigt, ergab die LC-MS-Analyse im ESI-Modus Pseudomolekülonen $[M-H]^-$ mit m/z 427 für die Theaflavinsäure (9)

und m/z 563 für das Theaflavin (**10**). Die beiden Theaflavinmonogallate **11** und **12** wiesen das Pseudomolekülion von m/z 715 auf.

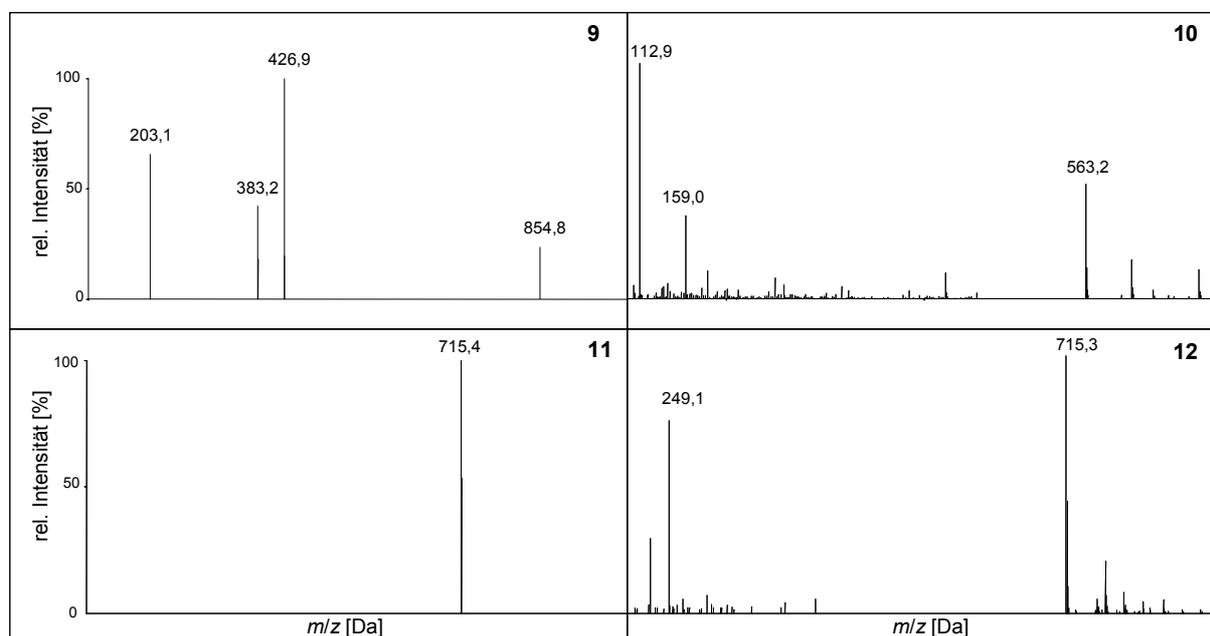


Abbildung 18: LC-MS-Spektren (ESI) der Theaflavinderivate Theaflavinsäure (**9**), Theaflavin (**10**), Theaflavin-3-gallat (**11**) und Theaflavin-3'-gallat (**12**).

Die UV/Vis-Spektren aller Theaflavinderivate zeigten aufgrund des Benzotropolongrundgerüsts einen charakteristischen Verlauf mit drei Maxima bei 270, 370 sowie bei 450 nm.

Die $^1\text{H-NMR}$ -Daten der synthetisierten Verbindungen sind in Kapitel 3.2.2 zusammengefasst, diese bestätigen die postulierten Strukturen der Benzotropolonderivate **9-12**. [Abbildung 19](#) demonstriert einen Ausschnitt aus dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Theaflavin (**10**). Das Spektrum zeigte die typischen zwei Paare der meta-ständigen Protonen in den Positionen H-C(6), H-C(6'), H-C(8) und H-C(8') mit einer chemischen Verschiebung von 6,06 ppm, die mit einer Kopplungskonstante von 2,3 Hz koppelten. Die Singulets bei 7,62 ppm, 8,02 ppm und 8,05 ppm mit der Intensität von jeweils eins entsprachen den Signalen der drei Protonen H-C(7''), H-C(3'') und H-C(5'') des Benzotropolonsystems. Breite Signale bei 2,95 ppm mit einer Intensität von vier konnten den zwei Methylengruppen der Positionen H-C(4) und H-C(4') zugeordnet werden. Da die zwei Protonen H-C(2) und H-C(2') als Singulets bei 5,06 ppm und 5,78 ppm auftraten, konnte daraus geschlossen werden, dass sie sich in axial-äquatorialer Stellung zu ihren Nachbarprotonen befinden. Folglich liegt somit eine *cis*-

Stereochemie zwischen den Protonen H-C(2) und H-C(3) und zwischen H-C(2') und H-C(3') des Moleküls vor.

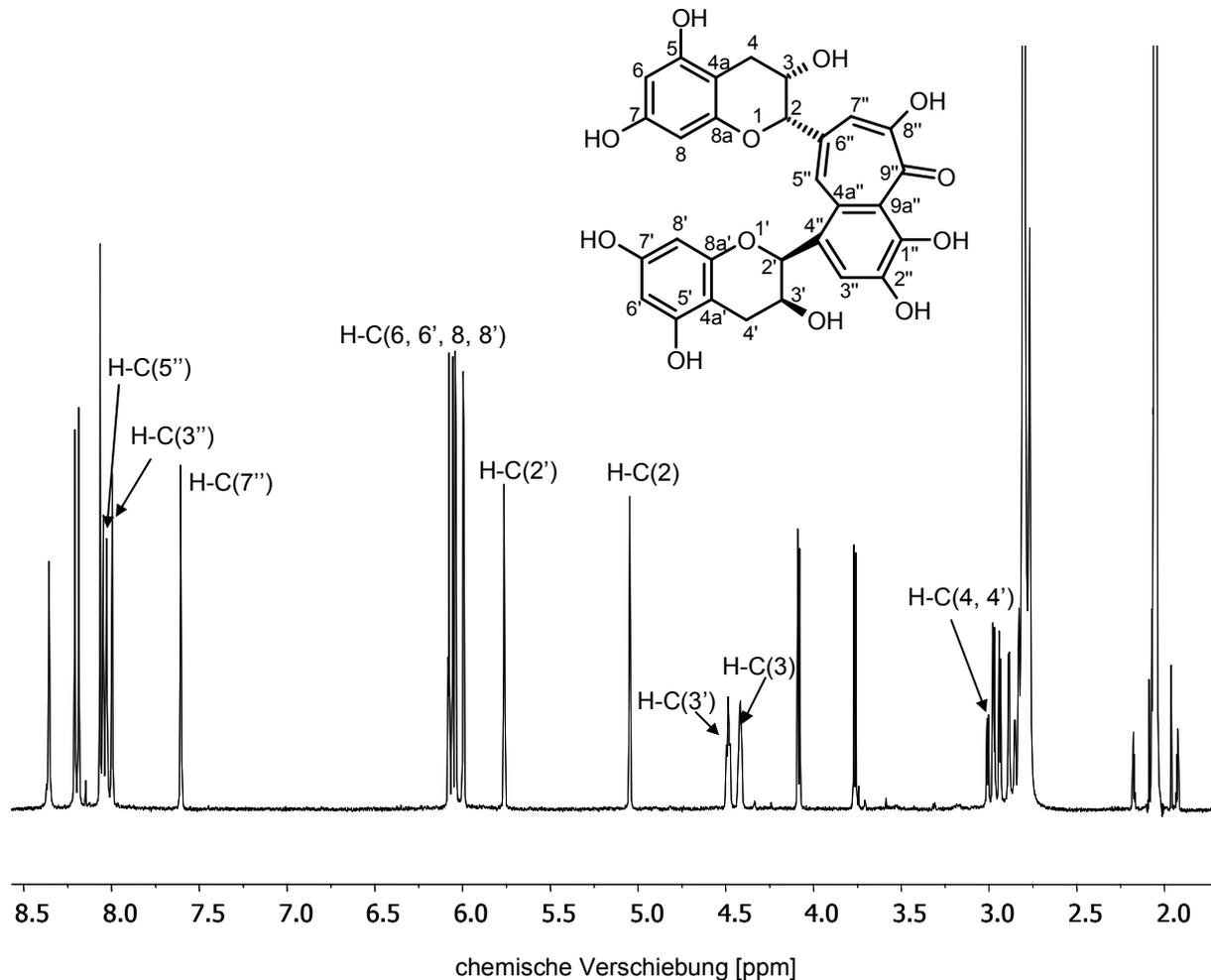


Abbildung 19: Ausschnitt aus dem ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, CD₃COCD₃) und chemische Struktur von Theaflavin (10).

Die isolierten und aufgereinigten Theaflavinderivate **9-12** ([Abbildung 17](#)) sowie das Theaflavin-3,3'-digallat (**13**, [Abbildung 6](#)) wurden als Standardsubstanzen zur Identifizierung und Quantifizierung dieser Substanzklasse im Standardteegetränk mittels RP-18 HPLC und massenspektrometrischer Detektion im MRM Mode eingesetzt. In [Abbildung 20](#) sind die extrahierten Massenübergänge der untersuchten Theaflavine im Standardteegetränk dargestellt.

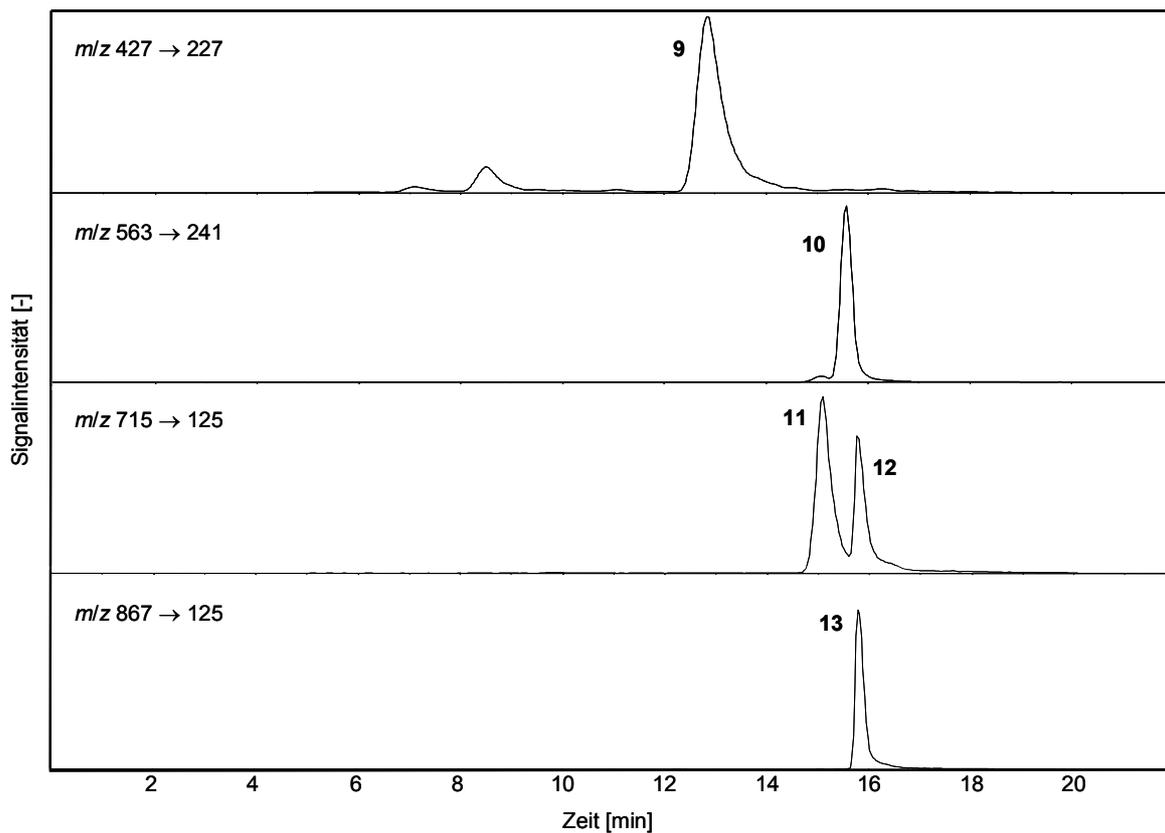


Abbildung 20: LC-MS/MS-Chromatogramme: Extrahierte Massenspuren der Theaflavine im Standardteegetränk (*Assam Broken Goldspitzen GFBOP, Second Flush*). Die Signalintensität jedes Massenüberganges ist normalisiert. Bezifferung der Substanzen bezieht sich auf die Strukturen in **Abbildung 6**.

Durch das Heranziehen der chromatographischen und spektroskopischen Daten (UV/Vis, LC-MS/MS) sowie durch Co-Chromatographie mit Referenzsubstanzen ergab sich die eindeutige Identifizierung von Theaflavinsäure (**9**), Theaflavin (**10**), Theaflavin-3-gallat (**11**), Theaflavin-3'-gallat (**12**) und Theaflavin-3,3'-digallat (**13**) als weitere Inhaltsstoffe von schwarzem Tee.

Tabelle 5 zeigt die Konzentrationen der identifizierten Theaflavinderivate, die mit Hilfe externer Kalibration mittels LC-MS/MS-Analyse bestimmt wurden.

Der ermittelte Konzentrationsbereich der Theaflavinderivate im Standardteegetränk lag zwischen 1,4 und 9 $\mu\text{mol/L}$. Theaflavin-3,3'-digallat (**13**) mit 9 $\mu\text{mol/L}$ und Theaflavin-3-gallat (**11**) mit 8 $\mu\text{mol/L}$ zeigten die höchsten Konzentrationen dieser Substanzklasse, während Theaflavinsäure (**9**) mit lediglich 1,4 $\mu\text{mol/L}$ als minore Komponente im Standardteegetränk bestimmt werden konnte.

Tabelle 5: Gehalte [$\mu\text{mol/L}$] der Theaflavine im Standardteegetränk.

Substanz (Nr.) ^a	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$] im Standardteegetränk
Theaflavinsäure (9)	$1,43 \pm 0,04^b$
Theaflavin (10)	$4,20 \pm 0,12^b$
Theaflavin-3-gallat (11)	$8,45 \pm 0,97^b$
Theaflavin-3'-gallat (12)	$4,90 \pm 0,03^b$
Theaflavin-3,3'-digallat (13)	$8,72 \pm 0,37^b$

^a Bezifferung der Substanzen bezieht sich auf die Strukturen in Abbildung 6. ^b Standardabweichung.

2.1.2.3 Flavonolglykoside

Um einen Überblick über die samtig-adstringierend schmeckende Flavonolglykoside im Teegetränk zu erhalten, wurde eine HPLC-Methode mit massenspektrometrischer Detektion entwickelt. Verwendet wurde hierbei der MRM Mode in negativem Modus. Das Standardteegetränk wurde nach Filtration direkt injiziert und nach der chromatographischen Trennung auf einer RP-8-Säule analysiert. Das Ergebnis der chromatographischen Untersuchung dieser Substanzklasse zeigt Abbildung 21 in Form eines LC-MS/MS-Chromatogramms.

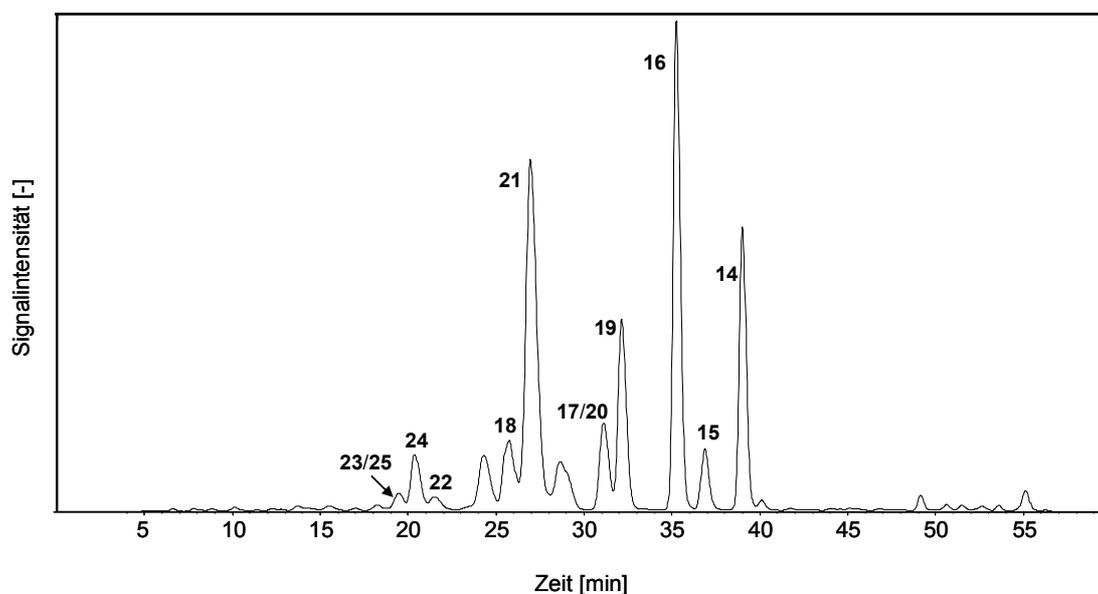


Abbildung 21: LC-MS/MS-Total Ion Chromatogramm (TIC) der Flavonolglykoside im Standardteegetränk (*Assam Broken Goldspitzen GFBOP, Second Flush*). Bezifferung der Substanzen bezieht sich auf die Strukturen in Abbildung 8.

Anhand der charakteristischen Massenübergänge, der Retentionszeiten sowie wenn möglich Co-Chromatographie mit Referenzsubstanzen ergab die Identifizierung folgende zwölf Flavonolglykoside: Kämpferol-3-O- β -D-glucopyranosid (**14**), Kämpferol-3-O- β -D-galactopyranosid (**15**), Kämpferol-3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosid] (**16**), Kämpferol-3-O-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosid] (**17**), Kämpferol-3-O-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-galactopyranosid] (**18**), Quercetin-3-O- β -D-glucopyranosid (**19**), Quercetin-3-O- β -D-galactopyranosid (**20**), Quercetin-3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosid] (**21**), Quercetin-3-O-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosid] (**22**), Quercetin-3-O-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-galactopyranosid] (**23**), Myricetin-3-O- β -D-glucopyranosid (**24**) und Myricetin-3-O- β -D-galactopyranosid (**25**). Für die Verbindungen **17** und **20** sowie für **23** und **25** konnte bei der RP-HPLC-Analyse eine Co-Elution dieser Verbindungspaare beobachtet werden, die erfolgreiche Identifizierung und Quantifizierung gelang jedoch mit Hilfe der charakteristischen Massenübergänge der jeweiligen Substanzen.

Da der Geschmacksbeitrag der Verbindungen **17-18** als gering (DoT < 0,5) beschrieben wurde (SCHARBERT und HOFMANN, 2005), beschränkte sich die Quantifizierung auf die Flavonolglykoside **14-16** sowie **19-21** via externer Kalibration mittels LC-MS/MS (Tabelle 6).

Die geringsten Konzentrationen zeigte Kämpferol-3-O- β -D-galactopyranosid (**15**) mit 1,5 μ mol/L, gefolgt von **14** und **20** mit Gehalten von ca. 5 μ mol/L sowie **16** und **19** mit Konzentrationen zwischen 7 und 10 μ mol/L. Die höchsten Gehalte wurden für Quercetin-3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosid] (**21**) mit 11 μ mol/L ermittelt. Die bestimmten Konzentrationen der Flavonolglykoside (**14-16**, **19-21**) lagen deutlich niedriger als die Gehalte für Flavan-3-ole. Der erhaltene Konzentrationsbereich ist jedoch mit dem der Theaflavine (**9-13**) vergleichbar.

Tabelle 6: Gehalte [$\mu\text{mol/L}$] der Flavonolglykoside im Standardteegetränk.

Substanz (Nr.)^a	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$] im Standardteegetränk
Kämpferol-3-O- β -D-glucopyranosid (14)	$5,08 \pm 0,11^b$
Kämpferol-3-O- β -D-galactopyranosid (15)	$1,47 \pm 0,06^b$
Kämpferol-3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosid] (16)	$7,00 \pm 0,27^b$
Quercetin-3-O- β -D-glucopyranosid (19)	$9,64 \pm 0,07^b$
Quercetin-3-O- β -D-galactopyranosid (20)	$4,73 \pm 0,01^b$
Quercetin-3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosid] (21)	$11,15 \pm 0,30^b$

^a Bezifferung der Substanzen bezieht sich auf die Strukturen in Abbildung 8. ^b Standardabweichung.

2.1.3 Geschmacksschwellenwerte und die Bewertung des Geschmacksbeitrages einzelner Verbindungen zum Teegeschmack

Nach Identifizierung und Quantifizierung der adstringierenden und bitteren Geschmacksstoffe bestehend aus den Substanzklassen der Flavan-3-ole (**1-8**), Theaflavine (**9-13**), Flavon-3-olglykoside (**14-16**, **19-21**) sowie der Purinalkaloide (**27-28**) wurde mit Hilfe der bereits bekannten Geschmacksschwellenwerte (SCHARBERT et al., 2004a, HENZE, 2009) der oben beschriebenen Verbindungen der Geschmacksbeitrag der einzelnen Substanzen zum Gesamtgeschmack von schwarzem Tee evaluiert. Die im Standardteegetränk ermittelten Konzentrationen, die jeweiligen Geschmacksschwellenwerte sowie die als Quotient der Konzentration und des Schwellenwertes einer Verbindung berechneten DoT-Faktoren sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Substanzen der Geschmacksgruppe I, die eine austrocknende und aufrauende Adstringenz sowie Bitterkeit aufweisen, sind acht Flavan-3-ole (**1-8**). Der Bereich der ermittelten Schwellenwerte für Flavan-3-ole (**1-8**) liegt zwischen 190 und 950 $\mu\text{mol/L}$ (SCHARBERT et al., 2004a, 2004b, SCHARBERT und HOFMANN, 2005, HENZE, 2009). In sensorischen Untersuchungen konnte zusätzlich zu der adstringierenden Geschmackswahrnehmung auch ein bitterer Geschmack für (-)-Epicatechin (**1**), (-)-Epicatechin-3-gallat (**3**), (-)-Epigallocatechin (**5**), (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**) sowie (-)-Gallocatechin-3-gallat (**8**) detektiert werden (Tabelle 7).

Tabelle 7: Im Standardteegetränk identifizierte Geschmacksstoffe mit Konzentrationen [$\mu\text{mol/L}$], Geschmacksschwellenwerten [$\mu\text{mol/L}$] und den berechneten DoT-Faktoren [-].

Substanz (Nr.) ^a	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]	Schwellenwert [$\mu\text{mol/L}$]	DoT-Faktoren [-] ^b
<i>Gruppe I: austrocknend, aufrauend adstringierend und bitter</i>			
(-)-Epicatechin-3-gallat (3)	84,3	285,0 ^{c, f} 570,0 ^{c, f}	0,3 ^e 0,2 ^g
(-)-Epigallocatechin-3-gallat (7)	50,8	190,0 ^{c, f} 380,0 ^{f, h}	0,3 ^e 0,1 ^g
(-)-Epigallocatechin (5)	67,4	475,0 ^{c, f} 950,0 ^{f, h}	0,1 ^e 0,1 ^g
(-)-Epicatechin (1)	35,2	465,0 ^{c, f} 930,0 ^{f, h}	0,1 ^e < 0,1 ^g
(-)-Catechin (2)	14,6	410,0 ^{c, d}	< 0,1 ^e
(-)-Catechin-3-gallat (4)	10,8	250,0 ^{c, d}	< 0,1 ^e
(-)-Gallocatechin-3-gallat (8)	9,0	390,0 ^{c, d} 390,0 ^{f, g}	< 0,1 ^e < 0,1 ^g
(-)-Gallocatechin (6)	6,2	540,0 ^{c, d}	< 0,1 ^e
<i>Gruppe II: austrocknend, aufrauend adstringierend</i>			
Theaflavin-3,3'-digallat (13)	8,7	13,0 ^{c, d}	0,7 ^e
Theaflavin-3-gallat (11)	8,5	15,0 ^{c, d}	0,6 ^e
Theaflavin-3'-gallat (12)	4,9	15,0 ^{c, d}	0,3 ^e
Theaflavin (10)	4,2	16,0 ^{c, d}	0,3 ^e
Theaflavinsäure (9)	1,4	24,0 ^{c, d}	0,1 ^e
<i>Gruppe III: samtig-belegend adstringierend</i>			
Quercetin-3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosid] (21)	11,2	0,00115 ^{c, d}	9696,0 ^e
Kämpferol-3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosid] (16)	7,0	0,25 ^{c, d}	28,0 ^e
Quercetin-3-O- β -D-glucopyranosid (19)	9,6	0,65 ^{c, d}	14,9 ^e
Quercetin-3-O- β -D-galactopyranosid (20)	4,7	0,43 ^{c, d}	11,0 ^e
Kämpferol-3-O- β -D-glucopyranosid (14)	5,1	0,67 ^{c, d}	7,6 ^e
Kämpferol-3-O- β -D-galactopyranosid (15)	1,5	6,7 ^{c, d}	0,2 ^e
<i>Gruppe IV: bitter</i>			
Koffein (28)	1380,0	500,0 ^{f, h}	2,8 ^g
Theobromin (27)	130,6	750,0 ^{f, h}	0,2 ^g

^a Bezifferung der Substanzen bezieht sich auf die Strukturen in Abbildungen 3, 6, 8 und 9. ^b DoT = Dose-over-Threshold.

^c Schwellenwert für Adstringenz. ^d SCHARBERT et al., 2004a. ^e DoT-Faktor für Adstringenz. ^f HENZE, 2009.

^g DoT-Faktor für Bitterkeit. ^h Schwellenwert für Bitterkeit.

Im Vergleich zu den Flavan-3-olen (**1-8**) wurden für die Theaflavine (**9-13**), Substanzen aus Gruppe II (Tabelle 7), welche eine raue Adstringenz verbunden mit einem kratzenden Gefühl im hinteren Rachenbereich hervorrufen, Geschmacksschwellenwerte im Bereich von 13 bis 24 $\mu\text{mol/L}$ postuliert. Der Schwellenwert von Theaflavin (**10**) zum Beispiel ist mit 16 $\mu\text{mol/L}$ 58 mal niedriger als der von (-)-Epicatechin (**1**) (SCHARBERT et al., 2004a, 2004b).

Die Berechnung der DoT-Faktoren für Adstringenz und Bitterkeit ergibt Werte für Catechine (**1-8**) sowie Theaflavine (**9-13**) zwischen $< 0,1$ für zum Beispiel die Substanzen **1**, **2** oder **4** und 0,7 für Theaflavin-3,3'-digallat (**13**).

In Gruppe III sind die Verbindungen zusammengefasst, die eine samtig-belegende, adstringierende Geschmackswahrnehmung hervorrufen. Dabei handelt es sich um vier Flavon-3-olmonoglykoside (**14-15**, **19-20**) und zwei Flavon-3-oldiglykoside (**16**, **21**) (Tabelle 7). Diese Substanzen weisen äußerst geringe Geschmacksschwellenwerte im Bereich von 0,00115 $\mu\text{mol/L}$ für Quercetin-3-O- $[\alpha\text{-L-rhamnopyranosyl-(1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-glucopyranosid}]$ (**21**) bis 6,7 $\mu\text{mol/L}$ für Kämpferol-3-O- $\beta\text{-D-galactopyranosid}$ (**15**) auf. Vergleicht man das Quercetinrutinosid (**21**) mit den Rutinosiden der anderen Flavon-3-olaglykone, so wird ersichtlich, dass das Aglykon einen starken Einfluss auf die Geschmacksintensität der jeweiligen Verbindung besitzt. Während Kämpferol-3-O- $[\alpha\text{-L-rhamnopyranosyl-(1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-glucopyranosid}]$ (**16**) einen Schwellenwert von 0,25 $\mu\text{mol/L}$ aufweist, liegt dieser für Myricetin-3-O- $[\alpha\text{-L-rhamnopyranosyl-(1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-glucopyranosid}]$ (**26**) mit 10,5 $\mu\text{mol/L}$ deutlich höher (SCHARBERT et al., 2004a). Zudem konnten SCHARBERT et al. (2004a) beobachten, dass neben der Struktur des Aglykons auch die Struktur des Zuckerrestes einen Einfluss auf die Adstringenz besitzt. Deutlich wird dieses beim Vergleich des Geschmacksschwellenwertes von Quercetin-3-O- $\beta\text{-D-glucopyranosid}$ (**19**) mit 0,65 $\mu\text{mol/L}$ und Quercetin-3-O- $[\alpha\text{-L-rhamnopyranosyl-(1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-glucopyranosid}]$ (**21**) mit 0,00115 $\mu\text{mol/L}$, die sich lediglich durch eine zusätzliche glykosidisch gebundene Rhamnose unterscheiden. Mit der Bestimmung des Schwellenwertes für Quercetin-3-O- $[\beta\text{-D-glucopyranosyl-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-L-rhamnopyranosyl-(1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-galactopyranosid}]$ (**23**, 18,3 $\mu\text{mol/L}$) konnte jedoch keine weitere Verringerung der Schwelle durch eine zusätzliche glykosidisch verknüpfte Zuckereinheit beobachtet werden. Zudem stellt die Sequenz der Zuckereinheit einen weiteren Einflussfaktor dar. Diese Beobachtung wird deutlich bei näherer Betrachtung der verschiedenen Triglykoside (**17-18**, **22-23**). Während die Flavon-3-olglykoside, deren Aglykone mit einer Glukoseeinheit (**17**, **22**) verknüpft sind, relativ hohe

Schwellen (18-20 $\mu\text{mol/L}$) aufweisen, zeigen die Triglykoside mit einer Galaktoseeinheitverknüpfung (**18**, **23**) am Aglykon deutlich geringere Geschmacksschwellenwerte (1-6 $\mu\text{mol/L}$).

Die Berechnung der DoT-Faktoren für die Substanzklasse der Flavon-3-olglykoside (**14-16**, **19-21**) zeigte, bedingt durch die niedrigen Geschmacksschwellen, deutlich höhere Werte als bei Gruppen I und II. So wurde zum Beispiel für Quercetin-3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosid] (**21**) ein DoT-Faktor von 9696 ermittelt, gefolgt von Kämpferol-3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosid] (**16**), Quercetin-3-O- β -D-glucopyranosid (**19**), Quercetin-3-O- β -D-galactopyranosid (**20**) und schließlich Kämpferol-3-O- β -D-glucopyranosid (**14**) mit DoT-Faktoren im Bereich von 7,6 bis 28. Aufgrund der hohen DoT Werte sollten diese fünf Flavon-3-olglykoside (**14**, **16**, **19-21**) zum adstringierenden Geschmack von Tee beitragen.

In der Gruppe der bitteren Substanzen (Gruppe IV) wurden die Purinalkaloide Theobromin (**27**) und Koffein (**28**) identifiziert (Tabelle 7). Dabei besaß das Koffein (**28**) mit mehr als 1000 $\mu\text{mol/L}$ die höchste Konzentration und leistete mit einem DoT-Faktor von > 2 auch einen wichtigen Beitrag zur bitteren Geschmackswahrnehmung von schwarzem Tee. Für Theobromin konnte ein DoT-Faktor von 0,2 ermittelt werden.

2.1.4 Rekombinationsexperimente

Zur Verifizierung der sensorischen und instrumentellen Daten wurden Rekombinationsexperimente durchgeführt, um den Einfluss der identifizierten Geschmacksstoffe auf den Gesamtgeschmack zu überprüfen.

Zur Herstellung eines Gesamtteekombinates wurden die in Tabelle A1 (s. Anhang) aufgeführten 16 Substanzen in ihrer „natürlichen“ Teekonzentration in mineralstoffarmem Wasser (Evian[®]) gelöst und die Lösung unter Zugabe von Ameisensäure (0,1 mmol/L) auf den pH-Wert von 6,4, dem pH einer Standardteeinfusion, eingestellt. Anschließend wurde das zubereitete Gesamtrekombinat vergleichend zum authentischen Standardteegetränk dem geschulten Sensorikpanel gereicht und mittels einer Geschmacksprofilanalyse für die Geschmacksqualitäten adstringierend und bitter auf einer Bewertungsskala von 0 (kein Geschmack wahrnehmbar) bis 5 (starker Geschmackseindruck) bewertet, da der Fokus der Arbeit auf adstringierenden und bitteren Substanzen lag.

Der direkte Vergleich des Geschmacksprofils des Rekombinates mit dem des authentischen Standardteegetränkes, dargestellt in Abbildung 22, macht die Ähnlichkeit beider deutlich.

Das Geschmacksprofil des Gesamtrekombinats bezogen auf die Geschmacksmodalitäten adstringierend und bitter war mit dem Profil des Standardteegetränkes nahezu identisch. So wurde der adstringierende Geschmack des authentischen Teegetränkes mit der Intensität von 2,0 und im Rekombinat mit 1,9 bewertet. Auch unterschieden sich die Intensitäten der bitteren Note lediglich um den Wert von 0,1. Im Gesamtrekombinat wurde die Bitterkeit mit einer Intensität von 1,6, während sie im Standardteegetränk mit einer Intensität von 1,7 beurteilt wurde. Es konnte somit kein signifikanter Unterschied zwischen dem Standardteegetränk und dem dazugehörigen Rekombinat detektiert werden.

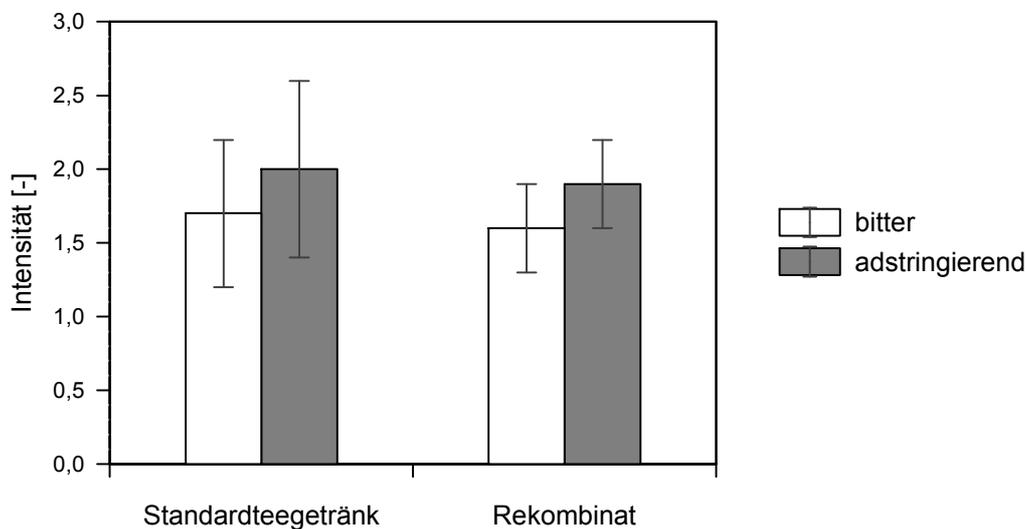


Abbildung 22: Vergleich der Geschmacksprofile des authentischen Teegetränkes und des Gesamtrekombinates^a. Bewertungsskala von 0 (nicht wahrnehmbar) bis 5 (stark wahrnehmbar). ^a Mischung besteht aus den Verbindungen in Tabelle A1. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

2.1.5 Diskussion

In vorhergehender Arbeit von SCHARBERT und HOFMANN ergab die Charakterisierung des Geschmacks von Darjeeling Tee die Identifizierung und Quantifizierung von insgesamt 51 Geschmacksstoffen. Unter Zuhilfenahme quantitativer Daten sowie Rekombinations- und Omissionsexperimente konnte der Beitrag von zwölf Schlüsselgeschmacksstoffen bestehend aus neun Flavonolglykosiden, Koffein und den Flavan-3-olen (-)-Catechin und (-)-Epigallocatechin-3-gallat zum Gesamtgeschmack von schwarzem Tee ermittelt werden

(SCHARBERT und HOFMANN, 2005). Die Flavonolglykoside leisteten nicht nur einen wichtigen Beitrag zum adstringierenden Geschmack des Tees, sondern übten auch einen Einfluss auf die Bitterkeit aus, indem sie Komplexe mit Koffein bildeten. Studien zum Geschmacksbeitrag der Theaflavinderivaten zeigten jedoch, dass diese Substanzen keinen Beitrag zum Teegeschmack leisteten. Darüber hinaus liegen quantitative und sensorische Daten zu den Geschmacksstoffen und Geschmacksmodulatoren in grünem Tee vor (HENZE, 2009). Um die publizierten Daten eines Darjeeling Teegetränkes sowie eines grünen Tees mit den Daten eines Assamtees vergleichen zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der sensorischen und instrumentellen Analytik Verbindungen der Substanzklassen Flavan-3-ole, Theaflavine, Purinalkaloide und Flavon-3-olglykoside im Standardgetränk des Assamtees untersucht.

Die Gehalte der acht Flavan-3-ole (**1-8**) sowie der Purinalkaloide Theobromin (**27**) und Koffein (**28**) als adstringierend und bitter schmeckende Verbindungen, die Konzentrationen der für die samtartige Adstringenz verantwortlichen Flavon-3-olglykoside (**14-16, 19-21**) sowie der fünf Theaflavinderivate, welche eine adstringierende Geschmackswahrnehmung vermitteln, zeigt Tabelle 8 im Vergleich zu den Gehalten dieser Verbindungen im Darjeeling Tee (SCHARBERT und HOFMANN, 2005) und in grünem Tee (HENZE, 2009). Die ermittelten DoT-Faktoren sind zusätzlich zu den Gehalten in Tabelle 8 aufgeführt.

