

Neue Monoterpene in Traubenmost und Wein sowie in Kulturen von *Botrytis cinerea*¹⁾

von

A. RAPP, H. MANDERY und H. NIEBERGALL

New monoterpenediols in grape must and wine and in cultures of *Botrytis cinerea*

S u m m a r y: In $\text{CFCl}_3/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ extracts from grape must and wine, cv. Morio-Muskat, (E)- and (Z)-8-hydroxylinalool were identified. Both compounds are original constituents of the must and wine flavour. It could be shown by model experiments that these compounds are also produced by *Botrytis cinerea* from linalool.

K e y w o r d s: must, wine, flavour, constituent.

Einleitung

Monoterpene wurden bisher erfolgreich zur Sortencharakterisierung von Weißweinen herangezogen (5, 6, 7, 8, 9, 15, 16). Neben Terpenethern und Monoterpenalkoholen wurden für diesen Zweck auch Monoterpene benützt — eine Verbindungskategorie, aus der mehrere flüchtige Terpene des Weinaromas entstehen. Dies erklärt das besondere Interesse, das wir diesen Verbindungen widmen. Durch eine speziell ausgearbeitete Anreicherungs-technik in Kombination mit der GC-MS-Analytik konnten bislang 10 Monoterpene (10, 11, 12, 13, 14, 20) im Weinroma nachgewiesen werden. Von den noch unaufgeklärten Komponenten dieser Stoffgruppe gelang es uns nun, zwei weitere Monoterpene zu identifizieren, worüber wir im folgenden berichten.

Material und Methoden

Probenmaterial

- Traubenmost der Rebsorte Morio-Muskat (1981) aus einem Gebinde der Gebietswinzergenossenschaft Rietburg e. G. (Rhodt, Rheinpfalz)
- Morio-Muskat Q. b. A. (1981); Gebietswinzergenossenschaft Deutsches Weintor e. G. (Ilbesheim, Rheinpfalz)
- *Botrytis-cinerea*-Kulturen:

Eine 3%ige Malzextraktlösung (Merck, Darmstadt) wurde 20 min bei 121 °C autoklaviert. Von dieser Lösung wurden aliquote Teile mit *B. cinerea* inkubiert und im Dunkeln bei Raumtemperatur aufbewahrt. Nach 10 d wurden die Kulturen jeweils mit einem der Monoterpenalkohole [I a—IV a] (s. Abb.) versetzt (0,4 mg/l Kulturlösung). Als Kontrolle diente eine Kultur ohne Terpenzusatz. Nach weiteren 14 d wurden 100 ml

¹⁾ Auszug aus der Diplomarbeit von H. MANDERY, Universität Karlsruhe, 1986.

Nährmedium mit 50 ml Wasser versetzt, 2 min lang homogenisiert und anschließend mit Monofluortrichlormethan/Dichlormethan (90 + 10; v/v) nach RAPP *et al.* (13) extrahiert.

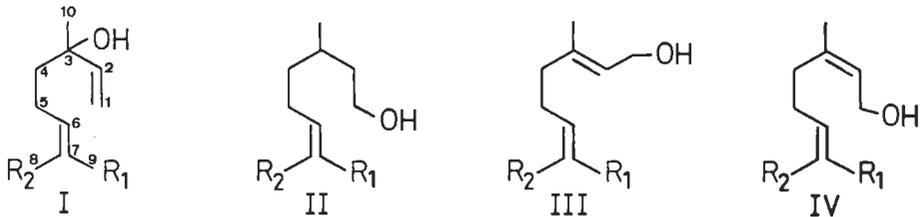
Anreicherung und Auftrennung der Aromastoffe

Die Aufarbeitung, Extraktion, Konzentrierung und gaschromatographische Auftrennung der Aromastoffe wurde, wie von RAPP *et al.* (13) beschrieben, durchgeführt.

Referenzsubstanzen

Die Darstellung der Monoterpendiole [I b—IV b] (Abb.) erfolgte durch allylische Oxidation der Acetate von [I a—IV a] mit tertiärem Butylhydroperoxid und katalytischen Mengen von Selenoxid gemäß der Vorschrift von UMBREIT und SHARPLESS (19) und anschließende Verseifung mit methanolischer Natronlauge.

Die Aldehydverbindung [I d] wurde aus [I b] durch MnO_2 -Oxidation in CCl_4 hergestellt.



- a) $R_1 = R_2 = CH_3$
- b) $R_1 = CH_2OH$; $R_2 = CH_3$
- c) $R_1 = CH_3$; $R_2 = CH_2OH$
- d) $R_1 = CHO$; $R_2 = CH_3$
- e) $R_1 = CH_3$; $R_2 = CHO$

Monoterpendiole in Traubenmost, Wein und Kulturen von *Botrytis cinerea*.

