

**Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe und ihr
Einfluss auf die enzymatische Bräunung von
Lactuca sativa var. *capitata***

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 Frau Diplom-Lebensmittelchemikerin
Franziska Mai
geboren am 02.06.1983 in Leipzig

1. Gutachter: Prof. Dr. Marcus A. Glomb (Halle)
2. Gutachter: Prof. Dr. Matthias Wüst (Bonn)

Halle (Saale), 19.02.2019
Datum der Verteidigung: 03.07.2019

Für meine Familie

DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. Marcus A. Glomb bedanken, für die Möglichkeit dieses außerordentlich interessante Thema zu bearbeiten. Durch seine wertvollen Anregungen, Hinweise und Diskussionen hat er maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Für das entgegengebrachte Vertrauen und die Ermutigung für den „letzten“ Schritt zur Fertigstellung der Dissertation bin ich überaus dankbar.

Allen ehemaligen Kollegen des Arbeitskreises Lebensmittelchemie danke ich für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre und die interessanten Gespräche, nützlichen Diskussionen und helfenden Hände. Unsere gemeinsamen Kochabende und Ausflüge werden mir immer in Erinnerung bleiben.

Einen besonderen Dank gilt auch den fleißigen Salatschnippelern, die mit mir mehrere hundert Kilo Salat für die Untersuchungen vorbereitet haben. Den Firmen Subway und Thurländer danke ich für die kostenlose Bereitstellung der Untersuchungsproben.

Bei Anita, Jana, Dorothe, Sascha, Friederike und Susanne möchte ich mich für ihren Fleiß und Sorgfalt bedanken, die im Rahmen ihrer Diplomarbeiten Ausschnitte des hier vorgestellten Themas bearbeitet haben.

Zudem möchte ich an dieser Stelle Herrn Dr. Dieter Ströhl und Herrn Dr. Michael Kovermann für die Aufnahme der NMR-Spektren danken. Für die Aufnahme von zahlreichen HR-MS-Spektren bedanke ich mich bei Herrn Dr. J. Schmidt.

Bei meiner gesamten Familie und meinen Freunden bedanke ich mich für ihr aufrichtiges Interesse und den nötigen Rückhalt, ihre Unterstützung und notwendige Ablenkung. Zum Schluss gilt ein liebevoller Dank meinem Ehemann David. Er hat mich trotz Arbeitsstress und Familienalltag immer daran erinnert, dass auch ich meine Ziele nicht aus den Augen verlieren darf. Jetzt bist du dran!

VORWORT

Die vorliegende Dissertation wurde in einer kumulativen Form verfasst und im Arbeitskreis von Prof. Dr. M. A. Glomb am Institut für Chemie, Bereich Lebensmittelchemie, der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg im Rahmen einer Beschäftigung als wissenschaftlicher Mitarbeiter angefertigt. Die Forschungsergebnisse, die experimentellen Daten und deren Diskussion wurden bereits in der internationalen Fachzeitschrift *Journal of Agricultural and Food Chemistry* in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

Publikation A:

F. Mai und M. A. Glomb, Isolation of Phenolic Compounds from Iceberg Lettuce and Impact on Enzymatic Browning, *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 2868–2874.

Publikation B:

F. Mai und M. A. Glomb, Lettucenin Sesquiterpenes Contribute Significantly to the Browning of Lettuce, *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 4747–4753.

Publikation C:

F. Mai und M. A. Glomb, Structural and Sensory Characterization of Novel Sesquiterpene Lactones from Iceberg Lettuce, *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 295–301.

Die Originalarbeiten (Publikationen A – C) sind im Kapitel 11 aufgeführt.

Weiterhin wurden Teile der kumulativen Arbeit als Review-Artikel in der Fachzeitschrift *Chemie in unserer Zeit* unter dem Titel „Die vielfältigen Bräunungsmechanismen von pflanzlichen Lebensmitteln“ von Franziska Mai, Nils Mertens und Marcus A. Glomb zur Veröffentlichung vorgelegt. Inhalte des Review-Artikels werden in *Kursivschrift* kenntlich gemacht. Passagen, die den Review-Artikel erweitern, sind in Standardschrift eingefügt.

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung und Zielstellung	1
2	Zur Botanik von <i>Lactuca sativa</i> L.	4
3	Inhaltsstoffe von <i>Lactuca sativa</i> L.	7
3.1	Überblick der wichtigsten Inhaltsstoffe	7
3.2	Polyphenole	9
3.2.1	Biosynthese der Polyphenole	10
3.2.2	Flavonoide	12
3.2.3	Polyphenole im Eisbergsalat.....	13
3.3	Sesquiterpenlactone	18
3.3.1	Biosynthese der Sesquiterpenlactone.....	19
3.3.2	Sesquiterpenlactone im Eisbergsalat.....	20
4	Die enzymatische Bräunung	24
4.1	Enzymatische Bräunung von echtem Tee (<i>Camellia sinensis</i>)	29
4.1.1	Bildung von reaktiven <i>o</i> -Chinonen.....	30
4.1.2	Bildung von Bisflavanolen (Theasinensine).....	31
4.1.3	Bildung von Theaflavinen	32
4.1.4	Bildung von Thearubigenen.....	34
4.2	Bräunung von Rooibos (<i>Aspalathus linearis</i>)	34
4.3	Enzymatische Bräunung von Äpfeln	37
4.4	Verfärbungen von Salat (<i>Lactuca sativa</i>)	38
4.4.1	Phenolbasierter Bräunungsmechanismus von Salat.....	39
4.4.2	Sesquiterpenlacton basierter Bräunungsmechanismus von Salat.....	39
4.5	Weitere Bräunungsmechanismen	42
5	Zusammenfassung	45
6	Summary	48
7	Abbildungsverzeichnis	50
8	Tabellenverzeichnis	51
9	Abkürzungsverzeichnis	52
10	Literaturverzeichnis	53

11	Originalarbeiten.....	61
11.1	Publikation A.....	62
11.2	Publikation B.....	69
11.3	Publikation C.....	76
12	Lebenslauf.....	83
13	Publikationsliste.....	84
14	Eigenständigkeitserklärung.....	86

1 Einleitung und Zielstellung

Abgeleitet von der bekannten Redensart „Das Auge isst mit“ spielt der optische Eindruck für den Verbraucher nicht nur beim Verzehr des fertigen Lebensmittels, sondern schon beim Kauf der Rohprodukte eine große Rolle. Die visuelle Wahrnehmung von Farbe, Form und Struktur ist einer der entscheidenden Faktoren für die Wahl eines pflanzlichen Lebensmittels wie Eisbergsalat, Apfel und Co.

Die optische Begutachtung weckt im Verbraucher Erwartungen im Hinblick auf Geschmack, Frische und Konsistenz. Kräftige Farben wie das satte Grün des Eisbergsalates gelten als Indikatoren für ein hohes Maß an Qualität und an hochwertigen Inhaltsstoffen. Umgekehrt werden wahrnehmbare Verfärbungen als Kriterium für geringe Qualität und einsetzenden Verderb gewertet, da besonders an Druck- und Schnittflächen farbige Pigmente entstehen. Auf der anderen Seite zeichnen sich Schwarzer Tee, Rooibos oder getrocknete Früchte durch eine gewollte, gleichmäßige Braunfärbung in den schönsten Rot- und Goldschattierungen aus, und lassen sich optisch deutlich von den unfermentierten Roh-/Produkten unterscheiden.

Zu Zeiten, in denen der Verbraucher großen Wert auf die Lebensmittelqualität legt, ist es deshalb umso wichtiger, sich mit den chemischen Mechanismen der Verfärbungen von Lebensmitteln auseinanderzusetzen.

Aufgrund ihrer ernährungsphysiologischen Bedeutung haben Salatpflanzen einen hohen Stellenwert in der Gesellschaft. Ernährungs- und küchentechnisch versteht man unter dem Begriff „Salatpflanzen“ im klassischen Sinne Blattgemüse verschiedener Arten. Der Siegeszug der Blattgemüse begann bereits im antiken Griechenland und Ägypten. Im 8. Jahrhundert unter Karl dem Großen kam der Salat nach Mitteleuropa und wurde in den Klostergärten erstmals gezielt gezüchtet. Die heutigen Kultursorten, wie Kopfsalat, Eisbergsalat und Chicorée, sind fester Bestandteil unserer Ernährung.

Der Gehalt an Vitaminen und sekundären Pflanzeninhaltsstoffen, die knackigen frischen Blätter und die große Auswahl im Handel haben aus dem einstigen Hasenfutter eine vollwertige Mahlzeit gemacht. (**s. Abschnitt 3.1 und Tabelle 2**).

Laut der Bayrischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) verzehrt der Deutsche im Durchschnitt 5,9 kg Blattgemüse pro Jahr. Auf die beliebten Sorten Kopfsalat und Eisbergsalat entfallen davon 5,3 kg. [1]

Die in den Verkehr gebrachten Salatsorten unterliegen den Qualitätsanforderungen der europäischen Durchführungsverordnung Nr. 543/2011 der Kommission vom 7. Juni 2011. Nach dieser Norm müssen die Erzeugnisse nach Aufbereitung und Verpackung folgendermaßen beschaffen sein: ganz, gesund, sauber und geputzt, prall und von

frischem Aussehen, praktisch frei von Schädlingen und deren Schäden, nicht geschossen, frei von anomaler äußerer Feuchtigkeit und frei von fremdem Geruch und/oder Geschmack. Damit sind Erzeugnisse mit Fäulnisbefall oder anderen Mängeln, die sie zum Verzehr ungeeignet machen, ausgeschlossen. [2]

Im Jahr 2013 wurden in Europa fast 3,2 Mio Tonnen Eisberg-, Kopfsalat und Chicoree produziert. Der Verlust durch Schwund und Verderb wird dabei auf 10 % geschätzt und führt zu enormen finanziellen Einbußen in der Landwirtschaft [1]

Besonders anfällig für sensorischer Veränderungen sind minimal verarbeitete Salate, also bereits gewaschene und geschnittene Salate, wie sie in einer Vielzahl von Convenience-Produkten vorkommen. Diese Verletzung des Gewebes führt zu einer Reihe von physiologischen und biochemischen Prozessen in der Pflanze. Dazu gehören die Induktion der Ethylensynthese, der Membranlipidabbau und Wasserverlust, eine erhöhte Atmung der Zellen, eine auftretende Wundheilung an den Schnittflächen, die Bildung sekundärer Metabolite und die eintretende oxidative Bräunung. [3] Dabei wird die enzymatische Bräunung der phenolischen Inhaltsstoffe als Hauptursachen für den Qualitätsverlust während der Lagerung von intakten und minimal verarbeiteten Salaten gesehen. [4]

Bei einer Verletzung des Gewebes, werden diese phenolischen Verbindungen aus den Vakuolen freigesetzt und es kommt zu enzymatischen und nicht-enzymatischen Reaktionen. Der Mechanismus der enzymatischen Bräunung wird durch die Polyphenoloxidase (PPO) gesteuert. PPO ist ein Kupfer-haltiges Enzym, welches auch bekannt ist als Catecholoxidase, Catecholase, Diphenoloxidase, *o*-Diphenolase, Phenolase und Tyrosinase. In Gegenwart von Sauerstoff katalysiert es zwei Reaktionen: die Hydroxylierung von monophenolischen Substraten zu *o*-Diphenolen und die oxidative Dehydrogenierung von *o*-Diphenolen zu *o*-Chinonen. [5; 6] Die sehr reaktiven *o*-Chinone können in nachfolgenden Reaktionen spontan und unter Enzym- und Sauerstoffausschluss zu Melaninen kondensieren. Melanine sind hochpolymere, braune bis schwarze Pigmente. Der spezifische Mechanismus, der entweder zu braunen oder schwarzen Reaktionsprodukten führt, ist abhängig von der jeweiligen Struktur der Polyphenolsubstrate. [5; 7] Diese optischen Veränderungen gelten beim Verbraucher als unerwünscht, zumal zusätzlich negative Geschmacks- und Aromaeindrücke entstehen.

Durch die zunehmende industrielle Verarbeitung von Salat und den damit einhergehenden Transport- und Lagerbedingungen ist ein grundlegendes Verständnis der sekundären Inhaltsstoffe von frischem und gebräuntem Salat notwendig, um chemische Abläufe und molekulare Mechanismen verstehen zu können. Bisher sind die molekularen Grundlagen der Bräunung im Salatgewebe nur wenig untersucht und es gibt keine Strukturvorschläge für Substanzen, die einen Einfluss auf die Farbveränderungen haben. Die vorliegende Dissertation hat sich deshalb mit der Isolierung von phenolischen und sesquiterpenoiden Strukturen beschäftigt und ihre Rolle bei der Bräunung von Salat untersucht.

2 Zur Botanik von *Lactuca sativa* L.

Die Salate gehören zur Familie der *Asteraceae* bzw. *Compositae* (Korbblütengewächse). Den 23.000 Arten ist gemeinsam, dass der Blütenstand durch Hüllblätter umgeben ist und eine funktionelle Einheit bildet, die umgangssprachlich als Kopf bezeichnet wird. Die Blütenköpfe bestehen entweder nur aus Zungenblüten, Röhrenblüten oder mittenständigen Röhren- und randständigen Zungenblüten. Die Einzelblüten stehen zu mehreren auf dem kugeligen, scheibenförmigen oder krugartigen Köpfchenboden, welcher meist von borstenartigen Spreublättern umgeben ist. Die Blüten bilden zweiteilige unterständige Fruchtknoten, die sich nach der Befruchtung zu den so genannten Achänen (einsamige Nussfrüchte) ausbilden. [8 bis 10]

Alle Salatformen sind einjährig. Wird der Salat im März ausgesät, sind die Köpfe im Mai erntereif und gehen im Juni unter Auflösung der charakteristischen Rosette in einen beblätterten, ca. 50 cm hohen Blütenstand über. Begünstigt wird das Strecken und Durchbrechen durch feuchtwarmes Wetter. Umgangssprachlich wird es auch als „der Salat schießt“ bezeichnet (**Abbildung 1**). Ein in die Höhe geschossener Salat ist bitter und in der Regel ungenießbar. [11]



Abbildung 1: Salat erntereif (links) und durchbrochen (rechts)

Eine Unterfamilie der *Asteraceae* sind die größtenteils milchsafführenden *Cichorioideae*. Dem Tribus *Lactuceae* (*Cichoriae*) werden die häufigsten Vertreter der Salate den Gattungen *Cichorium* (Wegwarte) und *Lactuca* (Lattiche) zugeordnet. Die Einteilung der einzelnen Sorten erfolgt nach Form und Farbe der Blätter, aber auch nach der Dichte der Köpfe. [8; 12]

Die Gattung *Cichorium* L., Wegwarten- oder Zichoriengewächse genannt, leitet sich von der Gewöhnlichen Wegwarte ab, die in Mitteleuropa häufig an Wegrändern mit ihren blauen Blütenköpfen auffallen. Die Gattung teilt sich in zwei Arten auf. Zu der Art *Cichorium intybus* L. gehören beispielsweise die bekannten Vertreter Chicoreé, Radicchio oder Zuckerhut, aber auch die Wurzelzichorie, deren gerösteten Wurzeln als

Kaffeersatz Verwendung fanden. Die zweite Art *Cichorium endivia* L., teilt sich wiederum in zwei Gruppen. Zu der Gruppe *Cichorium endivia* var. *latifolium* gehören Vertreter wie Endivie (breitblättrige Endivie) oder Eskariol. Ein Vertreter der Gruppe *Cichorium endivia* var. *crispum* ist der Frisée.

Die Gattung der Lattiche umfasst 120 Arten, darunter fällt der Gartensalat (*Lactuca sativa*). Dieser weist eine Vielfalt an Sorten in zwei weiteren Übergruppen auf. Einerseits die Convarietät *sativa* und zum Anderen die Convarietät *incocta*. Vertreter der convar. *sativa* sind Römischer Salat und Romanasalat. Sie werden entweder roh als Salat oder gekocht, wie Spargel oder Spinat, verzehrt. Die Convarietät *incocta* teilt sich in die Varietäten *crispa* L., mit den Sorten Lollo bionda und Lollo rosso, und *capitata* L., wozu der Kopfsalat und der Eisbergsalat gehören. Die folgende **Tabelle 1** gibt eine Übersicht der taxonomischen Einordnung dieser verwendeten Salatsorten.

Der Kopfsalat wird oft auch als Buttersalat bezeichnet und besitzt geschlossene Köpfe mit zarten, mehr oder weniger ganzrandigen, dunkelgrünen Blättern. Die innenliegenden Herzblätter sind hellgelb. Der Eisbergsalat dagegen zeichnet sich durch fest geschlossene Köpfe aus hellen, stark geknitterten, brüchigen und splitternden Blättern aus. Synonyme sind deshalb auch Eissalat oder Krachsalat. [12; 13]

Zusammen mit dem Bataviasalat, dieser besitzt nach oben geöffnete Köpfe, werden sie auch als „Crisphead“ zusammengefasst. Die ältere Form, der Bataviasalat, stammt aus Frankreich, woraus Anfang des 20. Jahrhunderts in den USA die erste Eisbergsalat-Sorte „Great Lakes“ gezüchtet wurde. Diese Sorte „Great Lakes“ bekam einer Legende zur Folge den umgangssprachlichen Namen Eisbergsalat, weil zu dieser Zeit der Transport mit der Bahn auf großen Eisblöcken erfolgte. [14]

In verschiedenen Verzehrstudien in Deutschland steht der Eisbergsalat auf Platz 1, der beliebtesten Salate. [15] Da er außerdem ganzjährig in großen Mengen zur Verfügung steht, wurde er als Untersuchungsmaterial für die **Publikationen A-C** verwendet. Für vergleichende Untersuchungen zu farbgebenden Inhaltsstoffen wurden außerdem verwandte Arten des Eisbergsalates ausgewählt.

Tabelle 1: Taxonomische Einordnung der verwendeten Salatsorten in den Publikationen A-C

Taxonomische Einordnung						
Abteilung	Samenpflanzen - <i>Spermatophyta</i>					
Klasse	Zweikeimblättrige - <i>Rasopsidae</i>					
Ordnung	Asternartige - <i>Asterales</i>					
Familie	Korbblütengewächse - <i>Asteraceae</i> (= <i>Compositae</i>)					
Unterfamilie	Wegwartengeschwister - <i>Cichorioideae</i> (= <i>Lactucoideae</i>)					
Tribus	<i>Lactuceae</i> (= <i>Cichorieae</i>)					
Gattung	Lattich – <i>Lactuca</i> L.			Wegwarten – <i>Cichorium</i> L.		
Art	Gartensalat – <i>Lactuca sativa</i> L.			<i>Cichorium intybus</i> L.	<i>Cichorium endivia</i> L.	
Convarietät	convar. <i>sativa</i> HELM	convar. <i>incoccta</i> HELM		-	-	
Varietät	<i>Lactuca sativa</i> var. <i>longifolia</i>	<i>Lactuca sativa</i> var. <i>crispa</i>	<i>Lactuca sativa</i> var. <i>capitata</i>	<i>Cichorium intybus</i> var. <i>Foliosum</i>	<i>Cichorium endivia</i> var. <i>crispum</i>	<i>Cichorium endivia</i> var. <i>latifolium</i>
Vertreter	Romanasalat	Lollo Rosso Lollo Bionda	Kopfsalat Eisbergsalat	Zuckerhut Radicchio Chicorée	Frisée (Krausblättrige Endivie)	Endivie (Breitblättrige Endivie)

3 Inhaltsstoffe von *Lactuca sativa L.*

3.1 Überblick der wichtigsten Inhaltsstoffe

Blattsalate sind ein fester Bestandteil gesunder Ernährung. Denn sie enthalten wichtige Nährstoffe und andere gesundheitsfördernde Inhaltsstoffe. Zudem haben die Blätter ein großes Volumen, einen Wassergehalt von 95 % und viele Ballaststoffe, sodass sie gut sättigen, aber wenig Energie liefern. Sie enthalten geringe Mengen an Vitamin A, C und E, sowie Mineralstoffe wie Calcium, Phosphor, Eisen oder Kalium. [16; 17]

Eisbergsalat im Besonderen zeichnet sich durch einen milden, leicht süßlichen Geschmack aus, der auf einen Zuckergehalt von etwa 1,6 g/100 g FG zurückzuführen ist. Die Nahrungsmittelbestandteile Fett und Proteine kommen in Summe nur mit 1,2 % im Eisbergsalat vor und spielen daher ernährungsphysiologisch nur eine untergeordnete Rolle. **Tabelle 2** gibt einen Überblick über die wichtigsten Inhaltsstoffe der verwendeten Salatsorten aus den **Publikationen A-C**. [16; 17]

Wie alle anderen pflanzlichen Lebensmitteln gelten Salate als wichtige Quelle von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen. Dazu gehören typische Inhaltsstoffe wie Lignane und Chlorophyll. Außerdem enthalten die meisten Sorten Carotinoide, wie β -Carotin und Lutein, sowie verschiedene aromatische Verbindungen wie Phenolsäuren, Flavonoide und Sesquiterpenlactone. [18; 19]

Mit 30 mg/100 g Frischgewicht ist der Flavonoidgehalt im Eisbergsalat im Vergleich zu anderer Salatsorten, wie beispielsweise Kopfsalat mit 200 mg/100 g FG, sehr gering. [20; 21] Auch der Lactucingehalt als typischer Vertreter der Sesquiterpenlactone fällt mit 0,03 mg/100 g FG auffallend niedrig aus, was sich durch einen milden und kaum bitteren Geschmack äußert. [22]

Trotz des geringen Nährstoffanteils leistet der Eisbergsalat durch die hohen Verzehrsmengen und den Anteil an sekundären Pflanzeninhaltsstoffen einen wichtigen Beitrag zu einer gesunden Ernährung und wurde daher in den Focus der vorliegenden Arbeit gestellt.

Tabelle 2: Ausgewählte Inhaltsstoffe von Eisbergsalat im Vergleich zu den verwendeten Salatsorten in den Publikationen A-C. [16; 17]

Inhaltsstoffe	Einheit pro 100g FG	Eisberg- salat	Kopf- salat	Romana- salat	Lollo Rosso	Lollo Bionda	Zuckerhut	Radicchio	Chicorée	Frisée	Endivie
Wasser	g	95,41	95,12	94,05	92,19	92,85	94,78	94,68	92,28	93,79	93,73
Kohlenhydrate	g	1,57	1,06	1,7	2,80	2,8	1,50	1,50	2,44	3,35	1,24
Zucker gesamt	g	1,56	1,03	1,68	0,83	2,77	1,49	1,49	2,40	0,25	1,24
Glucose	mg	629	404	680	335	1120	600	600	1257	-	483
Fructose	mg	630	524	680	335	1120	600	600	700	-	607
Saccharose	mg	299	104	323	159	532	285	285	439	-	150
Fett	g	0,20	0,22	0,20	0,30	0,30	0,22	0,22	0,18	0,20	0,20
Langkettige FS, gesamt	mg	160	174	160	240	240	177	177	143	-	160
Gesättigte FS	mg	31	40	29	57	57	42	42	35	48	53
Einfach unges. FS	mg	10	6	9	11	11	8	8	5	4	5
Mehrfach unges. FS	mg	119	128	122	172	172	127	127	103	87	102
Eiweiß	g	1,00	1,19	1,60	1,30	1,30	1,20	1,20	1,22	1,25	1,75
Essentielle AS	mg	519	580	837	673	677	626	626	614	-	914
Nichtessentielle AS	mg	479	610	765	624	624	574	574	606	-	836
Ballaststoffe, gesamt	g	1,07	1,40	1,30	1,79	1,60	1,60	1,60	1,30	3,1	1,91
Organische Säuren	g	0,30	0,13	0,25	0,25	0,25	0,20	0,20	0,30	-	0,28
Mineralstoffe	g	0,45	0,88	0,90	1,37	0,90	0,50	0,60	0,79	1,41	0,90
Kalium	mg	175	306	290	303	264	230	240	198	314	230
Calcium	mg	19	21	36	104	68	35	40	26	52	54
Phosphor	mg	20	23	45	38	25	30	27	26	28	54
Eisen	µg	500	314	1100	2133	1400	1000	1500	740	830	1400
Vitamin A (β-Carotin)	mg	3,60	1,12	1,56	1,14	1,14	0,80	0,80	3,43	1,30	1,68
Vitamin C	mg	4,30	11	24	13,5	18	14	28	8,69	6,5	9,8
Vitamin E	mg	0,57	0,57	0,57	0,60	0,60	0,50	0,50	0,10	0,44	1,00

3.2 Polyphenole

Polyphenole bilden die größte Gruppe der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe. Es wurde von mehr als 8000 Strukturen in dieser Verbindungsklasse berichtet, die im gesamten Pflanzenreich zu finden und somit praktisch in allen Gemüsearten vertreten sind. In der Pflanze werden diese Verbindungen als Schutz vor schädlichen Einflüssen wie UV-Strahlung, Krankheitserregern und Fraßfeinden gebildet. Weiterhin sind sie beteiligt an der Bildung von Pigmenten, an der Reparatur von Zellschäden und an der Produktion von Lockstoffen für Insekten [23; 24]

Charakterisiert werden sie durch ein aromatisches Ringsystem, das zwei oder mehr Hydroxylgruppen enthält, die direkt an einen aromatischen Ring gebunden sind. Phenole reichen daher von sehr einfachen, niedrigmolekularen bis hin zu großen und komplexen Tanninen. Eine Möglichkeit diese strukturelle Vielfalt systematisch zu ordnen, bietet daher die in **Tabelle 3** dargestellte Klassifizierung hinsichtlich der Grundstruktur ihres Kohlenstoffgerüsts. [25; 24]

Polyphenole liegen in der Natur meist konjugiert mit verschiedenen Zuckern, wie D-Glucose, D-Galactose, D-Xylose, D-Rhamnose oder D-Arabinose, und organischen Säuren, wie beispielsweise D-Galacturonsäure oder D-Glucuronsäure, vor. [23; 24]

Für den Eisbergsalat als Vertreter der Varietät *Lactuca sativa* var. *capitata* sind vor allem die Verbindungsklassen Hydroxyzimtsäuren und Flavonoide von Bedeutung.