Die erhaltenen Konzentrationen der Flavan-3-ole **1, 3, 5** und **7** lagen in grünem Tee in einem Bereich zwischen 184 und 1627 $\mu\text{mol/L}$ und somit deutlich höher als die Gehalte in schwarzem Tee. Der Grund hierfür ist, dass beim Herstellungsverfahren von grünem Tee die blatteigenen Enzyme deaktiviert werden und eine Oxidation der phenolischen Verbindungen so verhindert werden kann (FELDHEIM, 1994). Auch wiesen diese Substanzen in grünem Tee wesentlich höhere DoT-Faktoren auf (Tabelle 8).

Zudem zeigte der direkte Vergleich zwischen einem Assamtee und einem Darjeeling Teegetränk, dass (-)-Epicatechin (**1**), (-)-Catechin (**2**), (-)-Epicatechin-3-gallat (**3**), (-)-Epigallocatechin (**5**) und (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**) im Darjeeling Tee viel höhere Gehalte aufwiesen, während die zwei verbleibenden Flavan-3-ole **4** und **8** keine Unterschiede in den ermittelten Mengen für die beiden Tees zeigten (Tabelle 8). Diese Ergebnisse demonstrieren, dass der Assamtee im Vergleich zum Darjeeling Tee stärker fermentiert wurde.

Die höchste Konzentration des Purinalkaloides Koffein (**28**) konnte im grünen Tee ermittelt werden, gefolgt von Assamtee und Darjeeling Teegetränk. Der Gehalt für Theobromin (**27**) lag mit ca. 130 $\mu\text{mol/L}$ im Assamtee um ein dreifaches höher im Vergleich zum Sencha-

Getränk (Tabelle 8). Die DoT-Faktoren für Koffein lagen im Bereich von 2,0 (Darjeeling) über 2,8 (Assam) bis zu 3,3 (grüner Tee).

Da der Schritt der Fermentation bei der Herstellung des grünen Tees entfällt, können auch keine Theaflavinderivate im Sencha-Getränk nachgewiesen werden. Beim Darjeeling Tee zeigen die Theaflavinsäure (9), das Monogallat 11 und das Digallat 13 niedrigere Gehalte als im Standardteegetränk eines Assamtees. Während die Konzentrationen des Theaflavin-3'-gallates (12) in beiden Tees gleich sind, konnte Theaflavin (10) im Darjeeling Tee mit der doppelten Menge detektiert werden. In der Gesamtsumme der Theaflavinderivate (9-13) konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen einem Darjeeling- und einem Assamtee ermittelt werden (Tabelle 8).

Die Gehalte der untersuchten Flavon-3-olglykoside und somit auch die errechneten DoT-Faktoren lagen bei allen drei Teesorten im gleichen Konzentrationsbereich. Während die quantitativen Daten für Kämpferol-3-O- β -D-glucopyranosid (14), Kämpferol-3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosid] (16) sowie Quercetin-3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosid] (21) in den beiden Schwarzteegetränken keinen Unterschied aufwiesen, zeigten diese für das Sencha-Getränk lediglich halb so hohe Gehalte. Quercetin-3-O- β -D-glucopyranosid (19) zeigte in grünem Tee im Vergleich zu schwarzem Tee (Darjeeling und Assam) niedrigere Gehalte, während Quercetin-3-O- β -D-galactopyranosid (20) im Sencha-Getränk höhere Mengen aufwies. Die Konzentrationen für Kämpferol-3-O- β -D-galactopyranosid (15) nahmen in der Reihenfolge Assamtee (1,47 μ mol/L), Darjeeling Tee (3,02 μ mol/L) und schließlich grüner Tee (7,23 μ mol/L) deutlich zu (Tabelle 8).

Tabelle 8: Vergleich der Gehalte [$\mu\text{mol/L}$] und Dose-over-Threshold (DoT)-Faktoren [-] von Geschmacksstoffen in Assamtee, Darjeeling Tee und grünem Tee (Sencha-Getränk).

Substanz (Nr.) ^a		Konz. [$\mu\text{mol/L}$] (DoT-Faktor [-]) in		
		Assamtee ^b	Darjeeling Tee ^c	grünem Tee ^d
adstringierend und bitter	(-)-Epicatechin (1)	35,23 (0,1 ^e) ($<0,1^f$)	84,0 (0,1 ^e) (0,1 ^f)	562,45 (1,3 ^e) (0,6 ^f)
	(-)-Catechin (2)	14,57 ($<0,1^e$)	221,0 (0,5 ^e)	-
	(-)-Epicatechin-3-gallat (3)	84,32 (0,3 ^e) (0,2 ^f)	113,0 (0,4 ^e)	184,03 (0,7 ^e) (0,3 ^f)
	(-)-Catechin-3-gallat (4)	10,81 ($<0,1^e$)	11,0 ($<0,1^e$)	-
	(-)-Epigallocatechin (5)	67,36 (0,1 ^e) (0,1 ^f)	131,0 (0,3 ^e)	1430,99 (3,0 ^e) (1,5 ^f)
	(-)-Gallocatechin (6)	6,20 ($<0,1^e$)	11,0 (0,2 ^e)	-
	(-)-Epigallocatechin-3-gallat (7)	50,83 (0,3 ^e) (0,1 ^f)	328,0 (1,7 ^e) (1,7 ^f)	1627,29 (5,4 ^e) (2,7 ^f)
	(-)-Gallocatechin-3-gallat (8)	9,03 ($<0,1^e$) ($<0,1^f$)	11,0 ($<0,1^e$) ($<0,1^f$)	-
adstringierend	Theaflavinsäure (9)	1,43 (0,1 ^e)	0,0093 ($<0,1^e$)	-
	Theaflavin (10)	4,20 (0,3 ^e)	11,0 (0,7 ^e)	-
	Theaflavin-3-gallat (11)	8,45 (0,6 ^e)	6,43 (0,4 ^e)	-
	Theaflavin-3'-gallat (12)	4,90 (0,3 ^e)	4,33 (0,3 ^e)	-
	Theaflavin-3,3'-digallat (13)	8,72 (0,7 ^e)	6,68 (0,5 ^e)	-
samtig-adstringierend	Kämpferol-3-O- β -D-glucopyranosid (14)	5,08 (7,6 ^e)	4,92 (7,0 ^e)	3,50 (5,2 ^e)
	Kämpferol-3-O- β -D-galactopyranosid (15)	1,47 (0,2 ^e)	3,02 (0,5 ^e)	7,23 (1,1 ^e)
	Kämpferol-3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosid] (16)	7,00 (28,0 ^e)	6,52 (26,0 ^e)	3,70 (14,8 ^e)
	Quercetin-3-O- β -D-glucopyranosid (19)	9,64 (14,9 ^e)	6,03 (9,0 ^e)	3,64 (5,6 ^e)
	Quercetin-3-O- β -D-galactopyranosid (20)	4,73 (11,0 ^e)	5,44 (13,0 ^e)	8,33 (19,4 ^e)
	Quercetin-3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosid] (21)	11,15 (9696,0 ^e)	11,07 (9626,0 ^e)	5,36 (4660,9 ^e)
bitter	Theobromin (27)	130,67 (0,2 ^f)	-	53,79 (0,1 ^f)
	Koffein (28)	1378,00 (2,8 ^f)	990,0 (2,0 ^f)	1627,29 (3,3 ^f)

^a Bezifferung der Substanzen bezieht sich auf die Strukturen in Abbildungen 3, 6, 8 und 9. ^b Gehalte und DoT-Faktoren sind Tabelle 7 entnommen. ^c SCHARBERT und HOFMANN, 2005. ^d HENZE, 2009. ^e DoT-Faktor für Adstringenz. ^f DoT-Faktor für Bitterkeit.

Um einen ersten Einblick in die Geschmacksrelevanz der einzelnen Substanzen für den Gesamtgeschmack eines vollfermentierten schwarzen Tees zu erhalten, wurden für alle Substanzen die Dose-over-Threshold (DoT) Faktoren, als Quotient aus Geschmacksschwellenwert und der ermittelten Konzentration, berechnet. Die berechneten DoT-Faktoren für die Flavon-3-olglykoside (**14**, **16**, **19-21**) liegen dabei deutlich über 1, ausgenommen Kämpferol-3-O- β -D-galactopyranosid (**15**). Die Bedeutung dieser fünf Flavon-3-olglykoside (**14**, **16**, **19-21**) für den adstringierenden Geschmack von Tee wurde mit Hilfe des durchgeführten Rekombinationsexperimentes bestätigt. Catechine (**1-8**) wiesen dagegen DoT-Faktoren kleiner 0,5 auf, während bei Theaflavinen (**9-13**) Werte im Bereich zwischen $< 0,1$ für **9** und $0,7$ für **13** erhalten wurden. In Form eines Rekombinationsexperimentes wurde auch die Auswirkung der Catechine **1-5** sowie **7** und der Theaflavine **11-13** auf den Gesamtgeschmack überprüft. Hierbei konnte gezeigt werden, dass trotz geringer DoT-Faktoren die Flavan-3-ole **1-5**, **7** sich als wertgebende Verbindungen für den Gesamtgeschmack der Teeinfusion erwiesen. Auch drei Vertreter (**11-13**) der Substanzklasse der Theaflavine konnten als mitverantwortlich für den adstringierende Geschmack identifiziert werden. Für das Koffein (**28**) konnte ein DoT-Faktor von $2,8$ berechnet werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass beide Purinalkaloide **27** und **28** zum bitteren Gesamtteeengeschmack beitragen.

Anhand des durchgeführten Rekombinationsexperimentes mit anschließender sensorischer Evaluierung in Form von vergleichender Geschmacksprofilanalyse konnten 16 Verbindungen als adstringierende und bittere Schlüsselgeschmacksstoffe in schwarzem Tee identifiziert werden. Dazu gehören Flavan-3-ole (**1-4**, **5**, **7**), Purinalkaloide (**27-28**), Flavon-3-olglykoside (**14**, **16**, **19-21**) sowie Theaflavinderivate (**11-13**). Die Übereinstimmung der Geschmacksprofile bestätigte die Verlässlichkeit der verwendeten Analytik zur Identifizierung der geschmacksaktiven Verbindungen.

2.2 Einfluss von Proteinen auf die Geschmacksstoffe in schwarzem Tee

Um den Einfluss von Milchzusätzen auf die Geschmacksstoffe in „Ready-to-Drink“ Teeprodukten zu untersuchen, wurden mit Hilfe von Magermilchpulver sowie einzelner Milchproteine (α -, β - und κ -Casein, α -Lactalbumin und β -Lactoglobulin) sowohl sensorische als auch instrumentell-analytische Experimente durchgeführt. Für die Ermittlung des Einflusses von Magermilchpulver auf die Teeinhaltsstoffe wurde das Standardteegetränk mit unterschiedlichen Mengen an Magermilchpulver versetzt, zentrifugiert und der Überstand anschließend untersucht.

2.2.1 Einfluss von Magermilchpulver auf Geschmacksstoffe in schwarzem Tee

2.2.1.1 Vergleichende Geschmacksprofilanalyse von Teegetränken vor und nach Magermilchpulver-Zusatz

Um den Einfluss von Magermilchpulver-Zusatz auf die geschmackliche Wahrnehmung der bitteren und adstringierenden Substanzen im Teegetränk zu studieren, wurde eine vergleichende Geschmacksprofilanalyse von einem frischen Teegetränk in Abwesenheit bzw. nach Zusatz von Magermilchpulver (0,1 g/100 mL, 0,5 g/100 mL und 2,0 g/100 mL) durchgeführt. Zusätzlich wurde der Einfluss der im Milchpulver enthaltenen Laktosemenge auf den Geschmack des schwarzen Tees getestet. Dazu wurden Aliquote des stabilisierten Standardteegetränks mit 1,0 g Laktose versetzt, entsprechend der Laktosekonzentration in 2,0 g Magermilchpulver.

Nach Abkühlen der frisch zubereiteten Teeinfusionen auf Raumtemperatur (15 min) wurden die Proben zentrifugiert (30 min, 9000 U/min, RT) und schließlich einem geschulten Panel zur Verkostung gereicht. Das Panel bewertete die Geschmackseindrücke adstringierend, bitter und süß mit Hilfe einer komparativen Geschmacksprofilanalyse auf einer Bewertungsskala von 0 (kein Geschmack zu vernehmen) bis 5 (starker Geschmackseindruck).

Abbildung 23 zeigt die Sensorikergebnisse für ein Standardteegetränk (Referenz), Teegetränke mit Magermilchpulver (0,1, 0,5 und 2,0 g/100 mL) sowie der mit 1,0 g Laktose/100 mL dotierten Teeinfusion. Mit zunehmender Magermilchpulverkonzentration konnte sowohl eine Abnahme in der Bitterkeit als auch in der rauen Adstringenz beobachtet werden. Die Wahrnehmung der Bitterkeit sank von 1,7 auf einen Wert von 0,6. Diese Beobachtung war vergleichbar mit der Verminderung der Adstringenz, hierbei wurde eine Intensitätsabnahme von 1,2 erfasst. Zusätzlich zu der Abnahme der rauen, austrocknenden

Adstringenz veränderte sich die Geschmacksqualität in den untersuchten Teegetränken zu einer samtig-belegenden Wahrnehmung. Die Bewertung der Süße stieg mit zunehmender Milchpulvermenge geringfügig an. Da die im Milchpulver enthaltene Menge an Laktose deutlich unter dem ermittelten Schwellenwert (0,072 mol/L oder 2,6 %; BELITZ et al., 2001) zurückblieb, sollte der auftretende Süßgeschmack nicht durch die Laktose, sondern vermutlich durch die Reduktion der Bitter- und Adstringenzintensität resultieren. Tatsächlich hat die Zugabe von 1,0 g Laktose/100 mL Teeinfusion keinen Einfluss auf die Geschmacksmodalitäten bitter und adstringierend (Abbildung 23).

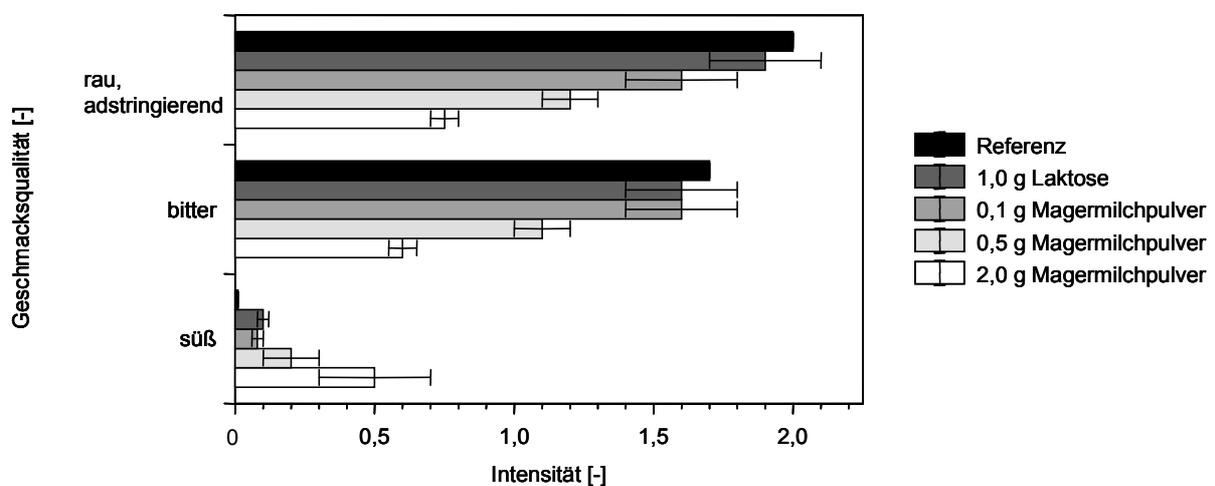


Abbildung 23: Vergleichende Geschmacksprofilanalyse eines Standardteegetränkes ohne Zusatz (Referenz) bzw. nach Zugabe von 1,0 g Laktose bzw. 0,1 g – 2,0 g Magermilchpulver. Bewertungsskala von 0 (nicht wahrnehmbar) bis 5 (stark wahrnehmbar). Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Da die Abnahme der Bitterkeit und Adstringenz auf eine mögliche Interaktion der bitteren und adstringierenden Geschmacksstoffe des schwarzen Tees mit den Inhaltsstoffen des Magermilchpulvers hinwies, wurden im Folgenden instrumentell-analytische Experimente durchgeführt.

2.2.1.2 Einfluss von Magermilchpulver-Zusätzen auf die Gehalte verfügbarer Geschmacksstoffe in Teegetränken

Um den Einfluss verschiedener Magermilchkonzentrationen auf die im Standardteegetränk enthaltenen bitteren und adstringierenden Verbindungen auf molekularer Ebene zu ermitteln, wurden die unterschiedlichen Substanzklassen der Flavan-3-ole (**1-8**), der Theaflavine (**9-13**), der Flavonolglykoside (**14-16, 19-21**) sowie der Purinalkaloide (**27-28**) mittels HPLC-DAD (**1-8** und **27-28**) bzw. mittels HPLC-MS/MS-Analyse (**9-16, 19-21**) im Standardteegetränk vor bzw. nach Zugabe von Magermilchpulver (je 0,1 g, 0,25 g, 0,5 g, 1,0 g und 2,0 g /100 mL Teeinfusion) untersucht. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur (15 min) wurden die Proben zentrifugiert (30 min, 9000 U/min, RT), die Überstände membranfiltriert und die Geschmacksstoffe mittels HPLC-DAD- bzw. HPLC-MS/MS-Analyse und externer Kalibrierung quantifiziert.

Um den Verlauf der Bindungsreaktionen von Teeinhaltsstoffen mit den Milchproteinen zu veranschaulichen, sind die quantitativen Daten der Flavan-3-ole (**1-5, 7**), der Theaflavine (**9-13**), der Flavonolglykoside (**14-16, 19-21**) sowie der Purinalkaloide (**27-28**) in Abbildung 24 dargestellt. Zusätzlich sind alle aufgeführten Daten in Tabelle A2 (s. Anhang) zusammengefasst.

Die Flavan-3-ole (-)-Gallocatechin (**6**) und (-)-Gallocatechin-3-gallat (**8**) konnten im Standardteegetränk nach Zugabe von Magermilchpulver nicht mehr nachgewiesen werden (Abbildung 24). Die Konzentrationen der nicht-galloylierten Flavan-3-ole (-)-Epicatechin (**1**) und (-)-Catechin (**2**) blieben im Verlauf der Experimente mit Milchpulver konstant zwischen 32,2 $\mu\text{mol/L}$ und 35,2 $\mu\text{mol/L}$ für **1** und zwischen 13,9 $\mu\text{mol/L}$ und 15,2 $\mu\text{mol/L}$ für **2**. Bei (-)-Epigallocatechin (**5**) konnte erst bei höheren Mengen Magermilchpulver eine Abnahme der Konzentration beobachtet werden. In Abhängigkeit von der Magermilchkonzentration zeigten dagegen die galloylierten Flavan-3-ole (-)-Epicatechin-3-gallat (**3**) und (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**) eine deutliche Verminderung der Gehalte (Abbildung 24). Die Konzentration von (-)-Epicatechin-3-gallat (**3**) nahm von 80,8 $\mu\text{mol/L}$ im Standardteegetränk auf 18,5 $\mu\text{mol/L}$ im Teegetränk nach Zugabe von 2,0 g Magermilchpulver ab. Für **7** konnte mit zunehmender Menge an Magermilchpulver ebenfalls eine starke Abnahme der Gehalte beobachtet werden. So wurden zum Beispiel nach Dosierung von 2,0 g Magermilchpulver lediglich 30 % des (-)-Epigallocatechin-3-gallats (**7**) im Überstand nachgewiesen. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass 70 % von **7** an Proteine gebunden vorliegen müssen. Zusammenfassend lässt sich beobachten, dass die Gesamtmenge an nicht-galloylierten Flavan-3-ole (**1-2**) bei zunehmender Magermilchpulvermenge unverändert blieb,

wogegen die Summe der galloylierten Catechine (**3-4, 7**) bei steigender Konzentration an Milchpulver eine starke Abnahme erfuhr. Die Galloylierung eines Flavanols beeinflusst somit das Bindungsverhalten zwischen den Polyphenolen und den Milchproteinen aus dem Magermilchpulver.

Es konnte weiterhin beobachtet werden, dass die Konzentrationen der Theaflavinsäure (**9**) im Verlauf der Analyse nahezu gleich blieben, während bei den restlichen Benzotropolonderivaten (**10-13**) eine Zunahme an Additiven eine Konzentrationsabnahme der Geschmacksstoffe zur Folge hatte (Abbildung 24). Die Konzentration von Theaflavin (**10**) nahm von 4,2 $\mu\text{mol/L}$ im Standardteegetränk auf einen Gehalt von 1,2 $\mu\text{mol/L}$ in Teegetränk mit 2,0 g Magermilchpulver ab. Die drei galloylierten Theaflavinderivate Theflavin-3-gallat (**11**), Theaflavin-3'-gallat (**12**) und Theaflavin-3,3'-digallat (**13**) zeigten ein vergleichbares Bindungsverhalten bezüglich der Milchproteine. Die Abnahme der Theaflavine betrug dabei bereits nach Zugabe von 0,1 g Magermilchpulver gut 50 % und stagnierte bei höheren Mengen Milchpulver (Abbildung 24).

Der Einfluss von Magermilchpulver auf das Verhalten der Flavon-3-olglykoside Kämpferol-3-O- β -D-glucopyranosid (**14**), Kämpferol-3-O- β -D-galactopyranosid (**15**), Kämpferol-3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosid] (**16**), Quercetin-3-O- β -D-glucopyranosid (**19**), Quercetin-3-O- β -D-galactopyranosid (**20**) sowie Quercetin-3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosid] (**21**) wurde ebenfalls analysiert (Abbildung 24). Es wird ersichtlich, dass für die Gehalte der Substanzen **14-16** und **21** mit steigender Magermilchkonzentration keine Veränderung detektiert werden konnte, während die Konzentrationen der Substanzen Quercetin-3-O- β -D-glucopyranosid (**19**) und Quercetin-3-O- β -D-galactopyranosid (**20**) eine leichte Abnahme erfuhren. Diese Abnahme gibt jedoch keine eindeutigen Rückschlüsse auf eine Interaktion dieser Monoglykoside mit den Inhaltsstoffen des Magermilchpulvers.

Abbildung 24 zeigt schließlich auch das Verhalten der Purinalkaloide Theobromin (**27**) und Koffein (**28**) nach Zugabe von verschiedenen Magermilchpulvermengen zum Standardteegetränk. Die Konzentrationen liegen in einem Bereich zwischen 1378 $\mu\text{mol/L}$ und 1530 $\mu\text{mol/L}$ für **28** sowie zwischen 130 $\mu\text{mol/L}$ und 136 $\mu\text{mol/L}$ für **27**. Die Addition von Magermilchpulver in den für dieses Experiment gewählten Mengen hat keinen Einfluss auf die Konzentration der Purinalkaloide Theobromin (**27**) und Koffein (**28**).

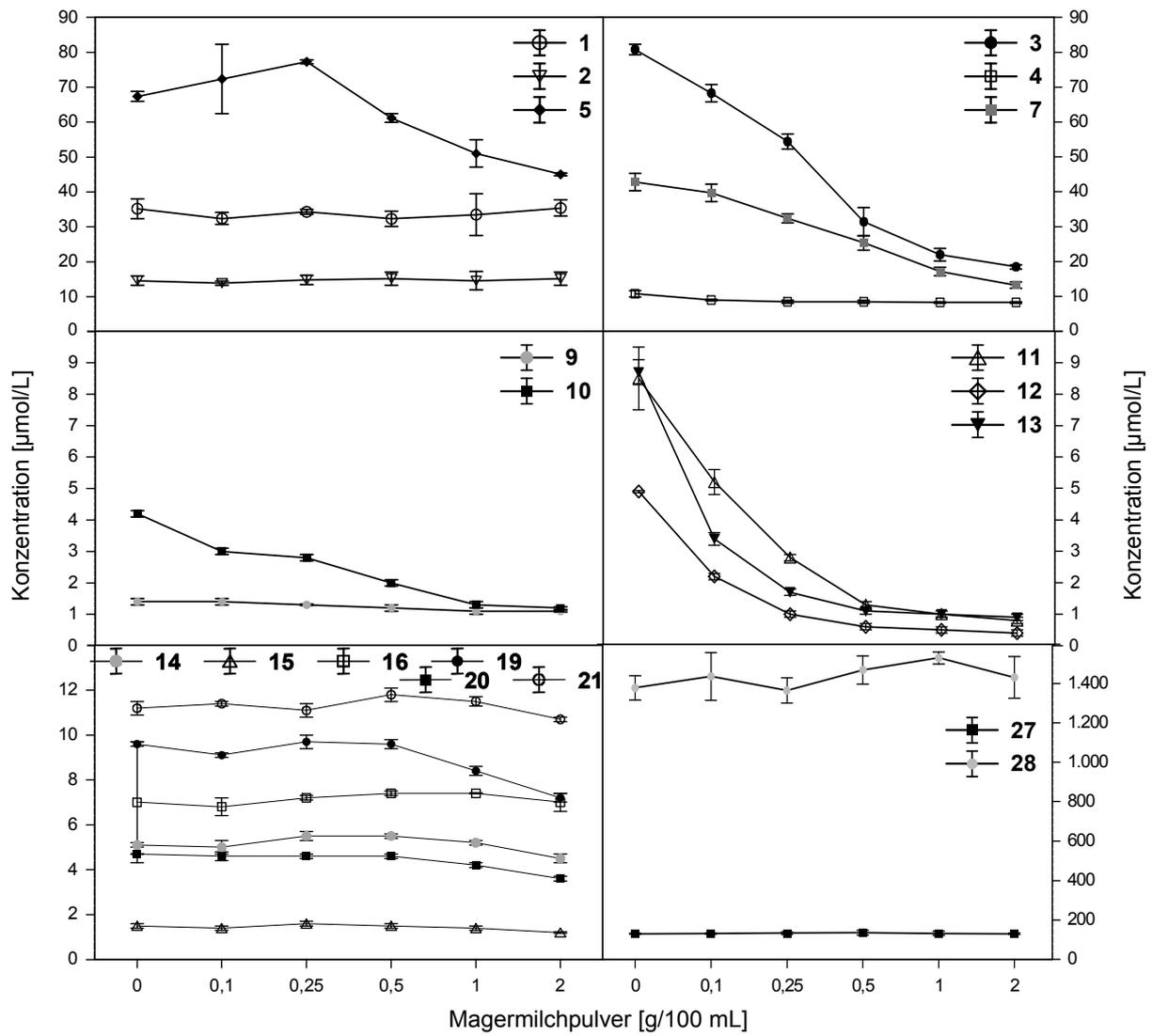


Abbildung 24: Verhalten der nicht-galloylierten (1-2, 5) und galloylierten (3-4, 7) Catechine, der Theaflavine (9-13), der Flavonolglykoside (14-16, 19-21) sowie der Purinalkaloide (27-28) bei Zugabe von Magermilchpulver (0,1 g - 2,0 g) zum Standardteegetränk. Bezifferung der Substanzen bezieht sich auf die Strukturen in Abbildung 3, 6, 8 und 9. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

2.2.1.3 Einfluss von Magermilchpulver-Zusätzen auf den Geschmacksbeitrag bitterer und adstringierender Teeinhaltsstoffe

Um den Geschmacksbeitrag einzelner im Standardteegetränk identifizierter und quantifizierter Geschmacksstoffe nach Zusatz von Magermilchpulver zu bewerten und somit ihr Bindungsverhalten zu untersuchen, wurde zunächst der Geschmacksbeitrag der Flavan-3-ole (**1-8**), Theaflavine (**9-13**), Flavon-3-olglykoside (**14-16**, **19-21**) sowie der Purinalkaloide (**27-28**) mit Hilfe der bereits veröffentlichten Geschmacksschwellenwerte (SCHARBERT et al., 2004a, HENZE, 2009) bestimmt. Die Geschmacksschwellenwerte, die im Standardteegetränk vor und nach Zugabe von Magermilchpulver (2,0 g/100 mL) ermittelten Gehalte sowie die aus dem Quotient der Konzentration und des Schwellenwertes einer Verbindung berechneten DoT-Faktoren für die Zubereitungen mit und ohne Magermilchpulver sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Bedingt durch die Abnahme der Konzentrationen durch Bindung mit Milchproteinen zeigen sowohl die für die Flavan-3-ole **1-5** und **7** und die Theaflavine **10-13** berechneten DoT-Faktoren eine Reduktion auf $\leq 0,1$. Da jedoch mögliche Synergismen sowie additive Effekte nicht berücksichtigt werden, muss durch sensorische Analyse in Form von Rekombinationsexperimenten der Beitrag der Catechine (**1-5**, **7**) und Theaflavine (**10-13**) zum bitteren und adstringierenden Gesamtgeschmack einer Teeinfusion nach Addition von Magermilchpulver überprüft werden.

Die berechneten DoT-Faktoren für die Flavon-3-olglykoside (**14**, **16**, **19-21**) liegen auch nach Zugabe von 2,0 g Magermilchpulver deutlich über 1, ausgenommen Kämpferol-3-O- β -D-galactopyranosid (**15**). Diese fünf Flavon-3-olglykoside (**14**, **16**, **19-21**) spielen somit definitionsgemäß eine wichtige Rolle für den adstringierenden Geschmack von Tee. Bestätigt wird dieses Ergebnis durch das Heranziehen der durchgeführten vergleichenden Geschmacksprofilanalyse (Kapitel 2.2.1.1). Diese zeigte, dass sich der adstringierende Geschmack nach Zugabe von Magermilchpulver verbunden mit einer Verminderung der Summe der Flavan-3-ole (**1-8**) von rau, austrocknend nach samtig-belegend verändert hat.

Weiterhin wurde für das Koffein (**28**) ein DoT-Faktor von > 1 berechnet, so dass die Annahme erfolgen kann, dass der bittere Kaffeingeschmack weiterhin deutlich zum Gesamtteeengeschmack, auch nach Magermilchpulver-Zusatz, beiträgt.

Tabelle 9: Schwellenwerte [$\mu\text{mol/L}$], Konzentrationen [$\mu\text{mol/L}$] und DoT-Faktoren [-] der Geschmacksstoffe im Standardteegetränk (A) und im Teegetränk nach Zugabe von 2,0 g Magermilchpulver^a (B).

Substanz (Nr.) ^b	Schwellenwert [$\mu\text{mol/L}$]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$] ^c		DoT-Faktoren [-] ^d	
		A	B	A	B
<i>Gruppe I: austrocknend, aufrauend adstringierend und bitter</i>					
(-)-Epicatechin (1)	465,0 ^{e, f}	35,2	35,4	0,1 ^g	0,1 ^g
	930,0 ^{f, h}			< 0,1 ⁱ	< 0,1 ⁱ
(-)-Catechin (2)	410,0 ^{e, j}	14,6	15,2	< 0,1 ^g	< 0,1 ^g
(-)-Epicatechin-3-gallat (3)	285,0 ^{e, h}	84,3	18,5	0,3 ^g	0,1 ^g
	570,0 ^{f, h}			0,2 ⁱ	< 0,1 ⁱ
(-)-Catechin-3-gallat (4)	250,0 ^{e, j}	10,8	8,3	< 0,1 ^g	< 0,1 ^g
(-)-Epigallocatechin (5)	475,0 ^{e, f}	67,4	45,0	0,1 ^g	0,1 ^g
	950,0 ^{f, h}			0,1 ⁱ	< 0,1 ⁱ
(-)-Galocatechin (6)	540,0 ^{e, f}	6,2	n.d.	< 0,1 ^g	-
(-)-Epigallocatechin-3-gallat (7)	190,0 ^{e, j}	50,8	13,2	0,3 ^g	0,1 ^g
	380,0 ^{f, h}			0,1 ⁱ	< 0,1 ⁱ
(-)-Galocatechin-3-gallat (8)	390,0 ^{e, j}	9,0	n.d.	0,1 ^g	-
	390,0 ^{h, j}			< 0,1 ⁱ	-
<i>Gruppe II: austrocknend, aufrauend adstringierend</i>					
Theaflavinsäure (9)	24,0 ^{e, j}	1,4	1,1	0,1 ^g	0,1 ^g
Theaflavin (10)	16,0 ^{e, j}	4,2	1,2	0,3 ^g	0,1 ^g
Theaflavin-3-gallat (11)	15,0 ^{e, j}	8,5	0,8	0,6 ^g	0,1 ^g
Theaflavin-3'-gallat (12)	15,0 ^{e, j}	4,9	0,4	0,3 ^g	< 0,1 ^g
Theaflavin-3,3'-digallat (13)	13,0 ^{e, j}	8,7	0,9	0,7 ^g	0,1 ^g
<i>Gruppe III: samtig-belegend adstringierend</i>					
Kämpferol-3-O- β -D-glucopyranosid (14)	0,67 ^{e, j}	5,1	4,5	7,6 ^g	6,7 ^g
Kämpferol-3-O- β -D-galactopyranosid (15)	6,7 ^{e, j}	1,5	1,2	0,2 ^g	0,2 ^g
Kämpferol-3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosid] (16)	0,25 ^{e, j}	7,0	7,0	28,0 ^g	28,0 ^g
Quercetin-3-O- β -D-glucopyranosid (19)	0,65 ^{e, j}	9,6	7,2	14,9 ^g	11,0 ^g
Quercetin-3-O- β -D-galactopyranosid (20)	0,43 ^{e, j}	4,7	3,6	11,0 ^g	8,4 ^g
Quercetin-3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosid] (21)	0,00115 ^{e, j}	11,2	10,7	9696,0 ^g	9287,0 ^g

Substanz (Nr.) ^b	Schwellenwert [µmol/L]	Konzentration [µmol/L] ^c		DoT-Faktoren [-] ^d	
		A	B	A	B
		<i>Gruppe IV: bitter</i>			
Theobromin (27)	750,0 ^{f, h}	130,6	130,0	0,2 ⁱ	0,2 ⁱ
Koffein (28)	500,0 ^{f, h}	1380,0	1431,0	2,8 ⁱ	2,9 ⁱ

^a Angabe in g/100 mL Teeinfusion. ^b Bezifferung der Substanzen bezieht sich auf die Strukturen in Abbildungen 3, 6, 8 und 9. ^c Gehalte aus Quantifizierungsdaten in Tabelle 7 und A2. ^d DoT = Dose-over-Threshold. ^e Schwellenwert für Adstringenz. ^f HENZE, 2009 ^g DoT-Faktor für Adstringenz. ^h Schwellenwert für Bitterkeit. ⁱ DoT-Faktor für Bitterkeit. ^j SCHARBERT et al., 2004a. n.d. = nicht detektierbar.

Zur Verifizierung der sensorischen und instrumentellen Daten bezüglich des Einflusses von Milchproteinen, in Form von Magermilchpulver, auf den Gesamtgeschmack des Teegetränkes mit speziellem Fokus auf Bitterkeit und Adstringenz, wurden Rekombinationsexperimente durchgeführt.

Um das Gesamtrekombinat eines Standardteegetränkes nach Addition von 2,0 g Magermilchpulver herzustellen, wurden die in Tabelle A3 aufgeführten Substanzen in ihrer „natürlichen“ Konzentration in mineralstoffarmem Wasser gelöst.

Die so erhaltene Lösung wurde unter Zugabe von Ameisensäure (0,1 mmol/L) auf pH 6,4 eingestellt. Dieser pH-Wert entspricht dem pH einer Standardteeinfusion nach Zusatz von Magermilchpulver. Anschließend wurde das frisch zubereitete Gesamtrekombinat vergleichend zum authentischen Standardteegetränk, zu welchem vorher 2,0 g Magermilchpulver zugefügt wurden, dem geschulten Sensorikpanel gereicht. Mit Hilfe der Geschmacksprofilanalyse wurden die Geschmacksqualitäten adstringierend, bitter und süß auf einer Bewertungsskala von 0 (kein Geschmack detektierbar) bis 5 (starker Geschmackseindruck) bewertet.

Tabelle 10 zeigt die Ergebnisse der durchgeführten Rekombinationsexperimente für ein Standardteegetränk sowie für das Rekombinat der Geschmacksstoffe, die in einem Teegetränk nach Zugabe von Magermilchpulver (2,0 g/100 mL) bestimmt werden konnten. Die sensorische Evaluierung des Rekombinates, der in einem Teegetränk mit Magermilchpulver-Zusatz (2,0 g/100 mL) verfügbaren Geschmacksstoffe, macht dabei deutlich, dass die Rekombinatlösung bezogen auf die Geschmacksqualitäten bitter und adstringierend nahezu identisch mit dem Profil eines authentischen Teegetränkes nach Addition einer analogen Menge Magermilchpulver war. Die Adstringenz wurde im Rekombinat mit 0,7 bewertet und

im Vergleich dazu im Standardteegetränk mit 0,8. Für den bitteren Geschmackseindruck eines Standardteegetränkes nach Addition von Milchpulver konnte ein Wert von 0,6 ermittelt werden, während die Bitterkeit im Rekombinat einen Wert von 0,5 aufwies.

Tabelle 10: Vergleich der Geschmacksprofilanalysen vom Standardteegetränk mit dem dazugehörigen Rekombinat sowie einem Standardteegetränk nach Zugabe von 2,0 g Magermilchpulver mit dem dazugehörigen Rekombinat.

