

**Mechanistische Untersuchungen zur
enzymatischen Bräunung**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät II

Chemie, Physik und Mathematik

der Martin-Luther-Universität

Halle-Wittenberg

vorgelegt von

Herrn Diplom-Lebensmittelchemiker Nils Mertens

geb. am 29.10.1991 in Haldensleben

1. Gutachter: Prof. Dr. Marcus A. Glomb

2. Gutachter: Prof. Dr. Volker Böhm

Datum der Einreichung: 20.06.2022

Datum der Verteidigung: 18.11.2022

I Vorwort

Diese Arbeit entstand im Arbeitskreis für Lebensmittelchemie von Prof. Dr. Marcus A. Glomb am Institut für Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg im Zeitraum vom Juni 2016 bis Mai 2020 im Rahmen einer Beschäftigung als wissenschaftlicher Mitarbeiter. Die vorliegende Dissertation wurde in kumulativer Form angefertigt. Die enthaltenen Forschungsergebnisse wurden vollständig in international anerkannten Fachzeitschriften publiziert, denen die experimentellen Daten, Einzelergebnisse sowie deren Diskussion zu entnehmen sind. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die wissenschaftlichen Einzelaspekte aus den Veröffentlichungen zusammenzufassen und in den wissenschaftlichen Kontext einzuordnen.

II Danksagung

An dieser Stelle möchte ich zuerst Herrn Prof. Dr. Marcus A. Glomb für die Möglichkeit, dieses spannende und vielseitige Thema zu bearbeiten, und für seine fachliche Unterstützung danken.

In diesem Zusammenhang danke ich dem NMR-Team um Herrn Dr. Dieter Ströhl und dem HR-MS-Team um Herrn Dr. Frolov und Frau Mandy Dorn für die Aufnahme der zahlreichen NMR- und hochauflösenden Massenspektren. Herrn Prof. Dr. René Csuk gebührt Dank für seine Unterstützung bei der Benennung der finalen Farbstruktur.

Der Mount Everest Tee Company GmbH danke ich für die kostenlose Bereitstellung fermentierter und unfermentierter Rooibosteeproben.

Meinen beiden Diplomandinnen Christin Marie Mansius und Frederike Thal gebührt besonderer Dank für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit. Ohne euch hätte ich das nicht geschafft.

Ein großes Dankeschön möchte ich an den gesamten Arbeitskreis Glomb richten sowohl für seine fachliche Kompetenz als auch für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Den Laboranten, im besonderen Christine Herzlieb und Andreas Kiowski, danke ich für ihre Unterstützung und die ein oder andere süße Frühstückspause. Ein großer Dank gilt Thomas Heymann für seine fachliche Unterstützung, insbesondere seine Mitarbeit an der zweiten Veröffentlichung und sein stets offenes Ohr für allerlei Probleme. Meinen ehemaligen Mitstreitern aus dem Labor 428, Christoph Hohmann, der neben seiner fachlichen Kompetenz mit so manch kreativer Idee aufwarten konnte, und meinem besten Kumpel Robert Rau für die spaßige Zeit und die Unterstützung inner- wie außerhalb des Labors, möchte ich besonders herzlich danken.

Schließlich danke ich meinen Eltern, die mich stets unterstützt und motiviert haben und mir während der gesamten Zeit den nötigen Rückhalt boten.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Aktueller Stand der Forschung	3
2.1	Enzymatische Bräunungsreaktion.....	3
2.1.1	Polyphenole	3
2.1.2	Enzymatische Oxidation	6
2.1.3	Reaktionen von Polyphenolen und <i>o</i> -Chinonen mit Aminosäuren und Proteinen.....	8
2.1.4	Kovalente Interaktionen	10
2.1.5	Analytik der Polyphenol-Protein-Addukte	12
2.1.6	Melanogenese.....	16
2.2	Bräunung im Pflanzenreich.....	24
2.2.1	Kaffeensäure.....	24
2.2.2	Tee	27
2.2.3	Rooibostee und Apfel.....	32
2.2.4	Salat.....	35
2.2.5	Weitere pflanzliche Bräunungsreaktionen	36
3	Zielstellung	39
4	Diskussion der Ergebnisse.....	41
4.1	Benzothiazine als wichtige Intermediate von enzymatischen Bräunungsreaktionen.	41
4.1.1	Etablierung eines Modellsystems zur Untersuchung der enzymatischen Bräunungsreaktion.....	41
4.1.2	Einfluss von Aminosäuren auf den Verlauf der enzymatischen Bräunungsreaktion im Modellsystem	44
4.1.3	Weiterführende Reaktionen der Dihydrobenzothiazincarbonsäure-Derivate und Charakterisierung der Reaktionsprodukte	50
4.2	Untersuchungen zum oxidativen Abbau von Aspalathin im Rooibostee zu Dihydrokaffeensäure	57
5	Publikationen	66
5.1	Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67, 1719 – 1725	66

5.2	Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68, 13111 - 13120.....	73
5.3	Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69, 15345 - 15353.....	83
6	Zusammenfassung	92
7	Abstract.....	95
8	Literaturverzeichnis	98
9	Abbildungsverzeichnis	119
10	Anhang.....	121
11.1	Supporting Information zu Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67, 1719-1725.....	121
11.2	Supporting Information zu Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68, 13111-13120.....	124
11.3	Supporting Information zu Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69, 15345-15353.....	126
11	Publikationsliste.....	128
12	Lebenslauf.....	129
13	Eidstattliche Erklärung.....	130

1 Einleitung

Die Sensorik eines Lebensmittels bestehend aus Geruch, Textur, Geschmack und Optik beeinflusst unmittelbar das Kauf- und Aufnahmeverhalten des Verbrauchers.¹ Im Falle von pflanzlichen Lebensmitteln stehen dabei besonders das Aussehen und der Farbeindruck im Mittelpunkt, da sie ihm direkt Aussagen über die Reife und Frische und damit über die allgemeine Qualität ermöglichen. Eine bestimmende Rolle für die sensorischen Eigenschaften pflanzlicher Lebensmittel spielen dabei sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, die von der Ernte, über die Lagerung und während des Verarbeitungsprozesses bis zum Endprodukt ständigen Veränderungen unterliegen. Eine Gruppe von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen, die besonders im Zentrum dieser Veränderungen und damit im Brennpunkt der Forschung stehen, ist die der Polyphenole.² Diese Klasse von Verbindungen zeichnet sich insbesondere durch ihre antioxidativen,³⁻⁵ antiinflammatorischen,⁴ antikanzerogenen^{3,6,7} und antimutagenen⁶ Eigenschaften aus und ist damit von großem ernährungsphysiologischem Interesse⁸. Eine polyphenolreiche Ernährung wird in zahlreichen epidemiologischen Studien in Zusammenhang mit einem verringerten Auftreten von Diabetes,^{9,10} Herz-Kreislauf-Erkrankungen,^{7,9,11} Schlaganfällen,⁹ Fettleibigkeit⁹ und neuro-degenerativen Erkrankungen gebracht.^{9,11-13}

Neben den gesundheitlichen Aspekten haben Polyphenole auch einen bedeutenden Einfluss auf die Sensorik von Lebensmitteln. Ihre auf dem Ausfällen von Proteinen basierende Adstringenz beeinflusst maßgeblich das Mundgefühl und den Geschmack von Lebensmitteln.^{14,15} Weiterhin sind sie Ausgangspunkt vielfältiger oxidativer Abbaureaktionen, wobei die enzymatische Bräunungsreaktion die bekannteste und auch bedeutendste Reaktion darstellt. Die im Zuge dieser Reaktion entstehenden hochreaktiven *o*-Chinonstrukturen sind Schlüsselintermediate weitreichender Folgereaktionen und Interaktionen mit Proteinen bzw. Aminosäuren, die zu wesentlichen sensorischen Veränderungen beitragen. Diese können wie bei der Fermentation von Tee und Kakao zum essentieller Bestandteil des Herstellungsprozesses sein. Erst durch die oxidativen Abbaureaktionen und den resultierenden Folgereaktionen mit anderen phenolischen Strukturen und Aminosäuren entwickeln sich die charakteristischen Farb-, Geschmacks- und Aromaeindrücke.^{16,17} Zum anderen gehen diese oxidativen Prozesse in anderen Bereichen mit einer deutlichen Qualitätsminderung der Endprodukte einher: die Polymerisierung der enzymatisch oxidierten phenolischen Verbindungen führt zu unerwünschten Verfärbungen von Obst und Gemüse; die Interaktion mit Aminosäuren und Proteinen kann zu Trübungen in eigentlich klaren Produkten wie Bier, Wein und

Fruchtsäften führen; ein Verlust an Nährstoffqualität ist durch die Komplexierung von Nahrungsprotein und den Abbau von essentiellen Aminosäuren und phenolischer Verbindungen zu verzeichnen.^{18,19}

Damit ist ein Verständnis dieser Prozesse in Bezug auf die ablaufenden Reaktionen, die Interaktionen der phenolischen Substrate und die daraus resultierenden Endprodukte fundamental, um eine hohe Qualität der Produkte zu gewährleisten und diese Prozesse zu kontrollieren.²⁰

2 Aktueller Stand der Forschung

2.1 Enzymatische Bräunungsreaktion

2.1.1 Polyphenole

Im Allgemeinen beschreibt die enzymatische Bräunungsreaktion eine Abfolge enzymatischer und nicht-enzymatischer Reaktionen, bei der pflanzliche Phenolstrukturen durch Oxidation und Polymerisation zu braunen Melaninen umgesetzt werden. Polyphenole bilden mit über 8000 nachgewiesenen Strukturen die größte Klasse pflanzlicher Sekundärmetaboliten und sind ubiquitär im Pflanzenreich verbreitet.^{5,21} Das Spektrum der an der Bildung beteiligten Enzyme begründet die Bandbreite an phenolischen Strukturen. Das Phenolprofil in Früchten hängt von der Art, dem Reifegrad der jeweiligen Sorte und den Wachstumsbedingungen ab. Die Biosynthese der Polyphenole beruht auf einem komplexen Zusammenspiel des Shikimisäure- Phenylpropanoid- und des Polyketidweges. Ausgehend von diesen Biosynthesewegen lassen sich phenolische Verbindungen in die Gruppe der Nicht-Flavonoide und die Gruppe der Flavonoide unterteilen. Zu den Nicht-Flavonoiden zählen die Hydroxybenzoesäure-Derivate (C6-C1-Grundkörper) und die Hydroxyzimtsäure-Derivate (C6-C3-Grundkörper) (Abb. 1). Flavonoide bilden die bedeutendsten Vertreter und weisen einen C6-C3-C6-Grundkörper auf.^{5,22}

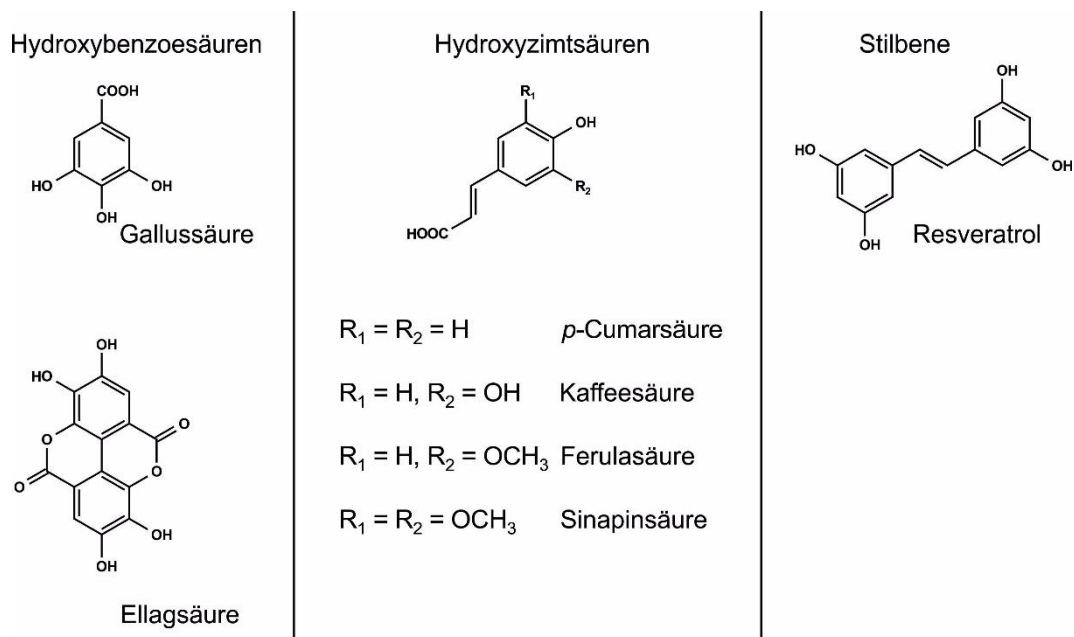


Abb. 1: Nicht-Flavonoid-Strukturen

Der wichtigste Vertreter der Hydroxybenzoesäure-Derivate ist Gallussäure. Gallussäure und die daraus abgeleitete Ellagsäure sind in Form ihrer Glycoside die Hauptbestandteile der hydrolysierbaren Tannine (Gallotannine und Ellagitannine) und Teil des Lignins. Die bedeutsamsten Vertreter der Hydroxyzimtsäure-Derivate sind *p*-Cumarsäure, Kaffeesäure, Ferulasäure und Sinapinsäure. Eine weitere wichtige Gruppe bilden die Chlorogensäuren, Ester der Chinasäure mit Hydroxyzimtsäuren, wobei Kaffeesäure die quantitativ bedeutendste Rolle spielt. Aus den Hydroxyzimtsäuren leiten sich die Stilbene mit einem C6-C2-C6-Grundkörper ab. Sie gehören zur Gruppe der Phytoalexine, die als Reaktion auf Stress, Verletzungen und Krankheit von der Pflanze gebildet werden.²² Das für Lebensmittel relevanteste Stilben ist *trans*-Resveratrol in Rotwein und Erdnüssen (*Arachis hypogaea*).²³

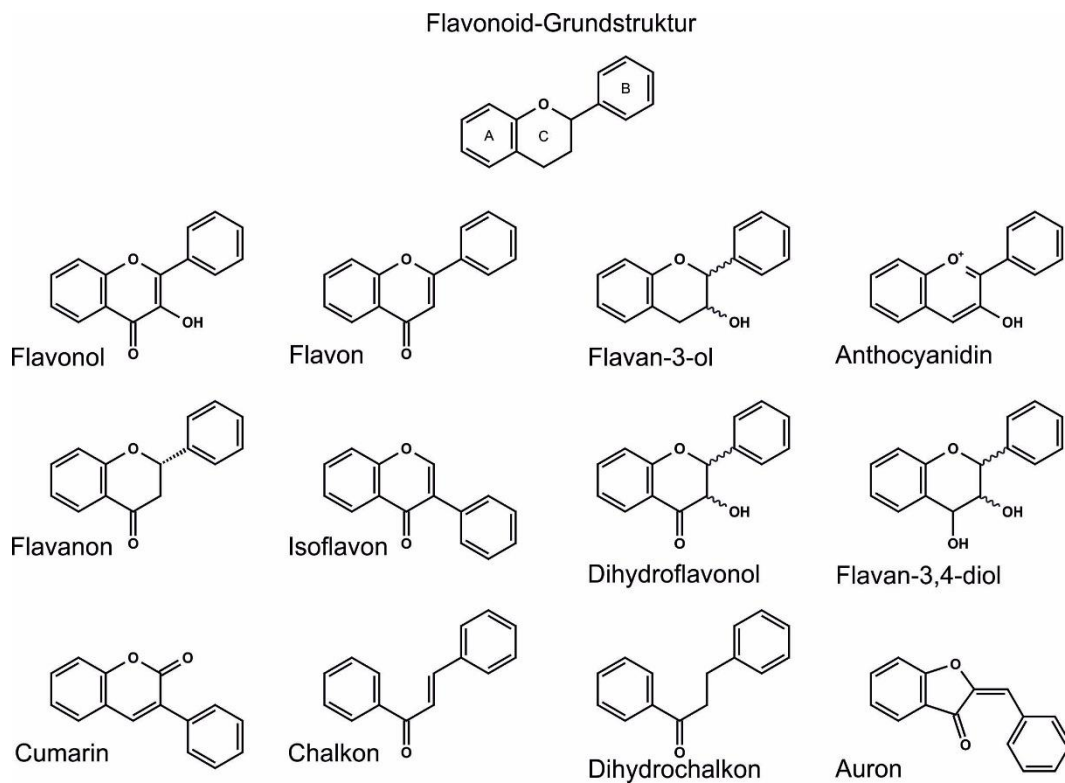


Abb. 2: Flavonoid-Strukturen

Flavonoide (Abb. 2) bilden die größte Gruppe der phenolischen Verbindungen. Sie bestehen aus zwei aromatischen Ringen, dem A- und dem B-Ring, die über eine Brücke aus drei Kohlenstoffatomen, die sich im Allgemeinen zum C-Ring schließt, miteinander verbunden sind. Flavonole, Flavone, Flavan-3-ole, Anthocyane, Flavanone und Isoflavone bilden dabei die wichtigsten Unterklassen, wohingegen Dihydroflavonole, Flavan-3,4-diole, Cumarine, Chalkone, Dihydrochalkone und Aurone eine untergeordnete Rolle spielen. Weiterhin sind die aus Flavanol-Einheiten zusammengesetzten kondensierten

Tannine (Proanthocyanidine), die quantitativ weitaus bedeutender als die hydrolysierbaren Tannine sind, erwähnenswert. Die Substituierung der Flavonoide kann vielfältig ausfallen, ist aber allgemein durch Hydroxygruppen an den Positionen 5 und 7 bzw. 3', 4' und 5' geprägt. Diese wiederum können entweder frei oder alkyliert, beispielsweise mit Methyl- oder Isopentylgruppen, acyliert oder *O*-glycosidisch mit Mono- oder Oligosacchariden bevorzugt an Position 3 oder 7 verknüpft vorliegen.²²

Die Reaktivität phenolischer Strukturen liegt in ihrer Wirkung als starke Redoxsysteme und begründet ihre leichte Oxidierbarkeit. Allgemein gilt: je elektronenreicher das aromatische System ist, desto leichter erfolgt die Oxidation. Die Autoxidation von *o*-Hydrochinonen (Abb. 3) führt in Anwesenheit von Sauerstoff vorrangig zur Bildung von *o*-Chinonen oder Semichinon-Radikalen als Intermediate. Der Initialschritt dieser autoxidativen Umsetzung wird durch die spontane Reaktion von Sauerstoff oder einem beliebigen Radikal mit einem abstrahierbaren Wasserstoffatom beschrieben, wobei diese Reaktion unter Beteiligung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und unter basischen Bedingungen schneller verläuft. Aufgrund der Delokalisierung des radikalischen Charakters über das gesamte System von 8 Atomen vermittelt der elektronenreiche Aromat eine optimale Stabilisierung des resultierenden Übergangszustandes des Hydrochinons. Anschließend erfolgt durch eine weitere Wasserstoffabstraktion die Oxidation zum elektrophilen *o*-Chinon.^{24–27}

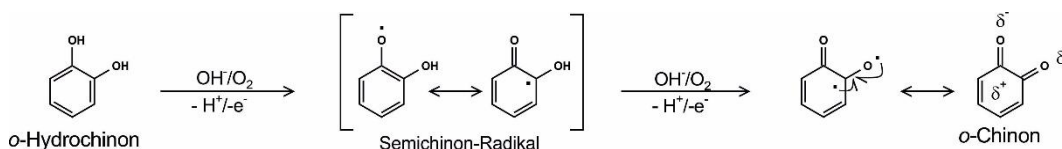


Abb. 3: Oxidation von *o*-Hydrochinonen

Dieses Reaktionsverhalten bedingt die eingangs erwähnte antioxidative Wirksamkeit phenolischer Verbindungen und wird stark durch die Reaktionsbedingungen wie von Reaktionszeit, Temperatur, pH-Wert, Sauerstoffkonzentration, Konzentration der phenolischen Verbindung und Substitutionsmuster der Hydroxylgruppen beeinflusst.^{18,24} Durch weitere Hydroxylsubstituenten wird der Elektronenreichtum weiter erhöht und somit die Fähigkeit zur Delokalisation und die damit verbundene antioxidative Eigenschaft weiter verstärkt. Die Konjugation des Aromaten zu Doppelbindungen bzw. weiteren aromatischen Teilstrukturen begünstigt dies zusätzlich. Weiterhin führt ein neutrales bzw. basisches Milieu zu einer erleichterten Abstraktion der sauren phenolischen Protonen und erhöht damit die Elektronendichte und so die Oxidierbarkeit.^{25–27} Neben der möglichen im Alkalischen begünstigten Autoxidation ist außerdem eine Oxidation der *o*-Hydrochinone

auf chemischen Wegen durch Natriummetaperiodat, Cerammoniumnitrat, Chloranil oder das Fenton-Reagenz [Fe^{2+} /Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)/ H_2O_2] möglich.²⁸ Des Weiteren sind vor allem Polyphenole in der Lage, prooxidativ wirkende Übergangsmetall-Ionen wie Eisenionen zu komplexieren und damit die Bildung von Sekundärradikalen zu verhindern.²⁹

2.1.2 Enzymatische Oxidation

Im Vergleich zur Autoxidation phenolischer Verbindungen spielt die enzymatische Oxidation im Zuge der enzymatischen Bräunungsreaktion die übergeordnete Rolle. Diese Reaktion, die in letzter Konsequenz zu hochmolekularen braunen Melaninen führt, wird durch Polyphenoloxidasen (PPO) katalysiert. Allgemein können PPOs die Hydroxylierung eines Monophenols zum *o*-Hydrochinon (Cresolaseaktivität) und die anschließende Oxidation zum *o*-Chinon (Catecholaseaktivität) katalysieren (Abb. 4).

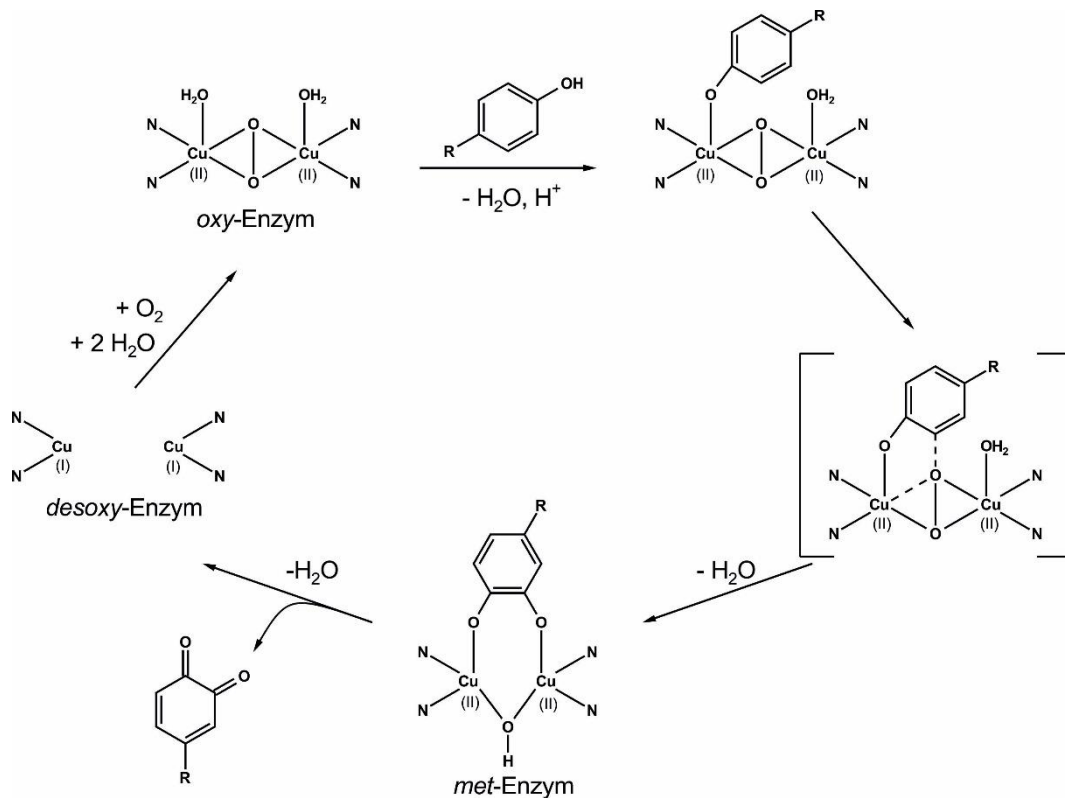


Abb. 4: Katalytischer Zyklus der PPO³⁰

Je nach Ursprung des Enzyms und der verfügbaren Substrate kann ein Reaktionsweg gehemmt oder vollständig unterdrückt werden. Tyrosinasen katalysieren 2-e⁻-Übergänge und sind demnach in der Lage ein Monophenol vollständig zum *o*-Chinon zu oxidieren, wohingegen Laccasen ausschließlich 1-e⁻-Übergänge katalysieren und damit nur *o*-Hydrochinone und *p*-Hydrochinone umsetzen.^{31,32} Auch Peroxidasen können

o-Hydrochinone unter Reduktion von Wasserstoffperoxid in einer 1-e⁻-Reaktion oxidieren.^{33,34} Das aktive Zentrum der PPO enthält zwei Cu(I)-Ionen, die über je zwei Histidinreste mit dem Apoenzym verbunden sind. Im Sinne eines „ordered mechanism“ bindet das Enzym zuerst Sauerstoff, wobei es zu einem Valenzwechsel von Cu⁺ zu Cu²⁺ kommt. Anschließend wird das Monophenol gebunden. Durch die starke Polarisierung der O-O-Bindung erfolgt die Hydroxylierung zum *o*-Diphenol und die Oxidation zum *o*-Chinon beendet den katalytischen Zyklus.^{30,35–38}

In pflanzlichen Zellen liegen Polyphenole und PPOs getrennt voneinander vor. PPOs kommen in gebundener Form in den Plastiden vor, wohingegen die phenolischen Substrate sich hauptsächlich in den Vakuolen und zu geringen Anteilen in der Zellwand, dem Intrazellulärraum und den Mitochondrien befinden. Das Zerstören der pflanzlichen Zellstruktur beispielsweise während der Lagerung oder des Herstellungs- und Verarbeitungsprozesses von Lebensmitteln führt zur Aufhebung dieser Kompartimentierung. Enzym und Substrat treten in Kontakt und die Reaktionsabfolge der enzymatischen Bräunung kann nun stattfinden.³⁹ Die Reaktionskaskade (Abb. 5) beginnt mit der bereits erwähnten Hydroxylierung des Monophenols zum elektronenreichen *o*-Hydrochinon. Anschließend erfolgt die Oxidation zum *o*-Chinon als zentralem Intermediat.⁴⁰ Obwohl in verarbeiteten Lebensmitteln die oxidierenden Enzyme häufig inaktiviert oder entfernt worden sind, können dort die Oxidationsprozesse weiterhin nicht-enzymatisch, oft über eine thermisch-induzierte Autoxidation, ablaufen.^{24,27} Bei *o*-Chinonen handelt es sich um hochreaktive, elektrophile Strukturen, sodass die weiteren Reaktionsschritte nicht-enzymatisch ablaufen. Die durch den Elektronenzug der Carbonylgruppe ausgebildete partiell positive Ladung ist durch die Konjugation der Doppelbindung in den Ring ausgedehnt. Dieses sogenannte Michael-System kann nun direkt von Nucleophilen angegriffen werden. Der Angriff kann zum einen direkt (Abb. 5, A) am *o*-Chinon erfolgen und resultiert in einer zusätzlichen Substitution am Aromaten (Michael-Addition).⁴¹ Zum anderen kann bei Vorhandensein eines exocyclischen abstrahierbaren H-Atoms auch die Umlagerung zum Chinonmethid stattfinden (Abb. 5, B). Die zusätzliche Doppelbindung verlängert das konjugierte System und die partiell positive Ladung ist weiter ausgedehnt. Dadurch kann ein nucleophiler Angriff außerhalb des Aromaten stattfinden. Nach der nucleophilen Addition erfolgt in beiden Fällen die Wiederherstellung des aromatischen Systems durch Umlagerung.⁴⁰ Aufgrund der Substratspezifität der PPOs werden fast ausschließlich reine *o*-Hydrochinonverbindungen aufoxidiert. Triphenolverbindungen wie beispielsweise Gallussäure oder konjugierte Polyphenole wie Rutin zeigen keine Reaktion mit den Enzymen. Zusätzlich vorhandene

Carboxylgruppen zeigen eine inhibitorische Wirkung. Jedoch können *o*-Chinone solche nicht umgesetzten Substrate über ein Redoxcycling oxidieren (Abb. 5, C). Voraussetzung ist, dass das Redoxpotential der Verbindung kleiner als das des *o*-Chinons ist. Nach Wiederherstellung der *o*-Hydrochinonstruktur kann erneut eine enzymatische Oxidation erfolgen.⁴²⁻⁴⁴

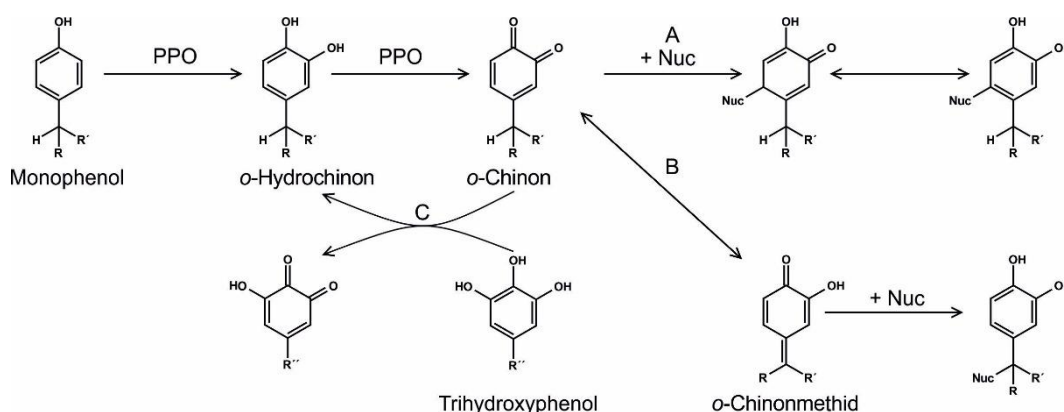


Abb. 5: Reaktionsmechanismus der enzymatischen Bräunungsreaktion

Die Interaktion der *o*-Chinone mit Nucleophilen ist die Grundlage für die Bildung der hochmolekularen farbigen Melaninstrukturen. Melanine bilden eine strukturell komplexe Gruppe von Biopolymeren, die sich durch eine große Vielfalt in der Zusammensetzung, Farbe, Größe, Erscheinung und Funktion auszeichnen und in allen lebenden Organismen vorkommen.⁴⁵ In Bezug auf die Struktur der phenolischen Komponente, die von vergleichsweise kleinen Phenolsäuren, über Flavonoide und komplexen Procyanidinstrukturen reichen kann, scheint es offensichtlich, dass je komplexer die Ausgangsstruktur ist, desto komplexer die Reaktionsprodukte sein werden.⁴⁶ Als nucleophile Reaktionspartner kommen Phenole als reduziertes *o*-Hydrochinon in Frage. Diese können das Chinon im Sinne einer oxidativen Kupplung unter Ausbildung einer stabilen C-C-Verknüpfung angreifen. Weiterhin stehen verschiedene nucleophile Seitenketten von Aminosäuren und Proteinen als bedeutende Reaktionspartner zur Verfügung.^{16,18}

2.1.3 Reaktionen von Polyphenolen und *o*-Chinonen mit Aminosäuren und Proteinen

Proteine sind hochkomplexe Makromoleküle, deren vielfältige Strukturen und Funktionen auf die ihnen zugrunde liegende Aminosäuresequenz zurückzuführen sind. Sie sind in der Lage mit anderen Lebensmittelinhaltsstoffen wie Polyphenolen Komplexe zu bilden, woraus Veränderungen in ihren strukturellen, ernährungsphysiologischen und

funktionellen Eigenschaften resultieren.¹⁹ Im Allgemeinen interagieren die aus den phenolischen Strukturen gebildeten Chinone und Aminosäuren in lebenden Systemen durch die in den Zellen herrschende Kompartimentierung nicht miteinander. Durch die Zerstörung der Zellstruktur können die im Zuge der enzymatischen Oxidation der phenolischen Verbindungen entstehenden *o*-Chinone mit Aminosäuren und Proteinen in Kontakt treten. Rohn fasst die möglichen Reaktionsorte für Polyphenole mit Proteinen wie folgt zusammen: 1. in der Pflanze; 2. während der Lebensmittelverarbeitung; 3. während der Verdauung im Magen-Darm-Trakt; 4. nach der Absorption mit Proteinen des Blutplasmas und 5. schließlich mit Proteinen in den Zielgeweben des menschlichen Körpers.⁴⁶ Die resultierenden Interaktionen können dabei entweder reversibler (nicht-kovalenter) oder irreversibler (kovalenter) Natur sein.¹⁶ Prigent et al. zeigten mit ihren Untersuchungen zum Bindungsverhalten von Chlorogensäure, dass beide Bindungstypen simultan auftreten.⁴⁷

Die nicht-kovalenten Wechselwirkungen umfassen dabei Wasserstoffbrückenbindungen (H-Brücken), Van-der-Waals-Kräfte, hydrophobe, ionische und π -Wechselwirkungen.^{18,19} Berechnungen der freien Energien, Enthalpien und Entropien über Infrarotspektren zur Bildung von H-Brücken unterschiedlicher Bindungspaare zeigten, dass die H-Brücken zwischen den Hydroxylgruppen phenolischer Verbindungen und den Peptidbindungen zu den vergleichsweise stärksten Bindungstypen zählen. Dies begünstigt die Bildung von Phenol-Protein-Komplexen.^{24,48-51} Weiterhin trägt der Phenyl-Ring zur Ausbildung hydrophober Wechselwirkungen bei.²⁴ Ionische Bindungen können sich beispielsweise über die ionisierten Carboxyl-Gruppen der Hydroxymyrsäuren mit den basischen Seitenketten von Arginin oder Lysin der Proteine ausbilden.^{24,50,52} Untersuchungen von Bianco et al. belegen zwar, dass die π -Wechselwirkungen bei moderaten pH-Bedingungen die vorherrschende Interaktionsmöglichkeit darstellen,⁵³ jedoch sind die generellen Wechselwirkungen von verschiedenen Faktoren wie Temperatur, pH-Wert des Milieus, Art, Struktur und Konzentration der Proteine und der phenolischen Verbindungen abhängig.¹⁹ So scheint die Temperatur dabei größtenteils einen Einfluss auf nicht-kovalente Bindungstypen wie beispielsweise die Bildung von H-Brücken und hydrophoben Wechselwirkungen zu haben, sodass mit steigender Temperatur eine Verringerung der Bindungsaffinität von 5-*O*-Caffeoylchinasäure mit verschiedenen Proteinen zu beobachten war.¹⁹ Im Gegensatz zur Temperatur beeinflusst der pH-Wert lediglich den Grad der Bindung jedoch nicht die Bindungsaffinität.⁵⁴ Die pH-abhängige Protonierung der Proteinseitenketten nimmt dabei Einfluss auf die Anzahl der potentiellen Bindungsstellen. Der pH-Wert und der isoelektrische Punkt des Proteins bestimmen dessen Löslichkeit und

somit die Verfügbarkeit der Bindungsstellen.⁵² Über die Protonierung und dementsprechend über die Ladung der sauren und basischen Seitenketten lassen sich damit die ionischen Interaktionen steuern.⁵² Diese pH- und Ladungs-Abhängigkeit zeigte sich sowohl in der Ausbildung von H-Brücken als auch in der Stärke der hydrophoben Wechselwirkungen.^{54,55} Weiterhin ist der pH-Wert ein Schlüsselfaktor für die Ausbildung kovalenter Protein-Phenol-Bindungen, da er maßgeblich die Bildung von *o*-Chinonen und die Nucleophilie der reaktiven Aminosäureseitenketten beeinflusst.^{19,54,56}

Der grundsätzliche strukturelle Aufbau der Reaktionspartner nimmt fundamentalen Einfluss auf die möglichen Interaktionen. Bei Proteinen wird dies durch die individuelle Aminosäuresequenz festgelegt, sodass die Interaktionen für jedes Protein spezifisch sind. Die allgemeine Bindungsaffinität von phenolischen Verbindungen mit Proteinen ist abhängig von ihrem Molekulargewicht, ihrer strukturellen Flexibilität und ihrem Grad der Methylierung, Hydroxylierung, Glykosylierung und Hydrierung.^{19,57,58} Ein höheres Molekulargewicht^{59,60} sowie Hydroxylierungen der A- und B-Ringe der Flavonoide erhöht die Bindungsaffinität der Polyphenole mit Proteinen. Methylierungen, Methoxylierungen, Glykosylierungen und eine Hydrierung der Doppelbindung zwischen C2- und C3-Atom des C-Rings führen dagegen zu einer Verringerung.⁵⁸ All diese Untersuchungen sowie die im Großteil der Literatur behandelten Phenol-Protein-Wechselwirkungen beziehen sich auf die allgemeine Interaktion der beiden Reaktanden ohne konkrete Strukturen zu beschreiben. Außerdem entfällt der überwiegende Teil der behandelten Interaktionen auf die nicht-kovalenten Bindungen,^{18,61} obwohl die kovalenten Bindungen von besonderem Interesse sind, da diese nachhaltig die Eigenschaften beider Reaktionspartner beeinflussen. Nicht-kovalente Bindungen scheinen keinen Einfluss auf die Funktion zu haben.^{18,19,46,47}

2.1.4 Kovalente Interaktionen

Die Ausbildung kovalenter Bindungen zwischen phenolischen Strukturen und Proteinen setzt die Oxidation der Phenolkomponente zu einer *o*-Chinon-Struktur als Initialschritt voraus. Daran schließt sich eine Michael-Addition der nucleophilen Seitenketten der Aminosäuren der Proteine an. Somit ist auf Seiten der Phenolkomponente eine oxidierbare Catechol-Grundstruktur die strukturelle Grundvoraussetzung für die Entstehung einer kovalenten Bindung. Andererseits hängen kovalente Bindungen von Proteinen vor allem von deren Aminosäuresequenz und der damit verbundenen Struktur ab. Diese entscheidet über die Verfügbarkeit von reaktiven, nucleophilen Seitenketten.

Erste Studien über die Reaktivität der funktionellen Seitenketten mit enzymatisch generierten *o*-Chinonen zeigten, dass Aminosäuren über freie Thiol- und Aminogruppen

(α , ε) reagieren. Im Gegensatz dazu scheinen die Amid-, Guanidin- und Hydroxylgruppen keine Reaktion zu zeigen.^{62,63} Reaktionen mit Aminosäuren führten mit Ausnahme des Cysteins zur Bildung farbiger Produkte⁶³ und verliefen bei einem neutralen pH-Wert und unter moderaten Temperaturbedingungen sehr schnell.⁶²

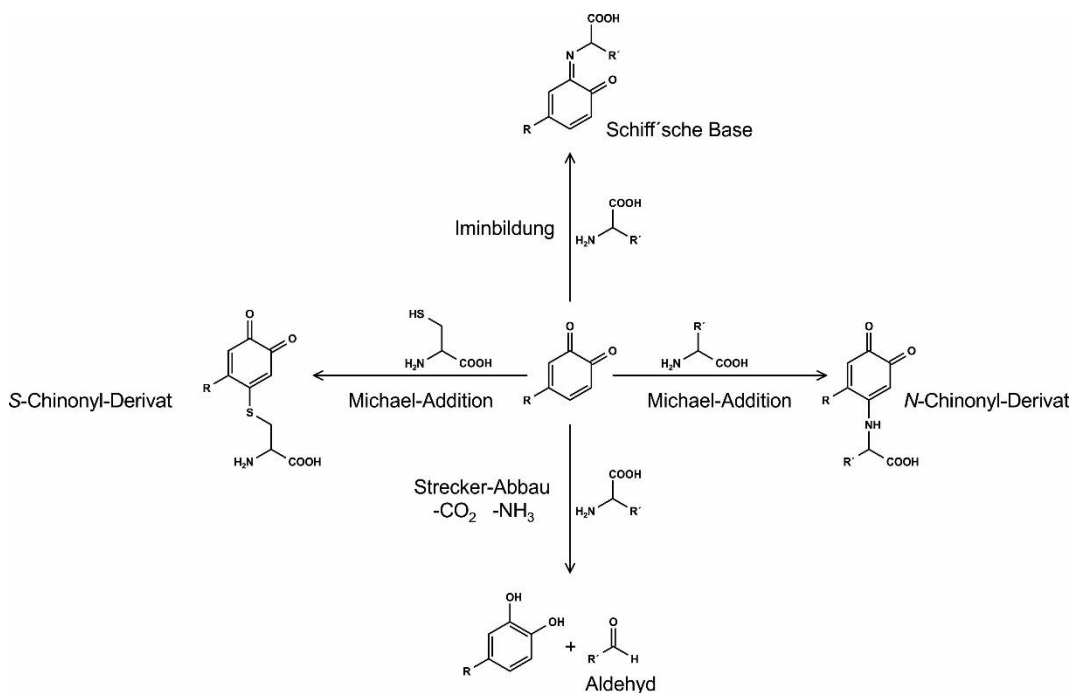


Abb. 6: Kovalente Interaktionen von Aminosäuren mit *o*-Chinonen¹⁶

Zum aktuellen Stand der Literatur gilt als gesichert, dass *o*-Chinone mit den α - und im Falle des Lysins den ε -Aminogruppen, der Thiolgruppe des Cysteins, der Indolgruppe des Tryptophans, der Amidgruppe des Glutamins oder des Asparagins, der Imidazolgruppe des Histidins und der phenolischen Seitenkette des Tyrosins kovalente Bindungen eingehen können.^{16,64–66} Die Amino- und Thiofunktionen sind dabei die stärksten Vertreter dieser nucleophilen Seitenketten. Dabei ist zu erwähnen, dass im Falle des Lysins und des Cysteins die nucleophile Michael-Addition vorwiegend durch die ε -Aminogruppe bzw. durch die Thiolgruppe erfolgt.⁶³ Prolin als sekundäre Aminosäure ist ebenfalls in der Lage kovalente Bindungen mit phenolischen Verbindungen einzugehen und verhindert durch seine Struktur die Ausbildung von α -Helices und erhöht damit die Verfügbarkeit möglicher nucleophiler Seitenketten für eine kovalente Bindung.⁶⁷ Besonders die Interaktion von Polyphenolen mit Prolin-reichen Proteinen des Speichels gilt als Ursache für das adstringierende Mundgefühl.^{14,15} Die primären Reaktionsprodukte sind Chinonimine (Schiff'sche Basen), *N*-Chinonyl-Derivate und *S*-Chinonyl-Derivate (Abb. 6).¹⁶ Weiterhin bildet die Reaktion von *o*-Chinonen mit Aminosäuren die Grundlage für den Strecker-Abbau. Dabei erfolgt ein oxidativer Abbau der Aminosäuren zu den sogenannten Strecker-

Aldehyden über die Bildung von Chinoniminen durch Decarboxylierung und Desaminierung.⁶⁸⁻⁷⁰ Die Entstehung dieser Aldehyde ist zentraler Bestandteil des Aromaprofils für viele prozessierte Lebensmittel wie Kaffee, Kakao, Tee und Tabak.^{68,69}

2.1.5 Analytik der Polyphenol-Protein-Addukte

Aus den ersten Untersuchungen von Mason et al. und Pierpoint zeichnete sich bereits eine große Schwierigkeit in Bezug auf die Analytik der Polyphenol-Aminosäure- bzw. Polyphenol-Protein-Addukte ab. So konnten keine konkreten Strukturen der vermeintlichen Addukte nachgewiesen werden, da sie für eine Isolation zu instabil waren.^{62,63} Die Polyphenole bleiben nach der Adduktbildung weiterhin reaktiv und können entweder erneut enzymatisch, beispielsweise über Laccasen, oder nicht-enzymatisch über ein Redoxcycling oxidiert werden, woraufhin ein erneuter nucleophiler Angriff durch Aminosäuren oder Proteine erfolgen kann. Dieses Protein-Crosslinking führt zu hochmolekularen, dunkel gefärbten Intermediaten, die sich der Analytik entziehen können (Abb. 7).⁴⁶

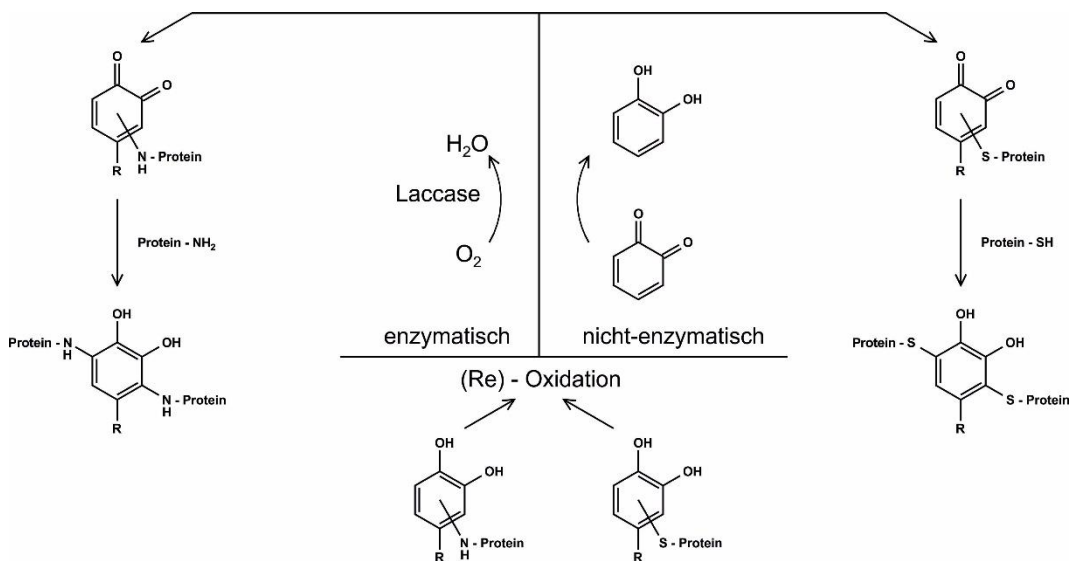


Abb. 7: Protein-Crosslinking nach Rohn⁴⁶

Die Reaktivität der *o*-Chinone gegenüber verschiedenen Nucleophilen wie den phenolischen Verbindungen und den Aminosäureseitenketten lässt bereits auf eine komplexe Reaktionskaskade mit ebenso komplexen Reaktionsprodukten schließen. Rohn teilt das Produktspektrum in drei Klassen ein: 1. einfache Reaktionsprodukte, die aus je einer Phenolkomponente und einer Aminosäureseitenkette bestehen, 2. gemischte Reaktionsprodukte, die sowohl Monomere als auch Oligomere aufweisen, und 3. komplexe Polyphenol-Protein-Vernetzungen.⁴⁶ Wenn man die Situation in Lebensmitteln bedenkt, so

sind dort weitere Inhaltsstoffe wie Polysaccharide als weitere potentielle Reaktionspartner vorhanden. Das bildet die Grundlage für eine heterogene Vernetzung zwischen Proteinen und Kohlenhydraten, die über die oxidierten Phenolfunktionen phenolischer Säuren oder der Tyrosinseitenketten von Proteinen vermittelt wird. Diese Art der Vernetzung wurde für Nicht-Stärke Polysaccharide, wie Arabinoxylane,^{71,72} die über eine Esterbindung mit der phenolischen Komponente, meist Ferulasäure, verbunden sind, nachgewiesen. Von Piber et al. konnte eine Dehydroferulasäure-Tyrosin-Modifizierung als eine mögliche Vernetzungsstruktur identifiziert werden.^{73,74} Die Vernetzung von Proteinen und Kohlenhydratverbindungen ist ein häufiges Reaktionsmuster, das während der nicht-enzymatischen Bräunungsreaktion, der Maillard-Reaktion, zu hochmolekularen, farbigen Melanoidinen führt. Im Zuge dieser komplexen Reaktionskaskaden können auch andere Strukturklassen wie phenolische Verbindungen eingebunden werden.⁴⁶ So zeigten beispielsweise die von Brudzynski et al. untersuchten Melanoidin-Fractionen aus hitzebehandeltem Honig eine verstärkte Einlagerung phenolischer Verbindungen.⁷⁵

Diese Komplexität und Reaktivität der Reaktionsprodukte stellt die Analytik vor große Herausforderungen und Einschränkungen, sodass verschiedene indirekte und direkte Analysenmethoden entwickelt wurden, um die Interaktionen und diskrete Strukturen zu identifizieren. Die indirekten Ansätze umfassen neben der Quantifizierung der nicht-modifizierten phenolischen Substrate mittels HPLC-DAD⁷⁶ zum einen die Analytik der nicht-modifizierten Aminosäureseitenketten der Proteine und der gebundenen Phenolkomponenten und zum anderen der veränderten funktionellen und strukturellen Eigenschaften.⁴⁶ Die Untersuchung der Aminosäuren kann zum einen durch die Analyse der kompletten Proteinsequenz und Vergleich mit dem nicht modifizierten Protein oder durch Analyse von ausgewählten Aminosäuren erfolgen.^{46,77} Diese erfordern den Einsatz reduzierender oder denaturierender Reagenzien, wie Dithiothreitol, Mercaptoethanol, Natriumdodecylsulfat (SDS) oder Harnstoff, um die native Proteinstruktur zu zerstören. Durch die Zerstörung der nicht-kovalenten Bindungen und Disulfidbrücken werden so alle Aminosäuren der Analyse zugänglich gemacht.⁷⁸⁻⁸⁰ Die freien Aminogruppen können als Indikator für den Grad an Modifizierung von Proteinen mit pflanzlichen Phenolstrukturen gesehen werden. Eine bewährte Methode dafür ist die Derivatisierung mit Trinitrobenzoesulfonsäure in einer 1%-igen SDS-Lösung.^{46,78,81,82} In Bezug auf den Nährwert kann darüber auch die freie Menge an Lysin bestimmt werden.⁸³ Thiol-Gruppen lassen sich mittels Derivatisierung durch Monobromobiman über eine Fluoreszenz-Messung^{78,80} oder über die Derivatisierung mittels 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure) und anschließender Absorptionsmessung bestimmen.^{81,84} Tryptophan ist die einzige

aromatische Aminosäure, die bei einer Anregung im Bereich von 295 nm eine starke Emission zeigt, die mit dem Tryptophangehalt des untersuchten Proteins korreliert. Eine Modifizierung dieser Seitenketten führt zu einem signifikanten Fluoreszenz-Quenching. Die Untersuchung des Quenchings erfolgt dabei nach Anregung bei 290 nm und Messung der Emission im Bereich von 320 bis 390 nm.^{78,85}

Die Bestimmung der kovalent gebundenen Phenolstrukturen kann erst nach deren Freisetzung erfolgen. Gebundene Chlorogensäure kann über Chinasäure, die nach einer Verseifung freigesetzt wird, durch anschließende Oxidation und Reaktion mit Thiobarbitursäure als pinkes Reaktionsprodukt bei 549 nm bestimmt werden. Weiterhin können estergebundene Phenolsäuren nach einer alkalischen Hydrolyse analysiert werden.^{46,86} Diese Methode birgt aufgrund des basischen Milieus die Gefahr der Oxidation und des Abbaus der phenolischen Verbindungen, wodurch der Einsatz einer Kombination aus Antioxidantien und Metallchelatoren notwendig ist.⁸⁷ Andere analytische Ansätze der Phenolkomponenten beruhen auf ihren spektroskopischen Eigenschaften.⁸⁸ Kovalente Reaktionen zwischen Proteinen und Polyphenolen können ebenfalls anhand der veränderten physiko-chemischen Eigenschaften bestimmt werden. Die relevantesten Änderungen erfahren die Proteine in Bezug auf ihre strukturellen und funktionellen Eigenschaften, ihren Nährwert und Verdaubarkeit. Im Bereich der phenolischen Reaktionspartner verändert sich der Gehalt der verfügbaren Phenolstrukturen. Weiterhin zeigten sich Veränderungen in der *in vitro* und der *in vivo* Bioverfügbarkeit und in der antioxidativen Aktivität.¹⁹ Diese Reaktionen führen dabei zu deutlichen Veränderungen im chromatographischen und elektrophoretischen Verhalten. Die kovalente Modifizierung von Molkenproteinen und α -Chymotrypsin mit verschiedenen Phenolsäuren zeigte eine allgemeine Verschiebung zu niedrigeren isoelektrischen Punkten. Dies war auf eine Verringerung der geladenen Seitenketten durch die Reaktion der oxidierten phenolischen Verbindungen mit beispielsweise der ϵ -Aminofunktion des Lysins, aber auch auf das Einführen zusätzlicher Carboxylfunktionen über die neu gebundenen Phenolsäuren zurückzuführen.⁸⁹ Durch die Veränderung der Proteinstruktur verändern sich die hydrophoben und hydrophilen Eigenschaften und gleichzeitig die Löslichkeit der Addukte. Infolgedessen ändern sich auch techno-funktionale Eigenschaften wie das Gelier-, Schaum- und Emulsionsverhalten.^{90,91} Schließlich wird durch die Modifizierung die biologische Aktivität der beiden Reaktanden beeinflusst. Studien zur antioxidativen Aktivität mittels *Trolox-Equivalent-Antioxidative-Capacity* (TEAC)- und 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)-Test zeigten, dass durch die Proteinmodifizierung allgemein die antioxidative Aktivität der Polyphenole im Vergleich zu ihren ungebundenen Derivaten

verringert wird.^{92,93} Die Modifizierung der Aminosäureseitenketten führte allgemein zu einer geringeren Verdaubarkeit der Proteine, womit ein deutlicher Nährwertverlust einhergeht. Weiterhin wiesen verschiedene Enzyme eine geringere Aktivität durch die Modifizierung auf.¹⁹ In anderen Fällen wie dem Ovalbumin und dem Erdnussallergen Ara h1 entfalten sich durch Interaktion mit (-)-Epigallocatechingallat die Proteine, wodurch sich ihre Verdaubarkeit erhöht.^{94,95} Die Änderungen in der Proteinstruktur haben zudem Auswirkungen auf das allergene Potential von Proteinen. Die Interaktion mit Polyphenolen greift an zwei Punkten der allergischen Immunantwort an: der Sensibilisierung und der Allergenexposition. In der Sensibilisierungsphase können die allergenen Proteine durch die phenolische Interaktion zu unlöslichen Komplexen reagieren und damit hypoallergen werden. Weiterhin behindert die durch die Polyphenole ausgelöste Konformationsänderung der Proteine die Exposition der allergenen Proteinregionen.⁹⁶ So zeigten Untersuchungen zu dem Einfluss verschiedener Flavonoid-Strukturen auf die Eigenschaften des Erdnussallergens Ara h1, dass das allergene Potential deutlich verringert wurde.⁹⁵

Das übergeordnete Ziel der Polyphenol-Protein-Analytik besteht in der direkten Aufklärung der Strukturen konkreter Reaktionsprodukte. Die bereits erwähnten Schwierigkeiten bezüglich der Reaktivität und Komplexität erschweren eine Isolation und Strukturaufklärung der Produkte. In den letzten Jahren hat sich für die Analyse der Polyphenol-Protein-Addukte die Massenspektrometrie gekoppelt mit einer sanften Ionisierungstechnik, wie der *Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionization*- (MALDI) oder der *Surface-Enhanced-Laser-Desorption/Ionization*- (SELDI)-Ionisierungsmethode gekoppelt mit einem Flugzeitmassenspektrometer [*Time-Of-Flight Mass Spectrometer* (TOF-MS)] etabliert. Kombiniert mit der SDS-PAGE und dem Einsatz von Endoproteasen lassen sich über das sogenannte *Peptide-Mass-Fingerprinting* mit dem Vergleich des nicht-modifizierten Proteins die Bindungsstellen der Polyphenole an den modifizierten Proteinen zu einem gewissen Ausmaß bestimmen.^{46,97,98} Darüber hinaus eignet sich die SDS-PAGE mit anschließender Nitroblautetrazolium (NBT)-Färbung zur Identifizierung kovalenter Polyphenol-Protein-Interaktionen.⁹⁹ Oft überwiegt der Gehalt der nicht-modifizierten Proteinstrukturen in den Reaktionslösungen, sodass eine weitere Aufreinigung der Proben unabdingbar ist. Außerdem können sowohl die MALDI-TOF-MS als auch die SELDI-TOF-MS in Abhängigkeit des modifizierten Proteins und dem Grad der Modifizierung in Bezug auf die Auflösung an ihre Grenzen stoßen.^{46,97} Die Analyse des gesamten Proteins umfasst jedoch nur einen kleinen Teil der Forschung an den kovalenten Interaktionen zwischen Polyphenolen und Proteinen. Der Großteil befasst sich mit Studien kleinerer

Reaktionsprodukte, die aus Untersuchungen mit verschiedenen Aminosäuren stammen, die aufgrund ihrer im Vergleich zu Proteinen einfacheren Struktur der Analytik leichter zugänglich sind. Hier hat sich vor allem die mit Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie und Elektrospray-Ionisation gekoppelte Tandem-Massenspektrometrie (HPLC/ESI-MSⁿ) etabliert.⁴⁶

Die bereits erwähnten Auswirkungen auf die physiko-chemischen Eigenschaften der kovalenten Interaktionen von Polyphenolen, Aminosäuren und Proteinen haben sowohl in Lebensmitteln als auch in Lebewesen weitreichende Folgen. Sie beeinflussen die Farbe, den Geschmack und das Aroma vieler pflanzlicher Produkte wie Tee, Kaffee, Kakao, Tabak und Wein.¹⁶ Als Bestandteil der enzymatischen Bräunungsreaktion sind sie maßgeblich sowohl an der Verfärbung von pflanzlichen Lebensmitteln während des Prozessierens als auch an der Pigmentierung tierischer Organismen über die sogenannte Melanogenese beteiligt. Die eingangs erwähnte Vielfältigkeit der phenolischen Substrate führt zu einer ebenso großen Vielfalt an Intermediaten und Bräunungsstrukturen und an den zugrunde liegenden Reaktionsmechanismen.