Tabelle 3: Einteilung der Polyphenole [25; 24]

Anzahl der Kohlenstoffatome	Grundstruktur des Kohlenstoffgerüsts	Phenolische Verbindungsklassen
6	C ₆	Einfache Phenole, Benzochinone
7	C ₆ -C ₁	Hydroxybenzoesäuren
8	C ₆ -C ₂	Hydroxyphenylelessigsäuren
9	C ₆ -C ₃	Hydroxyzimtsäuren, Cumarine, Chromone, Chromanone
10	C ₆ -C ₄	Naphtalenderivate
13	C ₆ -C ₁ -C ₆	Xanthone
14	C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbene, Anthracen
15	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoide
18	(C ₆ -C ₃) ₂	Lignane
30	(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	Biflavonoide
n	(C ₆ -C ₃) _n (C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Lignin, Kondensierte Tannine

3.2.1 Biosynthese der Polyphenole

Die Biosynthese von phenolischen Verbindungen beruht auf einem komplexen Mechanismus, der auf drei Stoffwechselwegen basiert. Über den Shikimisäureweg werden C₆-C₁ Verbindungen gebildet. Der anschließende Phenylpropanoidweg führt zu C₆-C₃ Verbindungen, welche dann als Precursoren für den Flavonoid-Bildungsweg von C₆-C₃-C₆ Verbindungen dienen. Die Synthese der Shikimisäure beginnt mit zwei Metaboliten des Glucosestoffwechsels, dem Phosphoenolpyruvat und dem Erythrose-4-Phosphat (**Abbildung 2**). Unter Abspaltung der Phosphatreste kondensieren diese Verbindungen zu Dehydrochinat. Nach anschließender Wasserabspaltung und Reduktion der Carbonylgruppe entsteht die namensgebende Shikimisäure. Durch folgende Phosphorylierung und Reaktion mit Phosphoenolpyruvat entsteht das 5'-Enolpyruvylshikimisäure-3-phosphat. Nach Dephosphorylierung bildet sich die Chorisminsäure, die zu zwei Folgeprodukten umgewandelt wird. Aus dem Folgeprodukt Anthranilsäure entsteht die Aminosäure Tryptophan. Nach Claisen-Umlagerung entsteht das zweite Folgeprodukt, die Prephensäure, und daraus die Arogensäure, die Vorläuferstruktur der Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin. [23; 26]

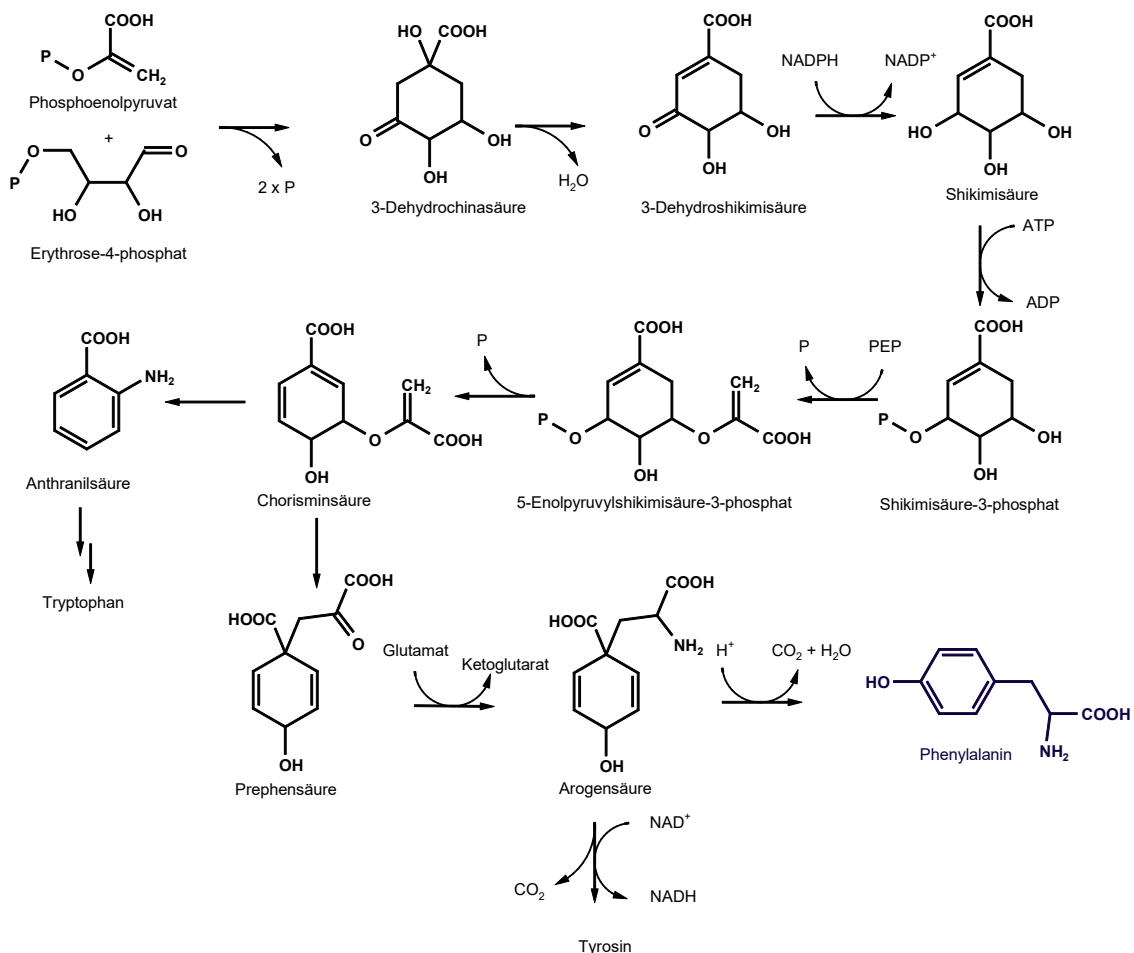


Abbildung 2: Bildung der Aminosäure Phenylalanin über den Shikimisäureweg

Phenylalanin ist die Ausgangsverbindung für die Synthese vieler wichtiger Naturstoffe. Für die Synthese polyphenolischer Produkte katalysiert zunächst das Enzym Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL) die Desaminierung des Phenylalanins. Durch Ausbildung einer Doppelbindung entsteht die *trans*-Zimtsäure, welche anschließend durch P₄₅₀-Monooxygenase zur *p*-Cumarsäure umgesetzt wird. Sie bildet die Grundlage für den folgenden Phenylpropanoidweg. [23; 26]

Zu den phenolischen Produkten des Phenylpropanoidwegs zählen die Polyphenolcarbonsäuren, die die Derivate der Hydroxybenzoesäure, der Phenylessigsäure und der Hydroxyzimtsäure umfassen. Diese Zuordnung erfolgt aufgrund ihres ähnlichen strukturellen Aufbaus aus einem Aromaten und einer Carboxylgruppe. Phenolcarbonsäuren entstehen ausgehend von der *p*-Cumarsäure durch weitere Hydroxylierung, die vorzugsweise an Position 3 und 5 stattfindet. Die gebildeten Hydroxylgruppen können außerdem durch Sauerstoff-Methyltransferasen methyliert werden, wodurch Hydroxyzimtsäuren, wie beispielsweise Kaffeesäure, Ferulasäure und Sinapinsäure, resultieren. Durch Abspaltung eines C₂- Fragmentes entstehen aus den Phenylpropanen die Benzoesäurederivate mit den bekannten Vertretern Salicylsäure und Gallussäure (**Abbildung 3**). [23; 26]

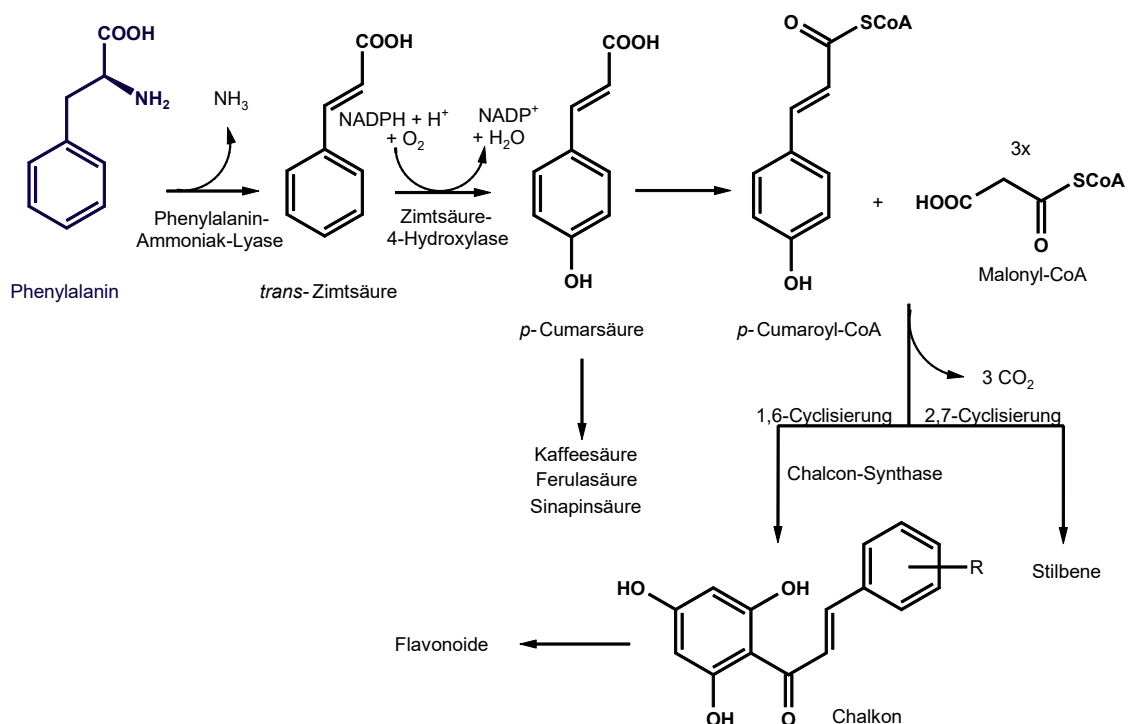


Abbildung 3: Bildung des Chalkons über den Phenylpropanoidweg

Über den Malonat-Weg erfolgt die Synthese der Flavonoide. Nach Aktivierung der *p*-Cumarsäure mittels Coenzym A, bindet sie auf enzymatischem Weg drei Einheiten Malonyl-CoA. Diese 3 Einheiten bilden den A-Ring des 2-Phenylchromans. Der B- und C-Ring entsteht aus der aktivierten *p*-Cumarsäure. Die daraus hervorgehende Zwischenstufe zyklisiert dann zu einem Chalkon, bei dem der C-Ring noch geöffnet vorliegt. Wird dieser geschlossen, entstehen die verschiedenen Strukturtypen der Flavonoide. [23; 27; 28]

3.2.2 Flavonoide

Die größte Gruppe der Polyphenole bilden die Flavonoide. Sie bieten eine sehr große Vielfalt und kommen im gesamten Pflanzenreich vor. [24] Abgeleitet vom lateinischen „flavus“ (= gelb) wurde unter Flavonoiden eine Gruppe von Pigmenten bezeichnet, die die Färbung von Früchten und Blättern hervorrufen. Mittlerweile umfasst der Begriff eine Vielzahl von Strukturklassen, die sich von einem C₆-C₃-C₆-Grundgerüsts ableiten lassen. Die meisten Flavonoide können auf das 2-Phenylchroman (Flavan) zurückgeführt werden. (**Abbildung 4**). Die Phenylgruppe kann aber auch an Position 3 (Isoflavonoide) oder 4 (Neoflavonoide) des Pyranrings gebunden sein. [24; 25; 29]

Zu den Hauptunterklassen zählen die Flavonole, Flavone, Flavan-3-ole, Antocyanidine, Flavanone und Isoflavone. Vergleichsweise kommen in der Natur geringere Mengen Flavonole (Dihydroflavonol), Flavan-3,4-diole, Chalkone, Dihydrochalkone und Aurone vor (**Abbildung 4**). [24; 28; 30]

Die genannten Grundstrukturen können zusätzlich vielfältig substituiert sein. Typische Substituenten sind Hydroxylgruppen, Methylgruppen oder Isopentyleinheiten an den Positionen 4', 5', 6' und 7'. Die meisten Flavonoide liegen außerdem als Glykoside vor. Zucker wie D-Glucose, D-Galactose, D-Xylose, D-Rhamnose oder D-Arabinose sind am Aglykon O-glykosidisch oder C-glykosidisch verknüpft. [24; 28]

Flavonoide sind aufgrund ihrer Eigenschaften für die menschliche Ernährung von großer Bedeutung. Sie besitzen die herausragende Funktion freie Radikale abzufangen oder nicht-radikalische reaktive Sauerstoffverbindungen zu inaktivieren. Diese antioxidative Kapazität kann die Peroxidation von Lipiden unterbinden und sorgt für die Regenerierung von α -Tocopherol durch Reduktion des α -Tocopheroxyl-Radikals. Außerdem können sie durch Komplexbildung mit Eisenionen (und anderen Schwermetallionen) die Bildung von Peroxyl-, Alkoxy- und Superoxid-Radikalen und damit die Fettautoxidation im Sinne der Fentonreaktion unterbinden. Aus diesen Gründen spielen Polyphenole eine wichtige Rolle bei der Minimierung des Krebsrisikos und kardiovaskulären Erkrankungen. [24; 30 bis 32]

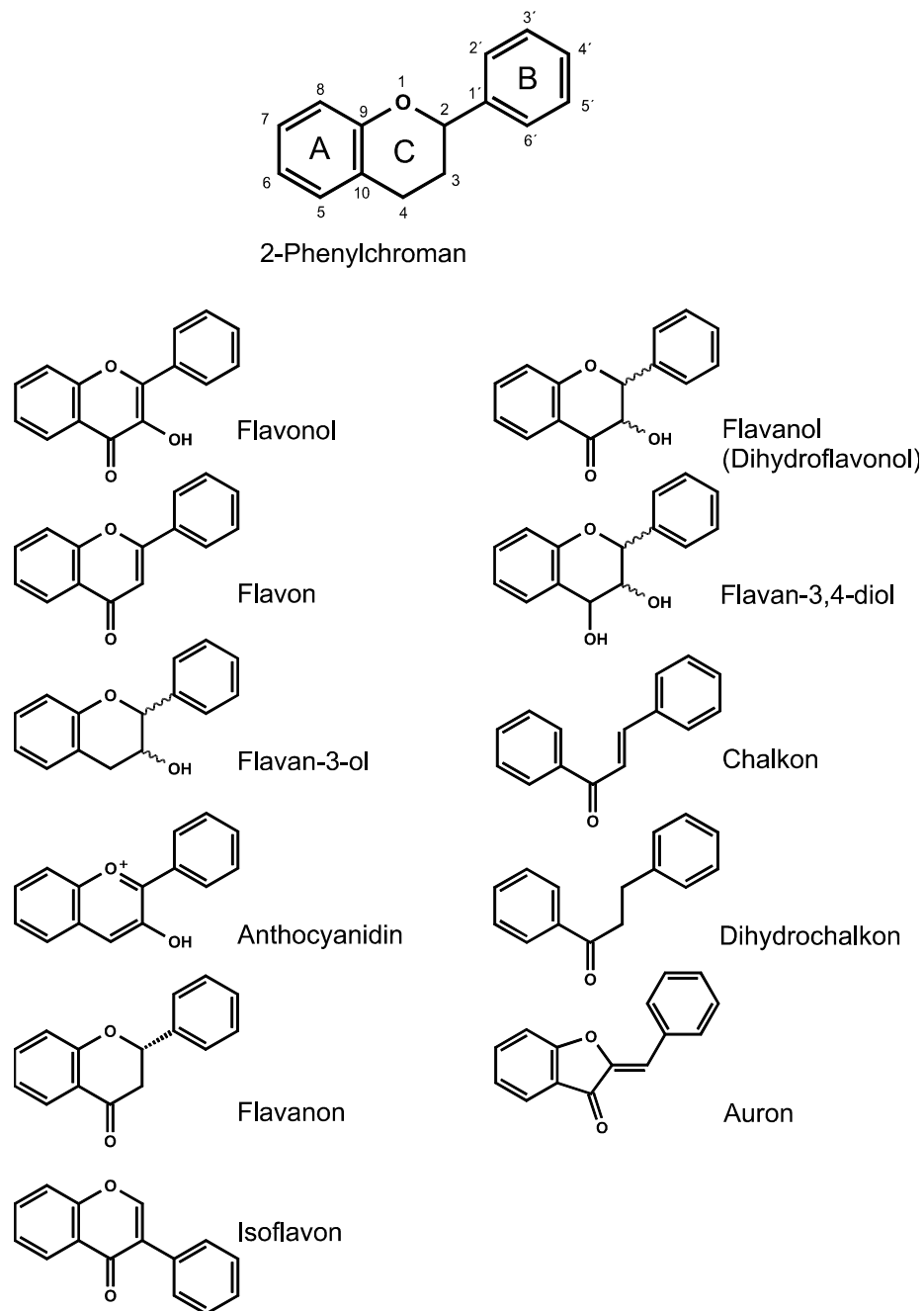


Abbildung 4: Strukturklassen der Flavonoide

3.2.3 Polyphenole im Eisbergsalat

Die Identifizierung von Polyphenolen in Obst und Gemüse steht bereits seit Mitte des zwanzigsten Jahrhunderts im Fokus der Forschung. Die ersten polyphenolischen Verbindungen in *Lactuca sativa* var. *capitata* wurden zunächst im Kopfsalat untersucht. Im Jahr 1966 wurden von JURICS die Hydroxycimtsäuren Kaffeesäure und Chlorogensäure erstmalig in Kopfsalat mittels papierchromatographischer Bestimmung

identifiziert. 1974 konnten WÖLDECKE UND HERRMANN die Flavonolglykoside Quercetin-3- β -D-glucuronide, Quercetin-3- β -D-glucoside und das Quercetin-3-(O-malonyl) - β -D-glucoside und das Flavonglycosid Luteolin-7- β -D-glucuronid nachgewiesen werden. [33]

1988 konnten KE und SALTVEIT im Eisbergsalat (+)-Catechin, Chlorogensäure (3-O-Caffeoylchinasäure), die 3,5- und 4,5- Dicaffeoylchinasäure (Isochlorogensäure) und als Vorläufer dieser Strukturen die Kaffeesäure identifizieren. Nach Ethylen-Begasung war außerdem (-)-Epicatechin nachweisbar. [34] Das Vorkommen dieser Verbindungen wurde 1997 durch TOMÁS-BARBERÁN und dessen Arbeitsgruppe bestätigt. [35] Im Jahr 2004 identifizierte LLORACH ET AL. die Chicoréesäure als die Haupthydroxyzimtsäure gefolgt von der Chlorogensäure. Weiterhin zeigte sich in den Untersuchungen, dass neben der Chlorogensäure (5-O-Caffeoylchinasäure) die Isomere Neochlorogensäure (3-O-Caffeoylchinasäure) und Kryptochlorogensäure (4-O-Caffeoylchinasäure) vorhanden sind. [36] In den folgenden Jahren wurden diese Verbindungen durch zahlreiche Studien belegt und die Liste der Hydroxyzimtsäurederivate mit den Verbindungen Kaffeemaleinsäure, Kaffeeweinsäure, Chicoréesäure und meso-Chicoréesäure erweitert. [37 bis 39]

Im Jahr 2000 lieferte DU PONT ET AL. einen bedeutenden Beitrag zur Aufklärung der flavonoiden Verbindungen im Eisbergsalat. Sie fanden heraus, dass im Eisbergsalat das Quercetin-3-O-(6''-malonyl)-glucosid mit 4,5 μ g/g FG von allen Quercetinderivaten überwiegt. Außerdem konnten die Verbindungen Quercetin-3-O-glucosid mit 0,6 μ g/g FG, Quercetin-3-O-glucuronid mit 2,7 μ g/g FG und Luteolin-7-O-glucuronid mit 1,0 μ g/g FG quantifiziert werden. Ferner wurden Quercetin-3-O-galactosid, Quercetin-3-O-rhamnosid und das Quercetin-3-O-rutinosid (Rutin, Quercetin-3-O-rhamnosyl-glucosid) identifiziert. [20]

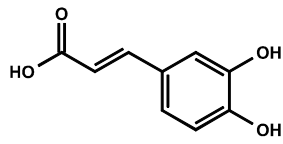
Allerdings haben mehrere Studien gezeigt, dass die Fülle an phenolische Verbindungen in Salatgeweben durch genetische Einflüsse (Varietäten, Sorten), agronomische Einflüsse (Bodenbeschaffenheit, Düngung oder Pflanzenschutzstrategien) und Umweltfaktoren beeinflusst werden kann. [20; 40] Besonders die Verarbeitungstechniken zeigen einen deutlichen Einfluss auf den Gehalt verschiedener Salatinhaltsstoffe. So schwankt beispielsweise der Polyphenolgehalt von 6 – 24 mg/g TM in verarbeiteten Eisbergsalat. [41]

Mit der **Publikation A** konnten wir im frischen Eisbergsalat die Hydroxyzimtsäurederivate Kaffeesäure, Chlorogensäure, Kaffeemaleinsäure, Chicoréesäure und Isochlorogensäure identifizieren und damit vorangegangene Studien bestätigen. Auch das Vorkommen der Flavon- und Flavonolglykoside Luteolin-7-O-glucuronid,

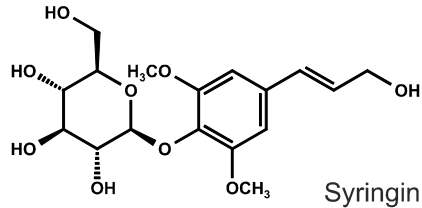
Quercetin-3-O-glucuronid, Quercetin-3-O-galactosid, Quercetin-3-O-glucosid und Quercetin-3-O-(6"-malonyl)-glucosid konnte belegt werden. Darüber hinaus wurde erstmalig ein β -O-Glucosid des Sinapylalkohols, das Syringin, isoliert und identifiziert. [42]

Im selben Jahr wurde in der Studie von ABU-REIDAH ET. AL ein metabolisches Profil des Eisbergsalates erstellt. Im Wasser/Methanol-Extrakt wurden 134 Pflanzeninhaltsstoffe aus verschiedenen wasserlöslichen Stoffgruppen (wie Aminosäuren, Peptiden, Nukleotiden, Alkaloiden, phenolischen Verbindungen und Sesquiterpenlactonen) mit modernster chromatographischer Technik (RP-UHPLC ESI-QTOF-MS) identifiziert. Es wurden zum Teil bekannte Strukturen bestätigt, aber auch zahlreiche neuartige Verbindungen identifiziert. Darunter waren 7 Hydroxybenzoesäuren, 3 Hydroxyphenylelessigsäuren und 21 Hydroxyzimtsäuren. Die bekannten Flavonoide, Flavone (Luteolinderivate) und Flavonole (Quercetinderivate) wurden erweitert und durch Hesperidin und Naringenin um eine weitere flavonoide Strukturgruppe, den Flavanonen, ergänzt. Insgesamt wurden 15 Verbindungen gefunden, wobei aber ein Teil der Strukturen nur durch massenspektroskopische Daten charakterisiert wurden. Die bereits 1989 durch KE UND SALTVEIT identifizierten Flavan-3-ole (Catechin und Epicatechin) konnten allerdings nicht nachgewiesen werden. [43; 34]

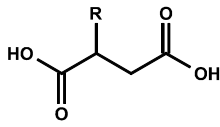
In Summe tragen alle Studien zu einer umfangreichen Sammlung an phenolischen Verbindungen im Eisbergsalat bei. Die folgenden **Abbildungen 5** und **6** geben eine Übersicht der bekannten Strukturen wieder.



