

## Veränderungen des *trans* 2-Hexenal-Gehalts in Rebblättern während der Vegetationsperiode

von

F. MALÍK, J. ŠAJBIDOR, J. LEŠKO und E. MINÁRIK

Chemisch-technologische Fakultät der Slowakischen Technischen Universität Bratislava, Slowakische Republik

**Z u s a m m e n f a s s u n g :** Ungesättigte Fettsäuren sind in der Rebe Vorstufen einer biologisch wichtigen Gruppe, der ungesättigten C<sub>6</sub>-Alkohole und -Aldehyde, die Bestandteile eines typischen Aromas ("green grass flavour") sind. Außer den charakteristischen sensorischen Eigenschaften schützen diese Verbindungen die Rebe vor Pilz- oder Bakterieninfektionen. Die saisonalen Veränderungen des *trans* 2-Hexenal-Gehalts von Rebblättern wurden von Mai bis August 1994 bei sieben verschiedenen Rebsorten untersucht. Der höchste Wert wurde Ende Juli, zu Beginn des Traubenschlusses bei der Sorte Irsay Oliver mit 4,1 g/kg Trockensubstanz festgestellt.

### Investigation of the *trans* 2-hexenal content in leaves of grapevines during the vegetation period

**S u m m a r y :** Unsaturated fatty acids in plants are known to be precursors of the biologically important group of unsaturated C<sub>6</sub>-alcohols and C<sub>6</sub>-aldehydes. These compounds constitute the basis of aroma components called "green grass flavour". On the other hand they protect grapevines against fungal or bacterial infections. Seasonal changes of the content of *trans* 2-hexenal in leaves of seven varieties of *Vitis vinifera* were investigated from May to August 1994. The highest content of *trans* 2-hexenal was detected in leaf samples harvested in the last decade of July when clusters started to close (cv. Irsay Oliver 4.1 g/kg dry weight).

**K e y w o r d s :** grapevine, leaves, aroma, hexenal.

### Einleitung

Ungesättigte Fettsäuren sind in der Rebe (*Vitis vinifera*) Vorstufen vieler Aromastoffe, die die Basis für den charakteristischen Geruch grüner Pflanzen bilden; in der Fachliteratur wird der Ausdruck "green grass flavour" verwendet (VICK und ZIMMERMANN 1987 a). Außerdem sind sie als eine erste Barriere gegen eine Infektion durch Pilze und Bakterien zu betrachten (CROFT *et al.* 1993).

Es wurde gezeigt, daß die sog. Blattaldehyde und -alkohole unter Beteiligung der Enzyme Lipoxygenase und Hydroperoxidlyase entstehen, die die ungesättigten Fettsäuren zu biologisch aktiven C<sub>6</sub>-Verbindungen wie Hexanal, *trans* 2-Hexenal, *cis* 3-Hexenol und *trans* 2-Hexenol spalten (VICK und ZIMMERMANN 1987 b).

Die Lipoxygenasen können bei einzelnen Arten zu verschiedenen Produkten führen. Zum Beispiel produziert die aus Tomaten und Gurken isolierte Lipoxygenase 9-Hydroperoxid, während die der Rebe zu 13-Hydroperoxiden führt (HATAKA *et al.* 1992). Die enzymatische Spaltung des 13-Hydroperoxids führt zur Bildung von Hexanal und *cis* 3-Hexenal, welches leicht zu *trans* 2-Hexenal isomeriert. Diese C<sub>6</sub>-Verbindungen haben eine wichtige Aufgabe bei der Bildung des Aromas von Trauben, Äpfeln und Tomaten (DRAWERT *et al.* 1966).

Zu einer Erhöhung der Bildung flüchtiger Substanzen aus ungesättigten Fettsäuren kommt es nach Kontakt des

Substrats mit dem Enzym, z.B. nach einer mechanischen Schädigung des Pflanzengewebes. Es ist bekannt, daß der Lipoxygenaseweg in Pflanzen während eines Pathogenbefalls aktiviert wird (OCAMPO *et al.* 1986). Es ist interessant, daß die biocidische Wirkung ungesättigter Aldehyde viel geringer war als die der  $\alpha$ ,  $\beta$ -ungesättigten Aldehyde (SCHAUENSTEIN 1977).