2.1.6 Melanogenese

Aus den bereits erwähnten Untersuchungen von Pierpoint zeichnete sich bereits der Einfluss von Aminosäuren auf die Farbgebung der enzymatischen Bräunung und damit auf die Bildung von Melaninen ab.⁶³ Die allgemeine Biosynthese des Melanins, die in den sogenannten Melanozyten von Bakterien, Pilzen, Pflanzen und Tieren stattfindet, wird als Melanogenese bezeichnet. Sie beschreibt einen speziellen Reaktionsweg der enzymatischen Bräunungsreaktion. Die Melanine, die bei Säugetieren wie dem Menschen für die Pigmentierung verantwortlich sind und auf die im Folgenden der Fokus gelegt wird, lassen sich in die Gruppen der Eu- und Phäomelanine unterteilen. Weitere Melaninklassen sind das in Pflanzen vorkommende Allomelanin, das in der *substantia nigra* des Gehirns gebildete Neuromelanin, das von Mikroorganismen produzierte Pyomelanin und synthetisch hergestelltes Melanin.^{45,100} Im Allgemeinen haben die unlöslichen Eumelanine eine braun bis schwarze Färbung, wohingegen die Farbe der alkalilöslichen Phäomelanine von gelb bis rot-braun variieren kann. Die Biosynthese dieser beiden Melaningruppen ist, angelehnt an das Reaktionsprinzip der enzymatischen Bräunung, eine Kombination aus enzymatischen und nicht-enzymatischen Reaktionen, die zuerst von Raper¹⁰¹ beschrieben,

später von Mason bestätigt und erweitert¹⁰² und zum sogenannten Raper-Mason-Reaktionsweg zusammengefasst wurden.¹⁰³

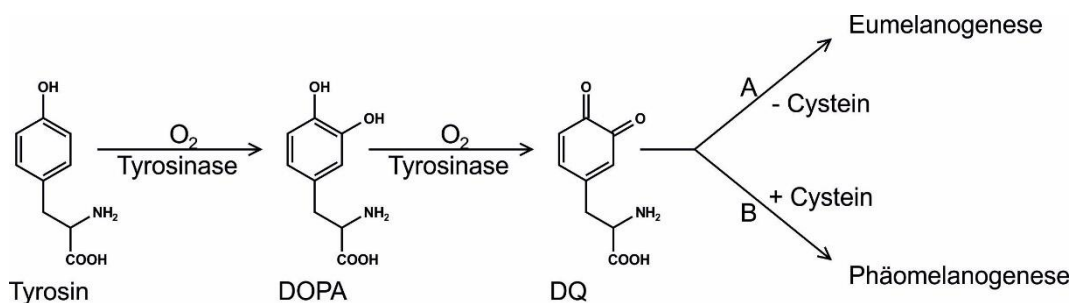


Abb. 8: Initialschritt der Melanogenese

Der Initialschritt besteht aus der Hydroxylierung der Aminosäure Tyrosin zu 3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) und der anschließenden Oxidation zum *o*-Chinon (DQ), dem Schlüsselintermediat der Melanogenese (Abb. 8).¹⁰⁴ Sowohl Hydroxylierung als auch die Oxidation werden dabei über die Tyrosinase katalysiert. Eine Beteiligung der Peroxidase an der Oxidation zu DQ wird ebenfalls vermutet.¹⁰⁵ Danach verzweigt sich die Biosynthese in Abhängigkeit der Ab- (Abb. 8, A) bzw. Anwesenheit (Abb. 8, B) der Aminosäure Cystein in Form der reinen Aminosäure oder in Form von Glutathion. Dabei findet die Biosynthese von Eumelanin unter der Abwesenheit von Cystein statt und wird durch einen neutralen pH-Wert des Milieus begünstigt. Nach der Oxidation kann eine spontane, intramolekulare 1,4-Addition der Aminogruppe des DQ am Benzolring erfolgen, die zum instabilen Leukodopachrom führt. Da aufgrund der Substratspezifität der Tyrosinase keine direkte Oxidation möglich ist, kann Leukodopachrom über ein DQ-DOPA-vermitteltes Redoxcycling schnell zu Dopachrom als weiteres zentrales Intermediat oxidiert werden (Abb. 9, A).¹⁰⁴ In einer Nebenreaktion kann DQ durch Wasseraddition zu einem Trihydroxyderivat (Topa) hydroxyliert werden (Abb. 9, B). Eine wieder über Redoxcycling vermittelte Oxidation führt zu *p*-Topachinon und in letzter Konsequenz ebenfalls zu Dopachrom.¹⁰⁶ Dieser Reaktionsweg ist besonders bei sauren pH-Werten von Bedeutung, da die unter diesen Bedingungen protoniert vorliegende Aminogruppe eine Cyclisierung verhindert. Dopachrom kann nun zu 5,6-Dihydroxyindol (DHI) decarboxyliert oder enzymatisch über die Dopachrom-Tautomerase katalysiert zum 5,6-Dihydroxyindol-2-carbonsäure (DHICA) tautomerisieren. Diese Umlagerung wird zudem durch Übergangsmetall-Ionen wie Co²⁺, Cu²⁺ oder Ni²⁺ gefördert. Die Enzymaktivität und das Vorhandensein der Übergangsmetall-Ionen bestimmen letztendlich das DHI/DHICA-Verhältnis im Eumelanin. Über die Redoxcycling-vermittelte Oxidation zum 5,6-Indolchinon (IQ) bzw. 5,6-Indol-2-carbonsäurechinon (ICAQ)¹⁰⁷ erfolgt schließlich die Bildung der hochmolekularen Eumelanine.^{45,108}

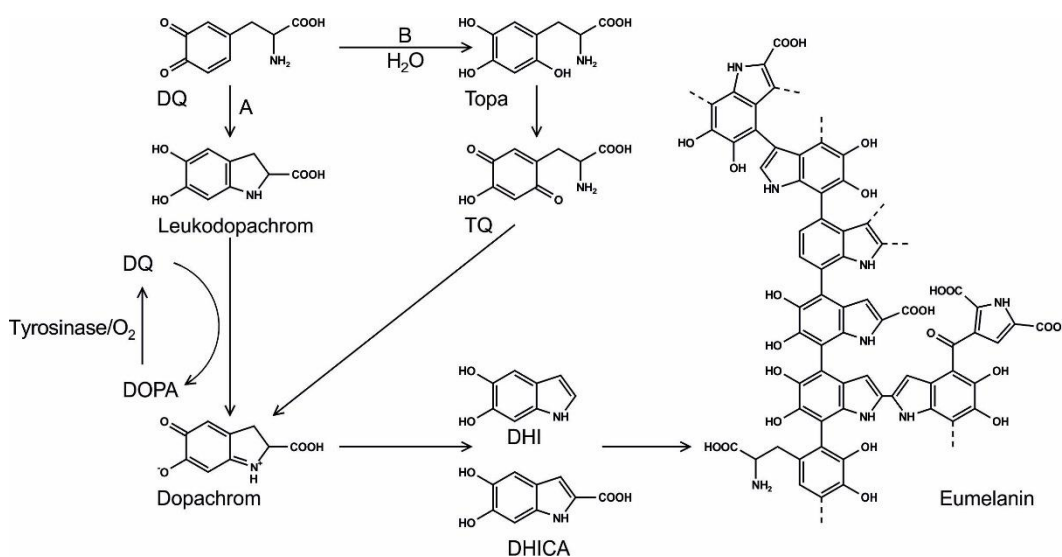


Abb. 9: Eumelanogenese^{45,104}

Dabei zeigen die von DHI abgeleiteten Melanine im Vergleich zu den von DHICA abgeleiteten gelb-braunen Melaninen eine schwarze Färbung. Das finale Eumelaninpigment ist eine komplexe Mischung dieser Struktureinheiten und es konnten bereits diverse Oligomere aus der oxidativen Verknüpfung der DHI- und DHICA-Einheiten strukturell aufgeklärt werden.¹⁰⁸ Die aktiven Positionen für eine Polymerisierung von DHI sind 2, 3, 4 und 7. Dagegen ist in DHICA die Position 2 durch die Carboxylgruppe blockiert und die Position 3 durch den Elektronenzug der Carboxylgruppe weniger reaktiv. Die Oxidation von DHI führt zu Dimeren, Trimeren und Tetrameren, die über 2,2′-, 2,4′- und 2,7′-Bindungen verknüpft sind. Die Polymerisierung der DHICA-Einheiten erfolgt über die Bildung von 4,4′-, 4,7′- und 7,7′-Bindungen.^{109–114} Dies führt dazu, dass DHICA zur Bildung linearer Polymere neigt, wohingegen DHI die Bildung verzweigter Polymere ermöglicht. Weiterhin ist es möglich, dass nicht-cyclisierte Einheiten des Tyrosins oder DOPAs oder oxidierte Indoleinheiten wie das IQ in geringen Mengen in das Polymer eingebaut werden können. Es wird vermutet, dass das DHI-Melaninchromophor hauptsächlich durch intrinsische Effekte, die die Delokalisierung der π -Elektronen über das oligomere Grundgerüst betreffen, bestimmt wird. Dagegen überwiegen im schwarzen DHICA-Melaninchromophor die extrinsischen Effekte wie die intermolekulare Störung des π -Elektronensystems bedingt durch Zusammenlagerung der DHICA-Einheiten.¹¹⁵

Wie bereits erwähnt, setzt die Bildung von Phäomelanin die Anwesenheit von Cystein voraus (Abb. 10). Ausgehend von DQ kann eine Michael-Addition an der Position 2, 5 oder 6 zu entsprechenden Cysteinyl-DOPAs (Cys-DOPA) erfolgen, wobei es auch zu Additionen an mehreren Positionen kommen kann. In Tyrosinase-katalysierten Modellinkubationen von DOPA mit einem Überschuss Cystein bildeten sich vorzugsweise

5-*S*-Cys-DOPA (5-*S*-Cys-DOPA) (74%), welches auch *in vivo* das quantitativ bedeutsamste Addukt darstellt, und 2-*S*-Cys-DOPA (14%). Zu geringen Mengen bildeten sich 6-*S*-Cys-DOPA (5%) und das Di-Addukt 2,5-*SS'*-Dicysteinyl-DOPA (1%)¹¹⁶, aber auch die Bildung des Tri-Addukts 2,5,6-*S,S',S''*-Tricysteinyl-DOPAs mittels Peroxidase ist möglich.¹⁰⁵ Die Reaktion mit Glutathion führt zuerst zu Glutathionyl-DOPA, welches durch Peptidasen zu den Cys-DOPAs abgebaut wird. Die Redoxcycling-vermittelte Oxidation zu Cysteinyl-DQ bildet die Voraussetzung für die Cyclisierung zum Chinonimin (QI). Dieses instabile Intermediat kann sich nun zu 1,4-Benzothiazin-3-carbonsäure (BTCA) oder zu 1,4-Benzothiazin (BT) nach erfolgter Decarboxylierung umlagern. Die Cyclisierung erfolgt immer über eine 1,2-Addition. Eine 1,4-Addition, die zu der Bildung von Aminochinonen führen würde, wird in keiner Studie beschrieben.¹¹⁷

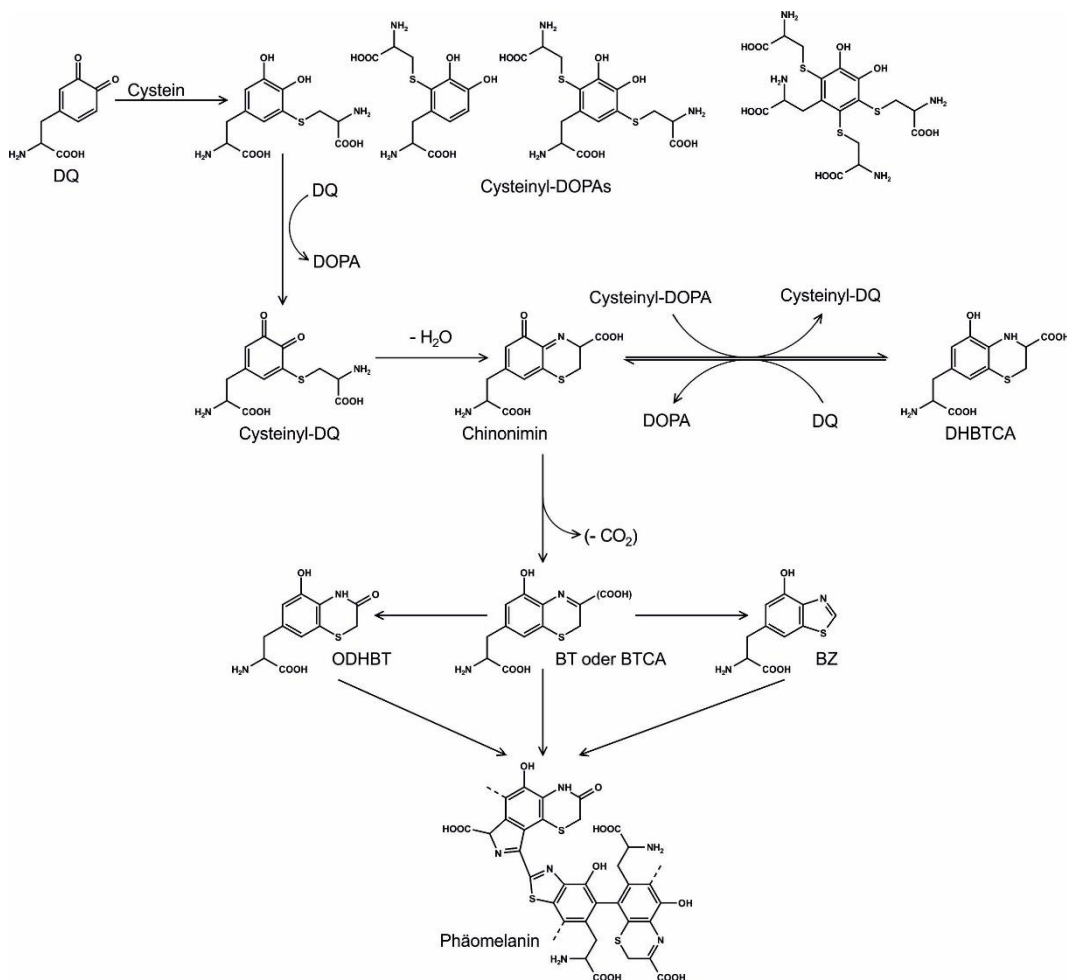


Abb. 10: Phäomelanogenese^{45,104,105}

Napolitano et al. zeigten in ihren Untersuchungen zur oxidativen Umsetzung von 5-*S*-Cys-DOPA, dass die Decarboxylierung des gebildeten QI mit 85% dem Reaktionsweg unter Erhalt der Carboxylgruppe mit 15% bevorzugt wird und dass diese Umsetzung unabhängig

vom Oxidationsmittel ist.¹¹⁸ Zink-Ionen, wie sie auch in natürlichem Epidermisgewebe in signifikanten Konzentrationen vorhanden sind, fördern dagegen die Bildung der carboxylierten Derivate.¹¹⁹ Weiterhin ist die Bildung der 1,4-Dihydrobenzothiazin-3-carbonsäure (DHBTCa) mittels Redoxcycling möglich. Die Phäomelanogenese wird als oxidative Polymerisierung von Cys-DOPA-Strukturen betrachtet, wobei DHBTCa als letztes stabiles Intermediat dieser Reaktionskaskade beschrieben wird.¹²⁰ Im weiteren Reaktionsverlauf unterliegen diese Benzothiazin-Intermediate vielfältigen Folgereaktionen wie Decarboxylierung, Ringverkleinerung zu Benzothiazol-Derivaten und schließlich die Polymerisation zu den hochmolekularen Pigmentstrukturen. Weiterhin wird die Bildung eines 3-Oxo-dihydro-1,4-benzothiazine-Derivates über die Stufe eines labilen 3-Hydroxy-3,4-dihydro-1,4-benzothiazine-Intermediates beschrieben.^{100,121–123} In rotem Menschenhaar und roten Hühnerfedern konnten Benzothiazolythiazinodihydroisochinolin-Strukturen (Abb. 11), Dimere als Folgeprodukte der Weiterreaktion von BTCA, als wichtige Struktureinheiten identifiziert werden.^{124–126}

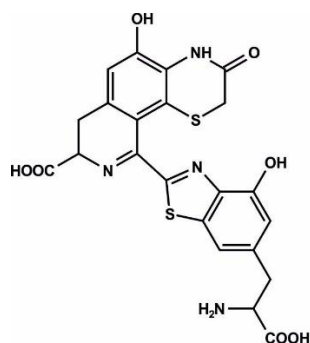


Abb. 11: Benzothiazolythiazinodihydroisochinolin¹²⁵

Aus Peroxidase/H₂O₂-Inkubationen von 5-S-Cys-DOPA konnten über die Bildung von BT und anschließender Reduktion mittels NaBH₄ verschiedene C-C- und C-O-verknüpfte Oligomere isoliert und strukturell aufgeklärt werden (Abb. 12).¹²⁰ Constantini et al. identifizierten in Tyrosin-katalysierten Inkubationen ein über einen Cycloadditionsmechanismus gebildetes Oligomer.¹²⁷

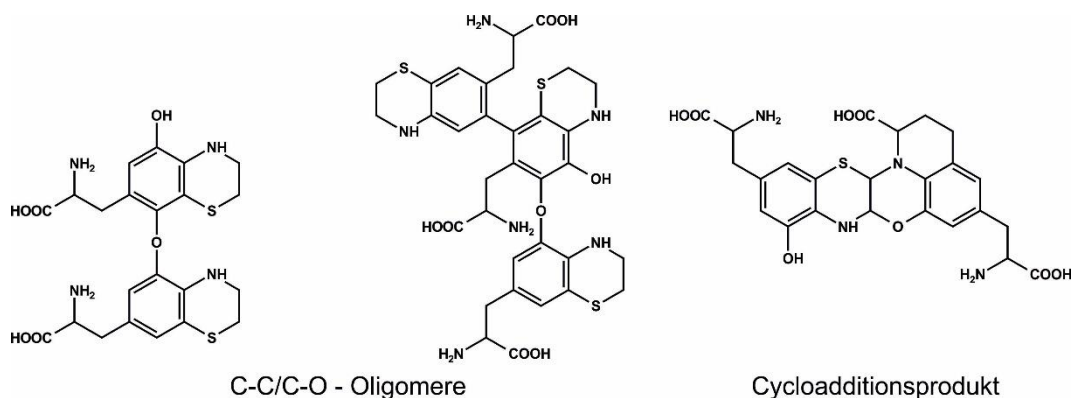


Abb. 12: Benzothiazin-Oligomere

Die Zink-katalysierte Oxidation über BTCA führte zur Bildung von 2,2'-Bibenzothiazinen.¹¹⁹ Über weitere Oxidationsschritte konnten farbige Strukturen, die zur Strukturklasse der sogenannten Trichochrome gehören, identifiziert werden. Bei den Trichochromen (Abb. 13) handelt es sich allgemein um niedermolekulare gelb-orange und violette Phäomelanine, die erstmals 1964 aus roten Federn von New-Hampshire-Hühnern mittels heißer Salzsäure extrahiert wurden.¹¹⁷

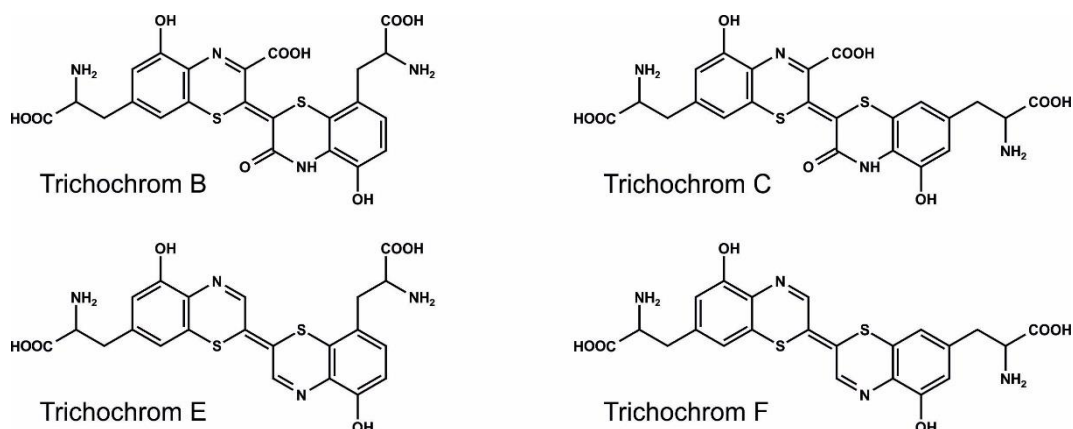


Abb. 13: Trichochrome

Diese Strukturklasse weist ein $\Delta^{2,2'}$ -Bi-2H-1,4-benzothiazin-Grundgerüst mit pH-abhängigen Absorptionsmaxima auf. Bisher sind die zwei gelb-orangen Trichochrome B und C und die zwei violetten Trichochrome E und F als Vertreter dieser Klasse bekannt. Sie sind im neutralen pH-Bereich unlöslich in Wasser und organischen Lösungsmitteln, zeigen ein schwieriges Kristallisationsverhalten und neigen stark zur Aggregation und Adsorption. Trichochrome gehören wie die pflanzlichen Betacyanine aufgrund des konjugierten Systems -S-C=C-C=N- als Chromophor zu den Polymethin-Farbstoffen. In saurer Lösung protoniert dieses System zu mesomeren Ammonium-Thionium-Kationen. Dies führt zu einer ausgeprägten bathochromen Verschiebung von ca. 100 nm und erklärt

die pH-Abhängigkeit der Farbigkeit. Die Trichochrome B und C weisen eine gewisse Säureinstabilität auf, sodass bereits nach kurzer Erwärmung in 0,1 N Salzsäure eine Decarboxylierung an Position 3 erfolgt und die sogenannten Decarboxytrichochrome B und C entstehen.^{100,117,128}

Während der Melanogenese ist durch die zusätzliche Interaktion mit Thiol- und Aminogruppen von Aminosäureseitenketten von Peptiden und Proteinen die Entstehung von Melanoproteinen möglich.^{45,129} Mit Ausnahme der Trichochrome und den bereits erwähnten Oligomeren ist aufgrund ihrer Reaktivität und komplexen, heterogenen Struktur die Analytik zur Identifizierung größerer diskreter Melaninstrukturen nur schwer möglich, sodass die Analytik hauptsächlich auf die qualitative und quantitative Zusammensetzung des Melanins abzielt. Eine etablierte Methode stellt die Analyse der Produkte des Melaninabbaus (Abb. 14) mittels HPLC-DAD oder LC-MS/MS dar,^{130,131} wobei sich zur Verbesserung des chromatographischen Profils die Festphasenextraktion mittels Anionenaustauscher eignet.^{132,133}

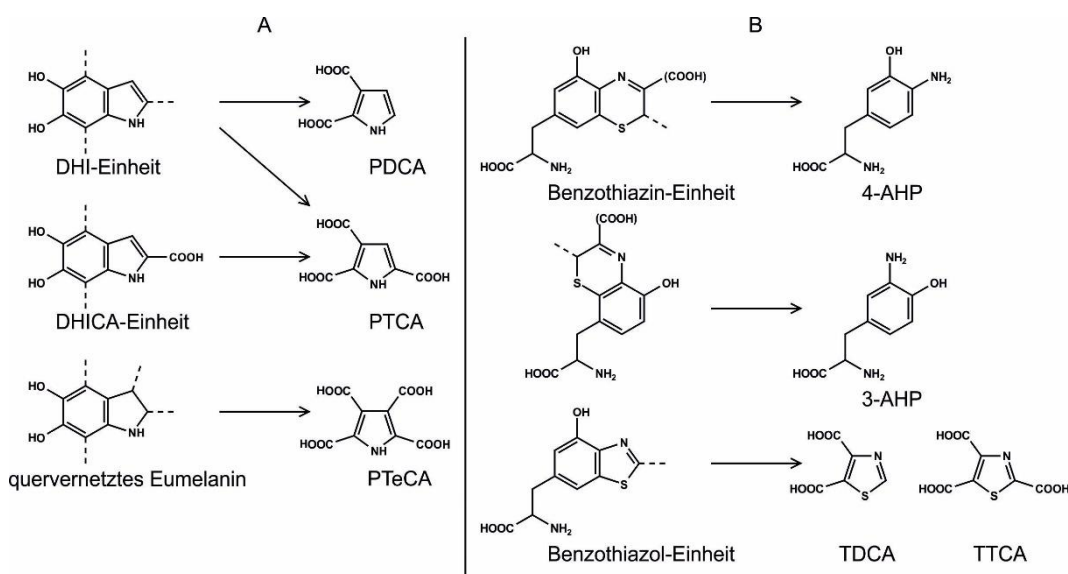


Abb. 14: Abbaumarker des Eu- (A) und Phäomelanins (B)¹³²

Für Eumelanin hat sich der Abbau mittels H_2O_2 mit 1 M NaOH oder 1 M K_2CO_3 -Lösung bewährt. Dieser oxidative Abbau führt zu Pyrrol-2,3,5-tricarbonsäure (PTCA), die als Markerstruktur für DHICA- und an Position 2 unsubstituierte DHI-Einheiten gilt, und zu Pyrrol-2,3-dicarbonsäure (PDCA), dem Marker für an Position 2 substituierte DHI-Einheiten. Die Pyrrol-2,3,4,5-tetracarbonsäure (PTeCA) wurde von Ito et al. als Marker für eine vollständige Vernetzung innerhalb der Eumelaninstruktur eingeführt. Carboxylierte Pyrrol-Einheiten werden auch als Bestandteil des Eumelanins diskutiert, würden sich aber nur durch stark oxidative Bedingungen während der Melanogenese oder durch Alterung

des Polymers erklären lassen. Für Phäomelanin haben sich 3-Amino-4-hydroxyphenylalanin (3-AHP), 4-Amino-3-hydroxyphenylalanin (4-AHP), beides Abbauprodukte aus einer reduktiven Hydrolyse mittels Iodwasserstoffsäure, und Thiazol-2,4,5-tricarbonsäure (TTCA), Thiazol-4,5-dicarbonsäure (TDCA), 6-Alanyl-2-carboxy-4-hydroxybenzothiazol (BTCA) und 7-Alanyl-2-carboxy-4-hydroxybenzothiazol (BTCA-2) als Abbauprodukte eines Abbaus durch Wasserstoffperoxid unter alkalischen Bedingungen, etabliert. Zusätzlich stehen auch Pyridinstrukturen als mögliche Markerstrukturen zur Diskussion. TTCA und TDCA sind spezifische Marker für Thiazol-Einheiten, 4-AHP und BTCA hingegen für Benzothiazinderivate. Da 3-AHP und BTCA-2 spezifisch für Strukturen sind, die aus 2-*S*-Cys-DOPA entstehen, und sowohl 4-AHP als auch BTCA Abbauprodukte der aus 5-*S*-Cys-DOPA hervorgehenden Strukturelemente sind, lassen sich durch Kombination der beiden Hydrolysemethoden quantitative Aussagen über das relative Verhältnis der dem Phäomelanin zugrunde liegenden Strukturelementen treffen.^{130–132} Je nach Ursprung des Melanins zeigen sich unterschiedliche Verhältnisse der verschiedenen Struktur motive. So konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass menschliches, rotes Haar und rote Hühnerfedern einen wesentlich höheren Gehalt an Benzothiazolstruktureinheiten aufweisen als gelbes Mäusehaar und synthetisches Melanin. In der menschlichen Epidermis setzt sich das Melanin unabhängig vom Pigmentierungsgrad zu 74% aus Eumelanin und zu 26% aus Phäomelanin, welches wiederum hauptsächlich aus Benzothiazoleinheiten besteht, zusammen.^{107,134} Darüber hinaus unterliegen die Melaninstrukturen einen photoinduzierten Abbau, der je nach Struktureinheit unterschiedlich ausfallen kann. Die Bestrahlung mit UV-A-Licht bewirkt eine Umwandlung der Melaninstrukturen und eine unmittelbare Verdunkelung der Pigmentierung, die auf die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zurückgeht. Im Fall der Eumelanine wird das auf eine Oxidation der DHI- und DHICA-Einheiten zurückgeführt. Die Absorptionsmaxima von DHI und DHICA liegen jeweils bei 303 und 321 nm, wohingegen die Absorptionsmaxima von IQ bei 500 nm und von IQCA bei 420 und 560 nm liegen. Neben dieser Verschiebung der Absorptionsmaxima führt zudem die oxidative Polymerisierung der Eumelaninstrukturen zu einer weiteren Pigmentverdunkelung.^{135,136} Die UV-A-Bestrahlung von Phäomelanin bewirkt eine oxidative Umwandlung der Benzothiazin- in Benzothiazol-Strukturen, die durch die Verringerung des 4-AHP/3-AHP-Verhältnisses und eine Erhöhung des TTCA/4-AHP-Verhältnisses belegt wurde.¹³⁵ Weiterhin zeigte ein Vergleich der Abbauraten von 4-AHP und 3-AHP, dass die von 5-*S*-Cys-DOPA abgeleiteten Benzothiazineinheiten labiler als die von 2-*S*-Cys-DOPA stammenden Einheiten sind. Phäomelanin trägt aber aufgrund seines

geringeren Gehalts und blässeren Farbe im Vergleich zum Eumelanin weniger zur Pigmentierung der Haut bei.¹³⁴

Weiterhin weisen Melanine aufgrund des ungepaarten Elektrons in ihren Semichinon- und Semichinoniminstruktureinheiten einen charakteristischen Paramagnetismus auf und stellen damit ein stabiles Radikalsystem dar. Diese Eigenschaft ermöglicht die Untersuchung mittels Elektronenspinresonanz (ESR)-Spektroskopie als zerstörungsfreie und hoch spezifische Alternative in der Melaninanalytik.¹³⁷ Entscheidend bei dieser Methode ist das sogenannte Komproportionierungs-Gleichgewicht, dem Gleichgewicht zwischen Hydrochinon, Chinon und dem Semichinon, welches durch den pH-Wert, Licht, redoxaktive Verbindungen und verschiedene Metall-Ionen beeinflusst werden kann.¹³⁰ Die ESR-Spektren erlauben sowohl einen direkten Nachweis der Melaninstrukturen in biologischen Systemen als auch eine Unterscheidung der Melanintypen.^{137,138}

Wie die ESR-Spektroskopie bietet auch die Raman-Spektroskopie eine zerstörungsfreie Analytik der Melanine. Mit ihr ist es ebenfalls möglich anhand der charakteristischen Banden Phäomelanin von Eumelanin und Trichochrom F zu unterscheiden. Eumelanine zeigen im Allgemeinen in den Bereichen 1380 und 1580 cm^{-1} zwei charakteristische Banden, die den Streckschwingungen der aromatischen Ringe, der Streckschwingung der C-C-Bindungen in den Ringen und den C-H-Schwingungen in den Methyl- und Methylengruppen zugeordnet werden. Phäomelanin zeigt dagegen vier charakteristische Banden bei 500 cm^{-1} (Deformationsschwingung des aromatischen Rings), 1150 cm^{-1} (Streckschwingung der C-N-Bindung oder *wagging*-Schwingung der Methylengruppen), 1490 cm^{-1} (Streckschwingung des aromatischen Rings) und im Bereich von 2000 cm^{-1} .¹³⁹⁻

141

2.2 Bräunung im Pflanzenreich

2.2.1 Kaffeesäure

Die Vielfalt der Polyphenole spiegelt sich in den unterschiedlichen und charakteristischen Polyphenolprofilen pflanzlicher Lebensmittel wider und bedingt verschiedenste Bräunungsmechanismen, die zwar im Allgemeinen auf den in Abb. 4 gezeigten Bildungsweg basieren, in der letzten Konsequenz aber zu individuellen Bräunungsprodukten führen. Die in der Literatur am häufigsten genannten Substrate der enzymatischen Bräunungsreaktion sind die auch in pflanzlichen Lebensmitteln quantitativ bedeutsamen Kaffeesäure und die von ihr abgeleiteten Chlorogensäuren. In Untersuchungen von Cilliers et al. zur Oxidation von Kaffeesäure zeigte sich, dass die

Bräunung bereits in den ersten Stufen der Oxidation mit einer gleichzeitigen Abnahme des Kaffeesäuregehaltes stattfindet. Dies deutet darauf hin, dass das frühe Stadium der enzymatischen Bräunung nicht durch die Bildung hochmolekularer Produkte mit ausgedehnten konjugierten Systemen bedingt ist. Vielmehr wird diese Phase durch die Bildung kleiner Moleküle wie Dimere oder Trimere bestimmt, deren Konjugation eine Absorption im sichtbaren Bereich erlaubt.²⁵ Die enzymatische Oxidation von Kaffeesäure führte zur Bildung verschiedener 2,3-Dihydro-1,4-benzodioxin- und Naphthalin-Derivate und einem Dihydrokaffeesäurelacton (Abb. 15).^{27,42} In diesem Zusammenhang konnte auch die Bildung eines instabilen, farbigen Produktes beobachtet werden, das ein pH-abhängiges Absorptionsmuster aufweist, aber aufgrund seiner Instabilität nicht isoliert und aufgeklärt werden konnte.⁴²

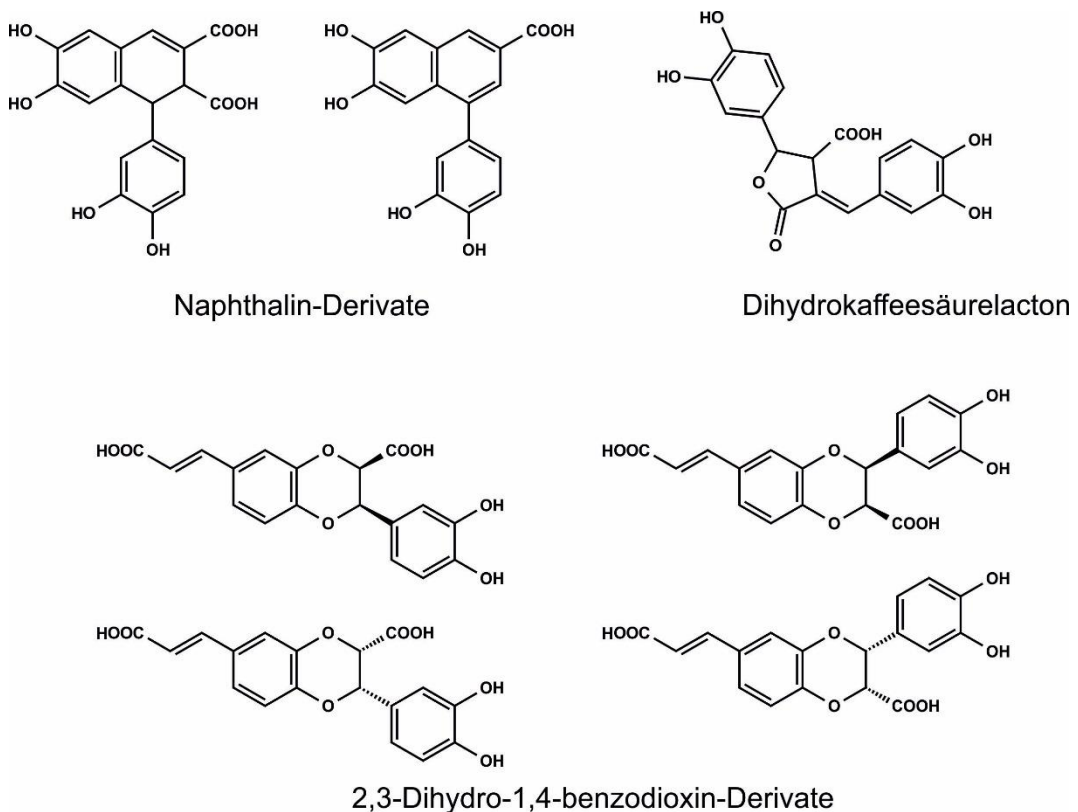


Abb. 15: Kaffeesäure-Dimere⁴²

In Süßkartoffeln und Lebensmitteln, die gemahlene Sonnenblumenkerne oder aus ihnen hergestellte Sonnenblumenbutter enthalten, konnte während der Verarbeitung und Lagerung eine Grünfärbung beobachtet werden. Diese war auf Oxidation von Chlorogensäure und eine anschließende Interaktion mit Aminofunktionen von Aminosäuren zurückzuführen.¹⁴²⁻¹⁴⁴ Yabuta et al. identifizierten dieses wasserlösliche farbige Produkt in Modelinkubationen aus Kaffeesäureestern unter alkalischen, oxidativen

Bedingungen nach Reduktion mit NaBH_4 unter Acetylierung als ein neuartiges Trihydroxybenzacrudin-Derivat. Dieses Derivat zeigt unter reduzierenden Bedingungen eine gelbe Farbe, die sich mit fortschreitender Oxidation zu einer grünen bis schließlich zu einer blauen Farbe wandelt. Bongartz et al. konnten in Inkubationen mit Chlorogensäure und allen proteinogenen Aminosäuren unter alkalischen Bedingungen für alle Aminosäuren bis auf Cystein eine Farbveränderung feststellen.¹⁴⁵ Neben der α -Aminogruppe reagiert auch die ε -Aminogruppe des Lysins zu einem Benzacrudin-Derivat.¹⁴⁶ Der vermutete Reaktionsmechanismus verläuft im ersten Schritt über eine oxidative Dimerisierung zweier Chlorogensäuremoleküle (Abb. 16).

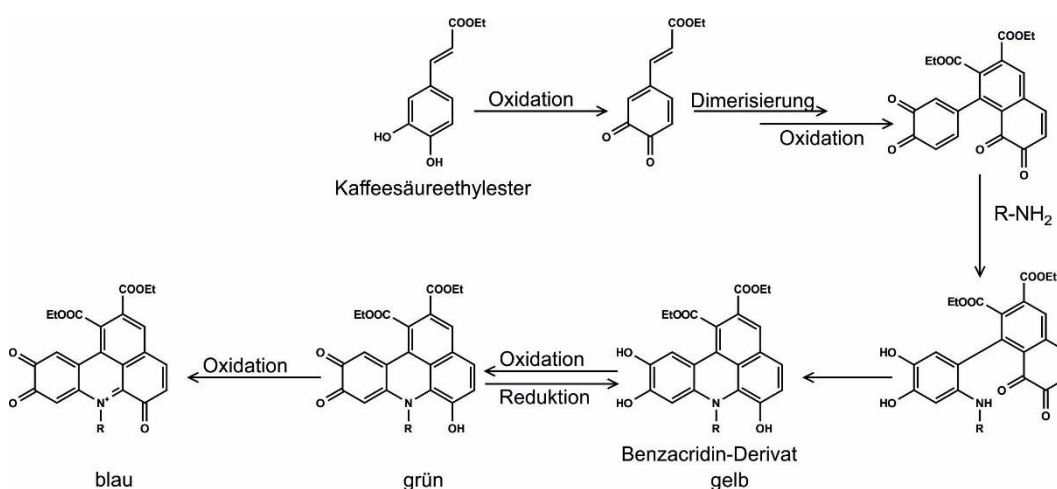


Abb. 16: Benzacrudinbildung

ESR-Messungen von Namiki et al. zeigten, dass die Dimerisierung über ein stabiles Radikal-Intermediat verläuft.¹⁴⁷ Nach einem weiteren Oxidationsschritt erfolgt der nucleophile Angriff der Aminofunktion und anschließend der über diese Aminogruppe verbrückte Ringschluss.¹⁴⁵ Die Reaktion der ε -Aminogruppe des Lysins verläuft unter Erhalt des Aminosäurekörpers, wohingegen die Reaktion der α -Aminogruppe zu einer Abspaltung der restlichen Aminosäure führt.^{145,148} Im Falle des Cysteins ist es erwähnenswert, dass diese Aminosäure zwar zu keinem Benzacrudin-Derivat führt, aber dennoch mit oxidierten Chlorogensäure-Addukten bildet. Dabei zeigte sich im Vergleich der funktionellen Gruppen besonders deutlich, dass Cystein primär über die Thiolfunktion interagiert und dass diese Interaktion noch vor der Dimerisierung der Chlorogensäure stattfindet, was in der starken Nucleophilie der Thiolgruppe begründet liegt.¹⁴⁶ Ohne Aminosäure polymerisieren diese Kaffeensäure-Derivate zu nicht näher definierten braunen Produkten. Die Benzacrudin-Derivate in ihrer reduzierten Form zeigen eine gelbe Farbe und eine hohe Reaktivität gegenüber Sauerstoff, aus der im weiteren Reaktionsverlauf Semichinon- und Chinon-Derivate hervorgehen.¹⁴⁷ Diese Benzacrudin-Derivate bilden in

der Lebensmittelindustrie eine mögliche Alternative auf der Suche nach auf Naturprodukten-basierten grünen Pigmenten, die zurzeit durch semisynthetische Kupferchlorophylle und den synthetischen Triphenylmethanfarbstoff Brillantsäuregrün S dominiert wird.¹⁴⁸

2.2.2 Tee

Die Identifizierung diskreter Bräunungsstrukturen direkt aus den Lebensmitteln stellt die Analytik vor eine große Herausforderung. Im Vergleich zu anderen pflanzlichen Lebensmitteln sind die frühen Intermediate und die darauffolgenden farbigen Strukturen mit den zugrundeliegenden Mechanismen während der Bräunungsreaktion, die während der Fermentation von Schwarzem Tee abläuft, sehr gut strukturell aufgeklärt und untersucht.^{149,150} Für die Herstellung des Tees werden die Triebe und jungen Blätter der Teepflanze (*Camellia sinensis*) verwendet. Die Polyphenolfraction der Teeblätter setzt sich zu 80% aus Flavan-3-olen und zu 20% aus Flavonolen und Flavonen und deren Glycoside, der Proanthocyanidine und phenolischen Säuren zusammen. Die wichtigsten Vertreter der Flavan-3-ole sind (-)-Epicatechin, (-)-Epicatechingallat, (-)-Epigallocatechin, (-)-Epigallocatechingallat, (+)-Catechin und (+)-Gallocatechin (Abb. 17).^{151,152}

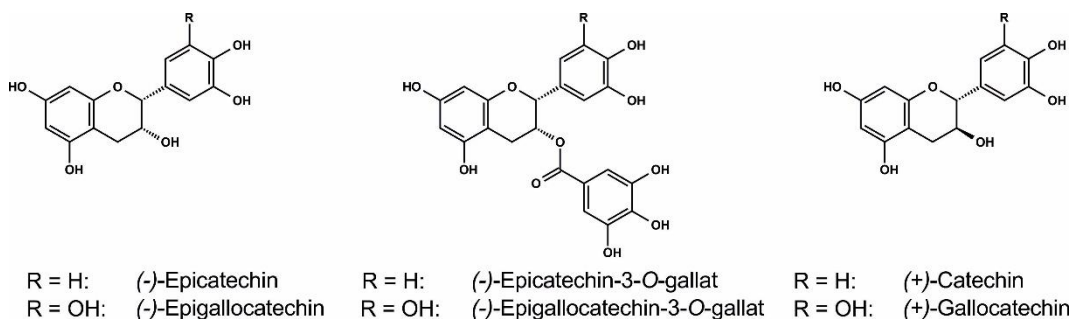


Abb. 17: Catechine im Tee

Die enzymatische Oxidation und die Folgereaktionen während der Fermentation zum Schwarzen Tee führen zu einem Abbau der enthaltenen Catechin-Strukturen, deren Gehalte sich von 20-35% auf bis zu 5-15% verringern. Dieser Fermentationsprozess kann durch die Inaktivierung der PPOs mittels Rösten (China) oder Dämpfen (Japan) unterbunden werden und führt zum Grünen Tee, halbfermentierter Tee wird als Oolong Tee bezeichnet. Die bereits beschriebene Oxidation der Catechin-Strukturen zu *o*-Chinonen bildet auch hier den Initialschritt der Bräunungsreaktion. Die darauffolgende oxidative Kupplung führt zu Dimeren, die sich in die fünf großen Klassen der Theacitrine, Theaflavine, Theasinensine, Theanaphthochinone und Oolongtheanine unterteilen lassen.¹⁵³ In erster Konsequenz dieser Dimerisierung erfolgt die Bildung der farblosen Bisflavanole, der sogenannten

Theasinensine (Abb. 18). In Abhängigkeit der für die Kupplungsreaktion zugrundeliegenden unterschiedlich substituierten Catechinderivate konnten die Theasinensine A – G strukturell aufgeklärt werden.^{154–158}

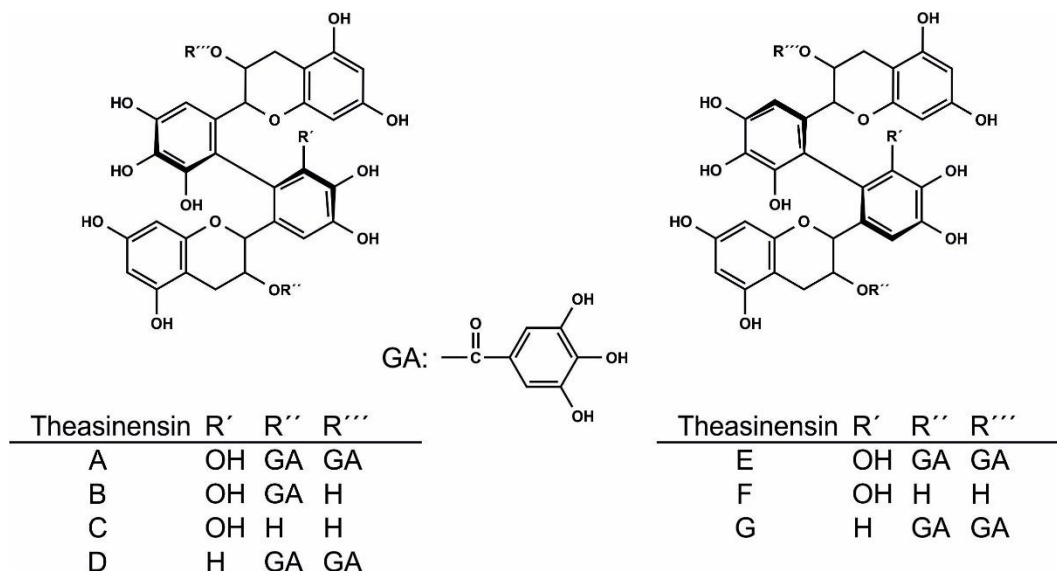


Abb. 18: Theasinensine

Eine Oxidation der B-Ringe der Theasinensine mit anschließender Ringkontraktion führt zur Bildung der sogenannten Oolongtheanine (Abb. 19). Dabei handelt es sich um Catechindimere, die aber lediglich intermediäre Verbindungen darstellen und im Verlauf der Teefermentation weitere Folgereaktionen eingehen.^{158,159}

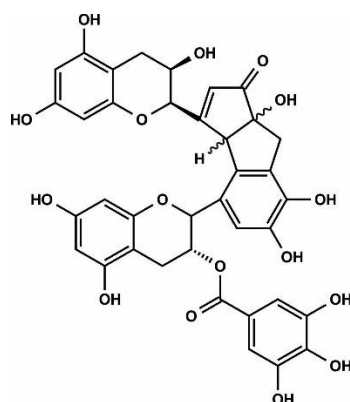


Abb. 19: Oolongtheanin

Die Oxidation der Bisflavanole bildet die Grundlage für die Bildung einer Strukturklasse von Schlüsselverbindungen für die Farbgebung des Tees, der Theaflavine. Diese Klasse an gelb-orangen Pigmenten ist aufgrund ihres hohen Anteils an Catechingallaten gut wasserlöslich. Auch hier wird die Bildung durch die oxidative Kupplung eines *o*-dihydroxylierten B-Rings wie Epicatechingallat mit einem 1,2,3-trihydroxylierten

B-Ring wie dem des Epigallocatechins initiiert (Abb. 20). Eine erneute Oxidation führt zu einem weiteren nucleophilen Angriff unter Bildung eines instabilen Bicyclo[3.2.1]octan-Intermediates. Dieses stabilisiert sich über eine β -Dicarbonylsplaltung in eine bicyclische Benzotropolonstruktur, dem charakteristischen Chromophor der Theaflavine. Nach weiterer Oxidation, Decarboxylierung und Isomerisierung resultieren letztendlich die Theaflavine. Theaflavin, Theaflavin-3-gallat, Theaflavin-3,3'-digallat, Theaflavinsäure und Theaflagallin sind die bekanntesten Vertreter dieser Strukturklasse.¹⁶⁰

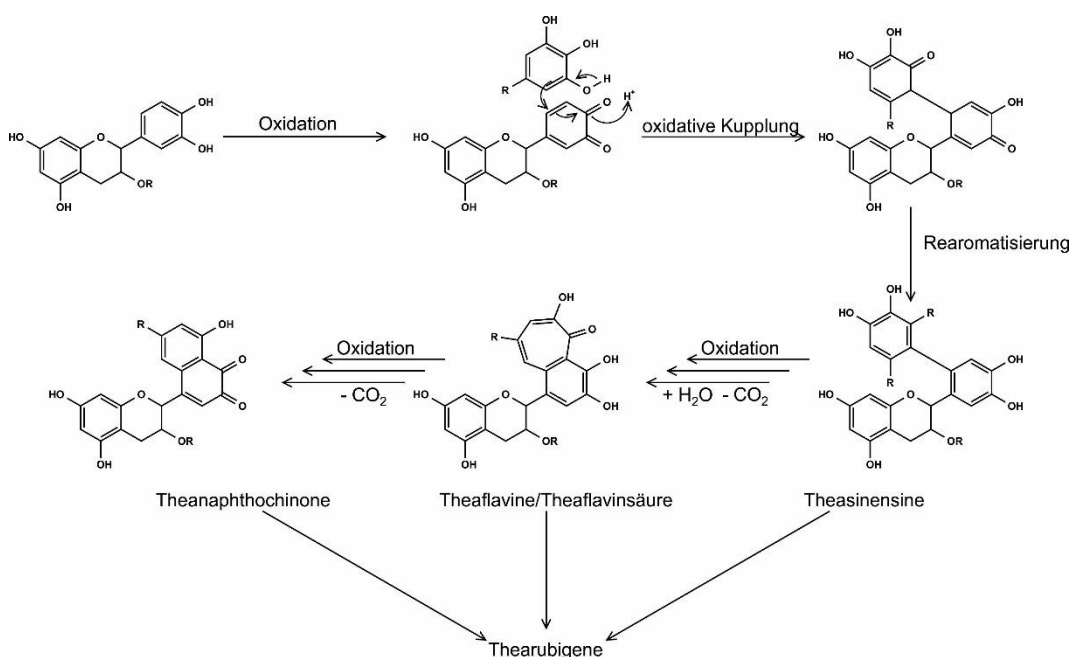


Abb. 20: Oxidative Bildung der Thearubigene

Neben diesen dimeren Verbindungen treten auch Trimere und Tetramere, die über massenspektrometrische Untersuchungen identifiziert wurden, auf. Der Gehalt der Theaflavine beträgt im Schwarzen Tee 0,3 – 2% und nimmt durch oxidative Prozesse im weiteren Verlauf der Teefermentation wieder ab. Das beweist wiederum, dass diese Strukturen zwar Schlüsselintermediate in der Farbgebung sind, aber nicht das Ende der Reaktionskaskade darstellen. Aus der instabilen Bicyclo[3.2.1]octan-Struktur resultieren darüber hinaus die gelb gefärbten Theacitrine (Abb. 21).^{161,162} Aus den Benzotropolon-Derivaten entstehen vermutlich über einen Radikal-vermittelten oxidativen Mechanismus die ebenfalls gelben Theanaphthochinone.^{163,164}

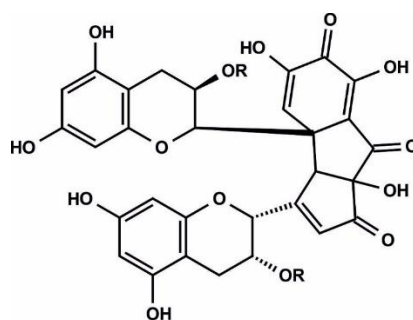


Abb. 21: Theacitrin

All diese reaktiven Intermediate sind wie bereits erwähnt an der Farbgebung des Tees beteiligt, aber nicht das Ende der Reaktionskaskade. Im weiteren Verlauf der enzymatischen Bräunungsreaktion bilden sie ein heterogenes Gemisch aus hochmolekularen, schwerer wasserlöslichen, sauren Strukturen, auf das die rot-braune Farbe des Tees letztendlich zurückgeführt wird, die sogenannten Thearubigene.¹⁵⁷ Selbst nach über 60 Jahren nach Entdeckung dieser Strukturklasse, die 60-70% der Trockenmasse der Aufgüsse des Schwarzen Tees ausmacht, ist die chemische Struktur der dazugehörigen Verbindungen kaum charakterisiert. Grund dafür ist die schwierige chromatographische Auftrennung und die damit verbundene Isolierung diskreter Strukturen aus diesem komplexen Gemisch. Das lässt sich unter der Problematik des „chromatographischen Hügels“ zusammenfassen. In komplexen Matrices wie Erdöl oder Umweltproben, aber auch in Lebensmitteln wie Tee, Kaffee oder Schokolade liefert die Analytik neben gut aufgelösten Signalen, die bisher zu gut charakterisierten Verbindungen führen, schlecht aufgelöste Hügel, die einen Großteil der zu analysierenden Strukturen beherbergen. Die Theorien zur Entstehung der chromatographischen Hügel lassen sich auf verschiedene Ursachen zurückführen: 1. die zu große Anzahl an Verbindungen, die chromatographisch aufgelöst werden müssen, 2. die Gegenwart chelatisierender multivalenter Metall-Ionen und 3. nicht-kovalenter Interaktionen wie H-Brücken und π - π -Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Thearubigen-Strukturen. Diese drei Hauptgründe führen letztendlich in ihrer Summe zu einer Peakverbreiterung und weiteren chromatographischen Trennproblemen. Mit Hilfe hochauflösender Massenspektrometrie-Experimente wie MALDI-TOF-MS und ESI-FT-ICR-MS und Elementverhältnisanalysen wie der van Krevelen-Analyse und Massendefektanalysen, der Kendrick-Analyse, gelang jedoch eine Klassifizierung der Thearubigen-Fraktion. Aus diesen Untersuchungen konnten homologe Reihen für die Bildung der Thearubigene abgeleitet werden, die auf acht Ausgangssubstanzen und drei Reaktionstypen basieren. Auf dieser Grundlage stellten Kuhnert et al. die Theorie der oxidativen Kaskade auf, bei der auf die oxidative

Dimerisierung zu den fünf genannten Hauptkopplungsprodukten eine Wiederholung dieses Schrittes zu hochmolekularen Oligomeren folgt. Neben dem nucleophilen Angriff einer weiteren Catechin-Struktur kann darüber hinaus Wasser den oxidierten B-Ring angreifen. Dieser formale Einbau eines Sauerstoff-Atoms in eine C-H-Bindung führt zu einer Erhöhung der Reaktivität der resultierenden Verbindung aufgrund der Einführung eines elektronenreichen Substituenten. Dies erhöht wiederum die Elektronendichte und damit die Nucleophilie der Struktur. Insgesamt konnten basierend auf diesen Untersuchungen für über 90% der identifizierten Verbindungen im Schwarzen Tee hypothetische Strukturen formuliert werden.^{153,165,166}

Modellinkubationen mit Epicatechin und Epigallocatechin durch Tan et al. zeigten, dass die Bildung von Bräunungsstrukturen auch auf autoxidativen Wegen stattfinden kann. Die dabei stattfindende Oligomerisierung scheint dabei durch Di- und Trimere dominiert zu werden. Die Epicatechin-Inkubationen führten zu δ -Typ-Dehydrodicatechin- (DhC₂s) und δ -Typ-Dehydrotricatechin-Verbindungen (Abb. 22), die an der Bräunung beteiligt sind. Ihre Bildung wurde durch autoxidative Bildung einer *o*-Chinon-Struktur initiiert. Daraus resultieren zuerst die β -Typ-DhC₂s als Intermediate und durch eine weitere Oxidation und intramolekulare Umlagerung die δ -Typ- DhC₂s als farbige Verbindungen.¹⁶⁷

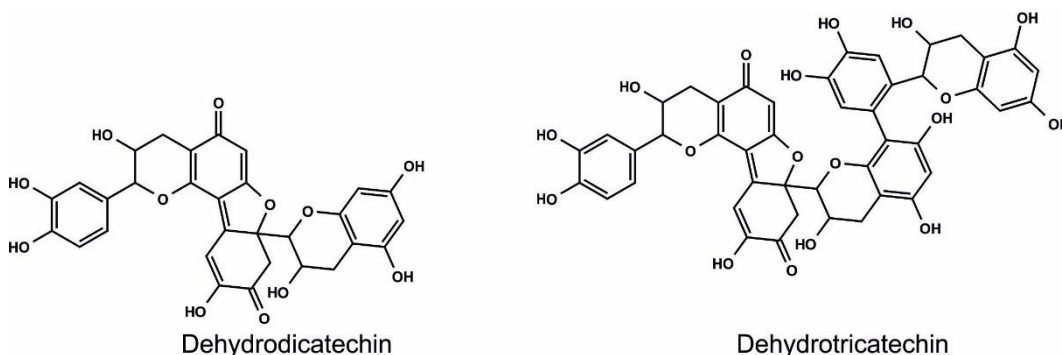


Abb. 22: Dehydrodicatechin und Dehydrotricatechin¹⁶⁷

Die Epigallocatechin-Inkubationen zeigten die Bildung von Dihydroinden-7-carbonsäure-Derivaten, deren Bildung ebenfalls über die autoxidative *o*-Chinonbildung eingeleitet wird. Nach erfolgter Dimerisierung zu einem Benzotropolon-Intermediat kann zum einen über eine Decarboxylierung und Eliminierung die Bildung von Theaflagallin und zum anderen über verschiedene Ringkontraktions- und Decarboxylierungsschritte die Bildung von Dihydroinden-7-carbonsäure-Derivaten erfolgen (Abb. 23). Diese wirken sich ebenfalls auf die Bräunung aus.¹⁶⁷