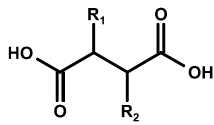
Kaffeesäure



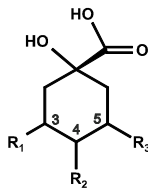
Syringin



Verbindung	R ₁
Maleinsäure	H
Kaffeoylmaleinsäure	kaffeoyl

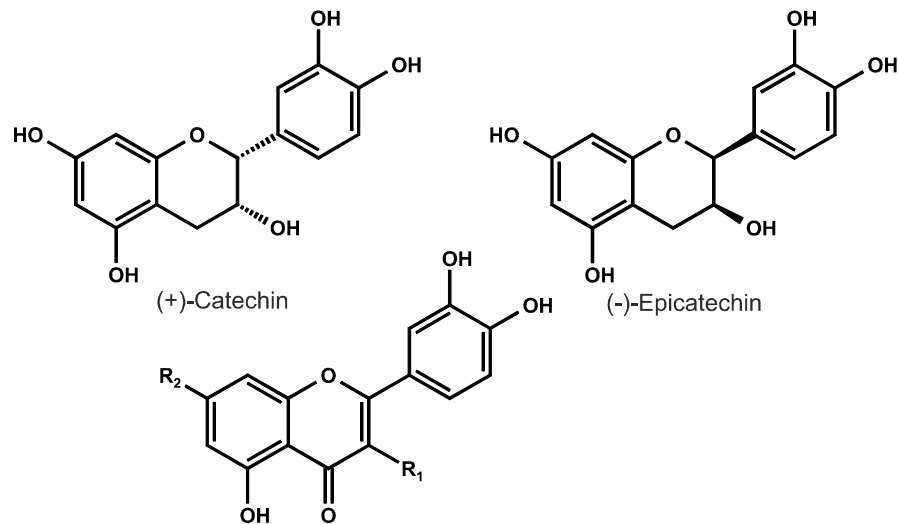


Verbindung	R ₁	R ₂
Weinsäure	OH	OH
Caftarinsäure (Kaffeeweinsäure)	kaffeoyl	OH
Chicoréesäure (Dikaffeoylweinsäure)	kaffeoyl	kaffeoyl

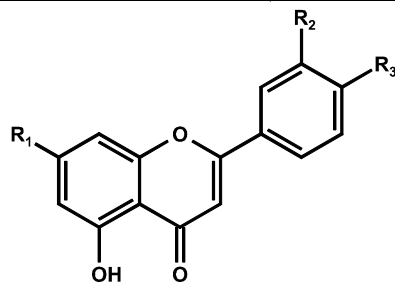


Verbindung	R ₁	R ₂	R ₃
Chinasäure	OH	OH	OH
Chlorogensäure (3-O-Kaffeoylchinasäure)	kaffeoyl	OH	OH
4-O-Kaffeoylchinasäure	OH	kaffeoyl	OH
Isochlorogensäure A (3,5-O-Dikaffeoylchinasäure)	kaffeoyl	OH	kaffeoyl
Isochlorogensäure B (3,4-O-Dikaffeoylchinasäure)	kaffeoyl	kaffeoyl	OH
Isochlorogensäure C (3,5-O-Dikaffeoylchinasäure)	OH	kaffeoyl	kaffeoyl

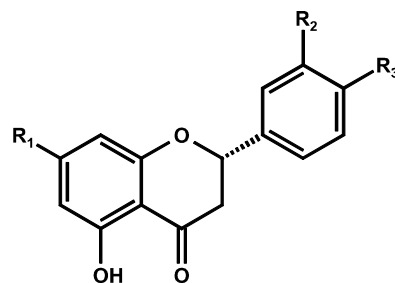
Abbildung 5: Hydroxyzimtsäurederivate im Eisbergsalat



Verbindung	R ₁	R ₂
Quercetin-3-O-glucuronid	O-glucuronid	OH
Quercetin-3-O-galactosid	O-galactosid	OH
Quercetin-3-O-glucosid	O-glucosid	OH
Quercetin-3-O-(6''-malonyl)-glucosid	O-(6''-malonyl)-glucosid	OH
Quercetin-3-O-rhamnosid	O-rhamnosid	OH
Quercetin-3-O-rutinosid	O-rutinosid	OH
Quercetin-3-O-(6''-malonyl)-glucosid-7-O-glucosid	O-(6''-malonyl)-glucosid	O-glucosid
Quercetin-3-O-(6''-malonyl)-glucosid-7-O-glucuronid	O-(6''-malonyl)-glucosid	O-glucuronid



Verbindung	R ₁	R ₂	R ₃
Luteolin	OH	OH	OH
Luteolin-7-O-glucosid	O-glucosid	OH	OH
Luteolin-7-O-glucuronid	O-glucuronid	OH	OH
Linarin (Acacetin-7-O-rutinosid)	O-rutinosid	H	OCH ₃



Verbindung	R ₁	R ₂	R ₃
Hesperidin	O-rutinosid	OH	OCH ₃
Naringin (Naringenin-7-O-neohesperidosid)	O-neohesperidosid	H	OH

Abbildung 6: Flavonoide im Eisbergsalat

3.3 Sesquiterpenlactone

Die Bezeichnung Lactuca stammt aus dem römischen Reich und benennt das Sekret der *Cichorioideae*, den Milchsaft, der beim Anschneiden des Salates, besonders aus dem Strunk austritt und leicht bitter schmeckt. [11] Für diesen bitteren Geschmack werden die Sesquiterpenlactone verantwortlich gemacht. [44]

Strukturell gehören die Sesquiterpenlactone zu den Terpenen, welche als Oligomere des Kohlenwasserstoffes Isopren aufzufassen sind. Sie bestehen aus C₅-Isopentyl- und Isopreneinheiten, die zur Klasse der Hemiterpene gezählt werden. Je nach Vorhandensein der genannten Basiseinheiten werden die Polyterpene folgendermaßen eingeteilt: Monoterpene (C₁₀, 2 Isopreneinheiten), Sesquiterpene (C₁₅, 3 Isopreneinheiten), Diterpene (C₂₀, 4 Isopreneinheiten), Sesterpene (C₂₅, 5 Isopreneinheiten), Triterpene (C₃₀, 6 Isopreneinheiten) und Tetraterpene (C₄₀, 6 Isopreneinheiten). Typische Vertreter sind in **Tabelle 4** genannt. Mit mehr als 200 verschiedenen natürlich vorkommenden Kohlenstoffgerüsten zählen die Sesquiterpene zur größten Gruppe der isoprenoiden Naturstoffe. [23; 26; 45]

Tabelle 4: Einteilung der Isoprenoide [23; 26; 45]

Anzahl der Kohlenstoffatome	Klasse	Beispiele
5	Hemiterpen	Isopren, Prenol
10	Terpen	Linalool, Limonen, Menthol
15	Sesquiterpene	Farnesol, Bisabolen, Lactucin
20	Diterpene	Retinol, Taxol
25	Sesterpene	Ophiobolin, Ircinin
30	Triterpene	Squalen, Lanosterin
40	Tetraterpene	Lycopin, β -Carotin
n	Hochmolekulare Polyprene	Naturkautschuk, Guttapercha

Sesquiterpene mit einer Lactonfunktion werden als Sesquiterpenlactone bezeichnet. Von den über 4000 bekannten Strukturen dieser Gruppe ist eine Vielzahl in der Familie der *Asteracea* zu finden. [46]

Die Vielfältigkeit der bisher entdeckten chemischen Strukturen wird von verschiedenen biologischen Aktivitäten begleitet. Sie weisen unter anderem zytotoxische, anti-tumoröse, antibakterielle und antimykotische Eigenschaften auf. [47] In einer Studie von BISCHOFF ET AL. zeigten sich außerdem Lactucin und Lactucopikrin als potente Wirkstoffe gegen Malaria. [48]

In der Pflanze werden diese sekundären Pflanzenmetabolite häufig als Abwehrstoffe gegen Pflanzenfresser (Phytotoxine) gebildet. Verschiedene Sesquiterpenlactone sind dafür bekannt, dass sie für Parasiten, Insekten, Tiere und Menschen toxisch sind. Vor

allem Sesquiterpenlactone mit einem α -Methylen- γ -butyrolacton-Rest besitzen diese Eigenschaft, da kovalente Bindungen mit Thiol-enhaltenden Enzymen gebildet werden. Beim Menschen äußert sich diese Toxizität in einer allergischen Kontaktdermatitis. [47; 49]

3.3.1 Biosynthese der Sesquiterpenlactone

Die Biosynthese der Sesquiterpenlactone beginnt mit dem Mevalonatweg. Ein Stoffwechselweg bei dem ausgehend von Acetyl-CoA die aktiven Isopreneinheiten Isopentenylpyrophosphat (IPP) und Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) entstehen. In einigen Pflanzen werden diese Stoffwechselprodukte alternativ über den Methylerythritolphosphatweg gebildet. IPP und DMAPP werden durch die anschließende Kopf-zu-Schwanz-Kondensation zu Geranylpyrophosphat (GPP), einem wichtigen Ausgangsprodukt für die Bildung von Monoterpenen, verknüpft. Durch eine weitere Kopf-zu-Schwanz-Kondensation mit IPP entsteht Farnesylpyrophosphat (FPP). Diese Verbindung besitzt ein C15-Grundgerüst und ist der Precursor für lineare und cyclische Sesquiterpene und Sesquiterpenlactone. [50]

Nach nukleophilen Angriff eines Elektrons aus der Doppelbindung an das C-Atom des Pyrophosphatrestes (PP) kommt es zur Cyclisierung des FPP zu (+)-Germacren A. Weitere Oxidationsschritte, basierend auf enzymatischen Reaktionen, führen zu Germacrensäure und anschließend durch Hydroxylierung an Position C-6 und nachfolgender Lactonbildung zu (+)-Costunolid. Es wird angenommen, dass die Biosynthese der Sesquiterpenlactone sich hier verzweigt und durch verschiedene Cyclisierungsreaktionen die Bildung der Eudesmanolide, der Germacranolide und Guaianolide beginnt. (**Abbildung 7**). [51; 50]

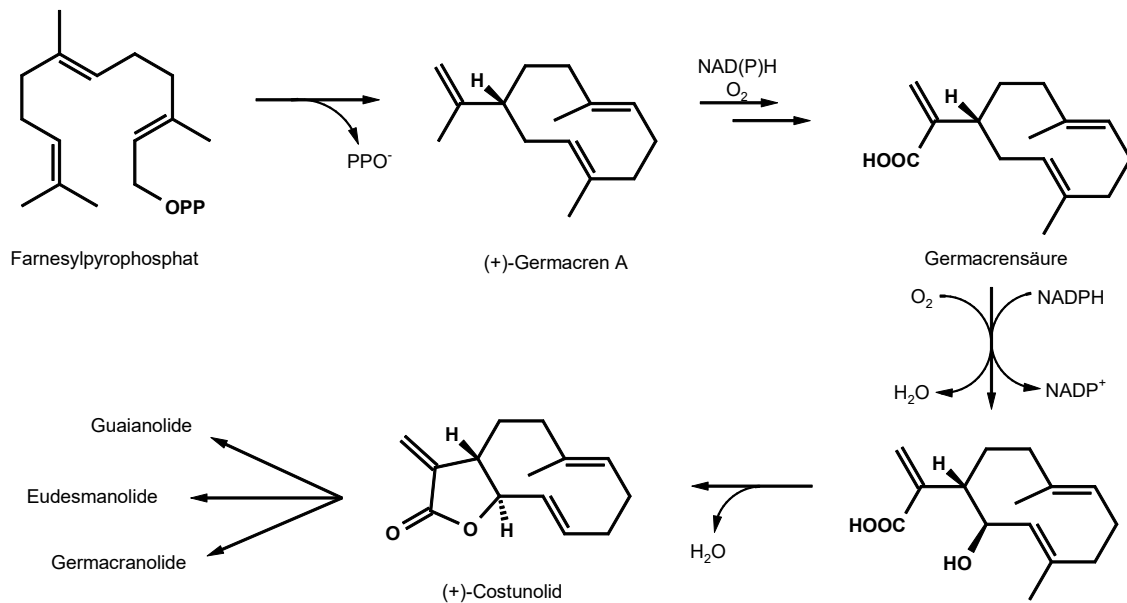


Abbildung 7: Biosynthese der Sesquiterpenlactone [51]

Für den Tribus *Lactuceae* sind ungefähr 360 verschiedenen Sesquiterpenlactone bekannt. Sie werden in 30 Unterklassen eingeteilt, wovon drei wichtig für die *Lactuceae* sind. Anhand des Kohlenstoffgrundgerüsts werden die Guaianolide, die Eudesmanolide und die Germacranolide unterschieden. [52]

Die Gruppe der Guaianolide ist die facettenreichste Klasse der Sesquiterpenlactone und umfasst die größte Anzahl von Verbindungen. Die Gruppe kann noch einmal in drei Untergruppen unterteilt werden: der Costuslacton-Typ, der Lactucin-Typ und der Hieracin-Typ. Zu den Germacranoliden zählt die Verbindung (+)-Costunolid. Sie ist Ausgangspunkt in der Biosynthese der Sesquiterpenlactone und nimmt damit einen hohen Stellenwert ein. Zur Gruppe der Eudesmanolide zählen nur wenige Verbindungen und bilden damit die kleinste Klasse der drei Gruppen der Sesquiterpenlactone bei den *Lactuceae*. [52]

3.3.2 Sesquiterpenlactone im Eisbergsalat

Der bittere Geschmack der *Lactuca*-Arten wird hauptsächlich auf unterschiedliche Mengen an Sesquiterpenlactonen zurückgeführt. [53] Von den 360 bekannten Strukturen sind 105 in der Gattung *Lactuca* zu finden. Davon sind 78,1 % Guaianolide, 20,0 % Germacranolide und 1,9 % Eudesmanolide. [52] Für die Art *Lactuca Sativa* L. sind die Guaianolide und Germacranolide von Bedeutung. Jedoch wurden zu den Sesquiterpenlactonen speziell im Eisbergsalat bisher nur wenige Studien durchgeführt. **Abbildung 8 und 9** zeigen deshalb eine Übersicht der bekannten Strukturen in der Varietät *Lactuca Sativa* var. *capitata*.

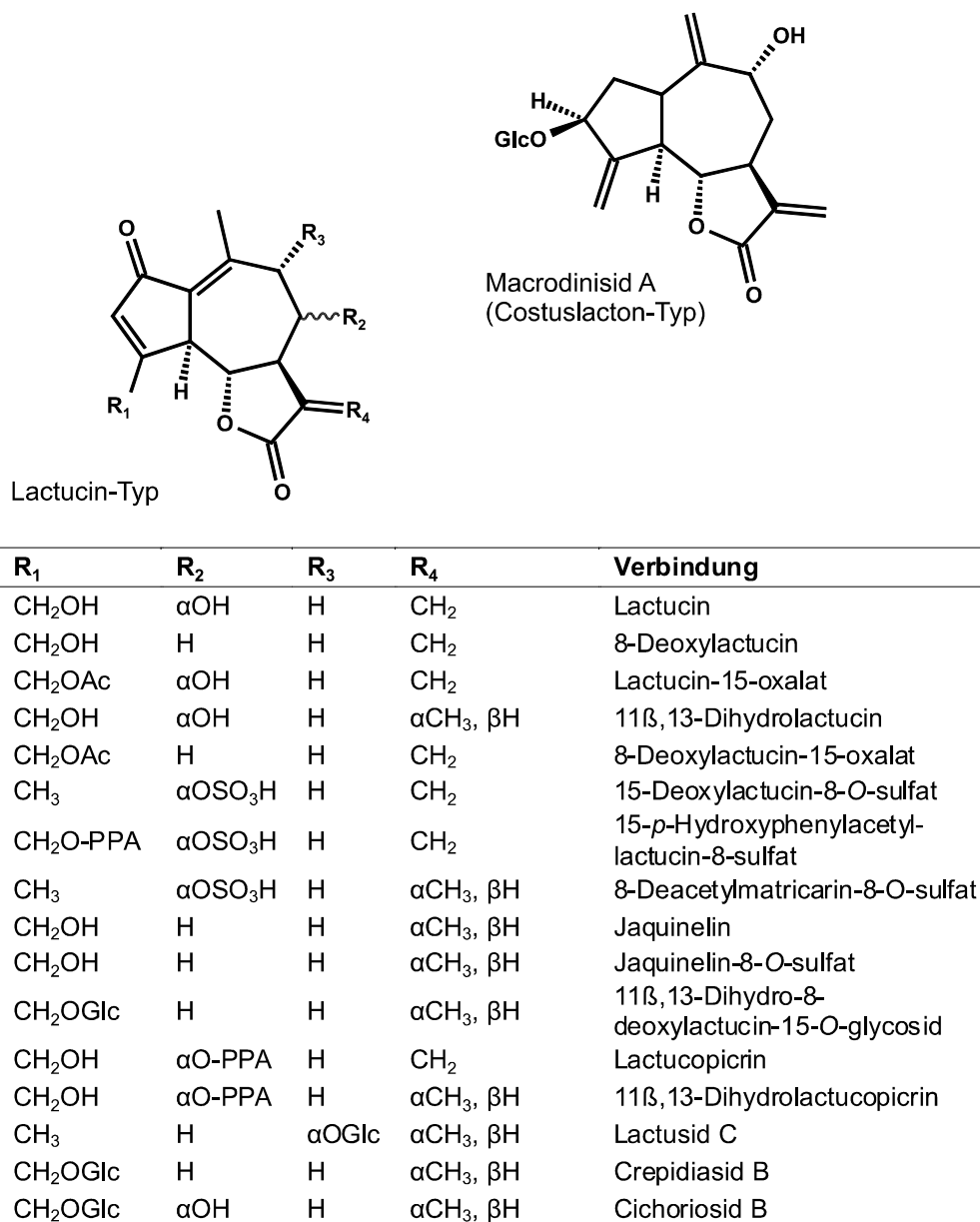


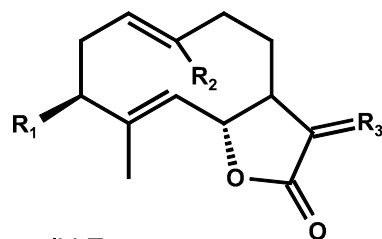
Abbildung 8: Vertreter der Guaianolide in *Lactuca Sativa* var. *capitata*

Bereits 1984 gelang es PYREK die Guaianolide Lactucin, 8-Desoxylactucin, Lactucopicrin und Jaquinelin in *Cichorium intybus* zu verifizieren. [54] Im Kopfsalat wurden 1986 die Verbindungen Lactucin, 11β,13-Dihydrolactucin, Lactucopicrin und das Melampolid 3β,14-Dihydroxy-11β,13-dihydrocostunolid identifiziert. [55]

Fast 20 Jahre später konnten FLICK ET AL. Lactucin und Lactucopicrin im Eisbergsalat nachweisen. [22] SESSA ET AL. lieferte neue Ergebnisse bezüglich des Vorkommens von Bitterstoffen in Kopfsalaten und Chicoree. Sie identifizierten in den untersuchten *Lactuca*-Spezies das Jaquinelinglycosid (11,13-Dihydro-8-deoxylactucin-15-glycosid), die Oxalate: Lactucin-15-oxalat, Lactucopicrin-15-oxalat und 8-Desoxylactucin-15-oxalat und die Sulfate: 15-Deoxylactucin-8-sulfat, 8-Deoxylactucin-15-sulfat und 15-(4-hydroxyphenylacetyl)-lactucin-8-sulfat. Sie zeigten außerdem, dass Oxalate

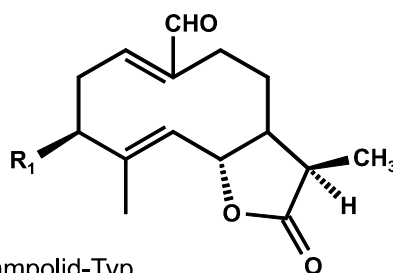
repräsentativ für die Spezies *Cichorium* und *Lactuca* sind, während Sulfate für *Lactuca*-Spezies spezifisch sind. [44]

2009 erweiterte MICHALSKA ET AL. die Liste der Sesquiterpenlactone um die Verbindungen 8-Deoxylactucin, Jaquinelin, Crepidiasid B und Lactusid A. [56]



Costunolid-Typ

R ₁	R ₂	R ₃	Verbindung
H	CH ₃	CH ₂	(+)-Costunolid
OH	CH ₂ OH	αCH ₃ ,βH	3β,14-Dihydroxy-11β,13-dihydrocostunolid



Melampolid-Typ

R ₁	Verbindung
OH	Lactulid A
OGlc	Lactusid A

Abbildung 9: Vertreter der Germacranolide in *Lactuca Sativa* var. *capitata*

BEHARAV ET AL. führte eine Studie zur Verteilung von Bitterstoffen in *Lactuca*-Spezies durch. Sie entdeckten, dass die Bitterstoffe in der Pflanze nicht homogen verteilt sind. Während im milchig weißen Latex des Salatkopfes hohe Konzentrationen auftraten, wurden in den Salatblättern niedrige Konzentrationen festgestellt. [57] Neben der Lokalisierung in der Pflanze ist die Bandbreite der Sesquiterpenlactone abhängig von der Herkunft der Pflanze und schlussfolgernd daraus auch von den Wachstumsbedingungen. Das Lactusid C beispielsweise konnte nur in japanischen Pflanzen identifiziert werden. [52]

In einer 2013 durchgeführten Studie haben ABU-REIDAH ET AL. neben einigen bekannten Sesquiterpenlactonen weitere Sulfat- und Aminosäurederivate im Eisbergsalat identifiziert. Anhand ihrer MS/MS-Experimente konnte jedoch nicht

unterschieden werden, an welcher Position die Sulfat- und Aminosäureeinheiten mit dem Sesquiterpenlacton-Grundgerüst verknüpft sind. [43]

2016 war es uns möglich aus dem *n*-Butanol-Extrakt des Eisbergsalates drei Sesquiterpenlactone zu isolieren. Alle Verbindungen wurden durch MLCCC (multilayer counter-current chromatography), gefolgt von präparativer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie isoliert und mittels spektroskopischer Methoden einschließlich NMR- und Massenspektrometrietechniken eindeutig verifiziert. Zum ersten Mal wurde 11 β -13-Dihydrolactucin-8-O-sulfat (Jaquinelin-8-O-sulfat) strukturell aufgeklärt und in Pflanzen identifiziert. Darüber hinaus wurden die Sesquiterpenlactone Cichoriosid B und 8-Desacetylmatricarin-8-O-sulfat als neue Bestandteile in Eisbergsalat identifiziert (**Publikation C**). [58]

Das farbige Guaianolid Lettucenin A wird in der Pflanze als antimikrobieller Abwehrmechanismus gebildet. 1985 berichteten TAKASUGI ET AL. von isoliertem Lettucenin A aus *Lactuca sativa* var. *capitata* nach Inkubation mit *Pseudomonas chicorii*. Gleichzeitig konnte das farblose (+)-Costunolid nachgewiesen werden. Beide Verbindungen konnten jedoch nicht im frischen Salat identifiziert werden und wurden daraus folgend als Phytoalexine bezeichnet. [59]

In der Studie aus 2014 konnten wir weitere Derivate von Lettucenin A isolieren und strukturell aufklären. Durch die mechanische Verletzung von Salatproben wurde die Synthese induziert und mit der Bräunung von Eisbergsalat in Verbindung gesetzt (**s. Abschnitt 4.4 und Publikation B**). [60]

Sesquiterpenlactone werden maßgeblich für den bitteren Geschmack in *Lactuca*- und *Cichorium*-Arten verantwortlich gemacht. Sie zeigen eine hohe Affinität zum Bittergeschmacksrezeptor hTAS2R46 der menschlichen Zunge. Stimuliert wird dieser durch den γ -Lactonring sowie einen δ -Lactonring gebunden an ein zyklisches System. [61]

Geschmacksverdünnungsanalysen des *n*-Butanol-Extraktes und der isolierten Sesquiterpenlactone ergaben einen eindeutigen Einfluss dieser Verbindungen auf die Bitterkeit von Eisbergsalat. Die Bitterschwellenwerte der neuen Verbindungen betragen 30 ppm für Jaquinelin-8-O-sulfat, 25 ppm für Cichoriosid B und 50 ppm für 8-Deacetylmatricarin-8-O-sulfat. Der Bitterschwellenwert für Lettucenin A wurde auf 15 ppm festgelegt (**Publikation C**). [58]

4 Die enzymatische Bräunung

Das Qualitätsmerkmal Aussehen von pflanzlichem Material wird im Wesentlichen durch Carotinoide, Anthocyane und durch die enzymatische Bräunung beeinflusst. Infolge von unerwünschten braunen Pigmenten an Druck- und Schnittflächen wirken sich Verfärbungen negativ auf das Aussehen und somit auf die Qualität von pflanzlichen Lebensmitteln aus. Neben den Veränderungen der Farbe kommt es zu Texturveränderungen, sowie zu Geschmacks- und Nährwertverlusten. Besonders empfindlich gegenüber diesen Veränderungen sind unter anderem Gemüse wie Salat, Kartoffeln und Avocados, aber auch Früchte wie Äpfel und Bananen (**Abbildung 10**).