Man vermutet, daß die ungesättigten Aldehyde und Alkohole (C<sub>6</sub>) für die Rebe von großer Bedeutung sind, vor allem im Anfangsstadium der Infektion. Phytoalexine werden erst in den späteren Phasen nach dem Eindringen der Pathogene aktiv. Dies zeigt, daß Kenntnisse der Biochemie der Entstehung von Schutzsubstanzen, die in der Rebe bei Infektion oder durch mechanische Schädigung entstehen, als eine wichtige Voraussetzung für eine gezielte Immunitätserhöhung der *Vitis vinifera*-Sorten zu betrachten sind.

Ungesättigte, aus Fettsäuren abgeleitete Alkohole und Aldehyde finden auch in der pharmazeutischen und kosmetischen Industrie Verwendung (GROSCH 1987). Natürliche Geruchsstoffe verdrängen häufig ihre synthetischen Analoge und nehmen einen immer größeren Anteil auf diesem Markt ein (TERANISHI und KINT 1993).

In unserer Arbeit haben wir Blattextrakte von sieben Rebsorten analysiert und Veränderungen des *trans* 2-Hexenals vier Monate lang während der Vegetationsperiode bestimmt.

### Material und Methoden

Es wurden Blätter der *Vitis vinifera*-Sorten Perle von Csaba, Irsay Oliver, Bouvier, Müller-Thurgau, Weißburgunder, Saint Laurent und des Direktträgers Isabella analysiert.

Die oberen Blätter der Sommertriebe wurden in Modra, einem Weinbaugebiet der Kleinen Karpaten, von Mai bis August 1994 gesammelt. Nach der Entnahme wurden sie bei -25 °C aufbewahrt und wie folgt aufgearbeitet:

100 g Rebblätter wurden 5 min in 500 ml aqua dest. homogenisiert. Anschließend wurde der pH-Wert mit HCl auf 2,3 eingestellt und 3 µl Amylalkohol als interner Standard zugegeben. Das Homogenat wurde mit aqua dest. auf 1 l aufgefüllt und 90 min mit 50 ml Diethylether extrahiert (LIKENS und NICKERSON 1964). Nach Filtration mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wurde der Extrakt wie nachfolgend untersucht.

**GC-Analyse:** CHROM 5 Gerät (Laboratorní přístroje, Praha); Säule: 2,5 m x 3 mm gepackt mit 10 % CARBOWAX 20 M auf CHROMATON NAW DMCS, Korngröße 0,125-0,16 mm; Trägergas: 34 ml/mm N<sub>2</sub>; Temperatur 80 °C; Temperatur des Injektors und Detektors 120 °C, FID; Auswertung der Chromatogramme mit Integrationsprogramm APEX 2.5 (Ecom, Praha).

**GC/MS-Analyse:** Gaschromatograph: VARIAN 3400 mit ITD Massendetektor 800/Finnigan, USA); Säule: 30 m Kapillare DB-5, ID 0,2 mm und 0,25 µm Filmschicht; Einspritzung: 0,5 µl Probe, split 1:50 bei Injektortemperatur 240 °C.

Die Ausgangstemperatur der Kapillare bei Einspritzung und 5 min danach war 60 °C. Danach wurde ein Linearprogramm 8 °C/min verwendet. Trägergasdurchfluß (He): 1 ml/min. Massenspektren (ET) wurden bei 70 eV mit einer Geschwindigkeit der Spektrumentwicklung 1 s/scan bei einer ITD Temperatur von 220 °C abgenommen. Die Verbindung zwischen dem Gaschromatographen und dem Massenspektrometer wurde bei 240 °C gehalten.

Zur quantitativen Auswertung der Chromatogramme wurde 1 l aqua dest. 3 µl Amylalkohol (interner Standard), 1 µl *trans* 2-Hexanol, 1 µl *cis* 3-Hexanol und 1 µl Hexanol zugefügt. Der pH-Wert wurde auf 2,3 mit HCl eingestellt. Zu dieser Mischung wurden 1, 3, 5, 7, 15 µl *trans* 2-Hexenal beigemischt und wie bei den Proben extrahiert und eingengt. Zur Quantifizierung von *trans* 2-Hexenal verwendeten wir die Peakflächenverhältnisse von *trans* 2-Hexenal und Amylalkohol, ausgehend vom Gehalt an *trans* 2-Hexenal vor der Destillation.

