

Sledovanie zmien obsahu trans-2-hexenal v siedmich kultivaroch viniča hroznorodého počas vegetačného obdobia

JÁN ŠAJBIDOR - FEDOR MALÍK - JÁN LEŠKO - NIKOLETA JERMÁŘOVÁ

SÚHRN. Nenasýtené mastné kyseliny sú v zelených rastlinách vrátane viniča prekursorom biologicky významnej skupiny látok, nenasýtených šesťuhlíkatých alkoholov a aldehydov, ktoré tvoria súčasť tzv. trávovej vône („green grass flavour“). Okrem charakteristických senzorických vlastností chráni tieto zlúčeniny vinič pred prienikom hubovej, kvasinkovej alebo bakteriálnej infekcie. V práci boli sledované sezónne zmeny obsahu trans-2-hexenal u 7 odrôd viniča v období máj - august 1994. Najvyšší obsah trans-2-hexenal bol zistený (s výnimkou Bouvierovho hrozna) v júli.

Nenasýtené mastné kyseliny sú vo viniči hroznorodom prekursorom mnohých aromatických látok tvoriacich základ charakteristickej vône zelených rastlín, pre ktorú sa v odbornej literatúre udomácnil výraz „green grass flavour“ (trávová vôňa). Okrem príjemnej arómy plnia metabolity mastných kyselín vo viniči aj oveľa dôležitejšiu funkciu. Sú prvou bariérou proti hubovému a bakteriálnemu prieniku infekcie do rastlinného pletiva. Bolo dokázané, že tzv. listové aldehydy a alkoholy vznikajú za spoluúčasti enzýmov lipoxigenáza (LOX) a hydroperoxidláza (HLA), ktoré oxidujú a štiepia nenasýtené mastné kyseliny na biologicky aktívne šesťuhlíkaté zlúčeniny ako hexanal, trans-2-hexenal, 1-hexanol, cis-3-hexén-1-ol a trans-2-hexén-1-ol. Tieto látky boli nájdené v rôznych rastlinách, pričom vo viniči boli dokázané v relatívne vysokých koncentráciách.

Lipoxigenázy pochádzajúce z rôznych rastlinných zdrojov sa významne líšia v optimálnej hodnote pH, substrátovej špecificite, ale najmä v izomérskej štruktúre reakčných produktov. Napríklad lipoxigenáza izolovaná z rajčín a uhoriek produkuje 9-hydroperoxidy, kým lipoxigenáza viniča podmieňuje vznik 13-hydroperoxidov. Enzymové štiepenie 13-hydroperoxidu vedie

Ing. Ján Šajbidor, CSc., Doc. Ing. Fedor Malík, CSc., Nikoleta Jermářová, Katedra biochemickej technológie ČHTF STU, Ing. Ján Leško, CSc., Centrálna laboratóriá, ČHTF STU, Radlinského 9, Bratislava.

k tvorbe hexanal a cis-3-hexenal, ktorý ľahko izomerizuje na trans-2-hexenal. Tieto šesťuhlíkaté zlúčeniny majú dôležitú úlohu pri tvorbe základnej arómy hrozna ale aj jabĺk a rajčín [1].

K zvýšenej tvorbe prchavých látok z nenасыtených mastných kyselín dochádza po kontakte substrátu (či už pridaného, alebo rastline vlastného) s enzýmom napríklad po mechanickom narušení rastlinného pletiva. Nedávno sa objavili publikácie, v ktorých je popísaná aktivácia lipoxigenázovej dráhy v rastlinách počas ich napadnutia fytopatogénmi [2]. Je zaujímavé, že najsilnejšie mikrobicídne účinky boli zistené u trans-2-hexenal. Experimenty dokázali infekciou aktivovanú indukciu lipoxigenázovej dráhy a vznik biocídov z 13-hydroperoxidu kyseliny linolénovej. Účinnými zložkami boli cis-3-hexenal, trans-2-hexenal, cis-3-hexenol a trans-2-hexenol. Aldehydy, predovšetkým trans-2-hexenal, sú pomerne reaktívne a majú veľký antifungálny a insekticídny účinok [3]. Je zaujímavé, že biocídny účinok nasýtených aldehydov bol v porovnaní s rovnakými, α,β -nenасыtenými aldehydmi oveľa menší [4].