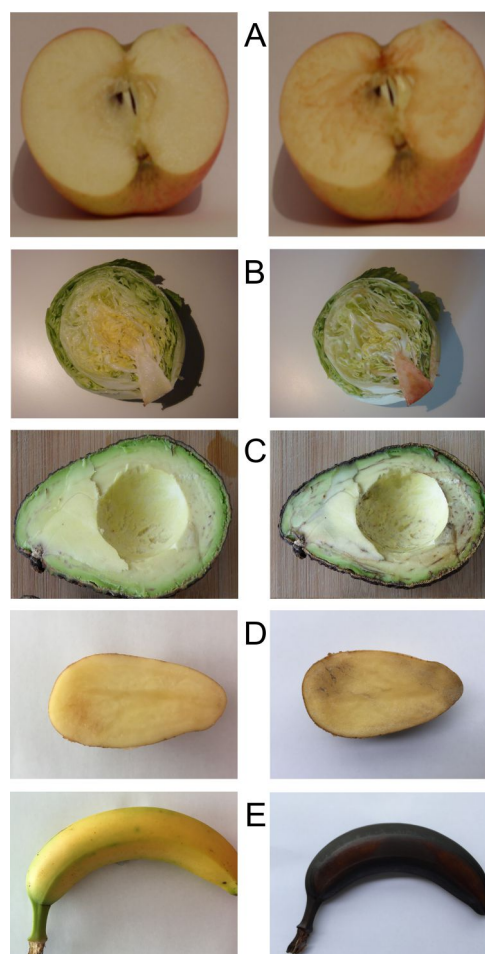


Abbildung 10: Ungebräunte (links) und gebräunte (rechts) Lebensmittel im Vergleich (A, Apfel; B, Eisbergsalat; C, Avocado; D, Kartoffel; E, Banane)

Die Probleme der Wertminderung sind schon seit langer Zeit bekannt, haben jedoch erst in den letzten Jahren wieder mehr an Bedeutung gewonnen. Durch die zunehmende Verwendung von mechanischen Geräten während der Ernte, der Verarbeitung und des Verpackens von Obst und Gemüse, und die zunehmende

Vermarktung von verzehrfertigen Pflanzenprodukten besteht ein großes Risiko für die Bildung von braunen Pigmenten. [62] Die enzymatische Bräunung führt jedoch nicht nur zu Qualitätsverlusten. Sie wird gezielt bei der Herstellung von Schwarzem Tee (**Abbildung 11**), Kakao oder Tabak genutzt. Dabei entstehen während der Fermentation die typische Farbe und das unverwechselbare Aroma. [63]



Abbildung 11: Nicht fermentierter (links) und fermentierter (rechts) Tee (A) und Rooibos (B) im Vergleich

Unter dem Begriff „enzymatische Bräunung“ ist im klassischen Sinn die Oxidation phenolischer Verbindungen durch oxidativ wirksame Enzyme zu verstehen. In der Folge werden braune bis schwarze Polymere, die so genannten Melanine, gebildet. Diese werden auch als Tannin-ähnliche Polymere bezeichnet, wenn sie nicht biogen, sondern erst durch z.B. die Verarbeitung induziert werden. Melanine besitzen für die Pflanze evolutionsgeschichtlich sehr nützliche Vorteile. In diesem Zusammenhang wurde 1940 der Begriff „Phytoalexine“ geprägt, nachdem die Resistenz verschiedener Kartoffelsorten gegen bestimmte Krankheitserreger entdeckt wurde. [64] Heute werden Phytoalexine u.a. als „[...] antimikrobiell wirksame Substanzen, die der Pflanze zur Abwehr von Pathogenen dienen“ definiert. [65] Stress in Form von Schadorganismen, wie phytopathogenen Pilzen, Bakterien, Viren und Fraßfeinden, im einfachsten Fall aber auch ausgelöst durch eine mechanische Verletzung führen in der Pflanze zur Produktion von speziellen, meist niedermolekularen Sekundärmetaboliten. Diese besitzen nativ, oder nach enzymatischen und/oder nicht-enzymatischen Folgereaktionen z.B. antimikrobielle oder adstringierende Eigenschaften zur Bekämpfung potentieller Infektionen oder zur Abschreckung von Fraßfeinden. Dazu werden die Strukturen meist in den betroffenen Regionen der Pflanze akkumuliert. Die Bildung von Phytoalexinen auslösenden Faktoren werden auch als Elicitoren bezeichnet. [66]

Phenolische Verbindungen liegen in den Vakuolen von Pflanzenzellen vor, wohingegen die für die Folgereaktionen benötigten Enzyme in den Plastiden, Chloroplasten oder Mitochondrien lokalisiert sind. Damit sind Enzyme und Substrate räumlich voneinander getrennt und können in intakten Zellen nicht miteinander reagieren. Erst durch Zerstörung der Membranen und folglich durch Aufhebung der Kompartimentierung innerhalb des Zellgewebes kommt es zur Zunahme der Enzymaktivität und die Bräunungsreaktion setzt ein. Eine Dekompartimentierung tritt als Folge von Verarbeitungsprozessen, wie Schneiden oder Trocknen, aber auch durch Quetschungen oder Welken auf. [5]

Nach der Zerstörung des Pflanzengewebes beginnt eine komplexe Kaskade unterschiedlicher Reaktionen. Zunächst wird die Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL), das Schlüsselenzym der Biosynthese phenolischer Strukturen, aktiviert. Sie katalysiert die Bildung der Phenole, die anschließend durch weitere Enzyme zu Chinonen oxidiert werden, welche spontan nicht-enzymatisch zu braunen Pigmenten polymerisieren. [67; 67] Die Hauptenzyme der enzymatischen Bräunung sind die Polyphenoloxidasen (PPOs). Sie wurden 1865 durch SCHOENBEIN in Pilzen entdeckt und stellen eine Gruppe kupferhaltiger Enzyme dar, die in Abhängigkeit des Ursprungs, der Aktivität und der Spezifität als Tyrosinase, Cresolase, Catecholase oder Diphenolase bezeichnet werden. In höheren Pflanzen sind sie in den Plastiden oder in den Chloroplasten lokalisiert, wo sie entweder gebunden oder frei vorliegen. Die Enzymaktivität ist keineswegs pflanzenspezifisch, sondern kommt auch in Tieren und Mikroorganismen vor. [35]

*Die PPOs katalysieren zwei verschiedene Reaktionen. Zum einen sind sie an der Hydroxylierung von Monophenolen zu o-Diphenolen (Monophenoloxidase- oder Cresolase-Aktivität) und zum anderen an der Oxidation von o-Diphenolen zu o-Chinonen (Diphenoloxidase- oder Catecholase-Aktivität) beteiligt (**Abbildung 12, A und B**). Als Cosubstrat benötigen beide Reaktionen molekularen Sauerstoff. Im Allgemeinen werden einfache phenolische Verbindungen, wie Kaffeesäure oder Chlorogensäure, vom aktiven Zentrum der PPO-Enzymgruppe schnell umgesetzt. Flavonoide wie die Anthocyane werden dagegen nur langsam oder überhaupt nicht oxidiert. Dies gilt jedoch nicht für die Catechine, die als Flavan-3-ole ebenfalls der Flavonoid-Klasse zuzuordnen sind. [30]*

Neben den PPOs wird die Umsetzung der phenolischen Substrate auch durch andere Oxidoreduktasen katalysiert, die als Laccasen und Peroxidasen bekannt sind. Im Vergleich zu PPOs können Laccasen nur o-Diphenole umsetzen, da sie die Hydroxylierung von Monophenolen nicht katalysieren. [30]

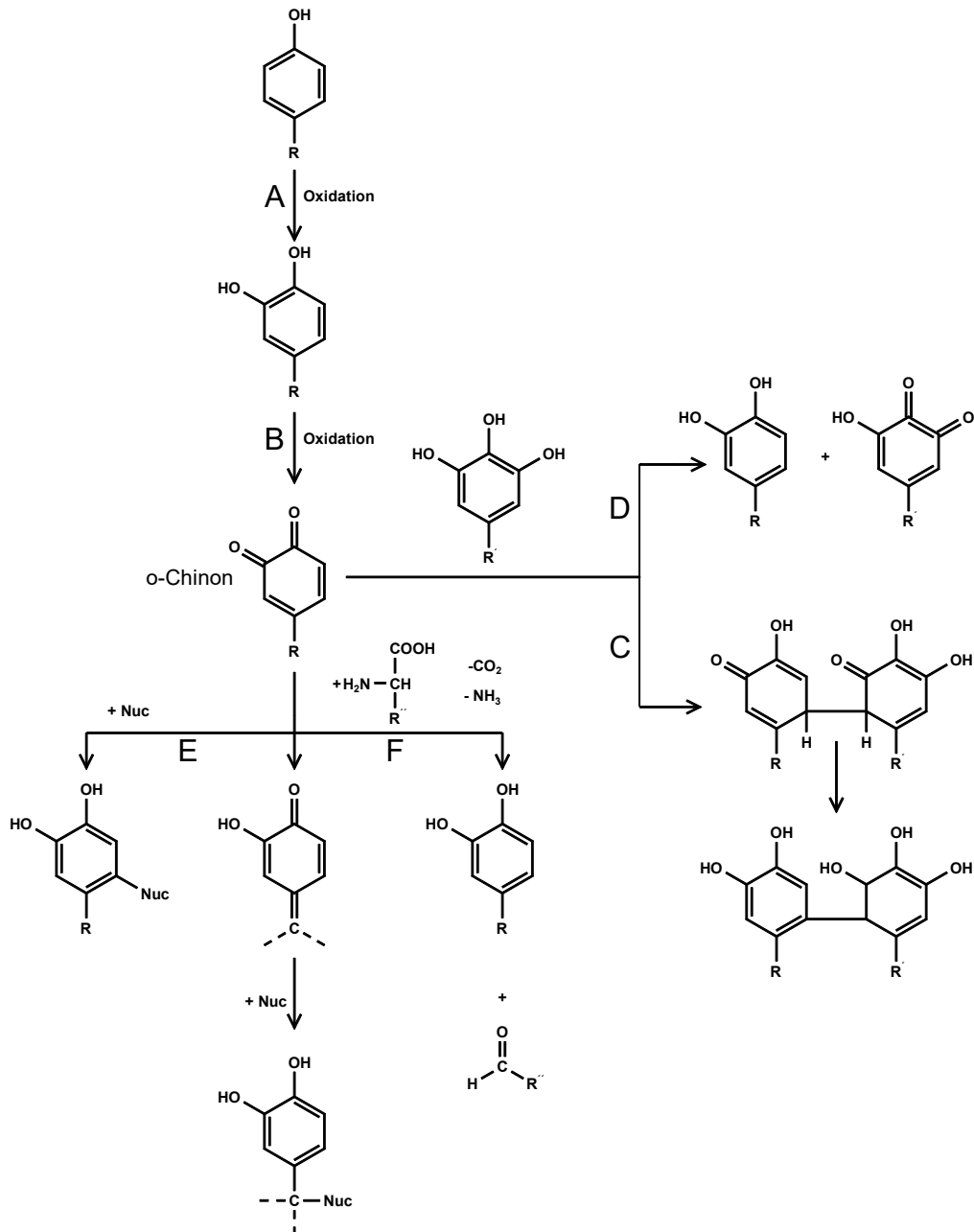


Abbildung 12: Reaktionsmechanismen der enzymatischen Bräunung: Initialer Schritt (A+B) und Folgereaktionen (C-F)

Die Enzyme kommen in vielen phytopathogenen Pilzen und in verschiedenen höheren Pflanzen vor. Mit Ausnahme von Pfirsichen und Aprikosen sind sie in Obst und Gemüse nicht vertreten. Die Peroxidasen (POD) sind dagegen im Pflanzenreich weit verbreitet. Sie oxidieren in Gegenwart von Wasserstoffperoxid sowohl Mono- als auch Diphenole und führen somit ebenfalls zur Bildung von Melaninen. Aktuelle Untersuchungsergebnisse belegen, dass die Anwesenheit von PODs die Umsetzung der phenolischen Verbindungen durch PPOs erleichtert, da PODs das erzeugte *o*-Chinon der PPOs als Peroxidsubstrat für die Reaktionskatalyse nutzen. Dieser synergistische Mechanismus ist bisher aber nicht vollständig verstanden. [30]

Nach dem initialen Schritt der enzymatischen Oxidation sind die hoch reaktiven o-Chinone in der Lage, sowohl mit phenolischen als auch mit nicht-phenolischen Verbindungen weitere meist nicht-enzymatische Reaktionen einzugehen. Abhängig von den phenolischen Vorläuferstrukturen und der chemischen Umgebung entstehen so Polymere in den unterschiedlichsten Farben und Farbtintensitäten. Die Reaktion zwischen zwei Phenolen unter Ausbildung einer stabilen Biphenylbindung wird als oxidative Kupplung bezeichnet. Dabei greift zunächst das elektronenreiche Hydrochinon als die reduzierte Form das elektronenarme o-Chinon nucleophil an. Abstraktion von Protonen führt dann zur Rearomatisierung. Die oxidative Kupplung der o-Chinone mit anderen Phenolen verläuft sehr schnell und ist von dem jeweiligen Reduktionspotential der verschiedenen Chinon/Hydrochinon-Paare abhängig. Die gebildeten Dimere sind Ausgangsstoffe für Folgereaktionen. (**Abbildung 12, Reaktion C**) Enzymatische oder nicht-enzymatische Oxidation bewirken unter Polymerisation schlussendlich die Bildung der hochmolekularen farbigen Verbindungen, den Melaninen. Sie sind einer der Gründe für die Pigmentierung von verschiedenen lebenden Geweben im Pflanzen-, aber auch im Tierreich. [30; 68]

Dagegen werden 1,2,3-Trihydroxyverbindungen normalerweise durch PPOs nicht erkannt und können demnach nicht direkt enzymatisch oxidiert werden. Aufgrund des Redoxpotentialunterschiedes können aber vorhandene o-Chinone unter Bildung der ursprünglichen o-Hydrochinonstruktur im Rahmen einer einfachen Redoxreaktion 1,2,3-Trihydroxyaromaten wie die Gallussäure auch nicht-enzymatisch in ihre reaktive oxidierte o-Chinon-Form überführen. Diesem Prinzip des Redoxcycling folgt auch die Regeneration der o-Chinone durch Antioxidantien wie der Ascorbinsäure, die in der Lebensmittelindustrie zur Verhinderung der enzymatischen Bräunung eingesetzt wird (**Abbildung 12, Reaktion D**). [30]

Als Elektrophile reagieren o-Chinone auch mit nicht-phenolischen Verbindungen. Als Nucleophile fungieren dabei z.B. die funktionellen Gruppen von Proteinen oder Aminosäuren mit ihren Sulfhydryl-, Amin-, Amid-, Indol- und Imidazol-Substituenten. Der Angriff findet entweder direkt am o-Chinonringsystem unter Wiederherstellung des o-Hydrochinons oder exocyclisch an dem nach Umlagerung gebildeten o-Chinonmethid statt (**Abbildung 12, Reaktion E**). Hauptprodukte sind Schiff'sche Basen, N-Quinonyl-Derivate und S-Quinonyl-Derivate. [68]

Bei Beteiligung am nicht-enzymatischen Strecker-Abbau von Aminosäuren wird die α -Dicarbonylstruktur von o-Chinonen ebenfalls zurück zum Hydrochinon reduziert. Gleichzeitig wird die Aminosäure unter Oxidation zum Strecker-Aldehyd decarboxyliert und desaminiert (**Abbildung 12, Reaktion F**). Die Bedeutung des Strecker-Abbaus

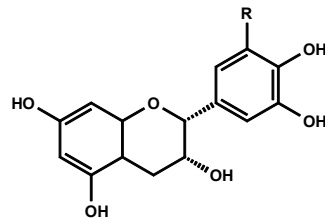
beruht auf der Bildung typischer Aromastrukturen vieler verarbeiteter pflanzlicher Lebensmittel, wie von Tee, Kaffee und Kakao. [68]

4.1 Enzymatische Bräunung von echtem Tee (*Camellia sinensis*)

Der echte Tee wird aus den Blattknospen, jungen Blättern und Trieben der Teepflanze (*Camellia sinensis*) gewonnen. Sie ist eine Pflanzenart aus der Gattung der Kamelien (*Camellia*) innerhalb der Familie der Teestrauchgewächse (*Theaceae*). Zwei Varietäten sind wirtschaftlich von Bedeutung, aus denen Teesorten sehr unterschiedlicher Qualität produziert werden: *Camellia sinensis* var. *sinensis* bringt einen leichten, hellen Aufguß mit viel Aroma hervor, *Camellia sinensis* var. *assamica* hingegen ein kräftiges und dunkles Getränk. [69] Prinzipiell werden drei Sorten entsprechend der Herstellungsart angeboten: unfermentierter Tee (Grüner Tee, Gelber und Weißer Tee), halbfermentierter Tee (Oolong Tee) und fermentierter Tee (Schwarzer Tee). [70]

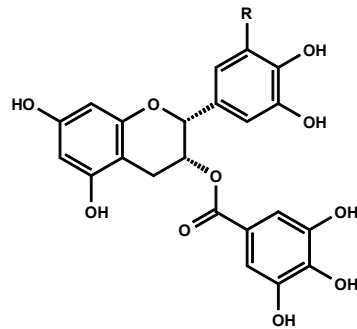
Frische Teeblätter zeichnen sich durch einen sehr hohen Gehalt an phenolischen Inhaltsstoffen aus. Angaben zu den Mengen variieren sehr stark. 80 % des Gesamtphenolgehaltes sind der Gruppe der Flavan-3-ole zuzuordnen. Die wichtigsten Vertreter sind (-)-Epicatechin, (-)-Epicatechingallat, (-)-Epigallocatechin, (-)-Epigallocatechingallat, (+)-Catechin und (+)-Gallocatechin (**Abbildung 13**). Die restlichen 20 % gehören den Strukturklassen der Flavonole und Flavone, sowie deren Glycoside, der Proanthocyanidine und der phenolischen Säuren an. [71]

Die Technologie der Teeherstellung führt zur enzymatischen Bräunung der in den frischen Teeblättern enthaltenen Catechine, und wird hier als Fermentation bezeichnet. Durch die einsetzende Oxidation und Folgereaktionen werden die ursprünglichen Gehalte von 20-35 % bis auf 5-15 % reduziert. Durch Welken, Rollen und Quetschen, Fermentation und Röstung bilden sich die charakteristische, dunkle Farbe sowie das typische Aroma des Schwarzen Tees aus. Der Fermentationsprozess kann durch Inaktivierung der blatteigenen PPOs mittels Dämpfen (Verfahren in Japan) oder Rösten (Verfahren in China) der frisch geernteten Teeblätter verhindert werden und führt zum Grünen Tee. [71; 72]



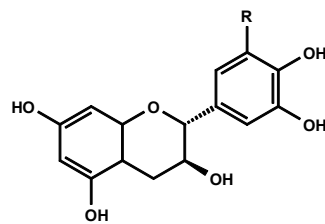
R = H: (-)-Epicatechin

R = OH: (-)-Epigallocatechin



R = H (-)-Epicatechin-3-O-gallat

R = OH: (-)-Epigallocatechin-3-O-gallat



R = H: (+)-Catechin

R = OH: (+)-Gallocatechin

Abbildung 13: Die wichtigsten Flavan-3-ole im Tee

4.1.1 Bildung von reaktiven o-Chinonen

Wie oben beschrieben, ist der erste Reaktionsschritt der Fermentation die Zwei-Elektronen-Oxidation der 1,2-Diol-Einheit vom Catechin-B-Ring zum o-Chinon durch die PPOs. [73] Das hoch elektrophile o-Chinon reagiert folgend mit Nucleophilen wie z.B. anderen Catechinen, und führt über die oxidative Kupplung zu Bisflavanolen (Theasinensine), weitere Ringkontraktionen bzw. -erweiterungen und/oder Umlagerungen zu Theacitrinen, Theaflavinen, Theanaphthochinonen und Oolongtheanin (**Abbildung 14**). In der Theorie können die Produkte dieser ersten Dimerisierung wieder als Substrate oder Cosubstrate der Oxidation, oder als Nucleophile für die Reaktion zu komplexeren, höher oligomeren Polyphenolverbindungen dienen. Durch diese umfangreichen Folgereaktionen

entstehen damit in letzter Konsequenz hochpolymere Verbindungen mit sehr heterogener Zusammensetzung. [74] Im Gegensatz zu anderen Lebensmitteln sind beim Tee die mechanistisch frühen, dimeren Kupplungsprodukte der enzymatischen Bräunung sehr gut untersucht und strukturell aufgeklärt.

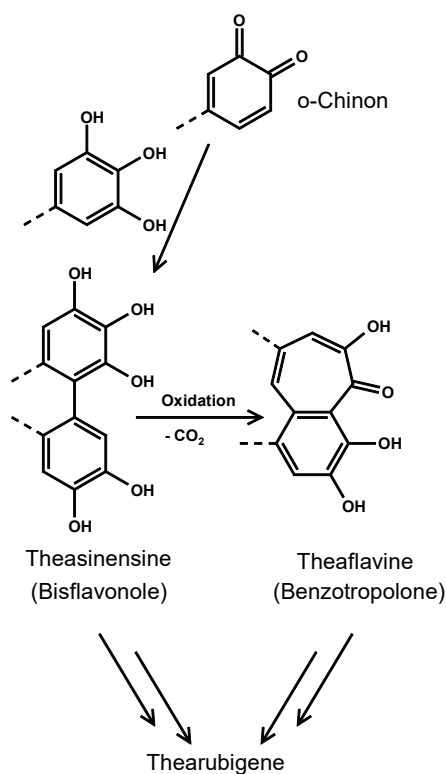


Abbildung 14: Übersicht der o-Chinon-Bildung und der Folgereaktionen im Tee

4.1.2 Bildung von Bisflavanolen (Theasinensine)

Durch oxidative Kupplung entstehen aus den Catechinen C-C-verknüpfte farblose Bisflavanole, die beim Tee als Theasinensine bezeichnet werden. Abhängig vom Reaktionspartner werden in der Gruppe der Catechindimere die Theasinensine A, B und C gebildet. Weiterhin sind von Theasinensin A und C die Atropisomere als Theasinensine D und E bekannt. Aus Epicatechingallat und Epigallocatechingallat entstehen Theasinensin F und dessen Atropisomer Theasinensin G (**Abbildung 15**). Durch die vielfältigen Folgereaktionen während der Fermentation können Bisflavanole allerdings nur in geringen Ausbeuten nachgewiesen werden. [73]

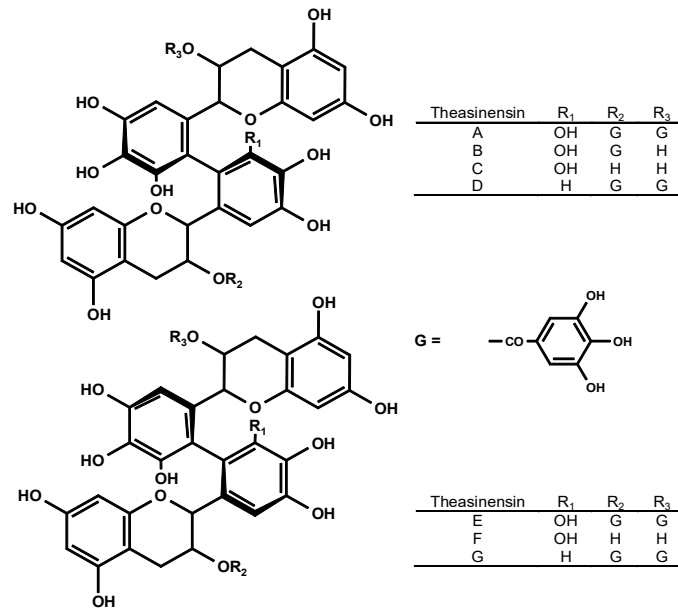


Abbildung 15: Strukturen der Theasinensine A-G

Für eine Gruppe von möglichen Reaktionsprodukten, die letztendlich zur Bildung von Thearubigenen führt, steht die Verbindung Oolongtheanin. Hier wird die Ringkontraktion zwischen den beiden B-Ringen von Theasinensin A oder D durch Oxidation eingeleitet (**Abbildung 16**). [70; 75]

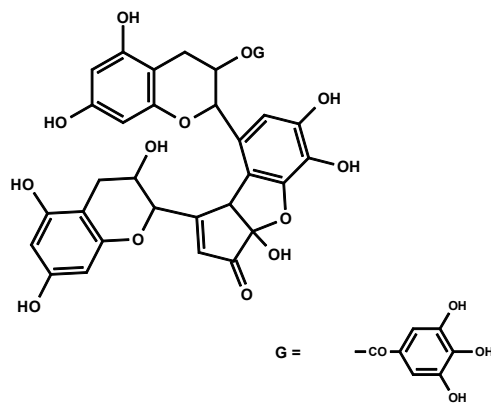


Abbildung 16: Struktur von Oolongtheanin

4.1.3 Bildung von Theaflavinen

Oxidation der Bisflavanole führt alternativ zur Bildung von gelb-orangen Pigmenten mit Benzotropolonstruktur, den Theaflavinen. Aufgrund des hohen Anteils von Catechingallaten liegen auch die Theaflavine meist als Gallate vor und sind damit gut wasserlöslich. Die Bildung von Theaflavinen beginnt mit der oxidativen Kupplung eines Catechinmoleküls mit *o*-dihydroxyliertem B-Ring wie Epicatechingallat und einem mit

1,2,3-trihydroxyliertem B-Ring wie Epigallocatechin. Erneute Oxidation leitet einen zweiten nucleophilen Angriff unter Bildung eines tricyclischen, instabilen Bicyclo[3.2.1]octan-Intermediates ein, das sich unter β -Dicarbonylsplaltung in die bicyclische Benzotropolonstruktur mit Carbonsäuresubstituent stabilisiert. Weitere Oxidation, Decarboxylierung und Isomerisierung resultieren dann in den Theaflavinen. [76; 71; 77] Die bekanntesten Vertreter, wie Theaflavin, Theaflavin-3-gallat oder Theaflavin-3,3'-digallat, sind in **Abbildung 17** dargestellt.