### Ergebnisse und Diskussion

Abb. 1 zeigt Blattextraktanalysen von Müller-Thurgau und Weißburgunder. In allen untersuchten Rebsorten haben wir Hexanal, *trans* 2-Hexenal, *trans* 2-Hexenol, *cis* 3-Hexenol, Hexanol und Limonen nachgewiesen.

In Abb. 2 ist das Massenspektrum von *trans* 2-Hexenal der Müller-Thurgau-Probe dargestellt. Ein Vergleich der relativen Peakintensität der Probe mit Daten, die bei der

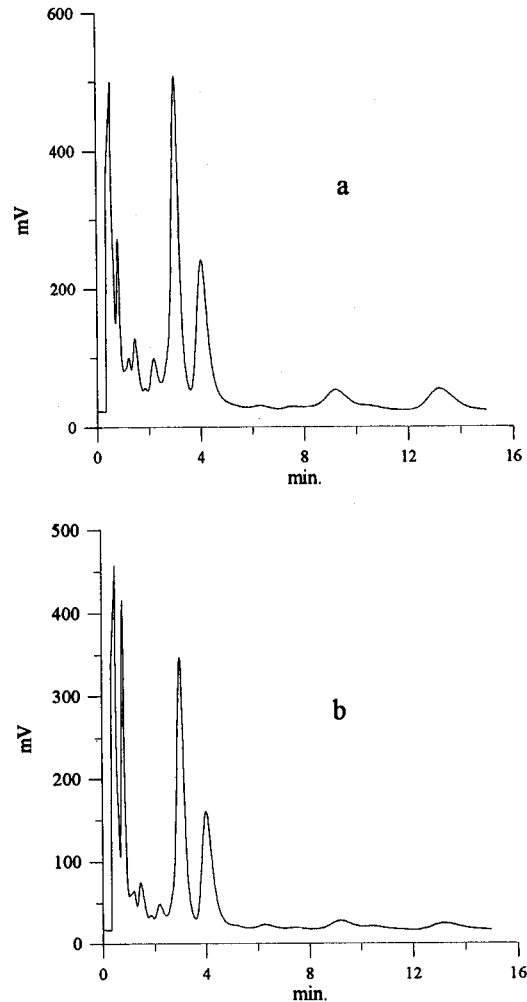


Abb. 1: GC-Analysen von Blattextrakten der Sorten Müller-Thurgau (a) und Weißburgunder (b).

GC analysis of leaf extracts from cvs Müller-Thurgau (a) and Pinot blanc (b).

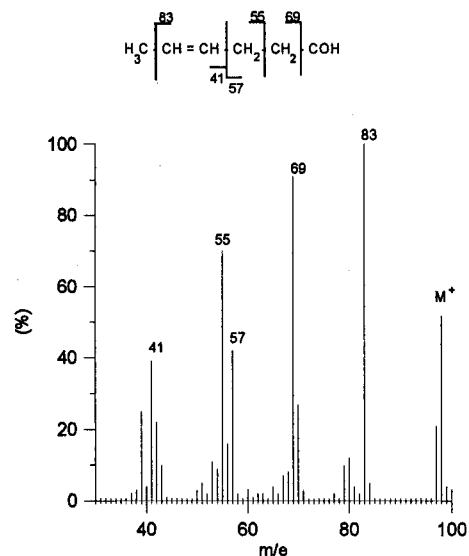


Abb. 2: Massenspektrum von *trans* 2-Hexenal aus Rebblättern der Sorte Müller-Thurgau.

Mass spectrum of *trans* 2-hexenal from leaf extracts of cv. Müller-Thurgau.

Analyse des Standards gewonnen worden waren, bestätigte die Struktur der analysierten Substanz. Das Molekülion wurde als  $m/z$  98 identifiziert, wobei das Ion mit  $m/z$  99 dem  $(M+1)^+$  entspricht, das im "Trap"-Detektor durch Addition des Protons zum Sauerstoff des Grundmolekülskeletts entsteht.

Die Veränderungen des *trans* 2-Hexenalgehaltes während der Vegetationsperiode in 7 untersuchten Proben verdeutlichen die Diagramme in Abb. 3. Die erste Blattentnahme erfolgte zwischen dem 20. und 30. Mai. Die Länge der Sommertriebe betrug zu diesem Zeitpunkt 60-80 cm und die Blüten der Gescheine waren noch geschlossen. Das Material wurde von Sommertrieben ohne Trauben entnommen (ZARUBA *et al.* 1985). Die Konzentration der untersuchten Substanz war in den Sommertrieben niedrig und lag im Bereich 0,03 (Müller-Thurgau, Saint Laurent) bis 0,07 g/kg Trockensubstanz (Perle von Csaba).