Geschmacksqualität	Intensität [-] ^a im			
	Standardteegetränk (A)	Rekombinat von A ^b	Teegetränk nach Zugabe von 2,0 g Magermilchpulver (B)	Rekombinat von B ^c
adstringierend	2,0 ± 0,6 ^d	1,9 ± 0,2 ^d	0,8 ± 0,3 ^d	0,7 ± 0,2 ^d
bitter	1,7 ± 0,5 ^d	1,6 ± 0,2 ^d	0,6 ± 0,2 ^d	0,5 ± 0,1 ^d
süß	0,2 ± 0,2 ^d	< 0,1	0,5 ± 0,2 ^d	0,4 ± 0,2 ^d

^a Bewertungsskala von 0 (nicht wahrnehmbar) bis 5 (stark wahrnehmbar). ^b Modellmischung besteht aus den Verbindungen der Tabelle A1. ^c Modellmischung besteht aus den Verbindungen der Tabelle A3. ^d Standardabweichung.

Im Fokus der Experimente stand zudem die Identifizierung der an der Protein/Polyphenol-Wechselwirkung beteiligten einzelnen phenolischen Verbindungen. Hierzu wurde zusätzlich zu den ermittelten Gehalten der Teegeschmacksstoffe nach Zugabe von Magermilchpulver ein direkter Vergleich der Rekombinationsexperimente vor und nach der Zugabe von Magermilchpulver durchgeführt (Tabelle 10). Aufgrund quantitativer Daten und der ermittelten Abnahme der Geschmackseindrücke adstringierend und bitter im Standardteegetränk nach Zugabe von Milchpulverzusatz sollten die galloylierten Flavan-3-ole **3-4** und **7**, das (-)-Epigallocatechin (**5**) sowie die Theaflavinderivate **11-13** die Schlüsselbindungspartner bei der Interaktion dieser Polyphenole mit Milchproteinen darstellen.

2.2.1.4 Diskussion

Mit Hilfe einer vergleichenden Geschmacksprofilanalyse gelang es eine Abnahme der bitteren Geschmackswahrnehmung und der rauen Adstringenz bei Verkostung eines Standardteegetränkes, welches mit zunehmender Magermilchpulverkonzentration behandelt wurde, zu beobachten. Dieser Verlauf der sensorischen Evaluierung deutet auf eine mögliche Interaktion der freien bitteren und adstringierenden Verbindungen aus dem schwarzen Tee mit den Milchproteinen aus dem Magermilchpulver hin. Die Verminderung dieser beiden Geschmacksmodalitäten mit steigender Menge an Magermilchpulver wurde zudem durch Ermittlung quantitativer Daten der einzelnen Substanzklassen mit Hilfe der HPLC-DAD- bzw. HPLC-MS/MS-Analyse bestätigt. Die Gesamtmenge an bitteren und adstringierenden nicht-galloylierten Flavan-3-olen (**1-2**, **5**) blieb bei zunehmender Magermilchpulvermenge nahezu unverändert, während die Summe der bitteren und adstringierenden galloylierten Catechine (**3-4**, **7**) bei steigender Konzentration an Magermilchpulver eine starke Reduktion erfuhr. Die galloylierte Struktureinheit eines Flavanols stellt somit ein wichtiges strukturelles Kriterium in Bezug auf die Bindungsaktivität der Polyphenole mit Proteinen dar. In Übereinstimmung mit CHARLTON et al. (2002) konnte gezeigt werden, dass der D-Ring eines Catechins eine wichtige Rolle für die Bindungsreaktion zwischen Polyphenolen und Proteinen spielt.

Bestätigt wird diese Annahme ebenfalls durch die Bindungsexperimente der Theaflavinderivate **10-13** mit Inhaltsstoffen des Magermilchpulvers. Die drei galloylierten Theaflavinderivate Theaflavin-3-gallat (**11**), Theaflavin-3'-gallat (**12**) und Theaflavin-3,3'-digallat (**13**) zeigten untereinander ein vergleichbares Bindungsverhalten bezüglich der Milchproteine. Die Abnahme der Theaflavine betrug dabei bereits nach Zugabe von 0,1 g Magermilchpulver ~ 50 % und stagnierte bei höheren Milchpulvermengen, während die Konzentrationen der Theaflavinsäure (**9**) im Verlauf der Analysen nahezu gleich blieben. Auch durchgeführte HPLC-Studien von FERRUZZI und GREEN (2006) bestätigen die Bedeutung einer galloylierte Struktureinheit eines Catechins als ein wichtiges strukturelles Kriterium in Bezug auf die Bindungsaktivität der Polyphenole mit Proteinen. Bei Studien von grünem Tee mit Magermilch zeigten besonders die galloylierten Flavan-3-ole Epigallocatechin-3-gallat (**7**) und Epicatechin-3-gallat (**3**) eine hohe Bindungsaffinität. Beim Zusatz von 50 % Magermilch zur Teeinfusion konnten im Überstand lediglich 20-30 % der beiden Catechine quantifiziert werden, der Rest lag gebunden vor (FERRUZZI und GREEN, 2006).

Die Addition von Magermilchpulver in den für diese Experimente gewählten Mengen zeigte jedoch keinen Einfluss auf die Konzentration der Purinalkaloide Theobromin (**27**) und Koffein (**28**) sowie auf das Bindungsverhalten der Flavonolglykoside (**14-16, 19-21**).

Zudem konnte gezeigt werden, dass der in Milchpulver enthaltene Zucker Laktose in den für das Experiment gewählten Konzentrationen mit maximaler Laktosekonzentration von 1 % keinen Einfluss auf die bittere und adstringierende Geschmackswahrnehmung des Tees hat. Der Geschmacksschwellenwert für Laktose wird in der Literatur mit 0,072 mol/L bzw. 2,6 % angegeben (BELITZ et al., 2001). Die eingesetzte Laktosekonzentration liegt somit unterhalb der in der Literatur angegebenen Geschmacksschwelle.

Anhand der Rekombinationsexperimente konnte bestätigt werden, dass die 16 Substanzen, die bereits bei Rekombinationsversuchen zum Standardteegetränk bestimmt wurden, ebenso als Schlüsselgeschmacksstoffe in mit Magermilchpulver behandeltem Teegetränk erfasst werden konnten. Hierzu zählen die Flavan-3-ole **1-4, 5, 7**, die Flavon-3-olglykoside **14, 16, 19-21**, die Theaflavinderivate **11-13** sowie die Purinalkaloide **27** und **28**.

Da der Schwerpunkt der Arbeit vordergründig auf der Identifizierung und der Charakterisierung der Schlüsselbindungspartner der Protein/Polyphenol-Wechselwirkungen lag, konnten aus den gewonnenen Erkenntnissen der Rekombinationsexperimente mit und ohne Behandlung mit Magermilchpulver die galloylierten Flavan-3-ole **3-4** und **7**, das (-)-Epigallocatechin (**5**) sowie die Theaflavinderivate **11-13** erfolgreich als Schlüsselbindungspartner bei der Interaktion der Teegeschmacksstoffe mit Milchproteinen identifiziert werden.

2.2.2 Einfluss einzelner Milch- bzw. Molkenproteine auf Geschmacksstoffe in schwarzem Tee

Für Untersuchungen von Protein/Polyphenol-Interaktionen wurde ein Assay basierend auf Amino-Functionalized Magnetic Beads entwickelt. Es handelt sich hierbei um magnetische Eisenoxidpartikel, die an der Oberfläche mit verschiedenen funktionellen Gruppen wie zum Beispiel Amino-, Aldehyd- oder Carboxygruppen gebunden vorliegen können. WESTON und AVRAMEAS beschrieben erstmals 1971 die Bedingungen einer Bindungsreaktion von Proteinen mit Polyacrylamid Beads über Glutaraldehyd, welches hierbei als Vernetzungsreagenz fungiert und kovalent an die Polyacrylamid Beads gebunden vorliegt. Bei Verwendung der Amino-Functionalized Magnetic Beads werden Proteine mit Hilfe von Glutaraldehyd kovalent an die magnetischen Partikel gebunden. Da die freie primäre Aminogruppe der Proteine für eine Weiterreaktion zur Verfügung steht, können nun kontrolliert ablaufende Bindungsexperimente, die auf dem Prinzip von WESTON und AVRAMEAS (1971) beruhen, mit Liganden wie zum Beispiel den Polyphenolen folgen. Magnetic Beads ermöglichen zudem eine schnelle und zuverlässige Separierung der gebundenen und der freien Liganden. Abschließend kann die Analyse dieser freien Liganden anhand quantitativer Studien mittels HPLC-UV bzw. HPLC-MS/MS erfolgen. Durchgeführte Experimente haben zudem gezeigt, dass der optimale Arbeitsbereich für die Magnetic Beads für die Proteinbindung in einem Bereich zwischen ~ 10 kDa und ~ 56 kDa liegt. Zu kleine oder zu große Peptide bzw. Proteine sind für diese Art von Proteinimmobilisierung nicht geeignet.

Eine schematische Darstellung der Proteinimmobilisierung sowie der Probenvorbereitung zeigt Abbildung 25. Um die Proteinimmobilisierung durchzuführen wird ein definiertes Volumen (z. B. 2,5 mL) der Magnetic Beads mit Pyridinpuffer (0,01 mol/L, pH 6) gewaschen. Zur Aktivierung der Beads werden diese für 3 h bei Raumtemperatur unter Schütteln mit Glutaraldehyd (5 %ige Lösung) inkubiert. Das überschüssige Glutaraldehyd wird anschließend mit Hilfe magnetischer Abtrennung entfernt und die Lösung wiederholt mit Pyridinpuffer (0,01 mol/L, pH 6) gewaschen. Die mit Glutaraldehyd aktivierten Magnetic Beads werden jetzt mit einer Proteinlösung, die eine definierte Proteinkonzentration besitzt, inkubiert. Diese Proteinlösung wird auch als Vorkopplungslösung bezeichnet. Das Inkubieren erfolgt bei Raumtemperatur unter Schütteln für 16-24 Stunden. Die Proteinlösung, die als Überstand nach Ablauf der Reaktionszeit entnommen werden kann, ist die sogenannte Nachkopplungslösung. Anhand der Vor- und Nachkopplungslösungen ist es möglich die Kopplungseffizienz mittels

BCA-Assay zu bestimmen (Kapitel 3.5.2) und somit auch die Proteinkonzentration, die an die Beads gebunden hat, zu ermitteln. Das Stoppen der Reaktion erfolgt mit einer Glycinlösung (1,0 mol/L), welche anschließend wieder entfernt wird. Die Magnetic Beads werden zum letzten Mal mit Pyridinpuffer (0,01 mol/L, pH 6) gewaschen. Nach der Aufnahme in Phosphatpuffer (0,01 mol/L, pH 6,4) können die mit Proteinen beladenen Magnetic Beads für Bindungsexperimente mit schwarzem Tee oder einer Modelllösung der Polyphenole eingesetzt werden. Für die folgenden Bindungsstudien werden die Beads mit α -, β - und κ -Casein, α -Lactalbumin und β -Lactoglobulin beladen.

Zur Probenvorbereitung wird ein definiertes Volumen des Standardteegetränkes bzw. einer Modelllösung der Polyphenole mit verschiedenen Konzentrationen der mit Proteinen immobilisierten Magnetic Beads inkubiert. Nach magnetischer Abtrennung der an die Beads gebundenen Liganden können die noch frei vorliegenden Polyphenole im Überstand mittels instrumentell-analytischer Experimente untersucht werden (Abbildung 25).

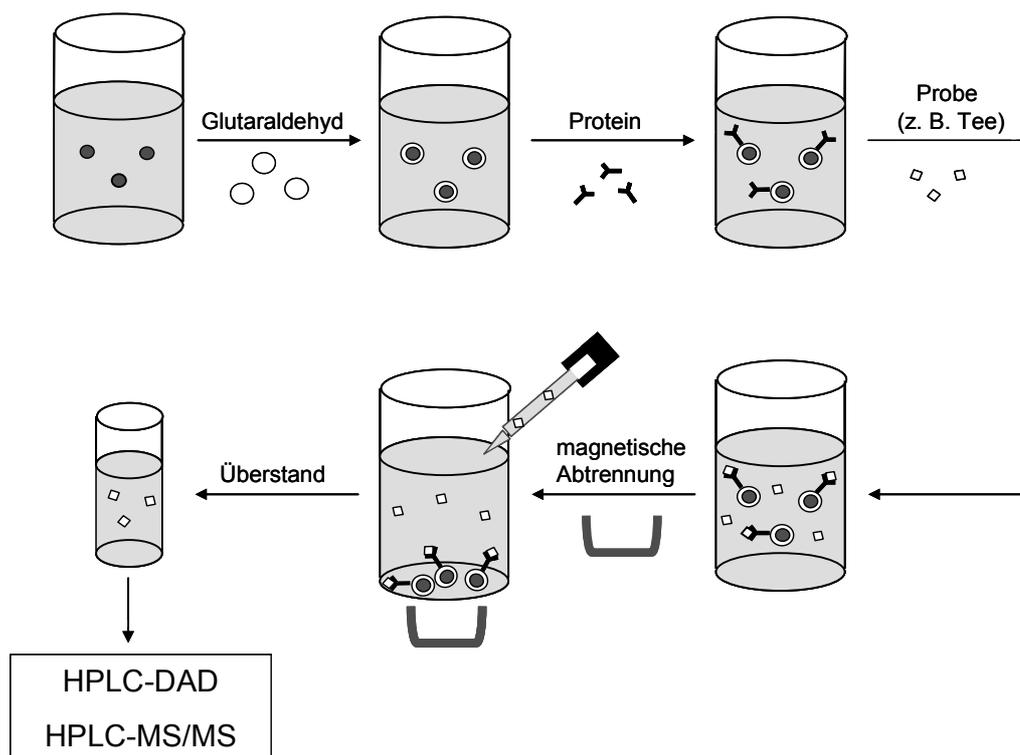


Abbildung 25: Magnetic Bead Assay: Proteinimmobilisierung und Probenvorbereitung.

2.2.2.1 Einfluss von β -Casein auf Flavan-3-ole und Theaflavine im Teegetränk

Um den Einfluss der Bindungsaktivität von β -Casein auf verschiedene Tee geschmacksstoffe untersuchen zu können, wurden folgende Experimente durchgeführt. 500 μ L des Standardteegetränks, welches im Vorfeld mit Ascorbinsäure stabilisiert wurde, wurden mit verschiedenen Konzentrationen (0,01 μ mol/mL, 0,02 μ mol/mL und 0,04 μ mol/mL) der mit β -Casein aktivierten Magnetic Beads für 10 min bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Nach abschließender magnetischer Abtrennung wurde der Überstand mittels HPLC-UV bzw. HPLC-MS/MS auf die Gehalte der freien Liganden, in diesem Fall der Flavan-3-ole (**1-5**, **7**) und Theaflavine (**9-13**), überprüft. Als Kontrolle diente eine Lösung des Standardteegetränkes.

Die nicht-galloylierten Flavan-3-ole (-)-Epicatechin (**1**) und (-)-Catechin (**2**) sowie Theaflavinsäure (**9**) zeigten bei den im vorliegenden Experiment verwendeten Proteinkonzentrationen keine signifikanten Wechselwirkungen mit dem β -Casein (Abbildung 26). Bei geringen Proteinmengen (0,01 und 0,02 μ mol/mL) wurde für (-)-Epigallocatechin (**5**) keine Bindung beobachtet, lediglich beim Verwenden der maximalen Konzentration an β -Casein konnte eine leichte Abnahme der Konzentration des freien Liganden **5** ermittelt werden.

Mit zunehmender Konzentration an β -Casein konnte hingegen eine signifikante Abnahme der galloylierten Catechine (-)-Epicatechin-3-gallat (**3**), (-)-Catechin-3-gallat (**4**) sowie (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**) beobachtet werden (Abbildung 26). Nach Zugabe von 0,01 μ mol/mL β -Casein wurden zum Beispiel 82 % an freiem (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**) im Überstand detektiert, lediglich 58 % nach Addition der doppelten Proteinmenge und schließlich 31 % des freien Liganden nach Behandlung mit 0,04 μ mol/mL β -Casein.

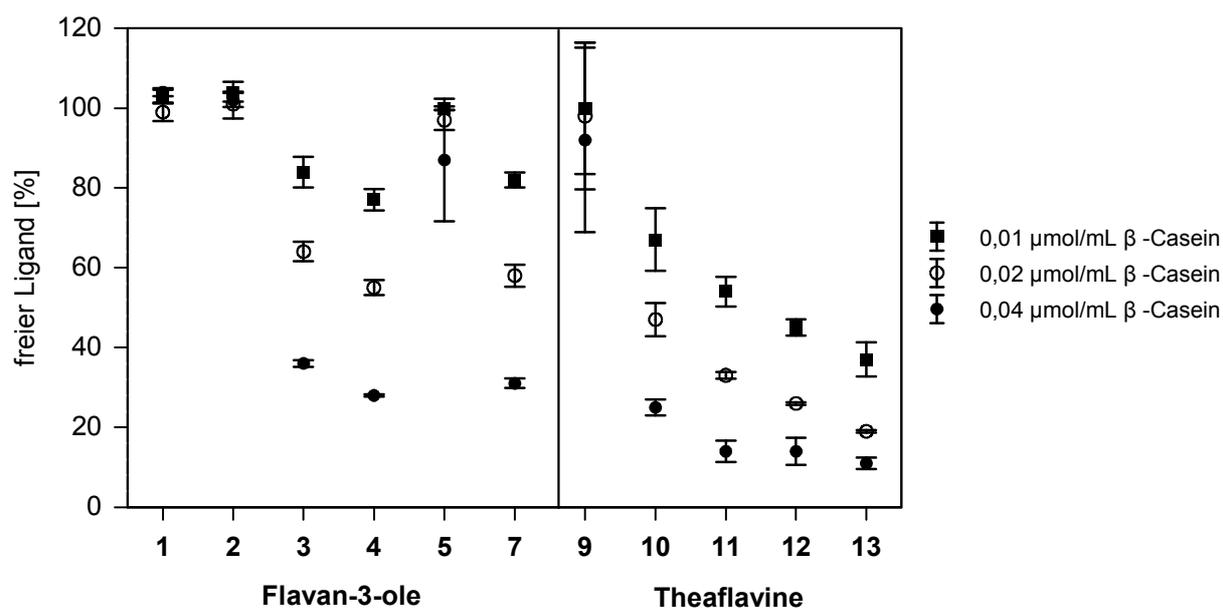


Abbildung 26: Einfluss der β -Caseinmenge auf die Bindungsaktivität ausgewählter Teegeschmacksstoffe: (-)-Epicatechin (1), (-)-Catechin (2), (-)-Epicatechin-3-gallat (3), (-)-Catechin-3-gallat (4), (-)-Epigallocatechin (5), (-)-Epigallocatechin-3-gallat (7), Theaflavinsäure (9), Theaflavin (10), Theaflavin-3-gallat (11), Theaflavin-3'-gallat (12) und Theaflavin-3,3'-digallat (13). Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Bezifferung der Substanzen bezieht sich auf die Strukturen in Abbildungen 3 und 6.

Die galloylierten Theaflavinderivate Theaflavin-3-gallat (11), Theaflavin-3'-gallat (12) und Theaflavin-3,3'-digallat (13) zeigten untereinander ein ähnliches Bindungsverhalten, welches im Vergleich zu den galloylierten Flavan-3-olen (3-4, 7) deutlicher ausgeprägt war. Im Gegensatz dazu wies Theaflavin (10) eine sichtlich schwächere Bindungsaktivität auf. Begründet werden kann dieses Bindungsverhalten durch die fehlende Galloylierung von 10 an Positionen C3 und/oder C3' ([Abbildung 17](#)).

Die Ergebnisse dieses ersten Bindungsexperimentes unter Verwendung der Magnetic Beads verdeutlichen einmal mehr die Notwendigkeit einer Galloylgruppe als eine wichtige Struktureinheit des Liganden für ein ausgeprägtes Bindungsverhalten mit einem Protein.

2.2.2.2 Einfluss von Milchproteinen auf die Bindung einzelner Geschmacksstoffe

Um den Einfluss der Proteinstruktur auf die Bindungsaffinität von Teeinhaltsstoffen in einem Modellsystem zu analysieren, wurden die Milchproteine α -, β - und κ -Casein sowie α -Lactalbumin und β -Lactoglobulin einzeln für Bindungsstudien mit einer Modelllösung der Flavan-3-ole (-)-Epicatechin (**1**), (-)-Catechin (**2**), (-)-Epicatechin-3-gallat (**3**), (-)-Catechin-3-gallat (**4**), (-)-Epigallocatechin (**5**) und (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**) verwendet. Bei diesen Bindungsexperimenten wurde ebenfalls der in Kapitel 2.2.2 beschriebene Magnetic Bead Assay genutzt.

Hierzu wurden 500 μ L der Modelllösung (**1-5, 7**, 2 μ mol/mL, pH 6,4) mit unterschiedlichen Konzentrationen der mit Milchproteinen beladenen Magnetic Beads für 10 min bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Die verwendeten Konzentrationen der eingesetzten Proteine betragen 0,01, 0,02 sowie 0,04 μ mol/mL. Die Gehalte der Flavan-3-ole (**1-5, 7**) wurden nach magnetischer Trennung im Überstand mittels HPLC-UV-Analyse quantifiziert.

Die Ergebnisse der Bindungsstudien mit je 0,04 μ mol/mL der Milchproteine zeigt exemplarisch [Abbildung 27](#). Im Vergleich zu nicht-galloylierten Catechinen (**1-2**), welche keine Bindungsaktivität bezüglich der Milchproteine aufwiesen, interagierten alle galloylierten Catechine (**3-4, 7**) mit jedem der verwendeten Milchproteine. Beispielsweise konnte für (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**) die stärkste Bindungsaffinität für α -Lactalbumin und β -Lactoglobulin gefolgt von α - und β -Casein beobachtet werden. κ -Casein zeigte für **7** das schwächste Bindungsverhalten, hier wurden 60 % des Liganden **7** als gebunden detektiert, während mit α -Lactalbumin bereits 80 % von **7** gebunden vorlag. (-)-Epicatechin-3-gallat (**3**) und (-)-Catechin-3-gallat (**4**) präsentierten beide die stärkste Bindungsaktivität mit α - und β -Casein, gefolgt von den Molkenproteinen α -Lactalbumin und β -Lactoglobulin. Für (-)-Catechin-3-gallat (**4**) wurde für alle Milchproteine eine höhere Bindungsaffinität im Vergleich zu (-)-Epicatechin-3-gallat (**3**) beobachtet. So wurden für **4** lediglich 26 % des freien Liganden nach der Bindungsreaktion mit α -Casein ermittelt, während für **3** noch 37 % an freiem Liganden detektiert werden konnten. Auch bei diesen Substanzen (**3-4**) konnte für κ -Casein mit Abstand die schwächste Protein/Polyphenol-Wechselwirkung beobachtet werden.

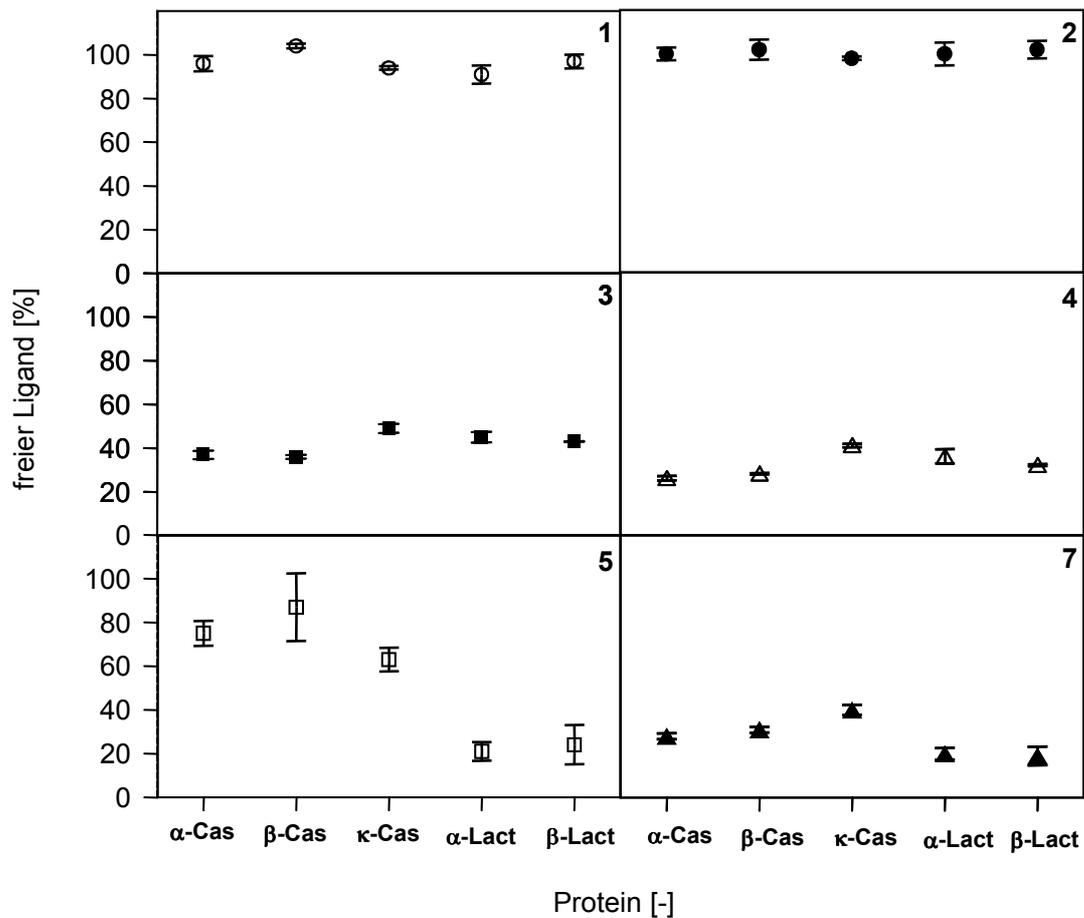


Abbildung 27: Einfluss der Milchproteinen (α -, β - und κ -Casein, α -Lactalbumin und β -Lactoglobulin: 0,04 $\mu\text{mol/mL}$) auf den Anteil von freien (-)-Epicatechin (1), (-)-Catechin (2), (-)-Epicatechin-3-gallat (3), (-)-Catechin-3-gallat (4), (-)-Epigallocatechin (5) und (-)-Epigallocatechin-3-gallat (7) in einer wässrigen Lösung der Polyphenole (2 $\mu\text{mol/mL}$, 500 μL , pH 6,4). α -Cas = α -Casein. β -Cas = β -Casein. κ -Cas = κ -Casein. α -Lact = α -Lactalbumin. β -Lact = β -Lactoglobulin. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Bezifferung der Substanzen bezieht sich auf die Strukturen in Abbildung 3.

Eine Sonderstellung nimmt (-)-Epigallocatechin (5) ein, dessen Bindungsverhalten sich sowohl von der Bindungsaktivität der galloylierten als auch von der der nicht-galloylierten Catechine unterschied. (-)-Epigallocatechin (5) wies die beste Bindungsaffinität für die Molkenproteine α -Lactalbumin und β -Lactoglobulin auf. Nach Zugabe von 0,04 $\mu\text{mol/mL}$ α -Lactalbumin konnten im Überstand lediglich 21 % des freien Liganden detektiert werden. Nach Addition gleicher Menge β -Lactoglobulin konnten 24 % von 5 im Filtrat ermittelt werden. Die Bindungsaffinität mit α -, β - und κ -Casein war hingegen signifikant niedriger im Vergleich zu den Molkenproteinen. Hierbei zeigte 5 eine höhere Bindungsaffinität zu

κ -Casein (63 % freies **5**) verglichen mit den Ergebnisse der Bindungsexperimente für α - (75 %) und β -Casein (87 %).

Um den Einfluss der verschiedenen Flavan-3-ole auf das Bindungsverhalten mit Milchproteinen zu überprüfen, wurden die Bindungsstudien für die Flavan-3-ole (-)-Epicatechin (**1**) und (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**) einzeln durchgeführt. Hierbei konnte eine hohe Bindungsaffinität von (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**) mit allen Milchproteinen detektiert werden (Abbildung 28). Am schwächsten erfolgte die Interaktion zwischen dem Protein κ -Casein und **7**. Das nicht-galloylierte Flavan-3-ol (-)-Epicatechin (**1**) zeigte hingegen auch einzeln im Vergleich zu **7** eine deutlich schwächere Bindungsaktivität mit den untersuchten Proteinen.

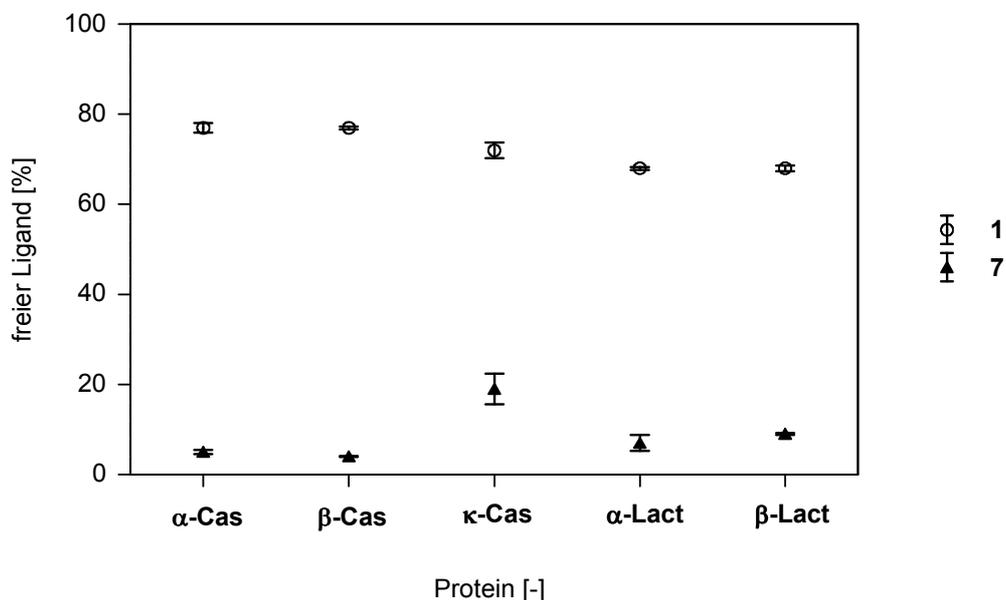


Abbildung 28: Einfluss der Milchproteinen (α -, β - und κ -Casein, α -Lactalbumin und β -Lactoglobulin: 0,04 $\mu\text{mol/mL}$) auf den Anteil von freien (-)-Epicatechin (**1**) und (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**) in einer wässrigen Lösung der Polyphenole (2 $\mu\text{mol/mL}$, 500 μL , pH 6,4). α -Cas = α -Casein. β -Cas = β -Casein. κ -Cas = κ -Casein. α -Lact = α -Lactalbumin. β -Lact = β -Lactoglobulin. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Bezifferung der Substanzen bezieht sich auf die Strukturen in Abbildung 3.

Es konnte gezeigt werden, dass unabhängig davon, ob die Flavan-3-ole (-)-Epicatechin (**1**) und (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**) im Gemisch mit anderen Catechinen vorliegen oder ob sie einzeln als Bindungspartner dienen, sich das Bindungsverhalten der einzelnen Flavan-3-ole nicht von den übrigen, in der Lösung vorliegenden, Substanzen beeinflussen lässt.

2.2.2.3 Diskussion

Zur Untersuchung der Protein/Polyphenol-Interaktionen mit Milchproteinen und Geschmacksstoffen aus schwarzem Tee sind ein kontrollierter Ablauf der Bindungsreaktion sowie die Reproduzierbarkeit der Messungen beim Einsatz unterschiedlicher Proteine wichtige Voraussetzungen der Analyse. Da in Lösung vorliegende Proteine diese Anforderungen nur begrenzt erfüllen können, wurden die Bindungsstudien mittels einer neu entwickelten Methode unter Verwendung der Amino-Functionalized Magnetic Beads durchgeführt. Hierbei ist es möglich Proteine kovalent mit Hilfe eines Vernetzungsreagenzes an die Magnetic Beads zu binden und gleichzeitig eine freie primäre Aminogruppe für die Weiterreaktion mit Polyphenole zur Verfügung zu haben (WESTON und AVRAMEAS, 1971). Magnetic Beads ermöglichen eine schnelle und zuverlässige Separierung der gebundenen und der freien Liganden wie es zum Beispiel mittels Ultrafiltration oder Ultrazentrifugation nur begrenzt möglich ist. Auch ist der optimale Arbeitsbereich für Proteine für diese Studien an die hier verwendeten Milchproteine angepasst.

Durch den Einsatz der Magnetic Beads gelang die Untersuchung der Bindungsreaktion von Teegeschmacksstoffen (**1-5, 7, 9-13**) im Standardteegetränk mit β -Casein sowie die Analyse der Flavan-3-ole (**1-5, 7**) in der Modelllösung mit Milch- und Molkenproteinen.

Auch hier zeigt sich deutlich, dass das Vorhandensein einer Galloylgruppe als Struktureinheit eines Polyphenols, welches als Bindungspartner dient, eine wichtige Rolle spielt. Galloylierte Catechine **3-4** und **7** zeigten dabei die höchste Bindungsaffinität mit allen verwendeten Proteinen (α -, β - und κ -Casein, α -Lactalbumin, β -Lactoglobulin). Galloylierte Theaflavinderivate (**11-13**) wiesen die höchste Bindungsaffinität zu β -Casein auf, während die nicht-galloylierten Catechine (-)-Epicatechin (**1**) und (-)-Catechin (**2**) mit keinem der Proteine eine Bindungsreaktion eingingen. Eine Sonderstellung nahm (-)-Epigallocatechin (**5**) ein. Sein Bindungsverhalten unterschied sich sowohl von dem der galloylierten als auch von dem der nicht-galloylierten Catechine. Zudem wurde der Einfluss der Flavan-3-ole untereinander auf die Bindungsaktivität mit β -Casein untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Substanzen gegenseitig nicht beeinflussen. Die Bindungsaffinität von **1** und **7** blieb im Gemisch und bei der Untersuchung dieser Verbindungen einzeln unverändert.

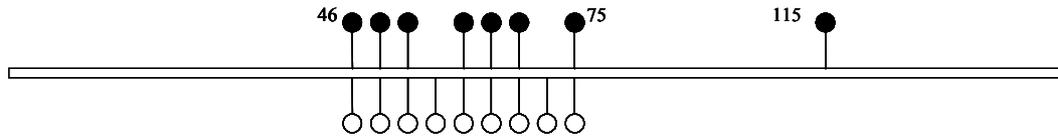
Neben der Struktur des Liganden ist die genaue Betrachtung der Rolle des Proteins für die Bindungsreaktion mit einem Polyphenol wichtig. Abbildung 29 zeigt nach LUCK et al. (1994) exemplarisch die strukturellen Merkmale der Caseine. LUCK et al. (1994) beschreiben die Caseine als relativ kleine, amphipathische Moleküle mit hohem Prolingehalt. Dabei verteilt

sich die Aminosäure Prolin gleichmäßig über die gesamte Aminosäuresequenz. α -Casein besitzt 199 Aminosäurereste mit einem Prolingehalt von 8,5 %. Während β -Casein einen doppelt so hohen Prolingehalt von 16,8 % aufweist, verfügt κ -Casein über 20 Prolinreste, dieses macht auf die Gesamtmenge der Aminosäuren betrachtet einen Gehalt von 11,8 % aus. κ -Casein ist somit ebenfalls prolinreich, unterscheidet sich jedoch durch das Vorhandensein von Kohlenhydratresten von α - und β -Casein. Das dargestellte strukturelle Charakteristikum der Verteilung der Prolinreste innerhalb der Proteinsequenz führt zu einer relativ offenen und wahllos gefalteten Konformation der Caseine und erleichtert so eine Komplexbildung dieser Proteine beim Wechselwirken mit Polyphenolen. Alle Caseine sind zudem stark hydrophob ($\beta > \kappa > \alpha_{s1} > \alpha_{s2}$), was die Protein/Polyphenol-Wechselwirkung zusätzlich begünstigt (LUCK et al., 1994, FERRUZZI und GREEN, 2006).

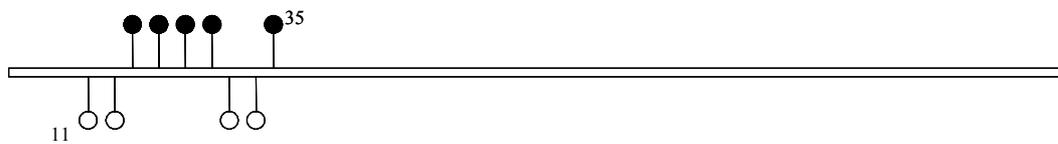
Mittels durchgeführter Bindungsstudien konnten die Literaturaussagen bezüglich der Wichtigkeit des Prolingehaltes bei einem Protein nicht bestätigt werden. Nach BAXTER et al. (1997) sowie JÖBSTL et al. (2004b) gehen Polyphenole bevorzugt eine Bindungsreaktion mit prolinreicheren Proteinen ein. Gemäß SPENCER et al. (1988) ist die sterische Zugänglichkeit auf der Seite der Proteine, bedingt durch Prolin, sowie der Polyphenole ebenfalls von großer Bedeutung. Es zeigte sich jedoch, dass das prolinreichere Protein κ -Casein im Vergleich zu den Molkenproteinen α -Lactalbumin (Prolingehalt: 1,6 %) und β -Lactoglobulin (Prolingehalt: 4,0 %) für die Substanzen **3-4** und **7** eine viel geringere Bindungsaffinität aufwies. Unter Betrachtung der Ergebnisse scheint Prolin nicht die einzige mögliche Bindungsstelle der Proteine zu sein.

