



# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Grundlagen der Iso- $\alpha$ -Säuren

### 1.1.1 Bedeutung der Iso- $\alpha$ -Säuren als Bierbitterstoffe

Die Bitterkeit gehört zu den wichtigsten und charakteristischsten Merkmalen des Bier-Flavors. Unter dem Begriff des Flavors versteht man die Gesamtheit aller gustatorischen, olfaktorischen und somatosensorischen Reizempfindungen (Abb. 1).

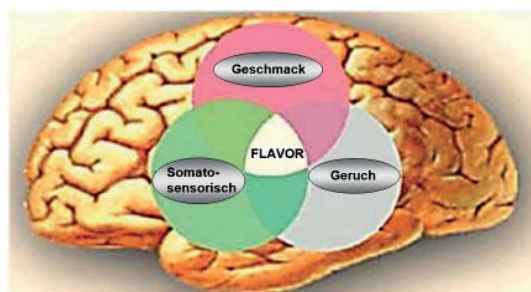


Abbildung 1: Begriff des Flavors (Lundström et al., 2011)

Das Bier-Flavor stellt eine komplexe Mischung von verschiedenen Komponenten dar, von denen über 800 Verbindungen identifiziert worden sind und zum charakteristischen Bier-Flavor beitragen (Meilgaard und Peppard, 1986). Die charakteristische Bitterkeit des Bieres resultiert hauptsächlich aus den Iso- $\alpha$ -Säuren, die auch als Isohumulone bezeichnet werden. Die Iso- $\alpha$ -Säuren umfassen im Wesentlichen eine Mischung von 6 Komponenten. In der Abbildung 2 sind die einzelnen Isomere und Homologe der Iso- $\alpha$ -Säuren dargestellt (Schönberger, 2006).

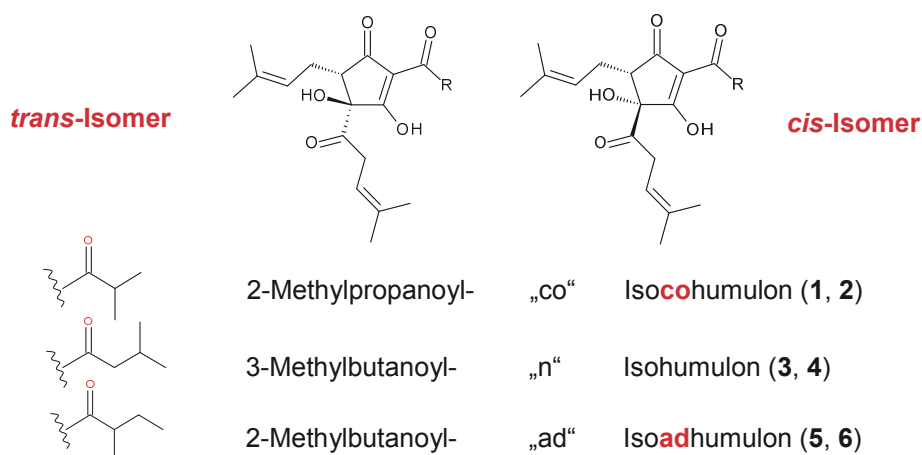
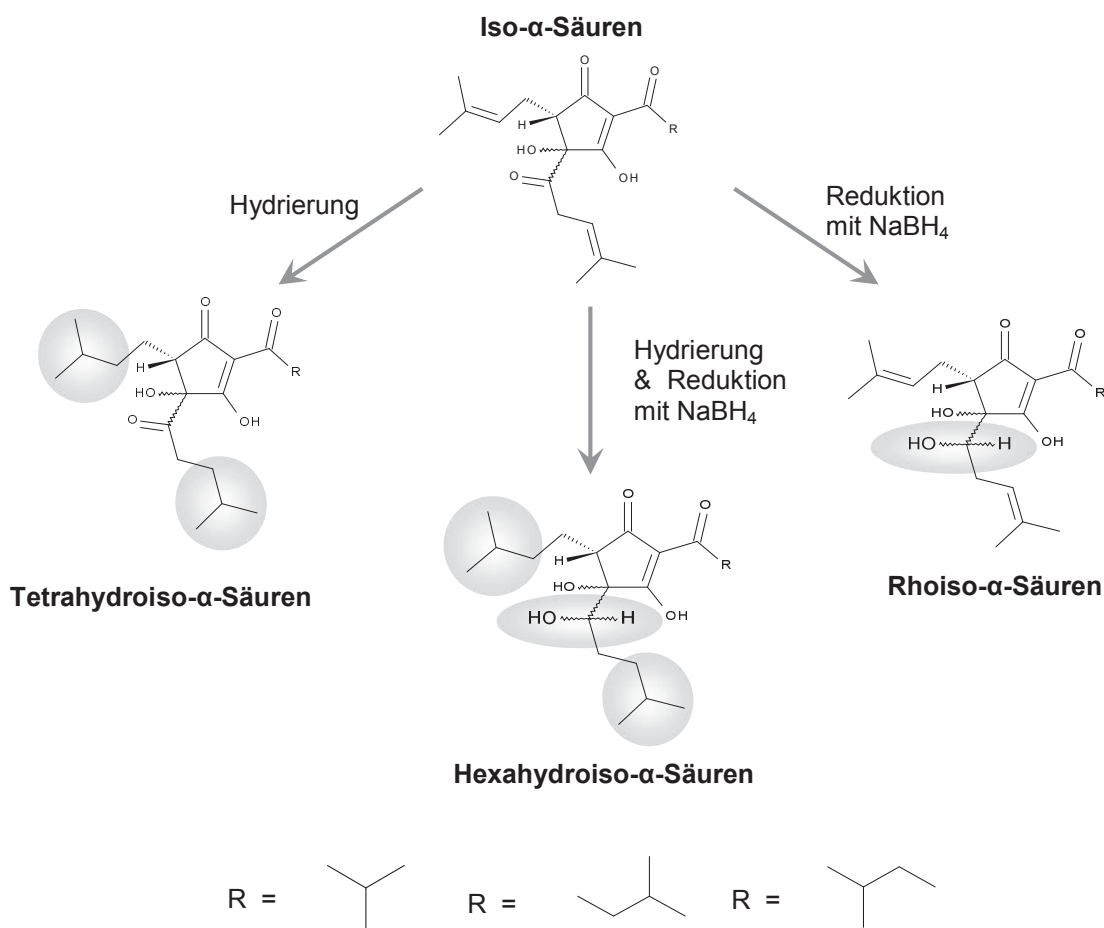