Die zweite Probenahme erfolgte im Zeitraum vom 15. bis 20. Juni. Zu dieser Zeit waren die frühreifenden Sorten (Perle von Csaba, Irsay, Oliver, Bouvier und Müller-Thurgau) im Nachblütstadium und die übrigen Sorten (Weißburgunder, Saint Laurent, Isabella) vor dem Blühende (Blütenköpchen zu 80-90 % abgefallen). Die höchsten Konzentrationen von *trans* 2-Hexenal wurden bei den frühreifenden Sorten festgestellt (Bouvier 2,1 g/kg Trockensubstanz). Offensichtlich wird die von uns untersuchte Substanz zum Zeitpunkt der Blüte synthetisiert.

Die dritte Blattentnahme erfolgte Ende Juli. Die Beeren spätreifender Sorten wiesen Erbsengröße auf und die Trauben begannen zu hängen. Bei frühreifenden Sorten begannen sich die Trauben bereits zu schließen. Eine bemerkenswert hohe *trans* 2-Hexenalkonzentration wurde in der Blattprobe der Sorte Irsay Oliver (4,1 g/kg Trockensubstanz) und der Sorte Perle von Csaba (2,6 g/kg Trocken-

substanz) gefunden. Die Konzentrationen lagen ansonsten zwischen 1,3 (Müller-Thurgau) und 1,6 g/kg Trockensubstanz (Bouvier).

Die vierte und letzte Probenahme wurde zum Zeitpunkt des Gipfels durchgeführt. Die frühreifenden Sorten befinden sich jetzt im Stadium des Weichwerdens der Beeren ("veraison"). Abb. 3 zeigt, daß zu diesem Zeitpunkt die Bildung von *trans* 2-Hexenal abnimmt und zwischen 0,3 (Müller-Thurgau) und 0,6 g/kg Trockensubstanz (Irsay Oliver) liegt.

Aus den Ergebnissen geht hervor, daß die *trans* 2-Hexenal-Konzentration nicht nur vom Zeitpunkt innerhalb der Vegetationsperiode, sondern auch von der Rebsorte abhängt. Während der Vegetationsperiode nimmt die Konzentration dieser Substanz zu, wobei der höchste *trans* 2-Hexenal-Gehalt Ende Juli festgestellt wurde (Ausnahme Bouvier), also zu Beginn des Traubenschlusses. Höchstmengen dieser Substanz synthetisieren die frühreifenden, aromatischen, weißen *Vitis vinifera*-Sorten Irsay Oliver und Perle von Csaba. Erhöhte Mengen von *trans* 2-Hexenal produzierte auch Bouvier, allerdings in frühen Entwicklungsabschnitten. Mittlere Werte wurden bei den Sorten Weißburgunder, Müller-Thurgau sowie bei der Sorte Saint Laurent festgestellt. In den Blättern der Sorte Isabella wurden im Verlauf der ganzen Vegetationsperiode relativ niedrige Konzentrationen (0,06-1,4 g/kg Trockensubstanz) synthetisiert.

Die von uns vorgelegten Ergebnisse stimmen mit älteren Arbeiten überein (SCHAUNSTEIN *et al.* 1977; VICK und ZIMMERMANN 1987; ANDERSON 1989), auch wenn höhere Konzentrationen beobachtet wurden. Untersuchungen zur Umwandlung ungesättigter Säuren in *trans* 2-Hexenal, sowie dessen Isolierung aus Blatthomogenaten werden Gegenstand weiterer Forschungsarbeiten sein.