Zur Prüfung dieser Ergebnisse wurden weitere Studien zu Struktur/Wirkungszusammenhängen von Polyphenolen mit unterschiedlichen Proteinen im folgenden Kapitel durchgeführt.

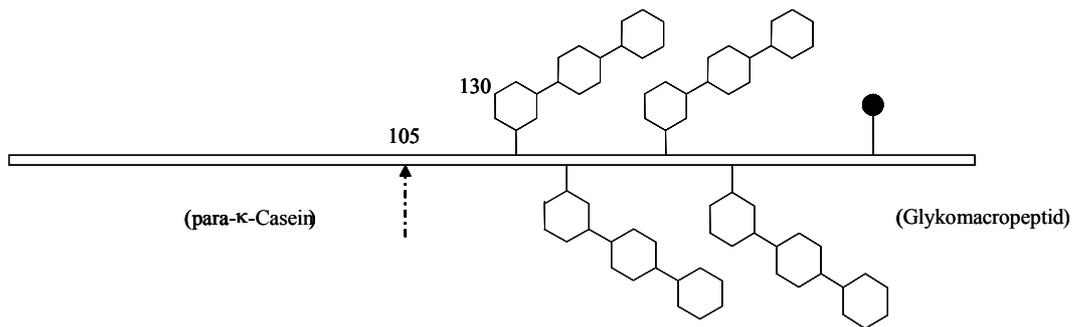
α_{s1} -Casein: 199 Aminosäuren, Prolingehalt: 8,5 %



β -Casein: 209 Aminosäuren, Prolingehalt: 16,8 %



κ -Casein: 169 Aminosäuren, Prolingehalt: 11,8 %



- Phosphoserin (Threonin)
- Carboxylat-Gruppe
- ⬡ Kohlenhydrat

Abbildung 29: Strukturen der Proteine α -, β - und κ -Casein nach LUCK et al., 1994.

2.2.3 Studien zu Struktur/Wirkungszusammenhängen der Polyphenol/Protein-Interaktion

Um die Struktur/Wirkungszusammenhänge während der Wechselwirkung eines Polyphenols mit einem Protein zu studieren, wurden sowohl der Einfluss der Polyphenolstruktur als auch der Beitrag der charakteristischen Merkmale eines Proteins analysiert. Zur Bestimmung der Bindungsaffinität ausgewählter Substanzen, die zum Einen als Bestandteile von schwarzem Tee charakterisiert werden konnten und zum Anderen strukturell verwandte Verbindungen darstellen, wurden Bindungsstudien mit Protein-beladenen Magnetic Beads durchgeführt. Diese Experimente ermöglichen die Berechnung der sogenannten halbmaximalen Bindungskonzentration (BC_{50} -Wert). Beim BC_{50} -Wert handelt es sich um die Konzentration eines Proteins bei der eine halbmaximale Bindung eines Liganden vorliegt. So ist es im Anschluss möglich die Bindungsaffinität der untersuchten Liganden anhand der ermittelten BC_{50} -Werte zu bewerten und untereinander zu vergleichen.

2.2.3.1 Einfluss der Polyphenolstruktur

Bindungsexperimente mit der Standardteeinfusion zeigten bereits eine erhöhte Bindungsaffinität der galloylierten Flavan-3-ole wie (-)-Epicatechin-3-gallat (**3**), (-)-Gallocatechin-3-gallat (**4**) und (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**). Während die nicht-galloylierten Catechine (-)-Epicatechin (**1**) und (-)-Catechin (**2**) keinerlei Bindungsaktivität aufwiesen, interagierte (-)-Epigallocatechin (**5**) lediglich mit bestimmten Proteinen (s. Abschnitt 2.2.1.2).

Die Untersuchung der teeigenen Geschmacksstoffe **1-8** und **29** wurde für Struktur/Aktivitäts-Überlegungen durch Trihydroxybenzoylderivate wie Pyrogallol (**31**), verschiedene Gallussäureester (**32-34**) und Pentagalloylglukose (**35**) (Abbildung 30) ergänzt.

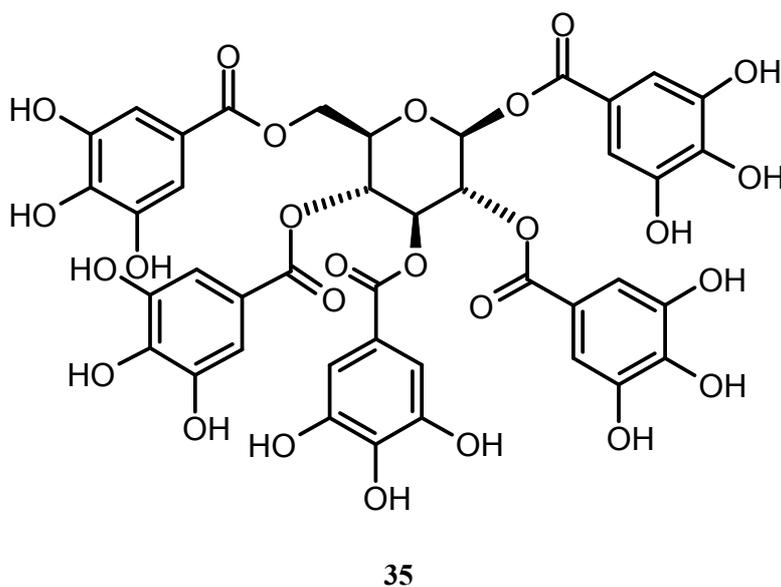
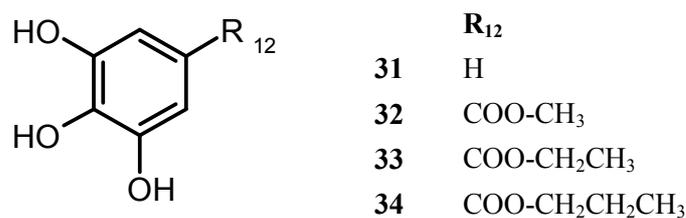


Abbildung 30: Strukturformeln von Pyrogallol (31), Methylgallat (32), Ethylgallat (33), Propylgallat (34) und Pentagalloylglukose (35).

Es erfolgte die Untersuchung verschiedener Flavan-3-ole (**1-8**) sowie Pentagalloylglukose (**35**) mit den Milchproteinen β -Casein und α -Lactalbumin. Dazu wurden je 500 μ L einer Flavan-3-ollösung (**1-8**) und einer Lösung von **35** (2 μ mol/mL, pH 6,4) mit verschiedenen Konzentrationen der mit β -Casein oder α -Lactalbumin aktivierten Magnetic Beads bei Raumtemperatur unter Schütteln für 10 min inkubiert. Zudem wurden auch je 500 μ L der Lösungen von Gallussäure (**29**), Pyrogallol (**31**) und dreier Gallussäureester (Methyl-, Ethyl- und Propylgallat (**32-34**)) (2 μ mol/mL, pH 6,4) mit β -Casein aktivierten Beads versetzt. Die acht eingesetzten Proteinkonzentrationen lagen in einem Bereich zwischen 0,5 nmol/mL und 100 nmol/mL. Nach abschließender magnetischer Abtrennung wurde der Überstand der Lösung mittels HPLC-DAD untersucht. Als Referenz diente eine

Lösung der Verbindungen **1-8, 29, 31-35** bei der jede Substanz einzeln mit Phosphatpuffer verdünnt vorlag. Die Menge an gebundenem Liganden wurde aus der Differenz der Konzentration der Referenz und der in Lösung verbleibenden freien Menge des jeweiligen Liganden bestimmt.

Abbildung 31 zeigt exemplarisch die ermittelten Bindungskurven von (-)-Epicatechin (**1**), (-)-Epicatechin-3-gallat (**3**), (-)-Epigallocatechin (**5**) sowie (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**) dargestellt gegen β -Casein bei einem pH von 6,4. Hierbei ergaben sich für die Substanzen **3, 5** und **7** im Gegensatz zu **1**, welche im gezeigten Konzentrationsbereich einen exponentiell ansteigenden Kurvenverlauf darstellt, sigmoide Kurvenverläufe. Die Bindungskurven von (-)-Epicatechin-3-gallat (**3**) und (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**) ähneln sich in ihrem Verlauf, dieses wird ebenfalls beim späteren Betrachten der ermittelten BC_{50} -Werte (Tabelle 11) deutlich.

Nach Bestimmung der individuellen Bindungskurven für β -Casein sowie für α -Lactalbumin konnte die halbmaximale Bindungskonzentration (BC_{50} -Wert) eines jeden Liganden, als die Konzentration des Proteins bei der eine halbmaximale Bindung des Liganden vorliegt, berechnet werden.

Die Ergebnisse der BC_{50} -Werte für die untersuchten Substanzen **1-8, 29** und **31-35** sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Den niedrigsten BC_{50} -Wert und somit die höchste Bindungsaktivität für β -Casein zeigten die galloylierten Flavan-3-ole (-)-Gallocatechin-3-gallat (**8**) mit 7,9 nmol/ μ mol und (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**) mit 8,3 nmol/ μ mol, gefolgt von (-)-Epicatechin-3-gallat (**3**) und (-)-Catechin-3-gallat (**4**) mit einem durchschnittlichen BC_{50} -Wert von 9,4 nmol β -Casein/ μ mol Ligand. Die ermittelten Werte für α -Lactalbumin sind für diese Substanzen höher und liegen in einem Bereich von 11,6 nmol und 19,0 nmol α -Lactalbumin/ μ mol Catechin. Nicht-galloylierte Flavan-3-ole (-)-Gallocatechin (**4**), (-)-Epigallocatechin (**5**), (-)-Epicatechin (**1**) und (-)-Catechin (**2**) zeigten hingegen ein anderes Bindungsverhalten. Für die Bestimmung der halbmaximalen Bindungskonzentration von **2** sowohl für β -Casein als auch für das Molkenprotein α -Lactalbumin konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Im Vergleich dazu konnten für (-)-Epigallocatechin (**5**) und (-)-Gallocatechin (**6**) bei Bindungsstudien mit α -Lactalbumin deutlich geringere BC_{50} -Werte als bei Experimenten mit β -Casein ermittelt werden. Bei Betrachtung aller Flavan-3-ole wird deutlich, dass (-)-Epicatechin (**1**) die geringste Bindungsaktivität und somit die höchsten BC_{50} -Werte aufwies und zwar für beide Proteine.

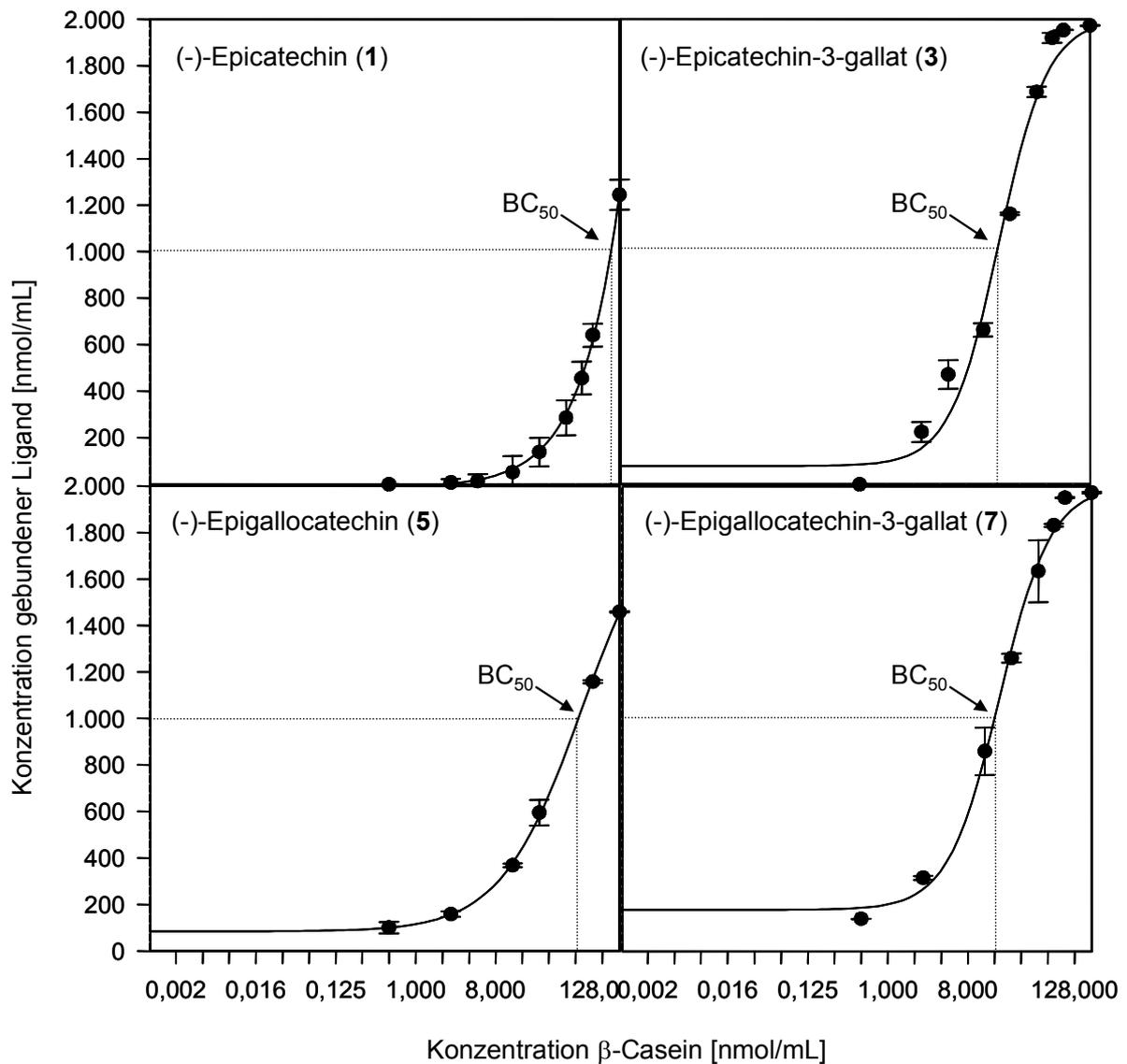


Abbildung 31: Vergleich der Bindungskurven von (-)-Epicatechin (1), (-)-Epicatechin-3-gallat (3), (-)-Epigallocatechin (5) und (-)-Epigallocatechin-3-gallat (7) (2 μ mol/mL, 500 μ L, pH 6,4) mit β -Casein (0,5 nmol/mL – 100 nmol/mL, pH 6,4). Fehlerbalken stellen die Konfidenzintervalle ($P < 0,05$) dar. Bezifferung der Substanzen bezieht sich auf die Strukturen in Abbildung 3.

Mit Hilfe der halbmaximalen Bindungskonzentration konnte die Bedeutung einer Galloyleinheit im Molekül bereits nach Bindungsstudien mit den Flavan-3-olen deutlich demonstriert werden. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass der Einfluss des B-Rings eines galloylierten Flavan-3-olmoleküls auf die Bindungsreaktion vernachlässigbar erscheint, da sich die ermittelten BC_{50} -Werte von beispielsweise (-)-Epicatechin-3-gallat (3)

(dihydroxylierter B-Ring) und von (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**) (trihydroxylierter B-Ring) nicht signifikant unterscheiden. Im Gegensatz dazu verändert sich das Bindungsverhalten der nicht-galloylierten Catechine durch eine zusätzliche OH-Gruppe am B-Ring des Moleküls. Dieses wird beim Betrachten der BC₅₀-Werte für die Substanzen **5** und **6** ersichtlich. Im Vergleich zu **1** und **2** (dihydroxylierter B-Ring) findet bei **5** und **6** (trihydroxylierter B-Ring) eine deutliche Abnahme der ermittelten Werte sowohl für β -Casein (z.B. 36,7 nmol β -Casein/ μ mol **5**) als auch für α -Lactalbumin (24,8 nmol α -Lactalbumin/ μ mol **5**) statt, trotzdem bleibt die Bindungsaktivität der nicht-galloylierten Catechine deutlich geringer im Vergleich zu den galloylierten Substanzen.

Tabelle 11: Übersicht der ermittelten BC₅₀-Werte der Liganden 1-8, 29 und 31-35 mit β -Casein und α -Lactalbumin.

Substanz (Nr.) ^a	BC ₅₀ -Wert [nmol Protein/ μ mol Catechin] ^b	
	β -Casein	α -Lactalbumin
(-)-Epicatechin (1)	79,8 \pm 8,4 ^c	126,8 \pm 7,1 ^c
(-)-Catechin (2)	55,5 \pm 6,3 ^c	50,8 \pm 6,9 ^c
(-)-Epicatechin-3-gallat (3)	9,3 \pm 1,0 ^c	11,6 \pm 0,9 ^c
(-)-Catechin-3-gallat (4)	9,5 \pm 1,4 ^c	13,7 \pm 0,5 ^c
(-)-Epigallocatechin (5)	36,7 \pm 3,2 ^c	24,8 \pm 8,1 ^c
(-)-Galocatechin (6)	35,9 \pm 0,8 ^c	26,8 \pm 0,5 ^c
(-)-Epigallocatechin-3-gallat (7)	8,3 \pm 0,7 ^c	19,0 \pm 1,8 ^c
(-)-Galocatechin-3-gallat (8)	7,9 \pm 0,02 ^c	11,9 \pm 2,5 ^c
Gallussäure (29)	n.b.	n.a.
Pyrogallol (31)	n.b.	n.a.
Methylgallat (32)	57,4 \pm 3,8 ^c	n.a.
Ethylgallat (33)	86,2 \pm 19,9 ^c	n.a.
Propylgallat (34)	63,5 \pm 7,8 ^c	n.a.
Pentagalloylglukose (35)	3,9 \pm 3,0 ^c	9,6 \pm 2,6 ^c

^a Bezifferung der Substanzen bezieht sich auf die Strukturen in Abbildungen 3, 15 und 30. ^b Der BC₅₀-Wert stellt die Konzentration eines Proteins dar, bei der eine halbmaximale Bindung des Liganden vorliegt. ^c Konfidenzintervall (P < 0,05). n.b. = keine Bindung zu beobachten. n.a. = nicht analysiert.

Um weiterführende Einblicke in die Struktur/Wirkungsbeziehungen zu bekommen, wurde das Bindungsverhalten von Pyrogallol (**31**), Gallussäure (**29**), Gallussäureestern (Methyl-, Ethyl- und Propylgallat (**32-34**)) und Pentagalloylglukose (**35**) für das Protein β -Casein näher betrachtet. Die Ergebnisse der Analysen sind ebenfalls in Tabelle 11 aufgeführt. Es konnte festgestellt werden, dass weder Pyrogallol (**31**) noch Gallussäure (**29**) eine Bindung mit dem Protein eingehen. Die Veresterung der Gallussäure (**29**) war hingegen mit einer Zunahme der Bindungsaffinität verbunden. Für die Gallussäureester Methylgallat (**32**), Ethylgallat (**33**) und Propylgallat (**34**) konnten halbmaximale Bindungskonzentrationen in einem Bereich von 57,4 - 86,2 nmol/ μ mol Polyphenol ermittelt werden. Die Verlängerung der Seitenkette von Methyl- über Ethyl- bis hin zu Propylgallat schien jedoch keine Auswirkungen auf die Bindungsaktivität zu haben. Während sich die bestimmten BC_{50} -Werte für Methyl- (**32**) und Propylgallat (**33**) nicht signifikant voneinander unterschieden, zeigte Ethylgallat (**34**) die niedrigste Bindungsaffinität.

Pentagalloylglukose (**35**) zeigte einen sehr geringen BC_{50} -Wert von 3,9 nmol/ μ mol **35** für β -Casein und 9,6 nmol/ μ mol **35** für α -Lactalbumin und somit auch eine höhere Bindungsaktivität im Vergleich zu den galloylierten Flavan-3-ole (**3-4, 7-8**).

2.2.3.2 Einfluss der Proteinstruktur

Um den Einfluss der Proteinstruktur und damit des isoelektrischen Punktes, des Molekulargewichtes und der Aminosäurezusammensetzung auf das Bindungsverhalten von Polyphenolen zu studieren, wurde exemplarisch (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**) mit Milchproteinen (α -, β - und κ -Casein, α -Lactalbumin und β -Lactoglobulin) sowie mit Lysozym-, Mucin- und Pepsin-gebundenen Magnetic Beads inkubiert.

Charakteristische Merkmale der verwendeten Proteine inklusive Molekulargewicht, isoelektrischem Punkt, der Anzahl der Aminosäuren sowie der Aminosäurezusammensetzung sind in Tabelle 12 zusammengefasst. Milchproteine weisen Molekulargewichte zwischen ~ 14 und ~ 24 kDa auf. Sie besitzen zudem isoelektrische Punkte (IEP) in einem Bereich zwischen 4,80 für α -Lactalbumin und 5,93 für κ -Casein. Da das Ausmaß der Größe eines Proteins auf die Bindungsaffinität ebenfalls untersucht werden sollte, wurde das Protein Mucin, welches ein Molekulargewicht von ~ 56 kDa besitzt, und somit etwa doppelt so groß wie β -Casein ist, zur Bindungsreaktion eingesetzt. Sein isoelektrischer Punkt befindet sich im neutralen Bereich ($pH_{IEP} = 7,06$). Um den Einfluss des isoelektrischen Punktes für die Protein/Polyphenol-Wechselwirkung einordnen zu können,

wurden außerdem die Proteine Lysozym mit einem IEP im basischen Bereich bei 9,32 sowie das Pepsin als ein Protein mit einem IEP im Sauren ($\text{pH}_{\text{IEP}} = 3,24$) mit Hilfe der halbmaximalen Bindungskonzentration analysiert.

Tabelle 12: Aminosäurezusammensetzung, die Anzahl der Aminosäuren, Molekulargewichte sowie isoelektrische Punkte verschiedener Proteine.

Amino- säure ^a	Prozentuale Verteilung der Aminosäuren in							
	α - Casein	β - Casein	κ - Casein	α -Lact- albumin	β -Lacto- globulin	Mucin	Lysozym	Pepsin
Ala	4,5	2,4	8,3	2,4	9,3	11,8	9,3	4,9
Arg	3,0	1,9	3,0	0,8	1,9	2,5	8,5	0,6
Asn	4,0	2,4	4,7	6,5	3,1	2,5	10,9	4,0
Asp	3,5	1,9	2,4	10,6	6,2	2,2	5,4	8,9
Cys	0,0	0,0	1,2	6,5	3,1	0,7	6,2	1,8
Gln	7,0	9,6	8,9	4,9	5,6	2,7	2,3	4,0
Glu	12,6	9,1	7,1	5,7	9,9	2,3	1,6	4,0
Gly	4,5	2,4	1,2	4,9	2,5	7,3	9,3	10,7
His	2,5	2,4	1,8	2,4	1,2	3,0	0,8	0,3
Ile	5,5	4,8	7,1	6,5	6,2	2,3	4,7	7,7
Leu	8,5	10,5	4,7	10,6	13,6	5,6	6,2	8,0
Lys	7,0	5,3	5,3	9,8	9,3	1,8	4,7	0,3
Met	2,5	2,9	1,2	0,8	2,5	0,9	1,6	1,2
Phe	4,0	4,3	2,4	3,3	2,5	1,6	2,3	4,3
Pro	8,5	16,7	11,8	1,6	4,9	13,6	1,6	4,6
Ser	8,0	7,7	7,7	5,7	4,3	20,6	7,8	13,5
Thr	2,5	4,3	8,9	5,7	4,9	11,3	5,4	8,0
Trp	1,0	0,5	0,6	3,3	1,2	0,7	4,7	1,5
Tyr	5,0	1,9	5,3	3,3	2,5	2,3	2,3	4,9
Val	5,5	9,1	6,5	4,9	5,6	4,1	4,7	6,7
AS- Anzahl ^b	199	209	169	123	162	558	129	326
MG ^c	22974,8	23583,2	18974,4	14186,0	18281,2	55709,8	14313,1	34509,8
IEP ^d	4,91	5,13	5,93	4,80	4,83	7,06	9,32	3,24

^a ExPASy Proteindatenbank. ^b AS = Aminosäure. ^c Molekulargewicht in Da. ^d Isoelektrischer Punkt.

Die verwendeten Proteinkonzentrationen befanden sich in einem Bereich zwischen 0,5 nmol/mL und 100 nmol/mL. Nach Inkubation und anschließender magnetischer Abtrennung wurde der Überstand der Lösung mittels HPLC-DAD-Analyse untersucht. Als Referenz diente eine mit Phosphatpuffer verdünnte Lösung von **7**. Die Menge an gebundenem Liganden wurde schließlich aus der Differenz der Konzentration der Kontrollprobe und der in Lösung verbleibenden freien Menge des Liganden bestimmt.

Nach Erfassung der Bindungskurven für alle verwendeten Proteine konnte die halbmaximale Bindungskonzentration (BC₅₀-Wert) des Liganden bestimmt werden (Tabelle 13). Die ermittelten BC₅₀-Werte für (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**) mit den acht verschiedenen Proteinen liegen hierbei in einem Bereich zwischen 7,3 und 19,0 nmol Protein/μmol **7**. Die höchste Bindungsaktivität zeigt (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**) mit den Proteinen Mucin und β-Casein, während für die Proteine κ-Casein und α-Lactalbumin die niedrigste Bindungsaffinität und somit die höchsten BC₅₀-Werte ermittelt werden konnten.

Tabelle 13: BC₅₀-Werte für die Bindungen von (-)-Epigallocatechin-3-gallat (7**) mit ausgewählten Proteinen.**

Proteine	BC₅₀-Wert^a [nmol Protein/μmol 7 ^b]
Mucin	7,3 ± 0,2 ^c
β-Casein	8,3 ± 0,7 ^c
Pepsin	11,1 ± 1,0 ^c
Lysozym	11,6 ± 1,0 ^c
β-Lactoglobulin	12,1 ± 3,3 ^c
α-Casein	14,1 ± 1,3 ^c
κ-Casein	18,2 ± 0,6 ^c
α-Lactalbumin	19,0 ± 1,9 ^c

^a Der BC₅₀-Wert stellt die Konzentration eines Proteins dar, bei der eine halbmaximale Bindung des Liganden vorliegt.

^b Bezifferung der Substanz bezieht sich auf die Strukturen in Abbildung 3. ^c Konfidenzintervall (p < 0,05).

Abbildung 32 korreliert die ermittelten BC₅₀-Werte sowie Gehalte der Aminosäuren Prolin, Arginin, Histidin, Asparaginsäure und Glutaminsäure, welche gemäß Literatur Einflussgrößen für die Bindungsreaktion darstellen sollen (HAGERMAN und BUTLER, 1981, YAN und

BENNICK, 1995, SIEBERT et al., 1996, BAXTER et al., 1997, CHARLTON et al., 2002a, JÖBSTL et al., 2004b).

Mucin zeigte im Vergleich zu allen anderen untersuchten Proteinen die höchste Bindungsaffinität für das Flavan-3-ol. Es wurde jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen Mucin und β -Casein ermittelt. Auch zwischen Pepsin (11,1 nmol), Lysozym (11,6 nmol) und β -Lactoglobulin (12,6 nmol) konnte kein Unterschied in der Bindungsaktivität anhand der BC_{50} -Werte festgestellt werden. Zudem zeigten β -Lactoglobulin und α -Casein und schließlich auch κ -Casein und α -Lactalbumin keine detektierbaren Unterschiede bezüglich der Bindungsaffinität mit (-)-Epigallocatechin-3-gallat (7). Für die Bindungsaffinität von 7 mit den verwendeten Proteinen ergab sich folgende Reihenfolge: Mucin ($pH_{IEP} = 7,06$) \approx β -Casein ($pH_{IEP} = 5,13$) $>$ Lysozym ($pH_{IEP} = 9,32$) \approx Pepsin ($pH_{IEP} = 3,24$) \approx β -Lactoglobulin ($pH_{IEP} = 4,83$) $>$ α -Casein ($pH_{IEP} = 4,91$) $>$ κ -Casein ($pH_{IEP} = 5,93$) \approx α -Lactalbumin ($pH_{IEP} = 4,80$).

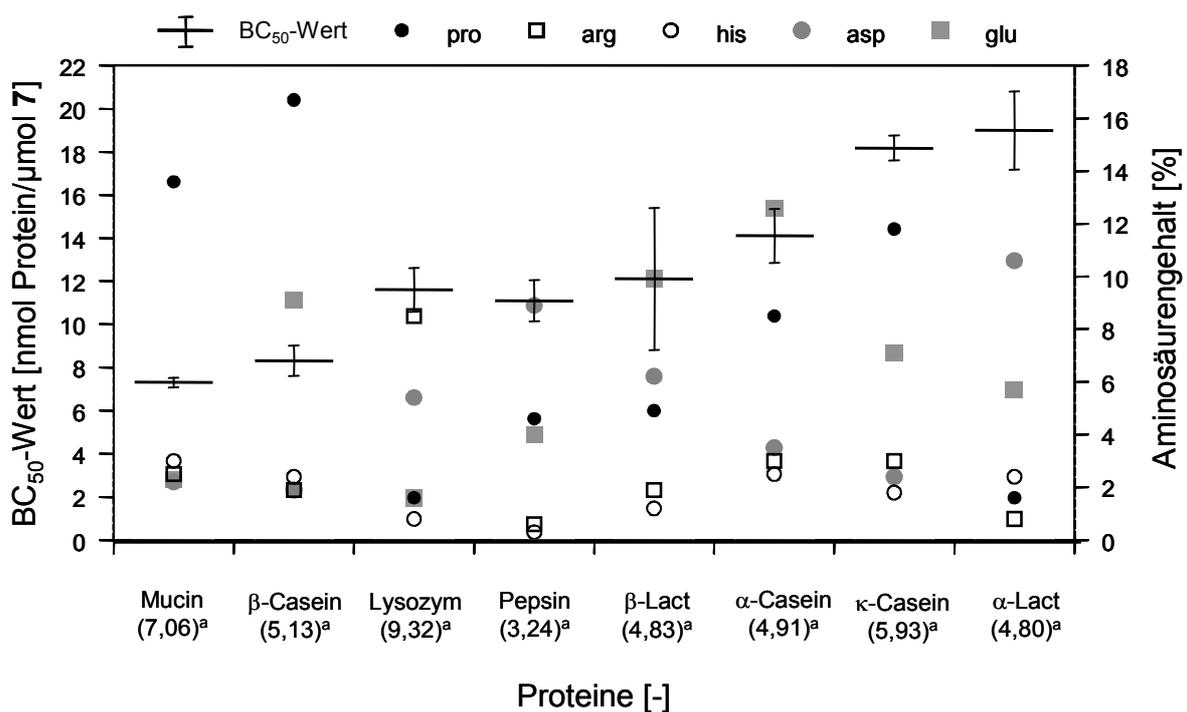


Abbildung 32: Einfluss der verschiedenen Proteine auf die Bindungsaktivität von (-)-Epigallocatechin-3-gallat (7). ^a isoelektrische Punkte der Proteine (Proteindatenbank: ExPASy, 2010). Pro = Prolin, Arg = Arginin, His = Histidin, Asp = Asparaginsäure, Glu = Glutaminsäure, β -Lact = β -Lactoglobulin, α -Lact = α -Lactalbumin. Fehlerbalken stellen die Konfidenzintervalle dar ($P < 0,05$). Bezifferung der Substanz bezieht sich auf die Strukturen in Abbildung 3.

Die erzielten Ergebnisse zeigten keine Korrelation zwischen den ermittelten BC_{50} -Werten und den in der Abbildung 32 hervorgehobenen Gehalten an Aminosäuren wie Prolin, Arginin, Histidin, Asparaginsäure oder Glutaminsäure. Zwar haben die Proteine Mucin und β -Casein hohe Prolingehalte, jedoch besitzt auch κ -Casein einen hohen Prolingehalt, aber keine hohe Bindungsaffinität. Auch zeigen die Proteine Pepsin, Lysozym und β -Lactoglobulin keine signifikante Abweichung in den ermittelten BC_{50} -Werten, ihre Prolingehalte unterscheiden sich dagegen sehr stark von einander. Es zeigte sich auch keine Korrelation zwischen dem isoelektrischen Punkt eines Proteins und der Bindungsaffinität dieser Proteine. So hat zum Beispiel Pepsin einen isoelektrischen Punkt von 3,24, während Lysozym einen isoelektrischen Punkt von 9,32 aufweist. Die Experimente zeigen jedoch für beide Proteine einen BC_{50} -Wert von ~ 12 nmol Protein/ μ mol 7.

Diese Daten machen deutlich, dass die Protein/Polyphenol-Komplexierung stärker durch die Struktur des Polyphenols als durch das Protein bestimmt wird.

2.2.3.3 NMR-Spektroskopische Untersuchung der Bindungsstellen von (-)-Epigallocatechin-3-gallat (7)

Um mögliche Bindungsstellen eines Flavan-3-ols bei Interaktion mit einem Protein ermitteln zu können, wurde die Bestimmung mittels STD (Saturation Transfer Difference) NMR gewählt.

Die Methoden der Kernresonanzspektroskopie (NMR) machen Beobachtungen und Charakterisierungen der Wechselwirkungen zwischen biologischen Makromolekülen und ihren natürlichen oder auch synthetischen Liganden möglich (MAYER und MEYER, 1999, 2001, MAURER, 2005, CLAASEN et al., 2005). Es gibt hierbei zwei mögliche Herangehensweisen, entweder werden die Signale der meist niedermolekularen Liganden beobachtet oder der Fokus der Untersuchung liegt auf der Seite der höhermolekularen Proteine (MAURER, 2005). Eine neue und schnelle Methode postulierten MAYER und MEYER (1999, 2001) mit der sogenannten Saturation Transfer Difference (STD) NMR. Diese Methode ermöglicht es bei Mischungen von potentiellen Liganden mit Proteinen, bereits bei Proteinkonzentrationen kleiner 1 nmol mit Hilfe von 1D und 2D NMR-Spektren ausschließlich die Signale des zu messenden Moleküls zu beobachten, welche eine Bindungsaffinität besitzen. Die Messung der Signale kann direkt in der Mischung des Liganden mit dem höhermolekularen Bindungspartner, wie zum Beispiel einem Protein, erfolgen. Besonders im Bereich der pharmazeutischen Forschung findet diese Methodik ihre

Anwendung (MAURER, 2005). MAURER (2005) präsentiert unter anderem am Beispiel von Humanserumalbumin (HSA) mit Glukose und Benzoesäure nach Aufnahme eines STD-¹H-NMR Spektrums, dass nur die Signale der Benzoesäure im Differenzspektrum zu sehen sind und somit lediglich Benzoesäure mit HSA interagiert, jedoch nicht die Glukose. Das Ergebnis eines solchen Experimentes zeigt nicht nur die Bindung sondern auch, anhand der Protonensignale des Moleküls, die genauen Bindungsstellen des jeweiligen Liganden.

Zur Durchführung der Bindungsstudien von (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**) und β -Casein mit Hilfe von STD-NMR Spektroskopie wurde eine Lösung von (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**) (5 μ mol/L) in Phosphatpuffer (0,1 mol/L Na₂HPO₄ in D₂O, pD 6) hergestellt. Verschiedene Mengen β -Casein wurden im Phosphatpuffer gelöst und zu der (-)-Epigallocatechin-3-gallatlösung (**7**) gegeben. 600 μ L der so hergestellten Lösungen sowie eine (-)-Epigallocatechin-3-gallatlösung als Referenz wurden in NMR Röhren überführt und am Bruker DRX 400-MHz Spektrometer bei 300 K gemessen.

Abbildung 33 zeigt das ¹H NMR Referenzspektrum von (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**) (B), das STD-NMR Spektrum von **7** nach Addition von 1 mg/mL β -Casein (C) sowie das Differenzspektrum von (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**) nach Zugabe von 1 mg/mL β -Casein (A).

Das Differenzspektrum von (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**) in Abbildung 33A macht deutlich, dass bei der Wechselwirkung mit dem Protein β -Casein nur die Protonen des B-Rings (H-C(2',6')) und des D-Rings (H-C(2'',6'')) des untersuchten Moleküls an der Bindung beteiligt sind.