Predpokladá sa, že šesťuhlíkaté nenасыtené aldehydy a alkoholy majú pre vinič veľký význam najmä v počiatočných štádiách infekcie. Fytoalexíny sú aktívne až v neskorších fázach po prieniku fytopatogénov.

Z uvedeného vyplýva, že poznanie biochémie vzniku ochranných látok produkovaných samotnou rastlinou pri infekcii alebo mechanickom poškodení, je prvým predpokladom cieleného zvýšenia imunity produkčných odrôd kultúrnych rastlín viniča nevynímajúc.

V našej práci sme sa zamerali na sledovanie zmien obsahu trans-2-hexenal počas 4 mesiacov vegetačného obdobia 7 kultivarov viniča.

Materiály a metódy

V práci sme analyzovali listy viniča hroznorodého (*Vitis vinifera*) týchto kultivarov:

A - Čabianska perla, B - Muller Thurgau, C - Iršaj Oliver, D - Izabela ružová, E - Svätovavrinské, F - Bouvierovo hrozno, G - Rulandské biele.

Listy boli zberané v lokalite Modra v priebehu mesiacov máj až august 1994. Po zbere boli uskladnené pri -25°C . Listový extrakt bol spracovaný nasledovným postupom:

272,8 g viničových listov o sušine 31,8 % sme homogenizovali 5 minút s 1250 ml destilovanej vody. Po homogenizácii sme upravili pH na 2,3 a pridali 3 μl amylalkoholu ako vnútorného štandardu. Obsah sme preniesli do varnej banky a doplnili destilovanou vodou na 1 l. Extrahovali sme v extrakčnej aparatúre podľa Likens - Nickersona [5] 50 ml dietyléteru 1,5 hodiny. Dietyléterový extrakt sme prefiltrovali cez bezvodý Na_2SO_4 a zahustili na objem 1 ml. Extrakt bol analyzovaný GC a GC/MS za nasledovných podmienok:

GC analýza na náplňovej kolóne:

Prístroj CHROM 5 (Lab.přístroje Praha)

Kolóna: 2,5 m x 3 mm plnená 10 % CARBOWAXom 20M na nosiči CHROMATON NAW DMCS o zrnitosti 0,125-0,16 mm

Mobilná fáza: dusík o vstupnom tlaku 60 KPa a prietoku 34 ml/min

Teplota kolonového priestoru: 80 °C

Teplota nástrekového a detekčného priestoru: 120 °C

Detektor: FID

Vyhodnotenie chromatogramov: integračný program APEX 2.5 (Ecom Praha)

GC analýza na kapilárnej kolóne:

Plynový chromatograf VARIAN 3400 s hmotnostným detektorom ITD 800 (Finnigan, USA)

Kolóna: 30 m dlhá kremenná kapilárna kolóna DB-5 s vnútorným priemerom 0,2 mm a hrúbkou filmu 0,25 µm

Nástrek: 0,5 µl vzorky s použitím deliča 1:50 pri teplote injektora 240 °C

Počiatočná teplota kolóny pri nástreku a počas ďalších 5 minút bola nastavená izotermicky na 60 °C. Potom sa použil lineárny program 8 °C/min. Prietok nosneho plynu (He) - 1 ml/min. Hmotnostné spektrá (EI) sa snímali pri energii elektrónov 70 eV s rýchlosťou rozvoja spektra 1s/scan pri teplote ITD 220 °C. Spojovacia rúrka medzi plynovým chromatografom a spektrometrickým detektorom sa udržiavala pri teplote 240 °C.