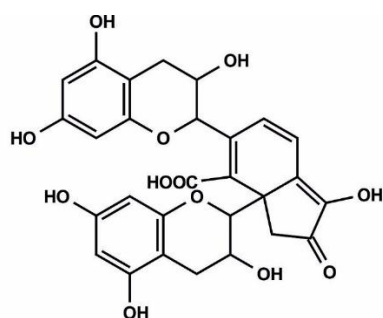


Abb. 23: Dihydroindeno-7-carbonsäure¹⁶⁷

Diese Untersuchungen legen eine mehrstufigen Oxidationsmechanismus vergleichbar mit der oxidativen Kaskade der Enzym-katalysierten Oxidation für diesen autoxidativen Prozess nahe.^{167,168} In Erdbeeren (*Fragaria*) ließ sich weiterhin die PPO- und Peroxidase-katalysierte Oxidation von (+)-Catechin nachweisen. Dabei werden die aus der PPO-katalysierten Oxidation hervorgehenden Oligomere für die Bräunung verantwortlich gemacht.¹⁶⁹

2.2.3 Rooibostee und Apfel

Die Strukturklasse der Dihydrochalkone ist charakteristischer Bestandteil des Polyphenolprofils von Rooibos (*Aspalathus linearis*) und Äpfeln (*Malus*). Aspalathin, ein C-glycosidisches Dihydrochalkon, stellt mit 70 mg/g die Hauptphenolkomponente im unverarbeiteten Rooibostee dar und ist für seine antioxidative, hypoglykämische und antimutagene Wirkung bekannt.¹⁷⁰⁻¹⁷² Während der Rooibosteefermentation verringert sich der Aspalathingehalt um bis zu 98%¹⁷³ und es entstehen die charakteristische Farbe und das Aroma des Tees. Im Gegensatz zur Fermentation des Schwarzen Tees haben *in vitro* Experimente gezeigt, dass der oxidative Abbau von Aspalathin, aufgrund der *o*-Hydrochinon-Struktur des B-Rings, sowohl enzymatisch als auch nicht-enzymatisch ablaufen kann.¹⁷⁴⁻¹⁷⁶ Bisher konnten drei Abbauwege von Aspalathin aufgeklärt werden, die alle auf der Oxidation von Aspalathin zum *o*-Chinon basieren (Abb. 24).^{174,175,177}

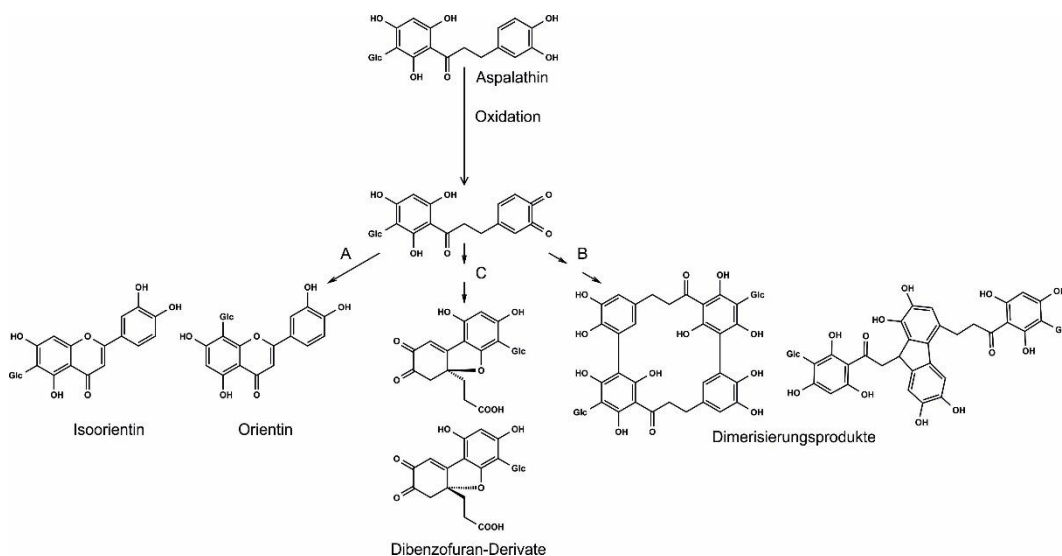


Abb. 24: Abbauewege des Aspalathins

Beim ersten Abbaueweg erfolgt nach der Oxidation zum *o*-Chinon die Umlagerung zum Chinonmethid. Anschließend erfolgt ein nucleophiler Angriff der Hydroxylfunktion des A-Rings unter Bildung von Eriodictyolglucosiden, die durch weitere Oxidation und Isomerisierung zu Orientin und Isoorientin reagieren (Abb. 24, A).¹⁷⁷ Im zweiten Abbaumechanismus erfolgt nach Bildung des *o*-Chinons ein nucleophiler Angriff eines zweiten Aspalathin-Moleküls, der zu verschiedenen Dimeren führt (Abb. 24, B). Krafczyk et al., die diese Reaktionswege aufklärten, zeigten zudem, dass es sich bei den genannten Reaktionsprodukten um farblose Intermediate handelt, die innerhalb der Fermentationskaskade des Rooibostees zu farbigen Melaninen abgebaut werden.^{174,177} Heinrich et al. zeigten in einem dritten Mechanismus die Bildung von zwei farbigen Dibenzofuran-Derivaten (Abb. 24, C), die aufgrund ihrer hohen Reaktivität erst durch eine Derivatisierung mittels *o*-Phenylendiamin (OPD) in Form ihrer jeweiligen Chinoxaline während des Aspalathinabbaus und im fermentierten Rooibostee identifiziert wurden. Die sich an die Oxidation zum *o*-Chinon anschließende Michael-Addition führt zu einer sechsgliedrigen Spiro-Ringverbindung. Nach erfolgter Rearomatisierung und β -Dicarbonylsplaltung bilden sich zwei hoch reaktive Propionsäure-substituierte Biphenyl-Atropisomere. Eine erneute Oxidation ermöglicht einen intramolekularen Ringschluss zu einem tricyclischen Ringsystem und eine abschließende Keto-Enol-Tautomerie führt zu den zwei farbigen Strukturen. In Farbverdünnungsanalysen wurde ihre Eigenschaft als Schlüsselchromophore in Aspalathin-Inkubationen aufgezeigt.^{154,175}

In französischen Apfelweinvaretiäten machen Dihydrochalkone in Form von Phloretinglycosiden 1-5% des Gesamtpolyphenolgehaltes aus.¹⁷⁸ Mit Phloretinxyloglucosid und Phloridzin enthalten Äpfel und Apfelprodukte ebenfalls

Dihydrochalkon-Strukturen in erhöhter Konzentration, welche an der enzymatischen Bräunungsreaktion beteiligt sind.^{37,179} Im Gegensatz zu Aspalathin handelt es sich zum einen bei Phloridzin um ein *O*-Glycosid und zum anderen ist der B-Ring dieser Dihydrochalkone nur monohydroxyliert. Damit stellt die PPO einen essentiellen Bestandteil in der oxidativen Bräunungsreaktion dieser Strukturen dar. Im ersten Schritt wird Phloridzin durch die Cresolase-Aktivität der PPO zu 3-Hydroxyphloridzin hydroxyliert und anschließend durch die Catecholase-Aktivität zu *o*-Phloridzinchinon oxidiert. Die weiteren Schritte der Reaktionskaskade verlaufen analog zur Bildung der Dibenzofuran-Strukturen aus dem Aspalathinabbau über eine intramolekulare Michael-Addition, Hydratisierung und Rearomatisierung zu zwei farblosen Atropisomeren. Nach weiterer Oxidation und intramolekularem Ringschluss entstehen zwei chromophore Strukturen die sich im Vergleich zum Rooibostee lediglich in ihrem glycosidischen Charakter unterscheiden (Abb. 25).^{154,180,181} Diese Strukturen wurden zuerst von Le Guernevé et al. und Gytot et al. in Modellinkubationen charakterisiert und konnten später in verschiedenen Apfelsäften im Zusammenhang mit dem entsprechenden Phloretinxyloglucosid-Produkt nachgewiesen werden.¹⁷⁹ Weiterhin zeigen die Produkte des Phloridzin eine pH-abhängige Farbigkeit, wobei sie bei einem pH-Wert von 5 gelb und bei höheren pH-Werten eine orange Farbe zeigen.¹⁸⁰ Neben Dihydrochalkonen ist auch Chlorogensäure, welche das beste Substrat der Apfel-PPO darstellt, enthalten. Ihre Oxidation führt zu gelb gefärbten Chinonen, die über verschiedene Redoxwege mit Flavonol-Monomeren zu intensiv gefärbten Produkten reagiert, deren Strukturen jedoch nicht aufgeklärt wurden.¹⁷⁹ Zudem scheint es synergistische Effekte zwischen Phloridzin und Chlorogensäure und Catechin in Bezug auf die enzymatische Bräunungsreaktion zu geben, wie Modellversuche von Oszmiansk et al. zeigten.¹⁸²

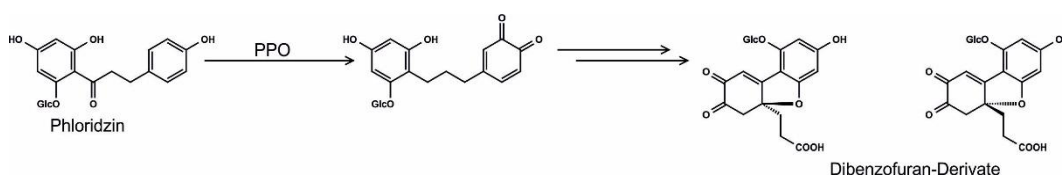


Abb. 25: Phloridzin-Abbau

Birnenfrüchte (*Pyrus*) zeigen ebenfalls Bräunungsreaktionen, die auf eine enzymatische Oxidation der enthaltenen Phenolstrukturen zurückgeführt wird. Die quantitativ bedeutendsten phenolischen Strukturen in der Birne sind Chlorogen-, Kaffee-, Cumaroylchina- und Cumarsäure und Arbutin (Abb. 26), wobei der Fokus der Bräunung hauptsächlich auf die Chlorogensäure und Procyanidine gelegt wird. Jedoch konnten bis

heute in diesem Zusammenhang keine konkreten Bräunungsstrukturen in der Birne strukturell aufgeklärt werden.^{183–185}

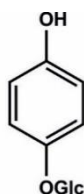


Abb. 26: Arbutin

2.2.4 Salat

Auch im Kopfsalat (*Lactuca sativa* var. *capitata*) lassen sich unter anderem Caffeoylderivate wie Chlorogensäure oder Chicoreesäure und Flavonoide wie Quercetin- und Luteolinglycoside als phenolische Substrate für eine enzymatische Oxidation nachweisen.¹⁸⁶ Für die gebildeten *o*-Chinon-Derivate werden zwar Folgereaktionen mit Kohlenhydraten, Proteinen oder weiteren Phenolen vermutet, die zur Bildung hochmolekularer brauner bis rotbrauner Verbindungen in verletztem Gewebe führen. Jedoch konnten bisher keine diskreten Bräunungsprodukte auf Basis phenolischer Substrate im Salat identifiziert werden. Neben den Polyphenol-basierten Bräunungsmechanismen konnte für den Salat ein Bräunungsmechanismus etabliert werden, der auf der Strukturklasse der Sesquiterpenlactone basiert (Abb. 27).^{187,188}

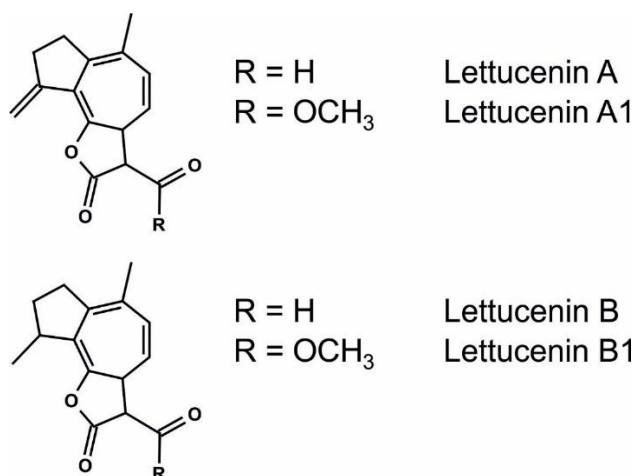


Abb. 27: Lettucenine A, A1, B, B1

Da es sich bei Sesquiterpenlactonen um Terpendervative handelt, geht ihre grundlegende Struktur auf das Isopren zurück. Dabei bilden drei Isopren-Einheiten das Sesquiterpengrundgerüst. Das entstehende Germacren A kann durch enzymatische Reaktionen zur Germacrensäure oxidiert und anschließend durch Hydroxylierung und

Lactonbildung zu Costunolid reagieren. Letzteres wird als Schlüsselverbindung der Sesquiterpenlacton-Biosynthese betrachtet. Im Salat konnten bereits die Sesquiterpenlactone Lettucenin A, A1, B und B1 nachgewiesen werden. Untersuchungen und Farbverdünnungsanalysen zu diesen Strukturen in gebräuntem Salat zeigten, dass die Lettucenine A, A1, B und B1 mit 40% maßgeblich zu der Bräunung im Salat beitragen. In weiterführenden Untersuchungen zu diesen Verbindungen konnte wiederum belegt werden, dass diese ebenfalls reaktive Intermediate darstellen und im weiteren Verlauf der Bräunungsreaktion zu höhermolekularen Strukturen polymerisieren.¹⁸⁷⁻¹⁸⁹

Eine Methode, die in den letzten Jahren sehr an Bedeutung gewonnen hat, ist die Untersuchung des Metaboloms von Pflanzen und Lebensmitteln. Dabei werden die unterschiedlichen Metabolit-Muster, hervorgerufen durch die Auswirkungen verschiedener Umwelteinflüsse und Verarbeitungsprozesse oder der Lagerung, der Reifung oder auch Bräunungsvorgänge, untersucht und verglichen. Diese Untersuchungen tragen zu einem besseren Verständnis um die Veränderungen innerhalb dieser komplexen Matrices bei und helfen, gegebenenfalls Schlüsselstrukturen in diesen Prozessen zu identifizieren. So konnte diese Methode bereits auf Tee, Apfel und Salat angewandt werden, um Strukturklassen einzugrenzen, die im Bräunungsprozess eine Rolle spielen.¹⁹⁰⁻¹⁹³ Da die Bräunung bei vielen Lebensmitteln zu einem Qualitätsverlust führt, kann diese Methode durch die Identifizierung von prozessrelevanten Biomarken dazu genutzt werden, Kultivare zu züchten, die ein geringeres Bräunungspotential aufweisen.

2.2.5 Weitere pflanzliche Bräunungsreaktionen

In vielen anderen Pflanzen treten ebenfalls Enzym-katalysierte Bräunungsreaktionen auf, jedoch können in den meisten Fällen keine diskreten Strukturen identifiziert werden. Bei Kartoffelknollen (*Solanum tuberosum* L.) tritt durch mechanische Einwirkung auf die Knolle während der Ernte, des Transportes oder der Lagerung die Bildung graudunkelvioletter Pigmente unter der intakten Haut auf, welche als Schwarzfleckigkeit bezeichnet wird.^{154,194-196} Untersuchungen der isolierten Pigmente zeigten, dass bei ihrer Bildung sowohl Chlorogensäure als auch die nucleophilen Seitenketten von Aminosäuren und Proteinen involviert sein können. Weiterhin wiesen die isolierten Pigmente DHICA- und BT-Struktur motive auf. Damit gelten Tyrosin, das Hauptsubstrat der Kartoffel-PPO, und Cystein als Schlüsselverbindungen für die Schwarzfleckigkeit als gesichert.¹⁹⁷⁻¹⁹⁹ Wie bei der Kartoffel zeigen sich bei der Banane (*Musa*) durch mechanische Einwirkungen schwarze Melanine an Fruchtfleisch und Schale, welche sich aufgrund der Substratspezifität der Bananen-PPO vermutlich von Tyramin und Dopamin ableiten

lassen.^{154,200} Die PPO im Tabak ist in der Lage, Chlorogen- und Kaffeesäure zu ihren jeweiligen *o*-Chinonen zu oxidieren, die wiederum mit Nicotin zu einem roten Pigment reagieren.²⁰¹ In Blumenkohllhomogenisat zeigte sich während der Lagerung die Bildung roter Kondensationsprodukte aus freien Aminosäuren und *o*-Chinonen, die sich im weiteren Verlauf zu hochmolekularen braunen Verbindungen umsetzen.²⁰² Diese Beispiele verdeutlichen zum einen die Vielfältigkeit der Substrate und Bräunungsmechanismen und den analytischen Strategien und zum anderen auch die analytische Herausforderung und die schiere Bandbreite an noch unbekanntem Strukturen, Mechanismen und möglichen Interaktionen mit Aminosäuren und Proteinen, die sich nur erahnen lassen.

Aus der Betrachtung der dargestellten Mechanismen ergeben sich drei Ansatzpunkte, um unerwünschten enzymatischen Bräunungsreaktionen entgegenzuwirken (Abb. 28): 1. die direkte Inhibierung der PPO, 2. die nicht-enzymatische Reduzierung der *o*-Chinone zu ihren *o*-Hydrochinonderivaten und 3. die chemische Modifizierung oder Entfernung der phenolischen Substrate der PPO oder entstehenden Intermediate.^{16,203}

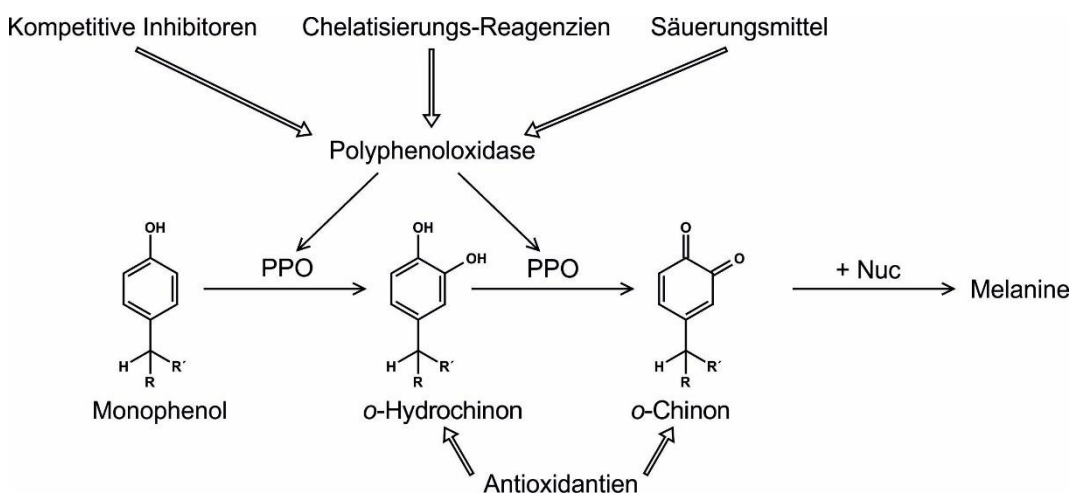


Abb. 28: Inhibierungsansätze der enzymatischen Bräunung nach Moon et al.²⁰³

Viele Methoden zur Supprimierung der Bräunung setzen bei der Hemmung der PPO an. Diese umfassen die Inhibierung des Enzyms durch Hitze oder die chemische Inhibierung durch Säuren, die den pH-Wert vom Optimum des Enzyms entfernen, oder Chelatbildner, die das Cu(II) im aktiven Zentrum des Enzyms komplexieren und inaktivieren. Antioxidantien wie Cystein unterbinden die enzymatische Oxidation oder entfernen durch die Adduktbildung die phenolischen Substrate aus der weiteren Bräunungsreaktionskaskade²⁰³. Damit zeigt sich, dass ein Verständnis der spezifischen Bräunungsprozesse der einzelnen Lebensmittel unabdingbar ist, um ihnen entgegenzuwirken und die Qualität und die Verbraucherakzeptanz pflanzlicher

Lebensmittel zu verbessern. So konnte auf Grundlage des Benzacridin-Bildungsweges der Einfluss verschiedener Zutaten, wie Süßungsmittel oder Ei-Ersatz-Produkte, in der Herstellung von Erzeugnissen, die Sonnenblumenbutter enthalten, auf die Grünfärbung untersucht werden.^{204,205}

Die Untersuchungen der kovalenten Interaktionen zwischen Polyphenolen und Proteinen umfassen wie bereits erwähnt zum Großteil Studien zu den Interaktionen der einzelnen Aminosäuren. Diese ermöglichen zwar einen Einblick in die grundlegenden Interaktionen, aber sie können, mangels der fehlenden strukturellen Komplexität, die Proteine aufweisen, nicht das vollständige Bild dieser Interaktionen wiedergeben.

3 Zielstellung

Die mechanistischen Vorgänge während der enzymatischen Bräunung sind aufgrund der Vielfältigkeit der möglichen Substrate und Reaktionswege bis heute nicht abschließend geklärt. Ist sie für einige Lebensmittel zwar ein Kernbestandteil der Technologie, so steht sie doch bei vielen pflanzlichen Lebensmitteln in Verbindung mit einem deutlichen Qualitätsverlust und Minderung der Verbraucherakzeptanz und führt zu einem beträchtlichen wirtschaftlichen Verlust. Nur mit einem fundamentalen Verständnis für die zugrunde liegenden Mechanismen und den mit ihnen einhergehenden Reaktionsprodukten kann diesen Prozessen entgegengewirkt werden. Die der oxidativen Umsetzung der phenolischen Substrate folgenden Reaktionen sind dabei nicht nur auf phenolische Verbindungen beschränkt, sondern involvieren auch Aminosäuren und Proteine. Dabei sind besonders die kovalenten Interaktionen von großem Interesse. Die damit verbundene Diversität an Reaktanden mit den dazugehörigen Reaktionsprodukten verbunden mit den komplexen Lebensmittelmatrices führen zu einer schwer erfassbaren Bandbreite an Strukturen. Die Ergebnisse, die in dieser Dissertation präsentiert werden, sollen einen Beitrag zu einem tieferen Verständnis dieser Strukturen und der kovalenten Interaktionen zwischen Polyphenolen und Aminosäuren leisten.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die grundlegenden Reaktionen von Aminosäuren und Polyphenolen während der enzymatischen Bräunungsreaktion in Bezug auf die farbigen Bräunungsstrukturen aufzuklären. Dazu wurde ein auf der PPO der Nashibirne (*Pyrus pyrifolia*) und auf der enzymatischen Bräunungsreaktion während der Teefermentation, basierend auf Gallussäure und (+)-Catechin, beruhendes Modellinkubationssystem entwickelt. Die Auswirkungen nucleophiler Aminosäuren auf das enzymatische Bräunungssystem bezüglich der farbigen Reaktionsprodukte wurden anhand der Aminosäuren Arginin, Lysin und Cystein untersucht, die farbigen Strukturen wurden isoliert, strukturell aufgeklärt und ihr Beitrag zu Gesamtfarbgebung mittels Farbverdünnungsanalyse ermittelt. Die farblosen Intermediate der Cystein-Modellinkubationen wurden mechanistischen Inkubationen unterworfen und hinsichtlich der Bildung farbiger Folgeprodukte, deren Isolierung und Strukturaufklärung im Fokus stand, mittels Derivatisierung mit OPD untersucht.

Ein weiterer Aspekt der Arbeit befasste sich mit dem oxidativen Abbau des Dihydrochalkons Aspalathin, wobei der Fokus auf die Bildung neuartiger Abbauprodukte und kovalenter Aminosäure-Polyphenol-Addukte gelegt wurde. Der oxidative Abbau des Aspalathins wurde in verschiedenen Modellinkubationen unter aeroben und anaeroben

Bedingungen durchgeführt und die kovalenten Interaktionen mit Proteinen und Aminosäuren anhand von bovinem Serum Albumin und Lysin betrachtet. Die Aufklärung des Abbaumechanismus mit Hilfe von Modellsystemen wurde unter aeroben und anaeroben Bedingungen sowie unter Generierung reaktiver Sauerstoffspezies unter Zuhilfenahme der Dihydrochalkone Phloridzin und Phloretin durchgeführt. Bei der Etablierung der Inkubationssysteme stand die Synthese authentischer Referenzstandards im Fokus. Durch die Quantifizierung der Produkte aus diesem oxidativen Abbau in fermentiertem und unfermentiertem Rooibostee wurden die Ergebnisse der Modellsysteme auf reale Lebensmittelproben übertragen.

4 Diskussion der Ergebnisse

4.1 Benzothiazine als wichtige Intermediate von enzymatischen Bräunungsreaktionen.

4.1.1 Etablierung eines Modellsystems zur Untersuchung der enzymatischen Bräunungsreaktion

Die Literatur zeigt, dass die Isolierung und Charakterisierung diskreter farbiger Strukturen aus der enzymatischen Bräunungsreaktion zwischen Polyphenolen und Aminosäuren die Analytik vor große Herausforderungen stellt. Die komplexen Lebensmittelmatrices erschweren die Isolation konkreter Verbindungen und häufig ist es der Fall, dass sich in den Chromatogrammen der Extrakte keine gut aufgelösten Peaks diskreter Verbindungen zeigen, sondern sich ein chromatographischer Hügel ausbildet. Für Tee, Rooibostee, Apfel und Salat kann die Literatur mit konkreten Beispielen dienen, sie bilden aber die Ausnahme.^{153,157,175,180,181,188} Für die anderen Lebensmittel, die der enzymatischen Bräunungsreaktion unterliegen, weist die Literatur jedoch verschiedene Möglichkeiten der Analytik auf, um auch ohne konkrete Bräunungsstrukturen Aussagen zum Verlauf, zu vermeintlichen Reaktionsprodukten oder zur Interaktion von Polyphenolen mit Aminosäuren oder Proteinen zu treffen. Den Ausweg aus dieser Problematik vermag die Etablierung geeigneter Modellsysteme, die eine vereinfachte Analyse der komplexen pflanzenspezifischen enzymatischen Bräunungsreaktionen im Labormaßstab ermöglichen, aufzuzeigen. Dabei beschränken sich die Reaktionen auf die im Modellsystem eingesetzten Substrate und begrenzen damit das Produktspektrum. Eine detaillierte Beschreibung des experimentellen Aufbaus sowie die Diskussion der Ergebnisse kann der Veröffentlichung „Influence of Nucleophilic Amino Acids on Enzymatic Browning Systems“ (Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67, 1719-1725) entnommen werden.²⁰⁶ Als Grundlage für das in dieser Arbeit vorgestellte Modellsystem diente die Fermentation von Schwarzem Tee, da diese Bräunungsreaktion wie bereits beschrieben bezüglich ihrer Substrate und Bräunungsstrukturen zu der am besten untersuchten enzymatischen Bräunungsreaktion im Pflanzenreich zählt.¹⁵³ Aufgrund ihrer relativ hohen Gehalte in der Polyphenolfraktion und als Strukturbaustein in den aufgeklärten Bräunungsprodukten spielen Catechine, Catechingallate und Gallocatechine die dominante Rolle im Tee, sodass Gallussäure (GA) und Catechin (CA) als Grundsubstrate für die Modellsysteme dienen.¹⁵¹

Aufgrund der Catechol-Struktur des Catechins dient dieses als Substrat für die in Abb. 4 dargestellte initiale Oxidationsreaktion.

In der Literatur werden drei Hauptwege für die experimentelle Oxidation von *o*-Hydrochinonen zu *o*-Chinonen beschrieben: 1. der Einsatz kommerziell erhältlicher Tyrosinase oder Peroxidase-Wasserstoffperoxid-Systeme,^{105,116,120,207} 2. die Verwendung isolierter PPO aus Pflanzen bzw. der Einsatz von pflanzlichen Homogenisaten^{186,208,209} und 3. die Verwendung chemischer Oxidationsmethoden. Die chemische Oxidation wird allgemein durch die Verwendung verschiedener Oxidationsmittel wie Wasserstoffperoxid, verschiedener Übergangsmetallverbindungen oder einen alkalischen pH-Wert ausgelöst.^{28,56,207} Auch eine Oxidation auf elektrochemischen Weg ist möglich.⁶⁴ Dies bietet zwar einen für den experimentellen Bereich praktikablen Weg, spiegelt aber nicht die für Lebensmittel vorherrschenden allgemeinen Bedingungen wider, da sowohl diese chemischen Oxidationsmittel nicht enthalten sind als auch allgemein ein saureres Milieu in pflanzlichen Lebensmitteln vorherrscht. Ein weiterer, besonders für die enzymatische Bräunung relevanter Aspekt, den die chemische Oxidation außer Acht lässt, ist die Substratspezifität der Enzyme. Die chemische Oxidation führt zu einer unkontrollierten Oxidation der Substrate und der Folgeprodukte und ermöglicht Nebenreaktionen. Somit hat der Einsatz von Enzympräparaten eine höhere lebensmitteltechnische Relevanz. Aber auch bei dem Einsatz von Enzymen ist die Substratspezifität als kritischer Faktor zu betrachten. Unabhängig davon, ob es sich um reine Enzyme oder Enzyme aus Pflanzenhomogenisaten handelt, unterliegen sie jedoch alle ihrer arteigenen Substratspezifität und weisen unterschiedliche Aktivitäten auf, die es zu beachten gilt. Die für die in dieser Arbeit verwendete PPO entstammt einem aus Nashibirnen hergestellten Homogenisat. Im Allgemeinen haben Pflanzenhomogenisate den Nachteil gegenüber den isolierten Enzymen, dass es sich nicht um reine Enzymlösungen handelt und andere Inhaltsstoffe störende Nebenreaktionen in den Modellsystemen auslösen können. Die Nashibirne weist jedoch sehr geringe Gehalte an phenolischen Verbindungen auf, die an der enzymatischen Bräunungsreaktion teilnehmen können.²¹⁰ Die HPLC-DAD-Analyse des Homogenisats zeigte ebenfalls keine detektierbaren phenolischen Strukturen oder farbigen Produkte, sodass eine Störung im Verlauf der enzymatischen Bräunungsreaktion in den Modellsystemen ausgeschlossen werden konnte. Neben der PPO können auch weitere Enzyme wie Peroxidasen oder andere äußere Faktoren wie Co-Faktoren in Form von redoxaktiven Metall-Ionen oder andere Redoxmediatoren im Homogenisat enthalten sein. Diese können den Verlauf der Reaktion bezüglich der Reaktionsgeschwindigkeit und des Produktspektrums beeinflussen. Da der Vergleich des Homogenisats mit einer reinen

PPO-Enzym-Lösung das gleiche Produktspektrum lieferte, wurde dieser Ansatz nicht weiter betrachtet. Weiterhin zeigt die Nashi-PPO eine vergleichsweise hohe Enzymaktivität, weshalb sie insgesamt eine kostengünstige, dennoch sehr effektive PPO-Quelle darstellt.²¹⁰

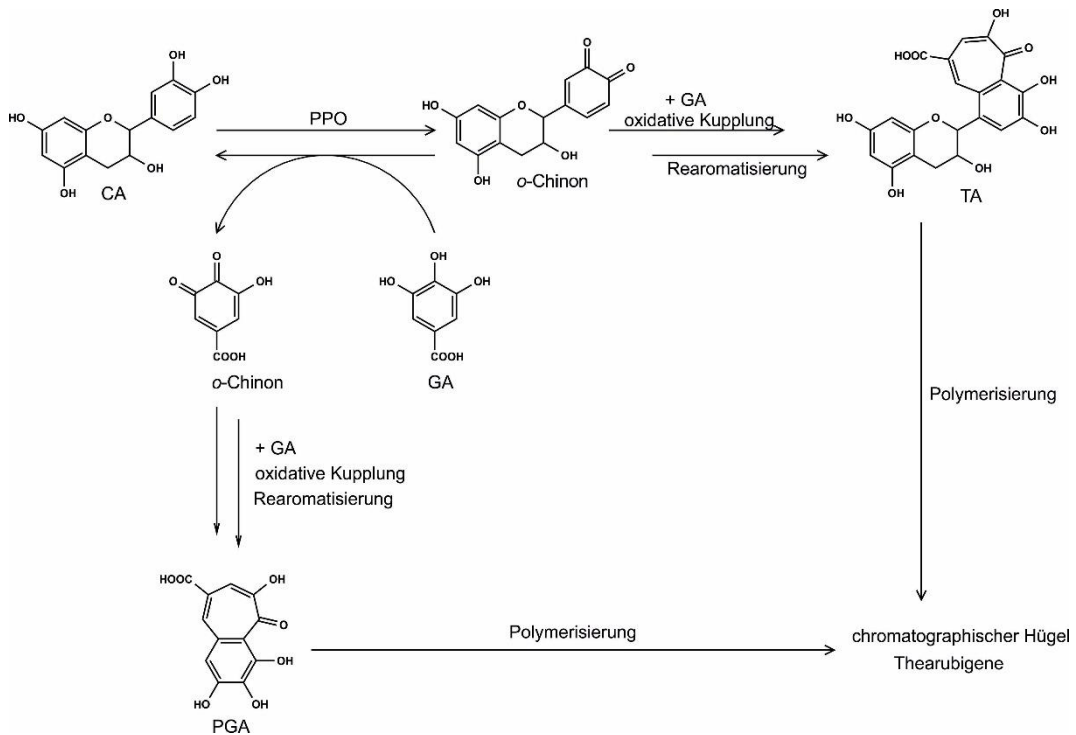


Abb. 29: Enzymatische Bildung von PGA und TA

Das initiale Modellsystem bestand somit aus einer Mischung aus 10 mM GA und 10 mM CA in Nashibirnenhomogenisat bei pH = 6,5. Nach Zugabe des Enzyms begann unmittelbar die Bildung einer gelb-bräunlichen Verfärbung. Dieses System führte sofort nach Beginn der Inkubation zu den bereits aus der Teefermentation bekannten Hauptprodukten Purpurogallin-4-carbonsäure (PGA) und Theaflavinsäure (TA) (Abb. 29) und zur Ausbildung eines chromatographischen Hügels. Wie aus der Teefermentation bereits bekannt ist, handelte es sich bei diesen Strukturen lediglich um reaktive Intermediate, die sich im weiteren Reaktionsverlauf zu höhermolekularen Strukturen unter dem chromatographischen Hügel umsetzten. Mit Hilfe der Farbverdünnungsanalysen konnten die Anteile einzelner Strukturen an der Gesamtfarbe über den Inkubationsverlauf bestimmt werden (Abb. 30). Der Anstieg des Farbverdünnungsfaktors (CD_{total}) über den Inkubationsverlauf belegt die Intensivierung der Verfärbung mit Fortschreiten der Inkubation. Nach einer Stunde Inkubationszeit besaß TA mit 62% den Hauptanteil an der Inkubationsfarbe. Mit fortschreitender Inkubationsdauer und dem damit einhergehenden Abbau der TA und der Ausbildung des chromatographischen Hügels verschieben sich die

Verhältnisse. So machen nach 24 h Inkubationsdauer allein die hochmolekularen Strukturen unter dem Hügel einen Anteil von 23% an der Gesamtfarbe aus. Aufgrund der irreversiblen Adsorption an der für die Fraktionierung der Extrakte beteiligten stationären Phase ist eine Wiederfindung von 100% der farbigen Strukturen über die Farbverdünnungsanalyse nicht möglich.

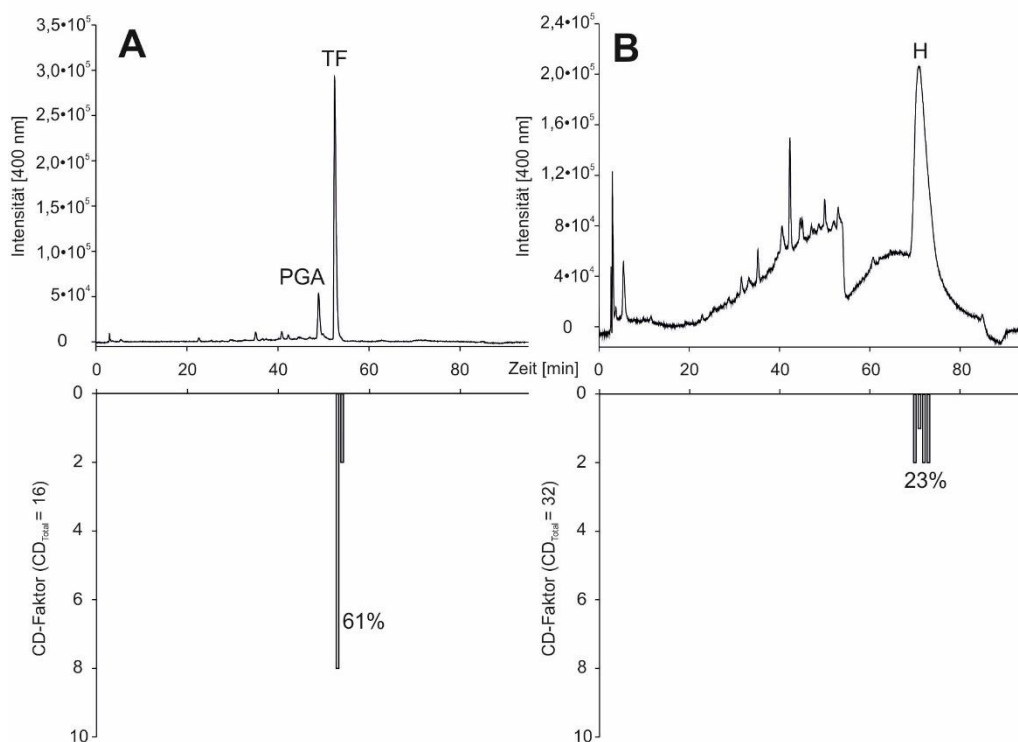


Abb. 30: Farbverdünnungsanalysen der GA-CA-Inkubationen nach 1 h (A) und 24 h (B)

4.1.2 Einfluss von Aminosäuren auf den Verlauf der enzymatischen Bräunungsreaktion im Modellsystem

Im Zentrum der enzymatischen Bräunungsreaktion steht die Michael-Addition eines Nucleophils an ein *o*-Chinon. So wurden Arginin, Lysin und Cystein, Aminosäuren mit stark nucleophilen Seitenketten,^{211–213} als zusätzliche nucleophile Komponente dem etablierten Modellsystem jeweils in äquimolaren Mengen zugesetzt. Die Aminosäuren Arginin und Lysin zeigten jeweils keinen Einfluss auf das Modellsystem in Bezug auf sowohl den Reaktionsverlauf als auch auf die Reaktionsprodukte und die Verfärbung des Systems. Es konnten auch keine Aminosäure-Polyphenol-Addukte detektiert werden. Die Cystein-haltige Inkubation zeigte jedoch einen veränderten Inkubationsverlauf. Mit Beginn

der Inkubation kam es weder zu einer Farbbildung noch zur Entstehung von PGA und TA, sondern es bildeten sich die farblosen Cystein-Addukte 2'-Cysteinyl-Catechin (A1) und 5'-Cysteinyl-Catechin (A2) (Abb. 31). Die Struktur dieser Addukte wurde bereits von Richard et al. während der enzymatischen Oxidation von Catechinen mit Cystein nachgewiesen.²⁰⁸ Jedoch konnte die Bildung von 6'- und 2',5'-Adukkten, wie sie in Tyrosinase-katalysierten Modellinkubationen von DOPA mit Cystein entstanden, in dem vorgestellten Inkubationssystem nicht detektiert werden.¹¹⁶

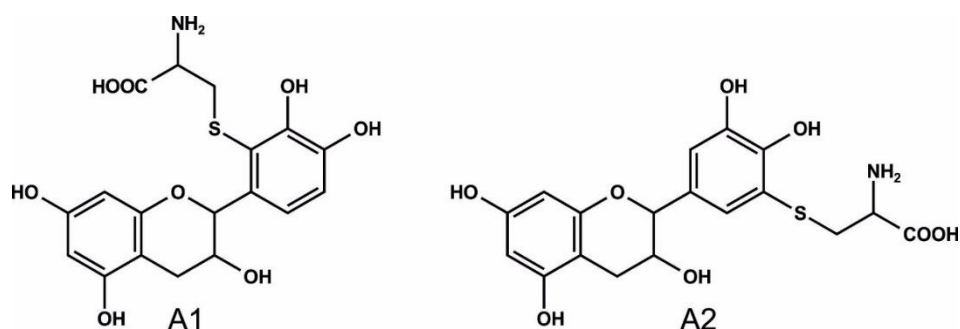


Abb. 31: Cysteinyl-Catechine A1 und A2

Aus diesen Verläufen wurde ein grundlegender Unterschied in den Reaktivitäten der nucleophilen Aminosäureseitenketten unter den gewählten Inkubationsbedingungen deutlich. Allgemein gelten die Thiol-Gruppe des Cysteins, die ϵ -Aminofunktion des Lysins und die Guanidino-Gruppe des Arginins als relativ starke nucleophile Seitenketten. Auch konnten bereits Addukte von Polyphenolen mit Proteinen über ihre Lysin- und Argininseitenketten in Molkenproteinen nachgewiesen werden.^{207,214} Jedoch zeigte eine Untersuchung der Nucleophilie der Aminosäuren, dass die Thiol-Gruppe des Cysteins eine deutlich höhere Nucleophilie und Reaktivität aufweist.²¹¹ Die Untersuchungen von Li et al. zur Modifizierung eines elektrochemisch generierten *o*-Chinons durch Thiol-, Amino- und Guanidino-Gruppen unter physiologischen pH-Wert zeigte eine mindestens 10^5 -fach höhere Reaktivität der Thiol-Gruppe gegenüber den anderen nucleophilen Funktionen.⁶⁴ In diesem Zusammenhang muss auch der pH-Wert des Systems als kritischer Punkt betrachtet werden. Dieser übt einen maßgeblichen Einfluss auf die Nucleophilie der Aminosäuren aus. Das leicht saure Milieu des Inkubationssystems spiegelt die reale Situation in den meisten pflanzlichen Lebensmitteln wider und bildet zudem das pH-Optimum der PPO. Ein basischer pH-Wert dagegen geht bei den basischen Aminosäuren Lysin und Arginin mit einer stärkeren Nucleophilie einher,^{56,212,215} sodass für die allgemeine Betrachtung der Interaktion von oxidierten Polyphenolen mit diesen Aminosäuren ein Inkubationssystem über eine Oxidation durch ein stark basisches Milieu zielführend wäre. Dies ist jedoch für die Betrachtung von realen pflanzlichen Lebensmitteln und für die weiteren

Untersuchungen nicht von Relevanz. Nach 3 h setzte der Abbau von A1 und A2 und die Bildung der zwei neuartigen farblosen Dihydrobenzothiazincarbonsäure-Derivate 8-(3,5,7-Trihydroxy-3,4-dihydro-2*H*-chromen-2-yl)-5-hydroxy-3,4-dihydro-2*H*-benzothiazin-3-carbonsäure (B1) und 7-(3,5,7-Trihydroxy-3,4-dihydro-2*H*-chromen-2-yl)-5-hydroxy-3,4-dihydro-2*H*-benzothiazin-3-carbonsäure (B2) ein (Abb. 32).

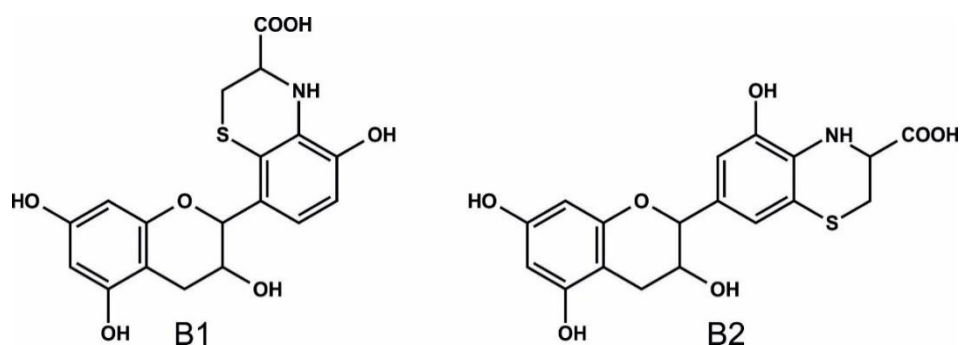


Abb. 32: Dihydrobenzothiazincarbonsäuren B1 und B2

Die Entstehung von B1 und B2 ging zudem mit der Ausbildung eines chromatographischen Hügels und der Ausbildung einer rot-braunen Farbe einher. Daraus folgt, dass die Dihydrobenzothiazincarbonsäure-Strukturen B1 und B2 lediglich reaktive Intermediate im enzymatischen Bräunungsverlauf dieses Inkubationssystems sind. Diese setzte sich zu hochmolekularen farbigen Verbindungen um, wie es aus dem Verlauf der Phäomelanogenese bereits bekannt ist.¹²⁰ In ihren Untersuchungen beschrieb die Arbeitsgruppe von Richard ebenfalls die Entstehung farbiger Verbindungen, wies dieser Farbige jedoch keine konkreten Strukturen zu.²⁰⁹ Im Zusammenhang mit der Farbe entstanden zusätzlich PGA und TA, die ebenfalls einen Anteil an der Gesamtfarbe der Inkubation haben. Nach 8 h wies der chromatographische Hügel den Hauptanteil an der Gesamtfarbe mit 41% auf, während TA einen Anteil von 2% hatte. Nach 24 h erhöhte sich der Anteil des chromatographischen Hügels auf 53%, wobei hier nur noch PGA zusätzlich mit 3% zur Gesamtfarbe beitrug (Abb. 33).

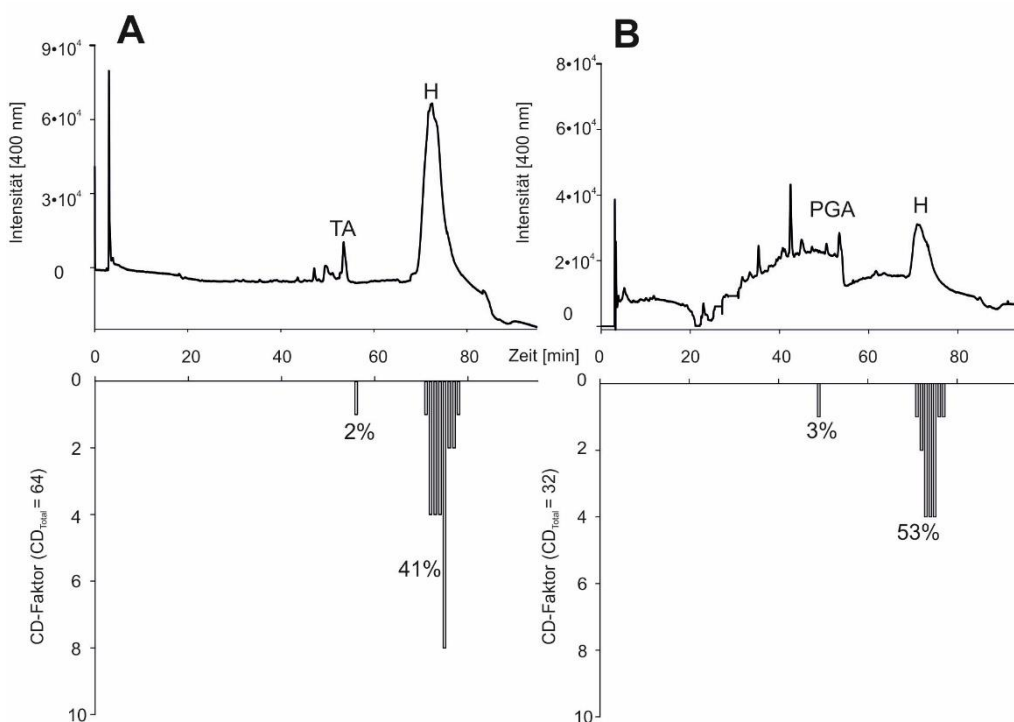


Abb. 33: Farbverdünnungsanalysen der GA-CA-Cystein-Inkubationen nach 8 h (A) und 24 h (B)

Angelehnt an die Reaktionsmechanismen der Phäomelanogenese wurde ein Mechanismus für die Bildung von B1 und B2 postuliert (Abb. 34). Ausgehend von der enzymatischen Oxidation des Catechins zum *o*-Chinon erfolgt ein nucleophiler Angriff der Thiol-Gruppe des Cysteins, welcher zu den 2'- und 5'-Cysteinyl Addukten A1 und A2 führt. Die Bildung dieser Produkte erfolgte zu Beginn der Inkubation beinahe quantitativ, sodass nach einer Stunde bereits 18% A1 und 31% A2 gebildet wurden, während der Gehalt an Catechin um 51% abnahm (Abb. 35). Als Grund für diesen Unterschied ist die stärkere sterische Hinderung eines Angriffs an C-2' im Vergleich zu C-5' zu sehen. Der für den intramolekularen Ringschluss notwendige zweite nucleophile Angriff durch die Amino-Gruppe setzt eine erneute Oxidation zum *o*-Chinon voraus. Aus der Literatur ist bekannt, dass Cystein-Addukte von Polyphenolen nicht als Substrate von PPOs erkannt werden. Durch Einzelinkubationen von A1 und A2 in Nashibirnenhomogenisat, bei denen sich keine Umsetzung der Addukte feststellen ließ, konnte auch diese Eigenschaft für die vorliegenden Strukturen bewiesen werden. Erst durch Zugabe von Catechin zur PPO konnte die Weiterreaktion erfolgen. Catechin wird durch die PPO zum *o*-Chinon oxidiert und fungiert wiederum als Oxidationsmittel für die Cystein-Addukte zum jeweiligen Cysteinyl-Chinon. Es wird im Gegenzug reduziert und kann erneut enzymatisch oxidiert werden.

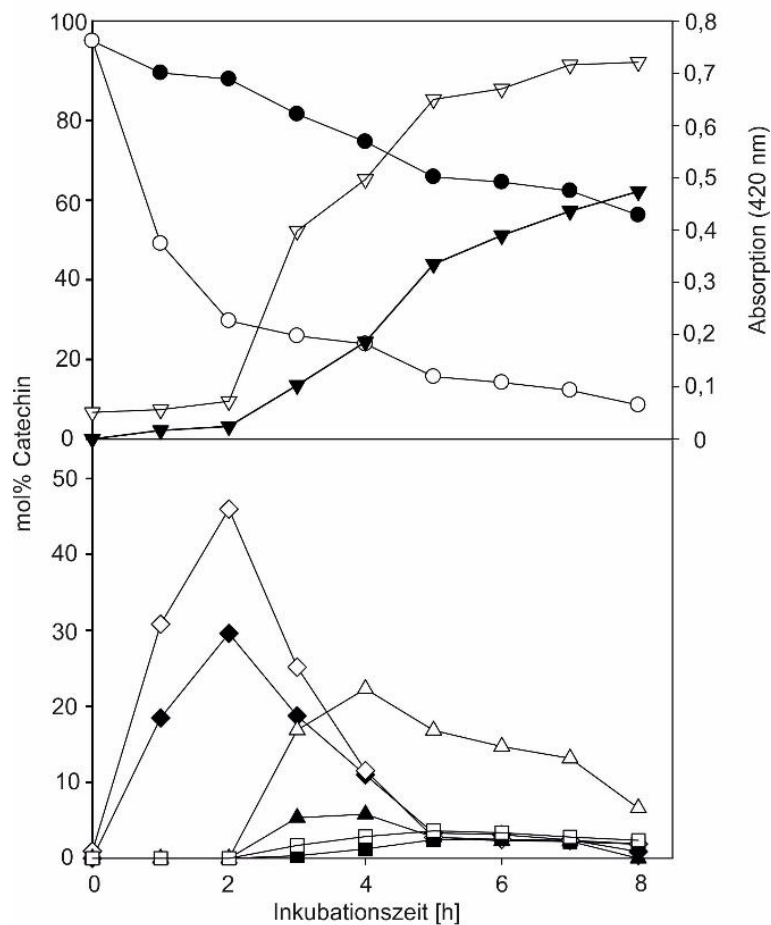


Abb. 35: Umsatz von GA und CA in Anwesenheit von Cystein, GA (●), CA (○), Hügel (▼), Absorption bei $\lambda = 420 \text{ nm}$ (▽), A1 (◆), A2 (◇), B1 (▲), B2 (△), PGA (■) und TA (□)

So führt ein Überschuss der Aminosäure zu einer verstärkten Bildung der Cystein-Addukte, wohingegen es kaum zu einer Bildung der Thiazin-Derivate und zu keiner Veränderung der Inkubationsfarbe kommt. Die starke Nucleophilie der Thiol-Gruppe bedingt, dass eine Adduktbildung zwischen dem *o*-Chinon und Cystein vor einer möglichen Dimerisierung erfolgt.¹⁴⁶ Der Überschuss an Cystein fängt effektiv das oxidierte Catechin ab, wodurch das für die Thiazin-Bildung benötigte Oxidationsmittel nicht mehr zur Verfügung steht. Folglich fördert ein Verschieben des Konzentrationsverhältnisses zugunsten des Catechins die Bildung der Thiazin-Derivate und es erfolgt die Bildung der rotbraunen Farbe.

4.1.3 Weiterführende Reaktionen der Dihydrobenzothiazincarbonsäure-Derivate und Charakterisierung der Reaktionsprodukte

Die verschiedenen farblosen Thiazinderivate gelten als letzte stabile, isolierbare Strukturen in der Phäomelanogenese. Damit zählen auch die isolierten Dihydrobenzothiazincarbonsäure-Derivate B1 und B2 zu den Schlüsselintermediaten in der weiteren Bildung farbiger Strukturen innerhalb des vorliegenden Inkubationssystems.¹²⁰ So beweist allein die unterschiedliche Färbung der verschiedenen Inkubationssysteme den Einfluss des Cysteins und der damit verbundenen Entstehung von B1 und B2 auf den Verlauf der enzymatischen Bräunungsreaktion und die Entstehung farbiger Verbindungen. Im Verlauf der Phäomelanogenese können die Thiazin-Derivate unterschiedlichen Folgereaktionen wie Decarboxylierungen, Ringkontraktion oder Polymerisierungsreaktionen unterliegen und schließlich zu komplex aufgebauten farbigen Melaninen führen.¹⁰⁰ Aus dem etablierten Inkubationssystem war keine Isolierung farbiger Intermediate möglich, da es sich bei diesen Strukturen um hochreaktive Verbindungen handelt und sie sich wie in den Farbverdünnungsanalysen ersichtlich zu hochmolekularen farbigen Produkten unter dem chromatographischen Hügel umsetzen. Zur Isolierung und Charakterisierung wurden weiterführende Inkubationen von B1 und B2 durchgeführt. Eine detaillierte Beschreibung des experimentellen Aufbaus sowie die Diskussion der Ergebnisse kann der Veröffentlichung „Benzothiazines as Major Intermediates in Enzymatic Browning Reactions of Catechin and Cysteine“ (Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69, 15345-15353) entnommen werden. B1 und B2 wurden zu unterschiedlichen pH-Werten inkubiert. Ein basisches Milieu (pH 10,8) führte zu einem sofortigen vollständigen Abbau der Thiazine und einer sofort einsetzenden violetten Verfärbung der Inkubation. Dabei konnten aufgrund der zu starken oxidativen Bedingungen im Alkalischen keine diskreten farbigen Strukturen detektiert werden. Im neutralen und sauren Milieu hingegen erfolgte der langsame Abbau von B1 und B2 und die stetige Bildung der zwei neuartigen decarboxylierten Dihydrobenzothiazin-Derivate 8-(3,5,7-Trihydroxy-3,4-dihydro-2*H*-chromen-2-yl)-5-hydroxy-3,4-dihydro-2*H*-benzothiazin (C1) und 7-(3,5,7-Trihydroxy-3,4-dihydro-2*H*-chromen-2-yl)-5-hydroxy-3,4-dihydro-2*H*-benzothiazin (C2) (Abb. 35). Initialschritt dieser Decarboxylierung ist die Oxidation der Thiazine zum jeweiligen Chinonimin. Die darauffolgende β -Decarboxylierung wird durch das vinyloge System unter sauren Bedingungen begünstigt (Abb. 36). Mit sinkendem pH-Wert erfolgte dabei eine schnellere Decarboxylierung, sodass bei pH = 1,3 nach 24 h B1 und B2 sich vollständig umgesetzt hatten und dabei eine

Umsatzrate von 30% erreicht wurde. In einem finalen Schritt erfolgt eine Reduktion zu den isolierten Dihydrobenzothiazin-Derivaten.

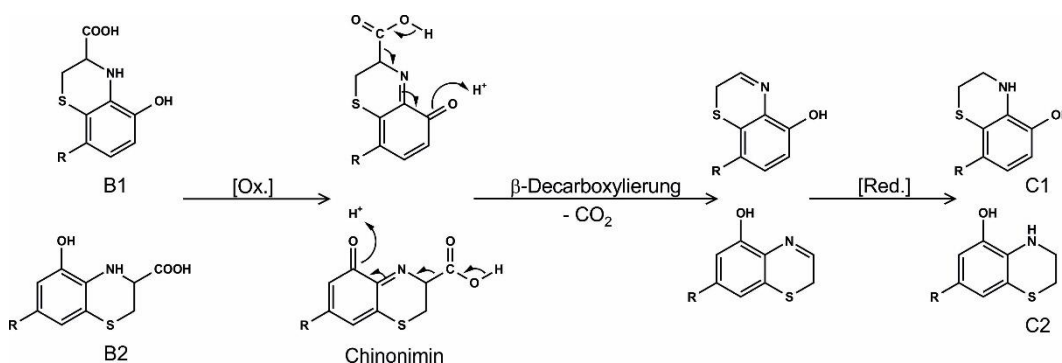


Abb. 36: Decarboxylierung von B1 und B2 zu C1 und C2

Die Decarboxylierung ist ein bedeutender Reaktionsweg im Verlauf der Phäomelanogenese, bei der der decarboxylierte Weg um 85% dem carboxylierten mit 15% bevorzugt wird und zusätzlich unabhängig vom Oxidationsmittel ist. Unter biologisch relevanten Bedingungen ist die Decarboxylierung der dominierende Weg.¹¹⁸ Die Phäomelanogenese ist eine pH-abhängige Reaktionskaskade, die in Abhängigkeit vom pH-Wert des Milieus zu farblich-differenzierten Produkten führt.²¹⁶ Dieses Merkmal der Phäomelanogenese spiegelte sich in den unterschiedlichen Färbungen bei verschiedenen pH-Werten wider: die basische Inkubation zeigte eine stark violette Färbung, wohingegen sich mit sinkendem pH-Wert eine intensivierende rote Färbung ausbildete. Dies weist auf die Entstehung unterschiedlich gefärbter Strukturen, vergleichbar den Trichochromen, die ebenfalls pH-abhängige Absorptionsmaxima aufweisen, hin.¹¹⁷ Jedoch konnten solche Strukturen in den vorliegenden Inkubationssystemen weder isoliert noch nachgewiesen werden.