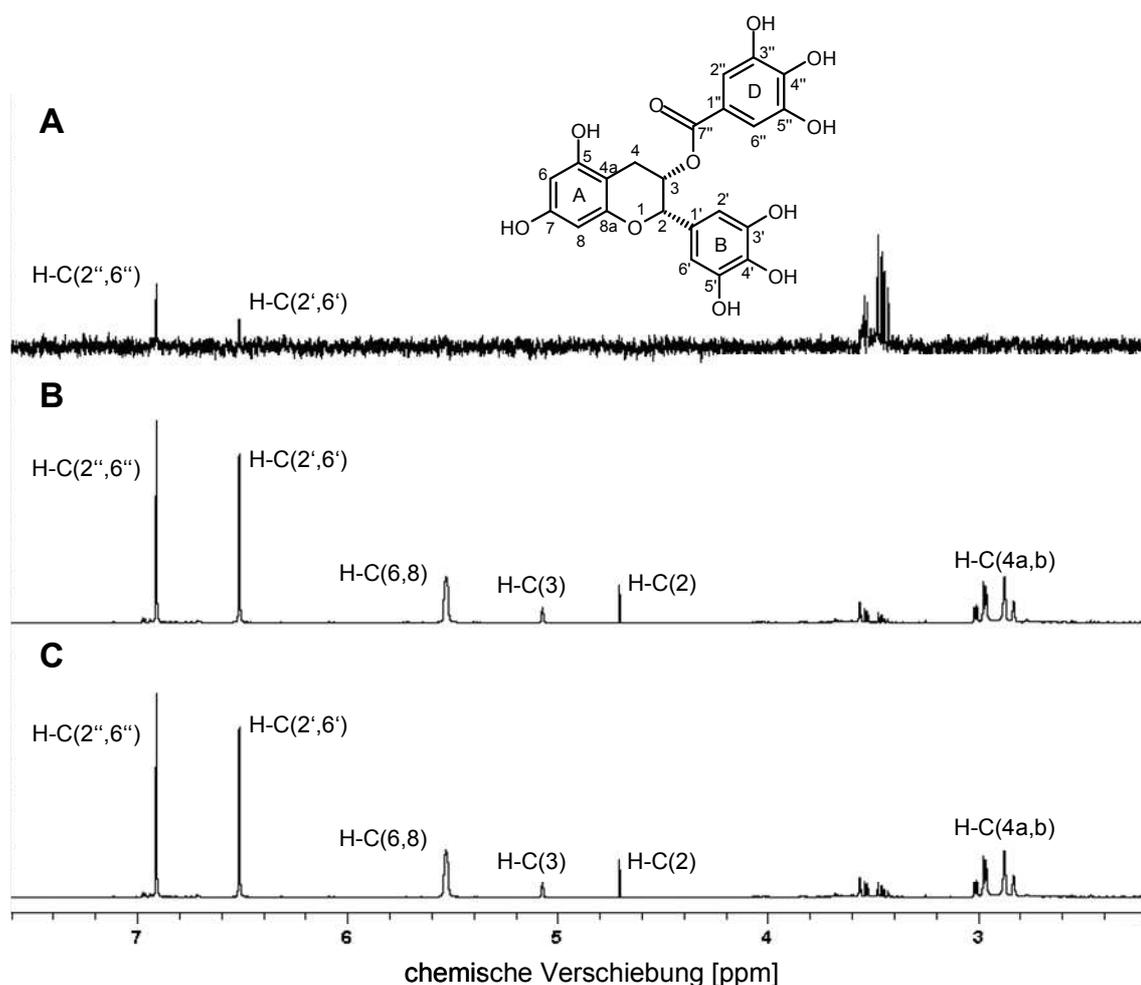


Abbildung 33: STD-NMR Experiment und Strukturformel des (-)-Epigallocatechin-3-gallates (**7**) mit β -Casein bei pH 6. A: Differenzspektrum von **7** und β -Casein. B: Referenz ^1H NMR Spektrum von **7**. C: STD-NMR Spektrum von **7** mit β -Casein.

Dieses Experiment erklärt somit auch die hohe Bindungsaffinität der galloylierten Flavan-3-ole **3-4**, **7-8** gegenüber β -Casein. Sie interagieren sowohl über den B- als auch über den D-Ring des Moleküls mit den Proteinen. Das Fehlen des D-Rings bei nicht-galloylierten Flavan-3-ole **1** und **2** begründet die geringe Bindungsaktivität dieser Substanzen. Das Wechselwirken der phenolischen Verbindungen **1** und **2** erfolgt nur schwach über den dihydroxylierten B-Ring der Moleküle. Die nicht-galloylierten Flavan-3-ole **5** und **6**, welche ebenfalls über keine Veresterung an Position 3 verfügen, zeigen jedoch durch die Interaktion der trihydroxylierten B-Ringe eine mittlere Bindungsaffinität, die sich zwischen denen der galloylierten Verbindungen und der Bindungsaffinität der nicht-galloylierten Substanzen **1** und **2** einordnen

lässt. Der dihydroxylierte A-Ring, das gemeinsame Strukturelement dieser Substanzklasse, hat keinen Einfluss auf die Bindungsaffinität der untersuchten Flavan-3-ole (**1-8**).

2.2.3.4 Diskussion

Um die Struktur/Wirkungszusammenhänge während einer Protein/Polyphenol-Interaktion zu beobachten und zu charakterisieren, wurde der Einfluss der Polyphenolstruktur zusammen mit dem Einfluss der Proteinstruktur analysiert.

Zur Bestimmung der Bindungsaffinität ausgewählter Substanzen wurden Bindungsstudien mit Hilfe der Magnetic Beads und variierender Proteinkonzentration durchgeführt. Die Berechnung der sogenannten halbmaximalen Bindungskonzentration (BC_{50} -Wert) ermöglichte es hierbei die Bindungsaffinität der unterschiedlichen Liganden anhand der ermittelten BC_{50} -Werte zu bewerten und untereinander zu vergleichen. Durch Kombination der halbmaximalen Bindungskonzentration und der Durchführung der STD- 1H -NMR Experimente konnte zudem die Charakterisierung der für die Protein/Polyphenol-Interaktion entscheidenden Strukturelemente auf Seite des Liganden erfolgreich ergänzt werden. Um die Rolle der Proteinstruktur in der Bindungsreaktion zu beleuchten, wurde exemplarisch das Bindungsverhalten von (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**) mit den Milchproteinen α -, β - und κ -Casein, α -Lactalbumin und β -Lactoglobulin sowie mit Lysozym, Mucin und Pepsin untersucht. Hier lag der Fokus auf den charakteristischen Merkmalen der Proteine wie dem isoelektrischen Punkt, dem Molekulargewicht und der Aminosäurezusammensetzung.

Die Untersuchung verschiedenster Liganden wie der galloylierten Catechine (-)-Epicatechin-3-gallat (**3**), (-)-Catechin-3-gallat (**4**), (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**), (-)-Gallocatechin-3-gallat (**8**), der nicht-galloylierten Catechine (-)-Epicatechin (**1**), (-)-Catechin (**2**), (-)-Epigallocatechin (**5**), (-)-Gallocatechin (**6**) sowie weiterer strukturverwandter Moleküle wie Gallussäure (**29**), Gallussäureester (**32-34**), Pyrogallol (**30**) und Pentagalloylglukose (**35**) mit Milchproteinen demonstrierte die Bedeutung mindestens einer Galloyleinheit des Liganden. Es konnte beobachtet werden, dass galloylierte Flavan-3-ole eine höhere Bindungsaffinität im Vergleich zu nicht-galloylierten Catechinen aufwiesen. Auch zeigte Pentagalloylglukose (**35**) eine höhere Bindungsaktivität verglichen mit den galloylierten Flavan-3-olen (**3-4, 7-8**). Zudem wurde ersichtlich, dass der Einfluss des Hydroxylierungsgrades des B-Rings auf die Bindungsreaktion eines galloylierten Flavan-3-olmoleküls vernachlässigbar erscheint, da sich die ermittelten BC_{50} -Werte für beispielsweise (-)-Epicatechin-3-gallat (**3**, dihydroxylierter B-Ring) und für (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**,

trihydroxylierter B-Ring) nicht signifikant unterschieden. Im Gegensatz dazu veränderte sich das Bindungsverhalten der nicht-galloylierten Catechine (**5-6**) durch eine zusätzliche OH-Gruppe am B-Ring des Moleküls. Für Pyrogallol (**31**) und Gallussäure (**29**) konnte keine Bindung mit β -Casein bestimmt werden. Die Veresterung der Gallussäure (**29**), im Falle von Methyl-, Ethyl- und Propylgallat (**32-34**), war hingegen mit einer Zunahme der Bindungsaffinität verbunden. Die Verlängerung der Seitenkette von Methyl- über Ethyl- bis hin zu Propylgallat schien jedoch keine Auswirkungen auf die Bindungsaktivität zu haben.

Das Differenzspektrum der NMR-spektroskopischen Untersuchung von (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**) mit β -Casein machte deutlich, dass bei der Wechselwirkung mit dem Protein nur die Protonen des B- und des D-Rings an der Bindung beteiligt sind. Das durchgeführte STD-NMR Experiment erklärt somit die hohe Bindungsaffinität der galloylierten Flavan-3-ole (**3-4, 7-8**) im Vergleich zu der geringen Bindungsaktivität der nicht-galloylierten Flavan-3-ole (**1-2**).

Die durchgeführten Bindungsexperimente von (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**) mit Milchproteinen, Mucin, Lysozym und Pepsin zeigten keine Korrelation zwischen den ermittelten BC_{50} -Werten und den Gehalten an Aminosäuren wie Prolin, Arginin, Histidin, Asparaginsäure oder Glutaminsäure, welche gemäß Literatur Einflussgrößen für die Bindungsreaktion darstellen sollen. Zwar haben die Proteine Mucin und β -Casein hohe Prolingehalte, jedoch besitzt auch κ -Casein einen hohen Prolingehalt, aber keine hohe Bindungsaffinität. Auch zeigten die Proteine Pepsin, Lysozym und β -Lactoglobulin keine signifikante Abweichung in den ermittelten BC_{50} -Werten, ihre Prolingehalte unterscheiden sich dagegen sehr stark von einander. Es zeigte sich auch keine Korrelation zwischen dem isoelektrischen Punkt und dem Molekulargewicht eines Proteins und der Bindungsaffinität dieser Proteine.

Die Ergebnisse der Bindungsstudien mit verschiedenen Liganden mit demselben Protein finden zum Teil Übereinstimmung mit der Literatur. So postulierten CHARLTON et al. (2002a), dass der A- und der D-Ring eines Catechinmoleküls eine wichtige Rolle in der Bindungsreaktion von Polyphenolen und prolinreichen Proteinen einnehmen. Die durchgeführten Bindungsexperimente bestätigen den Einfluss des D-Rings (Galloylgruppe), jedoch konnte die Bedeutung des A-Rings nicht verifiziert werden. Auch SCHWARZ und HOFMANN gelang es 2008 zu demonstrieren, dass galloylierte Polyphenole im Gegensatz zu nicht-galloylierten Catechinen eine erhöhte Affinität zu prolinreichen Speichelproteinen

haben. Ebenfalls im Einklang mit der veröffentlichten Literatur zeigte Pentagalloylglukose (**35**) eine erhöhte Bindungsaffinität gegenüber β -Casein (SPENCER et al., 1988).

Eine Mehrzahl der publizierten Bindungsstudien schreibt der Aminosäure Prolin eine besondere Beachtung zu. Bereits 1981 veröffentlichten HAGERMAN und BUTLER Untersuchungen darüber, dass prolinreiche Proteine eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber Tanninen aufweisen. Die hohe Bindungsaffinität der prolinreichen Proteine liegt in der Unterbrechung der regulären Sekundärstruktur. Bedingt durch diese Unterbrechung sind sowohl die Carbonylfunktion von Prolin als auch benachbarten Aminosäuren besonders gut für Liganden zugänglich, so dass eine Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen ermöglicht wird. Bindungsexperimente von BAXTER et al. (1997) und LUCK et al. (1994) unterstützen diese Aussage bei der Aminosäuren in direkter Nachbarschaft zu Prolin ebenfalls eine wichtige Rolle in der Protein/Polyphenol-Interaktion einnehmen. Zusätzlich zu Prolin konnten CHARLTON et al. (2002a, 2002b) zudem Wechselwirkungen mit Arginin und Phenylalanin beobachten. YAN und BENNICK (1995) postulierten hingegen Interaktionen zwischen Tanninen und histidinreichen Speichelproteinen, welche reich an basischen Aminosäuren sind, jedoch kein Prolin enthalten.

Deutlich wurde hier in erster Linie, dass der Einfluss des Liganden eine entscheidendere Rolle in der Bindungsreaktion einnimmt. Da der Einfluss der Bindungsaktivität der Proteine von zu vielen Parametern wie den Gehalten der verschiedenen Aminosäuren, der Aminosäuresequenz (Primärstruktur der Proteine) sowie der Sekundärstruktur abhängt, wurden im Folgenden Modellbindungsstudien mit Polyaminosäuren, welche aus lediglich einer Aminosäure bestehen (Homopolymere), durchgeführt.

2.2.4 Einfluss der Struktur von Polyaminosäuren auf die Bindung ausgewählter Polyphenole

Um gezielt den Einfluss der Aminosäureseitenketten auf die Bindungsaktivität von Proteinen für Polyphenole zu beleuchten und die Beteiligung von hydrophoben, ionischen bzw. von Wasserstoffbrückenbindungen bei Protein/Polyphenol-Interaktionen zu studieren, wurden im Folgenden Polyamid sowie neutrale (Polyglycin, Polyalanin, Polyprolin), saure (Polyasparaginsäure) und basische (Polyarginin, Polyhistidin) Polyaminosäuren für Bindungsexperimente eingesetzt. Zum Vergleich wurde β -Casein als schwach saures ($\text{pH}_{\text{IEP}} = 5,13$) und Protamin als basisches Referenzprotein ($\text{pH}_{\text{IEP}} = 13,3$) mitgeführt. Bei Protamin handelt es sich um ein basisches 5 kDa-Peptid bestehend zu 65,6 % aus Arginin (PROTEINDATENBANK: EXPASY, 2010). Als Polyphenole kamen (-)-Epicatechin (**1**), (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**), Gallussäure (**29**) und Gallussäuremethylester (**32**) zum Einsatz.

2.2.4.1 Bindungsstudien mit Modellproteinen (Polyaminosäuren), β -Casein, Protamin und Polyamid

Zur Bestimmung der Bindungsaktivität wurden Gallussäure (**29**), Methylgallat (**32**), (-)-Epicatechin (**1**) und (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**) mit unterschiedlichen Mengen der Modellproteine inkubiert. Dazu wurden 1 mg, 2 mg, 5 mg und 10 mg der Polyaminosäuren Polyalanin, Polyglycin, Polyprolin, Polyarginin, Polyhistidin, Polyasparaginsäure, der Peptide Protamin und Polyamid sowie β -Casein zu Phosphatpufferlösung (500 μL , pH 6,4) dazugegeben und mit Lösungen der vier Liganden (**1**, **7**, **29**, **32**, je 500 μL , 2 $\mu\text{mol/mL}$, pH 6,4) vermischt. Nach Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur wurden die Lösungen in Ultrafiltrationseinheiten überführt und bei 12000 U/min bei Raumtemperatur für 15 min zentrifugiert. Das Filtrat der Lösung wurde anschließend direkt mittels HPLC-DAD untersucht. Als Referenz diente eine Polyphenollösung, welche entsprechend verdünnt und ultrafiltriert wurde. Die Menge an gebundenem Liganden wurde aus der Differenz der Konzentration der Kontrollprobe und der im Filtrat verbleibenden freien Menge des jeweiligen Liganden bestimmt.

Die vollständigen Ergebnisse der Experimente mit allen eingesetzten Konzentrationen (1 mg, 2 mg, 5 mg und 10 mg/mL) der Polyaminosäuren, der Peptide und des β -Caseins zeigt Tabelle A4 (s. Anhang) sowie Abbildung 34.

Die phenolischen Substanzen Gallussäure (**29**) und Methylgallat (**32**) zeigten für das Milchprotein β -Casein keine Bindungsaffinität. Während für (-)-Epicatechin (**1**) eine schwache Bindung beobachtet werden konnte, lag (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**) bereits nach Zugabe von 2 mg/mL des Proteins zu ca. 85 % gebunden vor (Abbildung 34A).

Das basische Peptid Protamin interagiert mit (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**), Gallussäure (**29**) und dem Gallussäureester Methylgallat (**32**). Für die getesteten Konzentrationen zeigte (-)-Epicatechin (**1**) dagegen keine erkennbare Bindung mit Protamin (Abbildung 34B). Die höchste Bindungsaffinität wies (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**) auf. Bereits nach Zugabe von 1 mg/mL Protamin konnten lediglich 10 % des freien Liganden im Filtrat detektiert werden und nach Addition der zehnfachen Menge des Peptids lagen ca. 96 % von **7** in gebundener Form vor. Mit zunehmender Menge an Protamin konnte eine erhöhte Bindungsaffinität der Substanzen **29** und **32** beobachtet werden. Dabei wiesen Gallussäure (**29**) und Methylgallat (**32**) ein vergleichbares Bindungsverhalten auf. Nach Zugabe von 10 mg/mL Protamin konnten etwa 40 % der Liganden **29** und **32** als gebunden detektiert werden. Entsprechend dem Protamin, das zu 65,5 % aus Arginin besteht (PROTEINDATENBANK: EXPASY, 2010), konnten für das Polypeptid Polyarginin vergleichbare Ergebnisse mit **1**, **7**, **29** und **32** erhalten werden (Abbildung 34H).

Die Ergebnisse der Bindungsstudien der phenolischen Verbindungen **1**, **7**, **29** und **32** mit Polyamid zeigten, dass nur Gallussäure (**29**) keine Interaktion mit dem Peptid einging (Abbildung 34C). Die Veresterung der Gallussäure (**29**), hier gezeigt am Beispiel von Methylgallat (**32**), führte zur Erhöhung der Bindungsaffinität. (-)-Epicatechin (**1**) und (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**) zeigten ein vergleichbares Bindungsverhalten. Nach Addition von 10 mg/mL Polyamid wurden im Filtrat 23 % an freiem (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**) bestimmt. Nach Zugabe der gleichen Menge des Peptids zu **1** wurden 28 % des freien (-)-Epicatechins (**1**) im Filtrat nachgewiesen.

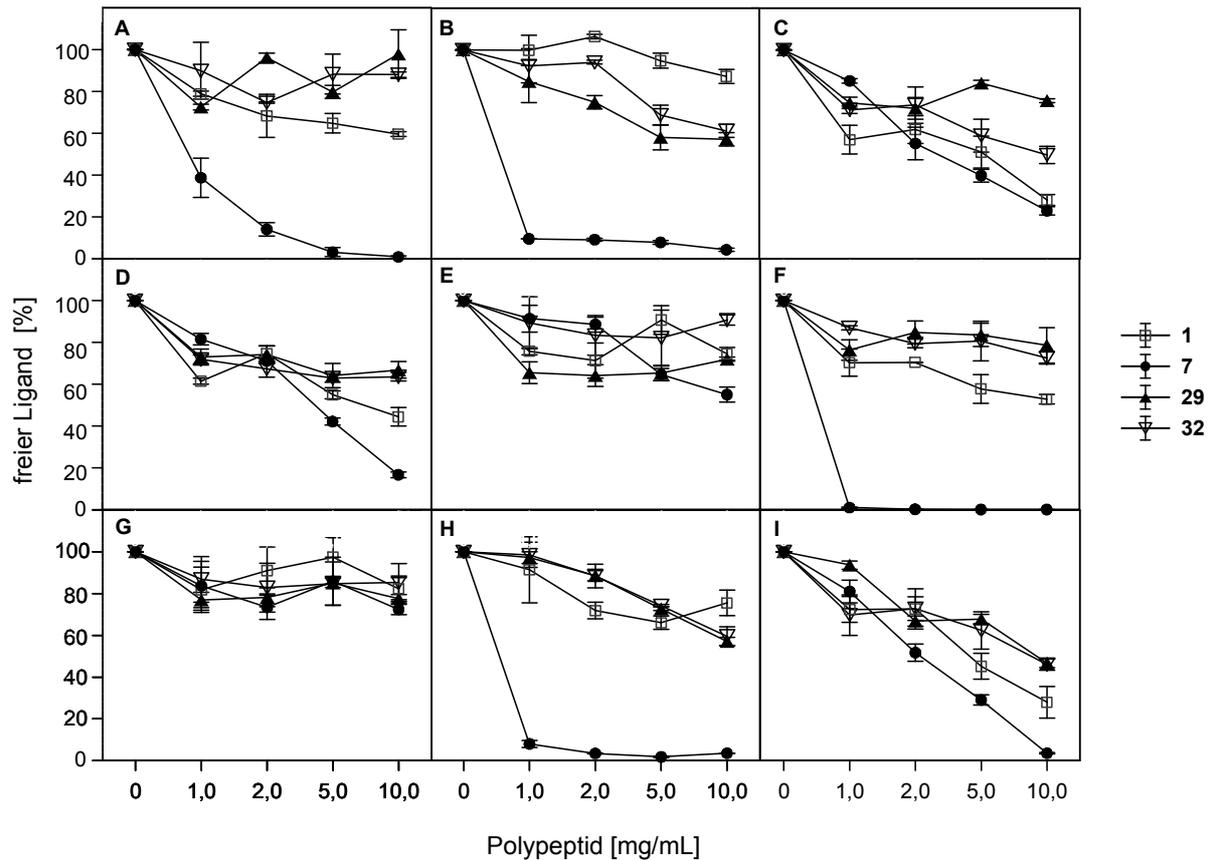


Abbildung 34: Einfluss unterschiedlicher Mengen (0, 1,0, 2,0, 5,0 und 10 mg/mL, pH 6,4) an β -Casein (A), Protamin (B), Polyamid (C), Polyglycin (D), Polyalanin (E), Polyprolin (F), Polyasparaginsäure (G), Polyarginin (H) und Polyhistidin (I) auf die Bindungsaffinität von (-)-Epicatechin (1), (-)-Epigallocatechin-3-gallat (7), Gallussäure (29) und Methylgallat (32) (je 2 μ mol/mL, pH 6,4). Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Bezifferung der Substanzen bezieht sich auf die Strukturen in Abbildungen 3, 15 und 30.

Für die neutralen Polypeptide Polyglycin (Abbildung 34D), Polyalanin (Abbildung 34E) und Polyprolin (Abbildung 34F) konnte für die beiden Phenole 29 und 32 keine Bindungsaffinität beobachtet werden. Auch (-)-Epicatechin (1) zeigte keinerlei Bindungsaktivität mit Polyalanin. Die beiden Polyaminosäuren Polyglycin und Polyprolin zeigten ein vergleichbares Bindungsverhalten mit (-)-Epicatechin (1). Bei Zusatz von jeweils 10 mg/mL der beiden Polypeptide konnten im Filtrat noch etwa 50 % des freien Liganden 1 nachgewiesen werden. Im Vergleich zu anderen Liganden zeigte (-)-Epigallocatechin-3-gallat (7) die höchste Bindungsaktivität. Bereits bei Zugabe von geringen Mengen an Polyprolin zu (-)-Epigallocatechin-3-gallat (7) lag dieser Ligand komplett gebunden vor, im Filtrat konnte kein freies (-)-Epigallocatechin-3-gallat (7) mehr bestimmt werden. Beim Vergleich der drei

neutralen Polypeptide zeigte Polyglycin die schwächste Bindungsaffinität mit (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**).

Für das saure Polypeptid Polyasparaginsäure konnte für keinen der Liganden **1**, **7**, **29**, **32** eine Bindung beobachtet werden (Abbildung 34G).

Als eine basische Polyaminosäure zeigte Polyhistidin in der durchgeführten Modellreaktion eine hohe Bindungsaffinität zu den vier Liganden (**1**, **7**, **29**, **32**), sogar zu (-)-Epicatechin (**1**) (Abbildung 34I). Nach Inkubation mit 10 mg/mL Polyhistidin konnten lediglich 28 % des freien (-)-Epicatechins (**1**) im Filtrat nachgewiesen werden. Der Verlauf der Bindungsreaktion von Polyhistidin mit (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**) unterschied sich vom Verlauf der Interaktion von **7** mit der basischen Polyaminosäure Polyarginin (Abbildung 34H). Mit steigender Menge an Polyhistidin, nahm der freie Gehalt an (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**) deutlich ab, während die Bindungsreaktion von **7** mit Polyarginin sowie mit Protamin bereits bei geringen Konzentrationen eine Sättigung erreichte.

Die Bedeutung basischer Polyaminosäuren auf die Bindungsaffinität von (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**) wurde anhand von Protamin genauer betrachtet.

Zur Bestimmung der Bindungsaktivität wurde (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**) (2 µmol/mL, pH 6,4) mit unterschiedlichen Mengen Protamin (0,005 – 10,0 mg/mL, pH 6,4) inkubiert. Die Untersuchung mittels HPLC-DAD erfolgte nach Inkubation (10 min) und Ultrafiltration (12000 U/min, RT, 15 min). Als Referenz diente eine Lösung von **7**, welche vor der HPLC-Analyse analog ultrafiltriert wurde. Die Bestimmung der gebundenen Menge des (-)-Epigallocatechin-3-gallats (**7**) erfolgte aus der Differenz der Menge der Referenz und der im Filtrat detektierten verbleibenden freien Menge von **7**.

Lediglich bei Zugabe sehr geringer Mengen Protamin (0,005 und 0,02 mg/mL) konnte keine Bindung mit (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**) beobachtet werden. Bereits nach Addition von 0,2 mg/mL gelang es nur 40 % des freien Liganden im Filtrat zu detektieren. Ab einer Menge von 1 mg/mL konnte keine weitere Abnahme der Konzentration des freien (-)-Epigallocatechin-3-gallats (**7**) festgestellt werden (Abbildung 35A).

Um die Bedeutung der ionischen Bindungen von Polyphenolen mit Proteinen zu studieren, wurden pH-abhängige Bindungsstudien mit (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**) und dem basischen Peptid Protamin mittels Ultrafiltration mit anschließender HPLC-DAD-Analyse durchgeführt. Hierzu wurden Phosphatpufferlösungen verschiedener pH-Werten (pH 2, 4, 6, 8 und 10) hergestellt. Die (-)-Epigallocatechin-3-gallatlösung (2 µmol/mL) wurde mit 5 mg/mL Protamin bei zuvor beschriebenen pH-Werten inkubiert. Nach Inkubation (10 min) und

Zentrifugation (15 min, RT, 12000 U/min) wurde das Filtrat der Lösung direkt im Anschluss mittels HPLC-DAD untersucht. Als Referenz diente hierbei eine Lösung von **7** verdünnt mit Phosphatpuffer des jeweiligen pH-Wertes und nach vorheriger Ultrafiltration.

Die Ergebnisse zeigten eine geringere Bindungsaffinität von (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**) im Sauren (pH 2 und 4). Die Affinität nahm mit steigendem pH-Wert zu und erreichte ihr Maximum bei pH 6 (Abbildung 35B).

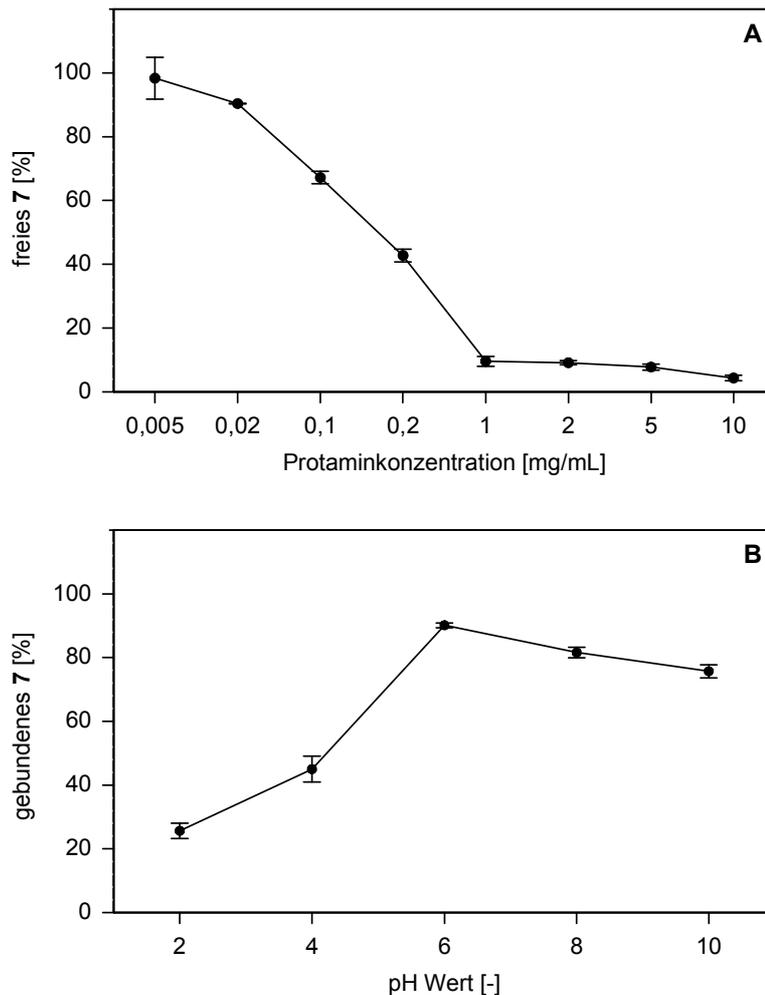


Abbildung 35: Einfluss verschiedener Protaminkonzentrationen auf die Bindungsaktivität von (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**) (A) und Einfluss des pH-Wertes auf die Bindungsaffinität von (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**) mit Protamin (5 mg/mL, B). Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Bezifferung der Substanz bezieht sich auf die Strukturen in Abbildung 3.

2.2.4.2 Diskussion

Der Einfluss der Aminosäureseitenkette auf die Bindungsaktivität von Proteinen für Polyphenole sowie die Beteiligung von hydrophoben, ionischen Wechselwirkungen bzw. von Wasserstoffbrückenbindungen bei der Protein/Polyphenol-Interaktion wurde mit Hilfe von Polyamid, neutralen (Polyglycin, Polyalanin, Polyprolin), sauren (Polyasparaginsäure) und basischen (Polyarginin, Polyhistidin) Polyaminosäuren untersucht. Zum Vergleich wurden auch β -Casein als schwach saures und Protamin als basisches Referenzprotein mitgeführt. Als Polyphenole kamen (-)-Epicatechin (**1**), (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**), Gallussäure (**29**) und Methylgallat (**32**) zum Einsatz.

Die phenolischen Substanzen Gallussäure (**29**) und Methylgallat (**32**) zeigten ein vergleichbares Bindungsverhalten mit allen verwendeten Polypeptiden. Eine Ausnahme stellte hingegen Polyamid dar, da Gallussäure (**29**) keine Bindung mit diesem einging. Beide Phenole zeigten keine Bindungsaffinität zu sauren/neutralen Polypeptiden (β -Casein, Polyasparaginsäure, Polyglycin, Polyalanin bzw. Polyprolin), wohl jedoch mit den basischen Polypeptiden (Polyhistidin, Polyarginin und Protamin). (-)-Epicatechin (**1**) zeigte die stärkste Bindung mit Polyhistidin und Polyamid, gefolgt von Polyglycin und Polyprolin, auch für β -Casein wurde eine schwache Bindungsaktivität beobachtet. Keinerlei Bindungsaktivität mit (-)-Epicatechin (**1**) zeigten hingegen Protamin, Polyarginin, Polyasparaginsäure und Polyalanin. Im Vergleich zu anderen Liganden zeigte (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**) die höchste Bindungsaktivität mit allen verwendeten Polypeptiden, es wurde jedoch ein unterschiedlicher Verlauf der Bindungsreaktionen ersichtlich. Während die Bindungsaffinität von Polyhistidin mit (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**) mit zunehmender Konzentration anstieg, erreichte diese beim Zusatz von Polyarginin, Protamin oder Polyprolin bereits bei sehr geringen Mengen einen frühen Sättigungspunkt. Die Addition höherer Mengen dieser Polyaminosäuren hatte keine zusätzliche Erhöhung der Bindungsaktivität zur Folge. Als einziges Homopolymer ohne Bindung mit **7** blieb Polyasparaginsäure.

Um die Bedeutung der ionischen Bindungen von Polyphenolen mit Proteinen zu studieren, wurden zudem pH-abhängige Bindungsstudien mit (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**) und dem basischen Peptid Protamin durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten eine geringere Bindungsaffinität im Sauren (pH 2 und 4), das Maximum der Bindungsreaktion lag bei pH 6. Mit zunehmendem pH-Wert (pH 8 und 10) konnte eine Abnahme der Bindungsaffinität beobachtet werden.

Aminosäuren, die als Bausteine der Peptide und Proteine dienen, verfügen über mindestens zwei funktionelle Gruppen und liegen deshalb in wässriger Lösung in Abhängigkeit vom pH-Wert als Kationen, Zwitterionen oder Anionen vor (BELITZ et al., 2001, [Abbildung 36](#)).

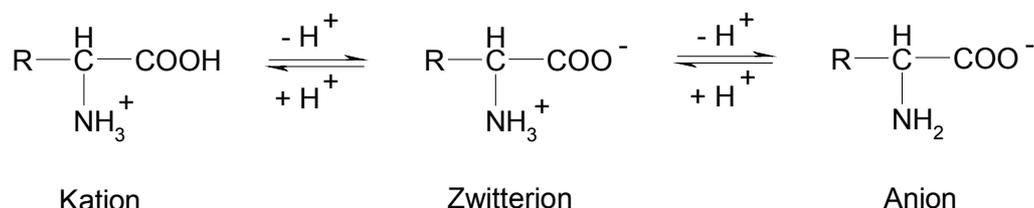


Abbildung 36: pH-Abhängigkeit der Aminosäure in wässriger Lösung nach BELITZ et al. (2001).

Der pH-Wert der vorliegenden Modelllösung ist mit pH 6,4 geringer als der pK_s -Wert von zum Beispiel Polyarginin, somit liegt die Aminogruppe positiv geladen als Kation vor. Bei der Polyasparaginsäure ist der pK_s -Wert hingegen höher als der pH-Wert der Lösung, wodurch die Carboxygruppe negativ geladen als Anion vorliegt (BELITZ et al., 2001, YANG und YUAN, 1999). Daraus folgt, dass bei den vorliegenden Reaktionsbedingungen (pH 6,4) Protamin (pH_{IEP} : 13,3, PROTEINDATENBANK: EXPASY, 2010), Polyarginin ($\text{pK}_s = 12,6$, BELITZ et al., 2001) sowie Polyhistidin ($\text{pK}_s = 9,07$, BELITZ et al., 2001) protoniert als Polykation vorliegen, während Polyasparaginsäure mit $\text{pK}_s = 3,65$ (BELITZ et al., 2001) deprotoniert als Polyanion auftritt.

Der pH-Wert der Reaktion beeinflusst nicht nur den Protonierungsstatus der Polyaminosäuren, sondern auch den der untersuchten Liganden **1**, **7**, **29** und **32** und somit auch ihre Bindungsaffinität während der Interaktion mit den Polypeptiden.

Gallussäure (**29**) weist einen pK_s von 4,5 auf (SANLI et al., 2002, BELTRÁN et al., 2003) und liegt beim pH-Wert der Modelllösung als Monoanion mit einer deprotonierten Carboxygruppe vor. Die Konsequenz dieser Deprotonierung ist eine erhöhte Bindungsaffinität zu basischen, protoniert vorliegenden Polyaminosäuren im Vergleich zu den neutralen Polypeptiden Polyprolin bzw. Polyalanin oder β -Casein.

Nach MITANI et al. (2008) ist Methylgallat (**32**) tribasisch und existiert in vier verschiedenen, vom pH-Wert abhängigen Formen ([Abbildung 37](#)). Bei niedrigen pH-Werten < 8 liegt demnach die undissoziierte Form neben dem Monoanion vor.

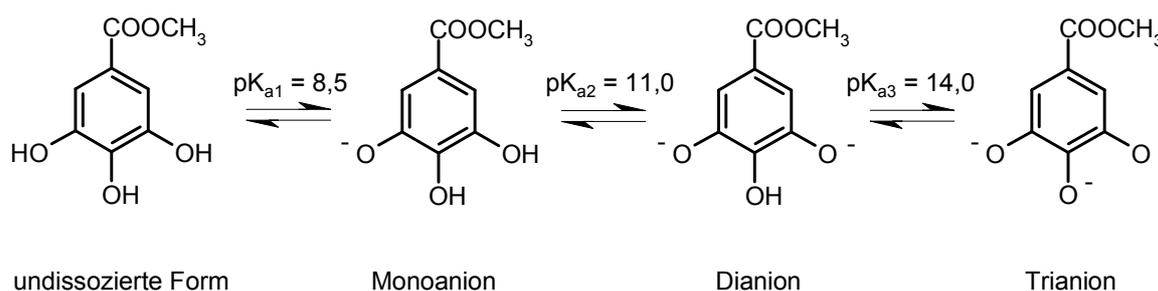


Abbildung 37: Vier verschiedene pH-abhängige Formen von Methylgallat (**32**) (undissoziierte Form, Monoanion, Dianion und Trianion) nach MITANI et al. (2008).

Es konnte gezeigt werden, dass die Substanzen **29** und **32** ein vergleichbares Bindungsverhalten gegenüber den Modellproteinen aufwiesen, mit Ausnahme von Polyamid. Dieser Unterschied erklärt sich durch das Auftreten der undissoziierten Form von Methylgallat (**32**), welche über eine höhere Bindungsaffinität im Vergleich zu der deprotonierten Form von Gallussäure (**29**) verfügt, die keine Bindung mit Polyamid zeigte.

(-)-Epicatechin (**1**) ist tetrabasisch und kann daher in fünf verschiedenen, vom pH-Wert abhängigen Formen, auftreten. In der pH-Region < 8 konnte (-)-Epicatechin (**1**) nur in der undissoziierten Form nachgewiesen werden (MUKAI et al., 2005, MITANI et al., 2008). Dieses erklärt die Tatsache, dass (-)-Epicatechin (**1**) nicht über ionische Bindungen mit den basischen Modellproteinen Protamin und Polyarginin interagiert.

MUZOLF et al. (2008) beschreiben die Positionen C3' und/oder C4' am B-Ring eines Moleküls als bevorzugte OH-Deprotonierungsstellen bei (+)-Catechin, (-)-Epicatechin und (-)-Epigallocatechin. Beim Verestern des Polyphenols mit Gallussäure verändert sich die Präferenz der Deprotonierung einer Hydroxygruppe von Position C4' (B-Ring) zu Position C4'' (D-Ring) (Abbildung 38).

Da Methylgallat (**32**) als Modell für einen D-Ring eines galloylierten Moleküls wie beispielsweise (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**) steht, kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass bei einem pH-Wert < 8 bei diesem Molekül neben der undissoziierten Form auch das Monoanion des D-Rings vorliegt (NAVARRO-PERÁN et al., 2005).