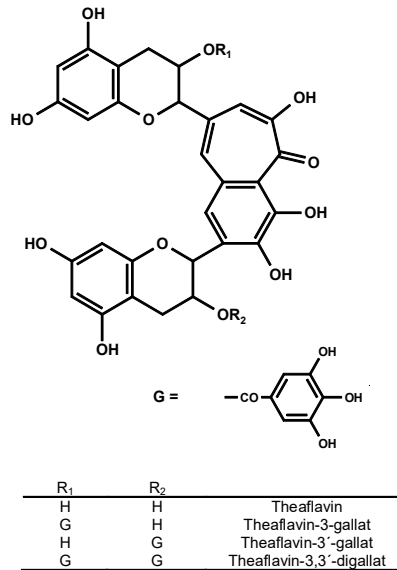


Abbildung 17: Hauptstrukturen der Theaflavin-Gruppe

Theaflavinsäure und Theaflagallin (**Abbildung 18**) sind ebenfalls leuchtend rote Benzotropolonderivate und werden aus Epicatechin bzw. Epicatechingallat und Gallussäure gebildet. Neben den Dimeren wurden auch Tri- und Tetramere durch massenspektrometrische Untersuchungen identifiziert. Als ein Beispiel dieser höher oligomeren Oxidationsprodukte zeigt **Abbildung 18** das Theaflavat A. [78]

Im Schwarzen Tee sind die Theaflavine in Konzentrationen von 0,3 bis 2 % enthalten. Die Menge nimmt mit fortschreitender Teefermentation unter weiterer Oxidation wieder ab. [70] Es entstehen neben den hochpolymeren Thearubigenen u.a. die gelben Pigmente Bistheflavin A, Bistheflavin B, Dehydrotheaflavin und Theanaphthochinon. [79]

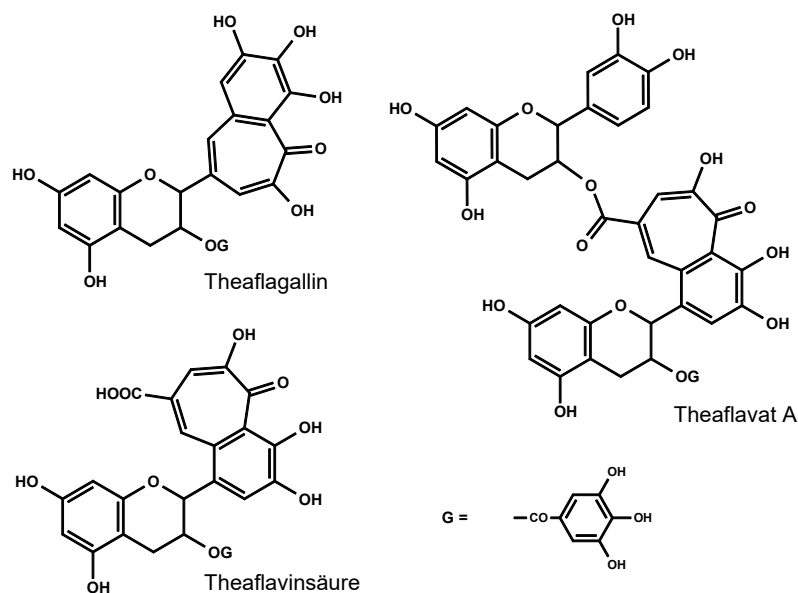


Abbildung 18: Weitere Theaflavine

4.1.4 Bildung von Thearubigenen

Abgesehen von den Theaflavinen werden bei der Fermentation weitere Verbindungen gebildet, die zu der charakteristischen rötlich-braunen Farbe von Schwarzem Tee vor der Röstung beitragen. Für dieses hochmolekulare, heterogene Gemisch wurde 1959 der Begriff Thearubigene eingeführt. Thearubigene sind ein hochkomplexes Gemisch aus schwerer wasserlöslichen, sauren Verbindungen mit einem Molekulargewicht bis 2000 Da. Bisher ist über die chemische Struktur wenig bekannt, da sie sich chromatographisch nicht trennen lassen und letztlich nur durch hochauflösende Massenspektrometrie-Experimente charakterisiert werden können. Mit dieser Technik war es möglich eine Klassifizierung der Thearubigene vorzunehmen. Die daraus entwickelte Theorie der oxidativen Kaskade führte zu dem Schluss, dass ausgehend von den monomeren Catechinen durch den Einbau von Hydroxylgruppen während der Fermentationsvorgänge theoretisch etwa 30.000 strukturell ähnliche, oligomere Verbindungen möglich sind. Aufgrund dieser Überlegungen konnte für ca. 1.500 Verbindungen eine Strukturformel postuliert werden. [74]

4.2 Bräunung von Rooibos (*Aspalathus linearis*)

Aus *Aspalathus linearis* wird das Nationalgetränk Südafrikas hergestellt, der Rooibos-Tee. Die Blätter und Stängel werden nach der Ernte fein gehackt und gequetscht. Dies leitet die Fermentationsprozesse unter Bildung der typischen Farbe und dem Geschmack ein. Der teeähnliche Getränkeaufguß ist im Gegensatz zum schwarzen

Tee coffeinfrei, aber reich an Polyphenolen. [80] Die phenolische Hauptstruktur ist Aspalathin, ein C-glycosidisches Dihydrochalkon, das nur im Rooibos zu finden ist (**Abbildung 19 A**). Während der Fermentation sinkt die Menge an Aspalathin drastisch um fast 98%. Im Gegensatz zum oxidativen Abbau der Catechine bei *Camellia sinensis* kann der Aspalathin-Abbau auch ausschließlich nicht-enzymatisch erfolgen. Bisher wurden drei verschiedene Abbaumechanismen von Aspalathin aufgeklärt. Grundlage aller Mechanismen ist die einleitende Oxidation des Dihydrochalkons zum *o*-Chinon. Nach Umlagerung des B-Rings zum Chinonmethid erfolgt im ersten Abbaumechanismus der nucleophile Angriff der Hydroxylfunktion des A-Rings unter Bildung von 6-C- bzw. 8-C-glucosidisch substituierten Eriodictyolen. Weitere Oxidation und Isomerisierung führen zu den farblosen Intermediaten Isoorientin und Orientin. Der zweite Mechanismus basiert auf der oxidativen Kupplung und führt ausgehend vom *o*-Chinon durch den nucleophilen Angriff eines zweiten Aspalathinmoleküls zur Dimerisierung. Aspalathindimere sind in **Abbildung 19 B** dargestellt. Dieser Mechanismus ist vergleichbar mit der Bildung von Bisflavanolen im Schwarzen Tee. Weder Eriodictyole, Isoorientin, Orientin, noch die Dimere sind jedoch gefärbte Substanzen. Sie stellen lediglich Intermediate innerhalb der Fermentationskaskade dar, und werden im weiteren Verlauf zu braunen Melaninen abgebaut. [81; 82]

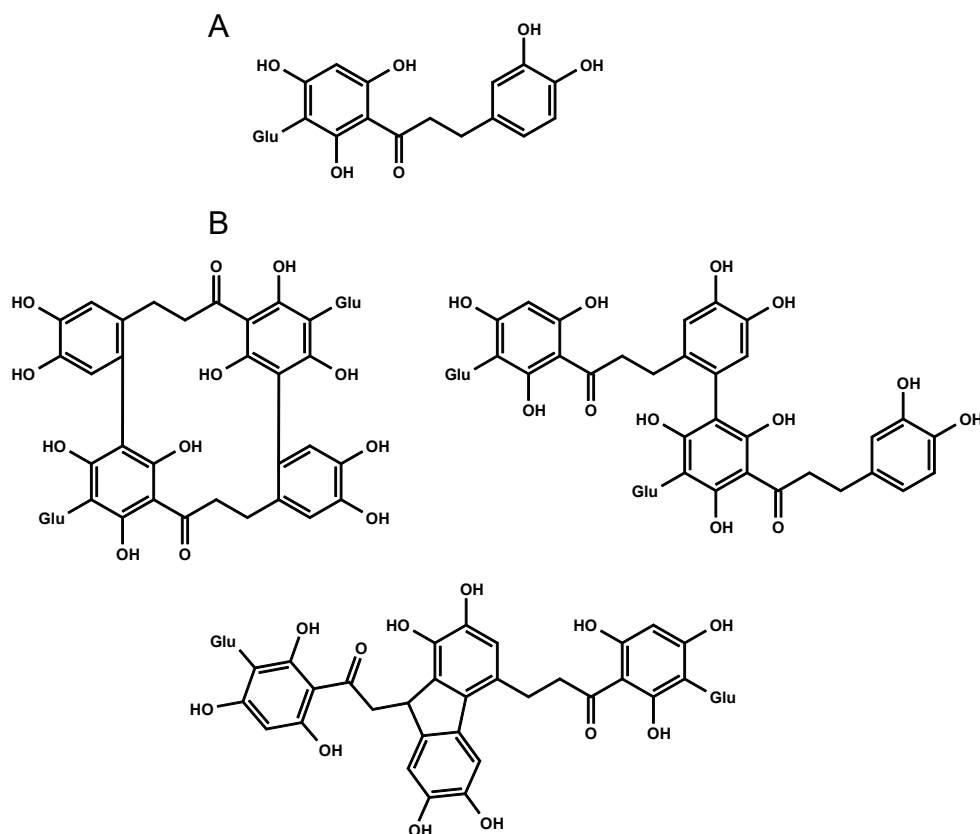


Abbildung 19: Aspalathin (A) und seine Dimere (B)

Als farbige Chromophore konnten im Rooibos erstmals zwei farbige Dibenzofurane identifiziert und mit einem dritten Mechanismus beim Aspalathinabbau unterlegt werden. Die Reaktion beginnt wieder mit der Oxidation von Aspalathin zum o-Chinon. Intramolekulare Michael-Addition führt zu einem sechsgliedrigen Ringsystem, das nach Rearomatisierung und β -Dicarbonylspaltung zwei hochreaktive Biphenyl-Isomere mit einem Propionsäuresubstituenten ergibt. Weitere Oxidation des ehemaligen B-Ringes erlaubt dann den intermolekularen Angriff zum tricyclischen Ringsystem. Keto-Enol-Tautomerie führt abschließend zu den farbigen Diastereoisomeren mit Dibenzofuranskelett, bezeichnet als (S)- und (R)-3-(7,9-Dihydroxy-2,3-dioxo-6- β -D-glucopyranosyl-3,4-dihydrodibenzo[b,d]furan-4a(2H)-yl)-propionsäure (**Abbildung 20**). [83] Interessanterweise wird beim Anschneiden von Äpfeln eine strukturell analoge Verbindung gebildet, die jedoch im Gegensatz zum Rooibos ausschließlich enzymatisch katalysiert wird.

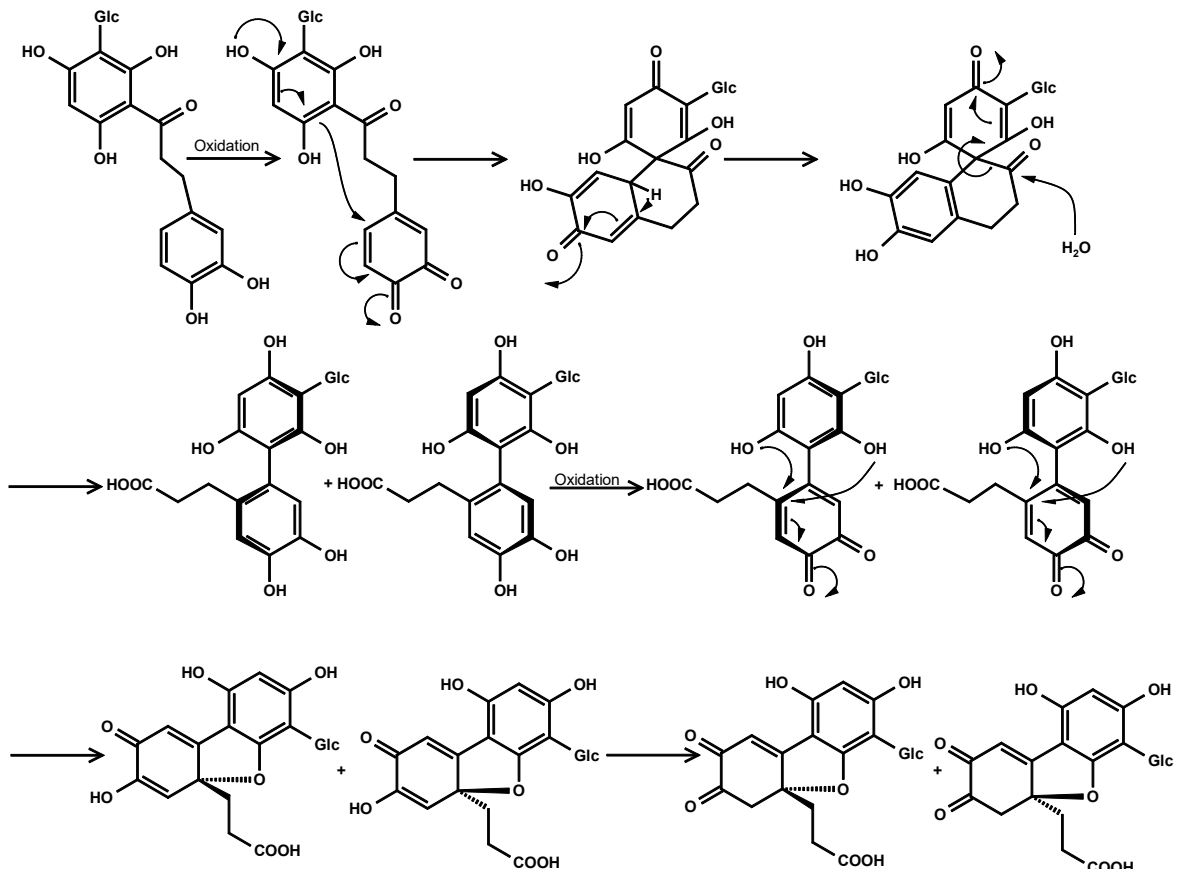


Abbildung 20: Bildung farbiger Oxidationsprodukte im Rooibos

4.3 Enzymatische Bräunung von Äpfeln

Äpfel (*Malus*) sind reich an phenolischen Inhaltsstoffen wie Catechinen, Dihydrochalkonen, Flavanolen, Anthocyanen und Hydroxyzimtsäuren. Diese werden durch Enzyme in Anwesenheit von Luftsauerstoff zu farbigen Strukturen oxidiert und führen zu der typisch orange-braunen Verfärbung in geschnittenen Äpfeln und zur goldbraunen Farbe von Apfelprodukten wie Apfelsaft oder Apfelwein.

Die Vertreter der Dihydrochalkone im Apfel sind Phloridzin und Phloretinxyloglucosid, die während der enzymatischen Oxidation für die Melaninbildung die wichtigste Stellung einnehmen. **Abbildung 21** zeigt, dass die Dihydrochalkone anders als beim Rooibos O-glycosidische Verbindungen darstellen und zum anderen am B-Ring nur monohydroxiliert sind. Durch die Cresolaseaktivität der PPOs wird Phloridzin zunächst zum 3-Hydroxyphloridzin umgesetzt, und anschließend durch die Catecholaseaktivität zum o-Phloridzinchinon oxidiert. Dieses Intermediat geht durch intermolekulare Michael-Addition, Hydratisierung und Rearomatisierung in zwei farblose atropisomere Verbindungen über. Erneute Oxidation erlaubt die Addition unter Bildung von zwei diastereomeren, gelben Produkten, die wie beim Rooibos auch aufgrund der polaren Propionsäuresubstituenten eine hohe Wasserlöslichkeit aufweisen. [84; 85]

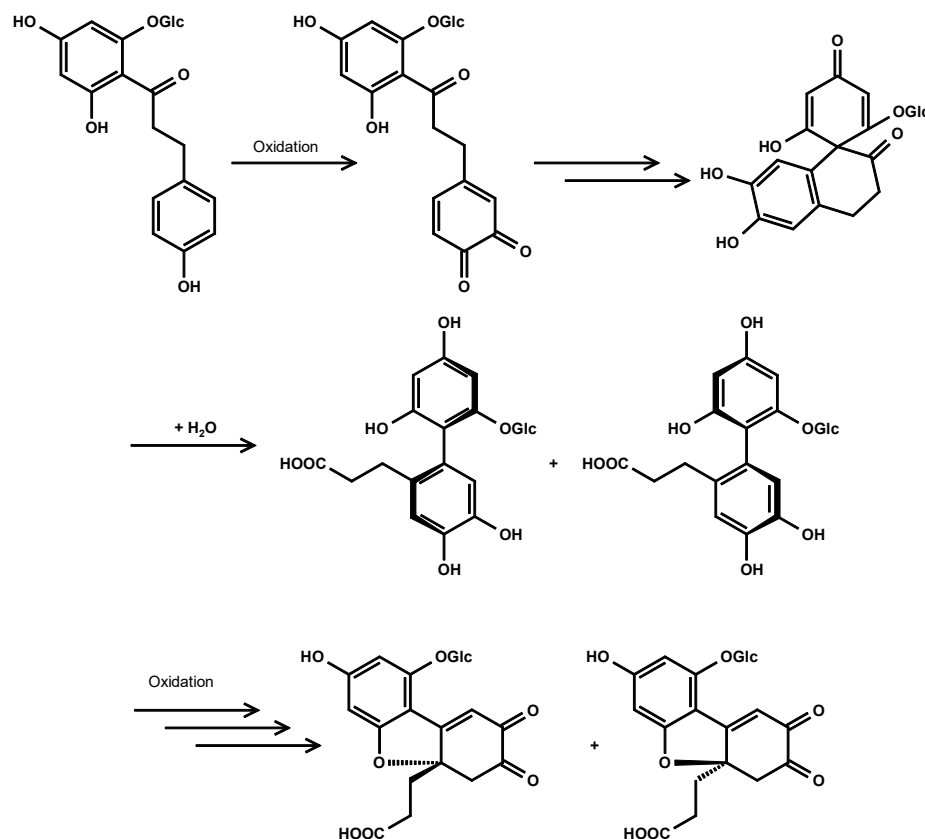


Abbildung 21: Bildungsmechanismus der Phloridzinoxidationsprodukte

Der Vergleich zeigt, dass die finalen Chromophore in beiden Fällen bis auf den verschiedenen glycosidischen Charakter identisch sind. Der Unterschied in der Synthese mit der strikten Abhängigkeit von Phenoloxidasen ist damit beim Apfel ausschließlich auf den monohydroxilierten Charakter der Ausgangsprodukte zurückzuführen.

4.4 Verfärbungen von Salat (*Lactuca sativa*)

Lactuca sativa, der Gartensalat, gehört zur Gattung der Lattiche und kann in die Convarietät *sativa*, wozu der Römersalat und der Spargelsalat zählen, und in die Convarietät *incocta*, mit den Vertretern Schnittsalat, Kopfsalat und Eisbergsalat, eingeteilt werden. [12] Eisbergsalat ist der Salat mit dem größten Handelsvolumen. Er wird meist roh verzehrt und lässt sich einfach zubereiten. Die nach der Verarbeitung oder Beschädigung auftretenden rotbraunen Pigmente sind am deutlichsten an dem geschnittenen Strunk zu erkennen. Mikroskopische Aufnahmen zeigen eine Anhäufung der Pigmente in den Zellen (**Abbildung 22**). Da der Verbraucher derartige Verfärbungen bei frischem Gemüse als unerwünscht bewertet, ist die Salatbräunung als ein Beispiel für die negativen Aspekte der enzymatischen Bräunungsreaktionen einzuordnen.

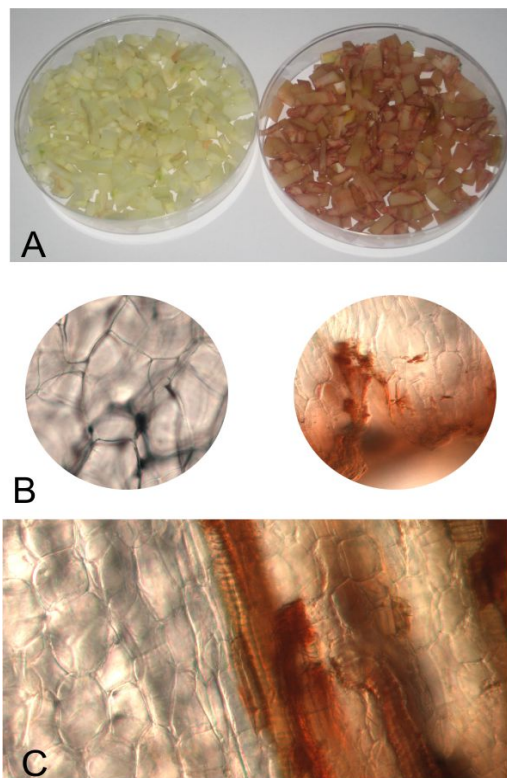


Abbildung 22: Vergleich von frischem (links) und gebräuntem Eisbergsalatstrunk (rechts), geschnitten (A) und unter dem Mikroskop (B, C)

4.4.1 Phenolbasierter Bräunungsmechanismus von Salat

Nach der Verwundung des pflanzlichen Materials finden im Wesentlichen wieder die zwei biochemischen Schlüsselprozesse statt. Auf der einen Seite wird die Aktivierung des Phenylpropanoid-Stoffwechsels durch die Phenylalanin-Ammoniak-Lyase induziert, und führt zu einer Anhäufung von phenolischen Verbindungen. Caffeoylderivate wie Chlorogensäure oder Chicoreesäure und Flavonoide wie Quercetin- und Luteolinglycoside stellen typische Phenolverbindungen von Eisbergsalat dar. Auf der anderen Seite kommt es nach Verletzungen zu oxidativen Enzym-Substrat-Reaktionen. Speziell für Salat haben Studien gezeigt, dass die PPOs ausschließlich *o*-Diphenole oxidieren können. Dagegen wurden keine Aktivitäten gegenüber Monohydroxy- und 1,2,3-Trihydroxy-Substraten nachgewiesen.

Die entstandenen *o*-Chinone kondensieren dann spontan mit anderen Phenolen und vielen anderen Pflanzenbestandteilen wie Proteinen und Kohlenhydraten unter Bildung von hochmolekularen Polymeren. Diese Tannin-ähnlichen Verbindungen wurden für die braunen bis rotbraunen Pigmente in den verletzten Geweben verantwortlich gemacht. [86] Trotz intensiver Forschung konnten bis heute jedoch keine diskreten, farbigen phenolischen Kondensationsprodukte nachgewiesen werden.

In der **Publikation A** wurden Extrakte von frischem (links) und gebräuntem Eisbergsalatstrunk verglichen und der Einfluss von Phenolverbindungen und der Aktivität von Polyphenoloxidase auf die enzymatische Bräunung untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass das Bräunen des Gewebes nach dem Schneiden und der Lagerung nicht mit der Änderung der Konzentrationen von phenolischen Verbindungen oder der spezifischen Aktivität von PPO korreliert. Ergebnisse von Modellinkubationen mit Pflanzenextraktlösungen führten zu dem Schluss, dass neben der durch Polyphenoloxidasen induzierten typischen enzymatischen Bräunung weitere Mechanismen involviert sein müssen. [42]

4.4.2 Sesquiterpenlacton basierter Bräunungsmechanismus von Salat

1985 wurde erstmals eine alternative chromophore Struktur, das Lettucenin A, nach dem Beimpfen von Salatblättern der Spezies *Lactuca sativa* var. *capitata* mit dem pathogenen Bakterium *Pseudomonas chiorii* isoliert. [59] Zur Aufklärung des Syntheseweges von Lettucenin A wurde die Hypothese entwickelt, dass es aufgrund der ähnlichen Struktur aus den nativ vorhandenen Sesquiterpenlactonen wie Lactucinde *de novo* synthetisiert wird. Wie bereits in Abschnitt 3.3 erläutert, sind Sesquiterpene als Oligomere des Kohlenwasserstoffes Isopren zu verstehen. Sie bestehen aus 3 Isopreneinheiten und werden ausgehend vom Farnesylpyrophosphat gebildet. Unter

Abspaltung von Pyrophosphat entsteht Germacren. Enzymatische Reaktionen führen unter Oxidation zur Germacrensäure, die durch Hydroxylierung und Lactonbildung zu Costunolid umgewandelt wird. Diese Verbindung kann als Schlüsselverbindung der Biosynthese von Sesquiterpenlactonen angesehen werden. [50] Der Biosyntheseweg von Lettucenin A wurde deshalb ebenfalls ausgehend von Farnesyldiphosphat über Costunolid oder Guaien postuliert (**Abbildung 23**). [87; 88]

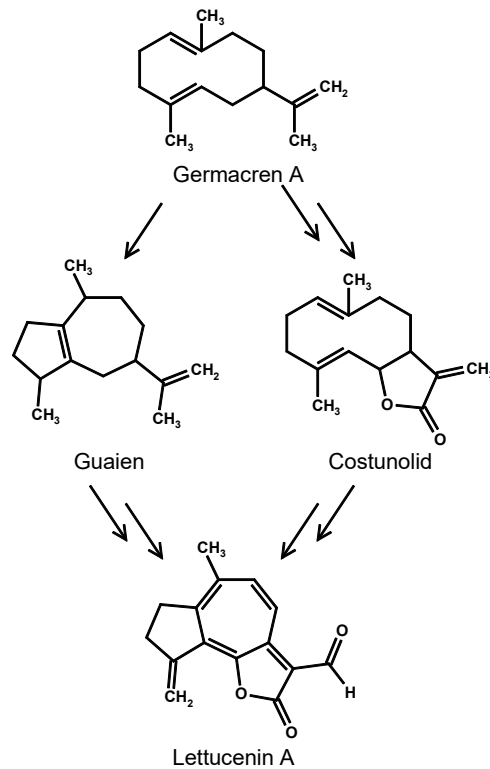


Abbildung 23: Postulierte Biosynthese von Lettucenin A

In den letzten Jahren konnte die Gruppe der Lettucenine durch die Verbindungen Lettucenin A1, B und B1 erweitert werden (**Abbildung 24**). Nach dem Verletzen verschiedener Salatpflanzen durch einfaches Kleinschneiden zeigte sich in allen untersuchten Arten der Gattung *Lactuca* eine Akkumulation von Lettucenin A. In deutlich geringeren Mengen wurde es auch in verschiedenen Arten der Gattung *Cichorium* nachgewiesen. [60]

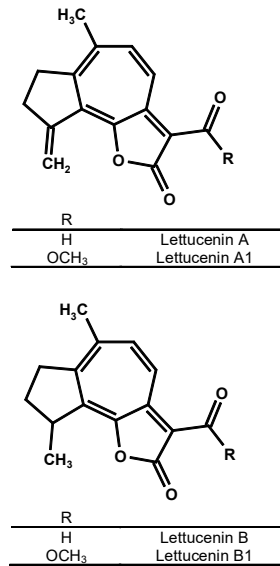


Abbildung 24: Strukturen der Lettucenin-Gruppe

Um die Bedeutung von Lettuceninen für die Gesamtfarbe von gebräuntem Eisbergsalat zu bestimmen, wurde eine Farbverdünnungsanalyse mit einem Diethylether-Extrakt durchgeführt. Die bei 420 nm nachgewiesenen Chromophore machten in Summe mehr als 50% der Gesamtfarbe aus (**Abbildung 25**). Die Lettucenine A, A1, B und B1 trugen 40% zur Gesamtfarbe bei, wobei dabei alleine auf die Hauptverbindung Lettucenin A 25% entfielen. Bezogen auf den mit einem Wasser-Aceton-Gemisch dargestellten Gesamtextrakt wurden 25% der Gesamtfarbe den Lettuceninen A, A1, B und B1 zugeordnet. Mit der Farbverdünnungsanalyse konnten damit die Lettucenine als die Schlüsselchromophore von gebräuntem Eisbergsalat identifiziert werden. Weiterführende Untersuchungen mit den isolierten Einzelverbindungen belegten, dass die Strukturen lediglich reaktive Intermediate darstellen und ähnlich wie bei der oben beschriebenen Chemie der Phenole weiter zu höhermolekularen Verbindungen polymerisieren (**Publikation B**). [60]

Die enzymatische Bräunung, die bisher nur der polyphenolischen Chemie zugeordnet wurde, kann somit um den neuen Aspekt der Sesquiterpen-basierten Bräunung erweitert werden.