Abbildung 2: Übersicht der Strukturen der Isomere und Homologe der Iso- $\alpha$ -Säuren



Ein wichtiges Anliegen der Brauindustrie ist die Optimierung des Herstellungsprozesses sowie die ständige Verbesserung der Stabilität des Bier-Flavors und die Vermeidung der Entstehung von Fehlnoten, wobei die Iso- $\alpha$ -Säuren eine wichtige Rolle spielen. Die Iso- $\alpha$ -Säuren werden in relativ kurzer Zeit abgebaut, was einerseits den Verlust der charakteristischen Bitterkeit mit sich bringt, und zum anderen mögliche Fehlnoten entstehen lässt (Vanderhaegen et al., 2006; King und Duineveld, 1999). Aus diesem Grund wurden Versuche unternommen die Iso- $\alpha$ -Säuren in ihrer Struktur durch chemische Reaktionen zu modifizieren. Diese chemisch modifizierten Iso- $\alpha$ -Säuren werden auch als reduzierte Iso- $\alpha$ -Säuren bezeichnet. Sie werden in drei verschiedene Gruppen eingeteilt (Abbildung 3).



**Abbildung 3:** Übersicht über die verschiedenen Gruppen der chemisch modifizierten Iso- $\alpha$ -Säuren

Die verschiedenen Iso- $\alpha$ -Säuren-Gruppen werden als handelsübliche Postfermentations-Hopfenbitterungsprodukte angeboten und bei der Bierherstellung eingesetzt.



Die Hopfenbitterungsprodukte stellen ein Gemisch der verschiedenen Isomere und Homologe dar. In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die chemisch modifizierten Iso- $\alpha$ -Säuren eine teilweise verbesserte Stabilität gegenüber Licht und oxidativem Abbau besitzen (De Cooman et al., 2001). Die Verwendung der chemisch modifizierten Iso- $\alpha$ -Säuren-Gruppen zeigte ebenfalls eine Verbesserung der Schaumstabilität, besonders bei den Tetrahydroiso- $\alpha$ -Säuren (Weiss et al., 2002). Eine weitere Eigenschaft der Iso- $\alpha$ -Säuren und deren modifizierter Derivate ist die Fähigkeit, Metallkationen zu binden. Durch diese Eigenschaft inhibieren sie das Wachstum von grampositiven Bakterien und tragen zur bakteriologischen Stabilität von Bier bei (Hughes, 2000; Simpson et al., 1993).

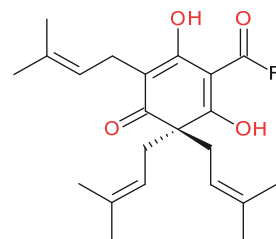
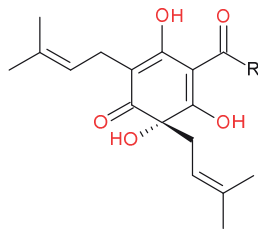
Die Verwendung der Iso- $\alpha$ -Säuren als auch der chemisch modifizierten Iso- $\alpha$ -Säuren als Postfermentations-Hopfenbitterungsprodukte ermöglicht der Industrie mehr Flexibilität bei der Steuerung und Einflussnahme des Herstellungsprozesses und des Bierflavors. Durch diese Produkte können die Gehalte im Bier besser eingestellt werden, wobei höhere Gehalte und verkürzte Kochzeiten realisierbar sind (Verzele und De Keukeleire, 1991). Aufgrund ihrer positiven Eigenschaften gewinnt die Verwendung der Postfermentations-Hopfenbitterungsprodukte der Iso- $\alpha$ -Säuren als auch der chemisch modifizierten Iso- $\alpha$ -Säuren in der Brauindustrie immer mehr an Bedeutung. Daher sind die Daten der sensorischen Eigenschaften der Iso- $\alpha$ -Säuren und deren chemisch modifizierter Derivate für die Brauindustrie von großem Interesse.

