



## Wissenschaftlicher Informationsdienst Tee

---

### Was „schmeckt“ man eigentlich im schwarzen Tee ?

Prof. Dr. Thomas Hofmann

Institut für Lebensmittelchemie, Universität Münster, Corrensstraße 45, 48149 Münster

#### **Einleitung**

Seit Jahrhunderten werden wässrige Infusionen getrockneter Blätter des Baumes *Camellia sinensis* als wohlschmeckendes Getränk verzehrt. Insbesondere fermentierte, schwarze Tees stellen dabei mit einem Marktanteil von etwa 75 Prozent den dominierenden Anteil an der Weltproduktion dar. Die sensorische Qualität der Teeinfusionen, die einen maßgeblichen Parameter bei der Festlegung des Handelswertes des Tees darstellt, wird von geschulten Testpersonen, den sog. "Tea Tastern", bewertet. Neben dem Profil und der Intensität der typischen Bitterkeit stellt dabei insbesondere der adstringierende Geschmack – ein raues, belegendes Gefühl im Mundraum – ein wichtiges Qualitätskriterium zur Bewertung von Teegetränken dar.

Mit dem Ziel, die Geschmacksstoffe, auf deren Basis wir eine Teeinfusion als gut oder schlecht bewerten, auf molekularer Ebene zu identifizieren und somit neue Maßstäbe für eine objektive Beurteilung der Qualität von Tee setzen, wurden in den vergangenen 50 Jahren eine Vielzahl an wissenschaftlichen Studien durchgeführt. Obwohl in zahlreichen Arbeiten versucht wurde, Korrelationen zwischen den sensorischen Bewertungen der Tea Taster und einzelnen Inhaltsstoffen aufzuzeigen, sind die Literaturdaten über jene Verbindungen, die die Bitterkeit sowie die Adstringenz ursächlich prägen, sehr widersprüchlich. So weisen verschiedene Arbeiten auf die im Zuge der Teefermentation aus Flavan-3-olen gebildeten orange-farbenen Theaflavine sowie die rot-braun gefärbten, hochmolekularen Thearubigine als die molekularen Ursachen des adstringierenden Geschmacks von Schwarztee-Infusionen hin (1-3). Anderen Arbeitsgruppen gelang es dagegen nicht, Zusammenhänge zwischen dem adstringierenden Geschmack des Tees und der Konzentration an Theaflavinen zu verifizieren (4). Wiederum gibt es Hinweise für einen Beitrag einiger Flavan-3-ole zum adstringierenden Geschmack (4). Darüber hinaus wurde berichtet, dass neben diesen Phenolen das 5-N-Ethyl-L-glutamin – das sog. Theanin – mit seiner umami-artigen Geschmacksqualität wertgebend zum Geschmacksprofil von Teeinfusionen beitragen soll (5).

Um die Lücke zwischen der Strukturchemie einzelner Teeinhaltsstoffe und der humanen Geschmackswahrnehmung zu schließen, sollten nun die Schlüsselgeschmacksstoffe einer Schwarztee-Infusion durch Anwendung eines kürzlich im Arbeitskreis Hofmann entwickelten Screening-Verfahrens, der sog. Geschmacksverdünnungsanalyse (6), identifiziert, quantifiziert und auf der Basis von Dosis/Aktivitäts-Überlegungen in ihrem Geschmacksbeitrag bewertet werden. Abschließend sollten die analytisch erhaltenen Erkenntnisse durch Herstellung einer Mischung, welche die einzelnen Geschmacksstoffe in deren natürlichen Konzentration enthält, erstmals verifiziert werden.

## Material und Methodik

Eine Darjeeling Gold-Auslese (TGPOP, Summer) wurde mit heißem Wasser (1 g / 100 ml) übergossen und nach vier Minuten über einen Cellulose-Filter abgetrennt.