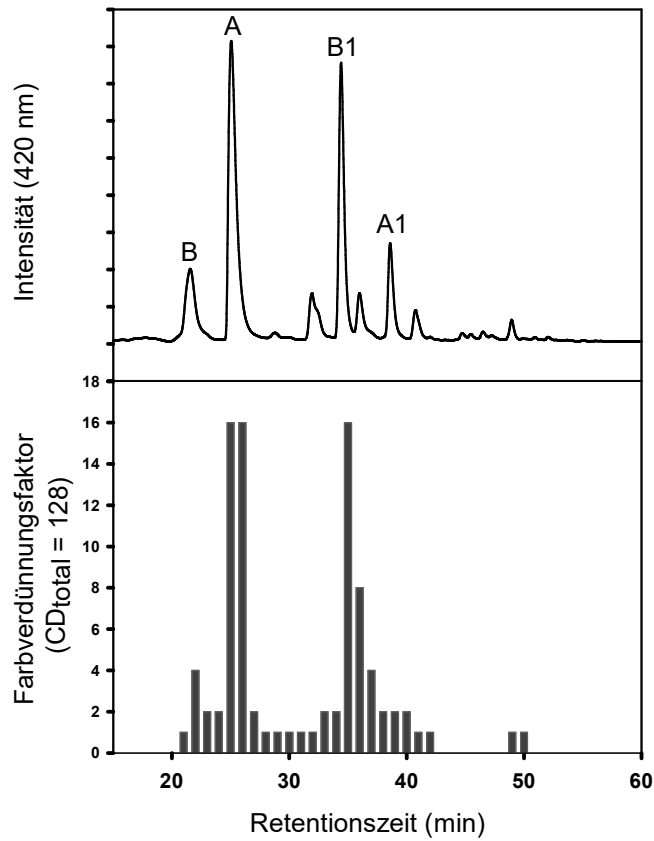


Abbildung 25: HPLC-Chromatogramm und Farbverdünnungsanalyse eines Diethylether-Extraktes von gebräuntem Eisbergsalat

4.5 Weitere Bräunungsmechanismen

Enzymatische Bräunungsreaktionen finden auch im tierischen Organismus statt, und beruhen hier auf Umsetzungen der Aminosäure Tyrosin. Die gebildeten Melanine erklären die Haarfarbe und das Bräunen der Haut unter Lichtbestrahlung. Zunächst führt die PPO-katalysierte Oxidation über das Dihydroxyphenylalanin (DOPA) zum Dopachinon. Dieses Zwischenprodukt wird dann über zwei Wege zu den farbigen Melaninen polymerisiert. Die intramolekulare nucleophile Addition der Aminogruppe ergibt das Indolderivat Leucodopachrom, das in der Folge teilweise unter Decarboxylierung nach dem Prinzip der oxidativen Kupplung zu hochpolymeren, dunkel-schwarzen Melaninen reagiert. Diese werden auch als Eumelanine bezeichnet. In Gegenwart von Thiolverbindungen werden zusätzlich Thioether-Addukte von DOPA gebildet. Diese Reaktion spielt durch den hohen Cysteinanteil im Keratin bei der Ausbildung der natürlichen Haarfarbe eine Rolle und ergibt mit Cystein das Cysteinyl-DOPA. Nach Oxidation, intramolekularer Addition zum bicyclischen Benzothiazin-Ringsystem und folgenden oxidativen Kupplungen resultieren schließlich die

niedermolekularen rotbraunen Phäomelanine. Folglich werden Eumelanine hauptsächlich aus 5,6-Dihydroxyindol-Einheiten gebildet, während Phäomelanine Anteile an Benzothiazin-Einheiten enthalten (Abbildung 26). [7; 89; 90]

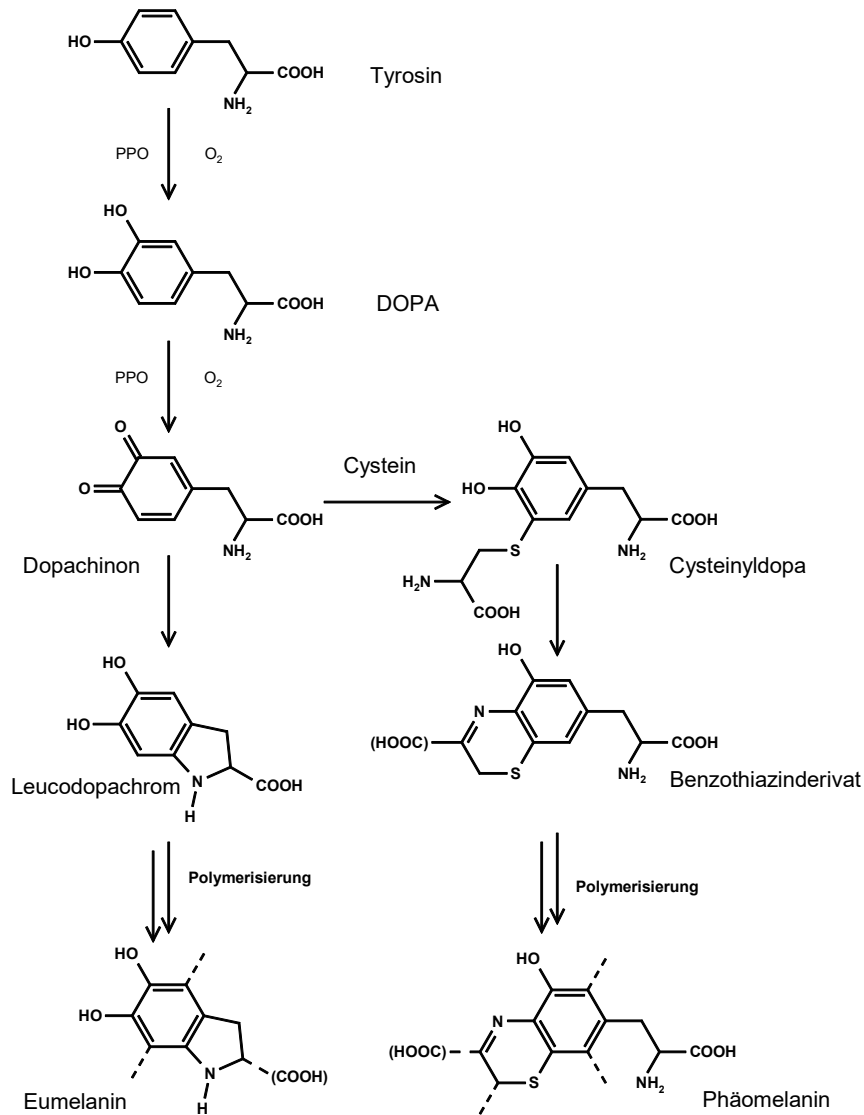


Abbildung 26: PPO-katalysierte Oxidation von Tyrosin

Dieser Mechanismus findet sich im Prinzip auch bei tyrosin- oder dopaminreichen pflanzlichen Lebensmitteln wie Kartoffeln und Bananen wieder, wobei hier zusätzlich pflanzliche Phenole in die farbigen Polymere eingebunden werden. So treten nach mechanischer Einwirkung auf Kartoffelknollen (*Solanum tuberosum* L.), z.B. ausgelöst durch Ernte oder Transport, dunkle Flecken unter der intakten Haut auf. Dieses Qualitätsproblem, im Allgemeinen als Schwarzfleckigkeit bezeichnet, verursacht jährlich erhebliche wirtschaftliche Schäden. Da Tyrosin das Hauptsubstrat der Kartoffel-PPOs ist, wird die Schwarzfleckigkeit mit der Bildung von DOPA abgeleiteten

Melaninpolymeren erklärt. Dieses Phänomen tritt deutlicher auch beim Anschneiden bzw. der Verarbeitung der Knolle auf, und zeigt sich durch die Entwicklung graudunkelviolettfärbter Pigmente. [7; 89; 90]

*Ähnlich wie bei der Kartoffel bilden sich schwarz gefärbte Melanine bei der Banane (*Musa paradisiaca*) an Druckstellen der Schale oder des Fruchtfleisches. Als spezifische Substrate der Bananen-PPO wurden Tyramin und Dopamin verifiziert. Damit unterscheiden sich Kartoffel-PPO und Bananen-PPO deutlich von denen des Apfels und des Salates, die als Substrate bevorzugt Epicatechin und/oder Chlorogensäure umsetzen. [91]*

Abschließend muss noch einmal betont werden, dass im Zusammenhang mit der Bräunung pflanzlicher Lebensmittel zwar oftmals die PPOs charakterisiert wurden, aber in den meisten Fällen wie auch bei Kartoffeln und Bananen die Struktur der resultierenden Melanin-Chromophore nach wie vor unbekannt ist.

5 Zusammenfassung

Die vielfältigen Reaktionsmechanismen, die bei der enzymatischen Bräunung von pflanzlichen Lebensmitteln eine Rolle spielen, sind nicht alleine auf die enzymkatalysierte Oxidation von phenolischen Verbindungen zurückzuführen. Neuere Untersuchungen haben zu der Einsicht geführt, dass die nach gewollter oder nicht beabsichtigter Verletzung des Pflanzengewebes einsetzende Bräunung maßgeblich auch auf anderen Vorläuferstrukturen z.B. aus der Gruppe der Sesquiterpene beruht. Offensichtlich sind die Wege der Pflanzen, bei mikrobiellen Infektionen, bei tierischem Verbiss, oder dem Lagern und Verarbeiten von Lebensmitteln Abwehrstoffe zu bilden, je nach Spezies sehr unterschiedlich. Vorkommende Substrate, Spezifität und Aktivität der beteiligten Enzyme, aber evtl. auch die Art der Einwirkung auf die Pflanzenzellen können Einflussfaktoren sein. Eine weitere, wesentliche Erkenntnis ist, dass bis heute kaum farbgebende Chromophore, noch die dahinterstehenden Mechanismen auf strukturell molekularer Basis bekannt sind. Eine Ausnahme bildet die Chemie der Teefermentation, aber auch hier sind im Wesentlichen nur die ersten, niedermolekularen Verbindungen der Bräunungsreaktionen bekannt. Die Erforschung der Bräunungsmechanismen von pflanzlichen Lebensmitteln bleibt daher auch in Zukunft ein interessantes und gerade für die Nahrungsmittelindustrie sehr wichtiges Thema.

Aufgrund seiner ernährungsphysiologischen Eigenschaften ist Salat ein wesentlicher Bestandteil einer gesunden Ernährung. Der Deutsche verbraucht durchschnittlich 5,9 kg pro Jahr. Wobei die beliebteste Sorte der Eisbergsalat ist. Im Handel stehen verschiedenste Salatsorten das ganze Jahr zur Verfügung und werden entweder frisch oder in Convenience-Produkten (z.B. verzehrfertige Salatschalen) konsumiert. Durch das Schneiden während der Verarbeitung zu Fertigprodukten wird an den Schnittflächen das Gewebe verletzt und es bilden sich Verfärbungen. Die Qualität von Salaten hängt direkt mit diesen Verfärbungen zusammen. Starke Verfärbungen senken die Konsumentenakzeptanz erheblich und verringert damit den Verkaufserlös.

Die Bräunung wird durch wundinduzierte Veränderungen in der Zusammensetzung der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe ausgelöst und im Allgemeinen auf die phenolbasierte enzymatische Bräunung zurückgeführt. Daher wurden im ersten Teil der Arbeit phenolische Inhaltsstoffe aus dem Eisbergsalat isoliert und deren Einfluss auf die enzymatische Bräunung untersucht. Durch Gegenstromverteilungschromatographie (multilayer countercurrent chromatographie, MLCCC) und präparativer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) wurden elf phenolische Verbindungen (Kaffeensäure, Chlorogensäure, Kaffeemaleinsäure, Chicoréesäure, Isochlorogensäure,

Quercetin-3-O-glucuronid, Quercetin-3-O-galactosid, Quercetin-3-O-glucosid, Quercetin-3-O-(6"-malonyl)-glucosid, Luteolin-7-O-glucuronid und Syringin) isoliert. Die Reinheit und Identität der isolierten Verbindungen wurde durch verschiedene NMR-Experimente, HPLC-DAD-MS- und HR-MS-Techniken bestätigt.

Der Zusammenhang zwischen den Verfärbungen von Eisbergsalat und der enzymatischen Bräunung wurde gründlich in verschiedenen Modellinkubationen geprüft. Die Ergebnisse zeigten, dass die Gesamtkonzentration an phenolischen Verbindungen und die Aktivität der Polyphenoloxidase nicht direkt mit den Bräunungsprozessen zusammenhängen. Überraschenderweise wurde die stärkste Verfärbung im Salatstrunk festgestellt, obwohl der Strunk die niedrigste PPO-Aktivität zeigte. Diese Ergebnisse und die Ergebnisse von Modellinkubationsversuchen mit Pflanzenextraktlösungen aus frischem Eisbergsalat führten zu dem Schluss, dass neben der durch PPO-induzierten enzymatischen Bräunung weitere Mechanismen involviert sein müssen.

Folglich wurden Extrakte des gebräunten Eisbergsalates untersucht. Es konnten verschiedene Verbindungen nachgewiesen werden, die ein Absorptionsvermögen des sichtbaren Lichts (d.h. 420 nm) zeigten. Mit den oben aufgeführten Methoden konnten wir gelbbraune Pigmente isolieren. Weitere Analysen durch NMR- und MS-Techniken identifizierten die sesquiterpenoide Struktur Lettucenin A und drei neue Derivate (Lettucenine A1, B und B1). Farbverdünnungsanalysen zeigten, dass diese strukturell identifizierten Verbindungen 40% zur Gesamtfarbe des Diethyletherextrakts beitrugen. Außerdem erklärten diese Verbindungen im gesamten Wasser/Aceton-Extrakt 25% der Gesamtfarbe.

Um die Bildung von Lettucenin A in der Pflanze genauer zu verstehen, wurde weiterhin eine zeitabhängige Bildungskurve aufgezeichnet. Die Ergebnisse zeigten Lettucenin A und das Derivat Lettucenin B als reaktive Zwischenprodukte, da in der Pflanze keine Akkumulation auftrat. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass Lettucenin A als chemosystematischer Marker der Gattung *Lactuca* verwendet werden kann. Denn in den 10 untersuchten Sorten der *Cichorieae* wurde Lettucenin A nur in den fünf *Lactuca*-Sorten nachgewiesen, nicht jedoch in den fünf *Cichorium*-Sorten.

Neben den Lettuceninen wurden im Eisbergsalat weitere Sesquiterpenlactone identifiziert. Chemische Untersuchungen am n-Butanol-Extrakt führten zur Isolierung von drei neuen Sesquiterpenlactonen (Jaquinelin-8-O-sulfat, Cichoriosid B und 8-Desacetylmatricarin-8-O-sulfat). Weitere Vertreter der *Cichorieae* wurden auf die obigen drei Verbindungen untersucht. Cichoriosid B war in allen untersuchten Sorten nachweisbar, wohingegen die Sulfate nur in 4 von 10 Sorten nachweisbar waren. Ein sortenspezifisches Vorkommen konnte aber nicht festgestellt werden. Bei fünf

Vertretern wurde der Gehalt im gesamten Salatkopf, in den Blättern und im Strunk verglichen. Der Vergleich zeigte eine Anhäufung der Verbindungen im Strunk. Der Einfluss dieser Sesquiterpenlactone auf die Farbbildung wurde in weiteren Experimenten untersucht, führte aber nicht zu konkreten Ergebnissen.

Ein weiteres Merkmal der Sesquiterpenlactone ist ihr bitterer Geschmack. Geschmacksverdünnungsanalysen des n-Butanol-Extraktes und der isolierten Sesquiterpenlactone ergaben einen eindeutigen Einfluss dieser Verbindungen auf die Bitterkeit von Eisbergsalat. Die Bitterschwellenwerte der neuen Verbindungen betragen 30 ppm für Jaquinelin-8-O-sulfat, 25 ppm für Cichoriosid B und 50 ppm für 8-Deacetylmatricarin-8-O-sulfat. Der Bitterschwellenwert für Lettucenin A wurde auf 15 ppm festgelegt.

6 Summary

Improper handling of vegetable foods during storage and processing quickly initiates unwanted browning reactions, which in most cases are associated to a loss of quality. Exceptions are e.g. the production of black tea, where enzymatic browning reactions are an essential step of the technology. From today's understanding the reaction is initiated by a disruption of cell compartments to bring phenolic compounds as the substrates together with polyphenoloxidases as the catalyzing enzymes. The present review underlines o-quinones as the central intermediates finally leading to high molecular brownish polymers called melanines. However, in sight of the current literature the term enzymatic browning has to be extended also to other substrates as, e.g., sesquiterpenlactones responsible for the discoloration of lettuce.

Because of its nutritional properties lettuce is an integral part of a healthy diet. On average, Germans consume 5.9 kg per year. The most popular variety is iceberg lettuce, which is consumed fresh or processed into convenience products. The cutting step within the processing of the lettuce causes injuries and discolorations are formed. The quality of iceberg lettuce is directly linked to this discoloration. In particular, the color change of lettuce leaves and stems considerably reduces consumer acceptance and thus decreases sales revenue of iceberg lettuce.

Wound-induced changes in the composition of secondary plant compounds are causing the browning of processed lettuce. The discoloration is generally associated with the phenol-based browning. Therefore, in the first part of the work phenolic ingredients from the iceberg lettuce were isolated and their influence on the enzymatic browning was investigated.

By multilayer countercurrent chromatography (MLCCC) and preparative high-performance liquid chromatography (HPLC) eleven phenolic compounds (caffeic acid, chlorogenic acid, phaseolic acid, chicoric acid, isochlorogenic acid, quercetin-3-O-glucuronide, quercetin-3-O-galactoside, quercetin-3-O-glucoside, quercetin-3-O-(6"-malonyl)-glucoside, luteolin-7-O-glucuronide and syringin) were isolated. The purity and identity of isolated compounds were confirmed by different NMR experiments, HPLC-DAD-MS, and HR-MS techniques.

The relationship between discoloration of iceberg lettuce and enzymatic browning was thoroughly investigated by modeling incubations with the isolated compounds and plant extracts. The results showed that the total concentration of phenolic compounds and the activity of polyphenol oxidase were not directly related to the browning processes. Unexpectedly, the strongest discoloration was detected in the lettuce stem, which

showed the lowest PPO activity. These results and the results of model incubation experiments with plant extract solutions led to the conclusion that besides the polyphenol oxidase-induced enzymatic browning, further mechanisms must be involved. Consequently, extracts of the browned lettuce were examined and different visible light absorbing compounds were detected. The methods listed above enabled us to isolate yellow-brown pigments. Following analyses by NMR and MS techniques identified the sesquiterpenoid structure lettucenin A and three novel derivatives (lettucenins A1, B, and B1).

Color-dilution analyses revealed these structurally identified compounds contributed 40% to the overall color of the diethyl ether extract. In addition the mentioned compounds explained 25% of the overall color in the total water/acetone extract.

To understand the formation of lettucenin A in the plant more accurately, time-course formation were plotted. The results proved lettucenin A and the derivatives as reactive intermediates, because there was no accumulation in the plant.

Moreover, it was established that lettucenin A might be used as a chemosystematic marker of the genus *Lactuca*. This assumption is based on the fact that lettucenin A was only verified in five varieties of *Lactuca*, but in contrast to that not in the five investigated varieties of *Cichorium*.

In addition to the sesquiterpenoid lettucenins, supplementary sesquiterpene lactones were identified in the iceberg lettuce. Chemical investigations on the n-butanol extract led to the isolation of three novel sesquiterpene lactones (jaquinelin-8-O-sulfate, cichorioside B and 8-deacetylmatricarin-8-O-sulfate). Further flowering plants in the daisy family Asteraceae were examined for the above three compounds. The comparison between the lettuce butt end and the leaves of five types of the *Cichorieae* tribe showed an accumulation of the compounds in the butt end. Additional experiments addressed the impact of sesquiterpene lactones on color formation, but did not lead to concrete results.

A characteristic feature of sesquiterpene lactones is their bitter taste. Taste dilution analyses of n-butanol extract and the isolated sesquiterpene lactones showed a clear influence of these compounds on the overall bitterness of iceberg lettuce. The bitter threshold values of the new compounds were 30 ppm for jaquinelin-8-O-sulfate, 25 ppm and 50 ppm for cichoriosid B for 8-deacetylmatricarin-8-O-sulfate. The bitter threshold for lettucenin A was set to 15 ppm.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Salat erntereif (links) und durchbrochen (rechts)	4
Abbildung 2: Bildung der Aminosäure Phenylalanin über den Shikimisäureweg.....	10
Abbildung 3: Bildung des Chalkons über den Phenylpropanoidweg	11
Abbildung 4: Strukturklassen der Flavonoide.....	13
Abbildung 5: Hydroxycimtsäurederivate im Eisbergsalat	16
Abbildung 6: Flavonoide im Eisbergsalat.....	17
Abbildung 7: Biosynthese der Sesquiterpenlactone [48].....	20
Abbildung 8: Vertreter der Guaianolide in <i>Lactuca Sativa</i> var. <i>capitata</i>	21
Abbildung 9: Vertreter der Germacranolide in <i>Lactuca Sativa</i> var. <i>capitata</i>	22
Abbildung 10: Ungebräunte (links) und gebräunte (rechts) Lebensmittel im Vergleich (A, Apfel; B, Eisbergsalat; C, Avocado; D, Kartoffel; E, Banane)	24
Abbildung 11: Nicht fermentierter (links) und fermentierter (rechts) Tee (A) und Rooibos (B) im Vergleich.....	25
Abbildung 12: Reaktionsmechanismen der enzymatischen Bräunung: Initialer Schritt (A+B) und Folgereaktionen (C-F)	27
Abbildung 13: Die wichtigsten Flavan-3-ole im Tee	30
Abbildung 14: Übersicht der o-Chinon-Bildung und der Folgereaktionen im Tee	31
Abbildung 15: Strukturen der Theasinensine A-G.....	32
Abbildung 16: Struktur von Oolongtheanin	32
Abbildung 17: Hauptstrukturen der Theaflavin-Gruppe	33
Abbildung 18: Weitere Theaflavine	34
Abbildung 19: Aspalathin (A) und seine Dimere (B).....	35
Abbildung 20: Bildung farbiger Oxidationsprodukte im Rooibos	36
Abbildung 21: Bildungsmechanismus der Phloridzinoxidationsprodukte.....	37
Abbildung 22: Vergleich von frischem (links) und gebräuntem Eisbergsalatstrunk (rechts), geschnitten (A) und unter dem Mikroskop (B, C)	38
Abbildung 23: Postulierte Biosynthese von Lettucenin A	40
Abbildung 24: Strukturen der Lettucenin-Gruppe.....	41
Abbildung 25: HPLC-Chromatogramm und Farbverdünnungsanalyse eines Diethylether-Extraktes von gebräuntem Eisbergsalat	42
Abbildung 26: PPO-katalysierte Oxidation von Tyrosin.....	43

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Taxonomische Einordnung der verwendeten Salatsorten in den Publikationen A-C	6
Tabelle 2: Ausgewählte Inhaltsstoffe von Eisbergsalat im Vergleich zu den verwendeten Salatsorten in den Publikationen A-C. [19; 20]	8
Tabelle 3: Einteilung der Polyphenole [23; 22].....	9
Tabelle 4: Einteilung der Isoprenoide [42; 24; 21].....	18

9 Abkürzungsverzeichnis

CoA	Coenzym A
convar.	convarietas, Konvarietät
DAD	Diodenarraydetektor
DMAPP	Dimethylallylpyrophosphat
DOPA	Dihydroxyphenylalanin
et al.	Und andere
FG	Frischgewicht
FPP	Farnesylpyrophosphat
GPP	Geranylpyrophosphat
HPLC	high performance liquid chromatography Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HR-MS	high resolution molecular spectroscopy
IPP	Isopentenylpyrophosphat
L.	Carl von Linné
MLCCC	multilayer countercurrent chromatography Gegenstromverteilungschromatographie
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Massenspektrometrie/Massenspektrometrie
NMR	Nuclear magnetic resonance
o-	ortho
PAL	Phenylalanin-Ammoniak-Lyase
POD	Peroxidase
PP	Pyrophosphat
PPO	Polyphenoloxidase
p-	para
ESI-QTOF	Flugzeitmassenspektrometer
RP	reverse phase, Umkehrphasen-
TM	Trockenmasse
UHPLC	ultra high performance liquid chromatography
USA	Die Vereinigten Staaten von Amerika
UV	Ultraviolett
var.	varietas, Varietät

10 Literaturverzeichnis

- [1] *Sutor, P.; Neuberger, S.; Steinbacher, N.*: Agrarbericht 2016. Gemüse. Hrsg.: Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL).
http://www.lfl.bayern.de/mam/cms07/iem/dateien/06_gemüse__by_.pdf, abgerufen am 06. Juni 2017
- [2] Durchführungsverordnung (EU) Nr. 543/2011 der Kommission mit Durchführungsbestimmungen zur Verordnung (EG) Nr. 1234/2007 des Rates für die Sektoren Obst und Gemüse und Verarbeitungserzeugnisse aus Obst und Gemüse (VO 543/2011/EU). ABl. (Amtsblatt der Europäischen Union) (2011) Nr. L 157, S. 1–163
- [3] *Brecht, J. K.*: Physiology of Lightly Processed Fruits and Vegetables. HortScience (1995) Nr. 30, S. 18–22
- [4] *Mateos, M.; Ke, D.; Cantwell, M.; Kader, A. A.*: Phenolic metabolism and ethanolic fermentation of intact and cut lettuce exposed to CO₂-enriched atmospheres. Postharvest Biol. Technol. 3 (1993) Nr. 3, S. 225–233
- [5] *Toivonen, P. M.; Brummell, D. A.*: Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables. Postharvest Biol. Technol. 48 (2008) Nr. 1, S. 1–14
- [6] *Martinez, M.; Whitaker, J. R.*: The biochemistry and control of enzymatic browning. Trends Food Sci Technol 6 (1995) Nr. 6, S. 195–200
- [7] *Muneta, P.*: Comparisons of Inhibitors of Tyrosine Oxidation in the enzymatic blackening of potatoes. Am Potato J 58 (1981) Nr. 2, S. 85–92
- [8] *Jäger, E. J.; Neumann, S.; Ohmann, E.*: Botanik. Mit 28 Tabellen. 5., neu bearb. Aufl., [Nachdr.]. Spektrum Akad. Verl., Heidelberg 2009
- [9] *Heß, D.*: Systematische Botanik. UTB basics. 2673. 1. Aufl. Ulmer, Stuttgart 2005
- [10] *Strasburger, E.; Sitte, P.*: Lehrbuch der Botanik für Hochschulen. Spektrum-Lehrbuch. 35. Aufl. Spektrum Akad. Verl., Heidelberg 2002
- [11] *Bickel-Sandkötter, S.*: Nutzpflanzen und ihre Inhaltsstoffe. Quelle & Meyer Biologie Botanik. 2., unveränd. Aufl. Quelle & Meyer, Wiebelsheim 2003
- [12] *Jäger, E. J.; Ebel, F.; Hanelt, P.; Müller, G.* (Hrsg.): Exkursionsflora von Deutschland. Springer Spektrum, Berlin 2016
- [13] *Rauh, W.*: Morphologie der Nutzpflanzen. Klassiker der Botanik. Reprint der 2. Aufl. 1950. Quelle & Meyer, Heidelberg 1994