Zur Isolierung farbiger Strukturen wurden Inkubationen mit OPD als Derivatisierungsreagenz durchgeführt. OPD ist ein etabliertes Reagenz zur Stabilisierung reaktiver α -Dicarbonyle aus dem Kohlenhydrat-Abbau^{217,218} und verschiedenster reaktiver Intermediate wie 2-Acetyl-1-pyrrolin,²¹⁹ farbiger Dibenzofuran-Derivate im Fermentationprozess von Rooibostee¹⁷⁵ und farbiger Strukturen im Teefermentationsprozess²²⁰ durch die Bildung der jeweiligen Chinoxalin- bzw. Phenazin-Derivate. Zudem weist OPD als Stickstoff-analoges *o*-Hydrochinon eine hohe Redoxaktivität auf, sodass es in der Lage ist, den oxidativen Abbau der Thiazine weiterzutragen.

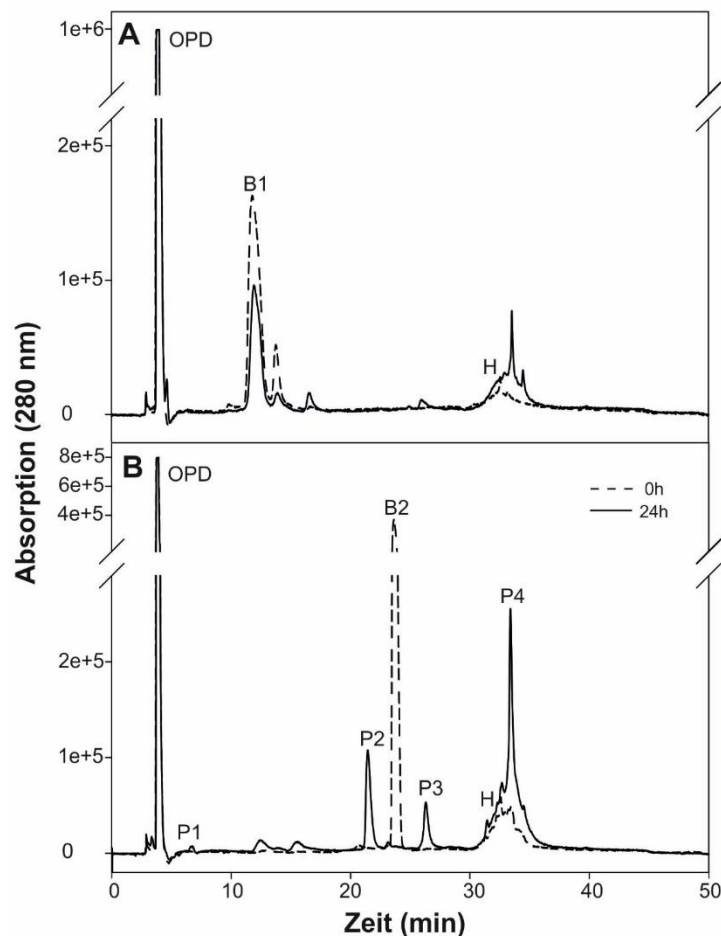


Abb. 37: Inkubationen von B1 (A) und B2 (B) mit OPD nach 0 h und 24 h mit den Produkten P1 – P4 und dem chromatographischen Hügel (H)

In der vorliegenden Arbeit wurden A1 und A2 bzw. B1 und B2 mit einem Überschuss OPD inkubiert, um die möglichen reaktiven farbigen Intermediate in der Farbbildung zu stabilisieren (Abb. 37). Die Inkubationen führten zwar alle zu einer Verfärbung, dennoch zeigten A1 und B1 im Vergleich zu A2 und B2 trotz ihrer strukturellen Ähnlichkeit ein vollständig unterschiedliches Reaktionsverhalten. Die Inkubation von B1 führte zwar zur Entstehung des chromatographischen Hügels, jedoch zu keinen diskreten Signalen. Die Umsetzung von B2 führte ebenfalls zur Entstehung des chromatographischen Hügels und zusätzlich zu vier diskreten Signalen (P1 – P4), die Absorptionsmaxima über 400 nm aufwiesen. Durch die hohe Redoxaktivität ist OPD anfällig für verschiedenste Nebenreaktionen.^{217,218} Um die Möglichkeit der Bildung von Reaktionsprodukten aus der direkten Reaktion von B2 mit OPD und die Bildung von Artefakten aus dem weiteren oxidativen Abbauprozess der OPD-Derivate auszuschließen, wurden Einzelinkubationen

der Cystein-Addukte mit Nashi-PPO und Catechin durchgeführt und zusätzlich mit OPD nachinkubiert.

Die Nachinkubationen von A1 führte wie zu erwarten zu keinen diskreten Signalen und somit wurden A1 bzw. B1 für die weiteren mechanistischen Betrachtungen nicht weiter berücksichtigt. Die farbigen Produkte aus dem Abbau von A1 bzw. B1 können somit durch OPD nicht abgefangen werden. Die Inkubation von A2 führte mit Bildung von B2 zeitgleich zu der Bildung von P2 und P4 in der Nachinkubation nach 3 h mit OPD. Dabei entstand P4 nur im Spurenbereich, sodass eine Isolation nicht möglich war. Diese Nachinkubation mit OPD führte zu einer marginalen Abnahme von B2 um weniger als 3%, wodurch eine direkte Reaktion von B2 mit OPD zur Bildung dieser Produkte ausgeschlossen werden kann. Die Produkte P1 und P3 waren ausschließlich in den 24 h Nachinkubationen nachweisbar und konnten als direkte Abbauprodukte von P2 nachgewiesen werden, sodass es sich bei diesen zwei Produkten lediglich um Folgeprodukte aus der OPD-Derivatisierung von B2 und nicht um derivatisierte Verbindungen aus der Reaktion der Thiazine handelt. Die isolierte Struktur P2 wurde als (12E)-5,5'-Dioxo-11a,11a'-bis(3,5,7-trihydroxy-3,4-dihydro-2H-chromen-2-yl)-3,3',4,4',5a,5a',6,6',11,11',11a,11a'-dodecahydro-2H,2'H,5H,5'H-12,12'-bi[1,4]thiazino[2,3-b]phenazin-3,3'-dicarbonsäure identifiziert (Abb. 38). Auf Grundlage der bekannten Thiazinstruktur und den bekannten Reaktionsmechanismen aus der enzymatischen Bräunungsreaktion und Phäomelanogenese wurde folgender Reaktionsmechanismus für B2 postuliert (Abb. 39).

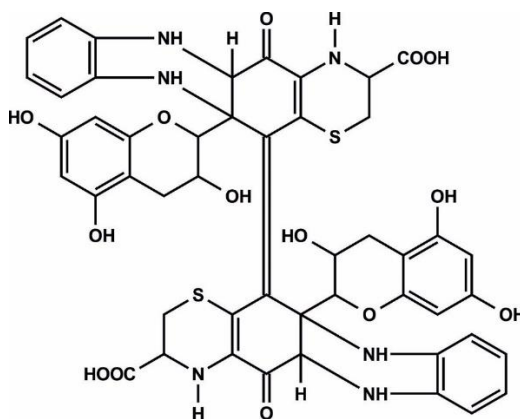


Abb. 38: Struktur von P2

Auch hier bildet die Oxidation der Dihydrobenzothiazincarbonsäure zum Chinonimin den Initialschritt des Mechanismus. Auf die Bildung des Chinonimins folgt ein nucleophiler Angriff eines zweiten B2-Moleküls in seiner reduzierten Form in *para*-Position der Carbonyl-Funktion unter Bildung einer stabilen C-C-Bindung. Dieser oxidativen

Kupplung schließt sich eine Umlagerung unter Rearomatisierung des entstehenden Dimers an. Der Mechanismus der oxidativen Kupplung ist ein bekannter und gut untersuchter Reaktionspfad im Verlauf der Teefermentation und der Phäomelanogenese. Da es sich bei dem gebildeten Dimer immer noch um ein Stickstoff-analoges *o*-Hydrochinon handelt, kann dieses erneut leicht zum Chinonimin aufoxidiert werden. Nun folgen zwei nucleophile Angriffe der Amino-Gruppen von OPD. Der erste Angriff muss aufgrund der sterischen Hinderung der *meta*-Position in *ortho*-Position zur Carbonyl-Funktion erfolgen. Allerdings scheint diese sterische Hinderung des zweiten nucleophilen Angriffs durch den intramolekularen Ringschluss kompensiert zu werden. Eine weitere Oxidation und Reaktion mit OPD mit dem zweiten Thiazin-Monomer und ein letzter Oxidationsschritt des vollständigen Dimers führen zum finalen Produkt P2.

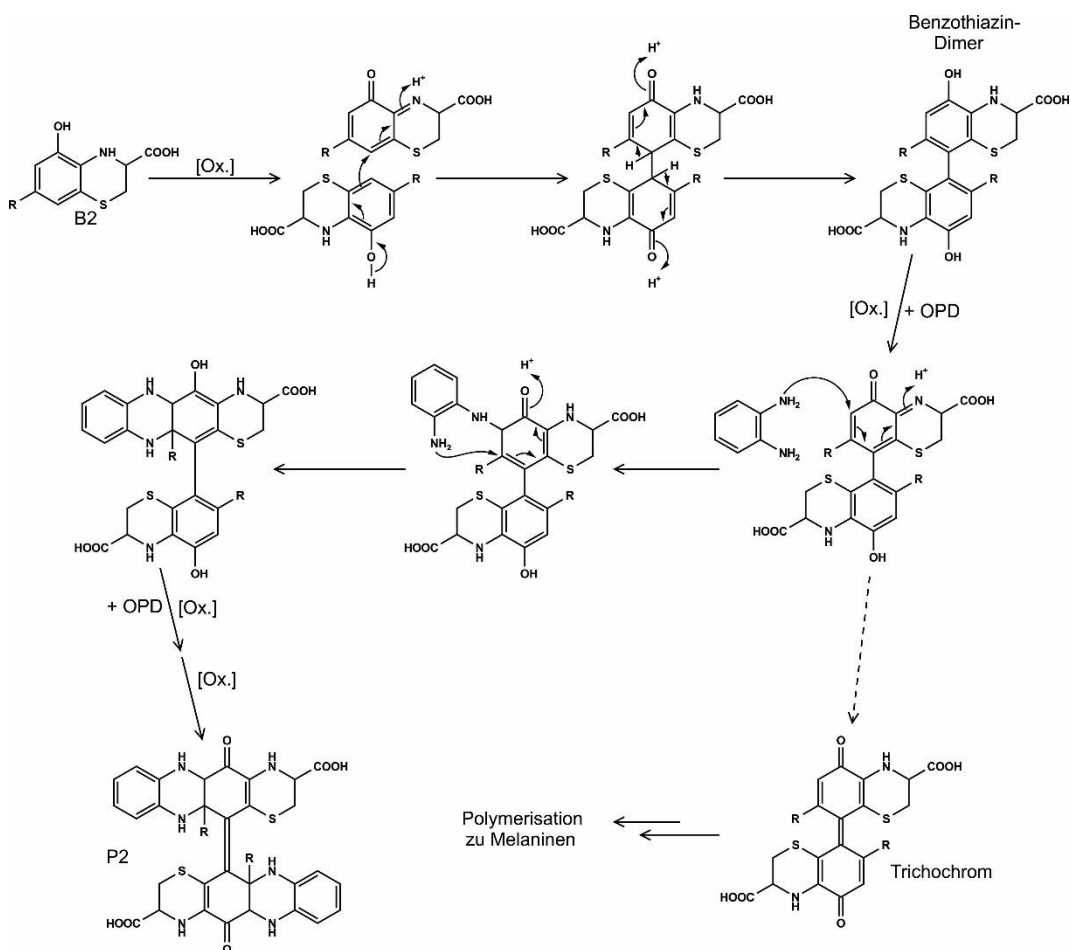


Abb. 39: Oxidative Dimerisierung von B2 und Derivatisierung mit OPD

Im Allgemeinen erfolgt die Derivatisierung mit OPD von α -Dicarbonylen zu den jeweiligen Chinoxalin- und von *o*-Chinonen zu den entsprechenden Phenazin-Derivaten. Jedoch muss die Reaktion von OPD mit *o*-Chinonen kritisch betrachtet werden, da es sich bei den *o*-Chinonen ebenfalls um sehr redoxaktive Strukturen handelt und nur in speziellen

Fällen eine Derivatisierung erfolgt.^{175,217,218,220} So führten beispielsweise Stabilisierungsversuche des Kaffeesäure-Chinons zu einem Phenazin-Derivat von Rizzi et al. lediglich zur Bildung eines Diiminotetrahydrophenazin-Derivates.⁷⁰ In den hier durchgeführten Untersuchungen erlaubte die Konstitution des oxidierten Dimers den nucleophilen Angriff von OPD, verhinderte aber die Rearomatisierung zum Chinoxalin. Die sterische Hinderung von B1 an diesen Punkten vermag zu erklären, warum keine Derivatisierung dieser Struktur durch OPD stattfand. Durch die Blockade der Angriffspunkte konnte ein alternativer Derivatisierungsmechanismus für OPD formuliert und ein farbiges Intermediat in der oxidativen Reaktionsabfolge der Dihydrobenzothiazincarbonsäuren isoliert werden. Die oxidative Kupplung ist ein etablierter Reaktionsweg in der Reaktionskaskade der enzymatischen Bräunung. Die Aufklärung diskreter Strukturen ist auf einige pflanzliche Lebensmittel wie Tee, Rooibostee oder Apfel beschränkt. Hier konnten aus den zugrundeliegenden CA- bzw. Dihydrochalkon-Derivaten die resultierenden Theaflavin- bzw. Dibenzofuran-Derivate als reaktive, farbige Intermediate strukturell aufgeklärt werden.^{157,165,175,180,181} In Bezug auf die Bildung farbiger Produkte in Folge einer kovalenten Interaktion zwischen phenolischen Verbindungen und Aminosäuren liefert die Literatur allein mit der beschriebenen Melanogenese und Benzacridin-Bildung konkrete Strukturen.^{45,117,144} Im Verlauf der Phäomelanogenese werden die DHBTC-Derivate als letzte isolierbare Intermediate betrachtet, die anschließend vielfältige Folgereaktionen wie Decarboxylierung, Ringverkleinerung zu Thiazol-Derivaten und Polymerisierungsreaktionen eingehen können, wobei die Dimerisierung durch oxidative Kupplung ein geläufiges Reaktionsmuster im oxidativen Abbauprozess der DHBT-Strukturen ist.^{100,117,120} Napolitano et al. gelang bereits die Isolierung und Strukturaufklärung verschiedener C-C- und C-O-verknüpfter Oligomere.¹²⁰ Die dabei durchgeführte Reduktion mittels NaBH₄ stellt eine alternative Derivatisierungsmethode dar und wäre damit auch für die in dieser Arbeit dargestellten Inkubationssysteme denkbar. Auch die Dimerisierung über einen Cycloadditions-Mechanismus mit anschließender Ringöffnung unter sauren Bedingungen, die zur Bildung Trichochrom-ähnlicher Strukturen führt, wie sie Constantini et al. beschrieben haben, scheinen ebenfalls möglich.¹²⁷ Die pH-Abhängigkeit der Inkubationsfarbe und die Entstehung farbiger Verbindungen unter den chromatographischen Hügeln deuten auf weitere farbige Intermediate in der Reaktionskaskade hin. Denkbare Strukturen wären eben solche Trichochrom-ähnlichen Verbindungen, die ebenfalls eine pH-abhängige Farbigkeit aufweisen.

Für die in dieser Arbeit beschriebenen DHBTC-Abgeleitete konnten die Decarboxylierung und nach der Derivatisierung die Dimerisierung strukturell nachgewiesen werden. Der Nachweis des noch nicht oder nicht vollständig derivatisierten Dimerisierungsprodukts wäre der abschließende Beweis gewesen, dass die Dimerisierung vor der Derivatisierung erfolgt, jedoch war dies nicht möglich. Weiterhin konnten in den gesamten Inkubationen keine Addukte aus OPD und den DHBTC-Monomeren als Intermediate nachgewiesen werden. Zudem bestärkt die anscheinend nicht erfolgte Derivatisierung von B1 diese These. Eine hypothetische Dimerisierung von B1 würde zu einer sehr starken sterischen Hinderung der darauffolgenden nucleophilen Angriffe des OPDs führen. Um diese These abschließend zu beweisen, wären weitere Untersuchungen der Inkubationen zu potentiellen Intermediaten wie den Thiazin-OPD-Monomeren oder dem noch nicht vollständig derivatisierten Dimer mit OPD beispielsweise mittels LC-MS notwendig.

Das vorliegende auf NashiPPO/O₂ und CA basierende Inkubationssystem ist mit dem von Richard et al. eingesetzten Inkubationssystem basierend auf der Apfel-PPO in Bezug auf Reaktionsverlauf und -produkte vergleichbar.^{208,209} Die Systeme, die vorwiegend zur Untersuchung der Phäomelanogenese eingesetzt werden, sind auf Tyrosinase/O₂ oder Peroxidase/H₂O₂ basierende Systeme. Dabei wird das Peroxidase/H₂O₂-System als das bedeutende Enzymsystem bezüglich der Melanogenese angesehen, da Cystein-substituierte Polyphenole nicht durch die PPOs als Substrat erkannt werden. Somit ist ein zusätzlicher Redoxcyclus, dessen Rolle Nashi-PPO/CA in den vorgestellten Untersuchungen übernehmen, notwendig. Solche Systeme besitzen in pflanzlichen Lebensmitteln jedoch keine große Relevanz, was die grundlegende Anwendbarkeit und Bedeutung der in dieser Arbeit vorgestellten Systeme unterstreicht. Um die Modellsysteme auf andere pflanzliche Lebensmittel anwenden zu können, lassen sich die Systeme bezüglich der jeweiligen PPOs und eingesetzten Substrate modifizieren und ein abschließender Schritt wäre die Anwendung der Modellsysteme auf reale Lebensmittel. Die Anwendung von Thiolverbindungen wie Glutathion und Cystein als Reagenzien zur Inhibierung der enzymatischen Bräunungsreaktion beruht hauptsächlich auf der Bildung farbloser Addukte, die kein Substrat für die PPO darstellen. Jedoch zeigen die Ergebnisse von Richard et al. und der vorliegenden Arbeit, dass dies in Abhängigkeit zur Cysteinkonzentration und damit zur Konzentration möglicher Redoxcyclus zu betrachten ist, da es in letzter Konsequenz trotzdem zu einer unerwünschten Farbbildung kommen kann.²⁰⁹

4.2 Untersuchungen zum oxidativen Abbau von Aspalathin im Rooibostee zu Dihydrokaffeensäure

Aus dem allgemeinen Reaktionsverlauf der enzymatischen Bräunung und den bereits vorgestellten Reaktionsmechanismen ist ersichtlich, dass die Bildung von *o*-Chinonen die zentrale Rolle spielt. So drehen sich auch die bereits bekannten Abbaumechanismen von Aspalathin, der Hauptphenolstruktur des Rooibostees, um die Bildung des *o*-Chinons als zentrales Intermediat und führen zu den bereits bekannten Strukturen Orientin, Isoorientin, diversen Dimerisierungsprodukten und farbigen Dibenzofuran-Strukturen. (Abb. 23)

Um das Spektrum der Aspalathin-basierten Abbauprodukte zu erweitern und genauere Einblicke in die Abbaumechanismen zu erlangen, wurde der Abbau des Aspalathins unter aeroben und anaeroben Bedingungen und in der Anwesenheit von Lysin als zusätzlichen nucleophilen Reaktionspartner untersucht. Eine detaillierte Beschreibung des experimentellen Aufbaus sowie die Diskussion der Ergebnisse kann der Veröffentlichung „Oxidative Fragmentation of Aspalathin Leads to the Formation of Dihydrocaffeic Acid and the Related Lysine Amide Adduct“ (Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68, 13111-13120) entnommen werden. Die Inkubation unter oxidativen Bedingungen führte zur Bildung von Dihydrokaffeensäure (DHC), deren Bildung mittels eines authentischen Referenz-Standards über HPLC-DAD und GC-MS nach erfolgter Silylierung verifiziert wurde (Abb. 40).

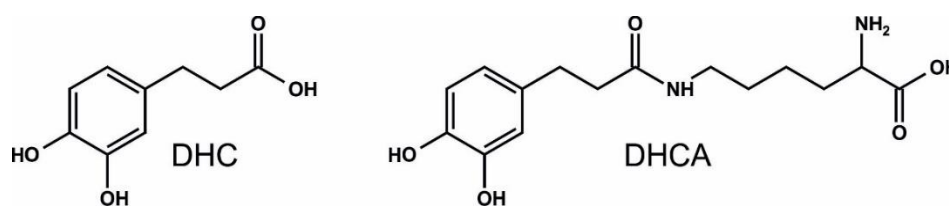


Abb. 40: Dihydrokaffeensäure (DHC) und das Lysin-Amid (DHCA)

Die aeroben Inkubationen zeigten einen unmittelbar einsetzenden Abbau von Aspalathin und die bereits bekannte Farbbildung (Abb. 41). Der Aspalathin-Abbau wurde durch die sofortige Bildung von DHC begleitet und erreichte nach vier Tagen ein Maximum von 8 mol-%. Diese Struktur ist aufgrund der zugrunde liegenden leicht oxidierbaren *o*-Hydrochinon-Struktur nicht stabil unter den herrschenden oxidativen Bedingungen, sodass die Konzentration an DHC im weiteren Verlauf der aeroben Inkubation abnahm. Die anaeroben Inkubationen zeigten weder eine Farbbildung noch die Bildung von DHC, wodurch die Bildung von DHC im Zusammenhang mit dem oxidativen Abbau von Aspalathin steht. Die Bildung von DHC wurde bereits von Muller et al. als mögliches

Fragmentierungsprodukt des Aspalathins vorgeschlagen.²²¹ Zudem zeigten anaerobe Inkubationen von Isoorientin mit menschlichen Darmbakterien die Bildung eines Intermediates aus der Hydrierung der 2,3-Doppelbindung und Spaltung der C-glycosidischen Bindung des gebildeten Eriodyctiols, welches über Ringspaltung zu DHC und Phloroglucinol führt.²²² Jedoch konnte kein schlüssiger Bildungsmechanismus für die Bildung von DHC unter aeroben Bedingungen aufgezeigt werden (Abb. 42, A).

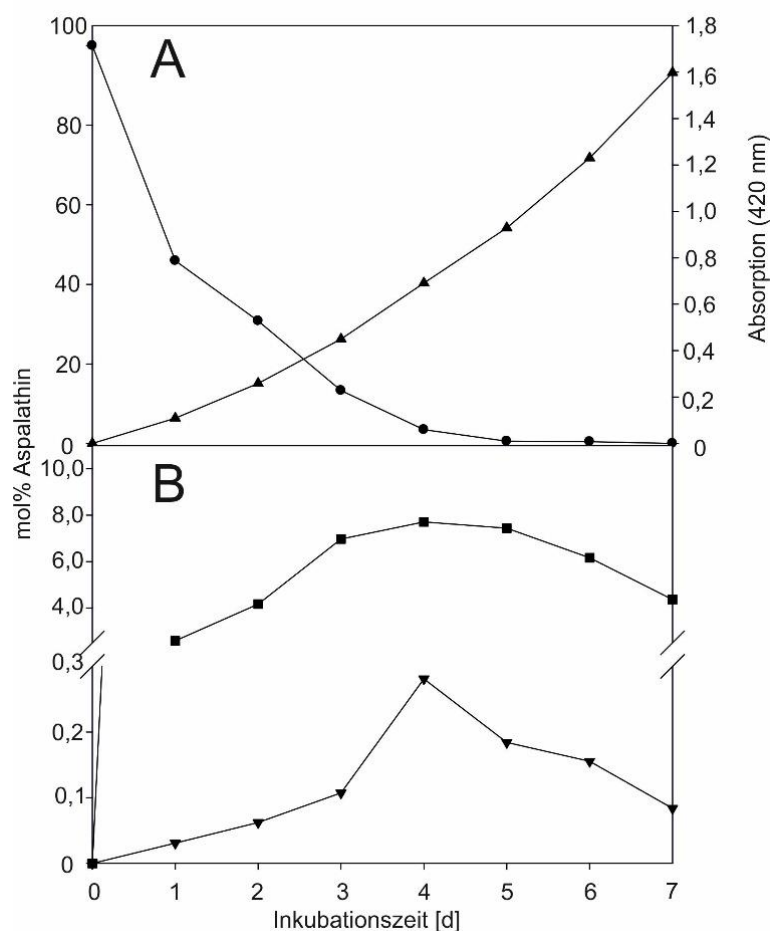


Abb. 41: Umsatz von Aspalathin in Anwesenheit von Lysin: Aspalathin (●), Gesamtabsorption der Inkubation bei $\lambda = 420$ nm (▲), DHC (■), und DHCA (▼)

Der über die Entstehung des *o*-Chinons vermittelte Bildungsweg, wie er bereits für die bekannten Reaktionsprodukte von Aspalathin beschrieben wurde, konnte dahingehend ausgeschlossen werden, da dieser Reaktionspfad zu Kaffeesäure führen würde, welche in keiner Inkubation detektiert wurde (Abb. 42, B). Zudem konnte das von Muller et al. postulierte Gegenstück der Spaltung, Phloroglucinol, in keiner Inkubation nachgewiesen werden. Auch andere bekannte Reaktionspfade phenolischer Verbindungen, wie die von Anthocyanen bekannte hydrolytische β -Dicarbonylspaltung der nach erfolgter

hydrolytischer Ring-Öffnung entstandenen Dicarbonyl-Struktur (Abb. 42, C)²²³ und die durch die Oxidation von Dihydrochalkonen eingeleitete Retro-Aldol-Spaltung (Abb. 42, D),²²⁴ konnten nicht für die Bildung von DHC in Betracht gezogen werden.

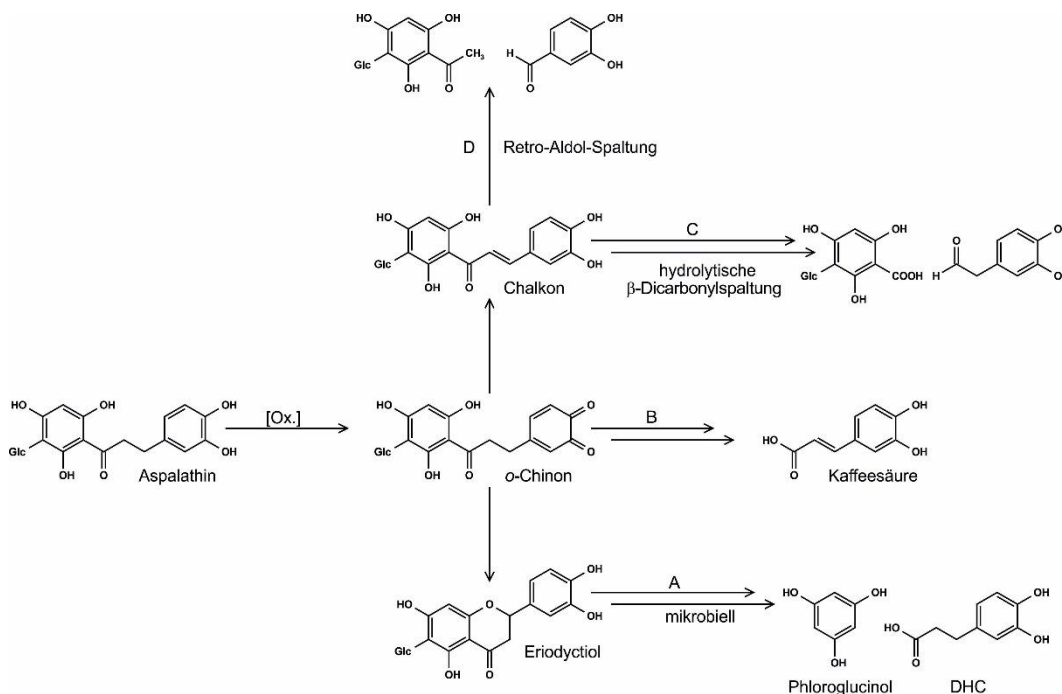


Abb. 42: Postulierte Abbauwege des Aspalathins

Die Bildung reaktiver Carbonyl-Strukturen ist sowohl in der Polyphenol-Chemie als auch in der Kohlenhydrat-Chemie im Zuge der Maillard-Reaktion ein bekanntes Reaktionsmotiv. Die quantitativ bedeutendsten Fragmentierungsmechanismen umfassen hier die hydrolytische β -Dicarbonyl-Spaltung und die oxidative α -Dicarbonyl-Spaltung.^{225,226} Beide Reaktionspfade führen über die Spaltung der C-C- α -Bindung zur Bildung von Carbonsäuren durch einen nucleophilen Angriff. Jedoch stützt sich die β -Dicarbonyl-Spaltung nicht auf die zwingend erforderlichen oxidativen Bedingungen, wie sie die Inkubationen aufzeigen, sodass dieser Weg ausgeschlossen wurde. Die oxidative α -Dicarbonyl-Spaltung beruht auf der Einbindung molekularen Sauerstoffs in die Molekülstruktur als Schlüsselreaktion durch die Aktivierung des Sauerstoffs durch beispielsweise photooxidative Prozesse oder durch Hydroperoxid-Strukturen.²²⁷ Smuda et al. zeigten im Zuge der Aufklärung der Abbauwege der Ascorbinsäure, dass diese Dicarbonyl-Spaltung mit einer Amin-induzierten Nebenreaktion einhergeht, die zu den entsprechenden Carbonsäureamiden führt.²²⁶

Um diesen Reaktionspfad zu unterlegen, wurde das entsprechende DHC-Lysin-Amid (DHCA) synthetisiert (Abb. 40). Die Modellinkubationen zeigten auch hier die strikte Abhängigkeit von oxidativen Bedingungen. In den aeroben Inkubationen aus Aspalathin

und Lysin entstand DHCA im Vergleich zu DHC in ungefähr 30-fach niedrigerem Ausmaß. Der Gehalt erreichte ein Maximum nach 4 Tagen Inkubationsdauer von 0,3 mol-%. Unter anaeroben Bedingungen konnte ebenfalls analog zu DHC kein DHCA detektiert werden.

Um die bereits dargestellte Oxidation des B-Rings des Aspalathins in der vorliegenden Spaltung auszuschließen, wurden Modellinkubationen mit den Dihydrochalkonen Phloridzin, einem *O*-Glycosid, und Phloretin, dem entsprechenden Aglykon, unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Wie bereits erwähnt sind diese Polyphenole bekannte Schlüsselintermediate in der enzymatischen Bräunungsreaktion in Apfel-Varietäten. Ähnlich dem Rooibostee führen diese zu farbigen Dibenzofuran-Strukturen. Im Gegensatz zum Aspalathin besitzen die phenolischen Strukturen einen monophenolischen B-Ring, sodass die oxidative Reaktionskaskade ausschließlich durch die Cresolase-Aktivität der Apfel-PPO initiiert werden kann. Da dies unter den in der vorliegenden Arbeit vorherrschenden Reaktionsbedingungen nicht der Fall war, wurde auch nicht die entsprechende Dihydrocumarsäure gebildet. (Abb. 43)

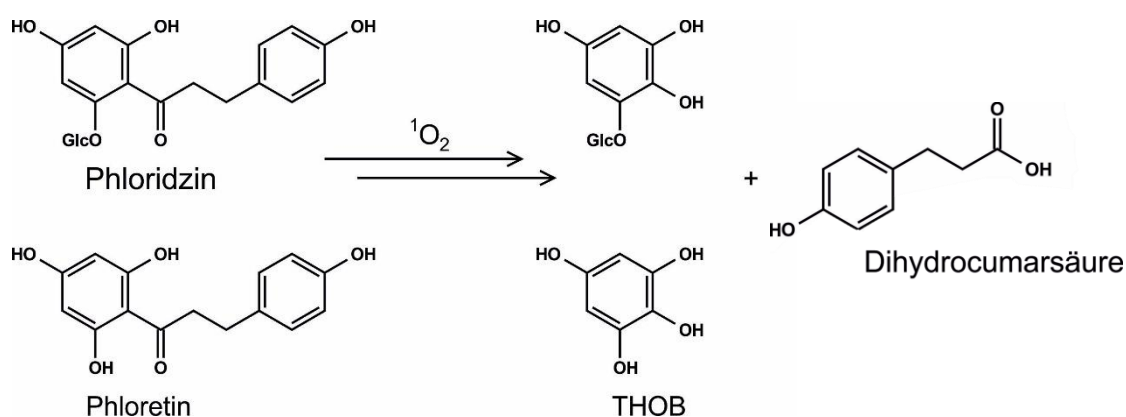


Abb. 43: $^1\text{O}_2$ -initiiertes Abbau von Phloridzin und Phloretin

Da die α -Dicarbonyl-Spaltung aktivierten Sauerstoff benötigt, wurden im nächsten Schritt Inkubationen der phenolischen Strukturen in Gegenwart von Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$), der über die Molybdät-katalysierte Disproportionierung von Wasserstoffperoxid generiert wurde, durchgeführt.²²⁸ Die Einführung von $^1\text{O}_2$ in das Inkubationssystem sorgte sowohl bei Aspalathin als auch bei Phloridzin und Phloretin für einen Anstieg der entsprechenden Phenolsäure. Bei den Apfel-Polyphenolen zeigte sich ein deutlicher Anstieg auf bis zu 25 mol-% bei einem 500-fachen Überschuss an $^1\text{O}_2$. Diese durch $^1\text{O}_2$ getriggerte Reaktion führte zu dem vorliegenden Reaktionsmechanismus (Abb. 44).

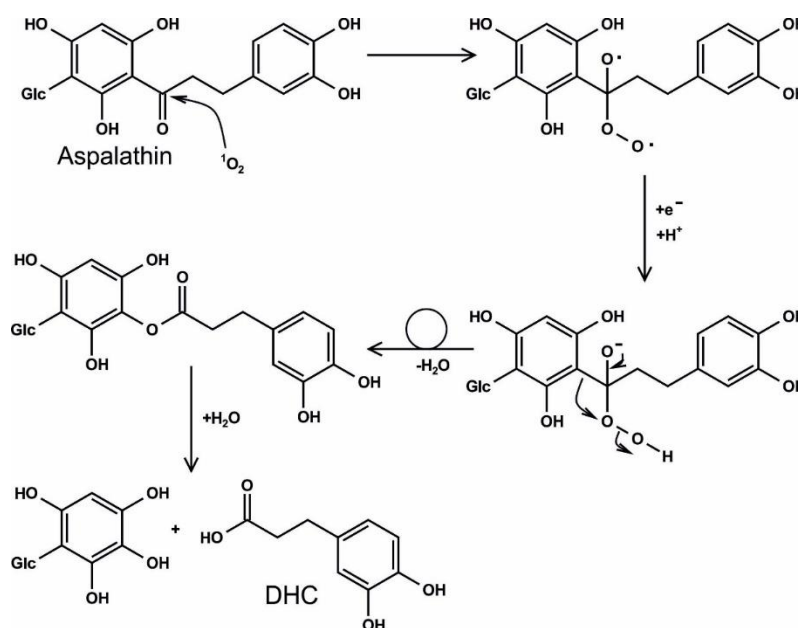


Abb. 44: Reaktionsmechanismus zur oxidativen Spaltung von Aspalathin

Im Initialschritt greift $^1\text{O}_2$ die Carbonyl-Gruppe des Dihydrochalkons an und führt zu einem Biradikal-Intermediat mit Alkoxy-Radikal-Funktion. Das nach zwei Ein-Elektronen-Transfers gebildete Hydroperoxid-Anion lagert sich in einer anschließenden *Baeyer-Villiger*-analogen Reaktion zu einem Carbonsäureester um. Dieser Umlagerungsschritt hängt maßgeblich von der Elektronendichte der sich umlagernden Gruppe ab, wobei elektronenreiche Substituenten wie der elektronenreiche A-Ring der vorliegenden Polyphenole bevorzugt werden.²²⁹ Der gebildete Carbonsäureester kann nun sowohl von Wasser als auch einer Amin-Komponente nucleophil angegriffen werden und führt im Falle von Aspalathin jeweils zu DHC und DHCA. Als Gegenstück dieser Esterspaltung entsteht das entsprechende Tetrahydroxybenzol-Derivat. Der Beweis des vorgestellten Reaktionsmechanismus erfolgte über Phloretin als Modellpolyphenol, da es zum einen zu einem sehr hohen Fragmentierungsumsatz von bis 22 mol-% bei einem 500-fachen Überschuss von $^1\text{O}_2$ kommt. Zum anderen ist das vermeintliche Fragmentierungsgegenstück, das 1,2,3,5-Tetrahydroxybenzol (THOB), synthetisch leichter zugänglich als die C- und O-glycosidischen Gegenstücke von Aspalathin und Phloridzin.²³⁰ Die starke Polarität schloss eine Detektion der nativen Struktur mittels Flüssig- und Gaschromatographie aus, sodass die Detektion mittels GC-MS² nach vorheriger Silylierung erfolgte. Die vermeintlich starke oxidative Instabilität dieser elektronenreichen Verbindung wurde in Modellinkubationen des THOB mit $^1\text{O}_2$ überprüft. Die Struktur konnte unter den starken oxidativen Bedingungen der Inkubationen mit einem 50- und 500-fachen Überschuss an $^1\text{O}_2$ nicht nachgewiesen werden, während in Inkubationen mit einem 5- und 25-fachen Überschuss an $^1\text{O}_2$ 35% des THOBs

wiedergefunden wurden. THOB konnte als abschließender Beweis des Fragmentierungsmechanismus in Phloretin-Inkubationen mit einem 25-fachen Überschuss an $^1\text{O}_2$ in Spuren Mengen über ein kollisionsinduziertes Dissoziations (CID)-Experiment über den Spektren-Vergleich der authentischen Referenzsubstanz bestätigt werden. Die bereits erwähnte oxidative Instabilität der Verbindung verhinderte jedoch die Quantifizierung des Fragmentierungsproduktes.

Die strenge Abhängigkeit der Fragmentierungsreaktion von $^1\text{O}_2$ deutet darauf hin, dass Aspalathin im Gegensatz zu Phloridzin oder Phloretin in der Lage ist, $^1\text{O}_2$ intrinsisch zu generieren. Aerobe Inkubationen von Aspalathin ohne externe Zugabe von $^1\text{O}_2$ führten bereits zur Bildung von 1 mol-% DHC. Mit Erhöhung der $^1\text{O}_2$ -Konzentration ging zunächst eine vergleichsweise geringe Zunahme der DHC-Konzentration einher. Die Redoxaktivität des B-Rings und die Verstärkung des oxidativen Milieus durch externe Erhöhung der $^1\text{O}_2$ -Konzentration leiten augenscheinlich zunächst die bereits diskutierten oxidativen Abbaumechanismen über das *o*-Chinon ein. Die Generierung von $^1\text{O}_2$ durch Polyphenole ist ein vielfach diskutiertes Thema in der Literatur. Tatsächlich bildet die Redoxaktivität der Catechol-Funktion die Grundlage für die Generierung von ROS, wie das Peroxidation-Radikal und Wasserstoffperoxid.²³¹ Der vorgestellte Mechanismus vermag somit als Grundlage für weitere Untersuchungen dienen, um die Bildung von ROS durch Polyphenole zu diskutieren.

Um diesen neuen Abbaumechanismus des Aspalathins und die Bildung von DHC und DHCA in die Realität zu übertragen und die tatsächliche Relevanz zu überprüfen, wurden kommerzielle unfermentierte und fermentierte Rooibostee-Proben untersucht. In Übereinstimmung mit dem vorliegenden oxidativen Abbaumechanismus zeigten die fermentierten Rooibostees deutliche höhere Gehalte an DHC (maximale Gehalte: 0,7 $\mu\text{mol DHC/g}$, 127 $\mu\text{g DHC/g}$) und DHCA (maximale Gehalte: 0,25 nmol DHCA/g , 108,5 ng DHCA/g), wobei die Unterschiede an DHC signifikant ($p < 0,01$) waren (Abb. 45). Bei den Gehalten an DHCA war jedoch ein deutlicher Trend zwischen den unfermentierten und fermentierten Teeproben zu beobachten.

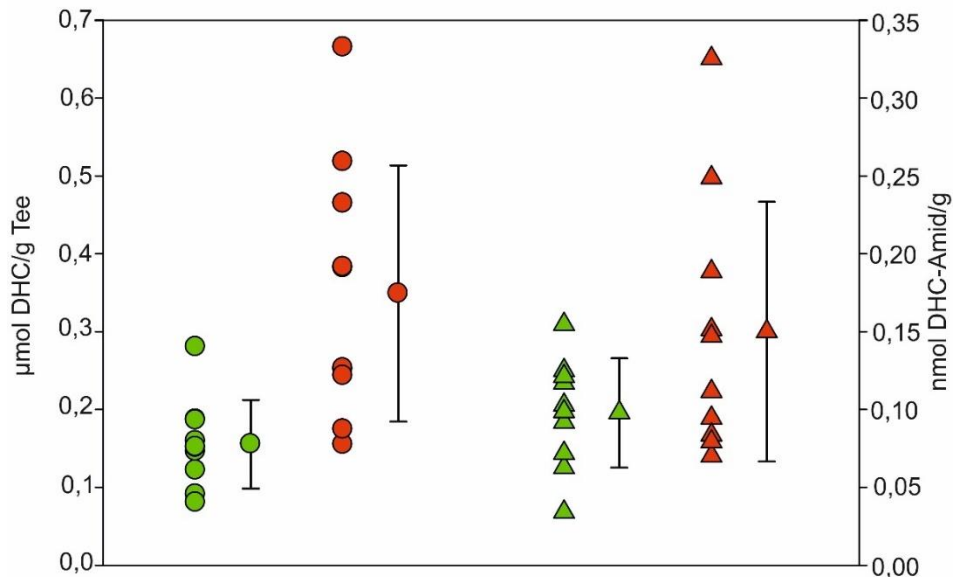


Abb. 45: Gehalt an DHC in unfermentierten (●) und fermentierten (●) Rooibostee und DHCA in unfermentierten (▲) und fermentierten (▲) Rooibostee

Wie zu erwarten unterstützen die oxidativen Bedingungen während der Fermentation des Tees den Abbaumechanismus. Während des Fermentationsprozesses sind noch zahlreiche Nebenreaktionen zu beachten, die auf die Zerstörung der internen Zellstruktur und damit auf die Freisetzung von Enzymen wie PPO oder Proteasen und weiterer Reaktionspartner wie Aminosäuren oder Proteinen zurückzuführen sind. Wie bereits erwähnt, ist dabei die Interaktion von Polyphenolen und Proteinen von besonderem Interesse und die Bildung des in dieser Arbeit vorgestellten DHCA scheint ein Folgeprodukt aus dem Zusammenspiel aus der oxidativen Interaktion von Aspalathin mit Proteinen und entsprechenden Proteasen zu sein. Um diese mögliche Interaktion von Protein und Polyphenol zu verifizieren, wurden Modellinkubation von Aspalathin und BSA bei pH 7 und 37°C unter aeroben Bedingungen mit anschließender enzymatischer Hydrolyse durchgeführt. Die über ein weiteres CID-Experiment erhaltenen Massenspektren zeigten das gleiche Fragmentierungsmuster und lieferten damit den eindeutigen Beweis der kovalenten Interaktion zwischen dem Protein und DHC. Dies stellt in diesem Zusammenhang den erstmaligen strukturellen Nachweis einer kovalenten Protein-Polyphenol-Modifizierung unter sehr milden Bedingungen dar.

Der in dieser Arbeit vorgestellte Abbaumechanismus von Aspalathin bietet neue Ansatzpunkte sowohl für die oxidativen Abbauprozesse von Polyphenolen als auch für die Untersuchung der kovalenten Interaktionen dieser mit Proteinen. Diese Untersuchungen können auf andere Polyphenole, die eine dem Aspalathin ähnliche Struktur aufweisen,

ausgeweitet werden und die entsprechenden Phenolsäuren als Markerstrukturen des oxidativen Abbaus herangezogen werden. Solche Strukturen könnten Flavonole (Quercetin) und Flavone (Hesperitin, Eriodictyol, Naringenin) sein (Abb. 46). Wiederum könnte Aspalathin mit dem resultierenden DHC als Markerstruktur für die Generierung von ROS fungieren.

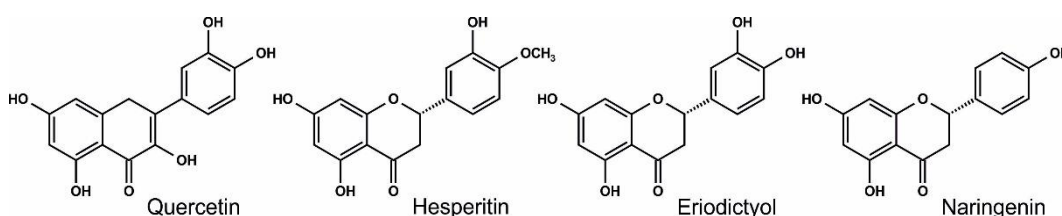


Abb. 46: Mögliche Abbaubsubstrate

Die Untersuchung der Proteinmodifizierung beschränkte sich in dieser Untersuchung auf Lysin. Jedoch ist eine Modifizierung durch andere nucleophile Aminosäuren wie Cystein, Tryptophan oder Arginin denkbar. In der Literatur wird bei der Untersuchung von kovalenten Polyphenol-Protein-Modifizierungen häufig auf die bereits erwähnten indirekten Analysemethoden zurückgegriffen. Mittels SDS-PAGE und NBT-Färbung konnten in jüngsten Untersuchungen Polyphenol-Protein-Addukte in ultrahoherhitzter Milch nach Zugabe von Epigallocatechingallat-angereichertem Grünen-Tee-Extrakt⁹⁹ und in gelagertem Honig⁷⁵ nachgewiesen werden. Kroll et al. konnten kovalente Modifizierungen der Lysin- und Tryptophan-Seitenketten mit verschiedenen phenolischen Verbindungen nach einer Oxidation unter alkalischen Bedingungen (pH = 9) nachweisen.^{232,233} Einen ähnlichen Ansatz verfolgten Rawel et al., die die kovalente Interaktion von Lysin und Tryptophan in Molkenproteinen²¹⁴ und von Cystein, Lysin und Tryptophan in Sojaprotein beschrieben.⁷⁸ Für bovines und humanes Serum Albumin konnten kovalente Modifizierungen über die Cystein-, Arginin- und Lysin-Seitenketten durch massenspektrometrische Untersuchungen nachgewiesen werden.⁶⁴ Untersuchungen der Seitenketten von Fleischproteinen führten zu Cystein-, Arginin-, Lysin- und auch Histidin-Addukten.^{84,234} Auch bei den Untersuchungen dieser Protein-Modifikationen spielt der pH-Wert eine entscheidende Rolle: Er bedingt das oxidative Milieu der Inkubationen und erhöht das Reaktionsvermögen der nucleophilen Seitenketten. In einer Untersuchung von Jongberg et al. konnte ein Cystein-Chinon-Addukt nach chemischer Oxidation über Fe(II)/H₂O₂ oder Periodat bei pH = 5,8 in Inkubationen von Glutathion, BSA oder Fleischprotein-Isolaten über UV-Spektren und LC-MS-Analysen nach saurer Hydrolyse und Aufreinigung über eine RP-C18-Säule nachgewiesen werden.⁵⁶

Die hier aus der Literatur diskutierten Beispiele bieten vielfältige Ansätze der Untersuchung solcher Proteinmodifikationen, stoßen aber aufgrund der Komplexität der Reaktionspartner und hinsichtlich des Milieus und der oxidativen Bedingungen auf verschiedene Grenzen. Die bereits besprochene Oxidation auf Grundlage eines basischen Milieus ist zwar eine effektive Möglichkeit der Generierung kovalenter Modifikationen hinsichtlich der Polyphenoloxidation und der Reaktivität besonders im Blick auf die nucleophilen Aminosäuren Lysin und Arginin, beschreibt aber ein relativ realitätsfremdes Umfeld im Vergleich zu Lebensmitteln. Dadurch gewinnt der in dieser Arbeit vorgestellte Ansatz an Bedeutung. Die Bildung kovalenter Polyphenol-Aminosäure- bzw. -Protein-Addukte zeichnet sich neben einer bereits erwähnten technologischen Relevanz auch durch eine sensorische Relevanz aus. Dihydrochalkone wie Aspalathin werden zum einen als Süßstoffe eingesetzt, zum anderen wird Aspalathin in der Literatur ein bitterer Geschmack mit süßlichen Noten zugeordnet.²³⁵ Amiden wird generell ein bitterer Geschmack zugeschrieben. Der oxidative Abbau von Aspalathin und die gleichzeitige Bildung des Amids könnten damit einen Einfluss auf die Sensorik des Tees nehmen und bieten damit einen weiteren Ansatzpunkt für zukünftige Untersuchungen. Die Etablierung der in dieser Arbeit vorgestellten enzymatischen und nicht-enzymatischen Oxidationssysteme auf andere Polyphenole, Aminosäuren und Proteine kann damit als Grundlage für die entsprechenden pflanzlichen Lebensmittel angewendet werden.


5 Publikationen

5.1 Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67, 1719 – 1725

Influence of Nucleophilic Amino Acids on Enzymatic Browning Systems

Nils Mertens,¹⁰ Franziska Mai, and Marcus A. Glomb*¹⁰

Institute of Chemistry, Food Chemistry, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Kurt-Mothes-Strasse 2, 06120 Halle/Saale, Germany

 Supporting Information

ABSTRACT: In the present study the enzymatic oxidation of gallic acid and catechin catalyzed by nashi pear polyphenol oxidase (PPO) in the presence of the amino acids lysine, arginine, or cysteine was investigated for polyphenol–amino acid adducts. HPLC analyses revealed the formation of two novel dihydrobenzothiazine carboxylic acid derivatives (8-(3',4'-dihydro-2H-chromene-3',5',7'-triole)-3,4-dihydro-5-hydroxy-2H-benzothiazine-3-carboxylic acid and 7-(3',4'-dihydro-2H-chromene-3',5',7'-triole)-3,4-dihydro-5-hydroxy-2H-benzothiazine-3-carboxylic acid) from 2'-cysteinyl catechin and 5'-cysteinyl catechin in cysteine incubations, respectively. In contrast, arginine and lysine did not lead to any amino acid adducts. Target compounds were separated by high-performance countercurrent chromatography and preparative HPLC and unequivocally characterized by mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. Mechanistic incubations starting from the catechin–cysteine adducts showed that both catechin and PPO are crucial components in the formation of the dihydrobenzothiazines. The cysteine incubations showed a red-brown coloration, which coincided with formation and degradation of the dihydrobenzothiazines finally leading to the formation of high-polymeric melanins. Therefore, these compounds might be the key intermediates to understand development of color during cysteine-driven enzymatic browning reactions.

KEYWORDS: enzymatic browning, polyphenol–amino acid adducts, high-performance countercurrent chromatography, color-dilution analysis, dihydrobenzothiazine

■ INTRODUCTION

Texture and appearance are the two crucial attributes determining the quality and the acceptance of fruits and vegetables for consumers. During postharvest handling, processing or storage tissue damage leads to discoloration and texture changes in plant based foods. This is commonly referred to as the enzymatic browning reaction.¹ Enzymatic browning is a complex process where enzymatic and non-enzymatic reactions intertwine. During these reactions phenolic compounds are oxidized by polyphenol oxidases (PPOs) to highly reactive electrophilic *o*-quinones, which subsequently react non-enzymatically with different nucleophiles such as other polyphenols or, supposingly, the nucleophilic side chains of proteins or amino acids. The formation of polyphenol–amino acid adducts is thought to affect the color and aroma of foods.²

Spectrophotometric investigations of different enzymatically oxidized phenolic compounds by Mason and Peterson implied that the formed *o*-quinones might react with thiol-, N-terminal and aliphatic amino groups of amino acids, whereas amide, guanidine, and seryl hydroxyl groups showed no reactions.³ The oxidation of caffeic acid and chlorogenic acid in the presence of different amino acids carried out by Pierpoint led to the formation of colored products. These studies indicated that the primary reactions between amino acids and *o*-quinones involve the thiol group of cysteine, the ϵ -amino group of lysine, and the α -amino groups of other amino acids. However, the experimental approach was only manometrical and spectrophotometrical, and no reaction products were structurally characterized.⁴ Mass spectrometric studies on the

enzymatic oxidation of chlorogenic acid in the presence of *N*_ε-(*tert*-butyloxycarbonyl)lysine and *N*-acetylcysteine showed covalent interactions between the oxidized phenolic compound and the two amino acid derivatives, though, again, no specific structures were isolated or elucidated.⁵ Investigations and structural analyses by Yabuta et al. on the greening reaction of caffeic esters with primary amino acids gave additional evidence for the formation of a highly reactive benzoacridine derivative.⁶ Thiol compounds such as cysteine are known to inhibit enzymatic browning reactions by inhibiting PPOs or by forming colorless adducts with several phenolic substrates such as catechol,⁷ caffeic acid,⁸ and chlorogenic acid and catechin.^{2,9–11} Reactions of lysine and tryptophan side chains of myoglobin with different phenolic compounds were also discussed.^{12–14} Under oxidative conditions heated solutions of catechin with glycine resulted in the formation of various adducts, which were tentatively characterized by mass spectrometry.¹⁵ Thus, the specific interaction between *o*-quinones and amino acids during enzymatic browning with respect to discrete structures of resulting polyphenol–amino acid adducts, the underlying mechanisms, and the impact on formation of colored compounds remains barely investigated.

Therefore, the aim of the present study was to mechanistically reinvestigate polyphenol–amino acid reactions based on a model system for enzymatic browning reactions

Received: November 21, 2018

Revised: January 11, 2019

Accepted: January 14, 2019

Published: January 31, 2019

using nashi pear homogenate as PPO source and gallic acid and catechin as substrates in the presence of amino acids. We were able to verify two novel dihydrobenzothiazine derivatives from isolated 2'-cysteinyl catechin and 5'-cysteinyl catechin. Their importance as key intermediates in cysteine-driven enzymatic browning reactions was established by color-dilution analysis.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. All chemicals of the highest quality available were provided by Sigma-Aldrich (Munich/Steinheim, Germany), Fluka (Taufkirchen, Germany), Merck (Darmstadt, Germany), VWR Chemicals (Darmstadt, Germany), ACROS Organics (Geel, Belgium), and ARMAR Chemicals (Leipzig, Germany) unless otherwise indicated. For all experiments ultrapure water was used.

Purpurogallin-4-carboxylic acid (PGA) and theaflavic acid (TA) were isolated from incubations of gallic acid (GA) and (+)-catechin (CA) and nashi pear polyphenol oxidase (nashi-PPO) using high-performance countercurrent chromatography (HPCCC) and preparative HPLC. Verification of the isolated material was carried out by NMR spectroscopy and was in line with the literature;^{17,18} high-resolution mass determination (HR-MS): PGA, m/z 263.0196 (found), m/z 263.0192 (calcd for $C_{12}H_7O_7 [M - H]^-$); TA, m/z 427.0666 (found), m/z 427.0665 (calcd for $C_{21}H_{15}O_{10} [M - H]^-$).

2'-Cysteinyl catechin (A1), 5'-cysteinyl catechin (A2), 8-(3,4-dihydro-2H-chromene-3,5,7-triol)-3,4-dihydro-5-hydroxy-2H-benzothiazine-3-carboxylic acid (B1), and 7-(3,4-dihydro-2H-chromene-3,5,7-triol)-3,4-dihydro-5-hydroxy-2H-benzothiazine-3-carboxylic acid (B2) were isolated from incubations of nashi-PPO, catechin, and cysteine using HPCCC and preparative HPLC. Verification was carried out by NMR spectroscopy, and data of A1 and A2 were in line with literature;⁹ HR-MS: A1, m/z 408.0753 (found), m/z 408.0753 (calcd for $C_{18}H_{18}O_8NS [M - H]^-$); A2, m/z 408.0755 (found), m/z 408.0753 (calcd for $C_{18}H_{18}O_8NS [M - H]^-$).

Nashi Pear Homogenate (nashi-PPO). Nashi pears (*Pyrus pyrifolia*) were purchased from local markets in Germany. The fruits were peeled, and 500 g were homogenized in 500 mL of phosphate buffer (0.2 M, pH 6.5) and filtrated over a Buchner funnel. The homogenate was stored at $-20\text{ }^\circ\text{C}$. The PPO activity was assayed according to Mai and Glomb,¹⁶ however, with one unit activity defined as 0.1 absorbance unit change per minute at 420 nm, and was determined as 660 U/mg of protein.

Polyphenol–Amino Acid Model Incubation. Mixtures containing GA (0.1 mM), CA (0.1 mM) in nashi-PPO, and either in the presence of one amino acid (0.1 mM; lysine, arginine, cysteine) or no amino acid were incubated in falcon tubes at room temperature and pH 6.5. Aliquots of 1 mL were collected each hour. The enzymatic reaction was stopped by mixing the aliquots with 1 mL of stopping solution containing NaF (8 mM). Each sample was instantly stored at $-20\text{ }^\circ\text{C}$ until further analyses. For preparative isolation 10 mL aliquots were mixed with 10 mL of stopping solution after formation of color and freeze-dried.