## Ergebnisse und Diskussion

Zur Bewertung des Geschmacksprofils der frisch bereiteten Teeinfusion wurden die Intensitäten der in **Tab. 1** angegebenen Diskriptoren von einem anhand von Referenzgeschmacksstoffen geschulten Sensorikpanel auf einer Skala von 0 (nicht detektierbar) bis 3 (stark wahrnehmbar) bewertet. Die mit Abstand höchsten Intensitäten von 2,2 bzw. 1,6 wurden für die adstringierende bzw. die bittere Geschmacksqualität vergeben (**Tab. 1**). Saure sowie süße Geschmacksnoten wurden mit vergleichsweise niedrigen Intensitäten bewertet, umami-artige Noten waren nicht detektierbar.<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Die Synthese von Referenzverbindungen der Theaflavine (7), die Isolierung von Referenzsubstanzen der Catechine und Flavon-3-ol-glycoside aus einer Teedroge (8) sowie die Methodik der Ultrafiltration, der Geschmacksverdünnungsanalyse (GVA), der sensorischen Analysen (8, 9) und der quantitativen Bestimmungen (9) wurden kürzlich publiziert.

**Tab. 1** Geschmacksprofilanalyse der authentischen Darjeeling-Infusion und des biomimetischen Geschmacksstoffrekombinates<sup>2</sup>

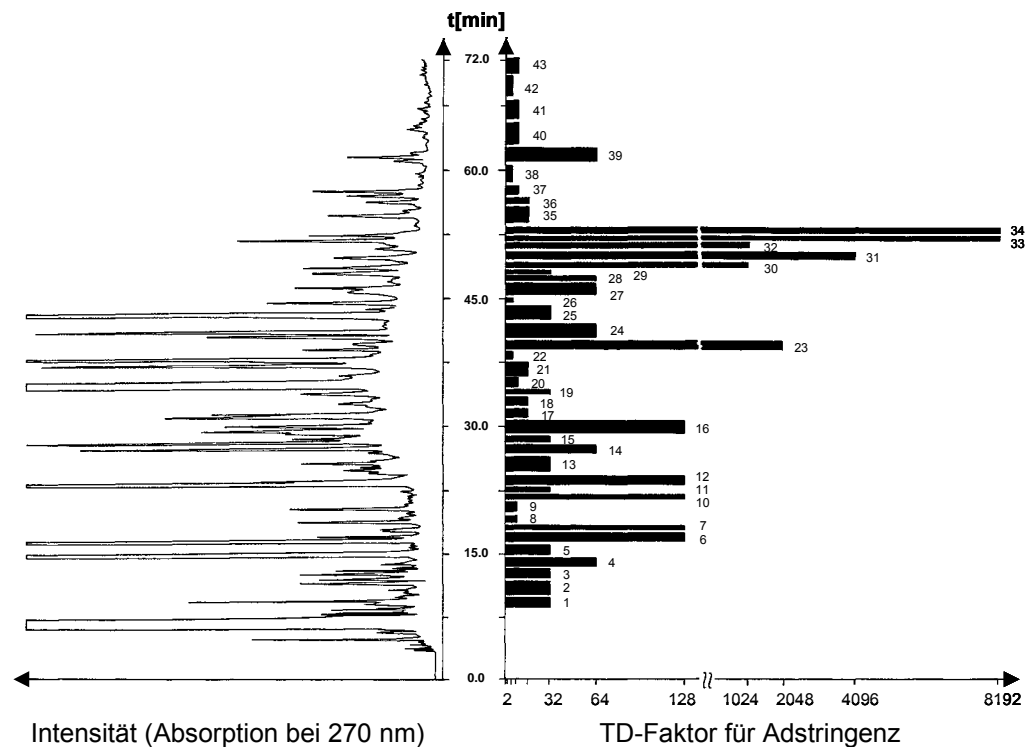
| Geschmacksqualität           | Intensität der Tee-Infusion | Geschmacksqualitäten <sup>a</sup> in Geschmacksrekombinat |
|------------------------------|-----------------------------|---|
| adstringierend, austrocknend | 2,2                         | 2,1   |
| bitter                       | 1,6                         | 1,5   |
| sauer                        | 0,5                         | 0,5   |
| süß                          | 0,4                         | 0,4   |
| salzig                       | 0                           | 0   |
| umami-artig                  | 0                           | 0   |

<sup>a</sup> Die Bewertung der Geschmacksintensitäten erfolgte auf einer Skala von 0 (nicht detektierbar) bis 3 (stark wahrnehmbar).