In der Literatur gibt es bis zum jetzigen Zeitpunkt sehr wenige Daten und Untersuchungen über Bitterkeit und Flavor der einzelnen Isomere und Homologe der Iso- $\alpha$ -Säuren bzw. keine Daten zu den einzelnen Isomeren und Homologen der chemisch modifizierten Iso- $\alpha$ -Säuren-Gruppen, Tetrahydro-, Hexahydro- und Rhoiso- $\alpha$ -Säuren. In sensorischen Untersuchungen der Bitterkeit der Hopfenbitterungsprodukte der Iso- $\alpha$ -Säuren und der chemisch modifizierten Iso- $\alpha$ -Säuren-Gruppen, die Gemische der verschiedenen Isomeren und Homologen darstellen, wurden Unterschiede in den Bitterintensitäten und in der Dauer der zeitlichen Wahrnehmung der Bitterkeit beobachtet (Fritsch und Shellhammer, 2009; Weiss et al., 2002). Es wurde ein Einfluss der *cis/trans*-Isomerie auf die Bitterintensität und den zeitlichen Verlauf der Bitterwahrnehmung bei den Iso- $\alpha$ -Säuren gefunden (Hughes, 2000). Weiterhin wurden unterschiedliche Schwellenwerte für die einzelnen Isomere und Homologe der Iso- $\alpha$ -Säuren beobachtet (Intelmann et al., 2009).



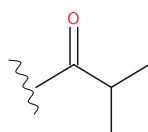
### 1.1.2 Bildung der Iso- $\alpha$ -Säuren

Die Iso- $\alpha$ -Säuren werden aus den Humulonen ( $\alpha$ -Säuren) gebildet, die ihren Ursprung in den gelben Lupulindrüsen der Hopfendolden haben. Die Lupulindrüsen enthalten unter anderem 2-12 % Humulone ( $\alpha$ -Säuren) und 1-10 % Lupulone ( $\beta$ -Säuren) (Abb. 4) (Verzele und De Keukeleire, 1991).



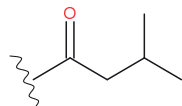
$\alpha$ -Säuren  
(Humulone)

$\beta$ -Säuren  
(Lupulone)



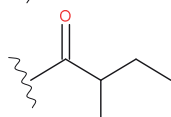
2-Methylpropanoyl-

„co“ **Co**humulon (20-65 %)



3-Methylbutanoyl-

„n“ Humulon (35-70 %)

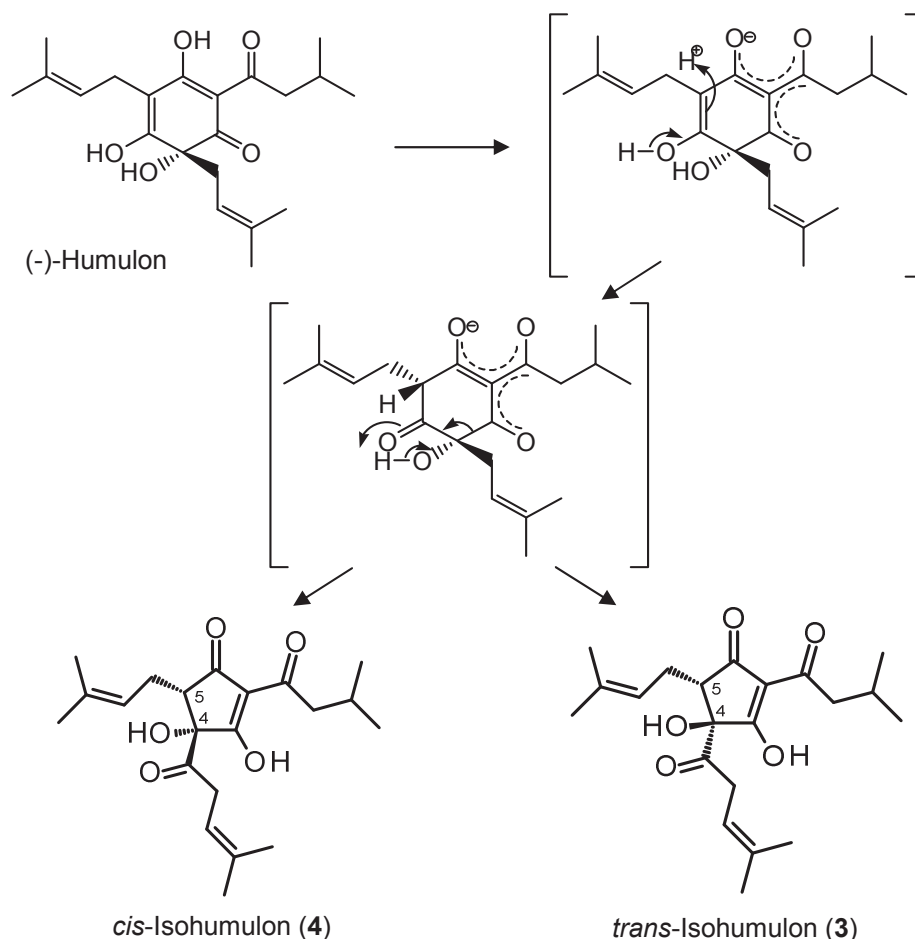


2-Methylbutanoyl-

„ad“ **Ad**humulon (10-15 %)