- [14] *Ryder, E. J.*: Lettuce, endive and chicory. Crop production science in horticulture. 9. CABI Pub, New York, NY 1999
- [15] *Behr, H.-C.*: AMI Markt Bilanz Gemüse 2017. Agrarmarkt Informations-Gesellschaft mbH (2017)
- [16] *Bernd Hartmann*: Bundeslebensmittelschlüssel. Hrsg.: Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft. <https://www.blsdb.de/>, abgerufen am 18. Mai 2017
- [17] USDA Branded Food Products Database. Hrsg.: United States Department of Agriculture. <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list>, abgerufen am 20. Dezember 2018
- [18] *Hedges, L. J.; Lister, C. E.*: Nutritional attributes of salad vegetables. Crop & Food Research Confidential Report No. 1473, Christchurch 2005.
- [19] *Crosby, D. G.*: The Organic Constituents of Food. I. Lettuce. J Food Science 28 (1963) Nr. 3, S. 347–355
- [20] *DuPont, M. S.; Mondin, Z.; Williamson, G.; Price, K. R.*: Effect of Variety, Processing, and Storage on the Flavonoid Glycoside Content and Composition of Lettuce and Endive. J. Agric. Food Chem. 48 (2000) Nr. 9, S. 3957–3964
- [21] *Heimler, D.; Isolani, L.; Vignolini, P.; Tombelli, S.; Romani, A.*: Polyphenol content and antioxidative activity in some species of freshly consumed salads. J. Agric. Food Chem. 55 (2007) Nr. 5, S. 1724–1729
- [22] *Flick, G.; Meier, J.; Schultze, D.*: Bitter principles of iceberg lettuce (*Lactuca sativa*) as a criterion for cultivation assessment of head lettuce. VDLUFA-Schriftenr (2004) Nr. 59, S. 510–515
- [23] *Nuhn, P.; Wessjohann, L.*: Naturstoffchemie. Mikrobielle, pflanzliche und tierische Naturstoffe. 4., neu bearb. Aufl. Hirzel, Stuttgart 2006
- [24] *Crozier, A.; Jaganath, I. B.; Clifford, M. N.*: Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. Nat Prod Rep 26 (2009) Nr. 8, S. 1001–1043
- [25] *Harborne, J. B.*: Classes and Functions of secondary product from Plants. In: *Walton, N. J.; Brown, D. E.* (Hrsg.): Chemicals from Plants. World Scientific and Imperial College Press 1999, S. 1–25
- [26] *Heldt, H.-W.; Piechulla, B.*: Pflanzenbiochemie. 5., überarb. u. aktual. Aufl. Springer Spektrum, Berlin 2015

- [27] *Merken, H. M.; Beecher, G. R.*: Measurement of Food Flavonoids by High-Performance Liquid Chromatography. A Review. *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) Nr. 3, S. 577–599
- [28] *Fischer, M.; Glomb, M. A.* (Hrsg.): *Moderne Lebensmittelchemie*. 1. Aufl. Behr, Hamburg 2015
- [29] *Singh, R. P.; Pandey, V. B.*: Nivetin, a neoflavonoid from *Echinops niveus*. *Phytochemistry* 29 (1990) Nr. 2, S. 680–681
- [30] *Robards, K.; Prenzler, P. D.; Tucker, G.; Swatsitang, P.; Glover, W.*: Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.* 66 (1999) Nr. 4, S. 401–436
- [31] *Hertog, M.; Feskens, E.; Kromhout, D.; Hollman, P.; Katan, M.*: Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease. The Zutphen Elderly Study. *Lancet* 342 (1993) Nr. 8878, S. 1007–1011
- [32] *Ross, J. A.; Kasum, C. M.*: Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu. Rev. Nutr.* 22 (2002), S. 19–34
- [33] *Wöldecke, M.; Herrmann, K.*: Flavonoide und Flavone der Gemüsearten. 4. Flavonole und Flavone des Kopfsalates und der Endivien. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* (1974) Nr. 156, S. 153–157
- [34] *Ke, D.; Saltveit, M. E.*: Plant Hormone Interaction and Phenolic Metabolism in the Regulation of Russet Spotting in Iceberg Lettuce. *Plant Physiol.* 88 (1988) Nr. 4, S. 1[7; 89; 90]136–1140
- [35] *Tomás-Barberán, F. A.; Gil, M. I.; Castañer, M.; Artés, F.; Saltveit, M. E.*: Effect of Selected Browning Inhibitors on Phenolic Metabolism in Stem Tissue of Harvested Lettuce. *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) Nr. 3, S. 583–589
- [36] *Llorach, R.; Tomás-Barberán, F. A.; Ferreres, F.*: Lettuce and chicory byproducts as a source of antioxidant phenolic extracts. *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) Nr. 16, S. 5109–5116
- [37] *Baur, S.; Klaiber, R. G.; Kablo, A.; Carle, R.*: Effect of different washing procedures on phenolic metabolism of shredded, packaged iceberg lettuce during storage. *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) Nr. 23, S. 7017–7025
- [38] *Degl'Innocenti, E.; Pardossi, A.; Tattini, M.; GUIDI, L.*: Phenolic compounds and antioxidant power in minimally processed salad. *J. Food Biochem.* 32 (2008) Nr. 5, S. 642–653

- [39] *Llorach, R.; Martínez-Sánchez, A.; Tomás-Barberán, F. A.; Gil, M. I.; Ferreres, F.*: Characterisation of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole. *Food Chem.* 108 (2008) Nr. 3, S. 1028–1038
- [40] *Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L.*: Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 79 (2004) Nr. 5, S. 727–747
- [41] *Cantos, E.; Espín, J. C.; Tomás-Barberán, F. A.*: Effect of Wounding on Phenolic Enzymes in Six Minimally Processed Lettuce Cultivars upon Storage. *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) Nr. 1, S. 322–330
- [42] *Mai, F.; Glomb, M. A.*: Isolation of phenolic compounds from iceberg lettuce and impact on enzymatic browning. *J. Agric. Food Chem.* 61 (2013) Nr. 11, S. 2868–2874
- [43] *Abu-Reidah, I. M.; Contreras, M. M.; Arráez-Román, D.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A.*: Reversed-phase ultra-high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry as a powerful tool for metabolic profiling of vegetables: *Lactuca sativa* as an example of its application. *J Chromatogr A* 1313 (2013), S. 212–227
- [44] *Sessa, R. A.; Bennett, M. H.; Lewis, M. J.; Mansfield, J. W.; Beale, M. H.*: Metabolite profiling of sesquiterpene lactones from *Lactuca* species. Major latex components are novel oxalate and sulfate conjugates of lactucin and its derivatives. *J. Biol. Chem.* 275 (2000) Nr. 35, S. 26877–26884
- [45] *Beyer, H.; Walter, W.; Francke, W.*: Lehrbuch der organischen Chemie. 23., überarb. und aktualisierte Aufl. Hirzel, Stuttgart 1998
- [46] *Schmidt, T. J.*: Toxic Activities of Sesquiterpene Lactones: Structural and Biochemical Aspects. *Curr Org Chem* (1999) Nr. 3, S. 577–608
- [47] *Picman, A. K.*: Biological activities of sesquiterpene lactones. *Biochem. Syst. Ecol.* 14 (1986) Nr. 3, S. 255–281
- [48] *Bischoff, T. A.; Kelley, C. J.; Karchesy, Y.; Laurantos, M.; Nguyen-Dinh, P.; Arefi, A. G.*: Antimalarial activity of lactucin and lactucopicrin: sesquiterpene lactones isolated from *Cichorium intybus* L. *J Ethnopharmacol* 95 (2004) Nr. 2-3, S. 455–457
- [49] *Rodríguez, E.; Towers, G.; Mitchell, J. C.*: Biological activities of sesquiterpene lactones. *Phytochemistry* 15 (1976) Nr. 11, S. 1573–1580
- [50] *Schall, A.; Reiser, O.*: Synthesis of Biologically Active Guaianolides with atrans-Annulated Lactone Moiety. *Eur. J. Org. Chem.* 2008 (2008) Nr. 14, S. 2353–2364

- [51] *Kraker, J.-W.* de: Biosynthesis of Germacrene A Carboxylic Acid in Chicory Roots. Demonstration of a Cytochrome P450 (+)-Germacrene A Hydroxylase and NADP+-Dependent Sesquiterpenoid Dehydrogenase(s) Involved in Sesquiterpene Lactone Biosynthesis. *Plant Physiol.* 125 (2001) Nr. 4, S. 1930–1940
- [52] *Zidorn, C.*: Sesquiterpene lactones and their precursors as chemosystematic markers in the tribe Cichorieae of the Asteraceae. *Phytochemistry* 69 (2008) Nr. 12, S. 2270–2296
- [53] *Price, K. R.; DuPont, M. S.; Shepherd, R.; Chan, H. W.-S.; Fenwick, G. R.*: Relationship between the chemical and sensory properties of exotic salad crops—coloured lettuce (*Lactuca sativa*) and chicory (*Cichorium intybus*). *J. Sci. Food Agric.* 53 (1990) Nr. 2, S. 185–192
- [54] *St. Pyrek, J.*: Sesquiterpene lactones of *Cichorium intybus* and *Leontodon autumnalis*. *Phytochemistry* 24 (1985) Nr. 1, S. 186–188
- [55] *Mahmoud, Z. F.; Kassem, F. F.; Abdel-Salam, N. A.; Zdero, C.*: Sesquiterpene lactones from *Lactuca sativa*. *Phytochemistry* 25 (1986) Nr. 3, S. 747–748
- [56] *Michalska, K.; Stojakowska, A.; Malarz, J.; Doležalová, I.; Lebeda, A.; Kisiel, W.*: Systematic implications of sesquiterpene lactones in *Lactuca* species. *Biochem. Syst. Ecol.* 37 (2009) Nr. 3, S. 174–179
- [57] *Beharav, A.; Ben-David, R.; Malarz, J.; Stojakowska, A.; Michalska, K.; Doležalová, I.; Lebeda, A.; Kisiel, W.*: Variation of sesquiterpene lactones in *Lactuca aculeata* natural populations from Israel, Jordan and Turkey. *Biochem. Syst. Ecol.* 38 (2010) Nr. 4, S. 602–611
- [58] *Mai, F.; Glomb, M. A.*: Structural and Sensory Characterization of Novel Sesquiterpene Lactones from Iceberg Lettuce. *J. Agric. Food Chem.* 64 (2016) Nr. 1, S. 295–301
- [59] *Takasugi, M.; Okinaka, S.; Katsui, N.; Masamune, T.; Shirata, A.; Ohuchi, M.*: Isolation and structure of lettucenin A, a novel guaianolide phytoalexin from *Lactuca sativa* var. *capitata*(Compositae). *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1985) Nr. 10, S. 621
- [60] *Mai, F.; Glomb, M. A.*: Lettucenin sesquiterpenes contribute significantly to the browning of lettuce. *J. Agric. Food Chem.* 62 (2014) Nr. 20, S. 4747–4753
- [61] *Brockhoff, A.; Behrens, M.; Massarotti, A.; Appendino, G.; Meyerhof, W.*: Broad tuning of the human bitter taste receptor hTAS2R46 to various sesquiterpene

- lactones, clerodane and labdane diterpenoids, strychnine, and denatonium. *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) Nr. 15, S. 6236–6243
- [62] *Marquès, L.; Fleuriet, A.; Macheix, J. J.*: Fruit Polyphenol Oxidases. In: *Lee, C. Y.; Whitaker, J. R.* (Hrsg.): *Enzymatic Browning and Its Prevention*. ACS symposium series. American Chemical Society, Washington, DC 1995, S. 90–102
- [63] *Marshall M.R.; Kim J.; Wei C.*: Enzymatic Browning in Fruits, Vegetables and Seafoods. *Agric. Serv. Bull.* (2000)
- [64] *Müller, K. O.; Börger, H.*: Experimentelle Untersuchungen über die Phytophthora-Resistenz der Kartoffel. *Arb. Biol. Reichsanstalt. Landw. Forstw.* (1940) Nr. 23, S. 189–231
- [65] *Pflanzenforschung.de*: Lexikon A-Z. Hrsg.: Dr. Jens Freitag.
<http://www.pflanzenforschung.de/de/themen/lexikon/phytoalexine-1140>, abgerufen am 13. November 2018
- [66] *Carle, R.*: Phytoalexine und ihre Bedeutung für die Resistenz höherer Pflanzen gegenüber Schadorganismen. *Pharm. Unserer Zeit* 21 (1992) Nr. 3, S. 99–104
- [67] *Whitaker, J. R.; Lee, C. Y.*: Recent Advances in Chemistry of Enzymatic Browning. In: *Lee, C. Y.* (Hrsg.): *Enzymatic browning and its prevention*. Developed from a symposium ... Washington, DC, August 21 - 26, 1994. ACS symposium series. 600. American Chemical Soc, Washington, DC 1995, S. 2–7
- [68] *Bittner, S.*: When quinones meet amino acids: chemical, physical and biological consequences. *Amino Acids* 30 (2006) Nr. 3, S. 205–224
- [69] *Haller-Zingerling, C.*: *Die Welt des Tees*. Neuer Umschau Buchverl., Neustadt an der Weinstraße 2014
- [70] *Haslam, E.*: Thoughts on thearubigins. *Phytochemistry* 64 (2003) Nr. 1, S. 61–73
- [71] *Matsuo, Y.; Tanaka, T.; Kouno, I.*: Production mechanism of proepitheafлагallin, a precursor of benzotropolone-type black tea pigment, derived from epigallocatechin via a bicyclo[3.2.1]octane-type intermediate. *Tetrahedron Lett.* 50 (2009) Nr. 12, S. 1348–1351
- [72] *Anesini, C.; Ferraro, G. E.; Filip, R.*: Total polyphenol content and antioxidant capacity of commercially available tea (*Camellia sinensis*) in Argentina. *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) Nr. 19, S. 9225–9229
- [73] *Graham, H. N.*: Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Prev. Med.* 21 (1992) Nr. 3, S. 334–350

- [74] *Kuhnert, N.*: Unraveling the structure of the black tea thearubigins. *Arch. Biochem. Biophys.* 501 (2010) Nr. 1, S. 37–51
- [75] *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.* 36 (1988) Nr. 5, S. 1676–1684
- [76] *Matsuo, Y.; Tanaka, T.; Kouno, I.*: A new mechanism for oxidation of epigallocatechin and production of benzotropolone pigments. *Tetrahedron* 62 (2006) Nr. 20, S. 4774–4783
- [77] *Yanase, E.; Sawaki, K.; Nakatsuka, S.-i.*: The Isolation of a Bicyclo[3.2.1] Intermediate During Formation of Benzo-tropolones, a Common Nucleus Found in Black Tea Pigments. *Theaflavins. Synlett* (2005) Nr. 17, S. 2661–2663
- [78] *Wan, X.; Nursten, H. E.; Cai, Y.; Davis, A. L.; Wilkins, J. P. G.; Davies, A. P.*: A New Type of Tea Pigment—From the Chemical Oxidation of Epicatechin Gallate and Isolated from Tea. *J. Sci. Food Agric.* 74 (1997) Nr. 3, S. 401–408
- [79] *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* 59 (2003) Nr. 40, S. 7939–7947
- [80] *Morton, J. F.*: Rooibos tea, *aspalathus linearis*, a caffeineless, low-tannin beverage. *Econ. Bot.* 37 (1983) Nr. 2, S. 164–173
- [81] *Krafczyk, N.; Glomb, M. A.*: Characterization of phenolic compounds in rooibos tea. *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) Nr. 9, S. 3368–3376
- [82] *Krafczyk, N.; Heinrich, T.; Porzel, A.; Glomb, M. A.*: Oxidation of the dihydrochalcone aspalathin leads to dimerization. *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) Nr. 15, S. 6838–6843
- [83] *Heinrich, T.; Willenberg, I.; Glomb, M. A.*: Chemistry of color formation during rooibos fermentation. *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) Nr. 20, S. 5221–5228
- [84] *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.* 8 (2007) Nr. 3, S. 443–450

- [85] *Le Guernevé, C.; Sanoner, P.; Drilleau, J.-F.; Guyot, S.*: New compounds obtained by enzymatic oxidation of phloridzin. *Tetrahedron Lett.* 45 (2004) Nr. 35, S. 6673–6677
- [86] *Murata, M.; Tanaka, E.; Minoura, E.; Homma, S.*: Quality of cut lettuce treated by heat shock: prevention of enzymatic browning, repression of phenylalanine ammonia-lyase activity, and improvement on sensory evaluation during storage. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 68 (2004) Nr. 3, S. 501–507
- [87] *Bennett, M.*: Cloning and expression of sesquiterpene synthase genes from lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Phytochemistry* 60 (2002) Nr. 3, S. 255–261
- [88] *Ikezawa, N.; Gopfert, J. C.; Nguyen, D. T.; Kim, S.-U.; O'Maille, P. E.; Spring, O.; Ro, D.-K.*: Lettuce costunolide synthase (CYP71BL2) and its homolog (CYP71BL1) from sunflower catalyze distinct regio- and stereoselective hydroxylations in sesquiterpene lactone metabolism. *J. Biol. Chem.* 286 (2011) Nr. 24, S. 21601–21611
- [89] *Friedman, M.*: Chemistry, Biochemistry, and Dietary Role of Potato Polyphenols. A Review. *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) Nr. 5, S. 1523–1540
- [90] *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.* 26 (2002) Nr. 1, S. 99–111
- [91] *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. *Food Sci. Technol. Res.* 10 (2004) Nr. 1, S. 75–78

11 Originalarbeiten

Publikation A

Mai, F.; Glomb, M.A.: Isolation of Phenolic Compounds from Iceberg Lettuce and Impact on Enzymatic Browning. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, Volume 61, Issue 11, pages 2868–2874, March **2013**; DOI: 10.1021/jf305182u

Reprinted with permission from ACS Publikations Copyright Clearance Center.
Copyright © 2013, American Chemical Society

Publikation B

Mai, F.; Glomb, M.A.: Lettucenin Sesquiterpenes Contribute Significantly to the Browning of Lettuce. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, Volume 62, Issue 20, pages 4747-4753, May **2014**; DOI: 10.1021/jf500413h

Reprinted with permission from ACS Publikations Copyright Clearance Center.
Copyright © 2014, American Chemical Society

Publikation C

Mai, F.; Glomb, M.A.: Structural and Sensory Characterization of Novel Sesquiterpene Lactones from Iceberg Lettuce *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, Volume 64, Issue 11, pages 295-301, January **2016**; DOI: 10.1021/acs.jafc.5b05128

Reprinted with permission from ACS Publikations Copyright Clearance Center.
Copyright © 2016, American Chemical Society

Isolation of Phenolic Compounds from Iceberg Lettuce and Impact on Enzymatic Browning

Franziska Mai and Marcus A. Glomb*

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

ABSTRACT: Enzymatic browning is generally reported as the reaction between phenolic substances and enzymes. The quality of iceberg lettuce is directly linked to this discoloration. In particular, the color change of lettuce stems considerably reduces consumer acceptance and thus decreases sales revenue of iceberg lettuce. Ten phenolic compounds (caffeic acid, chlorogenic acid, phaseolic acid, chicoric acid, isochlorogenic acid, luteolin-7-*O*-glucuronide, quercetin-3-*O*-glucuronide, quercetin-3-*O*-galactoside, quercetin-3-*O*-glucoside, and quercetin-3-*O*-(6''-malonyl)-glucoside) were isolated from *Lactuca sativa* var. *capitata* by multilayer countercurrent chromatography (MLCCC) and preparative high-performance liquid chromatography (HPLC). In addition, syringin was identified for the first time in iceberg lettuce. This polyphenolic ingredient was previously not mentioned for the family of Cichorieae in general. The purity and identity of isolated compounds were confirmed by different NMR experiments, HPLC-DAD-MS, and HR-MS techniques. Furthermore, the relationship between discoloration of iceberg lettuce and enzymatic browning was thoroughly investigated. Unexpectedly, the total concentration of phenolic compounds and the activity of polyphenol oxidase were not directly related to the browning processes. Results of model incubation experiments of plant extract solutions led to the conclusion that in addition to the typical enzymatic browning induced by polyphenol oxidases, further mechanisms must be involved to explain total browning of lettuce.

KEYWORDS: iceberg lettuce, *Lactuca sativa* var. *capitata*, multilayer countercurrent chromatography (MLCCC), enzymatic browning, phenolic compounds

INTRODUCTION

Lettuces are the most popular vegetables in the world and are consumed in increasing amounts due to their potential beneficial health effects. Favorite species are butterhead, romaine, and, most importantly, iceberg lettuce. In 2010 the consumption per private household in Germany was 2.8 kg.¹ Crispy texture, fresh green color, and in particular the absence of browning are desirable properties and contribute to the acceptance of foods. Such properties are most relevant to vegetables such as lettuce; consumers associate them with freshness and wholesomeness.^{2,3}

Browning of lettuce after minimal processing is one of the main causes of quality loss. The organoleptic and biochemical characteristics are significantly modified by the appearance of brown pigments, resulting in rejection by consumers. Iceberg lettuce tends to brown very rapidly specifically on the lettuce stem after harvesting, which complicates the storage of intact or processed heads.⁴ To prevent these processes physical or chemical treatments are needed. It is a matter of common knowledge that the quality and shelf life of lettuce vary depending on cultivar, maturity, processing, and storage conditions.^{5–7} Nevertheless, information on the molecular basis of tissue browning is limited.

After wounding of plant material, two biochemical key processes start. On the one hand, activation of the phenylpropanoid metabolism is induced by phenylalanine ammonia-lyase (PAL, EC 4.3.1.5), resulting in an accumulation of phenolic compounds.⁸ On the other hand, wounding causes cellular disruption leading to exposure of phenolic substrates to polyphenol oxidase (PPO, EC 1.14.18.1). Generally, PPO catalyzes both hydroxylation of monophenols to *o*-diphenols

and oxidation of colorless *o*-diphenols to *o*-quinones.⁹ Then the *o*-quinones condense spontaneously with other *o*-quinones, polyphenols, and many other plant constituents such as proteins and carbohydrates to form high molecular weight polymers. These tannin-like compounds are the brown, red, or dark pigments in injured vegetable tissues.^{10,11} PPO has a broad specificity toward different phenolic substrates.¹⁰ Especially for iceberg lettuce, studies have shown that lettuce PPO can exclusively oxidize *o*-diphenols. On the contrary, no reactivity was found for monohydroxy and 1,2,3-trihydroxy substrates. PPOs isolated from photosynthetic or vascular tissues of lettuce indicated almost identical properties.¹² However, a comparison of PPO activities in the various parts of lettuce tissues including the stem has not been published.

Caffeoyl derivatives and flavonoids, especially quercetin and luteolin glycosides, represent typical polyphenolic compounds in iceberg lettuce. Among them, dicaffeoyl tartaric esters belong to the quantitatively major compounds.^{13,14}

Many studies were conducted to gain insights into the mechanistic relationships between phenolic compounds and enzymatic catalyzed reactions in general. Caffeoyl derivatives led to a larger increase in enzymatic browning in comparison to flavonoids. Thus, they obviously play a significant role as substrates for polyphenol oxidases.¹⁵ Furthermore, extensive investigations were carried out to describe the beneficial effects

Received: December 4, 2012

Revised: February 18, 2013

Accepted: February 23, 2013

Published: March 8, 2013

of physical or chemical treatments on the prevention of discoloration.^{4,8}

However, for lettuce and also other kinds of fruits or vegetables, no precise relationship was reported for browning potential, PPO activity, and total or individual phenol accumulation or degradation.^{16–18} Besides the chemistry of black tea fermentation, specific products of enzymatic browning were characterized very scarcely and, in addition, to the best of our knowledge, no study exists describing the relationship of PPOs and enzymatic browning in various tissues of the same plant.

On the basis of isolated phenols from iceberg lettuce, this work investigates the influence of specific phenolic compounds leading to colored structures during the browning processes on cut interfaces and bruised areas. With the present work, we correlate the intensive tissue browning particularly of the lettuce stem to changes in phenolic content.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. Chemicals of the highest quality available were obtained from Roth (Karlsruhe, Germany) unless otherwise indicated. Methanol (HPLC grade), caffeic acid, chlorogenic acid, catechol, gallic acid, polyvinyl pyrrolidone (PVP, K15), and tyrosinase from mushroom (PPO, EC 1.14.18.1) were purchased from Sigma-Aldrich (Taufenkirchen, Germany). Methanol-*d*₄ (CD₃OD) and dimethyl-*d*₆ sulfoxide (DMSO-*d*₆) were obtained from Chemotrade (Leipzig, Germany). Folin–Ciocalteu's phenol reagent was ordered from Merck (Darmstadt, Germany).