## Screening und Identifizierung von Schlüsselgeschmacksstoffen

Um erste Einblicke in die adstringierenden und bitteren Teeinhaltsstoffe zu erhalten, wurde die Teeinfusion zunächst durch Ultrafiltration nach Molekülgrößen aufgetrennt. Dabei entstanden drei Fraktionen: eine intensive braun gefärbte, jedoch geschmackslose Fraktion der Thearubigenpolymere (Molekulargewicht >10 Kilo Dalton), eine rot-braun gefärbte, geschmacklose Fraktion (Molekulargewicht von 1-10 Kilo Dalton) und eine nahezu farblose Fraktion niedermolekularer Verbindungen (<1 Kilo Dalton). Interessant dabei war, dass die farblose Fraktion niedermolekularer Verbindungen das typische Geschmacksprofil (**Tab. 1**) der Teeinfusion wiedergab (8). Um die geschmacksaktiven Verbindungen in der niedermolekularen Fraktion zu lokalisieren, wurde diese zunächst mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) (**Abb. 1**, links) in 43 Subfraktionen aufgetrennt, die dann mittels Geschmacksverdünnungsanalyse (GVA) in deren Geschmacksaktivität gewichtet wurden (**Abb. 1**, rechts). Hierzu hat man die 43 Fraktionen gefriergetrocknet, mit Wasser jeweils auf 2 ml aufgefüllt und dann stufenweise so weit verdünnt, bis ein Geschmacksunterschied zu einer Blindprobe (Wasser) gerade noch wahrgenommen werden konnte. Die Höhe dieses Verdünnungsfaktors (Taste Dilution (TD)-Faktor) stellt somit ein Maß für den Geschmacksbeitrag einer Fraktion dar.

<sup>2</sup> Die identifizierten Geschmacksstoffe wurden als Flüssigkeit aufbereitet, die dem natürlichen Teegetränk nachempfunden war.



**Abb. 1.** HPLC-Chromatogramm (links) und Taste Dilution (TD)-Chromatogramm (für Adstringenz) der niedermolekularen Fraktion (< 1kDa) der Teeinfusion (8).

Aufgrund des hohen TD-Faktors von 8192 wurden die HPLC-Fractionen Nr. 33 und 34 mit dem höchsten Beitrag zum adstringierenden Geschmack bewertet, gefolgt von Fraktionen 30-32 und 23 (**Abb. 1**). Die Fraktionen 6, 7, 10-12 und 16 wurden mit vergleichsweise geringen Geschmacksaktivitäten bewertet. Für alle anderen Fraktionen wurde – aufgrund der niedrigen TD-Faktoren – eine Beteiligung zum Teegeschmack ausgeschlossen.

Der Fokus der Experimente zur Identifizierung der geschmacksgebenden Substanzen richtete sich zunächst auf die Catechine und Theaflavine, da diese in der Literatur bereits als geschmacksaktiv beschrieben wurden. Die Analyse der niedermolekularen Teeportion mittels HPLC-Massenspektrometrie sowie die Überprüfung mit den jeweiligen Referenzsubstanzen führten zur Identifizierung von Gallocatechin (Fr. 11), Epigallocatechin (Fr. 15), Catechin (Fr. 15), Epigallocatechin-3-gallate (EGCG, Fr. 20), Epicatechin (Fraktion 22), Gallocatechin-3-gallat (Fr. 24), Epicatechin-3-gallat (Fr. 25), Catechin-3-gallat (Fr. 26), Theaflavin (Fr. 37), Theaflavinsäure (Fr. 37), Theaflavin-3-gallat (Fr. 38), Theaflavin-3'-gallat (Fr. 38) und Theaflavin-3,3'-digallat (Fr. 39) als adstringierende Verbindungen in den entsprechenden HPLC-Fractionen (**Abb. 1**) (8).

