

PLANTA MEDICA

ZEITSCHRIFT FÜR ARZNEIPFLANZENFORSCHUNG

Organ der Gesellschaft für Arzneipflanzenforschung e. V.

Unter Mitwirkung von Prof. Dr. Austerhoff, Tübingen; Prof. Dr. Baerheim Svendsen, Leiden; Dr. Békésy, Budapest; Prof. Dr. Borkowski, Warschau; Prof. Dr. Duquenois, Strasbourg; Prof. Dr. Esdorn, Hamburg; Prof. Dr. Fairbairn, London; Prof. Dr. Flück, Zürich; Prof. Dr. Hegnauer, Leiden; Dr. A. Hofmann, Basel; Prof. Dr. Kaiser, Stuttgart; Dr. E. Meyer, Seeshaupt/Obb.; Prof. Dr. Mothes, Halle; Dr. B. Mukerji, Calcutta (India); Prof. Dr. van Os, Groningen; Prof. Dr. Paris, Paris; Prof. Dr. Poethke, Jena; Prof. Dr. E. Reinhard, Tübingen; Prof. Dr. Rowson, Bradford; Prof. Dr. Santavý, Olomouc; Prof. Dr. W. Schmid, Marburg; Prof. Dr. O. E. Schultz, Kiel; Prof. Dr. Shoji Shibata, Tokio; Prof. Dr. Soehring, Hamburg; Prof. Dr. Sokolow, Leningrad; Prof. Dr. Trease, Nottingham; Prof. Dr. Tyler, Lafayette.

Schriftleitung: Prof. Dr. E. Schratz, Münster/Westf., Martin-Luther-Straße 7

HIPPOKRATES VERLAG STUTTGART

Band 24

August 1973

Heft 1
Seite 1-7

Sonderdruck

Berichte der „Arbeitsgemeinschaft für Arzneipflanzenbau“

ZUR NACH-ERNT-PHYSIOLOGIE DER PFEFFERMINZE

Post-harvest physiology of peppermint

Von Ch. Franz und A. Wünsch¹

Summary

In the course of wilting of peppermint leaves variations were noticed in essential oil, protein, soluble nitrogen, and free amino acids. The increase of essential oil in wilting leaves of *Mentha piperita* is caused by leucin catabolism probably: After l-leucin-¹⁴C(U) incorporation into peppermint leaves and following wilting, the essential oil was radioactive labelled much more than oil of non-wilted leaves.

Einleitung und Problemstellung

Im Vergleich zu pflanzlichen Nahrungsmitteln (Drawert u. Mitarb., 1969; Weichmann, 1972) oder einigen Drogen wie Digitalis, Solanaceen und Tee (Stahl, 1962) sind über die Nach-Ernte Physiologie („post-harvest-physiology“) der Pfefferminze nur sehr wenig Untersuchungen bekannt. Die Arbeiten von Esdorn (1950), Kalitzki (1954) und Hefendehl (1964) zu diesem Problemkreis beschränkten sich darauf, nur Veränderungen in Menge und Zusammensetzung des ätherischen Öls welkender Pfefferminzblätter festzustellen, ohne auf andere gleichzeitig ablaufende Stoffwechselfvorgänge einzugehen.

Wir konnten bereits früher auf die Beobachtung hinweisen, daß in welkenden Blättern von *Mentha piperita* nicht nur der Gehalt an ätherischem Öl zunimmt,

¹ Vorgetragen auf der Tagung der Gesellschaft für Arzneipflanzenforschung in Helsinki, 20.-29. 7. 1972.

sondern auch der Anteil löslicher Stickstoffverbindungen am Gesamtstickstoff steigt (Fritz und Franz, 1970; Franz und Wunsch, 1972). In Fortsetzung dieser Arbeiten sollten von den löslichen-N-Verbindungen die freien Aminosäuren eingehender untersucht werden; Chichester et al. (1959) hatten nämlich beobachtet, daß gewisse niedere Pflanzen in der Lage sind, aus der Aminosäure Leucin Isoprenoide zu bilden. Tressl, Drawert u. Mitarb. (1970) fanden verschiedene Aminosäuren, darunter Leucin, als Precursoren von pflanzlichen Aromastoffen. Durch Einbauversuche mit radioaktiv markiertem Leucin sollte die Beteiligung dieser Aminosäure an der Zunahme des Ölgehalts während der Welke von Pfefferminzblättern offenkundig werden.