**Abbildung 4:** Darstellung der Hopfendolden und Lupulindrüsen sowie der Strukturformeln der  $\alpha$ -Säuren und  $\beta$ -Säuren mit den Gehalten an Cohumulon, Humulon und Adhumulon (Verzele und De Keukeleire, 1991)

Während des Würzekochens bei der Bierherstellung isomerisieren die  $\alpha$ -Säuren (Humulone) zu den Iso- $\alpha$ -Säuren. Die Abbildung 5 zeigt den Isomerisierungsprozess während des Würzekochens am Beispiel des Humulons.



**Abbildung 5:** Isomerisierungsmechanismus während des Würzekochens am Beispiel des Humulons zum *cis*- und *trans*-Isohumulon (4, 3) (Verzele und De Keukeleire, 1991)

Zu Beginn des Isomerisierungsprozesses spaltet sich das Proton der Säurefunktion in dem  $\beta$ -Triketo-System ab und es bildet sich ein stabiles Anion. Die verbleibende Enolfunktion im Ring lagert sich anschließend zu einer Carbonylfunktion um. Im Folgenden wird durch Bildung einer tertiären Alkoholfunktion und einer  $\alpha$ -Carbonylgruppe der Ring um ein Kohlenstoffatom verkleinert (Verzele und De Keukeleire, 1991). Da diese Ringverkleinerung nicht stereoselektiv verläuft, werden aus Humulon zwei Isomere gebildet, die als *cis*- bzw. *trans*-Isohumulon (4, 3) in Abhängigkeit der räumlichen Stellung der tertiären Hydroxy-Gruppe am Kohlenstoffatom C4 und der



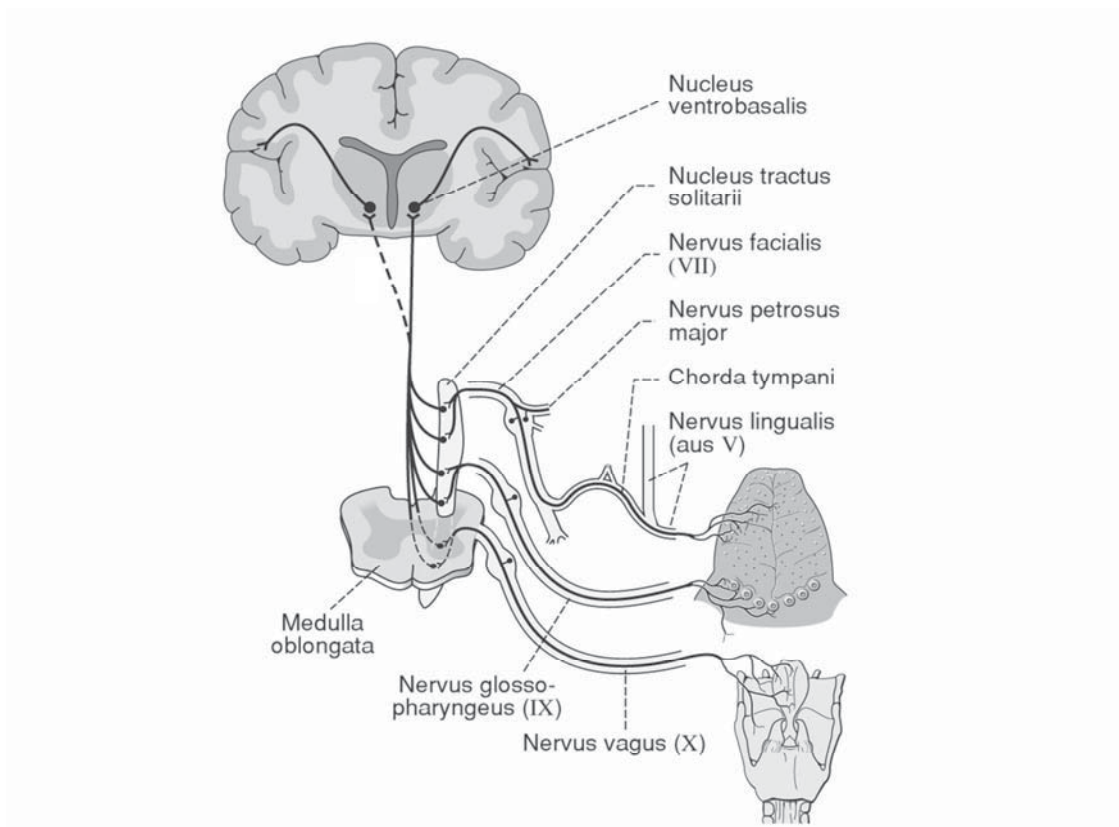
Prenylseitenkette am C5 bezeichnet werden. In umfangreichen Untersuchungen von Verzele und De Keukeleire (1991) zur Chemie der Hopfensäuren und der Bier-Bittersäuren wurden  $\alpha$ -Säuren und Iso- $\alpha$ -Säuren aus natürlichen Quellen isoliert, synthetisiert sowie chemisch modifiziert und die Reaktionsprodukte mittels NMR, Optischer Rotationsdispersion und Zirkulardichroismus zur Strukturaufklärung untersucht. Die Zuordnung der relativen Konfiguration der *cis/trans*-Isomere konnte mittels NMR-Spektroskopie vorgenommen werden. Die Struktur des Humulons wurde als (-) (6R)-Humulon mit  $[\alpha]_{D(\text{MeOH}, 20^\circ\text{C})} = -211$  bestimmt. Bei den Isohumulonen wurde für das *cis*-Isohumulon (**4**) die Konfiguration (4R, 5S) mit  $[\alpha]_{D(\text{MeOH}, 20^\circ\text{C})} = +47,6$  (Schmp. 18°C) und für das *trans*-Isohumulon (**3**) die (4S, 5S)-Konfiguration mit  $[\alpha]_{D(\text{MeOH}, 20^\circ\text{C})} = -7,8$  (Schmp. 65°C) ermittelt. Es wurde beobachtet, dass die synthetisierten Verbindungen racemisch waren und Spurenkomponenten enthielten, die nicht natürlich vorkommen. Die Untersuchungen von Verzele und De Keukeleire (1991) zeigen die Komplexität und Vielfalt dieser ähnlichen und labilen Strukturen, was die Untersuchung zur Stereochemie dieser Verbindungen erschwert. Neueste Untersuchungen von Urban et al. (2013) mittels Röntgenstrukturaufklärung ergaben für das (-)-Humulon die (6S)-Konfiguration und für das (+)-*cis*-Isohumulon die (4S, 5R)-Konfiguration, wobei betont wird, dass die Isomerisierung eine Vielzahl sehr ähnlicher Verbindungen hervorbringt, die für die Charakterisierung aufgetrennt, gereinigt und als Kristallsalz vorliegen müssen. Beide Untersuchungen zeichnen ein unterschiedliches Bild und die absolute Stereochemie dieser Verbindungen kann nicht eindeutig zugeordnet werden. Auf der Basis der jetzigen Daten kann lediglich die Zuordnung der relativen Konfiguration der *cis/trans*-Isomere vorgenommen werden.