Analytical HPLC–Diode Array Detection–Mass Spectrometry. A Jasco PU-2080 Plus quaternary gradient pump with degasser (DG-2080–54), quaternary gradient mixer (LG 2080–02), multi-wavelength detector (MD-2015 Plus) (Jasco, Gross-Umstadt, Germany), Waters 717 plus autosampler, and column oven (Techlab Jet Stream np K-3) was used. Chromatographic separations were performed on stainless steel columns (Vydac CRT, 201TPS4, 250 \times 4.6 mm, RP-18, 5 μm , Hesperia, CA, USA) using a flow rate of 1.0 mL/min. The mobile phase consisted of water (solvent A) and MeOH/water (7:3, v/v, solvent B). A 0.8 mL/L aliquot of formic acid was added to both solvents (A and B). Samples were analyzed using a gradient system: samples were injected at 10% B and held for 10 min. The gradient was changed linearly to 65% B in 55 min and to 100% B after 5 min and held at 100% B for 10 min. The column temperature was always $25\text{ }^\circ\text{C}$. The effluent was monitored at 220, 280, and 400 nm (GA, $t_R = 5$ min; CA, $t_R = 20$ min; PGA, $t_R = 49$ min; TA, $t_R = 52$ min; A1, $t_R = 12$ min; A2, $t_R = 14$ min; B1, $t_R = 32$ min; B2, $t_R = 42$

min; hump, $t_R = 68\text{--}78$ min). For qualitative peak assignment the eluent was directly coupled to the mass spectrometer. The mass analyses were performed using an Applied Biosystems API 4000 quadrupole instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). MS ionization was achieved using the turbospray ionization source operated in positive-ion mode. The settings were as follows: curtain gas (N_2) at 30 psi, ion source gas 1 at 50 psi, ion source gas 2 at 60 psi, source temperature at $550\text{ }^\circ\text{C}$, declustering potential at 40 V, entrance potential at 10 V, and ion spray voltage at 4500 V. A scan range between m/z 100 and 700 was used for the Q1 mode (PGA, m/z 265 $[M + H]^+$; TA, m/z 429 $[M + H]^+$; A1, m/z 410 $[M + H]^+$; A2, m/z 410 $[M + H]^+$; B1, m/z 392 $[M + H]^+$; B2, m/z 392 $[M + H]^+$).

For quantitation with HPLC–diode array detection (DAD) an external calibration based on standard solutions of authentic isolated references dissolved in water was used. The chromatographic hump was quantified in reference to the calibration curve of catechin.

High-Performance Countercurrent Chromatography. The HPCCC system (HPCCC Spectrum Series 20, Dynamic Extractions, Tredegar, Wales) was equipped with a Jasco PU-4180 RHPLC pump and a Jasco ultraviolet (UV) detector (UV-2075 Plus, Jasco, Gross-Umstadt, Germany) operating at 290 nm. Eluted liquids were collected in fractions of 15 mL with a fraction collector (LKB Ultrac 7000, LKB-Producter AB, Stockholm-Bromma, Sweden). Chromatograms were recorded on a plotter (Servogor 200, GMC, Nürnberg, Germany). The total volume of the coil was 140 mL. The HPCCC was run at a revolution speed of 1600 rpm and a flow rate of 6 mL/min of the upper organic phase in tail-to-head modus. Samples of 1 g of freeze-dried incubations were dissolved in a 1:1 mixture of light (organic) and heavy (aqueous) phase (6 mL) and injected via a 6 mL sample loop. Incubations were separated using ethyl acetate/water (1:1, v/v) (PGA, $t_R = 5\text{--}10$ min; TA, $t_R = 5\text{--}10$ min; CA, $t_R = 10\text{--}15$ min; GA, $t_R = 17.5\text{--}35$ min; B1, $t_R = 5\text{--}30$ min; B2, $t_R = 5\text{--}30$ min; A1 and A2 were collected from the retained stationary phase). The solvent of the collected fractions was instantly evaporated under reduced pressure at $30\text{ }^\circ\text{C}$ and freeze-dried. The dried residues were used for preparative HPLC–UV.

Preparative HPLC–UV. A Besta pump (Besta, Wilhelmsfeld, Germany) was used at a flow rate of 16 mL/min with a Knauer degasser (Knauer, Berlin, Germany) and a Jasco UV detector (UV-2075 Plus, Jasco, Gross-Umstadt, Germany) set at 280 nm. Up to 20 mg of the dried collected fractions of the HPCCC was injected. Chromatographic separations were performed on a stainless steel column (Vydac CRT, 218TP1022, 250 \times 20 mm, RP-18, 10 μm). The mobile phases used were solvents A and B identical to the HPLC–DAD system. An isocratic method was chosen according to the characteristics of the target compounds (PGA, 40% B, $t_R = 49\text{--}60$ min; TA, 40% B, $t_R = 61\text{--}85$ min; A1, 5% B, $t_R = 53\text{--}71$ min; A2, 5% B, $t_R = 72\text{--}100$ min; B1, 30% B, $t_R = 22\text{--}32$ min; B2, 30% B, $t_R = 60\text{--}86$ min). The solvents of the collected fractions were instantly removed under reduced pressure at $30\text{ }^\circ\text{C}$, freeze-dried, and stored at $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

High-Resolution Mass Determination. Negative ion high-resolution ESI mass spectra were obtained from an Orbitrap Elite mass spectrometer (ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany) equipped with an HESI electrospray ion source (spray voltage, 4 kV; capillary temperature, $275\text{ }^\circ\text{C}$; source heater temperature, $40\text{ }^\circ\text{C}$; FTMS resolution, $>30,000$). Nitrogen was used as sheath and auxiliary gas. The sample solutions were introduced continuously via a 500 μL Hamilton syringe pump with a flow rate of $5\text{ } \mu\text{L min}^{-1}$. The data were evaluated by the Xcalibur software 2.7 SP1.

Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. NMR spectra were recorded on a Varian Unity Inova 500 instrument operating at 500 MHz for ^1H and 125 MHz for ^{13}C . SiMe₄ was used as a reference for calibrating the chemical shift.

Color-Dilution Analysis. An aliquot (50 μL) of the incubations at 3 and 8 h was analyzed by HPLC–DAD for determination of the color-dilution factor (CD factor). Collected colored fractions of 1 mL were then stepwise 1:1 diluted with solvent B. The test was carried out in daylight against a white background. Each dilution was visually monitored until the color difference between the diluted fraction and

two blanks of solvent B could just be visually detected by five different panelists using a triangle test. This dilution was defined as the CD factor. For assignment of the total color-dilution factor (CD_{total} factor), 50 μL of the incubation was diluted to 1 mL and treated as described above. The contribution of a specific structure/fraction to the total color was calculated as follows: $\frac{CD}{CD_{\text{total}}} \times 100\%$.¹⁹

Statistical Analysis. Analyses were performed at least in triplicate and resulted in coefficients of variation less than 10%.

RESULTS AND DISCUSSION

Polyphenol Amino Acid Incubations and Color-Dilution Analysis. The general incubation system was chosen based on the black tea fermentation. Therefore, gallic acid and catechin were used as substrates because of the relatively high amounts of catechins, catechin gallates, and gallo catechins in fresh tea leaves.²⁰ After mixing gallic acid and catechin with nashi pear homogenate (nashi-PPO) the enzymatic oxidation started immediately developing a yellow-brown discoloration. Nashi pear was used as an economical enzyme source, because of its high polyphenol oxidase activity but low polyphenol content.²¹ In the first hours of incubation purpurogallin carboxylic acid and theaflavic acid, known reaction products from the fermentation of black tea,²² were formed instantly (Figure 1A). After 3 h PGA was completely degraded and TA explained 25% of the overall color as calculated from color-dilution analysis (Table 1). TA was finally degraded to high-molecular structures under the emerging chromatographic hump, forming an intense yellow-brown coloration. The addition of lysine and arginine, respectively, had virtually no influence, neither on the course of reaction nor on the course of coloration, and gave the same reaction products as without addition. Importantly, in these incubations no formation of polyphenol–amino acid adducts was detectable.

In contrast, incubations with cysteine showed a completely different picture of both reaction and coloration. First, after addition of nashi pear homogenate no change of color and no formation of PGA and TA occurred. Instead, the two colorless catechin–cysteine adducts A1 and A2 emerged, which were already isolated and characterized by Richard et al. from the enzymatic oxidation of catechin in the presence of cysteine (for NMR data obtained herein for A1 and A2, see Supporting Information).⁹ These adducts were degraded after 3 h, and two novel colorless compounds evolved, the dihydrobenzothiazine carboxylic acid derivatives B1 and B2 (Figure 1B). Exactly with onset of the formation of B1 and B2 at 3 h, the development of a red-brown color and the pronounced formation of a chromatographic hump was initiated. This indicated that adducts and dihydrobenzothiazine derivatives are reactive intermediates in the color formation mechanism and are ultimately degraded to high-molecular, yet unknown, structures under the chromatographic hump (Figure 1C). Interestingly, the emergence of the dihydrobenzothiazine derivatives was accompanied by the formation of PGA and TA contributing to the overall color.

Color-dilution analyses revealed that the chromatographic hump primarily contributed with 41% to the overall color after 8 h of incubation (Table 1), while TA gave 2%. In presence of cysteine the time course depicted in Figure 2 clearly shows the immediate degradation of catechin in contrast to gallic acid, which reacted much slower. Concurrently the formation of the catechin–cysteine adducts began in an almost quantitative fashion, i.e., after 1 h 18% and 31% of A1 and A2, respectively, were formed, while catechin declined by 51%. Obviously, the

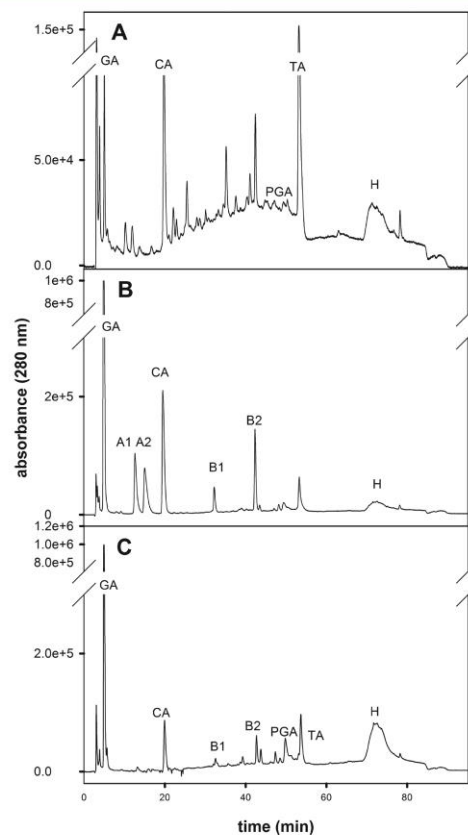


Figure 1. HPLC-DAD chromatograms of incubation of gallic acid (GA) and catechin (CA) at 3 h (A); where, for example, 1.5e+5 represents 1.5×10^5 and incubation of GA, CA, and cysteine at 3 h (B) and at 8 h (C) at $\lambda = 280$ nm: purpurogallin-4-carboxylic acid (PGA), theaflavic acid (TA), 2'-cysteinylcatechin (A1), 5'-cysteinylcatechin (A2), dihydrobenzothiazine derivative 1 (B1), dihydrobenzothiazine derivative 2 (B2), and chromatographic hump (H).

formation of A2 was favored in comparison to A1. This difference in formation was also reflected by B1 and B2, suggesting a mechanistic connection between B2 and A2 and between B1 and A1, respectively. However, the difference was much more pronounced.

Isolation and Elucidation of the Dihydrobenzothiazine Carboxylic Acid Derivatives. Because of its comparatively minor turnover, gallic acid seemed to have no relevant impact on the formation of A1, A2, B1, and B2 and, thus, was left out for incubations used for structure isolation. Incubations of catechin and cysteine were first subjected to high-performance countercurrent chromatography to separate B1 and B2 from A1 and A2. Afterward B1 and B2 were purified by preparative HPLC from the organic mobile fractions, while A1 and A2 were separated from the retained aqueous phase. It has to be mentioned that all target compounds were of extremely high reactivity leading very fast to colored degradation. Thus, after removal of organic solvents at ambient

Table 1. Yields (mol %) Catechin and Color Contribution (%) of the Main Reaction Products in the Incubations of Gallic Acid (GA) and Catechin (CA) at 3 h (1), GA and CA and Lysine at 3 h (2), GA and CA and Arginine at 3 h (3), GA and CA and Arginine at 3 h (3), GA and CA and Cysteine at 3 h (4-1), and GA and CA and Cysteine at 8 h (4-2)

	catechin (mol %)		color contribution (%)	catechin (mol %)				color contribution (%)
	PGA	TA	TA	A 1	A 2	B 1	B 2	hump
1	0	4.8	25	0	0	0	0	0
2	0	5.2	25	0	0	0	0	0
3	0	4.0	25	0	0	0	0	0
4-1	0.3	1.7	0	18.8	25.2	5.4	20.3	0
4-2	1.9	2.4	2	0.9	1.9	0	6.6	41

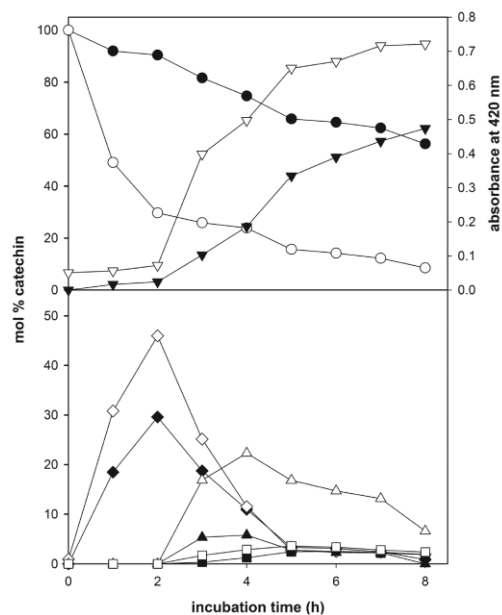


Figure 2. Conversion of GA and CA in the presence of cysteine: GA (●), CA (○), hump (▼), absorbance of total incubation at $\lambda = 420$ nm (▽), A1 (◆), A2 (◇), B1 (▲), B2 (△), PGA (■), and TA (□). The quantitative assessment of the hump is based on the calibration curve of catechin.

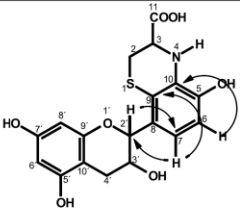
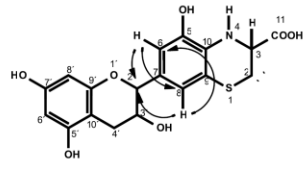
temperature, all fractions had to be immediately freeze-dried to give amorphous, slightly pinkish materials. The spectrometric and spectroscopic data of the isolated cysteine–catechin adducts A1 and A2 were in line with the above literature.⁹ For the novel dihydrobenzothiazine derivatives B1 showed absorption maxima of 230 and 306 nm, while B2 gave 235 and 295 nm. The elemental composition was verified by HR–MS to deliver a pseudo-molecular ion at m/z 390.0649 $[M - H]^-$ for B1 and at m/z 390.0648 for B2 (m/z 390.0648 calcd for $C_{18}H_{16}O_7NS$).

Final structural evidence was achieved by 1H NMR and ^{13}C NMR-APT measurements, as well as homonuclear correlation spectroscopy (H,H COSY), heteronuclear single quantum coherence (HSQC), and heteronuclear multiple-bond correlation (HMBC) techniques. Table 2 provides 1H NMR and ^{13}C NMR data of the novel dihydrobenzothiazine derivatives as well show selected HMBC correlations. Compared to published data of catechin,²³ both structures show virtually

identical NMR spectra for the former catechin A and C ring, as expected from their common backbone. The missing proton signal at C-9 (positions 2' and 5' of the former catechin B ring, respectively) of the dihydrobenzothiazine moiety and the AB_x system of the single α -proton H-2 at 4.20 ppm (B1) and 4.26 ppm (B2), respectively, giving two characteristic doublets of doublets for the two non-equivalent β -protons of former cysteine at 3.03 ($J = 12.5, 7.4$ Hz) and 3.17 ppm ($J = 12.5, 3.3$ Hz) (B1) and at 3.05 ($J = 12.5, 7.5$ Hz) and 3.25 ppm ($J = 12.5, 3.0$ Hz) (B2), respectively, verify the ring formation between the B-ring of catechin and cysteine. These observations are in agreement with the NMR data reported by Richard et al. for the cysteine adducts of catechin.⁹ The different constitutions of B1 and B2 are validated from the coupling constants and the HMBC correlations. In B1 the two aromatic protons H-6 and H-7 (6.51 and 6.55 ppm) of the benzothiazine moiety give two doublets with a typical 3J coupling constant of 8.1 Hz. As opposed to this, the two aromatic protons H-6 and H-8 of B2 (6.56 and 6.56 ppm) display a long-range coupling of 1.7 Hz. This clearly confirms the experimentally proven origin of B1 from the 2'-substituted and of B2 from the 5'-substituted cysteinyl catechin. The presence of HMBC correlations of H-7 to C-2' as well as to C-9 and between H-6 and C-10 of B1 are in further support of structure B1. For B2 the substitution pattern is validated by HMBC correlations of H-8 to C-6 as well as to C-2' (likewise H-6 to C-8 and C-2'). The closer vicinity of the dihydrobenzothiazine ring sulfur to the C-ring H-2' at 5.00 ppm in B1 results in a significant downfield shift of about 0.5 ppm compared to H-2' in B2. This downfield shift was also confirmed for the 2'-cysteinyl substitution of catechin (A1) by us and by Richard et al., who recorded a downfield shift of 0.73 ppm of the C-ring H-2 in comparison to H-2 for the 5' substitution (A2).⁹ Thus, the structures of B1 and B2 were unequivocally identified as 8-(3',4'-dihydro-2H-chromene-3',5',7'-triole)-3,4-dihydro-5-hydroxy-2H-benzothiazine-3-carboxylic acid and 7-(3',4'-dihydro-2H-chromene-3',5',7'-triole)-3,4-dihydro-5-hydroxy-2H-benzothiazine-3-carboxylic acid, respectively.

Formation Mechanism of B1 and B2. To elucidate the formation mechanism leading to B1 and B2 being isolated, authentic A1 or A2 was added to the above incubation system of catechin and nashi-PPO, however in the absence of cysteine. In contrast to the presence of cysteine, the dihydrobenzothiazine derivative synthesis started immediately. Figure 3 clearly shows that B1 originated solely from A1 and B2 from A2, respectively. Importantly, this formation was accompanied by immediate appearance of color paralleled by the development of the chromatographic hump with several absorbance maxima in the visible range. Additional incubations were performed omitting either nashi-PPO or catechin. None of these

Table 2. High-Resolution Mass and ¹H and ¹³C NMR Spectroscopic Data of B1 and B2 (in CD₃OD)

8-(3',4'-dihydro-2 <i>H</i> -chromene-3',5',7'-trio)-3,4-dihydro-5-hydroxy-2 <i>H</i> -benzothiazine-3-carboxylic acid (B1)			7-(3',4'-dihydro-2 <i>H</i> -chromene-3',5',7'-trio)-3,4-dihydro-5-hydroxy-2 <i>H</i> -benzothiazine-3-carboxylic acid (B2)		
					
HR-MS [M-H] ⁻ (m/z) calcd. C ₁₈ H ₁₆ O ₇ NS			HR-MS [M-H] ⁻ (m/z) calcd. C ₁₈ H ₁₆ O ₇ NS		
390.0649			390.0648		
390.0648			390.0648		
C/H	δ ¹ H [ppm]	δ ¹³ C [ppm]	C/H	δ ¹ H [ppm]	δ ¹³ C [ppm]
2 _A	3.03 (dd, 1H) ³ J = 7.4 ² J = 12.5	26.8	2 _A	3.05 (dd, 1H) ³ J = 7.5 ² J = 12.5	27.2
2 _B	3.17 (dd, 1H) ³ J = 3.3 ² J = 12.5	26.8	2 _B	3.25 (dd, 1H) ³ J = 3.0 ² J = 12.5	27.2
3	4.20 (m, 2 H) ^a	54.1	3	4.26 (dd, 1H) ³ J = 3.0 ³ J = 7.5	54.1
5	-	143.5	5	-	143.9
6	6.51 (d, 1H) ³ J = 8.1	110.1	6	6.56 (d, 1H) ⁴ J = 1.7	109.2
7	6.55 (d, 1H) ³ J = 8.1	115.2	7	-	127.8
8	-	127.2	8	6.54 (d, 1H) ⁴ J = 1.7	117.2
9	-	114.9	9	-	114.5
10	-	130.1	10	-	129.9
11	-	174.5	11	-	173.9
2'	5.00 (d, 1H) J ² = 6.8 Hz	78.4	2'	4.46 (d, 1H) ³ J = 7.9	81.5
3'	4.20 (m, 2 H) ^a	65.9	3'	3.93 (ddd, 1H) ³ J = 5.4 ³ J = 7.9	67.4
4' _A	2.53 (dd, 1H) ³ J = 7.5 ² J = 16.1	26.4	4' _A	2.48 (dd, 1H) ³ J = 7.9 ² J = 16.1	27.1
4' _B	2.78 (dd, 1H) ³ J = 5.2 ² J = 16.1	26.4	4' _B	2.85 (dd, 1H) ³ J = 5.4 ² J = 16.1	27.1
5'	-	156.1	5'	-	156.1
6'	5.83 (d, 1H) ⁴ J = 2.3	94.0	6'	5.84 (d, 1H) ⁴ J = 2.3	94.1
7'	-	156.3	7'	-	156.4
8'	5.92 (d, 1H) ⁴ J = 2.3	94.9	8'	5.92 (d, 1H) ⁴ J = 2.3	94.9
9'	-	155.6	9'	-	155.5
10'	-	99.2	10'	-	99.4

^aSignal was overlapped.

incubations showed the emergence of the dihydrobenzothiazine derivatives or the chromatographic hump. This means that both catechin and PPO are essential for the conversion of the cysteinyl adducts to the dihydrobenzothiazines.

Based on these observations the formation mechanism depicted in Figure 4 is proposed. In the first step catechin is oxidized by nashi-PPO to the *o*-quinone, which reacts with the thiol group of cysteine forming the 2'- and 5'-cysteinyl adducts A1 and A2. The obvious steric hindrance of the attack at position C-2' compared to C-5' also explains the discrimination of A1 by almost 50%. For the intramolecular ring closure the second nucleophilic reaction with the amino acids primary amino function requires reoxidation of the catechol

moiety to the *o*-quinone. From literature it is known that cysteine adducts of polyphenols are no longer recognized as substrates by PPOs.^{2,9} This is in line with the present experiments, in which A1 and A2 were stable, when only nashi-PPO was added. However, this immediately changed when catechin was included in the reaction mixture. Catechin as a substrate of PPO is then oxidized to the corresponding *o*-quinone, which in turn can then oxidize the cysteinyl adducts to give back the reduced catechin to be again enzymatically oxidized. This redox cycling is well-known from the black tea fermentation chemistry, where, e.g., gallo substituted phenols as epigallocatechin gallates must get oxidized in order to form the theaflavic chromophores.²⁴ Obviously, these redox systems

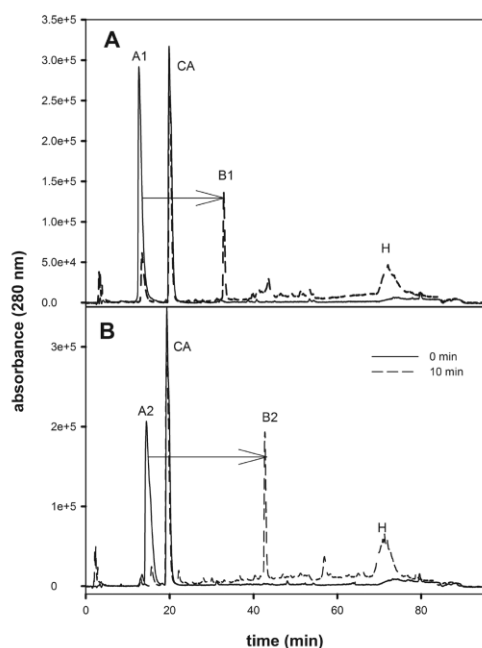


Figure 3. Incubation of (A) where, for example, 3.5×10^5 represents 3.5×10^5 A1 or (B) A2 in the presence of CA and nashi-PPO: B1, B2, and H.

are driven by the difference in oxidation potentials. This must also be true for the final step in the mechanistic scheme in Figure 4, as the products of ring closure, the quinone imins, were isolated as their reduced dihydrobenzothiazine counter-

parts B1 and B2. Most likely from the present experiments the non-enzymatic reduction agents are catechin itself or the cysteinyl adducts. It has to be stated that cysteine under oxidative conditions can be oxidized easily to cystine which represents an additional partner for redox reactions. All isolated structures were transient intermediates finally leading to color formation. The proposed mechanism is reminiscent of the formation of melanins during pheomelanogenesis. In this case the reaction starts from tyrosine via 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) to give indol intermediates or in the presence of cysteine benzothiazines. Thus, it can be hypothesized that the present phytophenolic derivatives will show similar follow-up reactions such as decarboxylation, ring contraction, or polymerization and will eventually lead to high-polymeric colored melanins.

In summary, we succeeded in gaining mechanistic insights into the influence of nucleophilic amino acids on enzymatic browning reactions in catechin-based model incubations. While lysine and arginine had no impact on the general course, cysteine incubations led to the unequivocal identification of two novel amino acid adducts in the form of dihydrobenzothiazine derivatives. This study strongly suggests their importance as crucial intermediates in the formation of color. Ongoing research will now clarify the nature of the resulting colored structures and their mechanistic background.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jafc.8b06458.

¹H and ¹³C NMR spectroscopic data of A1 and A2 in CD₃OD (PDF)

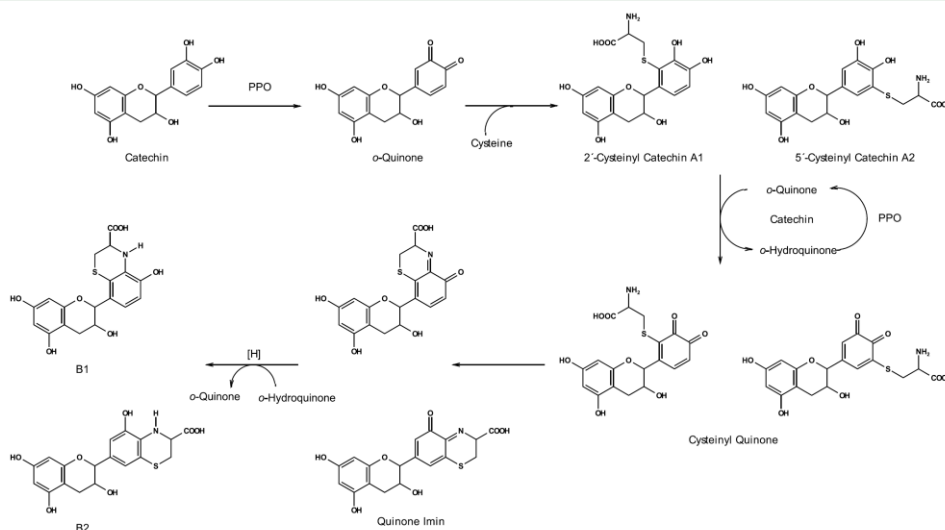


Figure 4. Formation of dihydrobenzothiazine carboxylic acid derivatives B1 and B2 in the presence of catechin, cysteine, and PPO.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: marcus.glomb@chemie.uni-halle.de. Fax: ++049-345-5527341).

ORCID 

Nils Mertens: 0000-0002-9769-1340

Marcus A. Glomb: 0000-0001-8826-0808

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. D. Ströhl from the Institute of Organic Chemistry, Halle, Germany, for recording NMR spectra and Dr. A. Frolov and A. Laub from the Leibniz Institute of Plant Biochemistry, Halle, Germany, for performing accurate mass analysis.

■ ABBREVIATIONS USED

DOPA, 3,4-dihydroxyphenylalanin; PGA, purpurogallin carboxylic acid; PPO, polyphenol oxidase; TA, theaflavic acid

■ REFERENCES

- (1) Toivonen, P. M. A.; Brummell, D. A. Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables. *Postharvest Biol. Technol.* **2008**, *48*, 1–14.
- (2) Bittner, S. When quinones meet amino acids: chemical, physical and biological consequences. *Amino Acids* **2006**, *30*, 205–224.
- (3) Mason, H. S.; Peterson, E. W. Melanoproteins I. Reactions between enzyme-generated quinones and amino acids. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **1965**, *111*, 134–146.
- (4) Pierpoint, W. S. o-Quinones formed in plant extracts. Their reactions with amino acids and peptides. *Biochem. J.* **1969**, *112*, 609–616.
- (5) Schilling, S.; Sigolotto, C.; Carle, R.; Schieber, A. Characterization of covalent addition products of chlorogenic acid quinone with amino acid derivatives in model systems and apple juice by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2008**, *22*, 441–448.
- (6) Yabuta, G.; Koizumi, Y.; Namiki, K.; Hida, M.; Namiki, M. Structure of green pigment formed by the reaction of caffeic acid esters (or chlorogenic acid) with a primary amino compound. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **2001**, *65*, 2121–2130.
- (7) Dudley, E. D.; Hotchkiss, J. H. Cysteine as inhibitor of polyphenoloxidase. *J. Food Biochem.* **1989**, *13*, 65–75.
- (8) Bassil, D.; Makris, D. P.; Kefalas, P. Oxidation of caffeic acid in the presence of L-cysteine: isolation of 2-S-cysteinylcaffeic acid and evaluation of its antioxidant properties. *Food Res. Int.* **2005**, *38*, 395–402.
- (9) Richard, F. C.; Goupy, P. M.; Nicolas, J. J.; Lacombe, J. M.; Pavia, A. A. Cysteine as an inhibitor of enzymic browning. 1. Isolation and characterization of addition compounds formed during oxidation of phenolics by apple polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39*, 841–847.
- (10) Ali, H. M.; El-Gizawy, A. M.; El-Bassiouny, R. E. I.; Saleh, M. A. Browning inhibition mechanisms by cysteine, ascorbic acid and citric acid, and identifying PPO-catechol-cysteine reaction products. *J. Food Sci. Technol.* **2014**, *52*, 3651–3659.
- (11) Valero, E.; Varon, R.; Garcia-Carmona, F. A kinetic study of irreversible enzyme inhibition by an inhibitor that is rendered unstable by enzymic catalysis. The inhibition of polyphenol oxidase by L-cysteine. *Biochem. J.* **1991**, *277*, 869–874.
- (12) Kroll, J.; Rawel, H. M.; Seidelmann, N. Physicochemical properties and susceptibility to proteolytic digestion of myoglobin-phenol derivatives. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 1580–1587.
- (13) Kroll, J.; Rawel, H. M. Reactions of plant phenols with myoglobin: influence of chemical structure of the phenolic compounds. *J. Food Sci.* **2001**, *66*, 48–58.
- (14) Kroll, J.; Rawel, H. M.; Rohn, S. Reactions of plant phenolics with food proteins and enzymes under special consideration of covalent Bonds. *Food Sci. Technol. Res.* **2003**, *9*, 205–218.
- (15) Guerra, P. V.; Yaylayan, V. A. Interaction of flavanols with amino acids: postoxidative reactivity of the B-ring of catechin with glycine. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 3831–3836.
- (16) Mai, F.; Glomb, M. A. Isolation of Phenolic Compounds from Iceberg Lettuce and Impact on Enzymatic Browning. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 2868–2874.
- (17) Collier, P. D.; Bryce, T.; Mallows, R.; Thomas, P. E.; Frost, D. J.; Korver, O.; Wilkins, C. K. The theaflavins of black tea. *Tetrahedron* **1973**, *29*, 125–142.
- (18) Imai, K.; Mitsunaga, T.; Takemoto, H.; Yamada, T.; Ito, S.; Ohashi, H. Extractives of *Quercus crispula* sapwood infected by the pathogenic fungus *Raffaella quercivora* I: comparison of sapwood extractives from noninfected and infected samples. *J. Wood Sci.* **2009**, *55*, 126–132.
- (19) Hofmann, T. Characterization of the most intense coloured compounds from Maillard reactions of pentoses by application of colour dilution analysis. *Carbohydr. Res.* **1998**, *313*, 203–213.
- (20) Graham, H. N. Green tea composition, consumption and polyphenol chemistry. *Prev. Med.* **1992**, *21*, 334–350.
- (21) Tsurutani, M.; Murata, M.; Homma, S. Comparison of Enzymatic Browning of Japanese Pear and Apple. *Food Sci. Technol. Res.* **2000**, *6*, 344–347.
- (22) Sang, S.; Lambert, J. D.; Tian, S.; Hong, J.; Hou, Z.; Ryu, J.; Stark, R. E.; Rosen, R. T.; Huang, M.; Yang, C. S.; Ho, C. Enzymatic synthesis of tea theaflavin derivatives and their anti-inflammatory and cytotoxic activities. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 459–467.
- (23) Hye, M. A.; Taher, M. A.; Ali, M. Y.; Ali, M. U.; Zaman, S. Isolation of (+)-catechin from *Acacia Catechu* (cutch tree) by a convenient method. *J. Sci. Res.* **2009**, *1*, 300–305.
- (24) Robertson, A. Effects of physical and chemical conditions on the in vitro oxidation of tea leaf catechins. *Phytochemistry* **1983**, *22*, 889–896.

1725

DOI: 10.1021/acs.jafc.8b06458
J. Agric. Food Chem. **2019**, *67*, 1719–1725

Reprinted with permission from Mertens, N; Mai, F.; Glomb, M. A. Influence of Nucleophilic Amino Acids on Enzymatic Browning Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2019**, *67*, 1719-1725. Copyright 2019 American Chemical Society

5.2 Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68, 13111 - 13120

JOURNAL OF
AGRICULTURAL AND
FOOD CHEMISTRY

pubs.acs.org/JAFC

Article

Oxidative Fragmentation of Aspalathin Leads to the Formation of Dihydrocaffeic Acid and the Related Lysine Amide Adduct

Nils Mertens, Thomas Heymann, and Marcus A. Glomb*



Cite This: *J. Agric. Food Chem.* 2020, 68, 13111–13120



Read Online

ACCESS |



Metrics & More



Article Recommendations



Supporting Information

ABSTRACT: In the present study, the degradation of C-glucosidic dihydrochalcone aspalathin as the major phenolic compound in rooibos (*Aspalathus linearis*) was investigated. Analyses by gas chromatography–mass spectrometry of aqueous aspalathin–lysine incubations after silylation showed the formation of dihydrocaffeic acid [3-(3,4-dihydroxyphenyl)-propionic acid] under oxidative conditions as a novel degradation product up to 10 mol %. High-performance liquid chromatography analyses revealed the concurrent formation of the dihydrocaffeic acid lysine amide at about 30-fold lower concentrations, which was unequivocally verified by synthesis of an authentic reference standard. The amide was also verified in aspalathin–protein incubations after enzymatic hydrolysis by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry analyses. Thus, the covalent interaction of phenolic plant compounds with proteins under mild conditions (ambient temperatures and neutral pH) was confirmed for the first time. Acid and free amide were also quantitated in rooibos teas with significantly higher values in fermented varieties. The mechanism of formation was clarified to be initiated by singlet oxygen and to include a rearrangement–fragmentation mechanism with 1,2,3,5-tetrahydroxybenzene as the counterpart.

KEYWORDS: rooibos tea, aspalathin, dihydrochalcones, dihydrocaffeic acid, polyphenol–protein adduct, high-performance countercurrent chromatography, singlet oxygen

INTRODUCTION

During food processing, the ingredients undergo significant changes, such as degradation, interactions with other constituents, and finally conversion into completely new products, which determine and define the quality of the final product. It is known that proteins are able to form complexes with polyphenols, resulting in changes in structural, functional, and nutritional properties.¹ Importantly, in contrast to non-covalent interactions, the covalent interactions between polyphenols and proteins, especially with respect to discrete structures, are barely described.² The formation of covalent bonds between polyphenols and proteins in general is discussed to involve the oxidation of the phenolic compound. In alkaline solutions or during the enzyme-catalyzed oxidation by polyphenol oxidases during enzymatic browning reactions, phenolic compounds are oxidized to highly reactive electrophilic *o*-quinones. These *o*-quinones are thought to then react with different nucleophiles, such as the side chains of amino acids or proteins, leading to the formation of polyphenol–protein adducts.^{2,3}

C-glycosidic dihydrochalcone aspalathin presents the major phenolic component in the unprocessed rooibos (*Aspalathus linearis*)⁴ plant material with about 70 mg/g and is known for its antioxidant, antimutagenic, and hypoglycemic activities.^{5–7} During fermentation of the tea, the aspalathin content decreases by almost 98%.⁸ In contrast to the processing of black tea (*Camellia sinensis*), *in vitro* experiments have shown that the oxidative degradation of aspalathin can involve both enzymatic and non-enzymatic mechanisms.^{9–11} Thus far, three different degradation routes were elucidated, which are all

initiated by oxidation of aspalathin to its *o*-quinone (see Figure SI-1 of the Supporting Information). The first pathway describes the conversion of aspalathin to orientin and isoorientin via the formation of eriodictyol glucopyranosides after oxidation.¹² During the second pathway, formed *o*-quinone is nucleophilically attacked by a second aspalathin molecule, leading to several dimerization products.^{9,10} The final pathway includes the formation of two highly reactive colored dibenzofuran structures, which were unequivocally elucidated as their corresponding quinoxalines after derivatization with *o*-phenylenediamine. Color dilution analysis of incubated aspalathin solutions revealed these structures as transient key chromophores.¹⁰ Furthermore, deaerated incubations of isoorientin with human intestinal bacteria showed the formation of eriodictyol after hydrogenation of the 2,3-double bond on the C ring and cleavage of the C-glucosyl bond. This intermediate was subsequently converted via ring fission to dihydrocaffeic acid (DHC) and phloroglucinol. Muller et al. proposed the formation of DHC as a possible metabolic breakdown pathway of aspalathin. On the other hand, a spontaneous non-enzymatic fragmentation was not reported thus far.^{13,14}

Special Issue: Highlights of AGFD program at 258th ACS National Meeting, San Diego

Received: December 4, 2019

Revised: January 27, 2020

Accepted: January 27, 2020

Published: February 5, 2020



Table 1. HR-MS and ^1H and ^{13}C NMR Spectroscopic Data of DHC–Amide in D_2O

Dihydrocaffeic acid lysine amide		
	HR-MS $[\text{M} + \text{H}]^+$ (m/z)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
	calculated $\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{O}_5\text{N}_2$	311.1605 311.1607
C/H	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1		175.4
2	2.33 (t, 2H) $^3J = 7.0$ Hz	37.6
3	2.84 (t, 2H) $^3J = 7.0$ Hz	30.7
1'		133.1
2'	6.62 (s, 1H)	116.2
3'		142.1
4'		143.7
5'	6.72 (d, 1H) $^3J = 7.9$ Hz	116.2
6'	6.53 (d, 1H) $^3J = 7.9$ Hz	120.7
1''		174.7
2''	3.54 (t, 1H) $^3J = 6.3$ Hz	54.6
3''	1.63 (m, 2H)	30.1
4''	1.03 (m, 2H) $^3J = 7.6$ Hz	21.8
5''	1.18 (m, 2H) $^3J = 7.6$ Hz	28.0
6''	2.92 (t, 2H) $^3J = 6.6$ Hz	38.7

Thus, the aim of the present study was to reinvestigate the degradation of aspalathin with respect to the formation of new phenolic fragmentation products and the identification of covalent protein–polyphenol interactions. We were able to verify the formation of DHC as a novel degradation product of aspalathin as well as the formation of the dihydrocaffeic acid lysine amide (DHC–amide) in aspalathin–protein incubations and fermented rooibos teas and to confirm a new oxidative degradation mechanism. The covalent interaction between a protein and a phenolic compound under mild conditions (ambient temperatures and neutral pH) was confirmed for the first time.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. All chemicals of the highest quality available were provided by Sigma-Aldrich (Munich/Steinheim, Germany), Fluka (Taufkirchen, Germany), Merck (Darmstadt, Germany), VWR Chemicals (Darmstadt, Germany), ACROS Organics (Geel, Belgium), and ARMAR Chemicals (Leipzig, Germany), unless otherwise indicated. For all experiments, ultrapure water (Ultra Clear, Siemens, Munich, Germany) was used.

Aspalathin was isolated from unfermented rooibos tea using high-performance countercurrent chromatography (HPCCC) and preparative high-performance liquid chromatography (HPLC). Verification of the isolated material was carried out by nuclear magnetic resonance

(NMR) spectroscopy and was in line with the literature;¹⁵ High-resolution mass spectrometry (HR-MS): m/z 453.1389 (found) and m/z 453.1397 (calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{O}_{11}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$).

N^2 -*t*-Boc-lysine *t*-butyl ester¹⁶ and 1,2,3,5-tetrahydroxybenzene [THOB; HR-MS, m/z 141.0183 (found) and m/z 141.0188 (calcd for $\text{C}_6\text{H}_3\text{O}_4$ $[\text{M} - \text{H}]^-$)]¹⁷ were synthesized according to the literature.

Diacetyldihydrocaffeic Acid. The synthesis was performed according to the synthesis of peracetyl gluconic carboxylic acid by Fan et al.¹⁸ Acetic anhydride (6 mL) was cooled to about 15 °C, and HClO_4 (0.8 g, 7.76 mmol, 67%) was added, followed by the addition of DHC (0.92 g, 5.05 mmol). The temperature of the mixture was kept below 40 °C. The mixture was poured on ice and extracted twice with 20 mL of CHCl_3 . The organic layers were pooled and washed with ice-cold water. Water (10 mL) and triethylamine (0.8 mL) were added to CHCl_3 , and the mixture was stirred overnight to hydrolyze any anhydride. The organic layer was separated and washed with 1 N HCl and dried over anhydrous Na_2SO_4 ; CHCl_3 was removed under reduced pressure; and the compound was dried under high vacuum to afford a yellow viscous oil (632 mg, 47%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 2.27 (s, 3H), 2.27 (s, 3H), 2.67 (t, $^3J = 7.8$ Hz, 2H), 2.94 (t, $^3J = 7.8$ Hz, 2H), 7.03 (dd, $^4J = 2$ Hz, $^5J = 0.5$ Hz, 1H), 7.09 (d, $^4J = 2$ Hz, 1H), 7.10 (d, $^5J = 0.5$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 20.6, 29.8, 35.1, 123.2, 123.4, 126.4, 139.0, 140.5, 141.9, 168.3, 168.4, 178.3.

***N*²-*t*-Boc-*N*⁶-(diacetyldihydrocaffeoyl) Lysine *t*-Butyl Ester.** Diacetyldihydrocaffeic acid (632 mg, 2.38 mmol) and hydroxybenzotriazole (HOBt, 337.8 mg, 2.5 mmol) were dissolved in 12.5 mL of dry tetrahydrofuran (THF) under an argon atmosphere at 0 °C. Then, 466 mg (3 mmol) of 1-ethyl-3-(3-(dimethylamino)propyl)-carbodiimide (EDC) was added. After 20 min, a solution of 756 mg (2.5 mmol) of *N*²-*t*-Boc-lysine *t*-butyl ester in 12.5 mL of dry THF was added dropwise. The mixture was stirred for 16 h on ice. The solvent was evaporated under reduced pressure, and the residue was dissolved in 10 mL of ethyl acetate and washed with 10 mL of a saturated NaHCO₃ solution and 1 M HCl, separately. The solvent was evaporated, and the crude product was purified by column chromatography (silica gel 60) using hexane/acetone (2:1). Fractions containing the product [thin-layer chromatography (TLC): *R*_f = 0.29 in hexane/acetone (2:1), with ultraviolet (UV) and ninhydrin detection] were collected, concentrated under reduced pressure, and dried under high vacuum to afford a yellowish brown oil (256 mg, 20%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.33 (m, 22H), 1.53 (m, 2H), 2.15 (s, 6H), 2.31 (t, ³*J* = 7.7 Hz, 2H), 2.80 (t, ³*J* = 7.7 Hz, 2H), 3.04 (dt, ³*J* = 6.6 Hz, ³*J* = 6.5 Hz, 2H), 3.98 (m, 1H), 5.15 (s, 1H), 6.22 (m, 1H) 6.89 (s, 1H), 6.94 (s, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 20.5, 22.5, 27.9, 28.2, 28.8, 30.9, 32.2, 37.7, 39.0, 53.8, 79.4, 81.5, 123.1, 123.2, 126.4, 139.8, 140.2, 140.8, 155.5, 168.2, 168.3, 171.8, 172.0.

DHC–Amide. *N*²-*t*-Boc-*N*⁶-(diacetyldihydrocaffeoyl) lysine *t*-butyl ester (256 mg, 0.465 mmol) was dissolved in acetone and 6 M HCl (3 mL each). After stirring for 30 min, the mixture was diluted with 50 mL of water and evaporated to dryness. The crude product was purified by column chromatography (silica gel 60) using acetonitrile/water (15:4). Fractions containing the product [TLC: *R*_f = 0.23 in acetonitrile/water (15:4), with UV and ninhydrin detection] were collected, evaporated to dryness, and dried under high vacuum to afford DHC–amide (130 mg, 90%). Verification was carried out by NMR spectroscopy and HR-MS (Table 1).

Extraction of Rooibos Tea. Unfermented and fermented rooibos teas from Biedouw Valley of South Africa were obtained from Mount Everest Tea Company GmbH (Elmshorn, Germany) and from local tea shops. For aspalathin isolation, 100 g of the unfermented rooibos was extracted with 1 L of acetone/water (7:3, v/v) for 24 h under an argon atmosphere at 4 °C. Acetone was evaporated under reduced pressure at 30 °C, and the aqueous phase was extracted successively with 2 × 200 mL each of diethyl ether and ethyl acetate, separately. The solvent of the ethyl acetate extract was removed under reduced pressure and freeze-dried. The dried extract was used for separation via HPLC.

For quantitation of DHC and DHC–amide, 1 g of the unfermented and fermented rooibos was extracted with 20 mL of the acetone/water (7:3, v/v) mixture for 1 h under an argon atmosphere at room temperature in an ultrasonic bath. DHC–amide was quantitatively enriched by repeated collection with analytical HPLC (below).

Aerated Polyphenol Incubations. Mixtures containing either aspalathin and *N*²-*t*-Boc-lysine (10 mM), aspalathin, phloridzin, or phloretin (0.5 mM) in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0) were incubated in screw-cap vials. Incubations were kept in a shaker for 7 days at 37 °C. The formation of DHC and dihydrocoumaric acid was analyzed by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) and gas chromatography–flame ionization detection (GC–FID) after silylation. DHC–amide was analyzed by high-performance liquid chromatography–fluorescence detection (HPLC–FLD) after removing the *N*²-*t*-Boc group by adding 6 M HCl to the samples to a final HCl concentration of 3 M and keeping them for 30 min at room temperature.

Deaerated Polyphenol Incubations. The incubations were modified by adding 1 mM diethylenetriaminepentaacetic acid to the phosphate buffer. The buffer was degassed with helium before the samples were placed in 2 mL screw cap vials without air and incubated under an argon atmosphere.

Singlet-Oxygen Polyphenol Incubations. The incubations were modified by adding 10 mM sodium molybdate to the phosphate

buffer. The solutions were mixed with hydrogen peroxide solutions of different concentrations, resulting in a molar excess of hydrogen peroxide of 1000×, 100×, 50×, and 10×, respectively, in relation to phenol. The solutions were incubated for 24 h in a shaker at room temperature. THOB was incubated in the same way.

Aspalathin Protein Incubation and Enzymatic Hydrolysis. Mixtures containing aspalathin (100 mM) and bovine serum albumin (BSA, 0.2 mM) were incubated under the above-mentioned aerated conditions. The modified protein was precipitated with trichloroacetic acid, washed with acetone, and dissolved in phosphate-buffered saline (PBS) buffer. Enzymatic hydrolysis of the protein solution was carried out according to Smuda et al.¹⁹

Analytical High-Performance Liquid Chromatography–Diode Array Detection (HPLC–DAD). For polyphenol analyses, a Jasco PU-2080 Plus quaternary gradient pump with a degasser (DG-2080-54), quaternary gradient mixer (LG 2080-02), multiwavelength detector (MD-2015 Plus) (Jasco, Gross-Umstadt, Germany), Waters 717 plus autosampler, and column oven (Techlab Jet Stream np K-3) was used. Chromatographic separations were performed on stainless-steel columns (Vydac CRT, 201TP54, 250 × 4.6 mm, RP-18, 5 μm, Hesperia, CA, U.S.A.) using a flow rate of 1.0 mL/min. The column temperature was always 25 °C. The mobile phase consisted of water (solvent A) and MeOH/water (7:3, v/v, solvent B), and to both solvents (A and B), 0.8 mL/L formic acid was added. Samples were analyzed using a gradient system: samples were injected at 10% B. The gradient was changed linearly to 30% B in 30 min, to 65% B after 40 min, to 100% B after 2 min, and held at 100% B for 8 min. The effluent was monitored at 220, 280, and 400 nm (DHC, *t*_R = 14 min; aspalathin, *t*_R = 39 min). For quantitation, an external calibration based on standard solutions of authentic isolated references dissolved in water was used.

Analytical HPLC–FLD. For determination of DHC–amide, a Jasco PU-980 gradient pump with a degasser (DG-2080-53), ternary gradient mixer (LG 980-02), fluorescence detector (FP-920), autosampler (851-AS) and column oven (Jasco, Gross-Umstadt, Germany) set at 25 °C was used. Chromatographic separations were performed on stainless-steel columns (Vydac CRT, 218TP54, 250 × 4.6 mm, RP-18, 5 μm, Hesperia, CA, U.S.A.) using a flow rate of 1.0 mL/min. The mobile phase consisted of water (solvent A) and MeOH/water (7:3, v/v, solvent B). A 1.2 mL/L aliquot of heptafluorobutyric acid was added to both solvents (A and B). The samples were injected at 2% B and held for 5 min, and the gradient was changed to 90% B in 30 min and 100% B in 1 min and held for 5 min. The fluorescence detector was attuned to 340 nm for excitation and 455 nm for emission (DHC–amide, *t*_R = 19 min). Prior, a post-column derivatization reagent was added at 0.5 mL/min. This reagent consisted of 0.8 g of *o*-phthalaldehyde, 24.73 g of boric acid, 2 mL of 2-mercaptoethanol, and 1 g of Brij 35 in 1 L of water adjusted to pH 9.75 with KOH. For quantitation with HPLC–FLD, an external calibration based on standard solutions of authentic synthesized references dissolved in water was used.

Analytical High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry (HPLC–MS²). For quantitation of DHC–amide as a protein modification, a Jasco PU-2080 Plus quaternary gradient pump with a degasser (DG-2080-54), quaternary gradient mixer (LG 2080-04) (Jasco, Gross-Umstadt, Germany), AS-2057 Plus autosampler, and column oven (Jasco Jetstream II) set at 25 °C was used. Chromatographic separations were performed on stainless-steel columns (Vydac CRT, 218TP54, 250 × 4.6 mm, RP-18, 5 μm, Hesperia, CA, U.S.A.) using a flow rate of 1.0 mL/min. The eluents and gradient program were identical to that used for HPLC–FLD analysis. The mass analyses were performed using an Applied Biosystems API 4000 quadrupole instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.). MS ionization was achieved using the turbospray ionization source operated in positive-ion mode. The settings were as follows: curtain gas (N₂) at 40 psi, ion source gas 1 at 70 psi, ion source gas 2 at 80 psi, source temperature at 650 °C, and ion spray voltage at 2500 V. Optimized mass spectrometric parameters for DHC–amide were as follows: *t*_R = 19 min, *m/z* 311.3/84.2 [declustering potential (DP), 65 V; collision energy (CE),

42 eV; cell exit potential (CXP) 14 V; quantifier], m/z 311.3/247.9 (DP, 65 V; CE, 21 eV; CXP, 15 V; qualifier 1), and m/z 311.3/123.2 (DP, 65 V; CE, 54 eV; CXP, 10 V; qualifier 2). To resolve potential matrix interferences, increasing amounts of authentic reference standards were added to mixed aliquots of the sample and a regression of response versus concentration was generated for quantitation.

Product Ion MS² by Collision-Induced Dissociation (CID). Samples were injected into the HPLC–MS² system using a CID experiment after chromatographic separation. Parameters for DP, CE, and CXP of DHC–amide were as follows: 65 V, 28 eV, and 15 V, respectively.

GC–FID Analysis. A Nexis GC-2030 gas chromatograph (Shimadzu, Kyoto, Japan) was used with helium 4.6 as a carrier gas in constant-flow mode (linear velocity of 20.8 cm/s and flow of 1.0 mL/min). Separation was carried out on a HP-5 capillary column (30 m × 0.32 mm × 0.25 μm, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, U.S.A.). Samples were injected to a split–splitless injector at 220 °C (split ratio of 4). The oven temperature was started at 80 °C, raised to 200 °C (8 K/min) and then to 270 °C (10 K/min), and held for 10 min. The detector was set at 300 °C. Aliquots of the incubations and tea extracts were acidified with HCl, extracted with diethyl ether for quantitation of the phenolic acids, and extracted with ethyl acetate for determination of THOB. The solvent was removed under an argon atmosphere; the dried extracts were dissolved in 100 μL of triethylamine; and 100 μL of *N,O*-bis(trimethylsilyl)acetamide with 5% trimethylchlorosilane was added. The samples were kept for 1 h at room temperature prior to injection into the GC–MS system. For quantitation, an external calibration based on standard solutions of authentic references was used. Limit of detection and limit of quantitation (LOD/LOQ) were as follows: DHC (1.0/3.1 mmol/mol of aspalathin), t_R = 18.6 min; dihydrocoumaric acid (2.6/7.8 mmol/mol of phloretin/phloridzin), t_R = 16.4 min; phloroglucinol, t_R = 15.1 min; and THOB, t_R = 16.6 min.

GC–MS Analysis. A Thermo Finnigan Trace GC Ultra coupled to a Thermo Finnigan Trace DSQ (Thermo Fischer Scientific GmbH, Dreieich, Germany) was used with helium 5.0 as a carrier gas in constant-flow mode (linear velocity of 35.0 cm/s and flow of 2.0 mL/min). Samples were injected to a split–splitless injector at 220 °C (split ratio of 10). Separation was performed on a DB-SMS capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm + 10 m Guard, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, U.S.A.). Mass spectra were obtained at 70 eV with electron-impact ionization (source temperature of 230 °C and emission current of 80 mA) in full-scan mode (mass range of m/z 50–650). The program and derivatization of the samples were identical to those used for GC–FID analysis [DHC, t_R = 18.9 min, m/z 398 (M⁺, 45%), 383 (5%), 280 (20%), 267 (36%), 179 (100%), 73 (58%); dihydrocoumaric acid, t_R = 16.4 min, m/z 310 (M⁺, 12%), 295 (5%), 192 (74%), 179 (100%), 73 (34%); phloroglucinol, t_R = 15.1 min, m/z 342 (M⁺, 90%), 327 (92%), 268 (15%), 253 (12%), 147 (28%), 133 (16%), 73 (100%); and THOB, t_R = 16.6 min, m/z 430 (M⁺, 14%), 415 (1%), 342 (4%), 327 (6%), 299 (12%), 207 (6%), 147 (16%), 73 (100%)].

GC–MS² Analysis. A Trace 1310 GC coupled to a TSQ Duo MS (Thermo Fischer Scientific GmbH, Dreieich, Germany) was used with helium 5.0 as a carrier gas in constant-flow mode (linear velocity of 35.0 cm/s and flow of 2.0 mL/min). Separation was performed on a VF-SMS capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm + 5 m EZ-Guard, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, U.S.A.). Samples were injected into the GC–MS² system using a CID experiment after chromatographic separation (splitless, injector at 220 °C). The program and derivatization of the samples were identical to those used for GC–FID analysis. Parameters for THOB were as follows: t_R = 12.5 min, selected m/z 430.2 and 70 eV (MS¹) with electron-impact ionization (source temperature of 300 °C and emission current of 80 mA); CE, 12 eV.

HPCCC. The HPCCC system (HPCCC Spectrum Series 20, Dynamic Extractions, Tredgar, U.K.) was equipped with a Jasco PU-4180 RHPLC pump and Jasco UV detector (UV-2075 Plus, Jasco, Gross-Umstadt, Germany) operating at 280 nm. Eluted liquids were

collected in fractions of 15 mL with a fraction collector (LKB Ultracore 7000, LKB-Producter AB, Bromma, Stockholm, Sweden). Chromatograms were recorded on a plotter (Servogor 200, GMC, Nürnberg, Germany). The total volume of the coil was 140 mL. HPCCC was run according to the HPCCC system for aspalathin separation of De Beer et al.¹⁵ with a revolution speed of 1600 rpm and a flow rate of 6 mL/min of the lower aqueous phase in head-to-tail modus. Samples of 500 mg of the ethyl acetate extract were dissolved in a 1:1 mixture of light and heavy phase (6 mL) and injected via a 6 mL sample loop. Incubations were separated using ethyl acetate/*n*-butanol/0.1% formic acid (4:1:5, v/v/v) (aspalathin, t_R = 18–40 min). The solvent of the collected fractions was evaporated under reduced pressure at 30 °C and freeze-dried. The dried residue was used for preparative HPLC–UV.

Preparative HPLC–UV. A Besta pump (Besta, Wilhelmsfeld, Germany) was used at a flow rate of 16 mL/min with a Knauer degasser (Knauer, Berlin, Germany). Up to 20 mg of the dried collected fractions of HPCCC was injected. Chromatographic separations were performed on a stainless-steel column (Vydac CRT, 218TP1022, 250 × 20 mm, RP-18, 10 μm, Hesperia, CA, U.S.A.). The mobile phases used were solvents A and B, identical to the HPLC–DAD system. An isocratic method was chosen according to the characteristics of the target compounds (aspalathin, 25% B, t_R = 62–80 min). The solvents of the collected fractions were removed under reduced pressure at 30 °C, freeze-dried, and stored at –20 °C.