Experimenteller Teil

Pflanzenmaterial und Probenahme

Die Versuchspflanzen stammten von dem schon früher verwendeten Klon von *Mentha piperita* L. (Franz und Wunsch, 1972). Sie wurden im Gewächshaus bei 20° C Tagestemperatur und 12° C bei Nacht sowie unter 16-Stunden-Langtag kultiviert. Die gleichmäßige 16-Stunden-Belichtung wurde durch 2 HQL-Lampen (250 W) pro m² erreicht. Zum Zeitpunkt der Untersuchung hatten die Pflanzen eben die Blütenknospen angesetzt.

Für die Anwelkversuche wurden aus den Triebspitzen und den obersten 3 Blattpaaren gleichartige Proben von je 12–15 g Frischmasse hergestellt, in einfacher Schicht ausgelegt und bei +22° C gehalten. Zu 5 Untersuchungszeitpunkten (sofort nach der Ernte bzw. 3, 8, 24 und 48 Stunden später) wurden in je einer Probe die Stickstofffraktionen (Gesamt-N, lösl.-N-Verbindungen, freie Aminosäuren), in einer Parallelprobe Menge und Zusammensetzung des ätherischen Öls bestimmt.

Stickstoff-Fraktionierung

Zur Trennung von Eiweiß und lösl.-N-Verbindungen wurde wie schon bei den früheren Untersuchungen Trichloressigsäure (TCE) benutzt. Das frische oder gefriergetrocknete Material wurde mit 5%iger TCE 30 sec in einem Ultramix zerkleinert, 10 min auf 70° C erwärmt und zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, der Niederschlag mit 1%iger TCE gewaschen und filtriert. In den vereinigten Filtraten wurden die lösl.-N-Verbindungen, in einer Parallelprobe der Gesamt-N-Gehalt nach Kjeldahl bestimmt.

Freie Aminosäuren (nach Schaller und Wunsch)

Zur Extraktion wurde 1 g gefriergetrocknete Pflanzensubstanz mit 100 ml Äthanol in einem 500 ml Rundkolben 20 min unter Rückflußkühlung gekocht, um proteolytische Enzyme zu inaktivieren. Danach wurde das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand im Kolben mit 100 ml Aqua dest. versetzt und 2 Std im Wasserbad bei 65° C gehalten. Zur Unterstützung des Lösungsvorganges wurde mehrmals im Abstand von 10 min umgeschwenkt. Die Hälfte des Wassers läßt man hierauf im Rotationsverdampfer abdunsten; der verbleibende Rest wurde zur Eiweißfällung mit 20 ml Pikrinsäurelösung (1,2%) versetzt und auf 100 ml mit Aqua dest. ergänzt. Nach kräftigem Umschütteln wurde zentrifugiert, 5 ml des Überstandes auf eine Austauschersäule (Carotinröhrchen, gefüllt mit Dowex 1×8, 200–400 mesh) pipettiert und einsickern gelassen. Die Aminosäuren wurden mit 20 ml 0,02 n HCl von der Säule eluiert, das Eluat

gesammelt und eingengt. Den Trockenrückstand nimmt man mit Puffer (pH 2,2) auf. Die Trennung der Aminosäuren erfolgte anschließend im Aminosäureanalysator (Biocal 200, 80-cm-Säule, Ionenaustauscher BioRad Aminex A 6, Ninhydrinfärbung).

Ätherisches Öl

Der Gehalt an ätherischem Öl wurde durch Rücklaufdestillation in modifizierten Neoclevenger-Apparaten bestimmt. Die anschließende Auftrennung in die Einzelkomponenten erfolgte gaschromatographisch (Packard GC 800, 25-m-Golay-Säule, Trennphase Polypropylen-glykol, FID).

Fütterung und Markierung mit ^{14}C -L-Leucin (U)

Für diese Experimente² wurde L-Leucin- ^{14}C (U) der Fa. Amersham-Buchler eingesetzt. Die spezifische Aktivität betrug lt. Hersteller 342 mCi/mM, die radiochemische Reinheit (DC) 98%, die optische Reinheit 99,9%. L-Leucin- ^{14}C (U) lag in 2%iger äthanolischer Lösung vor.