Aufgrund der drei verschiedenen Seitenketten der  $\alpha$ -Säuren und der Möglichkeit der *cis/trans*-Anordnung werden sechs Komponenten aus den drei  $\alpha$ -Säuren Humulon, Cohumulon und Adhumulon gebildet. Das Isomerenverhältnis der *cis/trans*-Verbindungen im Bier hängt von dem verwendeten Hopfenprodukt und den Prozessbedingungen ab. Der Gehalt an Iso- $\alpha$ -Säuren in Bier insgesamt liegt zwischen 15 und 80 ppm und variiert je nach Biersorte (Verzele und De Keukeleire, 1991). Die Iso- $\alpha$ -Säuren können ebenfalls aus den  $\alpha$ -Säuren bzw.  $\alpha$ -Säuren-reichen Extrakten hergestellt werden (Biendl, 2009; Koller et al, 1980). Die so gewonnenen Produkte enthalten die Iso- $\alpha$ -Säuren in einer angereicherten Menge und können als Postfermentations-Produkt dem Bier zugesetzt werden. Diese Erzeugnisse werden mit Bezeichnungen wie z.B. Isohopfenextrakt (IHE) angeboten.

### 1.1.3 Wahrnehmung der Iso- $\alpha$ -Säuren als Bitterstoffe

Bitterstoffe sind Geschmacksstoffe, die durch die Interaktion mit sensorischen Rezeptorzellen im Mundraum einen sensorischen Effekt hervorrufen und eine an die Nahrung gebundene Empfindung bewirken (Behrens et al., 2011). Dieser sensorische Effekt dient zur Bewertung der Nahrung und resultiert in deren Akzeptanz bzw. Ablehnung (Chaudhari und Roper, 2010) sowie der Initiierung physiologischer Prozesse zur Verdauung und Assimilierung der Nahrung, wie z.B. des Speichelflusses oder des preabsorptiven Insulinausstoßes (Mattes, 1997). Die anerkannten Geschmacksqualitäten sind süß, sauer, salzig, bitter und umami (Behrens et al., 2011; Chaudhari und Roper, 2010).