HR-MS. Positive-ion high-resolution ESI mass spectra were obtained from an Orbitrap Elite mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) equipped with a heated electrospray ionization (HESI) electrospray ion source [spray voltage, 4 kV; capillary temperature, 275 °C, source heater temperature, 40 °C; and Fourier transform mass spectrometry (FTMS) resolution, >30 000]. Nitrogen was used as sheath and auxiliary gas. The sample solutions were introduced continuously via a 500 μL Hamilton syringe pump with a flow rate of 5 μL min⁻¹. The data were evaluated by the Xcalibur software 2.7 SP1.

NMR Spectroscopy. NMR spectra were recorded on a Varian VXR 400 spectrometer operating at 400 MHz for ¹H and 100 MHz for ¹³C. SiMe₄ was used as a reference for calibrating the chemical shift.

Statistical Analysis. Analyses were performed at least in triplicate and resulted in coefficients of variation of less than 10%. All significance tests were performed by a Welch test with a probability value of 99%. LOD and LOQ were calculated at a signal/noise ratio of 3 for LOD and 10 for LOQ.

RESULTS AND DISCUSSION

Oxidative Degradation of Aspalathin to DHC. To gain deeper insights in the reactivity of aspalathin and to extend the spectrum of reaction products, the degradation of aspalathin was reinvestigated in the presence of lysine. After the start of the incubation under aerated conditions, the immediate emergence of a new peak was observed by HPLC–DAD among other known degradation products (Figure 1). After comparison to an authentic reference, this novel structure was identified as DHC and unequivocally verified after isolation and silylation via GC–MS. To elucidate the formation mechanism, incubations were carried out under aerated and deaerated conditions, respectively. In the aerated incubations, degradation of aspalathin and also the accompanying color formation started immediately as published before.¹⁰ The start of degradation was paralleled by the instant formation of DHC, reaching a maximum concentration of 8 mol % of aspalathin after 4 days of incubation (Figure 2). Obviously, this phenolic structure was not stable under oxidative conditions because its concentration declined during the further course of incubation, probably as a result of its easily oxidizable *o*-hydroquinone moiety. In contrast, incubations under deaerated conditions

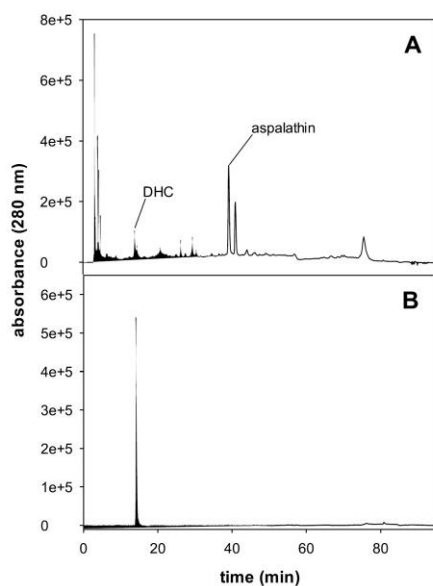


Figure 1. HPLC–DAD chromatogram of (A) incubation of aspalathin–lysine after 4 days and (B) DHC at $\lambda = 280$ nm.

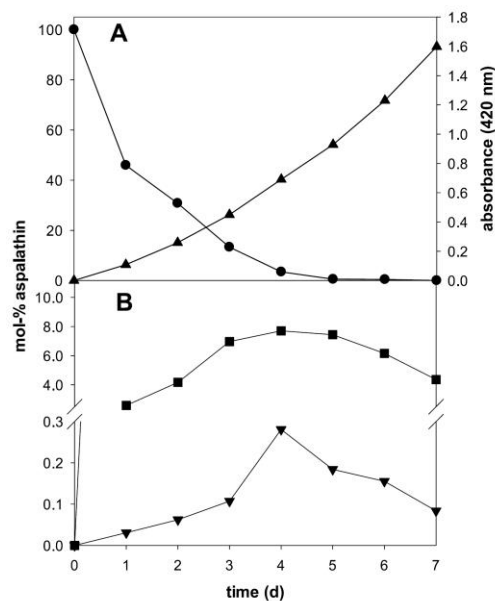


Figure 2. Degradation of aspalathin in the presence of lysine: aspalathin (●), absorbance of total incubation at $\lambda = 420$ nm (▲), DHC (■), and DHC–amide (▼).

showed no degradation of aspalathin to DHC (Table 2). No other structures and no color formation were observed. Consequently, the formation of DHC has to be linked to the

oxidative degradation of aspalathin. To elucidate the fragmentation mechanism, different known reactions of phenolic compounds were evaluated. In previous studies, three major pathways of oxidative degradation of aspalathin were already reported, leading to the conversion to orientin and isoorientin,¹² various dimerization products,^{9,10} and the formation of colored dibenzofuran intermediates.¹⁰ Importantly, the initiating step of all of these pathways is the oxidation of the B ring of dihydrochalcone to its *o*-quinone. However, in the case of DHC, this oxidation step cannot be the trigger for the fragmentation because it would theoretically lead to the formation of caffeic acid, which was never detected in any of the present incubations nor phloroglucinol as suggested from Muller et al.¹⁴ On the other hand, anthocyanins may undergo an opening of the C ring through hydrolysis and fission of the resulting dicarbonyl structure leads to hydroxybenzoic acid and 2,4,6-trihydroxyphenylacetaldehyde via hydrolytic β -dicarbonyl fragmentation.²⁰ It is also known that dihydrochalcones may be spontaneously oxidized to their respective chalcones, which can undergo retro-aldol-type cleavages after hydration.²¹ Taken together, neither of these phenolic reaction pathways would result in the established DHC. Looking for alternate mechanisms, loans were made from carbohydrate chemistry. The quantitatively most important fragmentations during the Maillard reaction at mild temperatures are hydrolytic β -cleavage and oxidative α -dicarbonyl cleavage.^{22,23} Both pathways have in common the formation of carboxylic acid and the scission of the carbon–carbon α -bond induced by the attack of a nucleophile. However, hydrolytic β -dicarbonyl scission can be ruled out, because it does not rely on oxidative processes, which contradicts the observed strictly oxidative DHC formation. On the other hand, oxidative α -dicarbonyl fragmentations require activated oxygen generated, e.g., by photooxidation processes or hydroperoxide species and include the incorporation of molecular oxygen as the key mechanistic step. In addition, studies of Smuda et al. on the degradation pathways of ascorbic acid proved that the dicarbonyl cleavage is paralleled by an amine-induced alternative, resulting in corresponding carboxylic acid amides.²³

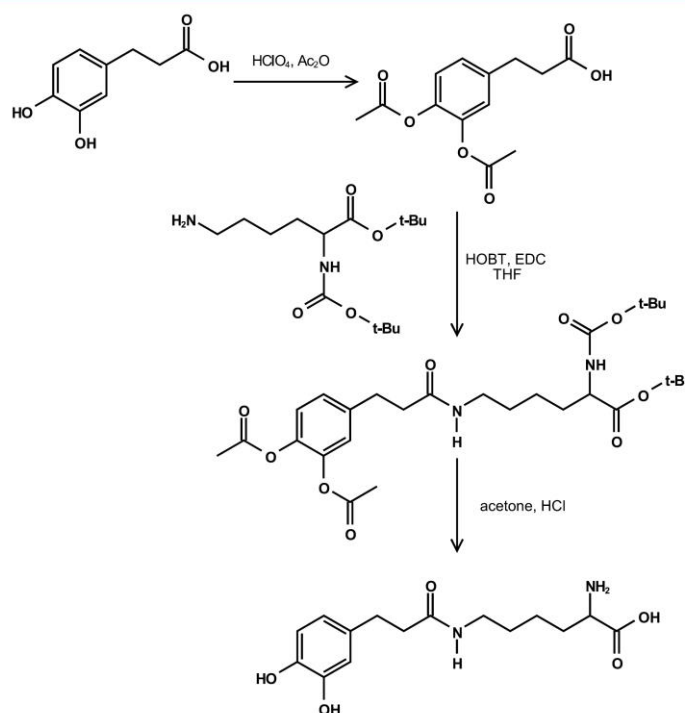
Synthesis of Authentic DHC–Amide. To prove the proposed oxygen-triggered mechanism, DHC–amide was synthesized via an amide-coupling reaction catalyzed by EDC and HOBt (Figure 3). The first step of the synthesis was the protection of the hydroxyl groups of DHC to prevent side reactions during coupling. The catechol moiety of DHC was derivatized with acetic acid anhydride to yield diacetyldihydrocaffeic acid, which was then conjugated to *N*²-*t*-Boc-lysine *t*-butyl ester to give the fully protected amide. Finally, deprotection was realized by treatment with 3 M HCl to give DHC–amide. The synthesized material was unequivocally verified by accurate mass determination via HR-MS and ¹H and ¹³C NMR attached proton test (APT) measurements as well as homonuclear correlation spectroscopy (¹H,¹H COSY), heteronuclear single-quantum correlation (HSQC), and heteronuclear multiple-bond correlation (HMBC) techniques as *N*⁶-lysiny dihydrocaffeic acid amide (Table 1). Specifically, the HMBC correlation between H-6'' and C-1 clearly indicated the successful coupling of the carboxyl group of DHC with the ϵ -amino moiety of lysine.

Singlet-Oxygen-Triggered Degradation Mechanism. DHC–amide was found in aspalathin–lysine reaction mixtures under aerated conditions in about 30-fold lower yields in

Table 2. Yields in mmol of Phenolic Acid/mol of Phenol of DHC (Aspalathin) and Dihydrocoumaric Acid (Phloridzin/Phloretin) in Deaerated, Aerated, and Singlet-Oxygen ($^1\text{O}_2$) Incubations after 6 h

	aspalathin (mmol of phenolic acid/mol of phenol)	phloridzin (mmol of phenolic acid/mol of phenol)	phloretin (mmol of phenolic acid/mol of phenol)
deaerated	<LOD ^a	<LOD	<LOD
aerated	9.4	<LOD	<LOD
$^1\text{O}_2$			
5× excess	13.2	39.7	41.6
25× excess	22.1	78.3	81.0
50× excess	12.7	150.6	93.8
500× excess	<LOQ ^b	250.3	222.1

^aLOD = limit of detection. ^bLOQ = limit of quantitation.

**Figure 3.** Synthesis of DHC–amide.

comparison to DHC, reaching a maximum of 0.3 mol % aspalathin after 4 days (Figure 2). As for DHC, absolutely no DHC–amide was detectable under deaeration. All known aspalathin degradation mechanisms are initiated by the easy oxidizable B-ring *o*-hydroquinone moiety. To rule out this possibility, at least for the mild reaction conditions used herein, the dihydrochalcones phloridzin and phloretin comprising a single monophenolic B ring were used for comparison. Phloridzin, a *O*-glycosidic dihydrochalcone, and phloretin, its aglycone, are phenolic compounds prominent for apple varieties.²⁴ Interestingly, during the browning process of apples, the degradation of phloridzin leads to similar dibenzofuran chromophores as the degradation of aspalathin; however, in this case, the degradation process must be initiated by the apple polyphenol oxidase creolase activity to oxidize the monohydroxy moiety on the B ring to the respective *o*-

hydroquinone.^{10,25} This is not the case under the present reaction conditions. Thus, as expected, no formation of anticipated dihydrocoumaric acid was monitored either under deaerated or under aerated conditions (Table 2). Next, according to the above oxidative α -dicarbonyl fragmentation mechanism for carbohydrates, activated oxygen species were introduced to the incubation system. Singlet oxygen was generated from hydrogen peroxide disproportionation catalyzed by molybdate ions in quantitative yields.²⁶ This led to the immediate detection of dihydrocoumaric acid (Table 2). In a dose-dependent manner, the concentration increased up to 25 mol % at a 500-fold excess of singlet oxygen. This clear impact of activated oxygen led to the reaction scheme proposed in Figure 4. In the first step, singlet oxygen attacks the carbonyl group of aspalathin, resulting in a biradicalic structure, including an alkoxyradical moiety. After

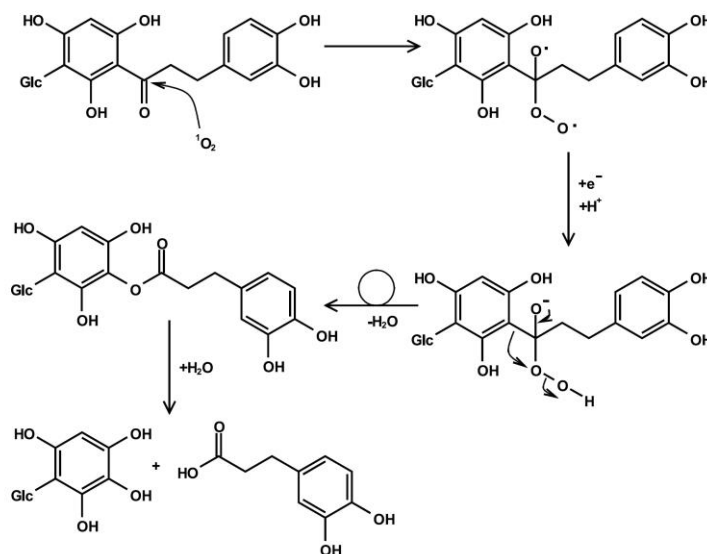


Figure 4. Proposed degradation pathway of aspalathin via oxidative cleavage.

single-electron transfer, the resulting hydroperoxide anion rearranges in a Baeyer–Villiger-type reaction. This rearrangement strongly depends upon the electron density of the migrating group, with electron-rich groups as the present aspalathin A ring being favored.²⁷ The putative carboxylic ester intermediate can be nucleophilically attacked by water or an amino component, leading to DHC or DHC–amide, respectively, and a glycosylated tetrahydroxybenzene derivative as the counterpart. The strict dependency upon activated oxygen to trigger the fragmentation independent from B-ring substitutions also means that aspalathin is able to intrinsically initiate the formation of singlet oxygen. Aspalathin degradation led to DHC detection up to 1 mol %, even in the absence of amines (Table 2). Indeed, it has been shown that the redox activity of catechol moieties leads to significant amounts of reactive oxygen species, e.g., the superoxide anion radical and hydrogen peroxide.²⁸ On the other hand, this also explains why exogenous addition of singlet oxygen only led to a 2.5-fold increase of DHC, after which concentrations dropped again under the limit of quantitation at 500-fold excess. Increased oxidative stress on the incubation leads to B-ring *o*-quinone formation to trigger the three above-discussed degradation mechanisms and, thus, withdraws aspalathin from the oxidative fragmentation, leading to DHC.

The search for the fragmentation counterpart as the final piece of the mechanistic puzzle was focused on phloretin (1) because of the high yields of fragmentation up to 22 mol % and (2) because targeted THOB is readily synthetically available in contrast to the *O*- and *C*-glycosidic pendants of phloridzin and aspalathin, respectively. THOB was realized according to the literature in a one-step deprotection from 3,4,5-trimethoxyphenol and a final purification step, as verified by HR-MS. The strong polarity ruled out the detection of the native structure from liquid and gas chromatography based setups, so that trimethylsilylation was chosen for detection with coupled GC–MS². Prior, the stability of the synthesized material was

tested in the above singlet-oxygen incubations without phenol. As expected from the extremely electron-rich structure, no THOB was detected under the strong oxidative conditions with 500- and 50-fold molar excess of singlet oxygen, while at 25- and 5-fold excess, at least about 35% of the added reference was recovered after extraction with ethyl acetate from the acidified deep brown incubations. Indeed, as a compromise of the fragmentation yield and stability, the formation of THOB was finally verified in trace levels in phloretin incubations with 25-fold excess of singlet oxygen. The spectrum of the silylated authentic reference was virtually identical to the material isolated from incubation mixtures. Figure 5 shows, e.g., the typical fragmentation pattern for silylated structures with a loss of a methyl (*m/z* 315) or silyloxy (*m/z* 342) group from the molpeak at *m/z* 430. Although the unstable nature forbids the detection of THOB on a quantitative basis, the present CID experiment must be evaluated as unequivocal proof of the fragmentation mechanism depicted in Figure 4.

DHC and DHC–Amide in Rooibos Tea and Protein Incubations. The relevance of the aspalathin degradation process to DHC and DHC–amide was tested in commercial rooibos tea samples. However, in comparison to above *in vitro* experiments, the situation in biological samples might be more complex as a result of the presence of other plant ingredients, such as phenolic compounds, and presumably microorganisms. In accordance to the above degradation mechanism, fermented rooibos samples showed higher amounts of both DHC and DHC–amide than green rooibos samples, reaching a maximum of 0.7 μmol of DHC/g (127 μg of DHC/g), paralleled by significantly lower concentrations of 0.35 nmol of DHC–amide/g (108.5 ng of DHC–amide/g) (Figure 6). While the difference of DHC was significant ($p < 0.01$), there was a clear trend for DHC–amide. Obviously, the oxidative conditions during the traditional fermentation process trigger the fragmentation reaction. Because cell maceration not only leads to the release of polyphenol oxidases but also all sorts of

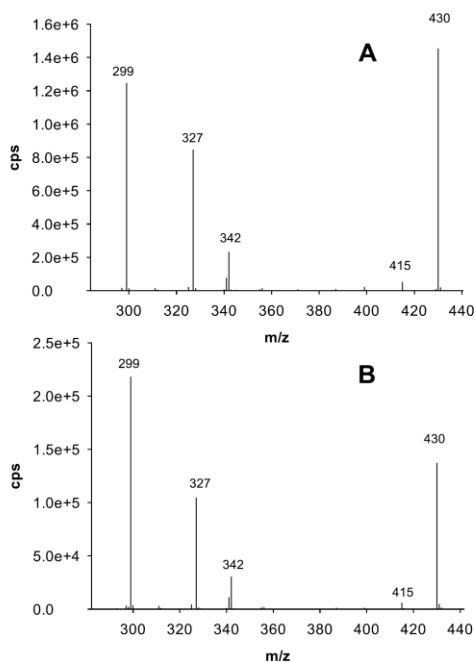


Figure 5. Product ion MS² of silylated 1,2,3,5-tetrahydroxybenzene in phloretin singlet-oxygen incubations by CID of m/z 430 M⁺: (A) authentic reference standard and (B) incubation after extraction and derivatization.

enzymes, including proteases, DHC–amide might also stem from protein–aspalathin modifications. To verify this hypothesis, aspalathin was incubated in the presence of BSA as a model protein under aerated conditions at pH 7 and 37 °C. After a multistep enzymatic hydrolysis of the isolated modified protein, the hydrolysate was analyzed by LC–MS/MS experiments. The resulting mass spectrum for DHC–amide showed virtually the identical fragmentation pattern as the

authentic reference, thus unequivocally verifying the covalent interaction between protein and DHC (Figure 7).

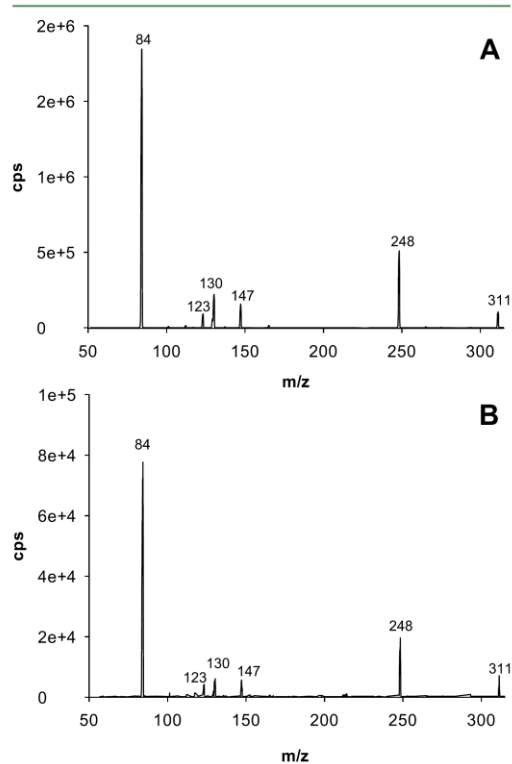


Figure 7. Product ion MS² of DHC–amide isolated from aspalathin–BSA incubations by CID of m/z 311 [M + H]⁺: (A) authentic reference standard and (B) incubation after enzymatic hydrolysis.

There have been many studies dealing with non-covalent interactions between phenolic compounds and proteins, but

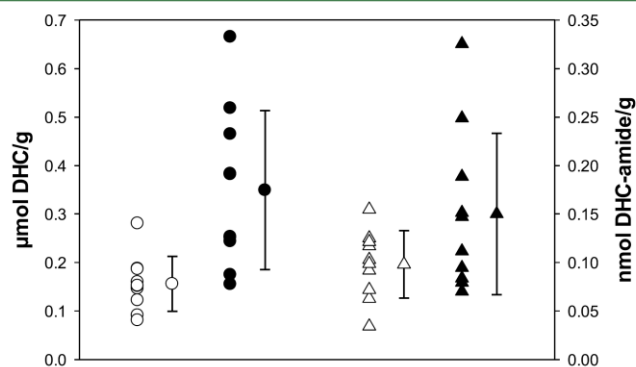


Figure 6. Content of DHC in unfermented (○) and fermented (●) rooibos tea and DHC–amide in unfermented (△) and fermented (▲) rooibos tea ($n = 10$; each symbol represents an individual rooibos tea sample; right columns, mean value \pm standard deviation).

the topic of covalent modification with respect to discrete structures remains barely investigated. In general, it is thought that the latter is initiated by spontaneous oxidation of the phenolic compound to its respective *o*-quinone in alkaline solutions or enzymatic oxidation triggered by polyphenol oxidases during enzymatic browning reactions. *o*-Quinone may then react with the nucleophilic side chains of proteins.² Initial work was performed by Pierpoint, and Mason et al. investigating enzymatically oxidized phenolic compounds in the presence of different amino acids at moderate temperatures by photo- and manometric means. Their results indicated that *o*-quinones primarily react with the thiol group of cysteine, the ϵ -amino group of lysine, and the α -amino groups of other amino acids, whereas amide, guanidine, and seryl hydroxyl groups showed no reactions.^{29,30} Heated solutions of glycine with catechin under oxidative conditions at 120 °C resulted in the formation of various adducts tentatively characterized by mass spectrometry.³¹ In recent studies on protein modification in ultrahigh-temperature-processed milk after the addition of epigallocatechin-gallate-enriched green tea extract³² and stored honey,³³ the formation of polyphenol–protein adducts was detected by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) with nitroblue tetrazolium staining. These adducts were argued by the formation of quinone–protein adducts, but no discrete structures were identified. Kroll et al. reported interactions between the lysine and tryptophan side chains of myoglobin with different phenolic compounds. To initiate phenol oxidation, the incubations were carried out at a pH of 9.^{2,34,35} Rawel et al. also described adduct formation of lysine and tryptophan in whey proteins³⁶ and the interaction of cysteine, lysine, and tryptophan in soy proteins using a similar approach.³⁷ Unfortunately, no discrete structures were isolated, and the proposed interactions of lysine, cysteine, and tryptophan were indicated by the change of free amino groups and free thiol groups and the change in the fluorescence of tryptophan, respectively. pH is a crucial point in those studies because higher pH initiates oxidation of the phenolic compounds but also results in an enhanced availability of the amine nucleophiles.³⁸ Cysteine is known to inhibit enzymatic browning by forming colorless adducts with several phenolic substrates, such as caffeic acid,³⁹ chlorogenic acid, and catechin.^{3,40} In a previous study, we investigated the enzymatic oxidation of gallic acid and catechin in the presence of arginine, lysine, or cysteine in model incubations at pH 6.5. Incubations containing lysine or arginine did not lead to any amino acid adducts. In contrast, cysteine incubations showed the formation of 2'-cysteinylyl catechin and 5'-cysteinylyl catechin, which were further degraded to two novel dihydrobenzothiazine carboxylic acid derivatives.⁴¹ Jongberg et al. investigated the formation of thiol–quinone adducts in model incubations of 4-methyl-1,2-benzoquinone, prepared from chemical oxidation of 4-methylcatechol with periodate or Fe(II)/H₂O₂. Indeed, in the presence of glutathione, BSA, or myofibrillar protein isolates from meat at pH 5.8, the formation of the cysteine–quinone adduct was identified according to UV spectra and LC–MS analyses after acidic hydrolysis and separation on RP-C18 columns.³⁸

In contrast, the present paper on aspalathin degradation establishes a novel mechanism for the formation of polyphenol–protein adducts initiated by singlet oxygen, independent of *o*-quinone intermediates. Under mild conditions of pH 7 and moderate temperatures, the formation of

DHC and DHC–amide was verified in protein incubations and also rooibos. Further studies will show if this unique oxidative rearrangement–fragmentation reaction can be transferred to other polyphenolic compounds.

■ ASSOCIATED CONTENT

SI Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.9b07689>.

Degradation pathways of aspalathin (Figure SI-1) (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Marcus A. Glomb – *Institute of Chemistry, Food Chemistry, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg 06120 Halle/Saale, Germany*; orcid.org/0000-0001-8826-0808; Email: marcus.glomb@chemie.uni-halle.de; Fax: ++049-345-5527341

Authors

Nils Mertens – *Institute of Chemistry, Food Chemistry, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg 06120 Halle/Saale, Germany*; orcid.org/0000-0002-9769-1340

Thomas Heymann – *Institute of Chemistry, Food Chemistry, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg 06120 Halle/Saale, Germany*; orcid.org/0000-0002-9472-8611

Complete contact information is available at: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.9b07689>

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. D. Ströhl from the Institute of Organic Chemistry, Halle, Germany, for recording NMR spectra and Dr. A. Frolov and M. Dorn from the Leibniz Institute of Plant Biochemistry, Halle, Germany, for performing accurate mass analysis.

■ ABBREVIATIONS USED

DHC, dihydrocaffeic acid; DHC–amide, dihydrocaffeic acid lysine amide; BSA, bovine serum albumin; THOB, 1,2,3,5-tetrahydroxybenzene

■ REFERENCES

- (1) Ozdal, T.; Capanoglu, E.; Altay, F. A review on protein–phenolic interactions and associated changes. *Food Res. Int.* **2013**, *51*, 954–970.
- (2) Kroll, J.; Rawel, H. M.; Rohn, S. Reactions of Plant Phenolics with Food Proteins and Enzymes under Special Consideration of Covalent Bonds. *Food Sci. Technol. Res.* **2003**, *9*, 205–218.
- (3) Bittner, S. When quinones meet amino acids: Chemical, physical and biological consequences. *Amino Acids* **2006**, *30*, 205–224.
- (4) Stander, M. A.; Van Wyk, B.-E.; Taylor, M. J. C.; Long, H. S. Analysis of Phenolic Compounds in Rooibos Tea (*Aspalathus linearis*) with a Comparison of Flavonoid-Based Compounds in Natural Populations of Plants from Different Regions. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 10270–10281.
- (5) Joubert, E.; De Beer, D. Rooibos (*Aspalathus linearis*) beyond the farm gate: From herbal tea to potential phytopharmaceutical. *S. Afr. J. Bot.* **2011**, *77*, 869–886.

- (6) Von Gadow, A.; Joubert, E.; Hansmann, C. F. Comparison of the Antioxidant Activity of Aspalathin with That of Other Plant Phenols of Rooibos Tea (*Aspalathus linearis*), α -Tocopherol, BHT, and BHA. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 632–638.
- (7) Kawano, A.; Nakamura, H.; Hata, S.-i.; Minakawa, M.; Miura, Y.; Yagasaki, K. Hypoglycemic effect of aspalathin, a rooibos tea component from *Aspalathus linearis*, in type 2 diabetic model db/db mice. *Phytomedicine* **2009**, *16*, 437–443.
- (8) Schulz, H.; Joubert, E.; Schütze, W. Quantification of quality parameters for reliable evaluation of green rooibos (*Aspalathus linearis*). *Eur. Food Res. Technol.* **2003**, *216*, 539–543.
- (9) Krafczyk, N.; Heinrich, T.; Porzel, A.; Glomb, M. A. Oxidation of the Dihydrochalcone Aspalathin Leads to Dimerization. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 6838–6843.
- (10) Heinrich, T.; Willenberg, I.; Glomb, M. A. Chemistry of Color Formation during Rooibos Fermentation. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 5221–5228.
- (11) De Beer, D.; Tobin, J.; Walczak, B.; Van Der Rijst, M.; Joubert, E. Phenolic composition of rooibos changes during simulated fermentation: Effect of endogenous enzymes and fermentation temperature on reaction kinetics. *Food Res. Int.* **2019**, *121*, 185–196.
- (12) Krafczyk, N.; Glomb, M. A. Characterization of Phenolic Compounds in Rooibos Tea. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 3368–3376.
- (13) Hattori, M.; Shu, Y.-Z.; El-Sedawy, A. I.; Namba, T.; Kobashi, K.; Tomimori, T. Metabolism of Homoorientin by Human Intestinal Bacteria. *J. Nat. Prod.* **1988**, *51*, 874–878.
- (14) Muller, C. J. F.; Malherbe, C. J.; Chellan, N.; Yagasaki, K.; Miura, Y.; Joubert, E. Potential of rooibos, its major C-glucosyl flavonoids, and Z-2-(β -D-glucopyranosyloxy)-3-phenylpropenoic acid in prevention of metabolic syndrome. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2018**, *58*, 227–246.
- (15) De Beer, D.; Malherbe, C. J.; Beelders, T.; Willenburg, E. L.; Brand, D. J.; Joubert, E. Isolation of aspalathin and nothofagin from rooibos (*Aspalathus linearis*) using high-performance countercurrent chromatography: Sample loading and compound stability considerations. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1381*, 29–36.
- (16) Gellett, A. M.; Huber, P. W.; Higgins, P. J. Synthesis of the unnatural amino acid N_{α} - N_{ϵ} -(ferrocene-1-acetyl)-L-lysine: A novel organometallic nuclease. *J. Organomet. Chem.* **2008**, *693*, 2959–2962.
- (17) Paizs, C.; Bartlewski-Hof, U.; Rétey, J. Investigation of the Mechanism of Action of Pyrogallol–Phloroglucinol Transhydroxylase by Using Putative Intermediates. *Chem. - Eur. J.* **2007**, *13*, 2805–2811.
- (18) Fan, X.; Potluri, V. K.; McLeod, M. C.; Wang, Y.; Liu, J.; Enick, R. M.; Hamilton, A. D.; Roberts, C. B.; Johnson, J. K.; Beckman, E. J. Oxygenated Hydrocarbon Ionic Surfactants Exhibit CO₂ Solubility. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11754–11762.
- (19) Smuda, M.; Henning, C.; Raghavan, C. T.; Johar, K.; Vasavada, A. R.; Nagaraj, R. H.; Glomb, M. A. Comprehensive Analysis of Maillard Protein Modifications in Human Lenses: Effect of Age and Cataract. *Biochemistry* **2015**, *54*, 2500–2507.
- (20) Fleschhut, J.; Kratzer, F.; Rechkemmer, G.; Kulling, S. E. Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro. *Eur. J. Nutr.* **2006**, *45*, 7–18.
- (21) Guthrie, J. P.; Cossar, J.; Cullimore, P. A.; Kamkar, N. M.; Taylor, K. F. The retroaldol reaction of chalcone. *Can. J. Chem.* **1983**, *61*, 2621–2626.
- (22) Smuda, M.; Glomb, M. A. Fragmentation Pathways during Maillard-Induced Carbohydrate Degradation. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 10198–10208.
- (23) Smuda, M.; Glomb, M. A. Maillard Degradation Pathways of Vitamin C. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *52*, 4887–4891.
- (24) Escarpa, A.; González, M. High-performance liquid chromatography with diode-array detection for the determination of phenolic compounds in peel and pulp from different apple varieties. *J. Chromatogr. A* **1998**, *823*, 331–337.
- (25) Le Guernevé, C.; Sanoner, P.; Drilleau, J.-F.; Guyot, S. New compounds obtained by enzymatic oxidation of phloridzin. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 6673–6677.
- (26) Aubry, J. M.; Cazin, B. Chemical sources of singlet oxygen. 2. Quantitative generation of singlet oxygen from hydrogen peroxide disproportionation catalyzed by molybdate ions. *Inorg. Chem.* **1988**, *27*, 2013–2014.
- (27) Renz, M.; Meunier, B. 100 Years of Baeyer–Villiger Oxidations. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 1999, 737–750.
- (28) Penning, T. M. Genotoxicity of ortho-quinones: Reactive oxygen species versus covalent modification. *Toxicol. Res.* **2017**, *6*, 740–754.
- (29) Pierpoint, W. S. o-Quinones formed in plant extracts. Their reactions with amino acids and peptides. *Biochem. J.* **1969**, *112*, 609–616.
- (30) Mason, H. S.; Peterson, E. W. Melanoproteins I. Reactions between enzyme-generated quinones and amino acids. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **1965**, *111*, 134–146.
- (31) Guerra, P. V.; Yaylayan, V. A. Interaction of Flavanols with Amino Acids: Postoxidative Reactivity of the B-Ring of Catechin with Glycine. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 3831–3836.
- (32) Jansson, T.; Rauh, V.; Danielsen, B. P.; Poojary, M. M.; Waehrens, S. S.; Bredie, W. L. P.; Sørensen, J.; Petersen, M. A.; Ray, C. A.; Lund, M. N. Green Tea Polyphenols Decrease Strecker Aldehydes and Bind to Proteins in Lactose-Hydrolyzed UHT Milk. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 10550–10561.
- (33) Brudzynski, K.; Sjaarda, C.; Maldonado-Alvarez, L. A New Look on Protein–Polyphenol Complexation during Honey Storage: Is This a Random or Organized Event with the Help of Dirigent-Like Proteins? *PLoS One* **2013**, *8*, e72897.
- (34) Kroll, J.; Rawel, H. M.; Seidelmann, N. Physicochemical Properties and Susceptibility to Proteolytic Digestion of Myoglobin–Phenol Derivatives. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 1580–1587.
- (35) Kroll, J.; Rawel, H. M. Reactions of Plant Phenols with Myoglobin: Influence of Chemical Structure of the Phenolic Compounds. *J. Food Sci.* **2001**, *66*, 48–58.
- (36) Rawel, H. M.; Kroll, J.; Hohl, U. C. Model studies on reactions of plant phenols with whey proteins. *Nahrung* **2001**, *45*, 72–81.
- (37) Rawel, H. M.; Czajka, D.; Rohn, S.; Kroll, J. Interactions of different phenolic acids and flavonoids with soy proteins. *Int. J. Biol. Macromol.* **2002**, *30*, 137–150.
- (38) Jongberg, S.; Gislasen, N. E.; Lund, M. N.; Skibsted, L. H.; Waterhouse, A. L. Thiol–Quinone Adduct Formation in Myofibrillar Proteins Detected by LC-MS. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 6900–6905.
- (39) Bassil, D.; Makris, D. P.; Kefalas, P. Oxidation of caffeic acid in the presence of L-cysteine: Isolation of 2-S-cysteinylcaffeic acid and evaluation of its antioxidant properties. *Food Res. Int.* **2005**, *38*, 395–402.
- (40) Richard, F. C.; Goupy, P. M.; Nicolas, J. J.; Lacombe, J. M.; Pavia, A. A. Cysteine as an inhibitor of enzymic browning. I. Isolation and characterization of addition compounds formed during oxidation of phenolics by apple polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39*, 841–847.
- (41) Mertens, N.; Mai, F.; Glomb, M. A. Influence of Nucleophilic Amino Acids on Enzymatic Browning Systems. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 1719–1725.

Reprinted with permission from Mertens, N.; Heymann, T.; Glomb, M. A. Oxidative Fragmentation of Aspalathin Leads to the Formation of Dihydrocaffeic Acid and the Related Lysine Amide Adduct. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2020**, *68*, 13111–13120. Copyright 2020 American Chemical Society

5.3 Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69, 15345 - 15353

JOURNAL OF
**AGRICULTURAL AND
FOOD CHEMISTRY**

pubs.acs.org/JAFC

Article

Benzothiazines as Major Intermediates in Enzymatic Browning Reactions of Catechin and Cysteine

Nils Mertens, Vanessa Fokuhl, and Marcus A. Glomb*

Cite This: *J. Agric. Food Chem.* 2021, 69, 15345–15353

Read Online

ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: The course of melanin formation is yet not thoroughly resolved on a mechanistic level. With the present study, incubations of catechin (CA)- and cysteine-derived dihydro-1,4-benzothiazine carboxylic acid derivatives were investigated for colored products during enzymatic browning. Analyses by high-performance liquid chromatography (HPLC)–mass spectrometry revealed the formation of two novel decarboxylated dihydro-1,4-benzothiazine derivatives [8-(3,5,7-trihydroxy-3,4-dihydro-2H-chromen-2-yl)-5-hydroxy-3,4-dihydro-2H-benzothiazine and 7-(3,5,7-trihydroxy-3,4-dihydro-2H-chromen-2-yl)-5-hydroxy-3,4-dihydro-2H-benzothiazine] preferentially under acidic conditions. Furthermore, in model reactions under neutral pH, a colored phenazine dimer intermediate was isolated by high-performance countercurrent chromatography and preparative HPLC when conducting the incubations in the presence of *o*-phenylenediamine (OPD). Mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy unequivocally verified the structure as (12*E*)-5,5'-dioxo-11a,11a'-bis(3,5,7-trihydroxy-3,4-dihydro-2H-chromen-2-yl)-3,3',4,4',5a,5a',6,6',11,11',11a,11a'-dodecahydro-2*H*,2'*H*,5*H*,5'*H*-12,12'-bi[1,4]thiazino[2,3-*b*]phenazine-3,3'-dicarboxylic acid. Enzymatically catalyzed incubations under aeration starting from the initial CA–cysteine adducts and their follow-up dihydro-1,4-benzothiazine carboxylic acids, respectively, proved that the unstable colored compound was a trichochrome-like reaction intermediate of the browning reaction cascade which can be trapped by postincubation with OPD, thus verifying their direct mechanistic relationship.

KEYWORDS: enzymatic browning, polyphenol–amino acid adducts, high-performance countercurrent chromatography, dihydrobenzothiazine, *o*-phenylenediamine

INTRODUCTION

Color and appearance of fruits and vegetables significantly influence the customer's buying and consumption behavior. Texture and color changes are commonly traceable to the destruction of the cell structure of plant-based foods during transport and postharvest manufacturing processes. These changes are generally summed up under the topic of enzymatic browning, a complex cascade with interacting enzymatic and nonenzymatic reactions.¹ In general, these processes are initiated by oxidation of phenolic compounds by polyphenol oxidases to highly reactive electrophilic *o*-quinones and followed by nonenzymatic reactions with various nucleophiles such as the nucleophilic groups of amino acids or proteins or other polyphenols leading to brown polymeric melanins.² Studies of Pierpoint and Mason and Peterson on enzymatically oxidized phenolic compounds in the presence of different amino acids indicated that the ϵ -amino group of lysine, the thiol group of cysteine, and the α -amino groups of other amino acids are primarily involved in the reaction with *o*-quinones, while amide, guanidine, and seryl hydroxyl groups showed no reactions.^{3,4} The formed polyphenol–amino acid adducts are thought to affect the color of foods,² but, as previously reported, the specific interaction of amino acids and plant polyphenols in enzymatic browning reactions with regard to the formation of discrete colored structures and their mechanistic background is hardly investigated.⁵ Furthermore, cysteine plays an important role in both the inhibition of

enzymatic browning reactions in plant-based foods^{6,7} and melanogenesis, a specific pathway of enzymatic browning in the pigmentation process of animals.

In recent years, significant advances in the field of melanogenesis with regard to formation mechanisms and structure elucidation were made. The initial step of melanogenesis combines the hydroxylation of tyrosine to dihydroxyphenylalanine (DOPA) and the subsequent oxidation to dopaquinone (Figure S1, Supporting Information). The process then diverges into eumelanogenesis or pheomelanogenesis depending on pH^{8,9} and on the presence of cysteine. Eumelanogenesis occurring in the absence of cysteine involves intramolecular cyclization of dopaquinone leading to black-brownish 5,6-dihydroxyindole-derived eumelanins.¹⁰ In contrast, the involvement of cysteine in pheomelanogenesis leads to the addition of cysteine to dopaquinone producing different cysteinyl-dopa isomers. In the next step, cysteinyl-dopa is oxidized via redox cycling reactions to cysteinyl dopaquinone which subsequently cyclizes to a quinone imine, which on the one hand undergoes rearrangement with or without decarbox-

Received: October 8, 2021
Revised: November 23, 2021
Accepted: November 24, 2021
Published: December 10, 2021



ylation forming 1,4-benzothiazine or 1,4-benzothiazine-3-carboxylic acid, respectively, or on the other hand is reduced via redox cycling reactions to 3,4-dihydro-1,4-benzothiazine-3-carboxylic acid. Final pigment formation is generally viewed as an oxidative polymerization of cysteinyl-dopa reaction isomers with the 3,4-dihydro-1,4-benzothiazine-3-carboxylic acid species regarded as the last major isolatable intermediates in the course of pheomelanogenesis.¹¹ In the further reaction steps, these benzothiazine intermediates may undergo mechanisms such as decarboxylation, ring contraction to benzothiazole intermediates, and finally polymerization to the yellow-to-reddish-brown-colored pheomelanins.¹⁰ A first approach to elucidate the structural moieties of pheomelanins and to compare the composition of synthetic pheomelanin prepared from DOPA and cysteine with naturally occurring pheomelanins in hair and feathers was based on the degradation by reductive hydrolysis with hydroiodic acid and alkaline H₂O₂ oxidation, respectively. The results showed that 4-amino-3-hydroxyphenylalanine, a degradation product induced by hydroiodic acid hydrolysis, serves as a marker for 3-oxo-dihydrobenzothiazine and benzothiazine moieties and that thiazole-4,5-dicarboxylic acid represents a marker for the benzothiazole moiety after alkaline H₂O₂ oxidation. Thus, the ratio of the degradation products indicated that red human hair and red chicken feathers compared to synthetic pheomelanin and yellow mouse hair contain higher concentrations of the benzothiazole moiety.¹²

In our previous study, we established catechin (CA)-derived dihydro-1,4-benzothiazine carboxylic acid derivatives as novel intermediates in the color formation process during cysteine-driven enzymatic browning model reactions based on CA and gallic acid simulating the fermentation of black tea.⁵ Hence, the aim of the present study was to clarify their impact on color formation and to elucidate the reaction mechanisms leading to colored pigments using *o*-phenylenediamine (OPD) to stabilize transient intermediates.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. All chemicals of the highest quality available were provided by Sigma-Aldrich (Munich/Steinheim, Germany), Fluka (Taufkirchen, Germany), Merck (Darmstadt, Germany), VWR Chemicals (Darmstadt, Germany), Acros Organics (Geel, Belgium), and ARMAR Chemicals (Leipzig, Germany) unless otherwise indicated. For all experiments, ultrapure water (Ultra Clear, Siemens) was used.

2'-Cysteinyl CA (A1), 5'-cysteinyl CA (A2) (Figure S2, Supporting Information), 8-(3,5,7-trihydroxy-3,4-dihydro-2H-chromen-2-yl)-5-hydroxy-3,4-dihydro-2H-benzothiazine-3-carboxylic acid (B1), and 7-(3,5,7-trihydroxy-3,4-dihydro-2H-chromen-2-yl)-5-hydroxy-3,4-dihydro-2H-benzothiazine-3-carboxylic acid (B2) were isolated from incubations of nashi-polyphenol oxidase (PPO), CA, and cysteine using high-performance countercurrent chromatography (HPCCC) and preparative high-performance liquid chromatography (HPLC) as previously reported.⁵ 8-(3,5,7-Trihydroxy-3,4-dihydro-2H-chromen-2-yl)-5-hydroxy-3,4-dihydro-2H-benzothiazine (C1) and 7-(3,5,7-trihydroxy-3,4-dihydro-2H-chromen-2-yl)-5-hydroxy-3,4-dihydro-2H-benzothiazine (C2) were isolated from incubations of B1 and B2, respectively, in diluted formic acid (formic acid/water, 1:19, v/v) using preparative HPLC. (12E)-5,5'-Dioxo-11a,11a'-bis(3,5,7-trihydroxy-3,4-dihydro-2H-chromen-2-yl)-3,3',4,4',5a,5a',6,6',11,11',11a,11a'-dodecahydro-2H,2'H,5H,5'H-12,12'-bi[1,4]thiazino[2,3-b]phenazine-3,3'-dicarboxylic acid (P2) was isolated from incubations of B2 and OPD using HPCCC and preparative HPLC (see below).

Nashi Pear Homogenate (Nashi-Polyphenol Oxidase). The nashi pear homogenate was prepared according to Mertens et al.⁵

Dihydrobenzothiazine Carboxylic Acid Model Incubations. Mixtures containing either B1 or B2 (10 mM) were incubated in soda/HCl-buffer (1.059 g of soda was dissolved in 100 mL of water and adjusted to pH 10.8 with 0.1 M HCl), phosphate buffer (0.2 M, pH 6.5), acetate buffer (pH 5.5), and in diluted formic acid (water/formic acid, v/v, 19:1, pH 1.33), respectively, in falcon tubes at 37 °C in a thermostatic shaker (New Brunswick Scientific, Nürtingen, Germany). Aliquots of 100 μL were collected each hour. Each sample was instantly stored at -20 °C until further analyses. For preparative isolation of C1 and C2, 10 mL aliquots of the diluted formic acid setup were incubated for 24 h, freeze-dried, and subjected to preparative HPLC.

Incubations of Dihydrobenzothiazine Carboxylic Acids with OPD. Mixtures containing either B1 or B2 (8 mM) and OPD (18.5 mM) were dissolved in phosphate buffer (0.2 M, pH 6.5) and incubated at 37 °C in a shaker for 24 h. Aliquots of 100 μL were collected each hour. Each sample was instantly stored at -20 °C until further analyses. For preparative isolation of P2, freeze-dried 1 g aliquots were subjected to HPCCC.

Incubations of Catechin–Cysteine Adducts with Post-incubation of OPD. Mixtures containing either A1 or A2 (15 mM) in the presence of CA (6 mM) dissolved in nashi-PPO were incubated in 2 mL Eppendorf tubes at room temperature (pH 6.5). A total of 100 μL of NaF in water (8 mM) was added to a 100 μL aliquot to stop the enzymatic reaction. To another 100 μL aliquot, 100 μL of OPD (25 mM) dissolved in phosphate buffer (0.2 M, pH 6.5) was added and reincubated at 37 °C in a shaker for 3 and 24 h. Each sample was instantly stored at -20 °C until further analyses.

Incubation of P2. A mixture containing P2 (0.5 mM) in phosphate buffer (0.2 M, pH 6.5) was incubated at 37 °C in a shaker for 1 week. Aliquots of 100 μL were collected at 0, 6, 24, 72, and 168 h.

Analytical HPLC–Diode Array Detection–Mass Spectrometry. A Jasco PU-2080 Plus quaternary gradient pump with a degasser (DG-2080-54), a quaternary gradient mixer (LG 2080-02), a multiwavelength detector (MD-2015 Plus) (Jasco, Gross-Umstadt, Germany), a Waters 717 plus autosampler (Waters, Milford, MA), and a column oven (Techlab Jet Stream np K-3) was used. Chromatographic separations were performed on stainless-steel columns (Vydac CRT, 201TP54, 250 × 4.6 mm, RP-18, 5 μm, Hesperia, CA) using a flow rate of 1.0 mL/min. The mobile phase consisted of water (solvent A) and MeOH/water (7:3, v/v, solvent B). 0.8 mL/L formic acid was added to both solvents (A and B). For analyses of the cysteinyl–CA adduct (A1/A2) incubations, samples were analyzed using the following gradient system: samples were injected at 10% B and held for 10 min. The gradient was changed linear to 65% B in 55 min, to 100% B after 5 min, and held at 100% B for 10 min. The column temperature was always 25 °C. The effluent was monitored at 220, 280, and 400 nm (A1, *t_R* = 12 min; A2, *t_R* = 14 min; CA, *t_R* = 20 min; B1, *t_R* = 32 min; B2, *t_R* = 42 min; hump, *t_R* = 68–78 min). For analyses of the dihydro-1,4-benzothiazine carboxylic acid incubations and incubations containing OPD, samples were analyzed using the following gradient system: samples were injected at 25% B and held for 10 min. The gradient was changed linear to 50% B in 15 min, to 100% B after 5 min, and held at 100% B for 10 min. The column temperature was always 25 °C. The effluent was monitored at 220, 280, and 400 nm (OPD, *t_R* = 4 min; B1, *t_R* = 12 min; B2, *t_R* = 23 min; P1, *t_R* = 7 min; P2, *t_R* = 21 min; P3, *t_R* = 26 min; P4, *t_R* = 33 min; hump, *t_R* = 30–36 min). For qualitative peak assignment, the eluent was directly coupled to the mass spectrometer: Applied Biosystems API 4000 quadrupole instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA). Mass spectrometry (MS) ionization was achieved using a turbospray ionization source operated in the negative-ion mode. The settings were as follows: curtain gas (N₂) at 30 psi, ion source gas 1 at 50 psi, ion source gas 2 at 60 psi, source temperature at 550 °C, declustering potential at -45 V, entrance potential at -10 V, and ion spray voltage at 4500 V. A scan range between *m/z* 100 and 1400 was used for the Q1 mode (C1, *m/z* 346 [M - H]⁻; C2, *m/z* 346 [M -

H⁻; P2, *m/z* 989 [M - H]⁻). For quantitation with HPLC–diode array detection (DAD), an external calibration based on standard solutions of authentic isolated references dissolved in water was used. P2 was quantitated in reference to the calibration curve of B2.

High-Performance Countercurrent Chromatography. An HPLCC system (HPLCC Spectrum Series 20, Dynamic Extractions, Tredegar, Wales) was equipped with a Jasco PU-4180 RPLC Pump and a Jasco ultraviolet (UV) detector (UV-2075 Plus, Jasco, Gross-Umstadt, Germany) operating at 430 nm. Eluted liquids were collected in fractions of 15 mL with a fraction collector (LKB Ultracrac 7000, LKB-Produkte AB, Stockholm-Bromma, Sweden). Chromatograms were recorded on a plotter (Servogor 200, GMC, Nürnberg, Germany). The total volume of the coil was 140 mL. HPLCC was run at a revolution speed of 1600 rpm and a flow rate of 6 mL/min of the upper organic phase in tail-to-head modus. Samples of 1 g of freeze-dried incubations were dissolved in a 1:1 mixture of light (organic) and heavy (aqueous) phase (6 mL) and injected via a 6 mL sample loop. Incubations were separated using ethyl acetate/water (1:1, v/v) with 0.8 mL/L formic acid (P2, *t_R* = 17–35 min; P4, *t_R* = 17–35 min; P1 and P3 were collected from the retained stationary phase). The solvent of the collected fractions was instantly evaporated under reduced pressure at 30 °C and freeze-dried. The dried residues were used for preparative HPLC–UV.

Preparative HPLC–UV. A Besta pump (Besta, Wilhelmsfeld, Germany) was used at a flow rate of 16 mL/min with a Knauer degasser (Knauer, Berlin, Germany) and a Jasco UV detector (UV-2075 Plus, Jasco, Gross-Umstadt, Germany) set at 310 nm. For P2, up to 20 mg of the dried collected fractions from HPLCC was injected. Chromatographic separations were performed on a stainless-steel column (Vydac CRT, 218TP1022, 250 × 20 mm, RP-18, 10 μm, Hesperia, CA). The mobile phases used were solvents A and B identical to the HPLC–DAD system. An isocratic method was chosen according to the characteristics of the target compounds (C1, 20% B, *t_R* = 27–45 min; C2, 30% B, *t_R* = 32–52 min; P2, 30% B, *t_R* = 33–53 min). The solvents of the collected fractions were instantly removed under reduced pressure at 30 °C, freeze-dried, and stored at –20 °C.

High-Resolution Mass Determination (HR-MS). Negative- and positive-ion high-resolution ESI mass spectra were obtained from an Orbitrap Elite mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) equipped with an HESI electrospray ion source (spray voltage 4 kV; capillary temperature 275 °C, source heater temperature 40 °C; and FTMS resolution > 30,000). Nitrogen was used as a sheath and auxiliary gas. The sample solutions were introduced continuously via a 500 μL Hamilton syringe pump with a flow rate of 5 μL/min. The data were evaluated using the Xcalibur software 2.7 SP1.

Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded on a Varian Unity Inova 500 instrument operating at 500 MHz for ¹H and 125 MHz for ¹³C in CD₃OD or D₂O. SiMe₄ was used as a reference for calibrating the chemical shift.

Statistical Analysis. Analyses were performed at least in triplicate and resulted in coefficients of variation less than 5%.

RESULTS AND DISCUSSION

Dihydrobenzothiazine Carboxylic Acid Incubations at Different pH. As there is a pH dependency in the course of pheomelanogenesis,⁹ CA-derived dihydro-1,4-benzothiazine carboxylic acid derivatives B1 and B2 were incubated at different pH for 24 h to gain deeper insights into the consecutive reactions. Alkaline conditions proved as too harsh as an immediate violet coloration of the initial pale pink incubations occurred, and a fast and total degradation of both B1 and B2 after 2 h but no development of discrete colored structures was observed. Incubations at neutral (pH 6.5) and slight acidic (pH 5.5) pH showed slow degradation of B1 and B2 and the immediate emergence of a chromatographic hump as a measure for the formation of higher molecular

compounds. Simultaneously, two novel structures, the decarboxylated dihydro-1,4-benzothiazine derivatives C1 and C2, were detectable in trace amounts, where C1 originated from B1 and C2 from B2, respectively. This conversion was promoted under strong acidic conditions in diluted formic acid (pH 1.3); the formation of C1 and C2 started slowly after 6 h with a strong increase after 8 h (Figure 1). After 24 h of

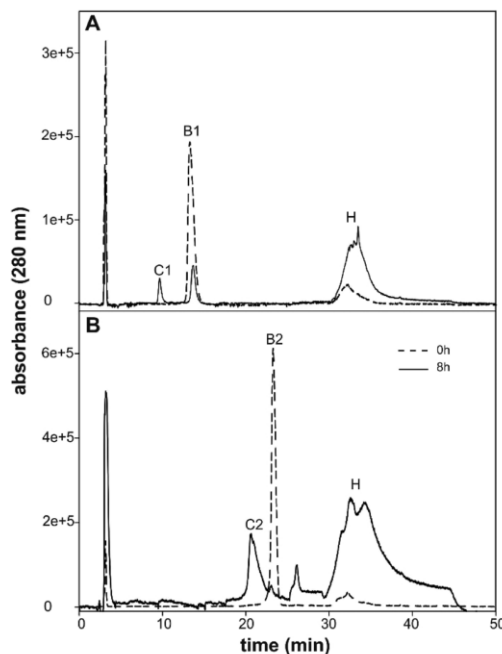


Figure 1. Incubation of dihydro-1,4-benzothiazine carboxylic acids (A) B1 or (B) B2 in diluted formic acid; C1/C2: decarboxylated benzothiazines; and H: chromatographic hump.

incubation, B1 and B2 were completely degraded and only C1 and C2 and the chromatographic hump were detectable with a turnover rate of 30% for the reduced and decarboxylated benzothiazines. In contrast to the alkaline incubations, these incubations showed a red coloration intensifying with the decline in the incubation pH, but no discrete colored compounds were detectable. The pH dependence of the coloration may indicate the formation of trichochrome-like structures as these compounds exhibit pH-dependent absorption maxima;¹³ however, no suchlike structures were detectable.

Isolation and Elucidation of C1 and C2. Because of the high turnover rate in diluted formic acid, this incubation system was used for isolation of C1 and C2. Both compounds were directly isolated from the incubations by preparative HPLC. As known from the previous reported isolation of cysteinyl–CA adducts A1 and A2 and the corresponding dihydro-1,4-benzothiazine carboxylic acid derivatives B1 and B2, decarboxylated dihydro-1,4-benzothiazines C1 and C2 also exhibited a high reactivity leading to colored degradation products.⁵ Thus, the obtained fractions had to be immediately freeze-dried after the removal of the organic solvent to give

Table 1. High-Resolution Mass and ¹H- and ¹³C NMR Spectroscopic Data of C1 and C2 in CD₃OD

8-(3,5,7-trihydroxy-3,4-dihydro-2H-chromen-2-yl)-3,4-dihydro-5-hydroxy-2H-benzothiazine (C1)				7-(3,5,7-trihydroxy-3,4-dihydro-2H-chromen-2-yl)-3,4-dihydro-5-hydroxy-2H-benzothiazine (C2)			
				HR-MS [M+H] ⁺ (m/z) calcd. C ₁₇ H ₁₈ O ₅ NS		HR-MS [M+H] ⁺ (m/z) calcd. C ₁₇ H ₁₈ O ₅ NS	
		348.0903 348.0906				348.0891 348.0906	
C/H	δ ¹ H [ppm]	δ ¹³ C [ppm]	C/H	δ ¹ H [ppm]	δ ¹³ C [ppm]		
2 _A	2.99 (m, 2H) ^a	25.5	2 _A	3.04 (m, 2H) ^a	25.7		
2 _B	2.99 (m, 2H) ^a	25.5	2 _B	3.04 (m, 2H) ^a	25.7		
3 _A	3.58 (m, 1H)	41.6	3 _A	3.58 (m, 2H) ^a	41.5		
3 _B	3.66 (m, 1H)	41.6	3 _B	3.58 (m, 2H) ^a	41.5		
5	-	143.4	5	-	143.9		
6	6.48 (d, 1H) ³ J = 8.2 Hz	109.7	6	6.52 (d, 1H) ⁴ J = 1.8 Hz	108.8		
7	6.52 (d, 1H) ³ J = 8.2 Hz	115.0	7	-	127.8		
8	-	127.2	8	6.49 (d, 1H) ⁴ J = 1.8 Hz	117.1		
9	-	115.3	9	-	115.7		
10	-	131.0	10	-	130.8		
2'	5.02 (d, 1H) ³ J = 6.9 Hz	78.3	2'	4.46 (d, 1H) ³ J = 7.5 Hz	81.5		
3'	4.20 (ddd, 1H) ³ J = 5.0 Hz ³ J = 6.9 Hz ³ J = 7.1 Hz	65.7	3'	3.93 (ddd, 1H) ³ J = 5.4 Hz ³ J = 7.5 Hz ³ J = 8.0 Hz	67.3		
4' _A	2.55 (dd, 1H) ³ J = 7.1 Hz ² J = 16.1 Hz	26.1	4' _A	2.49 (dd, 1H) ³ J = 8.0 Hz ² J = 16.0 Hz	27.1		
4' _B	2.75 (dd, 1H) ³ J = 5.0 Hz ² J = 16.1 Hz	26.1	4' _B	2.85 (dd, 1H) ³ J = 5.4 Hz ² J = 16.0 Hz	27.1		
5'	-	156.2	5'	-	156.1		
6'	5.85 (d, 1H) ⁴ J = 2.1 Hz	93.4	6'	5.85 (d, 1H) ⁴ J = 2.4 Hz	94.1		
7'	-	156.4	7'	-	156.4		
8'	5.93 (d, 1H) ⁴ J = 2.1 Hz	94.8	8'	5.92 (d, 1H) ⁴ J = 2.4 Hz	94.9		
9'	-	155.6	9'	-	155.5		
10'	-	99.1	10'	-	99.4		

^aSignal was overlapped.

amorphous pinkish materials. The novel decarboxylated dihydro-1,4-benzothiazine derivatives showed an absorption maxima of 235, 284, and 303 nm. The elemental composition was verified by high-resolution MS (HR-MS) to deliver a pseudo-molecular ion at m/z 348.0903 [M + H]⁺ for C1 and at m/z 348.0891 [M + H]⁺ for C2 (m/z 348.0906 calcd for C₁₇H₁₈O₅NS).