Ausgehend von den Ergebnissen der Bindungsexperimente von (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**) mit den bei pH 6,4 protoniert vorliegenden, basischen Polyaminosäuren Polyarginin und Polyhistidin sowie mit dem Peptid Protamin kann die Feststellung gemacht werden, dass

die anionische Form des (-)-Epigallocatechin-3-gallats (**7**) äußerst wichtig für die Interaktion zwischen einem Polyphenol und den Modellproteinen ist. Mögliche Bindungsstellen von (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**) und Polyarginin demonstriert Abbildung 38. Bei dargestellten Reaktionsbedingungen ist die protonierte Form der basischen Polyamino­säure Polyarginin hierbei in der Lage mit dem am D-Ring deprotoniert vorliegendem (-)-Epigallocatechin-3-gallatmolekül (**7**) über ionische Bindungen zu interagieren.

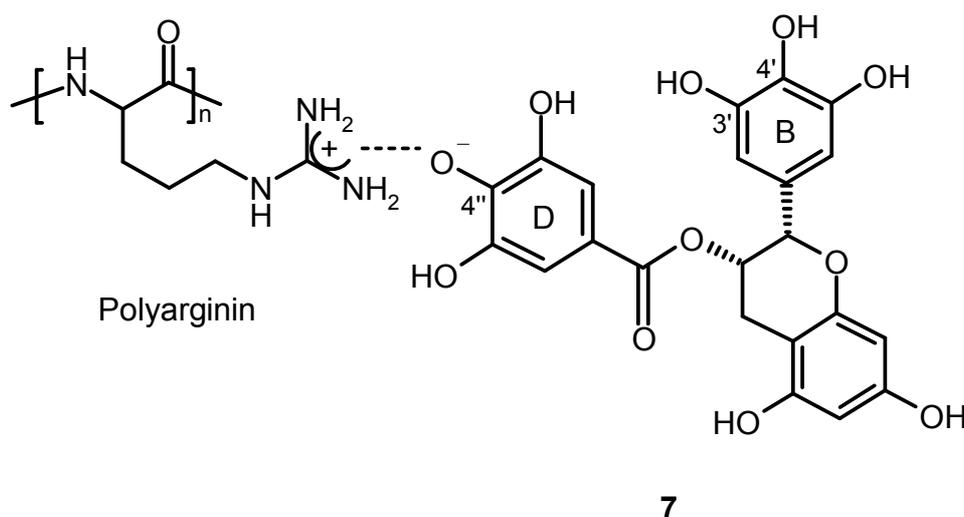


Abbildung 38: Mögliche Bindungsstellen des (-)-Epigallocatechin-3-gallats (7**) mit Polyarginin bei pH 6,4. Deprotonierte Darstellung von **7** nach NAVARRO-PERÁN et al., 2005.**

Die durchgeführten pH-Studien von (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**) mit Protamin in einem pH-Bereich zwischen 2 und 10 unterstreichen nochmals die Bedeutung der ionischen Bindungen in der Protein/Polyphenol-Interaktion des vorliegenden Modellsystems. Diese Daten bestätigen die vorhergehenden Studien von **7** mit Protamin und die Tatsache, dass (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**) im Sauren als protoniertes Molekül vorliegt und eine besonders geringe Neigung zur Bindung mit der ebenfalls protonierten Form von Protamin aufweist. Nähert sich der pH-Wert hingegen dem neutralen Bereich, spielt die deprotonierte Form der Galloyleinheit von **7** eine wichtige Rolle als Bindungspartner (NAVARRO-PERÁN et al., 2005).

Die Ergebnisse der Bindungsstudien mit basischen und sauren Polyaminosäuren bestätigen die Untersuchungen von SIEBERT et al. (1996). Durch Messung der Trübung mittels Lichtstreuung gelangte die Arbeitsgruppe zu gleichen Ergebnissen. Es zeigte sich insbesondere, dass Polyglutaminsäure, eine saure Polyaminosäure, keinerlei Trübung und folglich keine Interaktion mit den untersuchten Polyphenolen Catechin und Tanninsäure aufwies.

Neben BENNICK, der 2002 den Beitrag kovalenter und ionischer Bindungen zu Protein/Polyphenol-Interaktionen beschrieb, beobachteten auch CHARLTON et al. (2002a) Wechselwirkungen mit Arginin und Phenylalanin. Übereinstimmend mit der aufgeführten Literatur konnte gezeigt werden, dass die basischen Polyaminosäuren Polyhistidin und Polyarginin sowie das basische Peptid Protamin mit allen untersuchten Liganden die höchste Bindungsaffinität aufwiesen.

Zusätzlich zu den beschriebenen ionischen Bindungen zwischen basischen Polypeptiden und (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**) leisteten die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Hydroxygruppen einer undissoziierten Form von beispielsweise (-)-Epicatechin (**1**) oder (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**) und der Carbonylfunktion einer unpolaren Aminosäure wie Prolin einen entscheidenden Beitrag zu Protein/Polyphenol-Interaktion.

Abbildung 39 demonstriert die möglichen Bindungsstellen von (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**) und Polyprolin. Zu beachten gilt, dass (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**) nach NAVARRO-PERÁN et al. (2005) bei pH 6,4 neben dem Monoanion die undissoziierte Form aufweist. Die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen erfolgt hierbei zwischen den Hydroxygruppen des D-Rings der undissoziierten Form von **7** und der Carbonylfunktion des Modellproteins. Die Carbonylfunktion ist durch die irreguläre Struktur des Homopolymers für den Liganden (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**) besonders gut zugänglich.

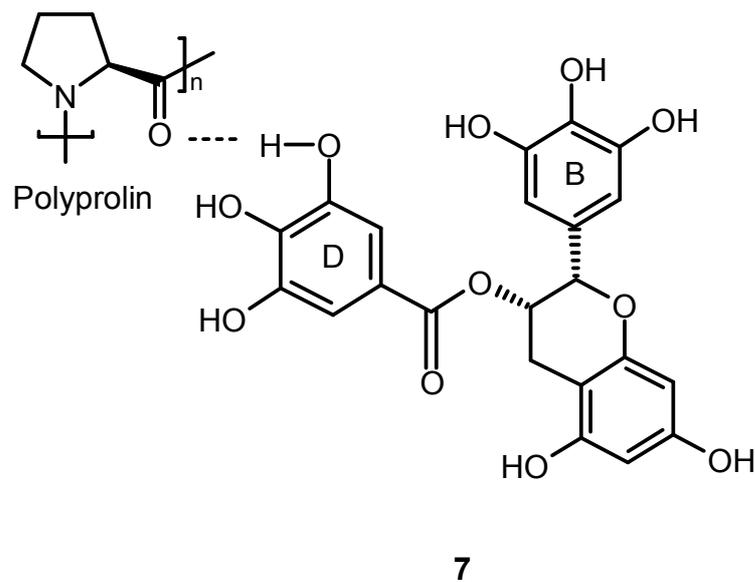


Abbildung 39: Mögliche Bindungsstellen des (-)-Epigallocatechin-3-gallats (7) mit Polyprolin bei pH 6,4.

Laut SPENCER et al. (1988) entstehen Wechselwirkungen von Polyphenolen mit Proteinen durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen phenolischen Hydroxygruppen und der Carbonylfunktion der Peptidbindung einerseits und der hydrophoben Wechselwirkung zwischen den unpolaren Aminosäureresten und den aromatischen Ringen der Polyphenole andererseits. Auch CHARLTON et al. (2002a, 2002b) konnten die Bedeutung von Prolin als wichtige Bindungsstelle bestätigen. Da die Bindungsexperimente von (-)-Epigallocatechin-3-gallat (7) mit Polyprolin ebenfalls eine sehr hohe Bindungsaktivität aufwiesen, konnte die Bedeutung von Prolin als eine essentielle Bindungsstelle im vorliegenden Modellsystem verdeutlicht werden. Hier wird jedoch zudem offenkundig, dass bei der Wechselwirkung von Polyphenolen mit Prolinseitenresten die Struktur des Liganden eine viel entscheidendere Rolle einnimmt. So zeigte beispielsweise (-)-Epicatechin (1) eine deutlich geringere Bindungsaktivität mit Polyprolin im Vergleich zu 7.

Die Bedeutung der Wasserstoffbrückenbindungen bei der Interaktion von Polyphenolen und Modellproteinen wird durch die Bindungsexperimente mit Polyamid nochmals hervorgehoben, da dieses Peptid lediglich über –CO-NH- Gruppen als mögliche Bindungsstellen für Polyphenole verfügt (SPENCER et al., 1988).

BAXTER et al. beschrieben 1997 die Interaktion von Pentagalloylglukose mit einem synthetischen Peptid in erster Linie über hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Prolinresten des Peptids und den aromatischen Ringen der Pentagalloylglukose. Es lässt sich somit der Schluss ziehen, dass bei der Bindungsreaktion von Polyphenolen wie beispielsweise (-)-Epicatechin (**1**) und (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**) eine Überlappung der aromatischen Ringe mit den unpolaren Aminosäureresten stattfindet und hydrophobe Wechselwirkungen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Bindungsreaktion spielen. Durch das Vorhandensein einer zusätzlichen Galloyleinheit im Molekül wie bei (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**) wird auch hier die Bindungsaffinität erhöht. Im Gegensatz zu der Interaktion mit Polyprolin zeigt (-)-Epicatechin (**1**) eine höhere Wechselwirkung mit Polyhistidin. Hier liegt die Vermutung nahe, dass hydrophobe Wechselwirkungen der aromatischen Ringe der undissoziierten Form von **1** mit den Fünfringen des Polyhistidins stattfinden. Bereits 1995 postulierten YAN und BENNICK Wechselwirkungen zwischen Tanninen und histidinreichen Proteinen, den Speichelproteinen Histatinen.

Die Modellreaktionen der Polyaminosäuren und Peptide mit Polyphenolen präsentierten deutlich, dass die Anwesenheit zweier pH-abhängiger Formen der galloylierten Flavan-3-ole die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen und/oder ionischer Bindungen ermöglicht. Die Bindungsreaktion kann zudem durch hydrophobe Wechselwirkungen unterstützt werden. Das Vorhandensein mindestens einer Galloyleinheit im Molekül des Liganden bleibt auch hier ein äußerst wichtiges Charakteristikum.

3 Experimenteller Teil

3.1 Untersuchungsmaterial

Folgende Teesorten dienen als Untersuchungsmaterial, es handelt sich hierbei um handelsübliche Produkte:

Difloo TGFOP, First Flush, Tee Blatt, München

Tippy Assam TGFOP, Tee Blatt, München

Assam Broken Goldspitzen GFBOP, Second Flush, Tee Blatt, München

Ostfriesen Broken Auslese, Second Flush, GBOP, Tee Blatt, München

Ostfriesen Blattmischung, FOP, Autumnal, Tee Blatt, München

3.2 Materialien und Reagenzien

Magermilchpulver, Sucofin, TSI GmbH & Co. KG

Laktose, Meggle, Alpenschnee Milchzucker

Amicon Filtereinheiten, regenerierte Cellulose, 3000 NMWL, Millipore Corporation, Bedford, USA

Amino-Functionalized Magnetic Beads, Sigma-Aldrich, Steinheim

Bicinchoninsäure Protein Assay Kit, Sigma-Aldrich, Steinheim

Mikrotestplatten, BRAND, Wertheim

Abdeckfolien für Mikrotestplatten, Carl Roth, Karlsruhe

3.2.1 Chemikalien

Aceton-d₆, Euriso-Top, Gif-Sur-Yvette, Frankreich

Acetonitril, HPLC grade, J.T.Baker, Deventer, Niederlande

α -Casein, min. 70%, Sigma-Aldrich, Steinheim

α -Lactalbumin, ~ 85%, Sigma-Aldrich, Steinheim

Ameisensäure, 99-100 %, Merck KGaA, Darmstadt

Ascorbinsäure, Sigma-Aldrich, Steinheim

β -Casein, min 90%, Sigma-Aldrich, Steinheim

β -Lactoglobulin, ~ 90%, Sigma-Aldrich, Steinheim

(-)-Catechin, Sigma-Aldrich, Steinheim

(-)-Catechin-3-gallat, Sigma-Aldrich, Steinheim

Koffein, Merck KGaA, Darmstadt
Deuteriumchlorid, Euriso-Top, Gif-Sur-Yvette, Frankreich
Deuteriumoxid, Euriso-Top, Gif-Sur-Yvette, Frankreich
Dinatriumhydrogenphosphat (wasserfrei), Sigma-Aldrich, Steinheim
(-)-Epicatechin, Sigma-Aldrich, Steinheim
(-)-Epicatechin-3-gallat, Sigma-Aldrich, Steinheim
(-)-Epigallocatechin, Sigma-Aldrich, Steinheim
(-)-Epigallocatechin-3-gallat, Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethylacetat, Merck KGaA, Darmstadt
Ethylgallat, Sigma-Aldrich, Steinheim
(-)-Galocatechin, Sigma-Aldrich, Steinheim
(-)-Galocatechin-3-gallat, Sigma-Aldrich, Steinheim
Gallussäure, Sigma-Aldrich, Steinheim
Glutaraldehyd, Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycin, Sigma-Aldrich, Steinheim
Kämpferol-3-O-glucosid, Extrasynthese, Lyon, Frankreich
Kämpferol-3-O-rutinosid, Extrasynthese, Lyon, Frankreich
Kaliumdihydrogenphosphat, Merck KGaA, Darmstadt
 κ -Casein, Sigma-Aldrich, Steinheim
Lysozym, Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol, HPLC grade, J.T.Baker, Deventer, Niederlande
Methylgallat, Sigma-Aldrich, Steinheim
DL-Milchsäure, Merck KGaA, Darmstadt
Mucin, Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid, Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat, Merck KGaA, Darmstadt
Natriumglutamat, Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumsulfat (wasserfrei), Sigma-Aldrich, Steinheim
Pentagalloylglukose (1,2,3,4,6-Pentakis-O-galloyl-beta-D-glukose), EndoTherm Life Science Molecules, Saarbrücken
Pepsin, Sigma-Aldrich, Steinheim
Poly-DL-alanin (MW 1000-5000), Sigma-Aldrich, Steinheim
Polyamid 6, Carl Roth, Karlsruhe
Poly-L-arginin Hydrochlorid (MW 5000-15000), Sigma-Aldrich, Steinheim

Poly-(α,β)-DL-asparaginsäure Natriumsalz (MW 2000-11000), Sigma-Aldrich, Steinheim

Polyglycin (MW 500-5000), Sigma-Aldrich, Steinheim

Poly-L-histidin (MW 5000-25000), Sigma-Aldrich, Steinheim

Poly-L-prolin (MW 1000-10000), Sigma-Aldrich, Steinheim

Protamin, Sigma-Aldrich, Steinheim

Propylgallat, Sigma-Aldrich, Steinheim

Pyridin, Merck KGaA, Darmstadt

Pyrogallol, Sigma-Aldrich, Steinheim

Quercetin-3-O-galactosid (Hyperosid), Extrasynthese, Lyon, Frankreich

Quercetin-3-O-glucosid, Extrasynthese, Lyon, Frankreich

Quercetin-3-O-rutinosid (Rutin), Extrasynthese, Lyon, Frankreich

Saccharose, Merck KGaA, Darmstadt

Tannin, Sigma-Aldrich, Steinheim

Theaflavin-3,3'-digallat, ReseaChem Life Science, Burgdorf, Schweiz

Theobromin, Merck KGaA, Darmstadt

Tyrosinase, Sigma-Aldrich, Steinheim

Wasser für die HPLC-Messungen wurde mit Hilfe einer Millipore-Station (Gradient A System, Millipore, Billerica, USA) aufgereinigt. Sensorische Experimente wurden mit kommerziell erhältlichem Mineralwasser (Evian[®]) durchgeführt.

3.2.2 Synthese der Theaflavine

Die Synthese der Theaflavine wird in Anlehnung an die Literatur (TAKINO et al., 1964, SCHARBERT et al., 2004b) aus zwei Flavan-3-olmolekülen (für Theaflavinsäure mit einem Flavan-3-olmolekül und Gallussäure (**29**)) durchgeführt. Es werden je nach zu synthetisierendem Theaflavinderivat verschiedene Ausgangssubstanzen eingesetzt (Tabelle 14).

Tabelle 14: Ausgangssubstanzen für die Synthese der Theaflavine.

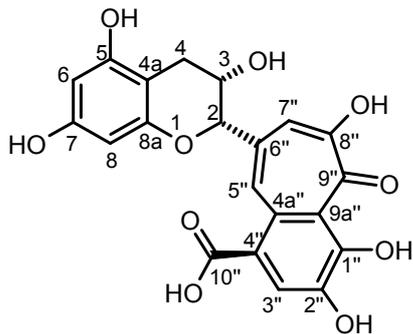
Gallocatechin^a	Catechin^a	Theaflavinderivat^a
Gallussäure (29)	(-)-Epicatechin (1)	Theaflavinsäure (9)
(-)-Epigallocatechin (5)	(-)-Epicatechin (1)	Theaflavin (10)
(-)-Epigallocatechin-3-gallat (7)	(-)-Epicatechin (1)	Theaflavin-3-gallat (11)
(-)-Epigallocatechin (5)	(-)-Epicatechin-3-gallat (3)	Theaflavin-3'-gallat (12)

^a Bezifferung der Substanzen bezieht sich auf die Strukturen in Abbildungen 3 und 6.

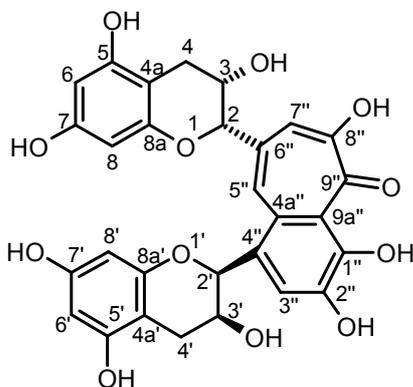
Die binäre Mischung aus Gallocatechin (100 µmol) und Catechin (50 µmol) wird in 5 mL Phosphatpuffer (0,1 mol/L, pH 6,0) gelöst und nach Zugabe von 1 mg Tyrosinase für 1 Stunde unter Zufuhr von Luftsauerstoff gerührt. Anschließend wird der pH-Wert mit Ameisensäure (30 % ig) auf pH 4 reduziert und die Lösung mit Ethylacetat (5 x 7,5 mL) bis zur Farblosigkeit der organischen Phase extrahiert. Die vereinigten Ethylacetatextrakte werden über Natriumsulfat getrocknet und eingeengt. Nach Entfernen des Lösungsmittels bei 25 °C unter Vakuum werden die Theaflavinderivate in 2 mL Wasser aufgenommen und mittels semipräparativer HPLC mit Hilfe des unten beschriebenen HPLC-Systems bei der Wellenlänge $\lambda = 270$ nm isoliert. Das Lösungsmittel wird entfernt, die erhaltene wässrige Lösung wird gefriergetrocknet. Die Strukturen der Syntheseprodukte werden mittels LC/MS- und NMR-Spektroskopie abgesichert.

HPLC-System: 2

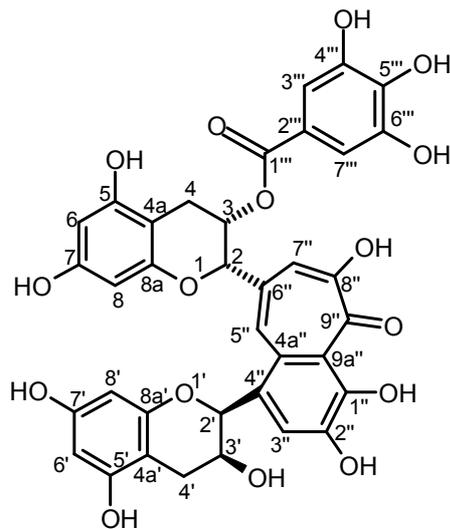
Säule	Grom Sil 120 octyl-5-CP, RP-8, 250 × 10 mm, 5 µm (Grom, Rottenburg-Hailfingen)		
Vorsäule	Phenomenex, RP-18, 4 × 4 mm, 5 µm (Phenomenex Technologies, Aschaffenburg)		
Eluent [A]	0,1 % Ameisensäure in Wasser		
Eluent [B]	Methanol		
Fluss	3,0 mL/min		
Wellenlänge	270 nm		
Gradient	Zeit [min]	A [%]	B [%]
	0	70	30
	10	50	50
	20	40	60
	23	0	100



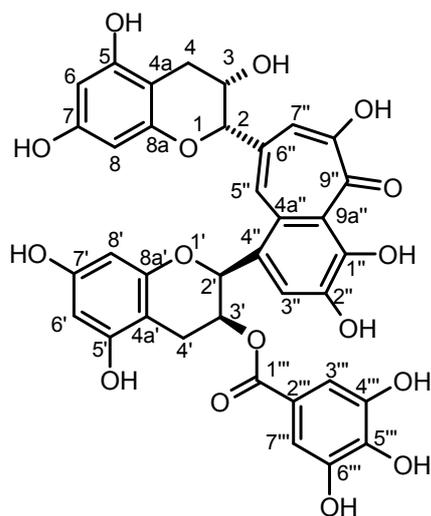
Theaflavinsäure (**9**): **UV/Vis** (MeOH): $\lambda_{\max} = 274, 398$ nm; **LC/MS** (ESI): m/z (%) 427 (100) [M-H]⁻, MS/MS: m/z (%) 427 (100), 383 (25); **¹H-NMR** (500 MHz, CD₃COCD₃): δ [ppm]: 2,95 [m, 2H, H-C(4)], 4,48 [m, 1H, H-C(3)], 5,75 [s, 1H, H-C(2)], 6,04 [d, 1H, $J = 2,5$ Hz, H-C(6)], 6,10 [d, 1H, $J = 2,5$ Hz, H-C(8)], 7,98 [s, 1H, H-C(7'')], 8,10 [s, 1H, H-C(3'')], 8,85 [s, 1H, H-C(5'')].



Theaflavin (**10**): **UV/Vis** (MeOH): $\lambda_{\max} = 289, 374, 457$ nm; **LC/MS** (ESI): m/z (%) 563 (100) [M-H]⁻, MS/MS: m/z (%) 610 (100), 113 (75), 563 (50), 159 (38); **¹H-NMR** (500 MHz, CD₃COCD₃): δ [ppm]: 2,95 [m, 4H, H-C(4), H-C(4')], 4,43 [m, 1H, H-C(3)], 4,50 [m, 1H, H-C(3')], 5,06 [s, 1H, H-C(2)], 5,78 [s, 1H, H-C(2')], 6,06 [m, 4H, $J = 2,3$ Hz, H-C(6), H-C(6'), H-C(8), H-C(8')], 7,62 [s, 1H, H-C(7'')], 8,02 [s, 1H, H-C(3'')], 8,05 [s, 1H, H-C(5'')].



Theaflavin-3-gallat (**11**): **UV/Vis** (MeOH): $\lambda_{\max} = 271, 373, 450 \text{ nm}$; **LC/MS** (ESI): m/z (%) 715 (100) $[M-H]^-$; **$^1\text{H-NMR}$** (500 MHz, CD_3COCD_3): δ [ppm]: 3,02 [m, 4H, H-C(4), H-C(4')], 4,58 [m, 1H, H-C(3)], 5,36 [s, 1H, H-C(3')], 5,80 [s, 1H, H-C(2)], 5,83 [s, 1H, H-C(2')], 6,12 [m, 4H, H-C(6), H-C(6'), H-C(8), H-C(8')], 6,91 [s, 2H, H-C(3'''), H-C(7''')], 7,63 [s, 1H, H-C(7'')], 8,07 [s, 2H, H-C(3''), H-C(5'')].



Theaflavin-3'-gallat (**12**): **UV/Vis** (MeOH): $\lambda_{\max} = 271, 373, 450 \text{ nm}$; **LC/MS** (ESI): m/z (%) 715 (100) $[M-H]^-$; **$^1\text{H-NMR}$** (500 MHz, CD_3COCD_3): δ [ppm]: 2,94 [m, 4H, H-C(4), H-C(4')], 4,46 [m, 1H, H-C(3)], 5,13 [s, 1H, H-C(3')], 5,79 [s, 1H, H-C(2)], 6,02 [s, 1H, H-C(2')], 6,09 [m, 4H, $J = 2,3 \text{ Hz}$, H-C(6), H-C(6'), H-C(8), H-C(8')], 7,00 [s, 2H, H-C(3'''), H-C(7''')], 7,63 [s, 1H, H-C(7'')], 8,03 [s, 1H, H-C(3'')], 8,07 [s, 1H, H-C(5'')].

3.3 Zubereitung eines Standardteegetränkes

1 g der Teedroge wird mit 100 mL kochendem Wasser übergossen und für 4 min bei Raumtemperatur ziehen gelassen. Anschließend wird der Teeaufguss unter Verwendung eines handelsüblichen Teefilters filtriert. Für sensorische Analysen wird das Teegetränk direkt verwendet. Für Quantifizierungen wird dieses mit Ascorbinsäure stabilisiert (50 mg/100 mL) und membranfiltriert.

3.4 Einfluss von Additiven auf die sensorische und quantitative Charakterisierung von Teeinhaltsstoffen

3.4.1 Magermilchpulver

Um den Einfluss von Milchproteinen auf den Geschmackseindruck von schwarzem Tee untersuchen zu können, werden jeweils 0,1 g, 0,25 g, 0,5 g, 1,0 g und 2,0 g Magermilchpulver zu einem Aliquot (100 mL) eines Standardteegetränks (Zubereitung Kapitel 3.3) gegeben. Nach Abkühlen bei Raumtemperatur (15 min) werden diese Lösungen bei 9000 U/min und bei Raumtemperatur für 30 min zentrifugiert. Die anschließenden sensorischen Analysen erfolgen direkt aus der Lösung. Für HPLC-Analysen werden die erhaltenen Lösungen membranfiltriert.

3.4.2 Laktose

Verschiedene Konzentrationen an Milchzucker (0,05 g, 0,25 g, 1,0 g and 2,0 g) werden zu einem Aliquot (100 mL) eines vorher zubereiteten Standardteegetränkes (Zubereitung Kapitel 3.3) gegeben. Die so erhaltenen Lösungen werden direkt im Vergleich zu einem Teegetränk sensorisch mittels vergleichender Geschmacksprofilanalyse verkostet.

3.5 Amino-Functionalized Magnetic Beads

Bei Amino-Functionalized Magnetic Beads handelt es sich um eine wässrige Suspension magnetischer Eisenoxidpartikel. Die Beads sind superparamagnetisch und haben einen Durchmesser von 1 μm . Die Kopplungseffizienz liegt bei 10 mg Protein/mL Bead Suspension. Die Proteine werden mittels Glutaraldehyd, welches als Vernetzungsreagenz fungiert, kovalent gebunden. Die Proteinaktivität bleibt nach dem Immobilisieren intakt (WESTON und AVRAMEAS, 1971).

3.5.1 Proteinimmobilisierung

Eine Schematische Darstellung der Proteinimmobilisierung zeigt Abbildung 25 (Kapitel 2.2.2).

Zur Proteinimmobilisierung werden 2,5 mL der Magnetic Bead Suspension mit Pyridinpuffer (0,01 mol/L, pH 6, 12,5 mL) mehrmals gewaschen.

Zur Aktivierung der Beads werden diese unter Schütteln bei Raumtemperatur für 3 h mit Glutaraldehyd (5 %ige Lösung, 5 mL) inkubiert. Das Glutaraldehyd dient als Vernetzungsreagenz zwischen den Magnetic Beads und den zum Beladen dieser Beads verwendeten Proteine. Das überschüssige Glutaraldehyd wird anschließend mit Hilfe magnetischer Abtrennung entfernt. Die Magnetic Bead-Lösung wird dazu mehrfach mit Pyridinpuffer (0,01 mol/L, pH 6, 12,5 mL) gewaschen.

Anschließend werden 2,5 mL der jeweiligen Proteinlösung (α -, β - und κ -Casein, α -Lactalbumin, β -Lactoglobulin, Mucin, Lysozym und Pepsin) mit der Proteinkonzentration von 10 mg Protein/mL Bead Suspension zu den mit Glutaraldehyd aktivierten Magnetic Beads gegeben. Diese Proteinlösung wird auch als Vorkopplungslösung bezeichnet. Das Inkubieren wird 18 h lang bei Raumtemperatur unter Schütteln durchgeführt. Nach der Inkubationszeit erfolgt die Abnahme der Proteinlösung (Nachkopplungslösung) aus dem Überstand nach magnetischer Abtrennung. Anhand der Vor- und Nachkopplungslösungen ist es möglich die Kopplungseffizienz mittels BCA-Assay zu bestimmen (Kapitel 3.5.2) und somit auch die an die Beads gebundene Proteinkonzentration zu ermitteln.

Zum Stoppen der Reaktion wird zu den mit Proteinen beladenen Magnetic Beads eine Glycinlösung (1,0 mol/L, 12,5 mL) gegeben und für 30 min unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Glycinlösung wird anschließend entfernt und die Magnetic Beads werden letztmals mit Pyridinpuffer (0,01 mol/L, pH 6, 12,5 mL) gewaschen.

Der Pyridinpuffer wird vollständig entfernt, so dass die mit Proteinen beladenen Magnetic Beads in Phosphatpuffer (0,01 mol/L, pH 6,4) aufgenommen und für weitere Experimente verwendet werden können.

3.5.2 Bestimmung der Proteinkopplungseffizienz mittels BCA-Assay

Um reproduzierbare Kopplungen der einzelnen Proteine an die mit Glutaraldehyd aktivierten Magnetic Beads und eine gute Vergleichbarkeit zwischen den verwendeten Proteinen zu haben, wird die Kopplungseffizienz der Proteine mittels BCA-Assay bestimmt.

Der BCA-Assay Kit setzt sich zusammen aus Reagenz A (Bicinchoninsäure, Natriumcarbonat, Natriumtartrat und Natriumbicarbonat in 0,1 N Natronlauge) und Reagenz B (4 % ige Kupfersulfat Pentahydrat Lösung) (SMITH et al., 1985).

Das Prinzip des BCA-Assays beruht auf der Bildung eines Cu^{2+} -Protein Komplexes unter alkalischen Bedingungen, gefolgt von der quantitativen Reduktion des zweiwertigen Kupfers durch das Protein zum einwertigen Kupfer. Diese ergeben mit Bicinchoninsäure einen

violetten Farbstoff mit einem Absorptionsmaximum bei $\lambda = 562 \text{ nm}$. Die Absorption ist dabei direkt proportional zu der vorhandenen Proteinkonzentration (Abbildung 40). Der BCA-Assay weist einen linearen Bereich zwischen 200-1000 mg Protein/mL auf. Die Proteinkonzentrationen der verwendeten Proteine in der Vor- und der Nachkopplungslösung werden anhand externer Kalibrationskurven (5-Punkt-Kalibrierung) bestimmt. Dazu werden 10 μL der jeweiligen Proteinlösung zusammen mit 200 μL des BCA-Arbeitsreagenz auf eine Mikrottestplatte aufgetragen. Nach der Inkubation bei 37 °C für 30 min im Wasserbad, wird die Absorption mit Hilfe eines Mikrottestplattenlesegerätes (FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech, Offenburg) gemessen und die Kopplungseffizienz bestimmt. Die Kopplungseffizienz der eingesetzten Proteine ist immer größer als 60 %.

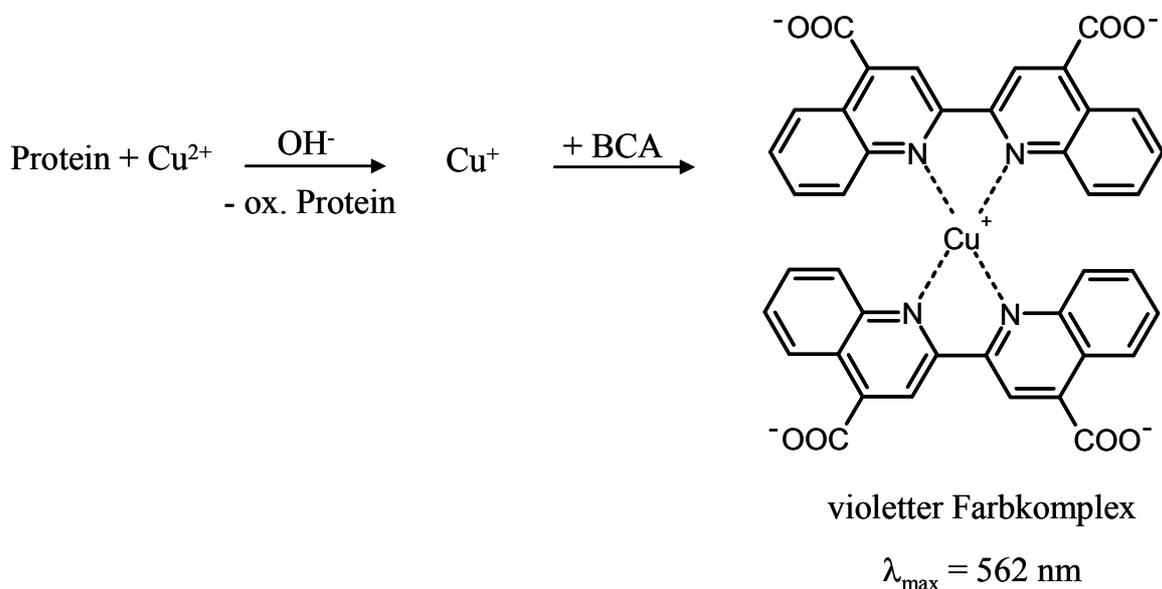


Abbildung 40: Messung der Proteinkonzentration mittels BCA-Assay durch Bildung eines violetten Cu^+ -BCA-Komplexes (SMITH et al., 1985).

3.5.3 Probenvorbereitung für proteinaktivierte Magnetic Beads

500 μL des Standardteegetränks, 500 μL einer Modelllösung bestehend aus 6 Flavan-3-olen (**1-5**, **7**, je 2 $\mu\text{mol/mL}$ in Phosphatpuffer (0,01 mol/L, pH 6,4)) sowie 500 μL der Lösungen von **1** und **7** (2 $\mu\text{mol/mL}$, in Phosphatpuffer (0,01 mol/L, pH 6,4)) werden mit verschiedenen Konzentrationen der mit Milchproteinen (α -, β - und κ -Casein, α -Lactalbumin und

β -Lactoglobulin) aktivierten Magnetic Beads für 10 min bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Die verwendeten Proteinkonzentrationen sind hierbei 0,01 $\mu\text{mol/mL}$, 0,02 $\mu\text{mol/mL}$ und 0,04 $\mu\text{mol/mL}$. Nach abschließender magnetischer Abtrennung kann der Überstand der Lösung mittels HPLC-UV (für Flavan-3-ole (**1-8**) und Purinalkaloide (**27-28**)) bzw. HPLC-MS/MS (Theaflavine (**9-13**)) untersucht werden. Als Referenz dienen eine Lösung des Standardteegetränkes, eine Modelllösung der sechs verschiedenen Flavan-3-ole (**1-5, 7**) sowie die Lösungen von **1** und **7** verdünnt mit Phosphatpuffer.

HPLC-System 2 für Flavan-3-ole (**1-8**) und Purinalkaloide (**27-28**) im Teegetränk sowie Flavan-3-ole (**1-5, 7**) in der Modelllösung:

Säue	Grom Sil 120 octyl-5-CP, RP-8, 250 × 4,6 mm, 5 μm (Grom, Rottenburg-Hailfingen)
Vorsäule	Phenomenex, RP-18, 4 × 4 mm, 5 μm (Phenomenex Technologies, Aschaffenburg)
Eluent [A]	0,1 % Ameisensäure in Wasser
Eluent [B]	Methanol
Fluss	0,8 mL/min
Wellenlänge	270 nm

Gradient	Zeit [min]	A [%]	B [%]
	0	90	10
	8,5	80	20
	39,5	60	40
	44,5	0	100

LC-MS/MS Parameter für die Quantifizierung der Theaflavine (**9-13**) im Standardteegetränk:

Ionisierung	Turbo Spray Electrospray Ionization (ESI)		
Scan Type	MRM (multiple reaction monitoring)		
Polarität	negativ		
Ion Spray Voltage	-4500 V		
Curtain Gas	20 psi		
CAD	3 N ₂		
Temperatur	350 °C		
Gas 1	50 psi		
Gas 2	60 psi		
Resolution	Unit		
Auswertung	AB SCIEX, Analyst Software 1.5		
Säule	Phenomenex Gemini C18 110A 50 x 2,0 mm, 3 μ , (Phenomenex Technologies, Aschaffenburg)		
Vorsäule	Phenomenex, RP-18, 4 × 4 mm, 5 μ m (Phenomenex Technologies, Aschaffenburg)		
Eluent [A]	Methanol		
Eluent [B]	0,1 % Ameisensäure in Wasser		
Fluss	250 μ L/min		
Injektionsvolumen	10 μ L		
Gradient	Zeit [min]	A [%]	B [%]
	0	40	60
	4	40	60
	22	100	0
	25	100	0
	28	40	60

Ausgewählte Massenübergänge und optimierte Bedingungen für die Untersuchung der Magnetic Beads Bindungsstudien bezüglich der Theaflavinkonzentrationen im Standardteegetränk sind in Kapitel 3.7.4 in Tabelle 17 dargestellt.