Unter Wasser geschnittene Triebspitzen und isolierte obere Blätter der Versuchspflanzen wurden in Fiolen mit einer wässrigen Lösung von L-Leucin- ^{14}C (U) gegeben (12,5 μCi in 1 ml) und in einer Klimakammer unter den oben erwähnten Bedingungen aufgestellt. Nach Aufnahme der markierten Substanz erhielten die Triebe und Blätter nach Bedarf Leitungswasser. Zum vorbestimmten Untersuchungszeitpunkt (2 bis 4 Tage nach der Aufnahme) wurde von der Hälfte der analogen Proben sofort, von der anderen Hälfte nach 24-stündigem Anwelken das ätherische Öl destilliert und die ^{14}C -Einbaurate bestimmt. Die Aktivitätsmessung des ätherischen Öls erfolgte in einem „Packard-Tri-Carb“ Liquid Scintillation Spectrometer, Scintillator Naphthalin-Dioxan-Cocktail. Um die Verteilung der Aktivität unter den Einzelkomponenten des ätherischen Öls zu beurteilen, wurden Dünnschichtchromatogramme und davon Autoradiogramme (Film: Agfa-Gevaert Structurix D 10) angefertigt.

Ergebnisse und Diskussion

Gehalt und Zusammensetzung des ätherischen Öls

Wie schon früher berichtet (Franz und Wunsch, 1972), konnte in Übereinstimmung mit älteren Arbeiten (Esdorn, 1950; Kalitzki, 1954) während 48-stündiger Welke der Pfefferminzblätter eine Zunahme des Gehalts an ätherischem Öl gefunden werden. Ebenso verschob sich entsprechend den Ergebnissen von Hefendehl (1964) die Zusammensetzung des ätherischen Öls (Tab. I).

Stickstoff-Fraktionen

Wir beobachteten bereits 1970, daß gleichzeitig mit dem ätherischen Öl sich auch ein Parameter des N-Stoffwechsels (lösl.-N: Eiweiß-N) beim Anwelken der Blätter ändert (Abb. 1): Der Anteil lösl.-N-Verbindungen am Gesamt-N nimmt

² Diese Versuche konnten im „Isotopenlabor“ des Instituts für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München durchgeführt werden. Herrn Akad. Dir. J. Hölzl sei auch an dieser Stelle für Arbeitsmöglichkeit und Unterstützung gedankt.

während dieser Zeit deutlich zu. Es war daher naheliegend, bei welkenden Pfefferminzblättern einen direkten Zusammenhang zwischen Verschiebungen in den N-Fractionen und Änderungen im Ölgehalt zu vermuten. Diese Annahme wurde durch die Befunde von Chichester et al. (1959) sowie Goodwin (1961) unterstützt, wonach Leucin bei katabolischen Prozessen über Isovaleryl-CoA und β -hydroxy- β -methyl-glutaryl-CoA (=HMG-CoA) in Isoprenoide umgewandelt werden kann.

Tabelle I
Veränderungen in Menge und Zusammensetzung des ätherischen Öls von *Mentha pip.* L. innerhalb der ersten 48 Stunden nach der Ernte

Zeit nach der Ernte in Stunden	äther. Öl % i. TM	Menthon %	Menthol %
sofort	3,19	54	20
3	3,30	51	21
8	3,35	49	23
24	3,48	48	25
48	3,65	48	29

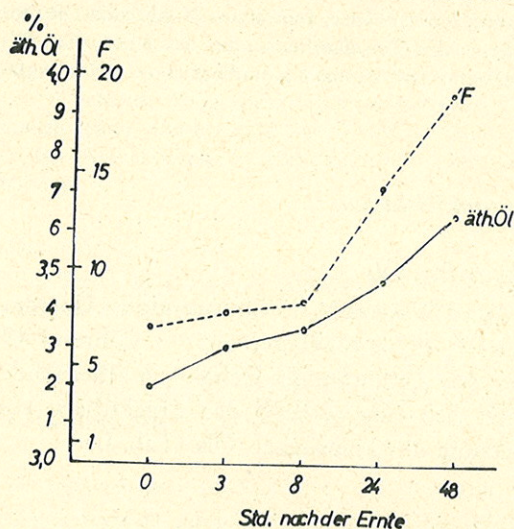


Abb. 1. Änderung des Gehalts an äther. Öl und der Stickstofffraktionen während der Welke von Pfefferminzblättern

$$\left(F = \frac{\text{lösl.-N} \times 100}{\text{Eiw.-N}} \right)$$

Eine Untersuchung der freien Aminosäuren ergab, daß im Verlauf der Welke durch Dissimilation des Proteins in den Blättern die Summe freier Aminosäuren im Durchschnitt auf das 2,7fache zunahm. Während aber die ursprünglich anteilmäßig vorherrschenden Substanzen Asparaginsäure und Glutaminsäure abnahmen, stieg der Gehalt von L-Leucin um das Vielfache des Durchschnittswertes an (Tab. II).