Der Vergleich dieser Ergebnisse mit denen der GVA (**Abb. 1**) machte deutlich, dass diese Verbindungen jedoch lediglich mit TD-Faktoren <128 bewertet wurden, während die unbekanntes Verbindungen in Fraktionen 30-34 TD-Faktoren von bis zu 8192 besaßen und deshalb den Hauptbeitrag zum Teegeschmack leisten sollten.

Die Isolierung der Geschmacksstoffe aus Fraktionen 30-34<sup>3</sup> erlaubte deren Identifizierung als äußerst geschmacksaktive Flavon-3-ol-glykoside (**Tab. 2**), unter denen insbesondere das sog. Rutin (Quercetin-3-O-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1→6)- $\beta$ -D-glucopyranosid]) mengenmäßig überwog (8).

Die neben der Geschmacksqualität zweite wichtige „biophysikalische“ Größe eines Lebensmittelgeschmacksstoffes ist dessen Geschmacksaktivität. Zu ihrer Bestimmung muss der jeweilige Geschmacksschwellenwert definiert werden. Die Bestimmung der oralen Erkennungsschwellenwerte (8), also der Konzentration, bei der ein Geschmacksstoff in wässriger Lösung gerade noch wahrnehmbar ist, ergab folgende Werte: Die Klasse der Catechine hatte eine Schwellenwertkonzentrationen von 190-930  $\mu\text{mol/l}$ . Die Theaflavine riefen bereits bei niedrigen Schwellenwertkonzentrationen von 13-26  $\mu\text{mol/l}$  einen austrocknenden und adstringierenden Eindruck im Mund hervor (**Tab. 2**). Die Flavon-3-ol-glykoside erzielten sogar bei besonders niedrigen Schwellenwertkonzentrationen von nur 0,001-19,8  $\mu\text{mol/l}$  (**Tab. 2**) einen austrocknenden Effekt und eine samtartige Adstringenz. Insbesondere das Rutin wies mit einer Konzentration von 0,001  $\mu\text{mol/l}$  eine außerordentlich niedrige Geschmacksschwelle auf.

**Tab. 2.** Geschmacksschwellenwerte, Konzentrationen und Dose-over-Threshold (Dot)-Faktoren ausgewählter Teegeschmacksstoffe

| Geschmacksstoff  | Schwelle<br>[ $\mu\text{mol/l}$ ] | Konz.<br>[ $\mu\text{mol/l}$ ] | DoT-<br>Faktor <sup>a</sup> |
|--|-----------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| <i>Gruppe I: aufrauend, adstringierende Verbindungen</i> |                                   |                                |                             |
| Epigallocatechin-3-gallat (EGCG)                         | 190,0                             | 328,0                          | 1,7                         |
| Theaflavin   | 16,0                              | 11,0                           | 0,7                         |
| Catechin   | 410,0                             | 221,0                          | 0,5                         |
| Theaflavin-3,3'-digallat                                 | 13,0                              | 6,7                            | 0,5                         |
| Epicatechin-3-gallat                                     | 260,0                             | 113,0                          | 0,4                         |
| Theaflavin-3-gallat                                      | 15,0                              | 6,4                            | 0,4                         |
| Theaflavin-3'-gallat                                     | 15,0                              | 4,3                            | 0,3                         |
| Epigallocatechin   | 520,0                             | 131,0                          | 0,3                         |
| Gallocatechin  | 540,0                             | 131,0                          | 0,3                         |