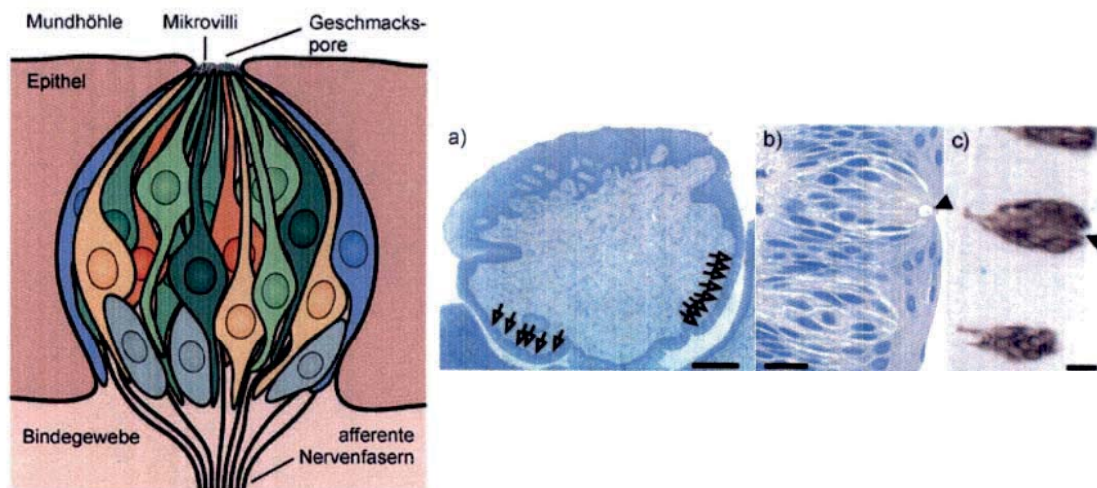
Die Wahrnehmung der Geschmacksstoffe erfolgt durch Geschmacksrezeptorzellen (TRCs, engl. *taste receptor cells*), die sich auf der Zunge, in der Schleimhaut der Wangen, Teilen des weichen Gaumens (lat. *Palatum molle*), dem Kehldeckel (lat. *Epiglottis*), dem Kehlkopf (lat. *Larynx*) und im Rachen (lat. *Pharynx*) befinden (Behrens et al., 2011; Deetjen et al., 2004; Miller, 1995; Huang et al. 2006; Miura et al., 2007). Die TRCs werden von unterschiedlichen Zweigen des siebenten, neunten oder zehnten Hirnnerves (CN, engl. *cranial nerve*) innerviert (Abb. 6).



**Abbildung 6:** Geschmacksnervenbahnen beim Menschen (Deetjen et al., 2004)

Über die afferenten Nervenfasern des *Nervus trigeminus* (CN V) und dessen Abzweigen, wie z.B. dem lingualen Abzweig *Nervus lingualis*, erfolgt die somato-sensorische Wahrnehmung von thermischen, taktilen und nozizeptiven Reizen im Gesicht (Viana, 2011; Lundström et al., 2011; Deetjen et al., 2004, Cerf-Ducastel et al., 2001). Die neuronalen Signale des gustatorischen Systems werden über eine Art Schaltzentrum, den *Nucleus tractus solitarii* (NTS), zum *Nucleus ventrobasalis* des Thalamus und dann in den *cerebralen Cortex* weitergeleitet (Behrens und Meyerhof, 2006; Behrens et al., 2011).

Die TRCs können rosettenförmig in Gruppen von 50-100 TRCs angeordnet sein und bilden die sogenannten Geschmacksknospen (Abb. 7).



**Abbildung 7:**

Links: Schematische Darstellung einer Geschmacksknospe. Gelb: Typ-I-Zellen, grün: Typ-II-Zellen, orange: Typ-III- oder präsynaptische Zellen, grau: Typ-IV- oder basale Zellen, blau: perigemmale oder Typ-V-Zellen (Behrens et al., 2011)

Rechts: Geschmackspapille und -knospe des Menschen (Behrens et al., 2011)

a) Mikroskopische Aufnahme eines Hemalum-Eosin-gefärbten Querschnittes einer Wallpapille. Geschmacksknospen sind nur schwer als kleine Lichtpunkte (durch Pfeile mit offener Spitze gekennzeichnet) im sonst blau gefärbten Epithel, das die Zwischenräume ausfüllt, sichtbar (Maßstab: 200  $\mu$ m).

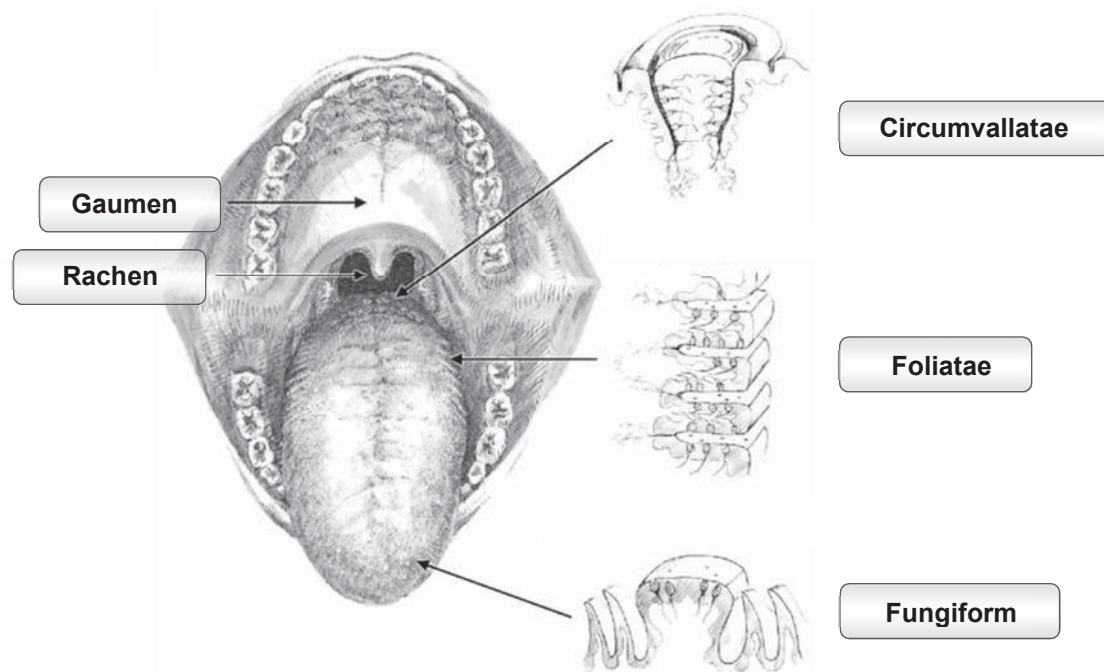
b) Stärkere Vergrößerung zweier Wallgeschmacksknospen aus a) (Maßstab 20  $\mu$ m).