Monoterpenediols in grape must, wine and cultures of *Botrytis cinerea*.

Identifizierung der Aromastoffe

Die Identifizierung der Aromakomponenten erfolgte durch Vergleich der Retentionsdaten mit denen von Referenzsubstanzen sowie mit Hilfe der Massenspektrometrie und 1H -NMR-Spektroskopie.

Gaschromatographie-Massenspektrometrie:

Gerät:	Finnigan 3200 (Quadrupol) mit INCOS-System
Trärgas:	He
Temperaturprogramm:	50—160 °C/min
Glaskapillarsäule:	60 m Fused Silica Durabond-Wax (0,25 μm Filmdicke, 0,32 mm i. D.)

Anregungsenergie:	70 eV
8-Hydroxylinalool (I b):	m/z 43 (100), 71 (71), 67 (57), 41 (35), 55 (34), 68 (25), 29 (18), 82 (18); weitere wichtige Fragmente: 93 (13), 96 (10), 110 (8), 119 (7), 134 (1), 137 (5), 152 (1)
8-Oxolinalool (I d):	m/z 71 (100), 43 (86), 55 (38), 41 (35), 67 (26), 82 (24), 39 (20); ferner 135 (1), 150 (1)

Bei der GCMS-Analyse der Oxidationsprodukte von [I a]-Acetat und anschließender Hydrolyse tauchte u. a. neben [I b] bei kürzerer Retentionszeit ein weiterer Peak [x] auf, der ein nahezu gleiches Massenspektrum lieferte wie [I b]. Zur Gewinnung von Reinsubstanzen für die Aufnahme von NMR-Spektren wurden präparative DC- und HPLC-Trennungen durchgeführt. Die DC-Trennung erfolgte an Kieselgel 60 F₂₅₄-Platten (Merck) mit Dichlormethan als Laufmittel. [I b] und [x] wurden so von den restlichen Oxidationsprodukten abgetrennt und gemeinsam einer NMR-Analyse unterzogen. Die präparative Trennung von [I b] und [x] gelang mittels HPLC:

Gerät:	Waters-HPLC
Phase:	250 × 3 mm; RP-8 (Superspher; Merck)
Laufmittel:	A = Methanol; B = 10 % Methanol und 2 % Essigsäure in Wasser.
Gradient:	8 min B (0,6 ml/min); ab 8. min B + 10 % A; ab 50. min B + 30 % A; ab 110. min B + 50 % A (0,8 ml/min)
Detektor:	UV-Detektor (Waters 440); Wellenlänge 256 nm.

¹H-NMR-Spektroskopie:

¹H-NMR-Spektren der in CDCl₃ bzw. CD₂Cl₂ gelösten Substanzen wurden aufgenommen an 250- und 500-MHz-Geräten der Fa. Bruker²⁾. Die erhaltenen Spektren von [I b] und [x] waren identisch mit den bereits von TSCHESCHE *et al.* (18) publizierten Daten für (E)- und (Z)-8-Hydroxylinalool [I b, I c].

Die Daten für [II b—IV b; II c—IV c; II d—IV d] werden an anderer Stelle publiziert.

Ergebnisse und Diskussion

Im Rahmen unserer Untersuchungen über die Terpenzusammensetzung des Weinaromas stießen wir in Most- und Weinextrakten der Rebsorte Morio-Muskat auf zwei weitere Verbindungen, deren Retentionsverhalten sowie Massenspektren für Monoterpendiole charakteristisch waren.

Die Übereinstimmung der Massenspektren ließ auf Konfigurationsisomere schließen. Das Fehlen des Molekülpeaks im Massenspektrum deutete auf eine tertiäre Hydroxylgruppe hin; die m/e-Werte bei 134 und 137 sprachen für die Abspaltung eines zweiten Moleküls Wasser bzw. einer Methylgruppe. Aus der Molekularmasse von 170 ergab sich die Summenformel C₁₀H₁₆O₂, d. h. eine doppelt ungesättigte Verbindung. Das Signal bei m/e 71 (C₄H₇O⁺) ist wegen der bevorzugten Spaltung am tertiären C-3-Atom bei Linalool und davon abgeleiteten Verbindungen meistens sehr intensiv.