3.5.4 Bestimmung der halbmaximalen Bindungskonzentration mittels Amino-Functionalized Magnetic Beads

3.5.4.1 Flavan-3-ole

500 µL einer Flavan-3-ollösung (**1-8**, 2 µmol/mL, in Phosphatpuffer (0,01 mol/L, pH 6,4)) werden mit verschiedenen Konzentrationen der mit Milchproteinen (α -, β - und κ -Casein, α -Lactalbumin und β -Lactoglobulin) sowie mit Lysozym, Mucin und Pepsin aktivierten Magnetic Beads bei Raumtemperatur unter Schütteln für 10 min inkubiert. Die eingesetzten Proteinkonzentrationen liegen in einem Bereich zwischen 0,5 nmol/mL und 100 nmol/mL. Der Überstand der Lösung wird nach magnetischer Abtrennung mittels HPLC-DAD unter Verwendung der nachfolgenden HPLC-Methode untersucht. Als Referenz (Kontrollprobe) dient eine Flavan-3-ollösung verdünnt mit Phosphatpuffer. Die Menge an gebundenem Liganden wird bestimmt aus der Differenz der Konzentration der Kontrollprobe und der in Lösung verbleibenden freien Menge des jeweiligen Liganden.

Der BC_{50} -Wert stellt die Konzentration eines Proteins dar, bei der eine halbmaximale Bindung des Liganden vorliegt. Mathematisch wird der BC_{50} -Wert mit Hilfe der Software Xact-Chart Publishing (SciLab, Hamburg, Deutschland) unter Nutzung folgender sigmoiden Funktion bestimmt:

$$f(x) = \frac{(a - d)}{(b/x)^c} + d$$

Formel 1: Gleichung zur Berechnung der sigmoiden Funktionen mit $b = BC_{50}$ -Wert, $x =$ Konzentration des Proteins, $a =$ Maximalwert, $d =$ Minimalwert und $c =$ Hill Koeffizient.

HPLC-System: 1

Säule	Grom Sil 120 octyl-5-CP, RP-8, 250 × 4,6 mm, 5 µm (Grom, Rottenburg-Hailfingen)		
Vorsäule	Phenomenex, RP-18, 4 × 4 mm, 5 µm (Phenomenex Technologies, Aschaffenburg)		
Eluent [A]	0,1 % Ameisensäure in Wasser		
Eluent [B]	Methanol		
Fluss	0,8 mL/min		
Wellenlänge	270 nm		
Gradient	Zeit [min]	A [%]	B [%]
	0	90	10
	5	80	20
	20	60	40
	23	0	100

3.5.4.2 Pyrogallol, Gallussäure, Gallussäureester, Pentagalloylglukose

Die halbmaximalen Bindungskonzentrationen (BC_{50} -Werte) der Substanzen Pyrogallol (**31**), Gallussäure (**29**), Gallussäureester (Methyl-, Ethyl- und Propylgallat (**32-34**)) und Pentagalloylglukose (**35**) werden mit β -Casein ermittelt. Für **35** erfolgt zusätzlich die Bestimmung mit α -Lactalbumin. Nach Inkubation mit den proteinaktivierten Magnetic Beads wird der Gehalt der in Lösung verbleibenden freien Menge des jeweiligen Liganden unter Verwendung der nachfolgenden HPLC-Methoden analysiert.

HPLC-System: 1

Säule	Grom Sil 120 octyl-5-CP, RP-8, 250 × 4,6 mm, 5 µm (Grom, Rottenburg-Hailfingen)
Vorsäule	Phenomenex, RP-18, 4 × 4 mm, 5 µm (Phenomenex Technologies, Aschaffenburg)
Eluent [A]	0,1 % Ameisensäure in Wasser
Eluent [B]	Methanol
Fluss	0,8 mL/min
Wellenlänge	270 nm

	Zeit [min]	A [%]	B [%]
Pyrogallol (31)	0	100	0
	20	80	20
	30	100	0
Gallussäure (29)	0	90	10
	2	90	10
	12	80	20
	15	90	10
Gallussäureester (32-34), Pentagalloylglukose (35)	0	100	0
	25	50	50
	30	100	0

3.6 Bindungsstudien mit Polyaminosäuren

3.6.1 Probenvorbereitung mittels Ultrafiltration

Zur Bestimmung der Bindungsaktivität werden die Substanzen (-)-Epicatechin (**1**), (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**), Gallussäure (**29**) und Methylgallat (**32**) (2 µmol/mL in Phosphatpuffer (0,01 mol/L, pH 6,4)) mit unterschiedlichen Mengen ausgewählter Modellproteine inkubiert. Dazu werden 1 mg, 2 mg, 5 mg und 10 mg der Polyaminosäuren Polyalanin, Polyglycin, Polyprolin, Polyarginin, Polyhistidin, Polyasparaginsäure, der Peptide Protamin und Polyamid, sowie β-Casein zu Phosphatpuffer (0,01 mol/L, pH 6,4) gegeben und

mit 500 μ L der vier Liganden (**1**, **7**, **29**, **32**) vermischt. Nach einer Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur unter Schütteln werden die Lösungen in Ultrafiltrationseinheiten (Amicon Filtereinheiten, 3000 NMWL, Millipore Corporation, Bedford, USA) überführt und bei 12000 U/min bei Raumtemperatur für 15 min zentrifugiert. Das Filtrat der Lösung wird anschließend direkt mittels HPLC-DAD unter Verwendung des unten genannten Systems untersucht. Als Referenz (Kontrollprobe) dient eine Ligandenlösung verdünnt mit Phosphatpuffer und nach vorheriger Ultrafiltration. Die Menge an gebundenem Liganden wird aus der Differenz der Konzentration der Kontrollprobe und der im Filtrat verbleibenden freien Menge des jeweiligen Liganden bestimmt.

HPLC-System: 3

Säule	Grom Sil 120 octyl-5-CP, RP-8, 250 \times 4,6 mm, 5 μ m (Grom, Rottenburg-Hailfingen)
Vorsäule	Phenomenex, RP-18, 4 \times 4 mm, 5 μ m (Phenomenex Technologies, Aschaffenburg)
Eluent [A]	0,1 % Ameisensäure in Wasser
Eluent [B]	Methanol
Fluss	0,8 mL/min
Wellenlänge	270 nm

	Zeit [min]	A [%]	B [%]
(-)-Epicatechin (1), (-)-Epigallocatechin- 3-gallat (7), Methylgallat (32)	0	70	30
	5	70	30
	10	60	40
	13	70	30
Gallussäure (29)	0	90	10
	2	90	10
	12	80	20
	15	90	10

3.6.2 Bestimmung der Bindungsaffinität von (-)-Epigallocatechin-3-gallat (7) mit Protamin

Zur Bestimmung der Bindungsaktivität werden 500 μL der (-)-Epigallocatechin-3-gallatlösung (7, 2 $\mu\text{mol/mL}$ in Phosphatpuffer (0,01 mol/L, pH 6,4) mit unterschiedlichen Mengen Protamin inkubiert. Die Protaminkonzentrationen sind hierbei 0,005 mg/mL, 0,02 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,2 mg/mL, 1,0 mg/mL, 2,0 mg/mL, 5,0 mg/mL und 10,0 mg/mL. Nach dem Inkubieren bei Raumtemperatur unter Schütteln für 10 min, werden die Lösungen in Ultrafiltrationseinheiten (Amicon Filtereinheiten, 3000 NMWL, Millipore Corporation, Bedford, USA) überführt und bei 12000 U/min bei Raumtemperatur für 15 min zentrifugiert. Das Filtrat der Lösung wird direkt mit Hilfe der unter 3.6.1 beschriebenen HPLC-Methode untersucht. Als Referenz (Kontrollprobe) dient eine Lösung von 7 verdünnt mit Phosphatpuffer nach vorheriger Ultrafiltration. Die Menge an gebundenem Liganden wird bestimmt aus der Differenz der Konzentration der Kontrollprobe und der in Lösung verbleibenden freien Menge des Liganden.

Tabelle 15 beschreibt die charakteristischen Merkmale inklusive der Aminosäurezusammensetzung von Protamin.

Tabelle 15: Aminosäurezusammensetzung, Anzahl der Aminosäuren, Molekulargewicht und isoelektrischer Punkt von Protamin.

Aminosäure ^a	Prozentuale Verteilung der Aminosäuren in
	Protamin
Arg	65,6
Gly	6,2
Pro	9,4
Ser	12,5
Val	6,2
AS-Anzahl ^b	32
MG ^c	4249,9
IEP ^d	13,3

^a ExPASy Proteindatenbank. ^b AS = Aminosäure. ^c = Molekulargewicht in Da. ^d Isoelektrischer Punkt.

3.6.3 Einfluss des pH-Wertes auf die Bindungsaktivität von (-)-Epigallocatechin-3-gallat (7) mit Protamin

Phosphatpufferlösungen mit verschiedenen pH-Werten (pH 2, 4, 6, 8 und 10) werden hergestellt. 500 μL der 2 $\mu\text{mol/mL}$ (-)-Epigallocatechin-3-gallatlösung (Phosphatpuffer: 0,01 mol/L, pH 2, 4, 6, 8 und 10) werden mit 5 mg/mL Protamin inkubiert. Nach Inkubation bei Raumtemperatur unter Schütteln für 10 min, werden die Lösungen in Ultrafiltrationseinheiten (Amicon Filtereinheiten, 3000 NMWL, Millipore Corporation, Bedford, USA) überführt und bei 12000 U/min bei Raumtemperatur für 15 min zentrifugiert. Das Filtrat der Lösung wird anschließend direkt mittels HPLC-DAD untersucht. Die verwendete HPLC-Methode ist unter 3.6.1 beschrieben. Als Referenz (Kontrollprobe) dient eine Lösung von 7 verdünnt mit Phosphatpuffer mit dem jeweiligen pH-Wert und nach vorheriger Ultrafiltration.

3.7 Quantitative Bestimmungen der Geschmacksstoffe in schwarzem Tee vor und nach Zugabe von Magermilchpulver

3.7.1 Flavan-3-ole

Ein Standardteegetränk (Zubereitung Kapitel 3.3) wird mit Ascorbinsäure stabilisiert (50 mg/100 mL), membranfiltriert und mittels HPLC-DAD vor und nach dem Zentrifugieren untersucht. Nach Zugabe von verschiedenen Mengen Magermilchpulver (0,1 g, 0,25 g, 0,5 g, 1,0 g und 2,0 g) zu 100 mL eines Standardteegetränkes werden die Lösungen zentrifugiert (9000 U/min, RT, 30 min), die erhaltenen Überstände membranfiltriert und ebenfalls mittels HPLC-DAD analysiert.

HPLC-System: 1

Säule	Grom Sil 120 octyl-5-CP, RP-8, 250 \times 4,6 mm, 5 μm (Grom, Rottenburg-Hailfingen)
Vorsäule	Phenomenex, RP-18, 4 \times 4 mm, 5 μm (Phenomenex Technologies, Aschaffenburg)
Eluent [A]	0,1 % Ameisensäure in Wasser
Eluent [B]	Methanol
Fluss	0,8 mL/min
Wellenlänge	270 nm

Gradient	Zeit [min]	A [%]	B [%]
	0	100	0
	65,5	40	60
	70,5	0	100

Die Quantifizierung der Flavan-3-ole erfolgt über externe Kalibrierung unter Verwendung der einzelnen Standardsubstanzen (**1-8**).

3.7.2 Purinalkaloide

Ein Standardteegetränk (Zubereitung Kapitel 3.3) wird mit Ascorbinsäure stabilisiert (50 mg/100 mL), membranfiltriert und mittels HPLC-DAD untersucht. Nach Zugabe von verschiedenen Mengen Magermilchpulver (0,1 g, 0,25 g, 0,5 g, 1,0 g und 2,0 g) zu 100 mL eines Standardteegetränkes werden die Lösungen zentrifugiert (9000 U/min, RT, 30 min), die erhaltenen Überstände werden membranfiltriert und ebenfalls mittels HPLC-DAD analysiert. Die Quantifizierung von Theobromin (**27**) und Koffein (**28**) erfolgt mittels externer Kalibrierung.

HPLC-System: 1

Säule	Grom Sil 120 octyl-5-CP, RP-8, 250 × 4,6 mm, 5 µm (Grom, Rottenburg-Hailfingen)		
Vorsäule	Phenomenex, RP-18, 4 × 4 mm, 5 µm (Phenomenex Technologies, Aschaffenburg)		
Eluent [A]	0,1 % Ameisensäure in Wasser		
Eluent [B]	Methanol		
Fluss	0,8 mL/min		
Wellenlänge	270 nm		
Gradient	Zeit [min]	A [%]	B [%]
	0	90	10
	8,5	80	20
	39,5	60	40
	44,5	0	100

3.7.3 Flavonolglykoside

Das Standardteegetränk (Zubereitung Kapitel 3.3) wird mit Ascorbinsäure stabilisiert (50 mg/100 mL), membranfiltriert und mittels LC-MS/MS untersucht. Nach Zugabe von verschiedenen Mengen Magermilchpulver (0,1 g, 0,25 g, 0,5 g, 1,0 g und 2,0 g) zu 100 mL eines Standardteegetränkes werden die Lösungen zentrifugiert (9000 U/min, RT, 30 min), die Überstände werden membranfiltriert und ebenfalls mittels LC-MS/MS analysiert.

Ionisierung	Turbo Spray Electrospray Ionization (ESI)		
Scan Type	MRM (multiple reaction monitoring)		
Polarität	negativ		
Ion Spray Voltage	-4500 V		
Curtain Gas	20 psi		
CAD	10 N ₂		
Temperatur	400 °C		
Gas 1	30 psi		
Gas 2	50 psi		
Resolution	Unit		
Auswertung	AB SCIEX, Analyst Software 1.5		
Säule	Agilent Eclipse XDB-C8, 150 x 4,6 mm, 5 µm (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)		
Vorsäule	Phenomenex, RP-18, 4 × 4 mm, 5 µm (Phenomenex Technologies, Aschaffenburg)		
Eluent [A]	Acetonitril		
Eluent [B]	0,1 % Ameisensäure in Wasser		
Fluss	250 µL/min		
Injektionsvolumen	10 µL		
Gradient	Zeit [min]	A [%]	B [%]
	0	17	83
	15	17	83
	45	30	70
	50	100	0

Die Quantifizierung der Substanzen **14-16** sowie **19-21** erfolgt anhand externer Kalibrierung über die charakteristischen Fragmentierungen (Tabelle 16).

Tabelle 16: Parameter zur massenspektrometrischen Analyse der Flavonolglykoside.

Substanz (Nr.) ^a	Massen- übergang	Massen- verlust [amu]	DP ^b [V]	CE ^c [V]	CXP ^d [V]
Kämpferol-3-O-β-D-glucopyranosid (14)	447 → 285	162	-100	-36	-15
Kämpferol-3-O-β-D-galactopyranosid (15)	447 → 285	162	-100	-36	-15
Kämpferol-3-O-[α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosid] (16)	593 → 285	208	-70	-44	-15
Kämpferol-3-O-[β-D-glucopyranosyl-(1→3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosid] (17)	755 → 285	470	-145	-58	-15
Kämpferol-3-O-[β-D-glucopyranosyl-(1→3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-β-D-galactopyranosid] (18)	755 → 285	470	-145	-58	-15
Quercetin-3-O-β-D-glucopyranosid (19)	463 → 300	163	-95	-38	-17
Quercetin-3-O-β-D-galactopyranosid (20)	463 → 300	163	-95	-38	-17
Quercetin-3-O-[α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosid] (21)	609 → 300	309	-135	-52	-21
Quercetin-3-O-[β-D-glucopyranosyl-(1→3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosid] (22)	771 → 300	471	-155	-64	-17
Quercetin-3-O-[β-D-glucopyranosyl-(1→3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-β-D-galactopyranosid] (23)	771 → 300	471	-155	-64	-17
Myricetin-3-O-β-D-glucopyranosid (24)	479 → 316	163	-105	-38	-17
Myricetin-3-O-β-D-galactopyranosid (25)	479 → 316	163	-105	-38	-17

^a Bezifferung der Substanzen bezieht sich auf die Strukturen in Abbildung 8. ^b declustering potential. ^c collision energy. ^d cell exit potential.

3.7.4 Theaflavine

Das Standardteegetränk (Zubereitung Kapitel 3.3) wird mit Ascorbinsäure stabilisiert (50 mg/100 mL), membranfiltriert und mittels LC-MS/MS untersucht. Nach Zugabe von verschiedenen Mengen Magermilchpulver (0,1 g, 0,25 g, 0,5 g, 1,0 g und 2,0 g) zu 100 mL eines Standardteegetränkes werden die Lösungen zentrifugiert (9000 U/min, RT, 30 min), die Überstände werden membranfiltriert und ebenfalls mittels LC-MS/MS analysiert. Die Quantifizierung der Theaflavine (9-13) erfolgt mittels externer Kalibrierung anhand der synthetisierten Standardsubstanzen über die charakteristischen Massenübergänge (Tabelle 17).

Ionisierung	Turbo Spray Electrospray Ionization (ESI)
Scan Type	MRM (multiple reaction monitoring)
Polarität	negativ
Ion Spray Voltage	-4500 V
Curtain Gas	20 psi
CAD	3 N ₂
Temperatur	350 °C
Gas 1	50 psi
Gas 2	60 psi
Resolution	Unit
Auswertung	AB SCIEX, Analyst Software 1.5
Säule	Phenomenex Gemini C18 110A 50 x 2,0 mm, 3µm, (Phenomenex Technologies, Aschaffenburg)
Vorsäule	Phenomenex, RP-18, 4 × 4 mm, 5 µm (Phenomenex Technologies, Aschaffenburg)
Eluent [A]	Methanol
Eluent [B]	0,1 % Ameisensäure in Wasser
Fluss	250 µL/min
Injektionsvolumen	10 µL

Gradient	Zeit [min]	A [%]	B [%]
	0	40	60
	4	40	60
	22	100	0
	25	100	0
	28	40	60

Tabelle 17: Parameter zur massenspektroskopischen Analyse der Theaflavine.

Substanz (Nr.) ^a	Massen- übergang	Massen- verlust [amu]	DP ^b [V]	CE ^c [V]	CXP ^d [V]
Theaflavinsäure (9)	427 → 227	44	-60	-30	-4
Theaflavin (10)	563 → 241	322	-135	-36	-4
Theaflavin-3-gallat (11)	715 → 125	590	-85	-66	-2
Theaflavin-3'-gallat (12)	715 → 125	590	-85	-66	-2
Theaflavin-3,3'-digallat (13)	867 → 125	742	-85	-94	0

^a Bezifferung der Substanzen bezieht sich die Strukturen in Abbildung 6. ^b declustering potential. ^c collision energy. ^d cell exit potential.

3.8 Sensorische Analyse

Für die humansensorischen Experimente wird kommerziell erhältlich Mineralwasser (Evian[®], pH 7) verwendet, welches in der sensorischen Untersuchung keine eigene Adstringenz aufweist. Die Verkostung wird in einem Sensoriklabor bei 18-22 °C durchgeführt.

3.8.1 Sensorikpanel

Das Sensorikpanel setzt sich zusammen aus zwölf Teilnehmern (acht Frauen und vier Männer, 24-33 Jahre, Mitarbeiter des Lehrstuhls der Lebensmittelchemie und molekulare Sensorik in Freising). Den Prüfern werden zur Referenz und zur Schulung der Geschmackseindrücke süß, sauer, salzig, umami, bitter sowie adstringierend folgende Standardsubstanzen gereicht (Tabelle 18).

Tabelle 18: Übersicht der zur sensorischen Schulung verwendeten Referenzsubstanzen und die dazugehörigen Konzentrationen.

Geschmacksqualität	Substanz	Konzentration [mmol/L]
Süß	Saccharose	50,0
Sauer	Milchsäure	20,0
Salzig	Natriumchlorid	12,0
Umami	Natriumglutamat	0,03
Bitter	Koffein	1,0
Adstringierend, rauh	Tannin	0,05 %
Adstringierend, samtig	Quercetin-3-O- β -D-glucopyranosid	0,002

3.8.2 Geschmacksprofilanalyse

Die gereichten Standardteegetränke (Zubereitung Kapitel 3.3) werden vom geschulten Sensorikpanel in den einzelnen Geschmacksqualitäten süß, sauer, salzig, umami, bitter und adstringierend beurteilt. Dazu bewerten die Panelisten die Intensitäten der Geschmacksqualitäten auf einer Skala von 0 (kein Geschmackseindruck wahrnehmbar) bis 5 (starker Geschmackseindruck wahrnehmbar).

3.8.3 Vergleichende Geschmacksprofilanalyse

3.8.3.1 Zusatz von Magermilchpulver zum Standardteegetränk

Vergleichende Geschmacksprofilanalysen für die Geschmacksqualitäten adstringierend, bitter und süß werden durchgeführt indem die mit verschiedenen Konzentrationen Magermilchpulver versetzten Standardteegetränke (Zubereitung Kapitel 3.4.1) im Vergleich zu einem unbehandelten Standardteegetränk verkostet werden. Das Sensorikpanel beurteilt die Intensitäten der drei Geschmacksqualitäten mit Hilfe eines vergleichenden Duotestes auf einer Skala von 0 (Geschmackseindruck nicht detektierbar) bis 5 (Geschmackseindruck stark detektierbar).

3.8.3.2 Zusatz von Laktose zum Standardteegetränk

Die mit unterschiedlichen Konzentrationen Laktose behandelten Standardteegetränke (Zubereitung Kapitel 3.4.2) werden ebenfalls mittels vergleichendem Duotest für die Geschmacksqualitäten adstringierend, bitter und süß bewertet. Die Intensitäten dieser Zubereitungen werden auf einer Skala von 0 (kein Geschmackseindruck wahrnehmbar) bis 5 (Geschmackseindruck stark wahrnehmbar) im Vergleich zu einem nicht behandelten Standardteegetränk beurteilt.

3.8.4 Erstellen und sensorische Beurteilung von Rekombinaten

Das Geschmacksrekombinat von schwarzem Tee sowie das Geschmacksrekombinat, der Geschmacksstoffe, die in einem Teegetränk nach Zugabe von Magermilchpulver (2,0 g/100 mL) bestimmt werden konnten, wird erstellt, indem alle in Tabelle A1 und in Tabelle A3 aufgeführten Substanzen in den für ein Standardteegetränk mit und ohne Additive analysierten Konzentrationen verwendet werden. Alle Substanzen werden in mineralstoffarmem Wasser gelöst. Die Lösungen werden anschließend zeitnah in einem vergleichenden Duotest analysiert. Dabei bewertet das Sensorikpanel die Intensitäten der verschiedenen Geschmacksqualitäten auf einer Skala von 0 (kein Geschmackseindruck wahrnehmbar) bis 5 (Geschmackseindruck stark wahrnehmbar).

3.9 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

HPLC-System 1 (analytisch)

Hochdruckpumpe	Jasco PU-2087 Plus (Jasco, Labor- und Datentechnik GmbH Deutschland, Groß-Umstadt)
Autosampler	Jasco AS-2055 Plus (Jasco, Labor- und Datentechnik GmbH Deutschland, Groß-Umstadt)
Degaser	Jasco DG-2080-53 (Jasco, Labor- und Datentechnik GmbH Deutschland, Groß-Umstadt)
Detektor	Jasco MD-2010 (DAD) (Jasco, Labor- und Datentechnik GmbH Deutschland, Groß-Umstadt)

HPLC-System 2 (analytisch und semipräparativ)

Hochdruckpumpe	Jasco PU-2087 Plus (Jasco, Labor- und Datentechnik GmbH Deutschland, Groß-Umstadt)
Autosampler	Jasco AS-2055 Plus (Jasco, Labor- und Datentechnik GmbH Deutschland, Groß-Umstadt)
Injektionsventil	Rh 7725i (Rheodyne, Bensheim)
Degaser	Jasco DG-2080-53 (Jasco, Labor- und Datentechnik GmbH Deutschland, Groß-Umstadt)
Detektor	Jasco UV-2075 Plus (Jasco, Labor- und Datentechnik GmbH Deutschland, Groß-Umstadt)

HPLC-System 3 (analytisch)

Niederdruckpumpe	Jasco PU-2080-ND (Jasco, Labor- und Datentechnik GmbH Deutschland, Groß-Umstadt)
Autosampler	Jasco AS-2055 Plus (Jasco, Labor- und Datentechnik GmbH Deutschland, Groß-Umstadt)
Injektionsventil	Rh 7725i (Rheodyne, Bensheim)
Degaser	Jasco DG-2080-53 (Jasco, Labor- und Datentechnik GmbH Deutschland, Groß-Umstadt)
Detektor	Jasco MD-2010 (DAD) (Jasco, Labor- und Datentechnik GmbH Deutschland, Groß-Umstadt)

3.10 Spektroskopische Methoden

3.10.1 UV/Vis Spektroskopie

Das Monitoring der UV-Spektren erfolgt während der Reversed-Phase-Chromatographie mit einem Jasco MD-2010 Diodenarraydetektor.

3.10.2 Hochdruckflüssigkeitschromatographie/Massenspektrometrie (LC/MS)

Spektrometer	API 3200 LC-/MS/MS (AB SCIEX, Foster City, Kalifornien, USA)
Ionisierung	Turbo Spray Electrospray Ionization (ESI)
Scan Type	MRM (multiple reaction monitoring)
Polarität	negativ
Hochdruckpumpe	HPLC Agilent 1100 series (Agilent Technologies, Santa Clara, United States)
Autosampler	HPLC Agilent 1200 series (Agilent Technologies, Santa Clara, United States)
Säulenofen	Agilent 1200 series (Agilent Technologies, Santa Clara, United States)
Flussrate	250 μ L/min
Injektionsvolumen	10 μ L
Software	AB SCIEX, Analyst Software 1.5

3.10.3 Kernresonanzspektroskopie

Die synthetisierten Theaflavinstandardsubstanzen werden in CD_3COCD_3 (Euroiso-Top, Gif-sur-Yvette, Frankreich) gelöst, in NMR-Röhrchen (178 x 5 mm, Norell, Landisville, USA) überführt und bei 298 K vermessen. Die Aufnahme der Kernresonanzspektren erfolgt an einem DRX 400-MHz Spektrometer (Bruker BioSpin, Rheinstetten) sowie an einem 500 MHz Gerät (Avance III, Bruker BioSpin, Rheinstetten). Die chemische Verschiebung wird bei allen Proben auf das Lösungsmittel referenziert. Zur Datenprozessierung wird die Top Spin Software (Version 2.1, Bruker, Rheinstetten) verwendet, die Auswertung der Spektren erfolgt rechnerunterstützt durch das Programm MestReNova V. 5.1.0 (Mestrelab Research, La Coruña, Spanien).

3.10.3.1 $^1\text{H-NMR}$

Die $^1\text{H-NMR}$ -Messungen werden am 500 MHz Gerät durchgeführt. Das Experiment gibt Aufschluss über die Intensität und chemische Verschiebung der Protonen, sowie die Anzahl der Nachbarprotonen anhand der jeweiligen Aufspaltung.

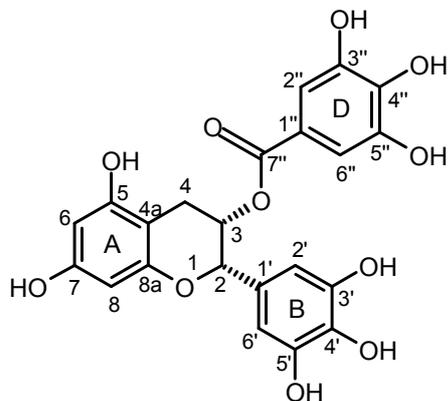
3.10.3.2 STD-NMR

Das von MEYER und Kollegen entwickelte STD („Sättigungs-Transfer-Differenz“) NMR Verfahren ermöglicht die Charakterisierung der Interaktion eines Liganden mit dem Protein. Das Protein wird hierbei nicht direkt beobachtet. Der Fokus der Messung liegt vielmehr auf den NMR Spektren der in Lösung vorliegenden Liganden. Als Ergebnis erhält man die funktionellen Gruppen des Liganden, die mit dem Protein wechselwirken.

Das STD NMR Verfahren basiert auf einer Sättigung des Proteins, die selektiv lediglich die Proteinsignale treffen darf. Hierzu wird die maximale Leistung auf ein Proteinsignal selektiv eingestrahlt. Diese Signale befinden sich üblicherweise im Bereich von etwa -1 ppm oder, sollten die Liganden keine aromatischen Signale haben, auch im Bereich von etwa 8 -10 ppm. Diese Einstrahlung führt dazu, dass das Protein innerhalb weniger Millisekunden vollständig gesättigt wird. Die Bindung der Liganden an das Protein führt jetzt zur Interaktion mit einem gesättigten Protein, welches die Sättigung an den gebundenen Liganden ebenfalls im Zeitraum von etwa 10 – 20 Millisekunden weitergibt. Hier werden im Liganden vorzugsweise die Protonen gesättigt, die einen engen Kontakt mit dem Protein haben. Nach Dissoziation dieses Liganden in den gelösten Zustand sind diese Signale im NMR Spektrum als Signale eines kleinen Moleküls, jedoch mit variabler Intensität, die durch die vom Protein übertragene Sättigung entstand, erkennbar. Durch den permanenten Austausch zwischen gebundenem und gelöstem Zustand werden in einem großen Bereich von Bindungsaffinitäten die Liganden nach kurzer Kontaktzeit mit dem Protein wieder in Lösung abgegeben. Die Information wie ein Ligand an das Protein bindet wird vielfach verstärkt, da während des Messvorganges viele Liganden diesen Zyklus durchlaufen und dann in Lösung ihre Information über den gebundenen Zustand erhalten (MEYER, 2006).

Zur Durchführung der Bindungsstudien von (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**7**) und β -Casein mit Hilfe von STD-NMR Spektroskopie wird eine Lösung von **7** (5 $\mu\text{mol/L}$) in Phosphatpuffer (0,1 mol/L Na_2HPO_4 in D_2O , pD 6) hergestellt. 1 mg und 2 mg β -Casein werden in 500 μL des Phosphatpuffers (0,1 mol/L Na_2HPO_4 in D_2O , pD 6) gelöst und zu 500 μL der (-)-Epigallocatechin-3-gallatlösung dazugegeben. Exakt 600 μL der so

hergestellten Lösungen sowie eine (-)-Epigallocatechin-3-gallatlösung als Referenz werden in NMR Röhren (178 x 5 mm, Norell, Landisville, USA) überführt und am Bruker DRX 400-MHz Spektrometer (Bruker BioSpin, Rheinstetten) bei 300 K gemessen. Zur Datenprozessierung wird die Top Spin Software (Version 2.1, Bruker, Rheinstetten) verwendet.



Epigallocatechin-3-gallat (7): $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): δ [ppm]: 2,95 [ddd, 2H, $J = 2,7, 17,2, 18,0$ Hz H-C(4a,b)], 4,71 [s, 1H, H-C(2)], 5,09 [s, 1H, H-C(3)], 5,58 [s, 2H, H-C(6,8)], 6,55 [s, 2H, H-C(2',6')], 6,90 [s, 2H, H-C(2'',6'')].

4 Zusammenfassung

Aufgrund des erfrischenden, leicht bitteren und adstringierenden Geschmacks wächst neben dem frisch zubereiteten Teegetränk der Marktanteil an in Flaschen oder Dosen abgefüllten Teegetränken. Diese „Ready-to-Drink“ Zubereitungen enthalten in der Regel Additive in Form von Milchzusätzen, die das Geschmacksprofil im Vergleich zu dem eines frisch zubereiteten Teegetränks deutlich beeinflussen. Auf Basis publizierter Daten zu geschmacksaktiven Inhaltsstoffen der Pflanze *Camellia sinensis* wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit deshalb der Einfluss von Milch- und Proteinzusätzen auf bittere und adstringierende Teegeschmacksstoffe untersucht.

Unter Zuhilfenahme instrumenteller Methodiken wie HPLC-DAD- bzw. HPLC-MS/MS-Analysen gelang zu Beginn der Arbeit die Charakterisierung der am adstringierenden und bitteren Geschmack maßgeblich beteiligten Geschmacksstoffe in schwarzem Tee vor bzw. nach Zugabe von Milchproteinen. Zur Verifizierung der sensorischen und instrumentellen Daten wurden die einzelnen Geschmacksstoffe auf der Basis von Dosis/Wirkungs-Überlegungen in dem Geschmacksbeitrag gewichtet und als „proof of concept“ Rekombinationsexperimente durchgeführt. Es konnten die Flavan-3-ole (-)-Epicatechin, (-)-Catechin, (-)-Epicatechin-3-gallat, (-)-Catechin-3-gallat, (-)-Epigallocatechin und (-)-Epigallocatechin-3-gallat, die Purinalkaloide Theobromin und Koffein, die Flavon-3-olglykoside Kämpferol-3-O- β -D-glucopyranosid, Kämpferol-3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosid], Quercetin-3-O- β -D-glucopyranosid, Quercetin-3-O- β -D-galactopyranosid und Quercetin-3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosid] sowie die Theaflavine Theaflavin-3-gallat, Theaflavin-3'-gallat und Theaflavin-3,3'-digallat als Schlüsselgeschmacksstoffe eines vollfermentierten schwarzen Tees bestimmt werden. Die Untersuchung des Einflusses der Milchproteine auf die Geschmacksmodalitäten bitter und adstringierend ermöglichte zudem die Charakterisierung der Schlüsselbindungspartner aus der Gruppe der Polyphenole. Durch Kombination instrumentell-analytischer und sensorischer Methodiken konnte deutlich gezeigt werden, dass die galloylierten Flavan-3-ole (-)-Epicatechin-3-gallat, (-)-Catechin-3-gallat, (-)-Epigallocatechin-3-gallat sowie (-)-Epigallocatechin und die galloylierten Theaflavinderivate Theaflavin-3-gallat, Theaflavin-3'-gallat und Theaflavin-3,3'-digallat als Schlüsselbindungspartner bei der Interaktion dieser Polyphenole mit Milchproteinen fungieren und somit die Veränderung des Geschmacks nach Milchzugabe bewirken.

Nach erfolgreicher Charakterisierung der an Protein/Polyphenol-Wechselwirkungen beteiligten Geschmacksstoffe im Teegetränk wurde das Bindungsverhalten dieser phenolischen Verbindungen sowie weiterer strukturell verwandter Substanzen anhand von Bindungskurven und der Bestimmung der halbmaximalen Bindungskonzentration (BC_{50} -Wert) unter Verwendung einer neu entwickelten Methode der Amino-Functionalized Magnetic Beads untersucht. Studien zu Struktur/Wirkungszusammenhängen ermöglichten die Untersuchung des Einflusses der Polyphenol- sowie der Proteinstruktur während der Interaktion. In Übereinstimmung mit der Literatur konnte das Auftreten mindestens einer galloylierten Moleküleinheit des Liganden als ein wesentliches Strukturelement nachgewiesen werden. Die Schlüsselbedeutung dieses Strukturcharakteristikums wurde anschließend mit Hilfe der STD-NMR Kernresonanzspektroskopie validiert. Hierbei zeigte sich, dass bei der Wechselwirkung eines galloylierten Flavan-3-ols mit einem Milchprotein die Protonen des B- und des D-Rings des Polyphenols an der Bindung beteiligt sind.

Um die vielschichtigen Interaktionen zwischen Proteinen und Polyphenolen aufzuzeigen, wurden Modellreaktionen mit ausgewählten Polyaminosäuren wie Polyglycin, Polyalanin, Polyprolin, Polyasparaginsäure, Polyarginin, Polyhistidin und Polyamid durchgeführt. Im Fokus der Arbeit stand hierbei die Fragestellung, ob es sich bei Protein/Polyphenol-Interaktionen um Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe Wechselwirkungen oder kovalente bzw. ionische Bindungen handelt. Es konnte in Einzelbindungsreaktionen demonstriert werden, dass der pH-Wert der Modellstudien nicht nur den Protonierungsstatus der Polyaminosäuren, sondern auch den der untersuchten vier Polyphenole (-)-Epicatechin, (-)-Epigallocatechin-3-gallat, Gallussäure sowie Methylgallat und somit auch ihre Bindungsaffinität beeinflusst. Das Interagieren der deprotonierten Form eines Polyphenols wie beispielsweise (-)-Epigallocatechin-3-gallat mit dem Polykation der basischen Polyaminosäuren im neutralen Medium der Modelllösung sowie das Ausbleiben einer Wechselwirkung mit dem Polyanion einer sauren Polyaminosäure brachte die Bedeutung von ionischen Bindungen zum Ausdruck. Bestätigende Ergebnisse lieferten ferner vertiefende pH-Studien von (-)-Epigallocatechin-3-gallat mit dem basischen Peptid Protamin. Zusätzlich zu ionischen Bindungen leisteten Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Hydroxygruppen der undissoziierten Form eines Polyphenols und der Carbonylfunktion einer unpolaren Aminosäure wie Prolin einen entscheidenden Beitrag zu Protein/Polyphenol-Interaktion. Die Bedeutung der Wasserstoffbrückenbindungen wurde weiterhin durch Bindungsexperimente mit Polyamid verifiziert. Modellstudien von (-)-Epicatechin und

(-)-Epigallocatechin-3-gallat mit Polyhistidin und Polyprolin beleuchteten zugleich, dass Protein/Polyphenol-Interaktionen durch hydrophobe Wechselwirkungen unterstützt werden können. So zeigte (-)-Epicatechin bei der Interaktion mit Polyhistidin eine höhere Bindungsaffinität im Vergleich zu Polyprolin. Auch das Auftreten einer zusätzlichen Galloyleinheit im Molekül des Polyphenols wie etwa bei (-)-Epigallocatechin-3-gallat begünstigte die Bindungsaffinität durch das Auftreten hydrophober Wechselwirkungen positiv.