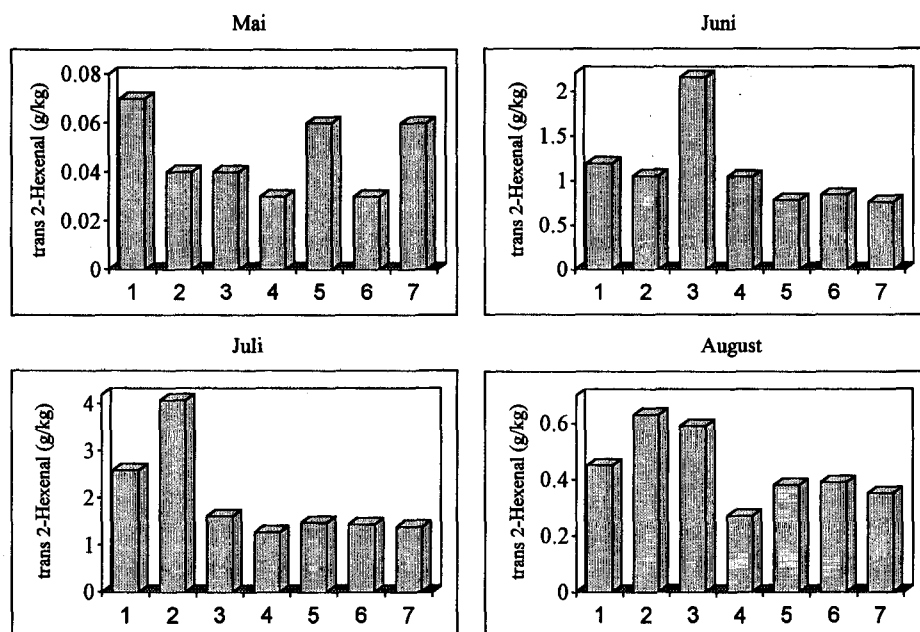


Abb. 3: Gehalte an *trans* 2-Hexenal in Blättern während der Vegetationsperiode.

1 - Perle von Csaba, 2 - Irsay Oliver, 3 - Bouvier, 4 - Müller-Thurgau, 5 - Weißburgunder (Pinot blanc), 6 - Saint Laurent, 7 - Isabella.

The content of *trans* 2-hexenal in leaves of 7 different cultivars during the vegetation period.

## Literatur

- CROFT, K. P. C.; JÜTTNER, F.; SLUSARENKO, A. J.; 1993: Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Plant. Physiol.* **101**, 13-24.
- DRAWERT, F.; HEIMAN, W.; EMBERGER, R.; TRESSL, R.; 1966: Biogenesis of aroma compounds in plant and fruit. II. Enzymic formation of 2-hexen-1-al, hexanal and their precursors. *Liebigs Ann. Chem.* **694**, 200-208.
- GROSCHE, W.; 1987: Enzymatische Bildung von Aromastoffen aus Lipiden. *Lebensm.-Chem. Gerichtl.Chem.* **41**, 40-46.
- HATAKA, A.; KAJIWARA, T.; MATSUI, K.; KITAMURA, A.; 1992: Expression of lipoxygenase and hydroperoxide lyase activities in tomato fruits. *Z. Naturforsch.* **47**, 369-374.
- LIKENS, S.; NICKERSON, G.; 1964: Detection of certain hop oil constituents in brewing products. *Proceed. Amer. Brew. Chem.* 5-13.
- OCAMPO, C. A.; MOERSCHBAUER, B.; GRAMBOW, H. J.; 1986: Increased lipoxygenase activity is involved in the hypersensitive response of wheat leaf cells infected with avirulent rust fungi or treated with fungal elicitor. *Z. Naturforsch.* **41**, 559-563.
- SCHAUENSTEIN, E.; ESTERBAUER, H.; ZOLLNER, H.; 1977: Aldehydes in biological systems - their natural occurrence and biological activities. Pion Limited, London.
- TERANISHI, R.; KINT, S.; 1992: Bioactive Volatile Compounds from Plants, ACS Symposium Series 525, 203rd National Meeting of the Amer. Chem. Soc., San Francisco.
- VICK, B. A.; ZIMMERMAN, D. C.; 1987 a: Oxidative systems for modification of fatty acids: The lipoxygenase pathway. In: STUMPF, P. K. (Ed.): *Lipids: Structure and Function. The Biochemistry of Plants*, Vol.9. Academic Press, New York, 53-90.
- - -; 1987 b: Pathways of fatty acid hydroperoxide metabolism in spinach leaf chloroplasts. *Plant Physiol.* **85**, 1073-1078.
- ZÁRUBA, F.; 1985: *Viticulture*. [Slovak] Príroda A.S., Bratislava.

Eingegangen am 13. Mai 1996