The isolated material was unequivocally verified by ¹H NMR and ¹³C NMR attached proton test (APT) measurements, as well as homonuclear correlation spectroscopy (H₂H COSY), heteronuclear single quantum coherence, and heteronuclear multiple-bond correlation (HMBC) techniques (Table 1). C1 and C2 showed virtually identical NMR spectra compared to the published data of their respective carboxylated precursors except the missing carboxyl moiety.⁵ This decarboxylation is verified by the missing signal and HMBC correlations of former C-11. As the decarboxylation would theoretically lead

to the formation of an imine structure with one proton at C-3 and to a significant downfield shift of the respective signal, the two proton signals at C-3 with their respective resonances at a higher field indicate a consecutive reduction after decarboxylation. Thus, the structures of C1 and C2 were unequivocally identified as 8-(3,5,7-trihydroxy-3,4-dihydro-2H-chromen-2-yl)-5-hydroxy-3,4-dihydro-2H-benzothiazine and 7-(3,5,7-trihydroxy-3,4-dihydro-2H-chromen-2-yl)-5-hydroxy-3,4-dihydro-2H-benzothiazine, respectively.

Incubations of B1 and B2 with OPD. In our previous study, the formation of B1 and B2 was accompanied by the intensifying coloration of the incubation suggesting their importance as reactive intermediates in color formation mechanisms leading to the formation of unknown colored structures visualized by the emergence of a chromatographic hump.⁵ As OPD proved as an effective agent to stabilize reactive intermediates such as 2-acetyl-1-pyrroline¹⁴ and

colored dibenzofuran structures¹⁵ in previous studies of our working group, B1 and B2 were incubated at pH 6.5 in the presence of an excess of OPD to trap transient intermediates in the degradation and color formation process, respectively. Furthermore, OPD as a nitrogen analogue *o*-hydroquinone exhibits a high redox activity enabling it to promote oxidative degradation of the benzothiazines. Both incubations led to coloration, but the experiment with B1 showed solely a decrease in B1 and the emergence of the chromatographic hump but no discrete new signals. As opposed to this, incubations of B2 gave four signals exhibiting absorption maxima above 400 nm (P1–P4) during complete degradation of B2 after 24 h (Figure 2). Due to its known high redox

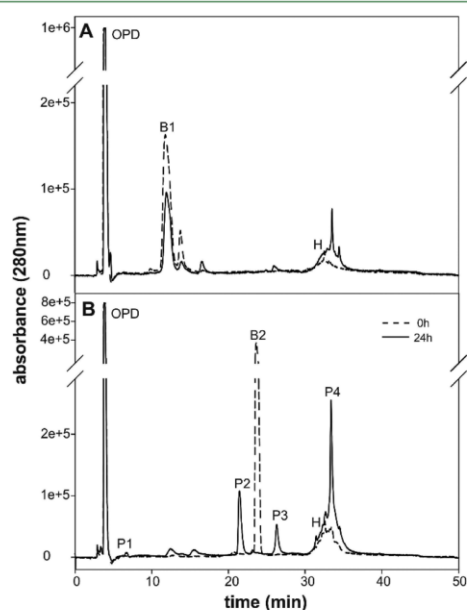


Figure 2. Incubation of dihydro-1,4-benzothiazine carboxylic acids (A) B1 or (B) B2 in the presence of OPD at pH 6.5; P1–P4: products of the OPD reaction and H: chromatographic hump.

activity, OPD is also prone to undergo side reactions.^{16,17} To ascertain that the found signals were neither products from a direct reaction of OPD with dihydro-1,4-benzothiazines nor artifacts formed in the further course of oxidative degradation processes of OPD-resulting intermediates, a second incubation system was established. The second system started from the cysteinyl–CA adducts A1 and A2 in the presence of CA and polyphenol oxidases isolated from nashi pears (nashi-PPO) as previously described⁵ to uncouple the trapping action of OPD from the direct conversion process of B1 and B2 by a postincubation setup (Figure 3). The incubation of A1 showed again the expected formation and degradation of B1 and the emergence of the chromatographic hump and coloration; however, the postincubation with OPD led to no discrete new signals as mentioned above. Thus, obviously, the colored structures emerging from the degradation of B1 cannot be trapped by OPD, and therefore, A1 and B1 were excluded from further investigations. In contrast, incubations with A2 showed

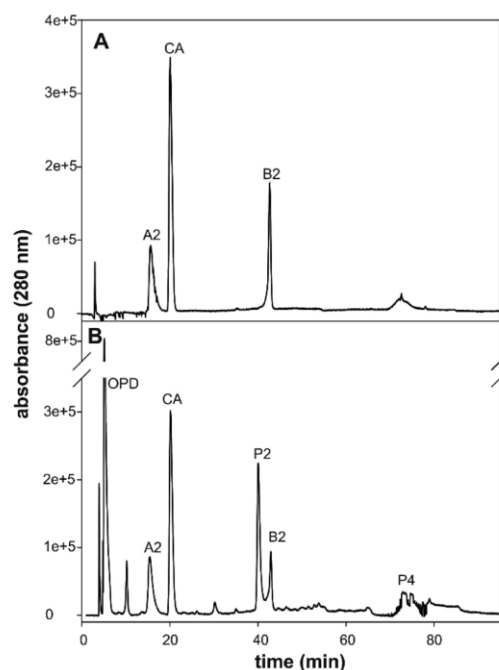


Figure 3. HPLC–DAD chromatogram of incubation of 5'-cysteinyl catechin (CA) adduct A2 in the presence of CA and nashi-PPO (pH 6.5) at 5 min without (A) and with (B) OPD postincubation; dihydro-1,4-benzothiazine carboxylic acid B2 and P2 + P4: products of the OPD reaction.

a completely different picture. With the formation of B2, the coloration started and P2 and in trace amounts also P4 arised during the postincubation with OPD (Figure 4). In the further course, there was a coinciding decrease in B2 and P2. It has to be mentioned that the addition of OPD caused the red-brownish solution to brighten up. Importantly, postincubation

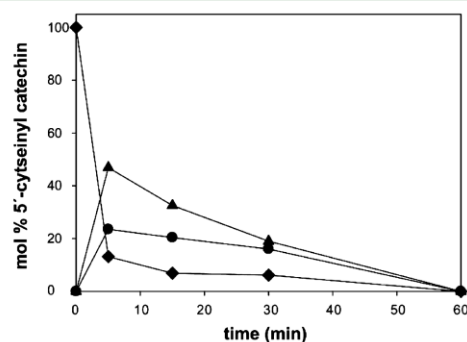


Figure 4. Conversion of 5'-cysteinyl CA A2 in the presence of CA and nashi-PPO at pH 6.5: A2 (◆), B2 (●) (dihydro-1,4-benzothiazine carboxylic acid), and P2 (▲); OPD reaction product P2 was assessed after postincubation with OPD and quantitation was based on the calibration curve of B2.

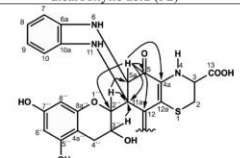
with OPD only led to a marginal decrease in B2 of less than 3%, which verified that there was only minimal influence of OPD on the general course of the degradation reaction of A2. On the other hand, P1 and P3 were only monitored if the postincubation time was extended to 24 h, that is, this strongly suggested that these structures are mere artifacts. Indeed, prolonged incubation of isolated P2 showed the direct formation of P1 and P3. Attempts to further characterize P4, P1, and P3 failed due to low yields and high reactivity leading to degradation of the target material during isolation.

Isolation and Elucidation of P2. Incubations of B2 and OPD were first subjected to HPLC to achieve an initial prepreparation of P2 from other reaction products. P2 was purified by preparative HPLC from the respective fractions of the mobile organic phase. Like the precursor structure B2, the target compound proved to be of high reactivity, and thus, all fractions had to immediately be freeze-dried after the removal of the organic solvents at ambient temperatures. The novel structure P2 was isolated as an amorphous, red-brownish material and showed absorption maxima of 229, 267, 283, 308, 337, and 436 nm. The elemental composition was verified by HR-MS to deliver a pseudo-molecular ion at an m/z of 989.2169 $[M - H]^-$ (m/z 989.2122 calcd for $C_{48}H_{41}O_{14}N_6S_2$). Further MS² and HR-MS measurements revealed the formation of a daughter ion at an m/z of 494.1042 $[M - H]^-$ (m/z 494.1022 calcd for $C_{24}H_{20}O_7N_3S$) corresponding to half of the molecule and, thus, suggested a dimeric and symmetrical constitution of P2.

Final structural verification was achieved using the above-mentioned NMR techniques. The NMR data (Table 2) further substantiated the dimeric and symmetrical constitution by clearly revealing the signal pattern of only half of the whole molecule. In comparison to its precursor B2, P2 showed virtually the same signals for the A-ring and C-ring and the former cysteine moiety except for H-2'' and H-2_B, which showed a strong high field shift to 3.76 ppm (H-2'') and 2.29 ppm (H-2_B), respectively. The loss of 44 mass units shown in the HPLC/ESI(-)-MS² experiments for both the dimer and the monomeric fragment and the signal at 173.9 ppm in the APT spectrum assigned to C-13 unequivocally verified the presence of the carboxyl moieties. The obvious differences in the signal pattern of the B-ring with its precursor structure indicate that the B-ring is the target for both the oxidative modification during the degradation process and the derivatization with OPD. The two signals of the aromatic protons of C-6 (6.56 ppm) and C-8 (6.54 ppm) of the B-ring of former B2⁵ disappeared and instead four new proton signals at 6.65 ppm (H-10), 6.68 ppm (H-8), 6.96 ppm (H-9), and 7.22 ppm (H-7) belonging to OPD emerged, thus indicating the interaction of OPD with the B-ring. The new quaternary carbon at 56.1 ppm was attributed to C-11a as it showed a ²J HMBC correlation with H-2'' and a ³J HMBC correlation with H-3'' of the C-ring, proving the quaternary carbon as the former C-7 of the B-ring. A new signal in the APT spectrum at 185.9 ppm verified the formation of a new carbonyl moiety and was therefore attributed to C-5 indicating the oxidation of the former hydroxyl group at C-5 of B2. An additional proton of a newly formed methine group hidden under the solvent signal in the spectra recorded in CD₃OD was resolved in an additional ¹H NMR spectrum recorded in D₂O (data not shown). This new methine group showed ²J HMBC correlations with both C-5 and C-11a, a ³J HMBC correlation with C-2'', and vice versa between H-2'' and C-5a.

Table 2. High-Resolution Mass and ¹H and ¹³C NMR Spectroscopic Data of P2 in CD₃OD

(12E)-5,5'-dioxo-11a,11a'-bis(3,5,7-trihydroxy-3,4-dihydro-2H-chromen-2-yl)-3,3',4,4',5a,5a',6,6',11,11',11a,11a'-dodecahydro-2H,2',H,5H,5',H-12,12'-bi[1,4]thiazino[2,3-b]phenazine-3,3'-dicarboxylic acid (P2)



C/H	HR-MS $[M - H]^-$ (m/z)	δ ¹ H [ppm]	δ ¹³ C [ppm]
	calcd $C_{48}H_{41}O_{14}N_6S_2$		989.2122
			989.2168
2 _A	3.04 (dd, 1H), ³ J = 7.7 Hz, ² J = 12.6 Hz		25.8
2 _B	2.29 (dd, 1H), ³ J = 2.9 Hz, ² J = 12.6 Hz		25.8
3	4.11 (m, 1H)		54.1
4a			154.2
5			185.9
5a	3.30 (s, 1H)		47.0
6a			136.3
7	7.22 (d, 1H), ³ J = 7.8 Hz		127.5
8	6.68 (m, 1H)		118.2
9	6.96 (m, 1H)		125.1
10	6.65 (d, 1H), ³ J = 7.8 Hz		112.7
11			132.0
11a			56.1
12			139.5
12a			138.9
13			173.9
2''	3.76 (d, 1H), ³ J = 5.1 Hz		84.3
3''	3.91 (ps q, 1H), ³ J = 5.1 Hz		62.3
4'' _A	2.35 (dd, 1H), ³ J = 5.1 Hz, ² J = 16.6 Hz		25.3
4'' _B	2.72 (dd, 1H), ³ J = 5.1 Hz, ² J = 16.6 Hz		25.3
4a''			98.2
5''			155.9
6''	5.60 (d, 1H), ² J = 2.3 Hz		94.1
7''			156.0
8''	5.83 (d, 1H), ² J = 2.3 Hz		95.1
8a''			153.8

Consequently, it was assigned to position 5a of the B-ring. The methine group together with the quaternary carbon at C-11a revealed again the removal of the aromatic character of the former B-ring in exchange for the coupling with OPD. Furthermore, H-5a showed further ³J HMBC correlations with olefinic carbons at 139.5 and 154.2 ppm. The signal at 154.2 ppm was attributed to C-4a as its vicinity to the carbonyl moiety caused a distinct downfield shift, and therefore, the signal at 139.5 ppm was assigned to C-12. Thus, the final signal at 138.9 ppm was assigned to C-12a, which has to be connected via a double bond to C-4a due to their respective chemical shift and the structural constitution of the molecule. The missing correlation of H-5a to C-12a due to its relative distance further supports this notion. As a consequence, the dimerization of two thiazine monomers was realized via a double bond between the C-12 carbons of the respective dimerization partners also expanding the conjugated system of the compound and explaining the measured absorption

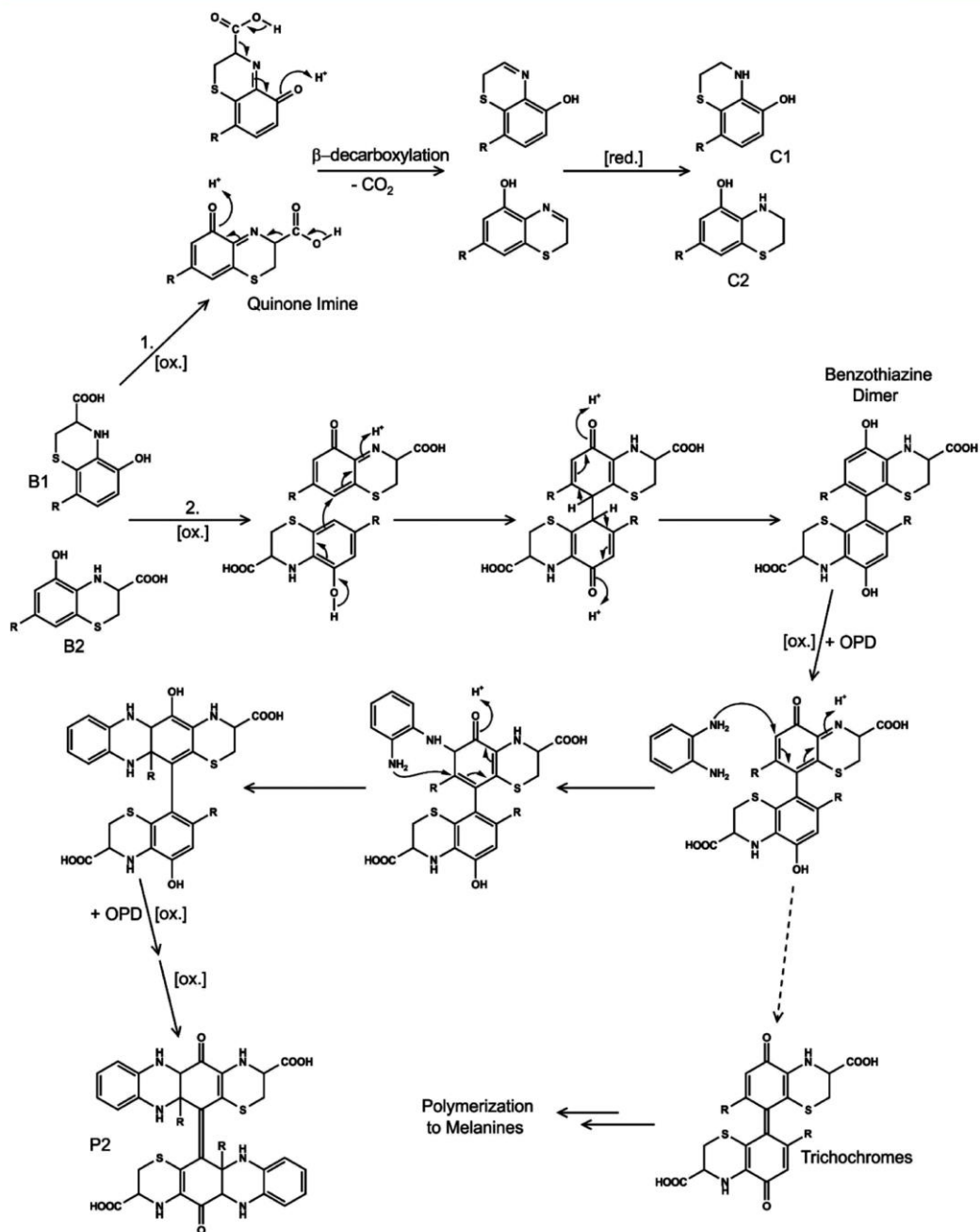


Figure 5. Degradation pathways of dihydro-1,4-benzothiazine carboxylic acids B1 and B2: (1) decarboxylation of B1 and B2 to C1 and C2 and (2) oxidative dimerization of B2 and derivatization with OPD to P2.

maximum in the visible range. Thus, the structure was unequivocally identified as (12*E*)-5,5'-dioxo-11a,11a'-bis-

(3,5,7-trihydroxy-3,4-dihydro-2*H*-chromen-2-yl)-3,3',4,4',5a,5a',6,6',11,11',11a,11a'-dodecahydro-

2*H*,2'*H*,5*H*,5'*H*-12,12'-bi[1,4]thiazino[2,3-*b*]phenazine-3,3'-dicarboxylic acid.

Degradation Pathways of B1 and B2. On the basis of the present investigations and the knowledge so far published for pheomelanogenesis and for the enzymatic browning reactions with CA, the following mechanisms for the formation of C1, C2, and P2 are proposed (Figure 5). The initiating step of the degradation is the oxidation of B1 and B2 to their corresponding quinone imine counterparts. In pathway 1, the quinone imines decarboxylate via a β -decarboxylation promoted by the vinyllogous system preferentially under acidic conditions. In a final reduction step, the formed benzothiazines are reduced to the herein isolated dihydrobenzothiazines C1 and C2. This decarboxylation process is a well-known degradation pathway in the course of pheomelanogenesis, where in vitro, it is preferred by 85% compared to 15% of the carboxylated species and independent from the nature of the oxidizing agent. Under biologically relevant conditions, decarboxylation is the dominant pathway.¹⁸ In pathway 2, the quinone imine of B2 is nucleophilic attacked by a second molecule B2 in its reduced state in para-position to the carbonyl moiety to form a stable C–C bond. This fundamental oxidative coupling is followed by rearrangement reactions leading to rearomatization of the resulting dimer. The formed dimer, like B2 still an electron-rich *N*-analogue *o*-hydroquinone, is again easily oxidized to a quinone imine, now followed by two nucleophilic attacks of the two amino moieties of OPD. The first attack has to take place in ortho-position to the carbonyl moiety as the meta-position bears an obvious steric hindrance. However, this steric hindrance of the second nucleophilic attack in meta-position is probably compensated by the now intramolecular interaction of the second amino moiety of OPD. OPD is a commonly used a derivatization reagent to trap and stabilize reactive α -dicarbonyl compounds in sugar degradation chemistry by converting them quantitatively into their corresponding quinoxalines.^{14,15,15–17} Even though *o*-quinones basically represent α -dicarbonyl moieties, the reaction with OPD has to be scrutinized, as it works only in selected cases. For example, it has been successfully used to derivatize some *o*-quinones in pulps by conversion into phenazines.¹⁹ On the other hand, the conversion of caffeic acid quinone to the respective phenazine by Rizzi failed and instead led only to a diiminotetrahydrophenazine derivative formed by two molecules of OPD.²⁰ However, in the present investigation on P2, the constitution of the oxidized dimer obviously allows the nucleophilic attack of OPD but hinders further aromatization to quinoxalines. Further oxidations of the second half of the dimer then facilitate the reaction with a second OPD molecule and the formation of P2. Thus, the oxidized dimer is stabilized as a hydrophenazine derivative and withdrawn from further nucleophilic reactions. Indeed, in the absence of OPD, it might rearrange to trichochrome-like structures of highly potent electrophilicity immediately leading to colored higher-molecular-weight melanins.

In vegetable foods, oxidative coupling of phenolic precursors under the formation of a stable C–C bond is an established key event in the course of the enzymatic browning reactions. However, structures of resulting polymeric colored melanins are elucidated only in very few cases. As exceptions, the fermentation of black tea and rooibos tea has been researched extensively and led to the elucidation of the oxidation of CAs and dihydrochalcones, respectively, and the concomitant formation of theaflavins, CA dimers, and dibenzofurans as

transient intermediates in color formation.^{14,15,15,21} When it comes to specific structures from the covalent interaction of amino acids with phenols, the literature becomes even more incomplete. During investigation of nashi-PPO-driven enzymatic browning model reactions with CA, we were only able to verify amino acid adducts from cysteine. The formation of dihydro-1,4-benzothiazine carboxylic acids was accompanied by intense browning.

Also, in the course of pheomelanogenesis, dihydro-1,4-benzothiazine carboxylic acid species are regarded as the last major isolatable intermediates. Under this topic of tyrosinase–DOPA systems, further reactions of these structures such as decarboxylation and ring contraction to benzothiazol intermediates were extensively examined. The formation of a 3-oxo-dihydro-1,4-benzothiazine derivative via a labile 3-hydroxy-3,4-dihydro-1,4-benzothiazine intermediate was also reported.²² However, mechanisms and resulting oligomeric structures which form the final pheomelanin pigments remain mostly unknown. A discrete class of fairly well-understood low-molecular-weight pheomelanins extracted from red feathers and red human hair is represented by trichochromes. These structures bear a $\Delta^{2,2'}$ -bi-2*H*-1,4-benzothiazine skeleton and feature pH-dependent absorption maxima.^{11,13} Dimerization by oxidative coupling was suggested as a common pattern in the oxidative degradation of dihydro-1,4-benzothiazines.^{10,23} To elucidate the intermediates in this oxidative polymerization process, benzothiazines were incubated under biologically relevant oxidative conditions with various enzymes. Biosynthetic systems were tyrosinase/O₂ and peroxidase/H₂O₂ setups, where peroxidase, as the major enzyme system in the course of melanogenesis, proved to be more effective than tyrosinase. Studies of Costantini et al. using tyrosinase revealed the formation of oligomers also via cycloaddition mechanisms. Under acidic conditions, these acid-labile intermediates may undergo ring opening to 1,4-benzothiazines and in the further course of reaction oxidative coupling at position 2 to form trichochrome-like structures.¹⁸ To gain further insights into the oxidative polymerization, Napolitano et al. investigated the formed oligomers of the peroxidase/H₂O₂ promoted oxidation of 5-*S*-cysteinyl-dopa and 3-*S*-cysteinyl-5-methylcatechol with subsequent reduction via NaBH₄. The found oligomers were characterized by C–C and C–O bonds between the benzothiazine subunits in ortho- or para-position to the respective hydroxyl group.¹¹ Thus, the oxidative polymerization process during pheomelanogenesis was substantiated as a phenol-type self-coupling pathway, that is, the oxidative phenolic coupling reaction. Cysteine-substituted polyphenols are poor substrates for tyrosinase and PPOs in general and, thus, need suitable redox cycling partners for the progression of the browning reaction.^{2,5,18,21,24}

In summary, we used nashi-PPO as an oxidizing enzyme and CA as the redox cycling agent to mimic the enzymatic browning reaction in vegetable foods. Thus, with the enzymatic generation of CA *o*-quinones, both electron-rich and -deficient structures are present to enter nonenzymatic follow-up reactions such as oxidative coupling depending on their redox potential. In our present mechanistic approach, we succeeded to gain deeper insights into the course of the cysteine-driven enzymatic browning reactions of CA by verifying dihydro-1,4-benzothiazine carboxylic acids as highly reactive intermediates. Oxidation triggered decarboxylation and oxidative coupling. The latter was verified by post-incubation with OPD derivatized as a phenazine derivative.

The native structure was reminiscent of colored trichochromes reported in pheomelanogenesis. Ongoing research will now further explore the influence of amino acids on enzymatic browning reactions of plant-based foods and related processing technologies.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.1c06335>.

Pathways of melanogenesis and structures of A1 and A2 (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Marcus A. Glomb – *Institute of Chemistry, Food Chemistry, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, 06120 Halle/Saale, Germany*; orcid.org/0000-0001-8826-0808; Email: marcus.glomb@chemie.uni-halle.de; Fax: ++049-345-5527341

Authors

Nils Mertens – *Institute of Chemistry, Food Chemistry, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, 06120 Halle/Saale, Germany*; orcid.org/0000-0002-9769-1340
Vanessa Fokuhl – *Institute of Chemistry, Food Chemistry, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, 06120 Halle/Saale, Germany*

Complete contact information is available at: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.1c06335>

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. D. Ströhl from the Institute of Organic Chemistry, Halle, Germany, for recording NMR spectra and Dr. A. Frolov and M. Dorn from the Leibniz Institute of Plant Biochemistry, Halle, Germany, for performing accurate mass analysis.

■ ABBREVIATIONS

OPD, *o*-phenylenediamine; PPO, polyphenol oxidase; DOPA, 3,4-dihydroxyphenylalanine

■ REFERENCES

- Toivonen, P. M. A.; Brummell, D. A. Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables. *Postharvest Biol. Technol.* **2008**, *48*, 1–14.
- Bittner, S. When quinones meet amino acids: chemical, physical and biological consequences. *Amino Acids* **2006**, *30*, 205–224.
- Mason, H. S.; Peterson, E. W. Melanoproteins I. reactions between enzyme-generated quinones and amino acids. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **1965**, *111*, 134–146.
- Pierpoint, W. S. *o*-Quinones formed in plant extracts. Their reactions with amino acids and peptides. *Biochem. J.* **1969**, *112*, 609–616.
- Mertens, N.; Mai, F.; Glomb, M. A. Influence of nucleophilic amino acids on enzymatic browning systems. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 1719–1725.
- Richard-Forget, F. C.; Goupy, P. M.; Nicolas, J. J. Cysteine as an inhibitor of enzymic browning. 2. Kinetic studies. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 2108–2113.
- Ali, H. M.; El-Gizawy, A. M.; El-Bassiouny, R. E. I.; Saleh, M. A. The role of various amino acids in enzymatic browning process in potato tubers, and identifying the browning products. *Food Chem.* **2016**, *192*, 879–885.
- Ito, S.; Suzuki, N.; Takebayashi, S.; Commo, S.; Wakamatsu, K. Neutral pH and copper ions promote eumelanogenesis after the dopachrome stage. *Pigm. Cell Melanoma Res.* **2013**, *26*, 817–825.
- Wakamatsu, K.; Nagao, A.; Watanabe, M.; Nakao, K.; Ito, S. Pheomelanogenesis is promoted at a weakly acidic pH. *Pigm. Cell Melanoma Res.* **2017**, *30*, 372–377.
- Prota, G. Progress in the chemistry of melanins and related metabolites. *Med. Res. Rev.* **1988**, *8*, 525–556.
- Napolitano, A.; Memoli, S.; Crescenzi, O.; Prota, G. Oxidative polymerization of the pheomelanin precursor 5-hydroxy-1,4-benzothiazinylalanine: A new hint to the pigment structure. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 598–604.
- Wakamatsu, K.; Ohtara, K.; Ito, S. Chemical analysis of late stages of pheomelanogenesis: conversion of dihydrobenzothiazine to a benzothiazole structure. *Pigm. Cell Melanoma Res.* **2009**, *22*, 474–486.
- Thomson, R. H. The pigments of reddish hair and feathers. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1974**, *13*, 305–312.
- Jost, T.; Heymann, T.; Glomb, M. A. Efficient analysis of 2-acetyl-1-pyrroline in foods using a novel derivatization strategy and LC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 3046–3054.
- Heinrich, T.; Willenberg, I.; Glomb, M. A. Chemistry of color formation during rooibos fermentation. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 5221–5228.
- Gobert, J.; Glomb, M. A. Degradation of Glucose: Reinvestigation of Reactive α -Dicarbonyl Compounds. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 8591–8597.
- Glomb, M. A.; Tschirmich, R. Detection of α -dicarbonyl compounds in maillard reaction systems and in vivo. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5543–5550.
- Napolitano, A.; Costantini, C.; Crescenzi, O.; Prota, G. Characterisation of 1,4-benzothiazine intermediates in the oxidative conversion of 5-S-cysteinyl-dopa to pheomelanins. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 6365–6368.
- Zhu, J. H.; Olmstead, J. A.; Gray, D. G. Fluorescent detection of *o*-quinones formed in lignin-containing pulps during irradiation. *Wood Chem. Technol.* **2006**, *15*, 43–64.
- Rizzi, G. P. Formation of strecker aldehydes from polyphenol-derived quinones and α -amino acids in a nonenzymic model system. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 1893–1897.
- Tanaka, T.; Kouno, I. Oxidation of tea catechins: chemical structures and reaction mechanism. *Food Sci. Technol. Res.* **2003**, *9*, 128–133.
- Napolitano, A.; Memoli, S.; Prota, G. A New Insight in the Biosynthesis of Pheomelanins: Characterization of a Labile 1,4-Benzothiazine Intermediate. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 3009–3011.
- Prota, G.; Ponsiglione, E.; Ruggiero, R. Synthesis and photochromism of $\Delta 2,2'$ -Bi-(2H-1,4-benzothiazine). *Tetrahedron* **1974**, *30*, 2781–2784.
- Richard, F. C.; Goupy, P. M.; Nicolas, J. J.; Lacombe, J. M.; Pavia, A. A. Cysteine as an inhibitor of enzymic browning. 1. Isolation and characterization of addition compounds formed during oxidation of phenolics by apple polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39*, 841–847.

15353

<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c06335>
J. Agric. Food Chem. **2021**, *69*, 15345–15353

Reprinted with permission from Mertens, N; Fokuhl, V.; Glomb, M. A. Benzothiazines as Major Intermediates in Enzymatic Browning Reactions of Catechin and Cysteine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2021**, *69*, 15345-15353. Copyright 2021 American Chemical Society

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit den enzymatischen und nicht-enzymatischen Reaktionen von Polyphenolen unter besonderer Berücksichtigung der Bildung kovalenter Polyphenol-Aminosäure-Addukte während der enzymatischen Bräunung. Die enzymatische Bräunung ist ein hoch-komplexer Prozess, bei dem vielfältige enzymatische und nicht-enzymatische Reaktionen mit einem großen Spektrum an möglichen Reaktionspartnern ineinandergreifen. Dies geht mit ebenso komplexen Bräunungsprodukten einher, die im positiven wie im negativen Sinn ein ausschlaggebendes Kriterium für die Qualität von pflanzlichen Lebensmitteln darstellen. Ein grundlegendes Verständnis dieser Prozesse ist damit essentiell. Das Ziel der vorliegenden Arbeit lag darin weiterführende oxidative Reaktionsmechanismen von Polyphenolen im Zuge ihres oxidativen Abbaus aufzuklären, wobei ein besonderer Fokus auf die entstehenden kovalenten Polyphenol-Aminosäure- und Polyphenol-Protein-Addukte gelegt wurde.

Dafür wurde ein auf der Polyphenoloxidase (PPO) der Nashi-Birne basierendes Modellsystem zur enzymatischen Oxidation entwickelt, womit eine systematische Untersuchung des Polyphenols Catechin in Gegenwart der nucleophilen Aminosäuren Arginin, Lysin und Cystein auf neuartige Catechin-Aminosäure-Addukte ermöglicht wurde. Während Arginin und Lysin keinen Einfluss auf den Reaktionsverlauf hatten, führte Cystein zu der Bildung der Cystein-Catechin-Addukte, 2'-Cysteinyl-Catechin (A1) und 5'-Cysteinyl-Catechin (A2), die im weiteren Verlauf zu zwei neuartigen Dihydrobenzothiazincarbonsäure-Derivaten, 8-(3,5,7-Trihydroxy-3,4-dihydro-2*H*-chromen-2-yl)-5-hydroxy-3,4-dihydro-2*H*-benzothiazin-3-carbonsäure (B1) und 7-(3,5,7-Trihydroxy-3,4-dihydro-2*H*-chromen-2-yl)-5-hydroxy-3,4-dihydro-2*H*-benzothiazin-3-carbonsäure (B2), reagierten und mechanistisch und strukturell aufgeklärt wurden. Dabei erfolgt ein intramolekularer Ringschluss über ein von Catechin und PPO vermitteltes Redoxcycling von den Addukten zu den entsprechenden Chinoniminen, die im weiteren Verlauf über ein erneutes Redoxcycling die isolierten Strukturen B1 und B2 bilden. In den Umsatzraten zu den Addukten zeigte sich deutlich die sterische Hinderung bei der Adduktbildung von A1 im Vergleich zu A2. Dies spiegelte sich folglich in den Umsatzraten der resultierenden jeweiligen Dihydrobenzothiazincarbonsäure wider. Diese Produkte stellten jedoch nur reaktive Intermediate der enzymatischen Bräunung dar. Inkubationen unter sauren, oxidativen Bedingungen führten nach der Oxidation zum jeweiligen Chinonimin zu einer β -Decarboxylierung und zur Bildung der decarboxylierten Dihydrobenzothiazin-Derivate 8-(3,5,7-Trihydroxy-3,4-dihydro-2*H*-chromen-2-yl)-5-

hydroxy-3,4-dihydro-2*H*-benzothiazin C1 und 7-(3,5,7-Trihydroxy-3,4-dihydro-2*H*-chromen-2-yl)-5-hydroxy-3,4-dihydro-2*H*-benzothiazin C2. Aus B2 wurde ein aus einer oxidativen Kupplung hervorgehendes Dimerisierungsprodukt, das strukturell den Trichochromen ähnelt, mittels Derivatisierung mit *o*-Phenylendiamin zu einem Phenazin-Derivat (12*E*)-5,5'-Dioxo-11*a*,11*a*'-bis(3,5,7-trihydroxy-3,4-dihydro-2*H*-chromen-2-yl)-3,3',4,4',5*a*,5*a*',6,6',11,11',11*a*,11*a*'-dodecahydro-2*H*,2'*H*,5*H*,5'*H*-12,12'-bi[1,4]thiazino[2,3-*b*]phenazin-3,3'-dicarbonsäure stabilisiert, isoliert und abschließend strukturell und mechanistisch aufgeklärt. Die Vorreinigung der Addukte, der Dihydrobenzothiazincarbonsäuren und des derivatisierten Dimerisierungsprodukts erfolgte mittels *High Performance Countercurrent Chromatography* aus den Inkubationen, die anschließende Isolierung mittels präparativer HPLC.

Damit gelangen die Isolierung und der strukturelle Nachweis eines farbigen Produkts aus der enzymatischen Bräunungsreaktion eines Polyphenols und einer Aminosäure aus dem neu etablierten Inkubationssystem.

Neben den enzymatischen Modellinkubationen wurde der oxidative Abbau von Aspalathin in Gegenwart von Lysin untersucht. In aeroben Inkubationen baute sich das aus unfermentierten Rooibostee isolierte Aspalathin zu bis zu 10 mol-% zu Dihydrokaffeesäure (DHC) ab. Die Bildung des Dihydrokaffeesäure-Lysin-Amids (DHCA) in einer 30-fach niedrigeren Konzentration konnte mittels HPLC-FLD mit *o*-Phthaldialdehyd-Nachsäulenderivatisierung und über die Synthese eines authentischen Referenzstandards eindeutig nachgewiesen werden. Die Bildung des Amids wurde zusätzlich in Aspalathin-Protein-Inkubationen bei Raumtemperatur und neutralem pH nach enzymatischer Hydrolyse mittels HPLC-MS² nachgewiesen. Damit gelang der erstmalige Nachweis einer kovalenten Polyphenol-Protein-Modifikation unter milden Bedingungen.

Die Bildung von DHC aus Aspalathin wurde in der Literatur bereits vorgeschlagen, konnte aber nicht mit einem Mechanismus unterlegt werden. Zur Aufklärung des Reaktionsmechanismus wurde der oxidative Abbau des Aspalathins, sowie des *O*-glycosidischen Dihydrochalkons Phloridzin und Phloretin, dessen Aglykon, in aeroben und anaeroben Inkubationen und Inkubationen unter Generierung von Singulett-Sauerstoff (¹O₂) untersucht. Daraus ergab sich ein oxidativer Abbau, der durch die Bildung von ¹O₂ initiiert wird. Nach Anlagerung des ¹O₂ erfolgt eine *Baeyer-Villiger*-analoge Umlagerung mit anschließender Fragmentierung in die Phenolsäure durch Wasser oder zum jeweiligen Phenolsäureamid durch ein entsprechendes Amin und einem Tetrahydroxybenzol-Derivat als Gegenstück. Dieses Gegenstück konnte im Falle des analytisch leichter zugänglichen Phloretins als Tetrahydroxybenzol (THOB) nach Synthese des authentischen

Referenzstandards durch GC-MS² nachgewiesen und somit der postulierte oxidative Mechanismus verifiziert werden. Die strikte Abhängigkeit des Mechanismus von ¹O₂ zeigt, dass Aspalathin in der Lage ist, intrinsisch ¹O₂ zu generieren. Die Quantifizierung der DHC und des Lysin-Amids in unfermentierten und fermentierten Rooibostee-Proben wiesen mit 0,7 μmol DHC/g (127 μg DHC/g) und 0,35 μmol DHCA/g (108,5 g DHCA/g) in den fermentierten Proben deutlich höhere Gehalte als die unfermentierten Tees auf. Obwohl nur bei DHC der Unterschied signifikant war, zeigte sich beim DHC-Amid jedoch ein deutlich verstärkter Abbau des Aspalathins unter aeroben Verhältnissen. Dies lässt sich auf die oxidativen Bedingungen des traditionellen Fermentationsprozesses des Rooibostees zurückführen und belegt damit den oxidativen Abbaumechanismus und dessen Relevanz im Tee.

Zusammenfassend gelang in der vorliegenden Dissertation eine vielseitige Untersuchung des sowohl enzymatischen als auch nicht-enzymatischen oxidativen Abbaus von Polyphenolen in Gegenwart von Aminosäuren im Blick auf kovalente Polyphenol-Aminosäure-Modifikationen. Die Etablierung eines neuen enzymatischen Modellinkubationssystems diente als Grundlage für die erfolgreiche Isolierung und Charakterisierung zum Teil farbiger Polyphenol-Aminosäure-Intermediate aus dem Reaktionsverlauf der enzymatischen Bräunungsreaktion und stellt durch die Variationsmöglichkeit der Substrate eine neue Methode zur Untersuchung der kovalenten Interaktionen während der enzymatischen Bräunung in pflanzlichen Lebensmitteln dar.

Aus dem oxidativen Abbau des Aspalathins wurden Erkenntnisse über einen neuen oxidativen Abbaupfad der Dihydrochalkone gewonnen, die auf die mögliche Generierung bzw. Stabilisierung von ¹O₂ durch Polyphenole schließen lässt und einen neuen Ansatzpunkt für die Untersuchung des oxidativen Abbaus strukturell ähnlicher Polyphenole bildet.

7 Abstract

The present Ph.D. thesis deals with the enzymatic and non-enzymatic reactions of polyphenols with respect to the formation of covalent polyphenol-amino acid adducts during the enzymatic browning reaction, a complex process with interacting enzymatic and non-enzymatic reactions resulting in a vast spectrum of complex browning products. These products influence the consumers perception and acceptance of plant based food. Thus, a fundamental understanding of these reactions is crucial to control these processes. Therefore this thesis aimed to elucidate additional pathways of the oxidative conversion of polyphenols in the specific view on the formation of covalent polyphenol-amino acid and polyphenol-protein adducts.

A model system for enzymatic browning reactions based on the PPO of nashi pear homogenate and gallic acid and catechin as substrates in the presence of the nucleophilic amino acids arginine, lysine and cysteine was developed to investigate the above-mentioned formation reactions under enzyme catalyzed oxidative conditions. Cysteine incubations revealed the formation of two novel dihydrobenzothiazine carboxylic acid derivatives (8-(3,4-dihydro-2*H*-chromene-3,5,7-triol)-3,4-dihydro-5-hydroxy-2*H*-benzothiazine-3-carboxylic acid (B1) and 7-(3,4-dihydro-2*H*-chromene-3,5,7-triol)-3,4-dihydro-5-hydroxy-2*H*-benzothiazine-3-carboxylic acid (B2)) from 2'-cysteinyl catechin (A1) and 5'-cysteinyl catechin (A2), respectively. Both, the cysteinyl catechin adducts A1 and A2 and the dihydrobenzothiazine carboxylic acid derivatives were structurally and mechanistically elucidated.

In contrast, arginine and lysine did not lead to any amino acid adducts. The catechin and PPO mediated redox cycling ring closure of the cysteinyl catechin adducts led to the corresponding quinone imines, which in turn finally react to the corresponding benzothiazine carboxylic acid again through an additional redox cycling. The yields of A1 and A2 revealed the obvious steric hinderance in the formation of the cysteinyl catechin adduct A1 in comparison to A2, which was also reflected by the formation rates of the benzothiazines, respectively. However, these products were only colorless, reactive intermediates in the course of the enzymatic browning reaction. Incubations at acidic, oxidative conditions led to the formation of decarboxylated derivatives 8-(3,5,7-trihydroxy-3,4-dihydro-2*H*-chromen-2-yl)-5-hydroxy-3,4-dihydro-2*H*-benzothiazine C1 and 7-(3,5,7-trihydroxy-3,4-dihydro-2*H*-chromen-2-yl)-5-hydroxy-3,4-dihydro-2*H*-benzothiazine C2 as a result of their corresponding carboxylic acid derivative after oxidation to quinone imines and subsequent β -decarboxylation. A colored dimerization

product of B2 originated from oxidative coupling was stabilized through derivatization with *o*-phenylenediamine to a phenazine derivative (12E)-5,5'-dioxo-11a,11a'-bis(3,5,7-trihydroxy-3,4-dihydro-2*H*-chromen-2-yl)-3,3',4,4',5a,5a',6,6',11,11',11a,11a'-dodecahydro-2*H*,2'*H*,5*H*,5'*H*-12,12'-bi[1,4]thiazino[2,3-*b*]phenazine-3,3'-dicarboxylic acid and was then structurally and mechanistically elucidated. The isolation of the adducts, the dihydrobenzothiazine carboxylic acids and the stabilized dimerization product out of the incubations was realized through high performance countercurrent chromatography (HPLCCC) and subsequent isolation via preparative HPLC.

In summary, the isolation and structural elucidation of a colored polyphenol-amino acid adduct of the enzymatic browning reaction was realized using a newly established model incubation system.

Moreover, the oxidative degradation of aspalathin in the presence of lysine was investigated. In aerated incubations aspalathin isolated from unfermented rooibos tea was degraded to 10 mol-% dihydrocaffeic acid. The formation of the dihydrocaffeic acid-lysine adduct with 30-fold lower concentration was verified with HPLC-FLD after post-column derivatization with *o*-phthalaldehyde using a self-synthesized authentic reference standard. Additionally, the formation of the corresponding amide was verified by aspalathin-protein-incubations at neutral pH and at ambient temperature after enzymatic hydrolysis via HPLC-MS². Thereby, the covalent interaction of a phenolic plant compound with proteins under such mild conditions was confirmed for the first time. Degradation of aspalathin to dihydrocaffeic acid was already postulated in literature, but was not proven by a plausible mechanism up to now. The elucidation of the oxidative degradation mechanism was carried out using aspalathin, the *O*-glycosidic dihydrochalcone phloridzin and its aglycone phloretin in aerated and deaerated incubations and in incubations including singlet oxygen. The oxidative cleavage of the phenolic compounds was initiated by singlet oxygen. Singlet oxygen attacks the carbonyl group of the dihydrochalcone, resulting in a biradicalic structure, including an alkoxyradical moiety. After singlet-electron transfer, the resulting hydroperoxide anion rearranges in a *Baeyer-Villiger*-type reaction followed by fragmentation to either the corresponding phenolic acid by water or the phenolic acid amide by the corresponding amino component and a tetrahydroxybenzene derivative as counterpart. In case of phloretin the formation of the respective tetrahydroxybenzene was confirmed after synthesis of an authentic reference standard by GC-MS² verifying the postulated mechanism. The strict dependency of singlet oxygen means that aspalathin is able to intrinsically generate singlet oxygen. The quantitation of dihydrocaffeic acid and the lysine-amide in fermented and unfermented rooibos tea samples showed higher

amounts of both the phenolic acid and the amide in fermented teas [0.7 μmol DHC/g (127 μg DHC/g) and 0.35 μmol DHC-amide/g (108.5 μg DHC-amide/g)] than the unfermented samples. While the difference of dihydrocaffeic acid was significant, there was a clear trend for the amide. The pronounced degradation can be ascribed to the oxidative conditions of the traditional fermentation process proving the postulated oxidative degradation mechanism and its relevance in the final product.

In summary, a comprehensive investigation of the enzymatic and non-enzymatic oxidative degradation of polyphenols in the presence of amino acids with main focus on the formation of covalent modifications was conducted. A new developed incubation system based on nashi-PPO formed the basis for the successful isolation and structural elucidation of both colorless and colored polyphenol-amino acid intermediates from the enzymatic browning reaction. This system provides a new approach for the investigation of covalent interactions during the enzymatic browning reaction in plant-based food due to its variation possibility of substrates and reaction conditions.

The degradation of aspalathin under oxidative conditions delivered new insights to the oxidative degradation pathways of dihydrochalcones, suggesting the intrinsic generation or stabilization of singlet oxygen by phenolic compounds, respectively. All in all, this provides a new approach towards the investigation of the oxidative degradation of structural related phenolic compounds.

8 Literaturverzeichnis

- (1) Andrés-Bello, A.; Barreto-Palacios, V.; García-Segovia, P.; Mir-Bel, J.; Martínez-Monzó, J. Effect of pH on Color and Texture of Food Products. *Food Eng Rev.* **2013**, *5*, 158–170.
- (2) Cheynier, V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *81*, 223S-229S.
- (3) Dai, J.; Mumper, R. J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules (Basel, Switzerland)*. **2010**, *15*, 7313–7352.
- (4) Zhang, H.; Tsao, R. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Current Opinion in Food Science*. **2016**, *8*, 33–42.
- (5) Robards, K.; Prenzler, P. D.; Tucker, G.; Swatsitang, P.; Glover, W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.* **1999**, *66*, 401–436.
- (6) Kuroda, Y.; Hara, Y. Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols. *Mutat. Res., Rev. Mutat. Res.* **1999**, *436*, 69–97.
- (7) Khan, N.; Mukhtar, H. Tea polyphenols for health promotion. *Life sciences*. **2007**, *81*, 519–533.
- (8) Rasouli, H.; Farzaei, M. H.; Khodarahmi, R. Polyphenols and their benefits: A review. *Int. J. Food Prop.* **2017**, 1–42.
- (9) Cory, H.; Passarelli, S.; Szeto, J.; Tamez, M.; Mattei, J. The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. *Front. Nutr.* **2018**, *5*, 87.
- (10) Bahadoran, Z.; Mirmiran, P.; Azizi, F. Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review. *J. Diabetes Metab. Disord.* **2013**, *12*, 43.
- (11) Potì, F.; Santi, D.; Spaggiari, G.; Zimetti, F.; Zanotti, I. Polyphenol Health Effects on Cardiovascular and Neurodegenerative Disorders: A Review and Meta-Analysis. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*,
- (12) Bhullar, K. S.; Rupasinghe, H. P. V. Polyphenols: multipotent therapeutic agents in neurodegenerative diseases. *Oxid. Med. Cell. Longevity*. **2013**, *2013*, 891748.

- (13) Losada-Barreiro, S.; Bravo-Díaz, C. Free radicals and polyphenols: The redox chemistry of neurodegenerative diseases. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *133*, 379–402.
- (14) Soares, S.; Vitorino, R.; Osório, H.; Fernandes, A.; Venâncio, A.; Mateus, N.; Amado, F.; Freitas, V. de. Reactivity of human salivary proteins families toward food polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 5535–5547.
- (15) 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.
- (16) Bittner, S. When quinones meet amino acids: chemical, physical and biological consequences. *Amino Acids.* **2006**, *30*, 205–224.
- (17) Whitaker, J. R.; Lee, C. Y. Recent Advances in Chemistry of Enzymatic Browning. In *Enzymatic browning and its prevention: Developed from a symposium ... Washington, DC, August 21 - 26, 1994*; Lee, C. Y., Ed.; ACS Symposium Series, Vol. 600; American Chemical Soc, 1995, 2–7.
- (18) Kroll, J.; Rawel, H. M.; Rohn, S. Reactions of Plant Phenolics with Food Proteins and Enzymes under Special Consideration of Covalent Bonds. *Food Sci. Technol. Res.* **2003**, *9*, 205–218.
- (19) Ozdal, T.; Capanoglu, E.; Altay, F. A review on protein–phenolic interactions and associated changes. *Food Res. Int.* **2013**, *51*, 954–970.
- (20) Tomás-Barberán, F. A.; Espín, J. C. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *J. Sci. Food Agric.* **2001**, *81*, 853–876.
- (21) Lund, M. N. Reactions of plant polyphenols in foods: Impact of molecular structure. *Trends Food Sci. Technol.* **2021**, *112*, 241–251.
- (22) Crozier, A.; Jaganath, I. B.; Clifford, M. N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 1001–1043.
- (23) Burns, J.; Yokota, T.; Ashihara, H.; Lean, M. E. J.; Crozier, A. Plant foods and herbal sources of resveratrol. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 3337–3340.
- (24) Rawel, H. M.; Rohn, S. Nature of hydroxycinnamate-protein interactions. *Phytochem. Rev.* **2010**, *9*, 93–109.
- (25) Cilliers, J. J. L.; Singleton, V. L. Nonenzymic autoxidative phenolic browning reactions in a caffeic acid model system. *J. Agric. Food Chem.* **1989**, *37*, 890–896.

- (26) Cilliers, J. J. L.; Singleton, V. L. Caffeic acid autoxidation and the effects of thiols. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38*, 1789–1796.
- (27) Cilliers, J. J. L.; Singleton, V. L. Characterization of the products of nonenzymic autoxidative phenolic reactions in a caffeic acid model system. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39*, 1298–1303.
- (28) Schieber, A. Reactions of Quinones-Mechanisms, Structures, and Prospects for Food Research. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66*, 13051–13055.
- (29) Fraga, C. G.; Galleano, M.; Verstraeten, S. V.; Oteiza, P. I. Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Mol. Aspects Med.* **2010**, *31*, 435–445.
- (30) Guzik, U.; Hupert-Kocurek, K.; Wojcieszynska, D. Immobilization as a strategy for improving enzyme properties-application to oxidoreductases. *Molecules (Basel, Switzerland)*. **2014**, *19*, 8995–9018.
- (31) Thurston, C. F. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*. **1994**, *140*, 19–26.
- (32) Selinheimo, E.; Autio, K.; Kruus, K.; Buchert, J. Elucidating the mechanism of laccase and tyrosinase in wheat bread making. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 6357–6365.
- (33) Subramanian, N.; Venkatesh, P.; Ganguli, S.; Sinkar, V. P. Role of polyphenol oxidase and peroxidase in the generation of black tea theaflavins. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 2571–2578.
- (34) Peter, M. G. Chemical Modifications of Biopolymers by Quinones and Quinone Methides. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 555–570.
- (35) Molitor, C.; Mauracher, S. G.; Rompel, A. Aurone synthase is a catechol oxidase with hydroxylase activity and provides insights into the mechanism of plant polyphenol oxidases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, *113*, E1806-15.
- (36) Singh, B.; Suri, K.; Shevkani, K.; Kaur, A.; Kaur, A.; Singh, N. Enzymatic Browning of Fruit and Vegetables: A Review. In *Enzymes in Food Technology*; Springer, Singapore, 2018, 63–78.
- (37) Nicolas, J. J.; Richard-Forget, F. C.; Goupy, P. M.; Amiot, M. J.; Aubert, S. Y. *Enzymatic browning reactions in apple and apple products*, Vol. 34, 1994.

- (38) Espín, J. C.; García-Ruiz, P. A.; Tudela, J.; Varón, R.; García-Cánovas, F. Monophenolase and Diphenolase Reaction Mechanisms of Apple and Pear Polyphenol Oxidases. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 2968–2975.
- (39) Toivonen, P. M.; Brummell, D. A. Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables. *Postharvest Biol. Technol.* **2008**, *48*, 1–14.
- (40) Land, E. J.; Ramsden, C. A.; Riley, P. A. Quinone Chemistry and Melanogenesis. *Methods Enzymol.* **2004**, *378*, 88–109.
- (41) Tokoroyama, T. Discovery of the Michael Reaction. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *2010*, 2009–2016.
- (42) Rompel, A.; Fischer, H.; Meiwes, D.; Büldt-Karentzopoulos, K.; Magrini, A.; Eicken, C.; Gerdemann, C.; Krebs, B. Substrate specificity of catechol oxidase from *Lycopus europaeus* and characterization of the bioproducts of enzymic caffeic acid oxidation 1. *FEBS Letters.* **1999**, *445*, 103–110.
- (43) Nokthai, P.; Lee, V. S.; Shank, L. Molecular modeling of peroxidase and polyphenol oxidase: substrate specificity and active site comparison. *Int. J. Mol. Sci.* **2010**, *11*, 3266–3276.
- (44) Robertson, A. Effects of physical and chemical conditions on the in vitro oxidation of tea leaf catechins. *Phytochemistry.* **1983**, *22*, 889–896.
- (45) Solano, F. Melanins: Skin Pigments and Much More—Types, Structural Models, Biological Functions, and Formation Routes. *New J. Sci.* **2014**, *2014*, 1–28.
- (46) Rohn, S. Possibilities and limitations in the analysis of covalent interactions between phenolic compounds and proteins. *Food Res. Int.* **2014**, *65*, 13–19.
- (47) Prigent, S. V. E.; Gruppen, H.; Visser, A. J. W. G.; van Koningsveld, G. A.; Jong, G. A. H. de; Voragen, A. G. J. Effects of non-covalent interactions with 5-O-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid) on the heat denaturation and solubility of globular proteins. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 5088–5095.
- (48) Loomis, W. D.; Battaile, J. Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. *Phytochemistry.* **1966**, *5*, 423–438.
- (49) Sabir, M. A.; Sosulski, F. W.; Finlayson, A. J. Chlorogenic acid-protein interactions in sunflower. *J. Agric. Food Chem.* **1974**, *22*, 575–578.
- (50) Prasad, D. T. Studies on the interaction of sunflower albumins with chlorogenic acid. *J. Agric. Food Chem.* **1988**, *36*, 450–452.

- (51) St. Flett, M. C. The Heats and Free Energies of Formation of some Hydrogen Bonds. *J. Soc. Dyers Colour.* **1952**, *68*, 59–64.
- (52) Saeed, M.; Cheryan, M. Chlorogenic acid interactions with sunflower proteins. *J. Agric. Food Chem.* **1989**, *37*, 1270–1274.
- (53) Bianco, A.; Chiacchio, U.; Rescifina, A.; Romeo, G.; Uccella, N. Biomimetic Supramolecular Biophenol–Carbohydrate and Biophenol–Protein Models by NMR Experiments. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 4281–4285.
- (54) Sastry, M. C. S.; Rao, M. S. N. Effect of chemical modification of sunflower 11 S protein on the binding of chlorogenic acid. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39*, 63–66.
- (55) Oh, H. I.; Hoff, J. E.; Armstrong, G. S.; Haff, L. A. Hydrophobic interaction in tannin-protein complexes. *J. Agric. Food Chem.* **1980**, *28*, 394–398.
- (56) Jongberg, S.; Gislason, N. E.; Lund, M. N.; Skibsted, L. H.; Waterhouse, A. L. Thiol–Quinone Adduct Formation in Myofibrillar Proteins Detected by LC-MS. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 6900–6905.
- (57) Czubinski, J.; Dwiecki, K. A review of methods used for investigation of protein-phenolic compound interactions. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2017**, *52*, 573–585.
- (58) Xiao, J.; Mao, F.; Yang, F.; Zhao, Y.; Zhang, C.; Yamamoto, K. Interaction of dietary polyphenols with bovine milk proteins: molecular structure-affinity relationship and influencing bioactivity aspects. *Mol. Nutr. Food Res.* **2011**, *55*, 1637–1645.
- (59) Dubeau, S.; Samson, G.; Tajmir-Riahi, H.-A. Dual effect of milk on the antioxidant capacity of green, Darjeeling, and English breakfast teas. *Food Chem.* **2010**, *122*, 539–545.
- (60) Soares, S.; Mateus, N.; Freitas, V. de. Interaction of different polyphenols with bovine serum albumin (BSA) and human salivary alpha-amylase (HSA) by fluorescence quenching. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 6726–6735.
- (61) Rawel, H. M.; Meidtner, K.; Kroll, J. Binding of selected phenolic compounds to proteins. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4228–4235.
- (62) Mason, H. S.; Peterson, E. W. Melanoproteins I. reactions between enzyme-generated quinones and amino acids. *Biophys. Acta, Gen. Subj.* **1965**, *111*, 134–146.
- (63) Pierpoint, W. S. o -Quinones formed in plant extracts. Their reactions with amino acids and peptides. *Biochem. J.* **1969**, *112*, 609–616.