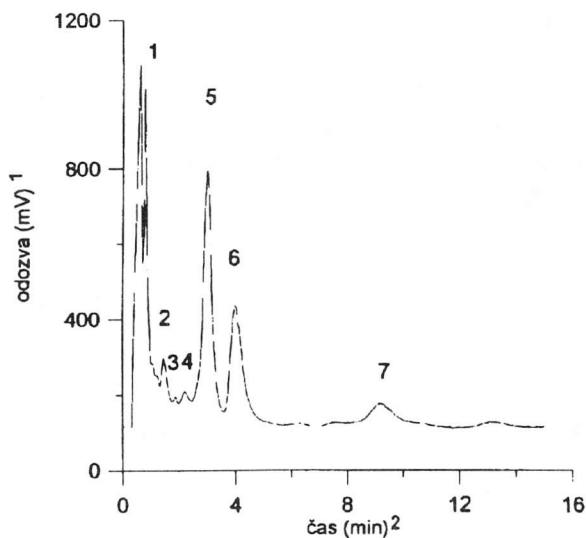
Na zostrojenie kalibračnej čiary na kvantitatívne vyhodnotenie chromatogramov sme použili nasledovný postup:

Do 1 l destilovanej vody sme pridali 3 µl amylalkoholu (vnútorný štandard) 1 µl trans-2-hexen-1-olu, 1 µl cis 3-hexen-1-olu a 1 µl hexanolu. pH sme upravili na 2,3.

K tejto zmesi sme pridávali 1, 3, 5, 7, 15 µl trans-2-hexenal. Obsah sme extrahovali v Likens-Nickersonovej aparátúre [5] s 50 ml dietyléteru 1,5 h. Dietyléterový extrakt sme prefiltrovali cez bezvodý síran sodný a zahustili na objem 1 ml a analyzovali metódou GLC popísanou vyššie. Na kvantifikáciu trans-2-hexenal sme použili kalibračnú čiaru zostrojenú ako funkčnú závislosť pomeru plôch píkov trans-2-hexenal a amylalkoholu od hmotnosti štandardu trans-2-hexenal v štandardnej zmesi pred destiláciou.

Výsledky a diskusia

Analýza listového extraktu je ilustrovaná na obr.1. Z výsledkov vyplýva, že dietyléterom sa zo zelenej hmoty extrahujú aj iné prchavé látky, ktoré sme sa pokúsili identifikovať metódou GC/MS. V listovom extrakte všetkých odrôd viniča sa nám podarilo dokázať prítomnosť hexenal, trans-2-hexenal, trans-

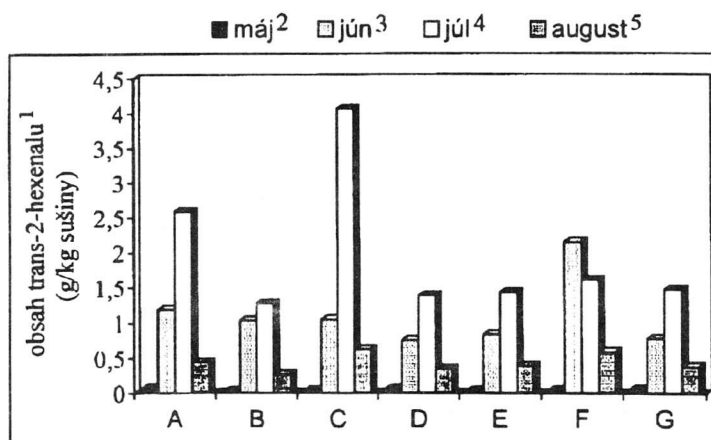


Obr.1. Chromatografická analýza extraktu listu viniča hroznorodého, odroda Izabela ružová na náplňovej kolóne CARBOWAX 20M.

Fig.1. GC analysis of leaf extract (*Vitis vinifera* - sort Müller Thurgau) on packed column with CARBOWAX 20M.

1 - response (mV), 2 - time (min).