c) Wallgeschmacksknospe, visualisiert durch indirekte Immunhistochemie mit einem Antiserum gegen Cytokeratin 20 (Maßstab: 20  $\mu$ m). Einzelne Geschmacksknospen sind gut sichtbar. Pfeilspitzen in b) und c) zeigen zu den Geschmacksporen.





Am apikalen Pol der Geschmacksknospe befindet sich unter der Epitheloberfläche eine Vertiefung, die Geschmackspore (lat. *Porus*). In die Pore hinein reichen lange, feine, fadenförmige Zellfortsätze, die man als *Mikrovilli* bezeichnet. Auf der Zunge sind die Geschmacksknospen in verschiedenförmigen, epidermalen Erhebungen und Fugen, den Papillen (lat. *Papillae*), eingebettet. In der Abbildung 8 sind die Mundhöhle und die Zungenbereiche mit den verschiedenen Formen der Geschmackspapillen dargestellt.



**Abbildung 8:** Mundhöhle und Zungenbereiche mit den verschiedenen Formen der Geschmackspapillen (Breslin und Spector, 2008)

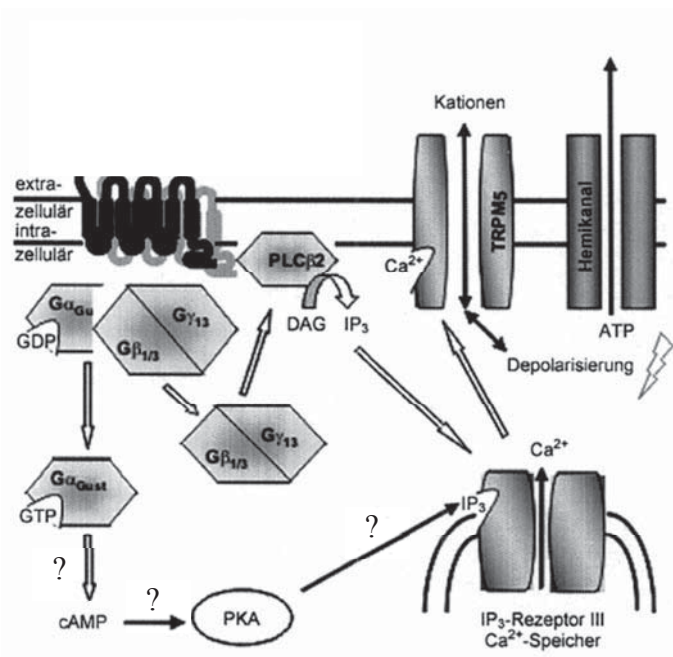
Die *Papillae fungiformes* (pilzförmig) befinden sich auf der vorderen Zungenoberfläche und werden durch den *Chorda tympani* (Ast des CN VII) innerviert. Auf dem hinteren Bereich der Zunge befinden sich die *Papillae foliatae* (blattförmig) und die *Papillae circumvallatae* (rund, von einem Schleimhautwall umgeben), die von einem lingualtonsillaren Zweig des *Nervus glossopharyngeus* (CN IX) innerviert werden. Die Geschmacksknospen im Gaumen werden vom *Nervus petrosus*, einem Zweig des CN VII, bzw. im Rachen von Abzweigen des *Nervus vagus* (CN X) innerviert (Abb. 6) (Behrens und Meyerhof, 2006; Breslin und Spector, 2008; Chaudhari und Roper, 2010; Suzuki, 2007, Miura et al., 2007).