Tabelle II

Veränderungen im Gehalt einiger freier Aminosäuren der Triebspitzen und obersten Blattpaare von *Mentha piperita* während 48stündiger Welke

Anwelkzeit (Stdn.)	0	3	8	24	48
Summe freier Aminosäuren					
μMol/g TM	56,75	65,83	84,56	141,31	152,09
relativ (%)	100	116	149	249	268
Asparaginsäure					
μMol/g TM	17,42	11,32	10,97	14,28	12,37
relativ (%)	100	65	63	82	71
Glutaminsäure					
μMol/g TM	25,28	29,32	32,11	18,45	5,81
relativ (%)	100	116	127	73	23
Leucin					
μMol/g TM	0,74	1,64	3,96	8,78	9,48
relativ (%)	100	221	535	1186	1281
Anteil Leucin an der					
Summe freier Aminosäuren (%)	1,3	2,5	4,7	6,0	6,0

Diese Tatsachen werden bei Kenntnis der normalen Zusammensetzung der freien Aminosäuren und des Proteins frischer Pfefferminzblätter verständlich. Unter den freien Aminosäuren hat L-Leucin einen Anteil von etwa 0,7–1%, die Proteinfraction besteht jedoch zu ca. 25% aus Leucin (L-Leucin + Isoleucin) (Crane and Steward, 1962). Bei der Dissimilation von Protein wird deshalb in erheblichem Maße Leucin freigesetzt. Trotzdem ist die gemessene Leucin-zunahme verhältnismäßig zu gering, denn der Anteil des Leucins an der Summe freier Aminosäuren stieg nur von 1,3 auf 6,0% (Tab. II). Daraus läßt sich schließen, daß ein Teil des Überschusses rasch metabolisiert wird.

Einbau von ^{14}C aus L-Leucin in das ätherische Öl

Um zu überprüfen, ob Leucinabbau entsprechend den Ergebnissen von Chichester et al. (1959) unter anderem auch zur oben beschriebenen Zunahme des Ölgehalts welkender Pfefferminzblätter führt, wurde versucht, die Aktivität des verfütterten und metabolisierten Leucins im ätherischen Öl nachzuweisen.

^{14}C -Leucin wurde von den Triebspitzen und Blättern von *Mentha* aus der wäßrigen Lösung rasch und innerhalb weniger Stunden bis zu 90% aufgenommen. Nach 48- bis 96-stündigem Einbau wurde aus einer Probe sofort das ätherische Öl destilliert und dessen Aktivität gemessen. Das ätherische Öl der frischen Blätter hatte im Mittel eine spezifische Aktivität um 900 dpm/1μl (ca. 0,45 nCi/μl), die Einbaurrate betrug etwa 0,04% (Tab. III). Die Parallelprobe wurde 24 Stunden bei Zimmertemperatur angewelkt. Das aus den welken Blättern destillierte Öl wies

durchschnittlich eine 2- bis 3-fache Aktivität und Einbaurrate des Öls der frischen Blätter auf (Tab. III).

Tabelle III
 ^{14}C -Markierung (aus Leucinabbau) des ätherischen Öls frischer und angewelkter Blätter von *Mentha pip.* L. (Mittel aus 3 Versuchen)

	frisch	welk
Blattmasse, g Frischsubst.	3	3
angebotene Aktivität, μCi	25	25
aufgenommene Aktivität, μCi	20	20
Gesamtaktivität im äther. Öl, dpm	13 900	36 300
Einbaurrate ins äther. Öl, %	0,04	0,10
spezif. Aktivität (dpm/1 μl äther. Öl)	910	2070

Daraus ist zu entnehmen, daß während der nur 24stündigen Anwelkzeit das ätherische Öl durch Abbauprodukte des L-Leucin- ^{14}C (U) wesentlich höher markiert wurde als während der 2-4 Tage vor dem Welken. Ein Versuch, bei dem die eine Hälfte der Proben 3 Tage mit ^{14}C -Leucin gefüttert, die andere Hälfte nach 2tägiger Aufnahme 24 Stunden angewelkt wurde, bestätigte dieses Verhalten.