2-hexenolu, cis-3-hexenolu, hexanolu a limonénu. Pík trans-2-hexenalu je na chromatograme označený ako 5 (retenčný čas 3 min) a vnútorný štandard amylalkohol pík č.6 (retenčný čas 4 min).



Obr.2. Obsah trans-2-hexenalu v 7 odrodách viniča počas 4 mesiacov vegetačného obdobia (A- Čabianska perla, B - Müller Thurgau, C - Iršaj Oliver, D - Izabela ružová, E - Svätovavrinské, F - Bouvierovo hrozno, G - Rulandské biele).

Fig.2. Content of trans-2-hexenal in 7 sorts of *Vitis vinifera* during 4 months of vegetation cycle (A- Čabianska perla, B - Müller Thurgau, C - Iršaj Oliver, D - Izabela ružová, E - Svätovavrinské, F - Bouvierovo hrozno, G - Rulandské biele).

1 - content of trans-2-hexenal (g/kg dry weight), 2 - May, 3 - June, 4 - July, 5 - August.

Na obr.2. je hmotnostné spektrum trans-2-hexenalu zo vzorky odrody Izabela ružová. Porovnanie relatívnej intenzity píkov vzorky s údajmi v databáze prístroja potvrdilo štruktúru analyzovanej látky. Molekulový ión m/z 98 a ión s m/z 99 prislúcha $(M+1)^+$, ktorý sa v „trap“ detektoroch často vyskytuje. Je tvorený adíciou protónu na kyslík základného skeletu molekuly.

Zo získaných výsledkov vyplýva, že obsah majoritného metabolitu trans-2-hexenalu sa vo vegetačnom období mení. V máji je jeho obsah najmenší vo všetkých odrodách, postupne však jeho obsah stúpa a diferencuje sa (obr.3.). Najvyššia hladina bola detegovaná v júli, v auguste jeho hodnota opäť klesla. Výnimkou je Bouvierovo hrozno, ktoré má maximum obsahu trans-2-hexenalu v júni. Najvyšší výťažok trans-2-hexenalu sme získali zo skorých odrôd Irsay Oliver a Čabianska perla. Poznatok, že obsah trans-2-hexenalu je najvyšší v období kedy máme k dispozícii veľké množstvo odpadnej biomasy pochádzajúcej z úprav ktoré sa robia v danom období na viniči je zaujímavý pre prípadné komerčné využitie.

Literatúra

1. RUTTLOFF, H.: Nahrung., 26, 1982, s.575.
2. OCAMPO, C.A.- MOERSCHBAUER, B.- GRAMBOW, H.J.: Z.Naturforsch., 41c, 1986, s. 559.
3. GOTZ-SCHMIDT, E.-M. - WENZEL, M. - SCHREIER, P.: Lebensm. Wiss. Technol., 19, 1986, s.152.
4. SCHAUENSTEIN, E. - ESTERBAUER, H. - ZOLLNER, H.: Aldehydes in biological systems-their natural occurrence and biological activities. Pion Limited London, 1977, s.32-35 a s.40-41.
5. LIKENS, S. - NICKERSON, G.: Proc. Am. Soc. Brew. Chem., 1964, s.5.

Production of trans-2-hexenal in seven sorts of *Vitis vinifera*

JÁN ŠAJBIDOR - FEDOR MALÍK - JÁN LEŠKO - NIKOLETA JERMÁŘOVÁ

SUMMARY. Unsaturated fatty acids in plants are known as a precursor of biologically important group of unsaturated alcohols and aldehydes with six carbons in chain length. Those compounds constituents the base of aroma called „green grass flavour“. On the other hand those alcohols and aldehydes protect vine against fungal or bacterial infections. Seasonal changes in the content of trans-2-hexenal in seven sorts of *Vitis vinifera* in the time period between may and august 1994 were investigated. The highest content of trans-2-hexenal (with the exception of Bouvier wine) was detected in the sample harvested in July.