Es werden fünf verschiedene Typen von TRCs unterschieden (I bis V). Bei den Typ-IV-Zellen handelt es sich um Zellen im basalen Bereich ohne Verlängerungen in die Geschmackspore, deren genaue Funktion momentan unklar ist (Miller, 1995; Behrens et al., 2011; Suzuki, 2007; Roper, 2006). Die perigemmalen Zellen (Typ-V-Zellen) befinden sich mehrschichtig in der Peripherie der Geschmacksknospe, wo sie ein Netzwerk aus Keratinbündeln bilden. Sie könnten somit eine Art Stütz- bzw. Barrierefunktion ausüben (Miller, 1995; Behrens et al., 2011). Die Rezeptorzellen des Typs I sind Glia-artige Zellen mit apicalen, schlanken Microvilli (Behrens et al., 2011). Sie exprimieren die Ekto-ATPase NTPDase 2 (Bartel et al., 2006) und den Glutamat-Transporter GLAST (Lawton et al., 2000). Die Ekto-ATPase NTPDase 2 könnte für die Neutralisation/Diffusionsbegrenzung des von den Typ-II-Zellen freigesetzten nichtsynaptischen Transmitters ATP von Bedeutung sein. Die Typ-I-Zellen exprimieren den  $K^+$ -Kanal ROMK, was auf eine Beteiligung an der  $K^+$ -Homöostase hindeuten könnte (Dvoryanchikov et al., 2009). Untersuchungen der Typ-I-Zellen von Mäusen ergaben Hinweise auf eine mögliche aktive Rolle bei der Geschmackswahrnehmung. Typ-I-Zellen der Mäuse exprimieren teilweise funktionale epitheliale Natriumkanäle (ENaC), die für die Transduktion des salzigen Geschmacks von Bedeutung sein könnten (Vandenbeuch et al., 2008). Die Typ-III-Zellen (presynaptische Zellen) besitzen einen einzelnen Mikrovillus (Yee et al., 2001) und exprimieren synaptische und neurale Proteine (Huang et al., 2008a; DeFazio et al., 2006; Miller, 1995; Behrens et al., 2011). Sie sind als einziger Zelltyp in den Geschmacksknospen an der Bildung von Synapsen beteiligt. Presynaptische Zellen reagieren bei Stimulierung durch saure Substanzen und durch  $CO_2$  sowie durch depolarisierende Konzentrationen extrazellulärer  $K^+$ -Ionen mit einem  $Ca^{2+}$ -Einstrom sowie der Freisetzung von Neurotransmittern (Chandrashekar et al., 2009; Huang et al., 2008a; DeFazio et al., 2006; Miller, 1995; Behrens et al., 2011). Die Typ-II-Rezeptorzellen konnten als geschmacksempfindliche Zellen für bitter, süß und umami identifiziert werden und zählen zu den primären Rezeptorzellen der Geschmackswahrnehmung (Roper, 2006). Typ-II-Rezeptorzellen exprimieren die membranständigen G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs, engl.: G protein-coupled receptors) und die intrazellulären Signalproteine der G-Protein-abhängigen Signalkaskade, wie das heterotrimere G-Protein, PLC- $\beta$ 2 (Phospholipase C- $\beta$ 2), IP3R3 (Inositoltrisphosphatrezeptor Typ 3) und den TRP-Kanal M5 (TRPM5), sowie die Hemikanäle Pannexin 1 und verschiedene Connexine (Roper, 2009; Romanov et al., 2007; DeFazio et al., 2006; Huang et al., 2007; Chandrashekar et al., 2006; Bartel et al.,



2006; Miura et al., 2007; Behrens et al., 2011). In der Abbildung 9 ist die Signaltransduktionskaskade schematisch dargestellt.



**Abbildung 9:** Schematische Darstellung des hypothetischen Mechanismus der Signaltransduktion von GPCRs in Typ-II-Rezeptorzellen (Behrens et al., 2011)

Die membranständigen G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) bestehen aus einer 7-helicalen transmembran Rezeptor-Domäne (7TM-Rezeptor) mit einer extrazellulären Polypeptidkette als Liganden-Domäne und einer intrazellulären Domäne, die mit dem heterotrimeren GTP-bindenden Protein (G-Protein) interagieren kann. Dieses G-Protein ist aus drei Untereinheiten zusammengesetzt, die mit  $G\alpha$ ,  $G\beta$  und  $G\gamma$  bezeichnet werden.  $G\alpha$  ( $\alpha$ -Gustducin) ist als GTPase in der Lage, GTP zu binden und in GDP umzuwandeln. Im inaktivierten Zustand ist GDP an  $G\alpha$  gebunden. Wenn ein Geschmacksstoff die extrazelluläre Liganden-Domäne eines GPCRs stimuliert, wird das heterotrimere G-Protein aktiviert. Das  $G\alpha$  bindet GTP und resultiert in einer Konformationsänderung.  $G\alpha$  und das  $G\beta/G\gamma$ -Dimer dissoziieren. Das  $G\alpha$  beeinflusst den cAMP-Spiegel (cyclisches Adenosin-5'-monophosphat) und damit die Protein-kinase-Aktivität (PKA), wobei der genaue Mechanismus in diesem Fall bisher nicht geklärt ist (Clapp et al., 2008; Behrens et al., 2011). Das  $G\beta/G\gamma$ -Dimer interagiert mit der Phospholipase PLC- $\beta$ 2, die PIP<sub>2</sub> (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat) in DAG (Diacylglycerin) und IP<sub>3</sub> (Inositol 1,4,5-trisphosphat) spaltet. Das IP<sub>3</sub> diffundiert durch das Cytosol zum endoplasmatischen Retikulum (ER), bindet und öffnet die IP<sub>3</sub>R-3-