<sup>3</sup> Die Isolierung erfolgte mittels präparativer Säulenchromatographie und deren Strukturaufklärung mittels HPLC-Massenspektrometrie und Kernresonanz-Spektroskopie

|   |        |       |        |
|---|--------|-------|--------|
| Epicatechin   | 930,0  | 84,0  | 0,1    |
| Catechin-3-gallat   | 250,0  | 11,0  | <0,1   |
| Gallocatechin-3-gallat  | 390,0  | 11,0  | <0,1   |
| Theaflavinsäure   | 24,0   | 0,009 | <0,1   |
| <i>Gruppe II: autrocknende, samtig-adstringierende Verbindungen</i>                   |        |       |        |
| Q-3-O-[ $\alpha$ -L-rha-(1→6)- $\beta$ -D-glc] (Rutin) <sup>b</sup>                   | 0,0015 | 11,1  | 9652,0 |
| K-3-O-[ $\alpha$ -L-rha-(1→6)- $\beta$ -D-glc] <sup>b</sup>                           | 0,25   | 6,5   | 26,0   |
| Q-3-O- $\beta$ -D-gal <sup>b</sup>  | 0,43   | 5,4   | 12,6   |
| Q-3-O- $\beta$ -D-glc <sup>b</sup>  | 0,65   | 6,0   | 9,2    |
| K-3-O- $\beta$ -D-glc <sup>b</sup>  | 0,67   | 4,9   | 7,3    |
| M-3-O- $\beta$ -D-glc <sup>b</sup>  | 2,10   | 9,3   | 4,4    |
| Q-3-O-[ $\beta$ -D-glc-(1→3)-O- $\alpha$ -L-rha-(1→6)-O- $\beta$ -D-gal] <sup>b</sup> | 1,36   | 3,3   | 2,4    |
| M-3-O- $\beta$ -D-gal <sup>b</sup>  | 2,70   | 6,5   | 2,4    |
| K-3-O- $\beta$ -D-gal <sup>b</sup>  | 6,70   | 3,0   | 0,4    |
| K-3-O-[ $\beta$ -D-glc-(1→3)-O- $\alpha$ -L-rha-(1→6)-O- $\beta$ -D-glc] <sup>b</sup> | 19,80  | 8,6   | 0,4    |
| Q-3-O-[ $\beta$ -D-glc-(1→3)-O- $\alpha$ -L-rha-(1→6)-O- $\beta$ -D-glc] <sup>b</sup> | 18,40  | 7,1   | 0,4    |
| A-8-C-[ $\alpha$ -L-rha-(1→2)- $\beta$ -D-glc] <sup>b</sup>                           | 2,80   | 0,9   | 0,3    |
| M-3-O-[ $\alpha$ -L-rha-(1→6)- $\beta$ -D-glc] <sup>b</sup>                           | 10,50  | 2,2   | 0,2    |
| K-3-O-[ $\beta$ -D-glc-(1→3)-O- $\alpha$ -L-rha-(1→6)-O- $\beta$ -D-gal] <sup>b</sup> | 5,80   | 0,8   | 0,2    |
| 5N-Ethyl-L-glutamin (Theanin)   | 6000,0 | 281,0 | <0,1   |
| <i>Gruppe III: bittere Verbindungen</i>   |        |       |        |
| Coffein   | 500,0  | 990,0 | 2,0    |
| Epigallocatechin-3-gallat (EGCG) <sup>a</sup>   | 380,0  | 328,0 | 0,9    |

<sup>a</sup> Der Dose-over-Threshold (DoT)-Faktor wurde aus dem Quotienten der Konzentration und des Schwellenwertes bestimmt, <sup>b</sup> Abkürzungen für Quercetin (Q), Kämpferol (K), Myricetin (M), Apigenin (A), Rhamnose (rha), Glukose (glc) und Galaktose (Gal).

## Quantifizierung und Bestimmung von Dose-over-Threshold (DoT)-Werten

Um den Geschmacksbeitrag aller identifizierten Verbindungen zu bestimmen, wurden die phenolischen Verbindungen sowie Coffein und Theanin in der Teeinfusion quantifiziert und basierend auf der Bestimmung von Dose-over-Threshold (DoT)-Faktoren als dem Quotienten von Konzentration und Schwellenwert einer Verbindung gewichtet (9). Das Ergebnis: Aus der Gruppe der Catechine und Theaflavine lag lediglich die Konzentration des EGCG in der Teeinfusion um den Faktor 1,7 oberhalb dessen Schwellenwertes für Adstringenz vor (**Tab. 2**). Die Konzentrationen der anderen Catechine und Theaflavine lagen hingegen unterhalb der Detektionsschwelle. Bei den Flavonol-3-glykosiden wurde für die meisten dieser Glykoside ein sehr hoher Geschmacksbeitrag festgestellt. Insbesondere das Rutin lag um das 9652-fache oberhalb dessen Schwellenwertskonzentration im Teegetränk vor. Obwohl Theanin in sehr hohen Konzentrationen in der Teeinfusion enthalten war, trug diese Aminosäure