Die beiden Spektren wurden als (E)- und (Z)-8-Hydroxylinalool [I b] bzw. [I c] interpretiert und durch Synthese der Referenzsubstanzen bestätigt. Im ¹H-NMR-Spek-

²⁾ Wir danken Herrn Dr. SPRAUL, Fa. Bruker Meßtechnik, 7500 Karlsruhe/Rheinstetten, für die Erstellung der NMR-Spektren.

trum unterschieden sich die beiden konfigurationsisomeren Diöle in den Signalen der folgenden Protonen:

	I b	I c
8 – H	1,64 (s; 3 H)	4,08 (bs; 2 H)
9 – H	3,96 (bs; 2 H)	1,77 (s; 3 H)
10 – H	1,25 (s; 3 H)	1,26 (s; 3 H)

Das Verhältnis der isomeren Diöle in dem Extrakt aus Morio-Muskat-Wein betrug ca. 3 : 1 (E/Z); bei der Synthese der Referenzsubstanz wurde eine Verteilung von 95 : 5 (E/Z) erhalten. Ob die (Z)-Verbindung ein Artefakt darstellt, konnte bisher noch nicht geklärt werden.

Auch in Modellversuchen, in denen im Nährmedium mit *B. cinerea* als einziges Monoterpen Linalool angeboten wurde, konnte u. a. die Bildung der Diöle [I b] und [I c] (96 : 1) beobachtet werden. In einer früheren Arbeit (14) hatten wir schon angedeutet, daß für die Bildung einiger Monoterpendiöle in Wein auch *B. cinerea* verantwortlich sein könnte. Diese Aussage resultierte aus der Beobachtung, daß bei edelfaulen Muskattrauben die Gehalte von Monoterpenen des primären Traubenaromas mit zunehmendem Wachstum von *B. cinerea* abnehmen. Nun konnten wir anhand von Modellversuchen, über die im Detail noch an anderer Stelle berichtet wird, zeigen, daß *B. cinerea* aus den in Traubenmost und Wein am häufigsten vorkommenden Monoterpenalkoholen Linalool [I a], Citronellol [II a], Geraniol [III a] und Nerol [IV a] die entsprechenden 8-Hydroxyverbindungen [I b], [II b], [III b] und [IV b] bildet. In dem Versuch mit Linaloolzusatz hatte *B. cinerea* neben [I b] und [I c] auch noch den Aldehyd [I d] gebildet, dessen Nachweis in Most- und Weinproben bisher negativ verlief.

Auch konnten die von *B. cinerea* in Modellversuchen gebildeten Diöle [II b], [III b] und [IV b] bisher nicht in Mosten und Weinen gefunden werden. In diesem Zusammenhang sei nur angefügt, daß die Diöle [III b] und [IV b] Vorstufen für die Biosynthese von Loganin und Indolalkaloiden sein können (1, 2).

Eine Infektion mit *B. cinerea* kann bei der untersuchten Most- und Weinprobe ausgeschlossen werden, weshalb eine Bildung von [I b] und [I c] in der Rebe bzw. Beere angenommen wird.

Über das Vorkommen der Diöle [I b] und [I c] in der Natur wird von verschiedenen Autoren berichtet. Beide Monoterpendiöle sind als Aglykone Bestandteil von Glucosiden, die aus Birkenblättern und Früchten von *Chaenomeles japonica* isoliert wurden (18). SUGA und Mitarbeiter (3, 17) berichten, daß Kalluskulturen von *Nicotiana tabacum* selektiv die trans-Methylgruppe des Isopropylidenrestes von Linalool sowie einiger seiner Derivate in eine Hydroxymethylgruppe umwandeln können.

MADYASTHA *et al.* (4) isolierten aus dem Boden einen *Pseudomonas*-Stamm, der in der Lage ist, mit Linalool als einziger C-Quelle auszukommen, wobei u. a. auch Diol [I b] gebildet wird.

Zusammenfassung

(E)- und (Z)-8-Hydroxylinalool wurden in $\text{CFCl}_3/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Extrakten von Morio-Muskat-Most und -Wein nachgewiesen. Die beiden Verbindungen sind originäre Inhaltsstoffe des Trauben- und Weinaromas. In Modellversuchen konnte gezeigt werden, daß diese Verbindungen auch durch *Botrytis cinerea* aus Linalool gebildet werden können.