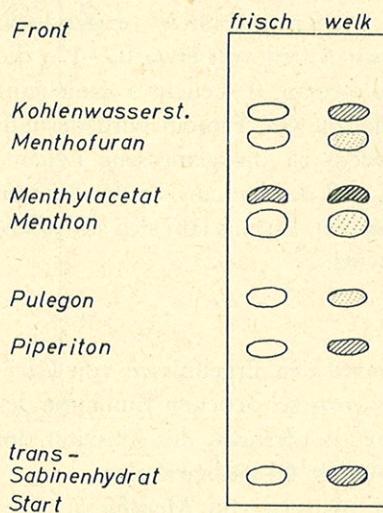


Abb. 2. Markierung der Komponenten des äther. Öls nach ^{14}C -Leucin-Applikation und Welke (Autoradiogramm eines Dünnschichtchromatogramms)

Da mehrere Komponenten insbesondere des ätherischen Öls welker Blätter radioaktiv markiert waren (Abb. 2), ist anzunehmen, daß die Aktivität zumindest teilweise vom $^{14}\text{C}_5$ -Grundkörper des L-Leucins stammte. Ob der von den Arbeitskreisen um Chichester und Goodwin für niedere Pflanzen postulierte Katabolismus (Leucin \rightarrow Isovaleryl-CoA \rightarrow β -methyl-crotonyl-CoA \rightarrow β -methyl-

glutaconyl-CoA \rightarrow HMG-CoA) unter bestimmten Voraussetzungen auch für höhere Pflanzen (insbes. Pfefferminze) gilt, soll durch den Nachweis einiger markierter Zwischenstufen überprüft werden.

Zusammenfassung

Im Verlauf der Welke von Pfefferminzblättern konnten Veränderungen in Gehalt und Zusammensetzung des ätherischen Öls, im Anteil löslicher Stickstoffverbindungen am Gesamtstickstoff und im Verhältnis der freien Aminosäuren zueinander beobachtet werden. Die Zunahme des Ölgehalts in welkenden Blättern von *Mentha piperita* L. ist vermutlich auf Leucinabbau zurückzuführen, denn Einbauversuche mit L-Leucin- ^{14}C (U) zeigten, daß das ätherische Öl während des Welkeprozesses wesentlich besser radioaktiv markiert wurde als vergleichsweise das Öl ungewelkter Blätter.

Literatur

- Chichester, C. O., Yokoyama, H., Nakayama, T. O. M., Lukton, A., and Mackinney, G.: J. Biol. Chem. 234, 598 (1959)
Crane, F. A., and Steward, F. C.: Cornell Univ. Agric. Exp. Sta. Mem. 379, 68 (1962)
Drawert, F., Heimann, W., Emberger, R., und Tressl, R.: Chromatographia 2, 57; 77 (1969)
Esdorn, I.: Pharmazie 5, 481 (1950)
Franz, Ch., und Wünsch, A.: Angew. Botanik 46, 223 (1972)
Fritz, D., und Franz, Ch.: Dt. Apoth. Ztg. 110, 1111 (1970)
Goodwin, T. W.: Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments, S. 143 ff., Academic Press (1965)
Hefendehl, F. W.: Planta 62, 321 (1964)
Kalitzki, M.: Pharmazie 9, 61 (1954)
Schaller, K., und Wünsch, A.: Die Nahrung (im Druck)
Stahl, E.: Karsten-Weber-Stahl, Lehrbuch der Pharmakognosie, 9. Aufl., Gustav-Fischer-Verlag (1962)
Tressl, R., Emberger, R., Drawert, F., und Heimann, W.: Z. Naturforsch. 25b, 704 (1970)
Weichmann, J.: Dissertation Weihenstephan (1972)

*Anschrift der Verfasser: Dr. Ch. Franz, Institut für Gemüsebau der Technischen Universität München, D-8050 Freising-Weihenstephan
Dr. A. Wünsch, Institut für Pflanzenernährung der Technischen Universität München, D-8050 Freising-Weihenstephan*