aufgrund ihrer hohen Schwellenwertkonzentration von 6000  $\mu\text{mol/l}$  nicht zum Teegeschmack bei. Hingegen liegt das bittere Alkaloid Coffein mit einem DoT-Faktor von 2,0 im Tee vor und sollte daher maßgebend am Bittergeschmack des Teegetränks beteiligt sein (**Tab. 2**).

Um die Ergebnisse dieser Untersuchungen zu verifizieren, wurde das Geschmacksprofil der Teeinfusion mit dem eines biomimetischen Geschmacksstoffrekombinats verglichen. Hierzu wurden Coffein sowie alle Flavonol-3-glykoside und Catechine, die mit DoT-Faktoren  $>0,5$  bewertet worden waren, in „natürlichen“ Konzentrationen in Wasser gelöst. (**Tab. 2**). Theaflavine wurden nicht hinzugefügt, da in Vorexperimenten ihre Beteiligung am Teegeschmack bereits ausgeschlossen werden konnte (7, 9).

### Fazit

Die sensorische Analyse ergab, dass das Geschmacksprofil dieses Rekombinates nicht signifikant von der authentischen Teeinfusion zu unterscheiden war. Die adstringierende und die bittere Geschmacksqualität wurde auf der 3-Punkteskala lediglich um 0,1 Einheiten weniger intensiv bewertet (**Tab. 1**). Damit konnte erstmals gezeigt werden, dass neben Coffein, Catechin und Epigallocatechin-3-gallat die acht Flavonol-3-glykoside Quercetin-3-*O*-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranosid], Kämpferol-3-*O*-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranosid], Quercetin-3-*O*- $\beta$ -D-galactopyranosid, Quercetin-3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid, Kämpferol-3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid, Myricetin-3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid, Quercetin-3-*O*-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-*O*- $\beta$ -D-galactopyranosid] und Myricetin-3-*O*- $\beta$ -D-galactopyranosid die Schlüsselmoleküle darstellen, die vom menschlichen Geschmackssinn beim Verzehr von Darjeeling-Tee wahrgenommen werden (9).

## Literatur

- (1) Roberts, E.A.H.; Smith, R.F. Spectrometric measurements of theaflavins and thearubigins in black tea liquors in assessment of quality in teas. *Analyst* **1961**, *86*, 94-98.
- (2) Millin, D.J.; Crispin, D.J.; Swain, D. Nonvolatile components of black tea and their contribution to the character of the beverage. *J. Agric. Food Chem.* **1969**, *17*, 717-721.
- (3) Hilton, P.J.; Ellis, R.T. Estimation of the market value of central African tea by theaflavin analysis. *J. Sci. Food Agric.* **1972**, *23*, 227-232.
- (4) Ding, Z.; Kuhr, S.; Engelhardt, U.H. Influence of catechins and theaflavins on the astringent taste of black tea brews (in German). *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1992**, *195*, 108-111.
- (5) Ekborg-Ott, K.H.; Taylor, A.; Armstrong, D.W. Varietal differences in the total and enantiomeric composition of theanine in tea. *J. Sci. Food Agric.* **1997**, *45*, 353-363.
- (6) 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 identification of taste-active compounds in foods. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 231-238.
- (7) 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.* **2004**, *218*; 442-447.
- (8) Scharbert, S.; Holzmann, N.; Hofmann, T. Identification of the astringent taste compounds in black tea by combining instrumental analysis and human bioresponse. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 3498-3508.
- (9) 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.