- (64) Li, Y.; Jongberg, S.; Andersen, M. L.; Davies, M. J.; Lund, M. N. Quinone-induced protein modifications: Kinetic preference for reaction of 1,2-benzoquinones with thiol groups in proteins. *Free Radical Biology and Medicine*. **2016**, *97*, 148–157.
- (65) Prigent, S. V. E.; Voragen, A. G. J.; Visser, A. J.; van Koningsveld, G. A.; Gruppen, H. Covalent interactions between proteins and oxidation products of caffeoylquinic acid (chlorogenic acid). *J. Sci. Food Agric*. **2007**, *87*, 2502–2510.
- (66) Keppler, J. K.; Schwarz, K.; van der Goot, A. J. Covalent modification of food proteins by plant-based ingredients (polyphenols and organosulphur compounds): A commonplace reaction with novel utilization potential. *Trends Food Sci. Technol*. **2020**, *101*, 38–49.
- (67) Siebert, K. J. Haze formation in beverages. *LWT-Food Sci. Technol*. **2006**, *39*, 987–994.
- (68) Yaylayan, V. A. Recent Advances in the Chemistry of Strecker Degradation and Amadori Rearrangement: Implications to Aroma and Color Formation. *FSTR*. **2003**, *9*, 1–6.
- (69) Schonberg, A.; Moubacher, R. The Strecker Degradation of α -Amino Acids. *Chem. Rev*. **1952**, *50*, 261–277.
- (70) Rizzi, G. P. Formation of strecker aldehydes from polyphenol-derived quinones and α -amino acids in a nonenzymic model system. *J. Agric. Food Chem*. **2006**, *54*, 1893–1897.
- (71) Figueroa-Espinoza, M.; Morel, M.-H.; Surget, A.; Asther, M.; Moukha, S.; Sigoillot, J.-C.; Rouau, X. Attempt to cross-link feruloylated arabinoxylans and proteins with a fungal laccase. *Food Hydrocolloids*. **1999**, *13*, 65–71.
- (72) Figueroa-Espinoza, M.-C.; Morel, M.-H.; Rouau, X. Effect of Lysine, Tyrosine, Cysteine, and Glutathione on the Oxidative Cross-Linking of Feruloylated Arabinoxylans by a Fungal Laccase. *J. Agric. Food Chem*. **1998**, *46*, 2583–2589.
- (73) Selinheimo, E.; Lampila, P.; Mattinen, M.-L.; Buchert, J. Formation of protein-oligosaccharide conjugates by laccase and tyrosinase. *J. Agric. Food Chem*. **2008**, *56*, 3118–3128.
- (74) Piber, M.; Koehler, P. Identification of dehydro-ferulic acid-tyrosine in rye and wheat: evidence for a covalent cross-link between arabinoxylans and proteins. *J. Agric. Food Chem*. **2005**, *53*, 5276–5284.

- (75) Brudzynski, K.; Sjaarda, C.; Maldonado-Alvarez, L.; Khan, R. H. A New Look on Protein-Polyphenol Complexation during Honey Storage: Is This a Random or Organized Event with the Help of Dirigent-Like Proteins? *PLoS ONE*. **2013**, *8*, e72897.
- (76) Poojary, M. M.; Zhang, W.; Olesen, S. B.; Rauh, V.; Lund, M. N. Green Tea Extract Decreases Arg-Derived Advanced Glycation Endproducts but Not Lys-Derived AGEs in UHT Milk during 1-Year Storage. *J. Agric. Food Chem.* **2020**.
- (77) Rohn, S.; Petzke, K. J.; Rawel, H. M.; Kroll, J. Reactions of chlorogenic acid and quercetin with a soy protein isolate--influence on the in vivo food protein quality in rats. *Mol. Nutr. Food Res.* **2006**, *50*, 696–704.
- (78) Rawel, H. M.; Czajka, D.; Rohn, S.; Kroll, J. Interactions of different phenolic acids and flavonoids with soy proteins. *Int. J. Biol. Macromol.* **2002**, *30*, 137–150.
- (79) Guharay, J.; Sengupta, B.; Sengupta, P. K. Protein-flavonol interaction: Fluorescence spectroscopic study. *Proteins*. **2001**, *43*, 75–81.
- (80) O'Keefe, D. O. Quantitative electrophoretic analysis of proteins labeled with monobromobimane. *Anal. Biochem.* **1994**, *222*, 86–94.
- (81) Ali, M.; Keppler, J. K.; Coenye, T.; Schwarz, K. Covalent Whey Protein-Rosmarinic Acid Interactions: A Comparison of Alkaline and Enzymatic Modifications on Physicochemical, Antioxidative, and Antibacterial Properties. *J. Food Sci.* **2018**, *83*, 2092–2100.
- (82) Adler-Nissen, J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *J. Agric. Food Chem.* **1979**, *27*, 1256–1262.
- (83) James, N. A.; Ryley, J. The rapid determination of chemically reactive lysine in the presence of carbohydrates by a modified trinitrobenzenesulphonic acid procedure. *J. Sci. Food Agric.* **1986**, *37*, 151–156.
- (84) Jongberg, S.; Lund, M. N.; Waterhouse, A. L.; Skibsted, L. H. 4-Methylcatechol Inhibits Protein Oxidation in Meat but Not Disulfide Formation. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 10329–10335.
- (85) Epps, D. E.; Raub, T. J.; Caiolfa, V.; Chiari, A.; Zamai, M. Determination of the affinity of drugs toward serum albumin by measurement of the quenching of the intrinsic tryptophan fluorescence of the protein. *J. Pharm. Pharmacol.* **1999**, *51*, 41–48.

- (86) Davies, A. M.; Newby, V. K.; Syngé, R. L. Bound quinic acid as a measure of coupling of leaf and sunflower-seed proteins with chlorogenic acid congeners: loss of availability of lysine. *J. Sci. Food Agric.* **1978**, *29*, 33–41.
- (87) Nardini, M. *Detection of bound phenolic acids: prevention by ascorbic acid and ethylenediaminetetraacetic acid of degradation of phenolic acids during alkaline hydrolysis*; Food Chemistry, Vol. 79, 2002.
- (88) Seifert, A.; Rawel, H. M.; Kroll, J.; Harding, S. E. Characterization of bovine serum albumin/chlorogenic acid solution mixtures by analytical ultracentrifugation. In *Analytical Ultracentrifugation VII*; Springer, Berlin, Heidelberg, 83–88.
- (89) Rohn, S.; Rawel, H. M.; Pietruschinski, N.; Kroll, J. In vitro inhibition of α -chymotryptic activity by phenolic compounds. *J. Sci. Food Agric.* **2001**, *81*, 1512–1521.
- (90) Jia, Z.; Zheng, M.; Tao, F.; Chen, W.; Huang, G.; Jiang, J. Effect of covalent modification by (–)-epigallocatechin-3-gallate on physicochemical and functional properties of whey protein isolate. *LWT--Food Sci. Technol.* **2016**, *66*, 305–310.
- (91) Sui, X.; Sun, H.; Qi, B.; Zhang, M.; Li, Y.; Jiang, L. Functional and conformational changes to soy proteins accompanying anthocyanins: Focus on covalent and non-covalent interactions. *Food Chem.* **2018**, *245*, 871–878.
- (92) Rohn, S.; Rawel, H. M.; Kroll, J. Antioxidant activity of protein-bound quercetin. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 4725–4729.
- (93) Cao, H.; Chen, X.; Yamamoto, K. Bovine serum albumin significantly improves the DPPH free radical scavenging potential of dietary polyphenols and gallic acids. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2012**, *12*, 940–948.
- (94) He, W.; Xu, H.; Lu, Y.; Zhang, T.; Li, S.; Lin, X.; Xu, B.; Wu, X. Function, digestibility and allergenicity assessment of ovalbumin–EGCG conjugates. *J. Funct. Foods.* **2019**, *61*, 103490.
- (95) He, W.; Zhang, T.; Velickovic, T. C.; Li, S.; Lyu, Y.; Wang, L.; Yi, J.; Liu, Z.; He, Z.; Wu, X. Covalent conjugation with (–)-epigallo-catechin 3-gallate and chlorogenic acid changes allergenicity and functional properties of Ara h1 from peanut. *Food Chem.* **2020**, *331*, 127355.
- (96) Singh, A.; Holvoet, S.; Mercenier, A. Dietary polyphenols in the prevention and treatment of allergic diseases. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology.* **2011**, *41*, 1346–1359.

- (97) Rawel, H. M.; Rohn, S.; Kroll, J.; Schweigert, F. J. Surface enhanced laser desorptions ionization-time of flight-mass spectrometry analysis in complex food and biological systems. *Mol. Nutr. Food Res.* **2005**, *49*, 1104–1111.
- (98) Padliya, N. D.; Wood, T. D. A strategy to improve peptide mass fingerprinting matches through the optimization of matrix-assisted laser desorption/ionization matrix selection and formulation. *Proteomics.* **2004**, *4*, 466–473.
- (99) Jansson, T.; Rauh, V.; Danielsen, B. P.; Poojary, M. M.; Waehrens, S. S.; Bredie, Wender L. P.; Sørensen, J.; Petersen, M. A.; Ray, C. A.; Lund, M. N. Green Tea Polyphenols Decrease Strecker Aldehydes and Bind to Proteins in Lactose-Hydrolyzed UHT Milk. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 10550–10561.
- (100) Prota, G. Progress in the chemistry of melanins and related metabolites. *Med. Res. Rev.* **1988**, *8*, 525–556.
- (101) Raper, H. S. The Aerobic Oxidases. *Physiol. Rev.* **1928**, *8*, 245–282.
- (102) Mason, H. S. Oxidases. *Annu. Rev. Biochem.* **1965**, *34*, 595–634.
- (103) Sánchez-Ferrer, Á.; Neptuno Rodríguez-López, J.; García-Cánovas, F.; García-Carmona, F. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology.* **1995**, *1247*, 1–11.
- (104) Ito, S.; Wakamatsu, K. Chemistry of mixed melanogenesis--pivotal roles of dopaquinone. *Photochem. Photobiol.* **2008**, *84*, 582–592.
- (105) Ito, S.; Fujita, K. Formation of cysteine conjugates from dihydroxyphenylalanine and its S-cysteinyl derivatives by peroxidase-catalyzed oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects.* **1981**, *672*, 151–157.
- (106) Li, J.; Christensen, B. M. Identification of Products and Intermediates During L-Dopa Oxidation to Dopachrome Using High Pressure Liquid Chromatography with Electrochemical Detection. *J. Liq. Chromatogr.* **1993**, *16*, 1117–1133.
- (107) Edge, R.; d'Ischia, M.; Land, E. J.; Napolitano, A.; Navaratnam, S.; Panzella, L.; Pezzella, A.; Ramsden, C. A.; Riley, P. A. Dopaquinone redox exchange with dihydroxyindole and dihydroxyindole carboxylic acid. *Pigment Cell Res.* **2006**, *19*, 443–450.

- (108) Micillo, R.; Panzella, L.; Koike, K.; Monfrecola, G.; Napolitano, A.; d'Ischia, M. "Fifty Shades" of Black and Red or How Carboxyl Groups Fine Tune Eumelanin and Pheomelanin Properties. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*,
- (109) d'Ischia, M.; Napolitano, A.; Pezzella, A.; Land, E. J.; Ramsden, C. A.; Riley, P. A. 5,6-Dihydroxyindoles and Indole-5,6-diones. *Adv. Heterocycl. Chem.* **2005**, *89*, 1–63.
- (110) d'Ischia, M.; Napolitano, A.; Pezzella, A. 5,6-Dihydroxyindole Chemistry: Unexplored Opportunities Beyond Eumelanin. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, *2011*, 5501–5516.
- (111) Panzella, L.; Pezzella, A.; Napolitano, A.; d'Ischia, M. The first 5,6-dihydroxyindole tetramer by oxidation of 5,5',6,6'-tetrahydroxy-2,4'-biindolyl and an unexpected issue of positional reactivity en route to eumelanin-related polymers. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1411–1414.
- (112) Pezzella, A.; Panzella, L.; Natangelo, A.; Arzillo, M.; Napolitano, A.; d'Ischia, M. 5,6-dihydroxyindole tetramers with "anomalous" interunit bonding patterns by oxidative coupling of 5,5',6,6'-tetrahydroxy-2,7'-biindolyl: emerging complexities on the way toward an improved model of eumelanin buildup. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 9225–9230.
- (113) Corradoini, M. G.; Napolitano, A.; Prota, G. A biosynthetic approach to the structure of eumelanins. The isolation of oligomers from 5,6-dihydroxy-1-methylindole. *Tetrahedron.* **1986**, *42*, 2083–2088.
- (114) Pezzella, A.; Napolitano, A.; d'Ischia, M.; Prota, G. Oxidative polymerisation of 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid to melanin: A new insight. *Tetrahedron.* **1996**, *52*, 7913–7920.
- (115) Ascione, L.; Pezzella, A.; Ambrogi, V.; Carfagna, C.; d'Ischia, M. Intermolecular π -electron perturbations generate extrinsic visible contributions to eumelanin black chromophore in model polymers with interrupted interring conjugation. *Photochem. Photobiol.* **2013**, *89*, 314–318.
- (116) Ito, S.; Prota, G. A facile one-step synthesis of cysteinyl dopas using mushroom tyrosinase. *Experientia.* **1977**, *33*, 1118–1119.
- (117) Thomson, R. H. Pigmente aus rötlichen Haaren und Federn. *Angew. Chem.* **1974**, *86*, 355–363.

- (118) Napolitano, A.; Costantini, C.; Crescenzi, O.; Prota, G. Characterisation of 1,4-benzothiazine intermediates in the oxidative conversion of 5-S-cysteinyl-dopa to pheomelanins. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 6365–6368.
- (119) Napolitano, A.; Di Donato, P.; Prota, G. Zinc-Catalyzed Oxidation of 5-S-Cysteinyl-dopa to 2,2'-Bi(2H-1,4-benzothiazine): Tracking the Biosynthetic Pathway of Trichochromes, the Characteristic Pigments of Red Hair. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 6958–6966.
- (120) Napolitano, A.; Memoli, S.; Crescenzi, O.; Prota, G. Oxidative Polymerization of the Pheomelanin Precursor 5-Hydroxy-1,4-benzothiazinylalanine: A New Hint to the Pigment Structure. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 598–604.
- (121) Di Donato, P.; Napolitano, A. 1,4-Benzothiazines as Key Intermediates in the Biosynthesis of Red Hair Pigment Pheomelanins // 1,4-Benzothiazines as Key Intermediates in the Biosynthesis of Red Hair Pigment Pheomelanins. *Pigment Cell Res.* **2003**, *16*, 532–539.
- (122) Wakamatsu, K.; Ohtara, K.; Ito, S. Chemical analysis of late stages of pheomelanogenesis: conversion of dihydrobenzothiazine to a benzothiazole structure. *Pigm. Cell Melanoma Res.* **2009**, *22*, 474–486.
- (123) Napolitano, A.; Memoli, S.; Prota, G. A New Insight in the Biosynthesis of Pheomelanins: Characterization of a Labile 1,4-Benzothiazine Intermediate. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 3009–3011.
- (124) Greco, G.; Panzella, L.; Napolitano, A.; d'Ischia, M. The fundamental building blocks of red human hair pheomelanin are isoquinoline-containing dimers. *Pigm. Cell Melanoma Res.* **2012**, *25*, 110–112.
- (125) Greco, G.; Panzella, L.; Verotta, L.; d'Ischia, M.; Napolitano, A. Uncovering the structure of human red hair pheomelanin: benzothiazolythiazinodihydroisoquinolines as key building blocks. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 675–682.
- (126) Thureau, P.; Ziarelli, F.; Thévand, A.; Martin, R. W.; Farmer, P. J.; Viel, S.; Mollica, G. Probing the motional behavior of eumelanin and pheomelanin with solid-state NMR spectroscopy: new insights into the pigment properties. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*. **2012**, *18*, 10689–10700.
- (127) Costantini, C.; Crescenzi, O.; Prota, G.; Palumbo, A. New intermediates of pheomelanogenesis in vitro beyond the 1,4-benzothiazine stage. *Tetrahedron.* **1990**, *46*, 6831–6838.

- (128) Prota, G. *Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals*, Vol. 75, 1980.
- (129) García-Borrón, J. C.; Saura, M. D.; Solano, F.; Iborra, J. L.; Lozano, J. A. FT-IR spectroscopy of natural melanins isolated from Harding-Passey mouse melanoma. *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR*. **1985**, *17*, 211–218.
- (130) d'Ischia, M.; Wakamatsu, K.; Napolitano, A.; Briganti, S.; Garcia-Borrón, J.-C.; Kovacs, D.; Meredith, P.; Pezzella, A.; Picardo, M.; Sarna, T.; Simon, J. D.; Ito, S. Melanins and melanogenesis: methods, standards, protocols. *Pigm. Cell Melanoma Res*. **2013**, *26*, 616–633.
- (131) Lerche, C. M.; Olsen, P.; Nissen, C. V.; Philipsen, P. A.; Wulf, H. C. A novel LC-MS/MS method to quantify eumelanin and pheomelanin and their relation to UVR sensitivity - A study on human skin biopsies. *Pigm. Cell Melanoma Res*. **2019**, *32*, 809–816.
- (132) Ito, S.; Del Bino, S.; Hirobe, T.; Wakamatsu, K. Improved HPLC Conditions to Determine Eumelanin and Pheomelanin Contents in Biological Samples Using an Ion Pair Reagent. *Int. J. Mol. Sci*. **2020**, *21*,
- (133) Rioux, B.; Rouanet, J.; Akil, H.; Besse, S.; Debiton, E.; Bouchon, B.; Degoul, F.; Quintana, M. Determination of eumelanin and pheomelanin in melanomas using solid-phase extraction and high performance liquid chromatography-diode array detection (HPLC-DAD) analysis. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci*. **2019**, *1113*, 60–68.
- (134) Del Bino, S.; Ito, S.; Sok, J.; Nakanishi, Y.; Bastien, P.; Wakamatsu, K.; Bernerd, F. Chemical analysis of constitutive pigmentation of human epidermis reveals constant eumelanin to pheomelanin ratio. *Pigm. Cell Melanoma Res*. **2015**, *28*, 707–717.
- (135) Ito, S.; Wakamatsu, K.; Sarna, T. Photodegradation of Eumelanin and Pheomelanin and Its Pathophysiological Implications. *Photochem. Photobiol*. **2018**, *94*, 409–420.
- (136) Maeda, K.; Hatao, M. Involvement of photooxidation of melanogenic precursors in prolonged pigmentation induced by ultraviolet A. *J. Invest. Dermatol*. **2004**, *122*, 503–509.
- (137) Pukalski, J.; Marcol, N.; Wolan, N.; Płonka, P. M.; Ryszka, P.; Kowalski, T.; Latowski, D. Detection of a pheomelanin-like pigment by EPR spectroscopy in the mycelium of *Plenodomus biglobosus*. *Acta Biochim. Pol*. **2020**, *67*, 295–301.

- (138) Sealy, R. C.; Hyde, J. S.; Felix, C. C.; Menon, I. A.; Prota, G.; Swartz, H. M.; Persad, S.; Haberman, H. F. Novel free radicals in synthetic and natural pheomelanins: distinction between dopa melanins and cysteinyl-dopa melanins by ESR spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1982**, *79*, 2885–2889.
- (139) Galván, I.; Jorge, A. Dispersive Raman spectroscopy allows the identification and quantification of melanin types. *Ecol. Evol.* **2015**, *5*, 1425–1431.
- (140) Galván, I.; Jorge, A.; Ito, K.; Tabuchi, K.; Solano, F.; Wakamatsu, K. Raman spectroscopy as a non-invasive technique for the quantification of melanins in feathers and hairs. *Pigm. Cell Melanoma Res.* **2013**, *26*, 917–923.
- (141) Galván, I.; Jorge, A.; Solano, F.; Wakamatsu, K. Vibrational characterization of pheomelanin and trichochrome F by Raman spectroscopy. *Spectrochim. Acta, Part A, Mol. Biomol. Spectrosc.* **2013**, *110*, 55–59.
- (142) Yabuta, G.; Koizumi, Y.; Namiki, K.; Hida, M.; Namiki, M. Structure of green pigment formed by the reaction of caffeic acid esters (or chlorogenic acid) with a primary amino compound. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **2001**, *65*, 2121–2130.
- (143) Wildermuth, S. R.; Young, E. E.; Were, L. M. Chlorogenic Acid Oxidation and Its Reaction with Sunflower Proteins to Form Green-Colored Complexes. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2016**, *15*, 829–843.
- (144) Yabuta, G.; Koizumi, Y.; Namiki, K.; Kawai, T.; Hayashi, T.; Namiki, M. Novel Benzacridine Derivative in the Green Pigment from Methyl Caffeate and Butylamine. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **1996**, *60*, 1701–1702.
- (145) Bongartz, V.; Brandt, L.; Gehrmann, M. L.; Zimmermann, B. F.; Schulze-Kaysers, N.; Schieber, A. Evidence for the Formation of Benzacridine Derivatives in Alkaline-Treated Sunflower Meal and Model Solutions. *Molecules (Basel, Switzerland)*. **2016**, *21*, 91.
- (146) Schilling, S.; Sigolotto, C.-I.; Carle, R.; Schieber, A. Characterization of covalent addition products of chlorogenic acid quinone with amino acid derivatives in model systems and apple juice by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2008**, *22*, 441–448.
- (147) Namiki, M.; Yabuta, G.; Koizumi, Y.; Yano, M. Development of free radical products during the greening reaction of caffeic acid esters (or chlorogenic acid) and a primary amino compound. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **2001**, *65*, 2131–2136.

- (148) Iacomino, M.; Weber, F.; Gleichenhagen, M.; Pistorio, V.; Panzella, L.; Pizzo, E.; Schieber, A.; d'Ischia, M.; Napolitano, A. Stable Benzacridine Pigments by Oxidative Coupling of Chlorogenic Acid with Amino Acids and Proteins: Toward Natural Product-Based Green Food Coloring. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 6519–6528.
- (149) Sava, V. M.; Yang, S.-M.; Hong, M.-Y.; Yang, P.-C.; Huang, G. S. Isolation and characterization of melanic pigments derived from tea and tea polyphenols. *Food Chem.* **2001**, *73*, 177–184.
- (150) Drynan, J. W.; Clifford, M. N.; Obuchowicz, J.; Kuhnert, N. The chemistry of low molecular weight black tea polyphenols. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 417–462.
- (151) Graham, H. N. Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Prev. Med.* **1992**, *21*, 334–350.
- (152) Matsuo, Y.; Tanaka, T.; Kouno, I. A new mechanism for oxidation of epigallocatechin and production of benzotropolone pigments. *Tetrahedron.* **2006**, *62*, 4774–4783.
- (153) Kuhnert, N. Unraveling the structure of the black tea thearubigins. *Arch. Biochem. Biophys.* **2010**, *501*, 37–51.
- (154) Mai, F.; Mertens, N.; Glomb, M. A. Bräunungsmechanismen pflanzlicher Lebensmittel. *Chem. Unserer Zeit.* **2019**, *53*, 330–341.
- (155) Tanaka, T.; Kouno, I. Oxidation of tea catechins: chemical structures and reaction mechanism. *FSTR.* **2003**, *9*, 128–133.
- (156) Weerawatanakorn, M.; Hung, W.-L.; Pan, M.-H.; Li, S.; Li, D.; Wan, X.; Ho, C.-T. Chemistry and health beneficial effects of oolong tea and theasinensins. *Food Sci. Hum. Wellness.* **2015**, *4*, 133–146.
- (157) Haslam, E. Thoughts on thearubigins. *Phytochemistry.* **2003**, *64*, 61–73.
- (158) Hashimoto, F.; Nonaka, G.-I.; Nishioka, I. Tannins and related compounds. LXIX. Isolation and structure elucidation of B,B'-linked bisflavanoids, theasinensins D-G and oolongtheanin from oolong tea. (2). *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, *36*, 1676–1684.
- (159) Hirose, S.; Tomatsu, K.; Yanase, E. Isolation of key intermediates during formation of oolongtheanins. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 7040–7043.
- (160) Tanaka, T.; Matsuo, Y.; Kouno, I. Chemistry of secondary polyphenols produced during processing of tea and selected foods. *Int. J. Mol. Sci.* **2009**, *11*, 14–40.

- (161) Davis, A. L.; Lewis, J. R.; Cai, Y.; Powell, C.; Davis, A. P.; Wilkins, J. P.; Pudney, P.; Clifford, M. N. A polyphenolic pigment from black tea. *Phytochemistry*. **1997**, *46*, 1397–1402.
- (162) Matsuo, Y.; Li, Y.; Watarumi, S.; Tanaka, T.; Kouno, I. Production and degradation mechanism of theacitrin C, a black tea pigment derived from epigallocatechin-3-O-gallate via a bicyclo[3.2.1]octane-type intermediate. *Tetrahedron*. **2011**, *67*, 2051–2059.
- (163) Jhoo, J.-W.; Lo, C.-Y.; Li, S.; Sang, S.; Ang, C. Y. W.; Heinze, T. M.; Ho, C.-T. Stability of black tea polyphenol, theaflavin, and identification of theanaphthoquinone as its major radical reaction product. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 6146–6150.
- (164) Tanaka, T.; Betsumiya, Y.; Mine, C.; Kouno, I. Theanaphthoquinone, a novel pigment oxidatively derived from theaflavin during tea-fermentation. *Chem. Commun.* **2000**, 1365–1366.
- (165) Kuhnert, N.; Drynan, J. W.; Obuchowicz, J.; Clifford, M. N.; Witt, M. Mass spectrometric characterization of black tea thearubigins leading to an oxidative cascade hypothesis for thearubigin formation. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2010**, *24*, 3387–3404.
- (166) Kuhnert, N.; Dairpoosh, F.; Yassin, G.; Golon, A.; Jaiswal, R. What is under the hump? Mass spectrometry based analysis of complex mixtures in processed food--lessons from the characterisation of black tea thearubigins, coffee melanoidines and caramel. *Food Funct.* **2013**, *4*, 1130–1147.
- (167) Tan, J.; Bruijn, W. J. C. de; van Zadelhoff, A.; Lin, Z.; Vincken, J.-P. Browning of Epicatechin (EC) and Epigallocatechin (EGC) by Auto-Oxidation. *J. Agric. Food Chem.* **2020**, *68*, 13879–13887.
- (168) Matsuo, Y.; Hayashi, T.; Saito, Y.; Kouno, I.; Tanaka, T. Structures of enzymatic oxidation products of epigallocatechin. *Tetrahedron*. **2013**, *69*, 8952–8958.
- (169) López-Serrano, M.; Barceló, A. R. Comparative study of the products of the peroxidase-catalyzed and the polyphenoloxidase-catalyzed (+)-catechin oxidation. Their possible implications in strawberry (*Fragaria x ananassa*) browning reactions. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 1218–1224.
- (170) Joubert, E.; De Beer, D. Rooibos (*Aspalathus linearis*) beyond the farm gate: From herbal tea to potential phytopharmaceutical. *S. Afr. J. B.* **2011**, *77*, 869–886.

- (171) Von Gadow, A.; Joubert, E.; Hansmann, C. F. Comparison of the Antioxidant Activity of Aspalathin with That of Other Plant Phenols of Rooibos Tea (*Aspalathus linearis*), α -Tocopherol, BHT, and BHA. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 632–638.
- (172) Kawano, A.; Nakamura, H.; Hata, S.; Minakawa, M.; Miura, Y.; Yagasaki, K. Hypoglycemic effect of aspalathin, a rooibos tea component from *Aspalathus linearis*, in type 2 diabetic model db/db mice. *Phytomedicine.* **2009**, *16*, 437–443.
- (173) Schulz, H.; Joubert, E.; Schütze, W. Quantification of quality parameters for reliable evaluation of green rooibos (*Aspalathus linearis*). *Eur. Food Res. Technol.* **2003**, *216*, 539–543.
- (174) Krafczyk, N.; Heinrich, T.; Porzel, A.; Glomb, M. A. Oxidation of the Dihydrochalcone Aspalathin Leads to Dimerization. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 6838–6843.
- (175) Heinrich, T.; Willenberg, I.; Glomb, M. A. Chemistry of color formation during rooibos fermentation. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 5221–5228.
- (176) De Beer, D.; Tobin, J.; Walczak, B.; Van Der Rijst, Marieta; Joubert, E. Phenolic composition of rooibos changes during simulated fermentation: Effect of endogenous enzymes and fermentation temperature on reaction kinetics. *Food Res. Int.* **2019**, *121*, 185–196.
- (177) Krafczyk, N.; Glomb, M. A. Characterization of Phenolic Compounds in Rooibos Tea. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 3368–3376.
- (178) Sanoner, P.; Guyot, S.; Marnet, N.; Molle, D.; Drilleau, J. P. Polyphenol profiles of French cider apple varieties (*Malus domestica* sp.). *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 4847–4853.
- (179) Le Deun, E.; van der Werf, R.; Le Bail, G.; Le Quéré, J.-M.; Guyot, S. HPLC-DAD-MS Profiling of Polyphenols Responsible for the Yellow-Orange Color in Apple Juices of Different French Cider Apple Varieties. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 7675–7684.
- (180) Guyot, S.; Serrand, S.; Le Quéré, J. M.; Sanoner, P.; Renard, C. M. Enzymatic synthesis and physicochemical characterisation of phloridzin oxidation products (POP), a new water-soluble yellow dye deriving from apple. *Innovative Food Sci. Emerging Technol.* **2007**, *8*, 443–450.

- (181) Le Guernevé, C.; Sanoner, P.; Drilleau, J.-F.; Guyot, S. New compounds obtained by enzymatic oxidation of phloridzin. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 6673–6677.
- (182) Oszmianski, J.; Lee, C. Y. Enzymic oxidation of phloretin glucoside in model system. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39*, 1050–1052.
- (183) Cui, T.; Nakamura, K.; Ma, L.; Li, J.-Z.; Kayahara, H. Analyses of arbutin and chlorogenic acid, the major phenolic constituents in Oriental pear. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 3882–3887.
- (184) Raja, M.; Hernández-Revelles, J.; Hernández-Cassou, S.; Saurina, J. Determination of polyphenols in the pear pulp matrix by solvent extraction and liquid chromatography with UV-Vis detection. *Anal. Methods.* **2014**, *6*, 9769–9776.
- (185) Franck, C.; Lammertyn, J.; Ho, Q. T.; Verboven, P.; Verlinden, B.; Nicolai, B. M. Browning disorders in pear fruit. *Postharvest Biol. Technol.* **2007**, *43*, 1–13.
- (186) Mai, F.; Glomb, M. A. Isolation of phenolic compounds from iceberg lettuce and impact on enzymatic browning. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 2868–2874.
- (187) Mai, F.; Glomb, M. A. Structural and Sensory Characterization of Novel Sesquiterpene Lactones from Iceberg Lettuce. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 295–301.
- (188) Mai, F.; Glomb, M. A. Lettucenin sesquiterpenes contribute significantly to the browning of lettuce. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 4747–4753.
- (189) Schall, A.; Reiser, O. Synthesis of Biologically Active Guaianolides with a trans - Annulated Lactone Moiety. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, *2008*, 2353–2364.
- (190) Garcia, C. J.; García-Villalba, R.; Garrido, Y.; Gil, M. I.; Tomás-Barberán, F. A. Untargeted metabolomics approach using UPLC-ESI-QTOF-MS to explore the metabolome of fresh-cut iceberg lettuce. *Metabolomics.* **2016**, *12*,
- (191) García, C. J.; García-Villalba, R.; Gil, M. I.; Tomas-Barberan, F. A. LC-MS Untargeted Metabolomics To Explain the Signal Metabolites Inducing Browning in Fresh-Cut Lettuce. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 4526–4535.
- (192) Hatoum, D.; Hertog, M. L.; Geeraerd, A. H.; Nicolai, B. M. Effect of browning related pre- and postharvest factors on the ‘Braeburn’ apple metabolome during CA storage. *Postharvest Biol. Technol.* **2016**, *111*, 106–116.
- (193) Tan, J.; Dai, W.; Lu, M.; Lv, H.; Guo, L.; Zhang, Y.; Zhu, Y.; Peng, Q.; Lin, Z. Study of the dynamic changes in the non-volatile chemical constituents of black tea

during fermentation processing by a non-targeted metabolomics approach. *Food Res. Int.* **2016**, *79*, 106–113.

(194) Friedman, M. Chemistry, Biochemistry, and Dietary Role of Potato Polyphenols. A Review. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 1523–1540.

(195) Muneta, P. Comparisons of Inhibitors of Tyrosine Oxidation in the enzymatic blackening of potatoes. *Am. Potato J.* **1981**, *58*, 85–92.

(196) Lærke, P. E.; Christiansen, J.; Veierskov, B. Colour of blackspot bruises in potato tubers during growth and storage compared to their discolouration potential. *Postharvest Biol. Technol.* **2002**, *26*, 99–111.

(197) Stevens, L. H.; Davelaar, E. Isolation and characterization of blackspot pigments from potato tubers. *Phytochemistry.* **1996**, *42*, 941–947.

(198) Stevens, L. H.; Davelaar, E. Biochemical Potential of Potato Tubers To Synthesize Blackspot Pigments in Relation to Their Actual Blackspot Susceptibility. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 4221–4226.

(199) Stevens, L. H.; Davelaar, E.; Kolb, R. M.; Pennings, E. J.; Smit, N. P. Tyrosine and cysteine are substrates for blackspot synthesis in potato. *Phytochemistry.* **1998**, *49*, 703–707.

(200) Yang, C.-P.; Nong, Z.-R.; Lu, J.-L.; Lu, L.; Xu, J.-S.; Han, Y.-Z.; Li, Y.-J.; Fujita, S. Banana Polyphenol Oxidase: Occurrence and Change of Polyphenol Oxidase Activity in Some Banana Cultivars during Fruit Development. *FSTR.* **2004**, *10*, 75–78.

(201) Weeks, W. W.; Campos, M. P.; Moldoveanu, S. Biochemical and model chemical reactions for the basis of red pigment in flue-cured tobacco. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 1321–1328.

(202) Pokorný, J.; Hosková, J.; Kyzlinik, V. Nonenzymic browning of cauliflower on storage. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung.* **1975**, *158*, 207–214.

(203) Moon, K. M.; Kwon, E.-B.; Lee, B.; Kim, C. Y. Recent Trends in Controlling the Enzymatic Browning of Fruit and Vegetable Products. *Molecules (Basel, Switzerland).* **2020**, *25*,

(204) Liang, S.; Were, L. M. Chlorogenic acid oxidation-induced greening of sunflower butter cookies as a function of different sweeteners and storage conditions. *Food Chem.* **2018**, *241*, 135–142.

- (205) Rogers, A.; Hahn, L.; Pham, V.; Were, L. Greening in sunflower butter cookies as a function of egg replacers and baking temperature. *J. Food Sci. Technol.* **2018**, *55*, 1478–1488.
- (206) Mertens, N.; Mai, F.; Glomb, M. A. Influence of nucleophilic amino acids on enzymatic browning systems. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 1719–1725.
- (207) Hurrell, R. F.; Finot, P. A.; Cuq, J. L. Protein-polyphenol reactions. *BJN.* **1982**, *47*, 191.
- (208) Richard, F. C.; Goupy, P. M.; Nicolas, J. J.; Lacombe, J. M.; Pavia, A. A. Cysteine as an inhibitor of enzymic browning. 1. Isolation and characterization of addition compounds formed during oxidation of phenolics by apple polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39*, 841–847.
- (209) Richard-Forget, F. C.; Goupy, P. M.; Nicolas, J. J. Cysteine as an inhibitor of enzymic browning. 2. Kinetic studies. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 2108–2113.
- (210) Tsurutani, M.; Murata, M.; Homma, S. Comparison of Enzymatic Browning of Japanese Pear and Apple. *FSTR.* **2000**, *6*, 344–347.
- (211) Brotzel, F.; Mayr, H. Nucleophilicities of amino acids and peptides. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 3814–3820.
- (212) Rzeszotarska, B.; Masiukiewicz, E. Arginine, Histidine And Tryptophan in Peptide Synthesis. The Guanidino Function of Arginine. *Org. Prep. Proced. Int.* **1988**, *20*, 427–464.
- (213) Uchida, K. Histidine and lysine as targets of oxidative modification. *Amino Acids.* **2003**, *25*, 249–257.
- (214) Rawel, H. M.; Kroll, J.; Hohl, U. C. Model studies on reactions of plant phenols with whey proteins. *Mol. Nutr. Food Res.* **2001**, *45*, 72–81.
- (215) Pettinger, J.; Jones, K.; Cheeseman, M. D. Lysine-Targeting Covalent Inhibitors. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2017**, *56*, 15200–15209.
- (216) Wakamatsu, K.; Nagao, A.; Watanabe, M.; Nakao, K.; Ito, S. Pheomelanogenesis is promoted at a weakly acidic pH. *Pigm. Cell Melanoma Res.* **2017**, *30*, 372–377.
- (217) Gobert, J.; Glomb, M. A. Degradation of Glucose: Reinvestigation of Reactive α -Dicarbonyl Compounds. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 8591–8597.

- (218) Glomb, M. A.; Tschirnich, R. Detection of α -dicarbonyl compounds in maillard reaction systems and in vivo. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5543–5550.
- (219) Jost, T.; Heymann, T.; Glomb, M. A. Efficient analysis of 2-acetyl-1-pyrroline in foods using a novel derivatization strategy and LC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 3046–3054.
- (220) Tanaka, T.; Watarumi, S.; Matsuo, Y.; Kamei, M.; Kouno, I. Production of theasinensins A and D, epigallocatechin gallate dimers of black tea, by oxidation–reduction dismutation of dehydrotheasinensin A. *Tetrahedron.* **2003**, *59*, 7939–7947.
- (221) Muller, Christo J. F.; Malherbe, C. J.; Chellan, N.; Yagasaki, K.; Miura, Y.; Joubert, E. Potential of rooibos, its major C -glucosyl flavonoids, and Z -2-(β -D-glucopyranosyloxy)-3-phenylpropenoic acid in prevention of metabolic syndrome. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2017**, *58*, 227–246.
- (222) Hattori, M.; Shu, Y.-Z.; El-Sedawy, A. I.; Namba, T.; Kobashi, K.; Tomimori, T. Metabolism of Homoorientin by Human Intestinal Bacteria. *J. Nat. Prod.* **1988**, *51*, 874–878.
- (223) Fleschhut, J.; Kratzer, F.; Rechkemmer, G.; Kulling, S. E. Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro. *Eur J Nutr.* **2006**, *45*, 7–18.
- (224) Guthrie, J. P.; Cossar, J.; Cullimore, P. A.; Kamkar, N. M.; Taylor, K. F. The retroaldol reaction of chalcone. *Can. J. Chem.* **1983**, *61*, 2621–2626.
- (225) Smuda, M.; Glomb, M. A. Fragmentation Pathways during Maillard-Induced Carbohydrate Degradation. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 10198–10208.
- (226) Smuda, M.; Glomb, M. A. Maillard Degradation Pathways of Vitamin C. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *52*, 4887–4891.
- (227) Davídek, T.; Robert, F.; Devaud, S.; Vera, F. A.; Blank, I. Sugar fragmentation in the maillard reaction cascade: formation of short-chain carboxylic acids by a new oxidative alpha-dicarbonyl cleavage pathway. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 6677–6684.
- (228) Aubry, J. M.; Cazin, B. Chemical sources of singlet oxygen. 2. Quantitative generation of singlet oxygen from hydrogen peroxide disproportionation catalyzed by molybdate ions. *Inorg. Chem.* **1988**, *27*, 2013–2014.
- (229) Renz, M.; Meunir, B. 100 Years of Baeyer-Villiger Oxidations. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**.

- (230) Paizs, C.; Bartlewski-Hof, U.; Rétey, J. Investigation of the Mechanism of Action of Pyrogallol–Phloroglucinol Transhydroxylase by Using Putative Intermediates. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 2805–2811.
- (231) Penning, T. M. Genotoxicity of ortho-quinones: reactive oxygen species versus covalent modification. *Toxicol. Res.* **2017**, *6*, 740–754.
- (232) Kroll, J.; Rawel, H. M.; Seidelmann, N. Physicochemical Properties and Susceptibility to Proteolytic Digestion of Myoglobin–Phenol Derivatives. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 1580–1587.
- (233) Kroll, J.; Rawel, H. M. Reactions of Plant Phenols with Myoglobin: Influence of Chemical Structure of the Phenolic Compounds. *J. Food Sci.* **2001**, *66*, 48–58.
- (234) Tang, C.; Zhang, W.; Wang, Y.; Xing, L.; Xu, X.; Zhou, G. Identification of Rosmarinic Acid-Adducted Sites in Meat Proteins in a Gel Model under Oxidative Stress by Triple TOF MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 6466–6476.
- (235) Chaudhary, S. K.; Sandasi, M.; Makolo, F.; van Heerden, F. R.; Viljoen, A. M. Aspalathin: a rare dietary dihydrochalcone from *Aspalathus linearis* (rooibos tea). *Phytochem. Rev.* **2021**, *20*, 1161–1192.

9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Nicht-Flavonoid-Strukturen	3
Abb. 2: Flavonoid-Strukturen	4
Abb. 3: Oxidation von <i>o</i> -Hydrochinonen	5
Abb. 4: Katalytischer Zyklus der PPO ³⁰	6
Abb. 5: Reaktionsmechanismus der enzymatischen Bräunungsreaktion.....	8
Abb. 6: Kovalente Interaktionen von Aminosäuren mit <i>o</i> -Chinonen ¹⁶	11
Abb. 7: Protein-Crosslinking nach Rohn ⁴⁶	12
Abb. 8: Initialschritt der Melanogenese	17
Abb. 9: Eumelanogenese ^{45,104}	18
Abb. 10: Phäomelanogenese ^{45,104,105}	19
Abb. 11: Benzothiazolythiazinodihydroisochinolin ¹²⁵	20
Abb. 12: Benzothiazin-Oligomere	21
Abb. 13: Trichochrome	21
Abb. 14: Abbaumarker des Eu- (A) und Phäomelanins (B) ¹³²	22
Abb. 15: Kaffeesäure-Dimere ⁴²	25
Abb. 16: Benzacridinbildung	26
Abb. 17: Catechine im Tee	27
Abb. 18: Theasinensine.....	28
Abb. 19: Oolongtheanin.....	28
Abb. 20: Oxidative Bildung der Thearubigene	29
Abb. 21: Theacitrin	30
Abb. 22: Dehydrodicatechin und Dehydrotricatechin ¹⁶⁷	31
Abb. 23: Dihydroinden-7-carbonsäure ¹⁶⁷	32
Abb. 24: Abbauwege des Aspalathins	33
Abb. 25: Phloridzin-Abbau	34
Abb. 26: Arbutin	35

Abb. 27: Lettucenine A, A1, B. B1.....	35
Abb. 28: Inhibierungsansätze der enzymatischen Bräunung nach Moon et al. ²⁰³	37
Abb. 29: Enzymatische Bildung von PGA und TA	43
Abb. 30: Farbverdünnungsanalysen der GA-CA-Inkubationen nach 1 h (A) und 24 h (B)	44
Abb. 31: Cysteinyl-Catechine A1 und A2	45
Abb. 32: Dihydrobenzothiazincarbonsäuren B1 und B2	46
Abb. 33: Farbverdünnungsanalysen der GA-CA-Cystein-Inkubationen nach 8 h (A) und 24 h (B).....	47
Abb. 34: Bildungsmechanismus von B1 und B2 aus CA und Cystein	48
Abb. 35: Umsatz von GA und CA in Anwesenheit von Cystein, GA (●), CA (○), Hügel (▼), Absorption bei $\lambda = 420$ nm (▽), A1 (◆), A2 (◇), B1 (▲), B2 (△), PGA (■) und TA (□)	49
Abb. 36: Decarboxylierung von B1 und B2 zu C1 und C2	51
Abb. 37: Inkubationen von B1 (A) und B2 (B) mit OPD nach 0 h und 24 h mit den Produkten P1 – P4 und dem chromatographischen Hügel (H).....	52
Abb. 38: Struktur von P2	53
Abb. 39: Oxidative Dimerisierung von B2 und Derivatisierung mit OPD	54
Abb. 40: Dihydrokaffeesäure (DHC) und das Lysin-Amid (DHCA)	57
Abb. 41: Umsatz von Aspalathin in Anwesenheit von Lysin: Aspalathin (●), Gesamtabsorption der Inkubation bei $\lambda = 420$ nm (▲), DHC (■), und DHCA (▼).....	58
Abb. 42: Postulierte Abbauwege des Aspalathins	59
Abb. 43: ¹ O ₂ -initiiertes Abbau von Phloridzin und Phloretin	60
Abb. 44: Reaktionsmechanismus zur oxidativen Spaltung von Aspalathin.....	61
Abb. 45: Gehalt an DHC in unfermentierten (●) und fermentierten (●) Rooibostee und DHCA in unfermentierten (▲) und fermentierten (▲) Rooibostee.....	63
Abb. 46: Mögliche Abbaubsubstrate	64

10 Anhang

11.1 Supporting Information zu Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67, 1719-1725

Influence of Nucleophilic Amino Acids on Enzymatic Browning Systems

Nils Mertens, Franziska Mai, Marcus A. Glomb*

Institute of Chemistry – Food Chemistry, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg,
Kurt-Mothes-Str. 2, D-06120 Halle/Saale, Germany

Author Information

*Corresponding Author

Prof. Dr. Marcus A. Glomb

Kurt-Mothes-Str. 2

D-06120 Halle/Saale, Germany

E-mail: marcus.glomb@chemie.uni-halle.de

Phone: +49-345-5525 784

Fax: +49-345-5527 341

Notes

The authors declare no competing financial interest.

1H and 13C-NMR Spectroscopic Data of A1 and A2 in CD3OD

2'-cysteinyl catechin A1			5'-cysteinyl catechin A2		
C/H	$\delta^1\text{H}$ [ppm]	$\delta^{13}\text{C}$ [ppm]	C/H	$\delta^1\text{H}$ [ppm]	$\delta^{13}\text{C}$ [ppm]
2	5.45 (d, 1H) $^3\text{J} = 8.5$	79.9	2	4.60 (d, 1H) $^3\text{J} = 7.9$	82.7
3	4.12 (m, 1H)	68.9	3	4.05 (m, 1H)	69.1
4 _A	2.58 (dd, 1 H) $^2\text{J} = 16.0$ $^3\text{J} = 9.0$	29.8	4 _A	2.59 (dd, 1 H) $^2\text{J} = 16.0$ $^3\text{J} = 8.5$	29.0
4 _B	2.98 (dd, 1 H) $^2\text{J} = 16.0$ $^3\text{J} = 5.5$	29.8	4 _B	3.00 (dd, 1 H) $^2\text{J} = 16.0$ $^3\text{J} = 5.3$	29.0
5	-	157.2	5	-	157.8
6	5.81 (d, 1H) $^4\text{J} = 2.0$	95.5	6	5.94 (s, 1H)	96.5
7	-	157.5	7	-	157.9
8	5.95 (d, 1H) $^4\text{J} = 2.0$	96.3	8	6.03 (s, 1H)	95.6
9	-	157.0	9	-	157.5
10	-	101.2	10	-	100.5
1'	-	134.7	1'	-	132.9

2'	-	117.4	2'	7.00 (s, 1H)	116.4
3'	-	146.4	3'	-	146.5
4'	-	148.1	4'	-	147.4
5'	6.93 (s, 2H) ^a	119.1	5'	-	118.7

11.2 Supporting Information zu Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68, 13111-13120

Oxidative Fragmentation of Aspalathin Leads to the Formation of Dihydrocaffeic Acid and the Related Lysine Amide Adduct

Nils Mertens, Thomas Heymann, Marcus A. Glomb*

Institute of Chemistry – Food Chemistry, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg,
Kurt-Mothes-Str. 2, D-06120 Halle/Saale, Germany

Author Information

*Corresponding Author

Prof. Dr. Marcus A. Glomb

Kurt-Mothes-Str. 2

D-06120 Halle/Saale, Germany

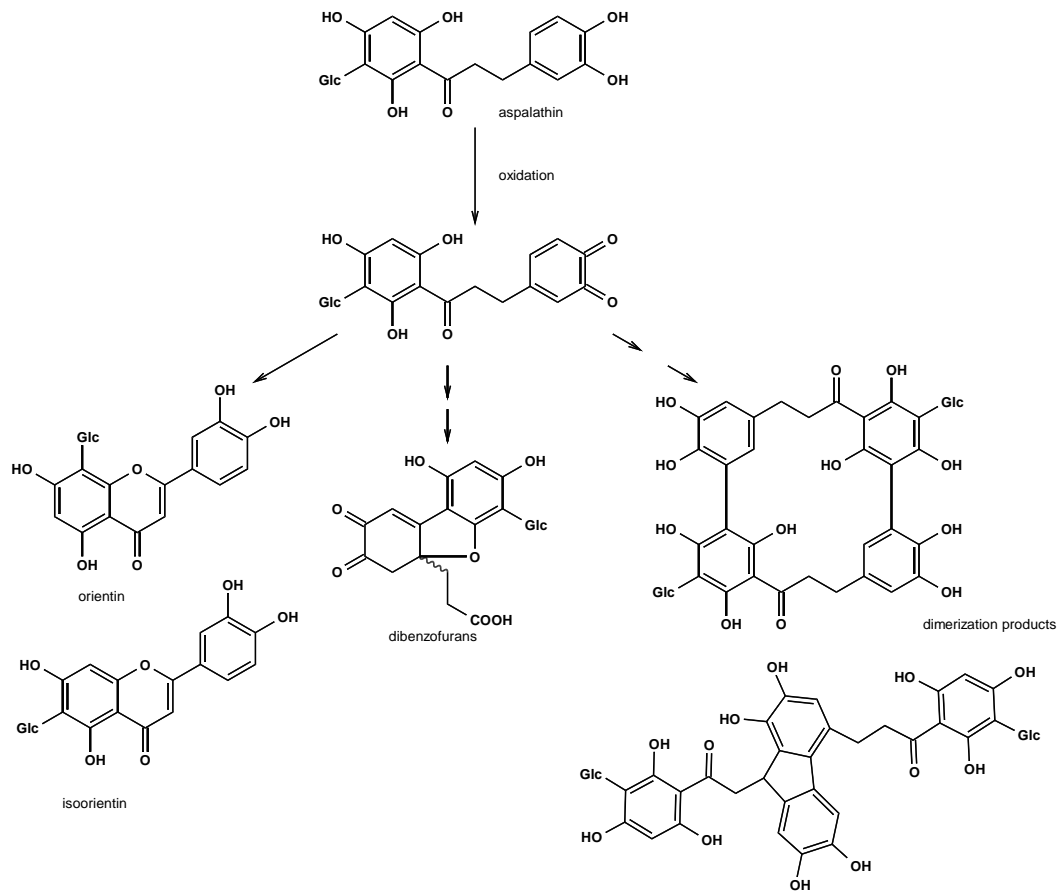
E-mail: marcus.glomb@chemie.uni-halle.de

Phone: +49-345-5525 784

Fax: +49-345-5527 341

Notes

The authors declare no competing financial interest.

Figure SI-1: Degradation Pathways of Aspalathin

11.3 Supporting Information zu Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69, 15345-15353

Benzothiazines as Major Intermediates in Enzymatic Browning Reactions of Catechin and Cysteine

Nils Mertens, Vanessa Fokuhl, Marcus A. Glomb*

Institute of Chemistry – Food Chemistry, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg,
Kurt-Mothes-Str. 2, D-06120 Halle/Saale, Germany

Author Information

*Corresponding Author

Prof. Dr. Marcus A. Glomb

Kurt-Mothes-Str. 2

D-06120 Halle/Saale, Germany

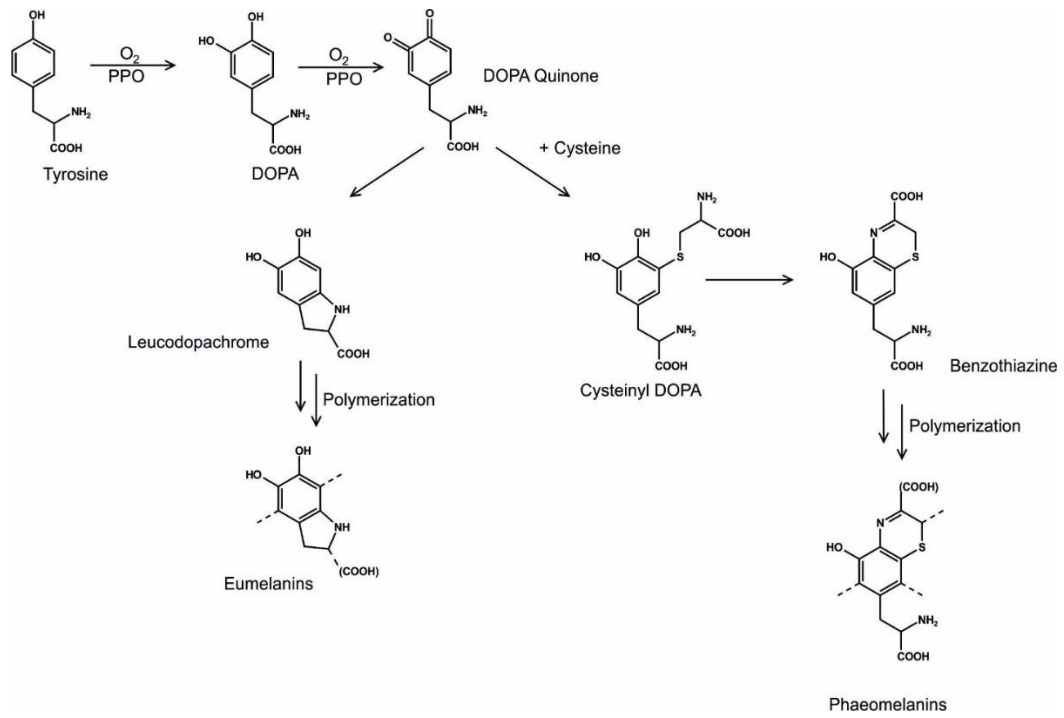
E-mail: marcus.glomb@chemie.uni-halle.de

Phone: +49-345-5525 784

Fax: +49-345-5527 341

Notes

The authors declare no competing financial interest.

Figure SI-1: Pathways of Melanogenesis

11 Publikationsliste

Veröffentlichungen

Mertens, N.; Mai, F.; Glomb, M. A. Influence of Nucleophilic Amino Acids on Enzymatic Browning Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2019**, *67*, 1719-1725

Mai, F.; **Mertens, N.;** Glomb, M. A. Bräunungsmechanismen pflanzlicher Lebensmittel. *Chemie in Unserer Zeit*, **2019**, *53*, 330–341

Mertens, N.; Heymann, T.; Glomb, M. A. Oxidative Fragmentation of Aspalathin Leads to the Formation of Dihydrocaffeic Acid and the Related Lysine Amide Adduct. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2020**, *68*, 13111-13120

Mertens, N.; Fokuhl, V.; Glomb, M. A. Benzothiazines as Major Intermediates in Enzymatic Browning Reactions of Catechin and Cysteine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2021**, *69*, 15345-15353

Tagungsvorträge

Mertens, N.; Glomb, M. A. Modellsysteme zur enzymatischen Bräunung. 28. Arbeitstagung Regionalverband Süd-Ost, 22. März 2018, Jena

Mertens, N.; Glomb, M. A. Dihydrokaffeensäure als neuartiges Abbauprodukt von Aspalathin. 29. Arbeitstagung Regionalverband Süd-Ost, 28. März 2019, Dresden

Posterbeiträge

Mertens, N.; Mai, Franziska.; Glomb, M. A. Modellsysteme zur enzymatischen Bräunung. 46. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 25. – 27. September 2017, Würzburg

Flashposter-Präsentation Mertens, N.; Mai, F.; Glomb, M. A. Influence of Nucleophiles in Enzymatic Browning Systems. 10th International Conference on Countercurrent Chromatography, 1. – 3. August 2018, Braunschweig

Mertens, N.; Mai, Franziska.; Glomb, M. A. Modellsysteme zur enzymatischen Bräunung. 47. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 17. – 19. September 2018, Berlin

Mertens, N.; Glomb, M. A. Dihydrokaffeensäure als neuartiges Abbauprodukt des Aspalathin. 48. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 16. – 18. September 2019, Dresden

12 Lebenslauf

Persönliche Daten

Nils Mertens

Geboren am 29.10.1991 in Haldensleben

Ledig

Berufstätigkeit

Seit 04.2021	Dozent für Ausbildungsberufe in der Chemie bei der Robotron Bildungs- und Beratungszentrum GmbH
06.2016 – 05.2020	Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Chemie – Lebensmittelchemie, Arbeitskreis Prof. Dr. M. A. Glomb
10.2010 – 04.2011	Grundwehrdienst

Ausbildung

10.2011 – 05.2016	Studium zum Diplom-Lebensmittelchemiker an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Titel der Diplomarbeit: „Der Einfluss von Sellerieinhaltsstoffen auf die Bräunung“
06.2010	Abitur am Freiherr-vom-Stein-Gymnasium

13 Eidestattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die eingereichte Dissertation „Mechanistische Untersuchungen zur enzymatischen Bräunung“ selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Diese Arbeit wurde bisher an keiner anderen Einrichtung zur Begutachtung vorgelegt.

Halle (Saale), den 21.12.2022

.....