Literatur

1. BATTERSBY, A. R.; BROWN, S. H.; PAYNE, T. G.; 1970: Biosynthesis of loganin and the indole alkaloids from hydroxygeraniol-hydroxynerol. Chem. Comm. 827—828.
2. ESCHER, S.; LOEW, P.; ARIGONI, D.; 1970: The role of hydroxygeraniol and hydroxynerol in the biosynthesis of loganin and indole alkaloids. Chem. Comm. 823—825.
3. HIRATA, T.; AOKI, T.; HIRANO, Y.; OTO, T.; SUGA, T.; 1981: The biotransformation of foreign substrates by tissue cultures. I. The hydroxylation of linalool and its related compounds with the suspension cells of *Nicotiana tabacum*. Bull. Chem. Soc. Japan **54**, 3527—3529.
4. MADYASTHA, K. M.; BHATTACHARYYA, P. K.; VAIDYANATHAN, C. S.; 1977: Metabolism of a monoterpene alcohol, linalool, by a soil Pseudomonad. Canad. J. Microbiol. **23**, 230—239.
5. RAPP, A.; GÜNTERT, M.; 1985: Beitrag zur Charakterisierung des Weines der Rebsorte Weißer Riesling. II. Untersuchung der Aromastoffzusammensetzung deutscher Weißweine der Rebsorten Weißer Riesling, Müller-Thurgau und Silvaner. Vitis **24**, 139—150.
6. — — ; — — ; HEIMANN, W.; 1985: Beitrag zur Sortencharakterisierung der Rebsorte Weißer Riesling. I. Untersuchung der Aromastoffzusammensetzung von ausländischen Weißweinen mit der Sortenbezeichnung „Riesling“. Z. Lebensm.-Untersuch. u. -Forsch. **181**, 357—361.
7. — — ; HASTRICH, H.; 1976: Gaschromatographische Untersuchungen über die Aromastoffe von Weinbeeren. II. Möglichkeiten zur Sortencharakterisierung. Vitis **15**, 183—192.
8. — — ; — — ; 1978: Gaschromatographische Untersuchungen über die Aromastoffe von Weinbeeren. III. Die Bedeutung des Standortes für die Aromastoffzusammensetzung der Rebsorte Riesling. Vitis **17**, 288—298.
9. — — ; — — ; ENGEL, L.; KNIPSER, W.; 1978: Possibilities of characterizing wine quality and wine varieties by means of capillary chromatography. In: CHARALAMBOUS, G.; INGLETT, G. B. (Eds): Flavor of Foods and Beverages, 391—417. Academic Press, New York.
10. — — ; KNIPSER, W.; 1979: 3,7-Dimethyl-okta-1,5-dien-3,7-diol — eine neue terpenoide Verbindung des Trauben- und Weinaromas. Vitis **18**, 229—233.
11. — — ; — — ; ENGEL, L.; 1980: Identifizierung von 3,7-Dimethyl-okta-1,7-dien-3,6-diol im Trauben- und Weinaroma von Muskatsorten. Vitis **19**, 226—229.
12. — — ; MANDERY, H.; GÜNTERT, M.; 1984: Terpene compounds in wine. In: NYKANEN, L.; LEHTONEN, P. (Eds): Flavor Research of alcoholic beverages. Proc. Alko-Symp. Kauppakirjapino Oy, Helsinki, 255—274.
13. — — ; — — ; ULLEMAYER, H.; 1983: 3,7-Dimethyl-1,7-octandiol — eine neue Terpen-Komponente des Trauben- und Weinaromas. Vitis **22**, 225—230.
14. — — ; — — ; — — ; 1984: Neue Monoterpene in Traubenmosten und Weinen und ihre Bedeutung für die Genese einiger cyclischer Monoterpenether. Vitis **23**, 84—92.
15. SCHREIER, P.; DRAWERT, F.; JUNKER, A.; 1976: Gaschromatographisch-massenspektrometrische Differenzierung der Traubenaromastoffe verschiedener Rebsorten von *Vitis vinifera*. Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm. **4**, 154—157.
16. — — ; — — ; — — ; REINER, L.; 1976: Anwendung der multiplen Diskriminanzanalyse zur Differenzierung von Rebsorten anhand der quantitativen Verteilung flüchtiger Weininhaltsstoffe. Mitt. Klosterneuburg **26**, 225—234.
17. SUGA, T.; HIRATA, T.; HIRANO, Y.; ITO, T.; 1976: Biotransformation of monoterpenes by tobacco tissue cultures. Selective hydroxylation of the trans-methyl group in the isopropylidene group. Chem. Lett. **11**, 1245—1248.
18. TSCHESCHE, R.; CIPER, F.; BREITMAIER, E.; 1977: Monoterpen-Glucoside aus den Blättern von *Betula alba* und den Früchten von *Chaenomeles japonica*. Chem. Ber. **110**, 3111—3117.

19. UMBREIT, M. A.; SHARPLESS, K. B.; 1977: Allylic oxidation of olefins by catalytic and stoichiometric selenium dioxide with tert-butyl hydroperoxide. *J. Amer. Chem. Soc.* **99**, 5526—5528.
20. WILLIAMS, P. J.; STRAUSS, C. R.; WILSON, B.; 1980: New linalool derivatives in Muscat of Alexandria grapes and wines. *Phytochemistry* **19**, 1137—1139.

Eingegangen am 10. 4. 1986

Prof. Dr. A. RAPP
BFA f. Rebenzüchtung
Geilweilerhof
D 6741 Siebeldingen