Beim Interagieren der phenolischen Tee geschmacksstoffe mit Milchproteinen findet folglich ein pH-abhängiges Zusammenspiel aus ionischen Bindungen, Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophoben Wechselwirkungen statt.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Struktur/Wirkungs-Studien zu Protein/Polyphenol-Wechselwirkungen liefern wichtige molekulare Einblicke zur Beeinflussung des Geschmacks von Teegetränken durch Milchzusätze und erlauben den Erkenntnistransfer auf andere polyphenolhaltige Lebensmittel sowie funktionelle Getränke.

5 Literatur

Adler, E.; Hoon, M. A.; Mueller, K. L.; Chandrashekar, J.; Ryba, N. J. P.; Zucker, C. S. A novel family of mammalian taste receptors. *Cell* **2000**, *100*, 693-702.

Bachmanov, A. A.; Beauchamp, G. K. Taste receptor genes. *Annu. Rev. Nutr.* **2007**, *27*, 389-414.

Bajec, M. R.; Pickering, G. J. Astringency: Mechanisms and Perception. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2008**, *48*, 858-875.

Bate-Smith, E. C. Astringency in foods. *Food.* **1954**, *23*, 124-127.

Bate-Smith, E. C.; Swain, T. Flavanoid compounds. *Comparative Biochemistry Academic Press, New York*, **1962**, 755-809.

Baxter, N. J.; Lilley T. H.; Haslam, E.; Williamson, M. P. Multiple interactions between polyphenols and a salivary proline-rich protein repeat result in complexation and precipitation. *Biochemistry* **1997**, *36*, 5566-5577.

Behrens, M.; Brockhoff, A.; Kuhn, C.; Bufe, B.; Winnig, M.; Meyerhof, W. The human taste receptor hTAS2R14 responds to a variety of different bitter compounds. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *319*, 479-485.

Behrens, M.; Foerster, S.; Staehler, F.; Raguse, J.-D.; Meyerhof, W. Gustatory expression pattern of the human TAS2R bitter receptor gene family reveals a heterogenous population of bitter responsive taste receptor cells. *J. Neurosci.* **2007**, *27*, 12630-12640.

Behrens, M.; Meyerhof, W. Bitter taste receptors and human bitter taste perception. *Cell. Mol. Life Sci.* **2006**, *63*, 1501-1509.

Beltrán, J. L.; Sanli, N.; Fonrodona, G.; Barrón, D.; Özkan, G.; Barbosa, J. Spectrophotometric, potentiometric and chromatographic pK_a values of polyphenolic acids in water and acetonitrile-water media. *Anal. Chim. Acta* **2003**, *484*, 253-264.

Belitz, H.-D.; Grosch, W.; Schieberle, P. Lehrbuch der Lebensmittelchemie, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, **2001**.

Bennick, A. Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* **2002**, *13*, 184-196.

Bokuchava, M. A.; Skobeleva, N. I. The biochemistry and technology of tea manufacture. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1980**, *12*, 303-370.

Böhm, H.-J.; Schneider, J. Protein-ligand-interactions. From molecular recognition to drug design, Wiley VCH Verlag, Weinheim, **2003**.

Brockhoff, A.; Behrens, M.; Massarotti, A.; Appendino, G.; Meyerhof, W. Broad tuning of the human bitter taste receptor hTAS2R46 to various sesquiterpene lactones, clerodane and labdane diterpenoids, strychnine, and denatonium. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 6236-6243.

Bronner, W. E.; Beecher, G. R. Method for determining the content of catechins in tea infusions by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **1998**, *805*, 137-142.

Brown, P. J.; Wright, W. B. An investigation of the interactions between milk proteins and tea polyphenols. *J. Chromatogr., II* **1963**, 504-514.

Bryce, T.; Collier, P. D.; Fowles, I.; Thomas, P. E.; Frost, D.; Wilkins, C. K. The structures of the theaflavins of black tea. *Tetrahedron Letters* **1970**, *32*, 2789-2792.

Bufe, B.; Hofmann, T.; Krautwurst, D.; Raguse, J.-D.; Meyerhof, W. The human TAS2R16 receptor mediates bitter taste in response to β -glucopyranosides. *Nat. Genet.* **2002**, *32*, 397-401.

Bufe, B.; Breslin, P. A. S.; Kuhn, C.; Reed, D. R.; Tharp, C. D.; Slack, J. P.; Kim, U.-K.; Drayna, D.; Meyerhof, W. The molecular basis of individual differences in phenylthiocarbamide and propylthiouracil bitterness perception. *Curr. Biol.* **2005**, *15*, 322-327.

Chandrashekar, J.; Mueller, K. L.; Hoon, M. A.; Adler, E.; Feng, L.; Guo, W.; Zuker, C. S.; Ryba, N. J. P. T2Rs function as bitter taste receptors. *Cell* **2000**, *100*, 703-711.

Charlton, A. J.; Baxter, N. J.; Lokman Khan, M.; Moir, A. J. G.; Haslam, E.; Davies, A. P.; Williamson, M. P. Polyphenol/peptide binding and precipitation. *J. Agric. Food Chem.* **2002a**, *50*, 1593-1601.

Charlton, A. J.; Haslam, E.; Williamson, M. P. Multiple conformations of the proline-rich protein/epigallocatechin gallate complex determined by time-averaged nuclear overhauser effects. *J. Am. Chem. Soc.* **2002b**, *124*, 9899-9905.

Chaudhari, N.; Roper, S. The cell biology of taste. *J. Cell Biol.* **2010**, *190*, 285-296.

Claasen, B.; Axmann, M.; Meinecke, R.; Meyer, B. Direct observation of ligand binding to membrane proteins in living cells by a saturation transfer double difference (STDD) NMR spectroscopy method shows a significantly higher affinity of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ in native platelets than in liposomes. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 916-919.

Czepa, A.; Hofmann, T. Structural and sensory characterization of compounds contributing to the bitter off-taste of carrots (*Daucus carota* L.) and carrot puree. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 3865-3873.

Del Rio, D.; Stewart, A. J.; Mullen, W.; Burns, J.; Lean, M. E. J.; Brighenti, F.; Crozier, A. HPLC-MSⁿ analysis of phenolic compounds and purine alkaloids in green and black tea. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 2807-2815.

Ding, Z.; Kuhr, S.; Engelhardt, U. H. Influence of catechins and theaflavins on the astringent taste of black tea brews. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1992**, *195*, 108-111.

Engelhardt, U. H.; Finger, A.; Herzig, B.; Kuhr, S. Determination of flavonol glycosides in black tea. *Dtsch. Lebensm. Rundschau* **1992**, *88*, 69-73.

Feldheim, W. Lebensmitteluntersuchung und Lebensmitteltechnologie: Tee und Tee-Erzeugnisse, Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin, **1994**.

Ferruzzi, M. G.; Green, R. J. Analysis of catechins from milk-tea beverages by enzyme assisted extraction followed by high performance liquid chromatography. *Food Chem.* **2006**, *99*, 484-491.

Finger, A.; Kuhr, S.; Engelhardt, U. H. Chromatography of tea constituents. *J. Chromatogr.* **1992**, *624*, 293-315.

Frank, O.; Ottinger, H.; Hofmann, T. Characterization of an intense bitter-tasting 1*H*,4*H*-Quinolizinium-7-olate by application of the taste dilution analysis, a novel bioassay for the screening and the identification of taste-active compounds in foods. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 231-238.

Gilbertson, T. A.; Damak, S.; Margolskee, R. F. The molecular physiology of taste transduction. *Curr. Opin. Neurobiolog.* **2000**, *10*, 519-527.

Grisebach, H.; Barz, W. Biochemie der Flavonoide. *Naturwissenschaften* **1969**, *11*, 538-544.

Hagerman, A. E.; Butler, L. G. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 4494-4497.

Hagerman, A. E.; Rice, M. E.; Ritchard, N. T. Mechanisms of protein precipitation for two tannins, pentagalloyl glucose and epicatechin₁₆ (4→8)-catechin (procyanidin). *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 2590-2595.

Haseleu, G.; Intelmann, D.; Hofmann, T. Structure determination and sensory evaluation of novel bitter compounds formed from β -acids of hop (*Humulus lupulus* L.) upon wort boiling *Food Chem.* **2009**, *116*, 71-81.

Häkkinen, L.; Uitto, V.-J.; Larjava, H. Cell biology of gingival wound healing. *Periodontol.* **2000**, *24*, 127-152.

Hayashi, N.; Ujihara, T.; Kohata, K. Binding energy of tea catechin/caffeine complexes in water evaluated by titration experiments with ¹H-NMR. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2004**, *68*, 2512-2518.

Henze, A. Geschmacksstoffe und Geschmacksmodulatoren in grünem Tee (*Camellia sinensis* L.). Verlag Dr. Hut, München, **2009**.

Hildebrandt, G. Geschmackswelten. Grundlagen der Lebensmittelsensorik. DLG-Verlag, Frankfurt am Main, **2008**.

Hofmann, T.; Glabasnia, A.; Schwarz, B.; Wisman, K. N.; Gangwer, K. A.; Hagerman, A. E. Protein binding and astringent taste of a polymeric procyanidin, 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-beta-D-glucopyranose, castalagin, and grandinin. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 9503-9509.

Intelmann, D.; Batram, C.; Kuhn, C.; Haseleu, G.; Meyerhof, W.; Hofmann, T. Three TAS2R bitter taste receptors mediate the psychophysical responses to bitter compounds of hops (*Humulus lupulus* L.) and beer. *Chem. Percept.* **2009**, *2*, 118-132.

Ishimaru, Y.; Inada, H.; Kubota, M.; Zhuang, H.; Tominaga, M.; Matsunami, H. Transient receptor potential family members PKD1L3 and PKD2L1 form a candidate sour taste receptor. *PNAS*, **2006**, *103*, 12569-12574.

Joslyn, M. A.; Goldstein, J. L. Astringency of fruits and fruit products in relation to phenolic content. *Adv. Food Res.* **1964**, *13*, 179-217.

Jöbstl, E.; Howse, J. R.; Fairclough, P. A.; Williamson, M. P. Noncovalent cross-linking of casein by epigallocatechin gallate characterized by single molecule force microscopy. *J. Agric. Food Chem.* **2004a**, *54*, 4077-4081.

Jöbstl, E.; O'Connell, J.; Fairclough, P. A.; Williamson, M. P. Molecular model for astringency produced by polyphenol/protein interactions. *Biomacromolecules* **2004b**, *5*, 942-949.

Kallithraka, S.; Bakker, J.; Clifford, M. N. Evidence that salivary proteins are involved in astringency. *J. Sens. Stud.* **1998**, *13*, 29-43.

Kuhn, C.; Bufe, B.; Winnig, M.; Hofmann, T.; Frank, O.; Behrens, M.; Lewtschenko, T.; Slack, J. P.; Ward, C. D.; Meyerhof, W. Bitter taste receptors for saccharin and acesulfam K. *J. Neurosci.* **2004**, *24*, 10260-10265.

Kuhnert, N. Unraveling the structure of the black tea thearubigins. *Arch. Biochem. Biophys.* **2010**, *501*, 37-51.

Lagemann, A. Molekulare Charakterisierung von Geschmacksstoffen und ACE-Inhibitoren in Spinat (*Spinacia oleracea*) und anderen Blattgemüsen. Verlag Dr. Hut, München, **2010**.

Lindemann, B. Receptors and transduction in taste. *Nature* **2001**, *413*, 219-225.

Luck, G.; Liao, H.; Murray, N. J.; Grimmer, H.R.; Warminski, E. E.; Williamson, M.P.; Lilley, T. H.; Haslam, E. Polyphenols, astringency and proline-rich proteins. *Phytochem.* **1994**, *37*, 357-371.

Matsunami, H.; Montmayeur, J.-P.; Buck, L. B. A family of candidate taste receptors in human and mouse. *Nature* **2000**, *404*, 601-604.

Maurer, T. NMR-studies of protein-ligand interactions. In *Protein-Ligand Interactions: Methods and Applications*; Nienhaus, G. U. Humana Press Inc., Totowa, NJ, **2005**, 197-213.

Mayer, M.; Meyer, B. Characterization of ligand binding by saturation transfer difference NMR spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1784-1788.

Mayer, M.; Meyer, B. Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6108-6117.

Meyer, B. Charakterisierung und Optimierung der Ligand-Rezeptor-Interaktion von Oligosacchariden, Glykokonjugaten und Peptiden sowie deren Mimetika. Chemiedozententagung der Gesellschaft Deutscher Chemiker e. V. **2006**, S. 47-48.

Meyerhof, W.; Bartram, C.; Kuhn, C.; Brockhoff, A.; Chudoba, E.; Bufe, B.; Appendino, G.; Behrens, M. The molecular receptive ranges of human TAS2R bitter taste receptors. *Chem. Senses* **2010**, *35*, 157-170.

Millin, D. J.; Crispin, D. J.; Swaine, D. Nonvolatile components of black tea and their contribution to the character of the beverage. *J. Agric. Food Chem.* **1969**, *49*, 717-721.

Mitani, S.; Ouchi, A.; Watanabe, E.; Kanesaki, Y.; Nagaoka, S.-I.; Mukai, K. Stopped-flow kinetic study of the aroxyl radical-scavenging action of catechins and vitamin C in ethanol and micellar solutions. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 4406-4417.

Mukai, K.; Mitani, S.; Ohara, K.; Nagaoka, S.-I. Structure-activity relationship of the tocopherol-regeneration reaction by catechins. *Free Radical Biol. Med.* **2005**, *38*, 1243-1256.

Murray, N. J.; Williamson, M. P.; Lilley, T. H.; Haslam, E. Study of the interaction between salivary proline-rich proteins and a polyphenol by ¹H-NMR spectroscopy. *Eur. J. Biochem.* **1994**, *219*, 923-935.

Muzolf, M.; Szymusiak, H.; Gliszczynska-Swiglo, A.; Rietjens, I. M. C. M.; Tyrakowska, B. pH dependent radical scavenging capacity of green tea catechins. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 816-823.

Navarro-Perán, E.; Cabezas-Herrera, J.; Hiner, A. N. P.; Sadunishvili, T.; García-Cánovas, F.; Rodríguez-López, J. N. Kinetics of the inhibition of bovine liver dihydrofolate reductase by tea catechins: origin of slow-binding inhibition and pH studies. *Biochemistry* **2005**, *44*, 7512-7525.

Nishimura, M.; Ishiyama, K.; Watanabe, A.; Kawano, S.; Miyase, T.; Sano, M. Determination of theaflavins including methylated theaflavins in black tea leaves by solid-phase extraction and HPLC analysis. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 7252-7257.

Papadopoulou, A.; Frazier, R. A. Characterization of protein-polyphenol interactions. *TFIS* **2004**, *15*, 186-190.

Peleg, H.; Gacon, K.; Schlich, P.; Noble, A. C. Bitterness and astringency of flavan-3-ol monomers, dimers and trimers. *J. Sci. Food Agric.* **1999**, *79*, 1123-1128.

Pronin, A. N.; Tang, H.; Connor, J.; Keung, W. Identification of ligands for two human bitter T2R receptors. *Chem. Senses* **2004**, *29*, 583-593.

Proteindatenbank: EXPASy (Expert Protein Analysis System) Proteomics Server of Swiss Institute of Bioinformatics (SIB), **2010**.

Punyasiri, P. A. N.; Abeysinghe, I. S. B.; Kumar, V.; Trutter, D.; Duy, D.; Gosch, C.; Martens, S.; Forkmann, G.; Fischer, T. C. Flavonoid biosynthesis in the tea plant *Camellia sinensis*: properties of enzymes of the prominent epicatechin and catechin pathways. *Arch. Biochem. Biophys.* **2004**, *431*, 22-30.

Rawel, H. M.; Meidtner, K.; Kroll, J. Binding of selected phenolic compounds to proteins. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4228-4235.

Roberts, E. A. H.; Cartwright, R. A.; Wood, D. J. The flavonols of tea. *J. Sci. Food Agric.* **1956**, *7*, 637-646.

Roberts, E. A. H.; Cartwright, R. A.; Oldschool, M. The phenolic substances of manufactured tea. I. Fractionation and paper chromatography of water-soluble substances. *J. Sci. Food Agric.* **1957**, *8*, 72-80.

Roberts, E. A. H. The phenolic substances of manufactured tea. II. Their origin as enzymic oxidation products in fermentation. *J. Sci. Food Agric.* **1958**, *9*, 212-216.

Roberts, E. A. H.; Myers, M. The phenolic substances of manufactured tea. VI. The preparation of theaflavin and of theaflavin gallate. *J. Sci. Food Agric.* **1959**, *10*, 176-179.

Robertson, A.; Bendall, D. S. Production and HPLC analysis of black tea theaflavins and thearubigins during *in vitro* oxidation. *Phytochem.* **1983**, *4*, 883-887.

Sandell, M. A.; Breslin, P. A. S. Variability in a taste-receptor gene determines whether we taste toxins in food. *Curr. Biol.* **2006**, *16*, R792-R794.

Sanli, N.; Fonrodona, G.; Barrón, D.; Özkan, G.; Barbosa, J. Prediction of chromatographic retention, pK_a values and optimization of the separation of polyphenolic acids in strawberries. *J. Chromatogr. A* **2002**, *975*, 299-309.

Scharbert, S.; Holzmann, N.; Hofmann, T. Identification of the astringent taste compounds in black tea infusions by combining instrumental analysis and human bioresponse. *J. Agric. Food Chem.* **2004a**, *52*, 3498-3508.

Scharbert, S.; Jezussek, M.; Hofmann, T. Evaluation of the taste contribution of theaflavins in black tea infusions using the taste activity concept. *Eur. Food Res. Technol.* **2004b**, *218*, 442-447.

Scharbert, S. Molekulare Objektivierung des Geschmacks von schwarzem Tee. Verlag Dr. Hut, München, **2005**.

Scharbert, S.; Hofmann, T. Molecular definition of black tea taste by means of quantitative studies, taste reconstitution, and omission experiments. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 5377-5384.

Schiffman, S. S.; Suggs, M. S.; Simon, S. A. Astringent compounds suppress taste responses in gerbil. *Brain Res.* **1992**, *595*, 1-11.

Schlichtherle-Cerny, H.; Grosch, W. Evaluation of taste compounds of stewed beef juice. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* **1998**, *207*, 369–376.

Schwarz, B.; Hofmann, T. Is there a direct relationship between oral astringency and human salivary protein binding? *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, *227*, 1693-1698.

Siebert, K. J.; Troukhanova, N. V.; Lynn P. Y. Nature of polyphenol-protein interactions. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 80-85.

Siebert, K. J. Effects of protein-polyphenol interactions on beverage haze, stabilization, and analysis. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 353-362.

Simon, S. A.; Hall, W. L.; Schiffman, S. S. Astringent-tasting compounds alter ion transport across isolated canine lingual epithelia. *Pharm. Biochem. Behav.* **1992**, *43*, 271-283.

Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goeke, N. M.; Olson, B. J.; Klenk, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **1985**, *150*, 76-85.

Spencer, C. M.; Cai, Y.; Russel, M.; Gaffney, S. H.; Goulding, P. N.; Magnolato, D.; Lilley, T. H.; Haslam, E. Polyphenol complexation – some thoughts and observations. *Phytochem.* **1988**, *27*, 2397-2409.

Stark, T.; Hofmann, T. Structures, sensory activity, and dose/response functions of 2,5-diketopiperazines in roasted cocoa nibs (*Theobroma cacao*). *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 7222-7231.

Stark, T.; Bareuther, S.; Hofmann, T. Molecular definition of the taste of roasted cocoa nibs (*Theobroma cacao*) by means of quantitative studies and sensory experiments. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 5530-5539.

Tachibana, H.; Koga, K.; Fujimura, Y.; Yamada, K. A receptor for green tea polyphenol EGCG. *NSMB* **2004**, *11*, 380-381.

Takino, Y.; Imagawa, H.; Horikawa, H.; Tanaka, A. Studies on the mechanism of the oxidation of tea leaf catechins. *Agr. Biol. Chem.* **1964**, *28*, 64-71.

Wang, Y.; Ho, C.-T. Polyphenolic chemistry of tea and coffee: a century of progress. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 8109-8114.

Warmke, R.; Belitz, H. D.; Grosch, W. Evaluation of taste compounds of Swiss cheese (Emmentaler). *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1996**, *203*, 230-235.

Weston, P. D.; Avrameas, S. Proteins coupled to polyacrylamide beads using glutaraldehyde. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1971**, *45*, 1574-1580.

Wright, L. P.; Mphangwe, N. I.; Nyirenda, H. E.; Apostolides, Z. Analysis of caffeine and flavan-3-ol composition in the fresh leaf of *Camellia sinensis* for predicting the quality of the black tea produced in Central and Southern Africa. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 1823-1830.

Yan, Q.; Bennick, A. Identification of histatins as tannin-binding proteins in human saliva. *Biochem. J.* **1995**, *311*, 341-347.

Yang, L.; Yuan, Z. Determination of dissociation constants of amino acids by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* **1999**, *20* 2877-2883.

6 Anhang

Tabelle A1: Rezeptur für das Geschmacksstoff-Rekombinat eines Standardteegetränkes.

Substanz (Nr.) ^a	Konzentration [μmol/L] ^b
<i>Gruppe I: austrocknend, aufrauend adstringierend und bitter</i>	
(-)-Epicatechin (1)	35,2
(-)-Catechin (2)	14,6
(-)-Epicatechin-3-gallat (3)	84,3
(-)-Catechin-3-gallat (4)	10,8
(-)-Epigallocatechin (5)	67,4
(-)-Epigallocatechin-3-gallat (7)	50,8
<i>Gruppe II: austrocknend, aufrauend adstringierend</i>	
Theaflavin-3-gallat (11)	8,5
Theaflavin-3'-gallat (12)	4,9
Theaflavin-3,3'-digallat (13)	8,7
<i>Gruppe III: samtig-belegend adstringierend</i>	
Kämpferol-3-O-β-D-glucopyranosid (14)	5,1
Kämpferol-3-O-[α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosid] (16)	7,0
Quercetin-3-O-β-D-glucopyranosid (19)	9,6
Quercetin-3-O-β-D-galactopyranosid (20)	4,7
Quercetin-3-O-[α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosid] (21)	11,2
<i>Gruppe IV: bitter</i>	
Theobromin (27)	130,6
Koffein (28)	1378,0

^a Bezifferung der Substanzen bezieht sich auf die Strukturen in Abbildungen 3, 6, 8 und 9. ^b Gehalte aus Quantifizierungsdaten in Tabellen 4, 5 und 6.

Tabelle A2: Gehalte der verfügbaren bitteren und adstringierenden Geschmacksstoffe vor bzw. nach Zugabe von Magermilchpulver (0,1 g – 2,0 g).

Nr ^a	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$] im					
	Standard- teegetränk, zentrifugiert	Teegetränk mit Magermilchpulver [g] ^b				
		0,1	0,25	0,5	1,0	2,0
<i>Gruppe I: austrocknend, aufrauend adstringierend und bitter</i>						
1	33,8 \pm 4,6 ^c	32,4 \pm 1,7 ^c	34,3 \pm 0,7 ^c	32,3 \pm 2,2 ^c	33,5 \pm 6,0 ^c	35,4 \pm 2,3 ^c
2	17,1 \pm 2,6 ^c	13,9 \pm 0,6 ^c	14,6 \pm 1,3 ^c	15,2 \pm 1,9 ^c	14,6 \pm 2,6 ^c	15,2 \pm 1,9 ^c
3	80,8 \pm 1,5 ^c	68,3 \pm 2,5 ^c	54,4 \pm 2,1 ^c	31,4 \pm 4,1 ^c	22,0 \pm 1,8 ^c	18,5 \pm 0,6 ^c
4	11,0 \pm 0,7 ^c	9,0 \pm 0,2 ^c	8,5 \pm 0,4 ^c	8,5 \pm 0,4 ^c	8,3 \pm 0,2 ^c	8,3 \pm 0,2 ^c
5	62,4 \pm 0,003 ^c	72,4 \pm 9,9 ^c	77,3 \pm 0,6 ^c	61,2 \pm 1,3 ^c	51,0 \pm 3,9 ^c	45,0 \pm 0,4 ^c
6	6,2 \pm 0,04 ^c	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
7	42,8 \pm 2,5 ^c	39,7 \pm 2,5 ^c	32,4 \pm 1,3 ^c	25,4 \pm 2,1 ^c	17,2 \pm 1,2 ^c	13,2 \pm 0,9 ^c
8	9,4 \pm 0,04 ^c	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Gruppe II: austrocknend, aufrauend adstringierend</i>						
9	1,4 \pm 0,1 ^c	1,4 \pm 0,1 ^c	1,3 \pm 0,02 ^c	1,2 \pm 0,1 ^c	1,1 \pm 0,1 ^c	1,1 \pm 0,03 ^c
10	4,2 \pm 0,3 ^c	3,0 \pm 0,1 ^c	2,8 \pm 0,1 ^c	2,0 \pm 0,1 ^c	1,3 \pm 0,1 ^c	1,2 \pm 0,04 ^c
11	8,1 \pm 1,4 ^c	5,2 \pm 0,4 ^c	2,8 \pm 0,1 ^c	1,3 \pm 0,1 ^c	1,0 \pm 0,1 ^c	0,8 \pm 0,1 ^c
12	4,5 \pm 0,1 ^c	2,2 \pm 0,1 ^c	1,0 \pm 0,1 ^c	0,6 \pm 0,1 ^c	0,5 \pm 0,1 ^c	0,4 \pm 0,1 ^c
13	8,3 \pm 0,4 ^c	3,4 \pm 0,2 ^c	1,7 \pm 0,1 ^c	1,1 \pm 0,1 ^c	1,0 \pm 0,1 ^c	0,9 \pm 0,1 ^c
<i>Gruppe III: samtig-belegend adstringierend</i>						
14	5,1 \pm 0,2 ^c	5,0 \pm 0,3 ^c	5,5 \pm 0,2 ^c	5,5 \pm 0,1 ^c	5,2 \pm 0,1 ^c	4,5 \pm 0,2 ^c
15	1,5 \pm 0,03 ^c	1,4 \pm 0,1 ^c	1,6 \pm 0,1 ^c	1,5 \pm 0,1 ^c	1,4 \pm 0,1 ^c	1,2 \pm 0,1 ^c
16	6,9 \pm 0,4 ^c	6,8 \pm 0,4 ^c	7,2 \pm 0,1 ^c	7,4 \pm 0,1 ^c	7,4 \pm 0,02 ^c	7,0 \pm 0,4 ^c
19	9,3 \pm 0,3 ^c	9,1 \pm 0,1 ^c	9,7 \pm 0,3 ^c	9,6 \pm 0,2 ^c	8,4 \pm 0,2 ^c	7,2 \pm 0,2 ^c
20	4,3 \pm 0,1 ^c	4,6 \pm 0,2 ^c	4,6 \pm 0,1 ^c	4,6 \pm 0,1 ^c	4,2 \pm 0,1 ^c	3,6 \pm 0,1 ^c
21	10,9 \pm 0,3 ^c	11,4 \pm 0,1 ^c	11,1 \pm 0,3 ^c	11,8 \pm 0,3 ^c	11,5 \pm 0,2 ^c	10,7 \pm 0,1 ^c
<i>Gruppe IV: bitter</i>						
27	129,7 \pm 2,5 ^c	131,0 \pm 2,0 ^c	133,2 \pm 6,9 ^c	136,0 \pm 12 ^c	131,8 \pm 10 ^c	129,9 \pm 4,3 ^c
28	1168,0 \pm 7,0 ^c	1436 \pm 121 ^c	1365,2 \pm 64 ^c	1469,2 \pm 72 ^c	1530,5 \pm 31 ^c	1431 \pm 106 ^c

^a Bezifferung der Substanzen bezieht sich auf die Strukturen in Abbildungen 3, 6, 8 und 9. ^b Angabe von Magermilchpulver in g/100 mL Standardteegetränk. ^c Standardabweichung. n.d. = nicht detektierbar.

Tabelle A3: Rezeptur für das Geschmacksstoff-Rekombinat eines Standardteegetränks nach Zusatz von Magermilchpulver (2,0 g/100 mL).

Substanz (Nr.)^a	Konzentration [µmol/L]^b
<i>Gruppe I: austrocknend, aufrauend adstringierend und bitter</i>	
(-)-Epicatechin (1)	35,4
(-)-Catechin (2)	15,2
(-)-Epicatechin-3-gallat (3)	18,5
(-)-Catechin-3-gallat (4)	8,3
(-)-Epigallocatechin (5)	45,0
(-)-Epigallocatechin-3-gallat (7)	13,2
<i>Gruppe II: austrocknend, aufrauend adstringierend</i>	
Theaflavin-3-gallat (11)	0,8
Theaflavin-3'-gallat (12)	0,4
Theaflavin-3,3'-digallat (13)	0,9
<i>Gruppe III: samtig-belegend adstringierend</i>	
Kämpferol-3-O-β-D-glucopyranosid (14)	4,5
Kämpferol-3-O-[α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosid] (16)	7,0
Quercetin-3-O-β-D-glucopyranosid (19)	7,2
Quercetin-3-O-β-D-galactopyranosid (20)	3,6
Quercetin-3-O-[α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosid] (21)	10,7
<i>Gruppe IV: bitter</i>	
Theobromin (27)	130,0
Koffein (28)	1431,0

^a Bezifferung der Geschmacksstoffe bezieht sich auf die Strukturen in Abbildungen 3, 6, 8 und 9. ^b Gehalte aus Quantifizierungsdaten in Tabelle A2.

Tabelle A4: Einfluss von β -Casein, Protamin sowie Polyaminosäuren auf die Bindungsaktivität von (-)-Epicatechin (1), (-)-Epigallocatechin-3-gallat (7), Gallussäure (29) und Methylgallat (32).

	Konz. [mg/mL]	freier Ligand [%]			
		1 ^a	7 ^a	29 ^a	32 ^a
β -Casein	1	78,9 \pm 1,2 ^b	38,7 \pm 9,4 ^b	72,5 \pm 1,4 ^b	89,9 \pm 13,6 ^b
	2	68,3 \pm 10,3 ^b	14,0 \pm 3,2 ^b	96,2 \pm 2,2 ^b	74,7 \pm 0,3 ^b
	5	64,8 \pm 4,6 ^b	3,1 \pm 2,2 ^b	79,8 \pm 3,1 ^b	88,3 \pm 9,6 ^b
	10	59,6 \pm 1,2 ^b	0,8 \pm 0,5 ^b	97,9 \pm 11,6 ^b	88,1 \pm 1,3 ^b
Polyamid	1	57,0 \pm 6,9 ^b	85,1 \pm 1,1 ^b	74,6 \pm 2,7 ^b	71,3 \pm 1,7 ^b
	2	61,9 \pm 6,7 ^b	55,2 \pm 7,8 ^b	72,0 \pm 5,2 ^b	73,6 \pm 8,7 ^b
	5	51,1 \pm 7,6 ^b	39,8 \pm 3,1 ^b	84,1 \pm 1,3 ^b	58,9 \pm 7,9 ^b
	10	28,1 \pm 2,6 ^b	22,9 \pm 2,0 ^b	75,7 \pm 0,9 ^b	49,7 \pm 4,2 ^b
Protamin	1	99,8 \pm 7,3 ^b	9,5 \pm 0,1 ^b	84,9 \pm 10,2 ^b	92,4 \pm 8,2 ^b
	2	106,4 \pm 1,1 ^b	9,1 \pm 0,6 ^b	74,9 \pm 3,2 ^b	94,1 \pm 0,9 ^b
	5	94,8 \pm 3,6 ^b	7,8 \pm 0,9 ^b	58,1 \pm 5,9 ^b	68,8 \pm 4,7 ^b
	10	87,3 \pm 3,4 ^b	4,3 \pm 0,8 ^b	57,2 \pm 3,2 ^b	61,2 \pm 3,1 ^b
Polyhistidin	1	72,4 \pm 6,2 ^b	81,0 \pm 5,5 ^b	93,6 \pm 2,0 ^b	69,7 \pm 9,7 ^b
	2	72,6 \pm 9,6 ^b	51,7 \pm 4,2 ^b	66,8 \pm 2,5 ^b	72,8 \pm 5,6 ^b
	5	45,1 \pm 6,2 ^b	29,0 \pm 2,5 ^b	67,7 \pm 2,3 ^b	62,3 \pm 9,0 ^b
	10	27,9 \pm 7,6 ^b	3,5 \pm 0,3 ^b	46,7 \pm 2,3 ^b	46,0 \pm 2,7 ^b
Polyarginin	1	91,4 \pm 15,8 ^b	8,0 \pm 1,7 ^b	97,2 \pm 2,8 ^b	98,5 \pm 6,0 ^b
	2	71,8 \pm 4,0 ^b	3,4 \pm 0,1 ^b	88,5 \pm 2,5 ^b	88,4 \pm 5,7 ^b
	5	66,0 \pm 3,2 ^b	1,8 \pm 0,4 ^b	72,7 \pm 0,9 ^b	74,2 \pm 0,6 ^b
	10	75,5 \pm 6,1 ^b	3,5 \pm 0,1 ^b	57,0 \pm 2,0 ^b	59,5 \pm 4,5 ^b
Polyalanin	1	75,8 \pm 1,7 ^b	91,4 \pm 6,4 ^b	65,5 \pm 5,2 ^b	89,4 \pm 12,5 ^b
	2	71,3 \pm 8,4 ^b	88,6 \pm 3,6 ^b	64,1 \pm 5,2 ^b	83,4 \pm 9,4 ^b
	5	90,7 \pm 6,9 ^b	64,6 \pm 2,9 ^b	65,4 \pm 3,7 ^b	82,1 \pm 13,3 ^b
	10	74,5 \pm 3,1 ^b	55,0 \pm 3,6 ^b	72,0 \pm 1,0 ^b	90,7 \pm 2,4 ^b
Polyprolin	1	70,3 \pm 6,5 ^b	0,9 \pm 0,3 ^b	76,4 \pm 4,9 ^b	87,0 \pm 1,0 ^b
	2	70,4 \pm 0,1 ^b	0,1 \pm 0,02 ^b	84,8 \pm 5,5 ^b	79,5 \pm 2,0 ^b
	5	57,8 \pm 6,9 ^b	n.d.	83,6 \pm 5,6 ^b	80,6 \pm 9,4 ^b
	10	52,8 \pm 2,3 ^b	n.d.	78,6 \pm 8,4 ^b	72,5 \pm 2,9 ^b

Fortsetzung Tabelle A4

	Konz. [mg/mL]	freier Ligand [%]			
		1 ^a	7 ^a	29 ^a	32 ^a
Polyglycin	1	61,4 ± 1,4 ^b	81,5 ± 2,7 ^b	73,0 ± 3,8 ^b	71,9 ± 2,2 ^b
	2	74,6 ± 3,7 ^b	71,1 ± 1,2 ^b	74,2 ± 4,2 ^b	67,3 ± 3,9 ^b
	5	54,9 ± 1,9 ^b	42,1 ± 1,7 ^b	64,1 ± 5,8 ^b	63,0 ± 2,1 ^b
	10	44,4 ± 4,4 ^b	16,6 ± 1,4 ^b	66,8 ± 4,0 ^b	63,6 ± 2,1 ^b
Polyasparaginsäure	1	81,8 ± 10,8 ^b	83,7 ± 11,6 ^b	76,9 ± 3,7 ^b	86,8 ± 10,9 ^b
	2	91,0 ± 11,2 ^b	73,4 ± 5,8 ^b	78,2 ± 4,5 ^b	82,8 ± 11,7 ^b
	5	97,4 ± 9,3 ^b	85,9 ± 11,6 ^b	85,1 ± 2,3 ^b	84,7 ± 10,3 ^b
	10	82,3 ± 5,3 ^b	72,4 ± 2,5 ^b	77,5 ± 2,0 ^b	85,3 ± 9,0 ^b

^a Bezifferung der Substanzen bezieht sich auf Abbildungen 3, 15 und 30. ^b Standardabweichung. n.d. = nicht detektierbar

LEBENS LAUF

Name Christina Schmidt
Geburtsdatum 10.06.1980 in Padun (Russische Föderation)
Staatsangehörigkeit Deutsch
Eltern Waldemar Schmidt
Nadeschda Schmidt, geb. Ruhl

SCHULAU SBILDUNG

1986-1993 Grund- und Mittelschule, Russland
1993-1994 Mittelschule, Leipzig
1994-1995 Gesamtschule, Gudensberg
1995-1998 Integrierte Gesamtschule, Baunatal
1998-2001 Gymnasiale Oberstufenschule, Kassel
08.06.2001 Abitur

STUDIUM

10/2001-05/2006 Studium der Lebensmittelchemie an der Technischen Universität München
12.04.2006 Erstes Staatsexamen
06/2006-05/2007 Praktische Ausbildung für staatlich geprüfte Lebensmittelchemiker am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Oberschleißheim
19.07.2007 Zweites Staatsexamen

PROMOTIONSSTUDIUM

06/2007-07/2010 Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und molekulare Sensorik, Technische Universität München
Betreuer: Prof. Dr. Thomas Hofmann

BERUFSTÄTIGKEIT

06/2007-07/2010 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und molekulare Sensorik, Technische Universität München, Freising
10/2010-02/2012 Lebensmittelchemikerin, Abteilung Technologie und Qualitätssicherung der Bitburger Braugruppe GmbH, Bitburg
ab 01.05.2012 Lebensmittelchemikerin, Abteilung Forschung und Entwicklung der Hallertauer Hopfenveredelungsgesellschaft (HHV), Mainburg