Plant Materials. Lettuce and nashi pears were obtained from local wholesale markets in Germany. The lettuce heads were prepared for further processing by removing and discarding wrapper leaves and brown spots. For isolation of polyphenols, the material was freeze-dried and stored at 5 °C until use. For some experiments, the fresh lettuce head was separated into four tissue types: green leaves, yellow leaves, stem, and a mix of the entire head. Each lot was cut into squares (1 × 1 cm) using a sharp ceramic knife and mixed thoroughly. The material was separated in three fractions. One fraction of fresh-cut plant material was used for purification of polyphenol oxidase. The second fraction was stored into freezer bags, freeze-dried, and stored at –20 °C until used (hereinafter called “fresh sliced”). For browning, the last fraction was packed into Petri dishes and kept at room temperature. After 24 h, the brown material was treated just like the second fraction (hereinafter called “24-h-aged sliced”).

Extraction of Plant Material. For isolation of polyphenols, 100 g of freeze-dried material was extracted with acetone/water (7:3 v/v, 1.5 L) at 5 °C for 24 h under argon atmosphere. The filtrates were concentrated under reduced pressure (<30 °C) until complete evaporation of acetone. The residual aqueous solution was successively extracted with diethyl ether (2 × 200 mL), ethyl acetate (2 × 200 mL), and *n*-butanol (2 × 200 mL). The ethyl acetate and *n*-butanol extracts were evaporated to dryness, and the residues were used for multilayer countercurrent chromatography (MLCCC).

For comparative studies on browning, 1 g of freeze-dried fresh sliced and of 24-h-aged sliced tissue types of iceberg lettuce were extracted with 10 mL acetone/water (7:3 v/v) at 5 °C under argon atmosphere. After 24 h, the samples were centrifuged at 4500 rpm for 10 min. A 1 mL aliquot of the clarified supernatant was dried under an argon stream. A 5 mL aliquot was concentrated under reduced pressure (<30 °C) until complete evaporation of acetone. The residue was extracted two times with 2 mL of diethyl ether. The combined diethyl ether phases were dried under argon stream.

Analytical HPLC-DAD-MS. A Jasco (Gross-Umstadt, Germany) quaternary gradient unit PU 2080, with degasser DG 2080-54, autosampler AS 2055, column oven (Jasco Jetstream II), and multiwavelength detector MD 2015 was used. Alternatively, the detector was coupled to an API 4000 triple-quadrupole mass spectrometer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Chromatographic separations were performed on stainless steel columns (Vydac

CRT. 218TP54, 250 × 4.0 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). To both solvents (A and B) was added 0.8 mL/L formic acid. Samples were analyzed using two different gradient systems. In gradient system 1, samples were injected at 10% B and held for 10 min, then the gradient was changed linearly to 65% B in 55 min and to 100% B in 5 min, and held at 100% B for 10 min. In gradient system 2, samples were injected at 50% B and held for 10 min. The gradient was changed linearly to 100% B in 60 min and held at 100% B for 10 min. The column temperature was always 25 °C. The effluent was monitored at 280 and 420 nm.

MS ionization was achieved using the Turbospray ionization source operated in positive and negative ion modes. Turbospray settings were as follows: curtain gas (N₂) at 40 psi, ion source gas 1 at 50 psi, ion source gas 2 at 60 psi, with source temperature at 500 °C and ion spray voltage at 4500 V and –4500 V, respectively. The total ion current (TIC) chromatogram with a scan range between 100 and 700 mass-to-charge units and mass spectral data on precursor ions were detected. Declustering potential, entrance potential, collision energy, and cell exit potential were optimized for each analyte.

MLCCC. The MLCCC system (Ito, Multilayer Separator-Extractor model, P. C. Inc., Potomac, MD, USA) was equipped with a Waters constant flow pump (model 6000 A), a Kontron spectrophotometer operating at 280 nm, and a sample injection valve with a 10 mL sample loop. Eluted liquids were collected in fractions of 8 mL with a fraction collector (LKB Ultrarac 7000). Chromatograms were recorded on a plotter (Servogor 200). The multilayer coil was prepared from a 1.6 mm inner diameter polytetrafluoroethylene (PTFE) tubing. The total capacity was 290 mL. The MLCCC was run at a revolution speed of 790 rpm and a flow rate of 2 mL/min in head-to-tail modus.

Samples of 1 g of dried extract were dissolved in a 1:1 mixture of light and heavy phase (10 mL) and injected into the system. Ethyl acetate extracts were separated by using water/ethyl acetate (1:1 v/v; solvent system A), and *n*-butanol extracts were isolated by using water/ethyl acetate/*n*-butanol (5:2:3 v/v; solvent system B).

Preparative HPLC-UV. A Besta HD 2-200 pump (Wilhelmsfeld, Germany) was used at a flow rate of 8 mL/min. Elution of materials was monitored by an UV detector (Jasco UV-2075, Gross-Umstadt, Germany). Chromatographic separations were performed on a stainless steel column (Vydac CRT. 218TP1022, 250 × 23 mm, RP 18, 10 μm). The mobile phases used were solvents A and B, identical to the analytical HPLC-DAD system. An isocratic method was chosen according to the characteristics of the target structures. From the individual chromatographic fractions, solvents were removed under reduced pressure. After addition of water, solutions of polyphenols were freeze-dried.

Accurate Mass Determination (HR-MS). The high-resolution positive and negative ion ESI mass spectra were obtained from a Bruker Apex III Fourier transform ion cyclotron resonance (FT-ICR) mass spectrometer (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) equipped with an Infinity cell, a 7.0 T superconducting magnet (Bruker, Karlsruhe, Germany), a radio frequency (RF)-only hexapole ion guide, and an external electrospray ion source (APollo; Agilent, off-axis spray). Nitrogen was used as the drying gas at 150 °C. The samples were dissolved in methanol, and the solutions were introduced continuously via a syringe pump at a flow rate of 120 μL/h. The data were acquired with 256K data points and zero filled to 1024K by averaging 32 scans.

Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR). NMR experiments were performed on a Varian Unity Inova 500 instrument (Darmstadt, Germany) operating at 500 MHz for ¹H and at 200 MHz for ¹³C, respectively. Samples were dissolved in either methanol-*d*₄ or dimethyl-*d*₆ sulfoxide, and all spectra were run at 27 °C. Chemical shifts are given relative to external Me₄Si and were referenced to internal CD₃OD (¹H, δ 3.310; ¹³C, δ 49.000) and DMSO-*d*₆ (¹H, δ 2.500; ¹³C, δ 39.520), respectively.

Incubation of Lettuce Extracts. Dried extracts (20 mg acetone/water, diethyl ether, ethylacetate, *n*-butanol, and water extract) were dissolved in phosphate buffer (0.2 M, pH 6.5). By diluting, an

appropriate intensity was adjusted. After the addition of 3 U of PPO solution (isolated from nashi, mushroom, or lettuce) and adjustment to 200 μL with buffer, the samples were incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 120 min. The absorbance of these solutions was measured at 420 nm every 1 min with a Tecan Infinite M200 Microplate reader including i-control software (Männedorf, Switzerland). After 90 min, the incubations reached a plateau. The corresponding absorbance change was plotted into graphs.

Purification of Lettuce PPO. PPO activities were determined in extracts prepared using a method of Fukumoto et al.,¹⁹ with some modifications. Fresh lettuce samples (fraction 1) were cut in 1 \times 1 cm squares using a ceramic knife. A 12.5 g sample was homogenized in a semimicro blender (Ultra-Turrax, IKA, Staufen, Germany) with 25 mL of chilled 0.05 M phosphate buffer (pH 6.2) and 1.88 g of PVP. The mixture was blended for 60 s, filtered through four layers of Schleicher & Schuell papers No. 905¹, and centrifuged at 4500 rpm for 30 min at 4 $^{\circ}\text{C}$. The supernatant was filtered through Schleicher & Schuell papers No. 589¹, and the clarified filtrate was kept for a maximum of 5 h on ice until assayed.

Protein Content. Protein content was measured using the method of Bradford²⁰ with bovine serum albumin (BSA from Roth, Karlsruhe, Germany) at several concentrations (0.005–0.05 mg/mL) as standard. A 500 μL aliquot of extracts or phosphate buffer (0.05 M, pH 6.2) was added to half microcuvettes. After addition of 500 μL of Bradford reagent the Parafilm-covered cuvette was inverted three times, and the absorbance was recorded at 595 nm in a Jasco V-530 UV-vis spectrometer (Gross-Umstadt, Germany).

Assay of PPO Activity. PPO activity was assayed as reported by Fukumoto et al.¹⁹ A 50 μL aliquot of extract was added to a cuvette containing 2.95 mL of 10 mM catechol solution (in 0.05 M phosphate buffer, pH 6.2). The Parafilm-covered cuvette was inverted three times, and the absorbance was recorded at 420 nm every 2 s for 120 s. Slopes for the linear portions of each resultant curve were calculated for the first 30 s of the recording. One unit of PPO activity was defined as a 0.001 absorbance unit change per minute at 420 nm. PPO activity is expressed as units per milligram protein. All data were the mean of three samples. Mean values \pm standard deviations were plotted.

Spectrophotometric Analysis. For the determination of the optical density 1 g of freeze-dried 24-h-aged sliced lettuce was extracted with methanol/water (7:3 v/v). The extracts were measured at 420 nm with a Jasco V-530 UV-vis spectrometer. Mean values of three samples \pm standard deviations were reported in the data.

Total Phenolic Determination. The total phenolic content was determined according to the Folin–Ciocalteu method. Freeze-dried material (1.5 g) was extracted with 30 mL of acetone/water (7:3 v/v) under sonication for 15 min and for 24 h at 5 $^{\circ}\text{C}$ under argon atmosphere. To 125 μL of filtered lettuce extract were added 500 μL of deionized water and 125 μL of the Folin–Ciocalteu's phenol reagent. The mixture was kept for 6 min. Then 1250 μL of 20% aqueous sodium carbonate solution and 1000 μL of water were added to a final volume of 3 mL at room temperature. After exactly 90 min, the absorption was measured at 760 nm against water as a blank using a Jasco V-530 UV-vis spectrometer. The amount of total phenolics was expressed as gallic acid equivalents (GAE, mg gallic acid/g dried sample) referenced to the calibration curve of gallic acid. The calibration curve ranged from 10 to 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($R^2 = 0.9982$). All data were mean values of triplicate analyses with standard deviations.

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation and Elucidation of Phenolic Compounds.

The extracts from iceberg lettuce (*Lactuca sativa* var. *capitata*) were screened for phenolic compounds by analytical HPLC-DAD. The qualitative determination of caffeic acid, chlorogenic acid, quercetin-3-*O*-galactoside, and quercetin-3-*O*-glucoside was carried out by comparison of retention time and UV-vis spectra of the eluting peak with authentic standards.

Basically, the ethyl acetate and *n*-butanol extracts revealed the same target structures. Therefore, both extracts were used for isolation of further phenolic substances.

The first step of purification was separation by MLCCC. Solvent system A was used for ethyl acetate extract and solvent system B for *n*-butanol extracts. Afterward, fractions containing the phenolic compounds were separated by preparative HPLC to isolate pure substances. The final structural evidence was achieved by ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance (NMR) measurements, as well as heteronuclear single-quantum coherence (HSQC), heteronuclear multiple-bond correlation (HMBC), and homonuclear correlation spectroscopy (^1H – ^1H -COSY) techniques.

The following structures were verified (Figure 1): caffeic acid 1 ($\lambda_{\text{max}} = 324$ nm), chlorogenic acid 2 ($\lambda_{\text{max}} = 326$ nm; 5-

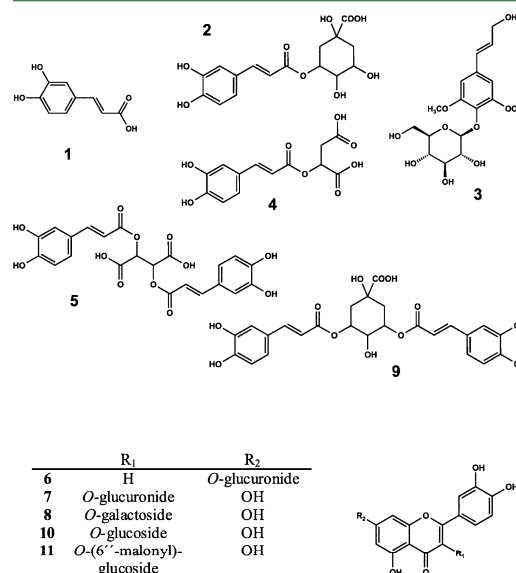


Figure 1. Phenolic compounds isolated from iceberg lettuce: 1, caffeic acid; 2, chlorogenic acid; 3, syringin; 4, phaseolic acid; 5, chicoric acid; 6, luteolin-7-*O*-glucuronide; 7, quercetin-3-*O*-glucuronide; 8, quercetin-3-*O*-galactoside; 9, isochlorogenic acid; 10, quercetin-3-*O*-glucoside; 11, quercetin-3-*O*-(6''-malonyl)-glucoside.

caffeoylquinic acid); syringin 3 ($\lambda_{\text{max}} = 271$ nm); phaseolic acid 4 ($\lambda_{\text{max}} = 329$ nm, 2-caffeoylmalic acid); chicoric acid 5 ($\lambda_{\text{max}} = 328$ nm; 2,3-dicafeoyl-*L*-tartaric acid); luteolin-7-*O*-glucuronide 6 ($\lambda_{\text{max}} = 350$ nm); quercetin-3-*O*-glucuronide 7 ($\lambda_{\text{max}} = 350$ nm); quercetin-3-*O*-galactoside 8 ($\lambda_{\text{max}} = 350$ nm); isochlorogenic acid 9 ($\lambda_{\text{max}} = 328$ nm; 3,5-dicafeoylquinic acid); quercetin-3-*O*-glucoside 10 ($\lambda_{\text{max}} = 350$ nm); and quercetin-3-*O*-(6''-malonyl)-glucoside 11 ($\lambda_{\text{max}} = 350$ nm). All compounds besides 3 have been isolated from iceberg lettuce before. NMR data of 7, 9, and 11 were in line with those of Ferreres et al.²¹ NMR data of 4, 5, and 6 were in agreement with the literature.¹⁵

Figure 2 represents a typical HPLC-DAD chromatogram of an acetone/water extract from the fresh sliced iceberg lettuce. Phenolic compounds eluted after 10 min. The acetone/water extract contained all of the isolated compounds. The

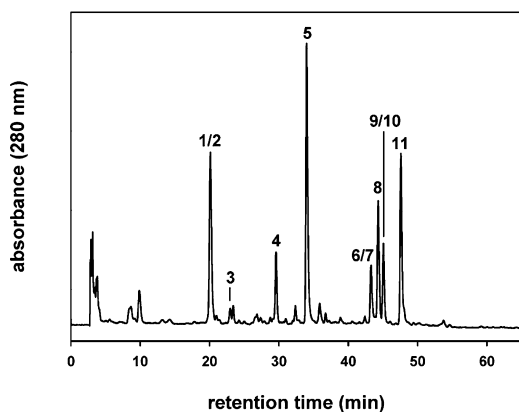


Figure 2. HPLC-DAD chromatogram of acetone/water extract from fresh iceberg lettuce. Phenolic compounds eluted after 10 min; retention times are given in parentheses: 1, caffeic acid (20.2 min); 2, chlorogenic acid (21.1 min); 3, syringin (23.0 min); 4, phaseolic acid (29.6 min); 5, chicoric acid (34.0 min); 6, luteolin-7-*O*-glucuronide (43.2 min); 7, quercetin-3-*O*-glucuronide (44.2 min); 8, quercetin-3-*O*-galactoside (44.4 min); 9, isochlorogenic acid (45.0 min); 10, quercetin-3-*O*-glucoside (45.2 min); 11, quercetin-3-*O*-(6''-malonyl)-glucoside (47.5 min).

concentrations ranged from 2 to 20 $\mu\text{g/g}$ fresh weight (FW). 4 ($3.0 \pm 0.7 \mu\text{g/g}$ FW), 6 ($5.1 \pm 0.7 \mu\text{g/g}$ FW), and 9 ($6.8 \pm 2.2 \mu\text{g/g}$ FW) were present in small amounts. Higher concentrations were quantified for 2 ($13.8 \pm 1.7 \mu\text{g/g}$ FW) and 7 ($11.1 \pm 1.2 \mu\text{g/g}$ FW). 5 and 11 were the main components, with concentrations ranging between 15.2 and 23.3 $\mu\text{g/g}$ FW for 5 and between 11.6 and 24.9 $\mu\text{g/g}$ FW for 11. Large variations in polyphenolic content (about 2 magnitude orders) have already been reported, which may be linked to the different extraction methods used.^{22–24} Nevertheless, our findings are in agreement with Degl'Innocenti et al. and Ribas-Agusti et al.^{24,25}

Compound 3 was isolated as a white crystalline substance with concentrations ranging between 6.6 and 12.8 $\mu\text{g/g}$ FW and analyzed by MS and NMR. LC-ESI-MS delivered for signal 3 a pseudomolecular ion of m/z 395.1 [$M + \text{Na}^+$]. This finding was confirmed by high-resolution mass spectrometry (found, m/z 395.13112 [$M + \text{Na}^+$]; calcd, m/z 395.13125 [$M + \text{Na}^+$] for $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_9\text{Na}$). Thin layer chromatography indicated the presence of a glucose moiety after acid hydrolysis. NMR spectral data of 3 are given in Table 1. The results of NMR spectroscopy verified the glucose moiety with ^1H signals at δ_{H} 3.03–3.58 (for H-1' to H-6') and an anomeric proton at δ_{H} 4.90 (1H, d, $^3J = 6.3$ Hz) for H-1'. In the ^{13}C NMR data the ketalic carbon signal at δ_{C} 102.6 (C-1') and the signals derived from the glucose moiety between δ_{C} 60.9 (C-6') and δ_{C} 77.2 (C-5') were confirmed. Coupling constant and chemical shift verified a β -*O*-glucopyranoside, linked to a phenylpropanoid skeleton. The presence of sinapyl alcohol was evident from ^1H NMR: δ_{H} 6.46 (1H, d, $^3J = 15.8$ Hz, H-7), 6.33 (1H, dt, $^3J = 15.8$ Hz, $^2J = 5.0$ Hz, H-8), and 4.10 (2H, d, $^3J = 5.0$ Hz, H-9). The coupling constant of $^3J = 15.8$ Hz was attributed to one pair of trans protons, which are characteristic for cinnamic acid derivatives. A meta-substituted aromatic ring system was verified by signals at δ_{H} 6.72 (2H, s, H-3 and H-5) and two *O*-methyl groups at δ_{H} 3.77 (6H, s, 2- and 6- OCH_3). The signal

Table 1. ^1H (500 MHz) and ^{13}C NMR (200 MHz) Spectroscopic Data of Syringin (in $\text{DMSO}-d_6$)^a

syringin		
C/H	$\delta^1\text{H}$ [ppm]	$\delta^{13}\text{C}$ [ppm]
1	-	133.9
2,6	-	152.7
3,5	6.72 (s, 2H)	104.5
4	-	132.6
7	6.46 (d, 1H, $^3J = 15.8$ Hz)	128.4
8	6.33 (dt, 1H, $^3J = 15.8$ Hz, $^2J = 5.0$ Hz)	130.2
9	4.10 (d, 2H, $^3J = 5.0$ Hz)	61.4
2,6- OCH_3	3.77 (s, 6H)	56.4
1'	4.90 (d, 1H, $^3J = 6.3$ Hz)	102.6
2'	3.20 (m, 1H)	74.2
3'	3.20 (m, 1H)	76.5
4'	3.13 (m, 1H)	69.8
5'	3.03 (m, 1H)	77.2
6'	3.41 (dd, 1H, $^2J = 11.2$ Hz, $^3J = 5.0$ Hz)	60.9
	3.58 (dd, 1H, $^2J = 11.2$ Hz, $^3J = 1.4$ Hz)	

^a δ , chemical shift; J , coupling constant; hydrogen/carbon assignments were verified by HMBC, HSQC, H,H-COSY, and APT measurements.

at δ_{C} 56.4 (2,6- OCH_3) confirmed the two *O*-methyl carbons. The chemical shift of C-1 and the HMBC signal between H-1' and C-1 verified the link between glucose and the phenylpropanoid skeleton. On the basis of one-dimensional and two-dimensional NMR data, compound 3 was thus identified as the β -*O*-glucoside of sinapyl alcohol, that is, syringin. 3 was identified for the first time in lettuce, especially iceberg lettuce. It was isolated first from the bark of *Syringia vulgaris* and has been verified in many types of plants as an allelopathic secondary metabolite. Bioactive functions as a hypotensive and antioxidative substance were described.²⁶

All of these phenolic structures have been associated with enzymatic browning. In particular, the caffeic acid derivatives were reported to play an important role. The latter were also identified in other fruits and vegetables that naturally have a high tendency to brownish discoloration.¹¹

Browning of Lettuce Tissues. The quality of iceberg lettuce is most easily assessed in relation to the discoloration of the lettuce stem. The greater the discoloration of the lettuce stem, the older is the iceberg lettuce. In the present experiments the browning in different parts of the plant was studied and compared to PPO activity and phenolic content. These aimed to increase our understanding of why the lettuce stem leads to more intensive browning in relation to specific phenolic compounds.

The underlying experimental setup was as follows: the lettuce was divided into four parts (outer (green) leaves, inner (yellow) leaves, lettuce stem, and, for comparison, a mixture of the total head). These subsamples were crushed, stored at room temperature for 24 h, and then extracted with methanol/water. Figure 3A represents the determined absorptions at 420 nm. It clearly states that the lettuce stem led to the strongest browning, followed by the yellow inner leaves. The outer leaves showed the slightest discoloration. Due to the high proportion of green leaves, the mixed total sample had a lower intensity versus the stem sample. Obviously, increased browning activity

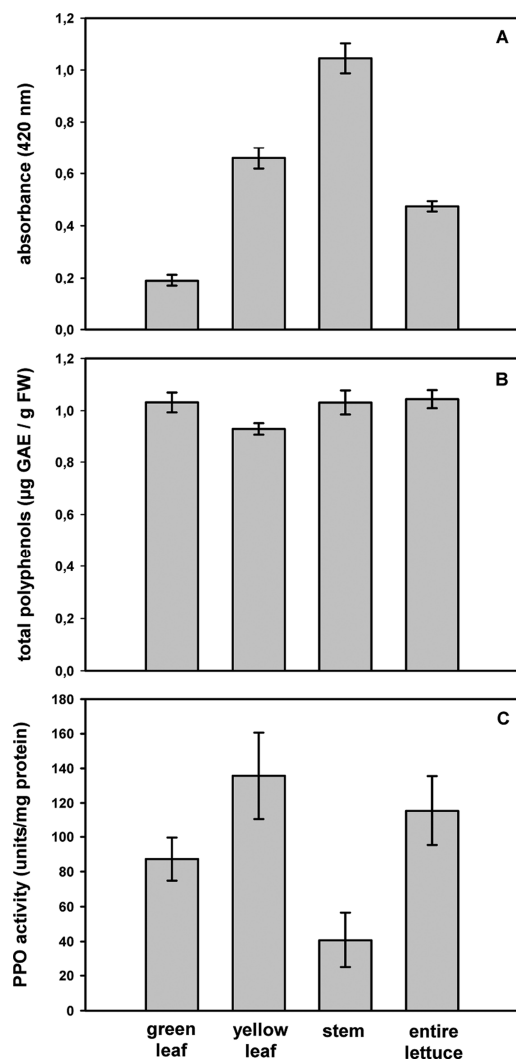


Figure 3. (A) Optical density in the process of enzymatic browning in different parts of lettuce. (B) Total phenolics expressed as microgram gallic acid equivalents (GAE) per gram fresh weight. (C) PPO activity in iceberg lettuce using catechol as substrate.

correlates to decreased chlorophyll content. However, all of the examined parts of the iceberg lettuce showed a browning reaction.

Our findings support the suggestion of Castaner et al. that the photosynthetic tissue also enables browning, although other natural pigments such as chlorophyll are masking the discoloration.⁴

Phenolic Distribution in Different Parts of Lettuce.

Figure 3B clearly demonstrates that the total phenolic content assessed by Folin–Ciocalteu showed no significant difference in the various subsamples. Thus, differences in browning cannot be related to total phenolic content. However, with the Folin–

Ciocalteu method, all of phenolic compounds are addressed, even those that are not substrates of PPO.

In addition to the substrate specificity, the enzyme activity of PPO plays a significant role. This was investigated in a catechol assay. This assay method, commonly used for the activity determination of most PPOs, is based on the oxidation of catechols to *o*-quinones. The activity was determined by following the reaction progress at 420 nm. It is reported that PPO is inactivated by freezing storage conditions.¹⁸ Therefore, we used only fresh lettuce samples from a local wholesale market. The PPOs showed different activities in the various parts of lettuce. In Figure 3C the activities are presented in units per milligram protein. The highest enzyme activity was verified in the inner yellow leaves followed by the external green chlorophyll-rich leaves, whereas the lettuce stem showed the lowest enzyme activity in the catechol assay. The activity of the entire head was clearly influenced by the major green leaf fraction. Therefore, the PPO-browning activities were not positively correlated to the actual browning in the different parts of lettuce.

Browning Process of Different Extracts from Lettuce.

The above observations of the enzymatic browning naturally occurring in the plant material were reviewed by a browning model in which specific enzymes were added to the five extracts for induction of color formation. The acetone/water extract contained the total of extractable material, whereas diethyl ether, ethyl acetate, *n*-butanol, and water extract represented subsets of increasing polarity. After 90 min at 24 °C, the color intensity was measured at 420 nm. To compare the effectiveness of lettuce PPO, additionally mushroom PPO and nashi pear PPO were used, to address a broad spectrum of substrates. By matter of preparation, the enzyme extracts of lettuce PPO and nashi pear PPO were enzyme mixtures. Only the mushroom PPO was a purchased purified standard.

Figure 4 exhibits that PPO isolated from iceberg lettuce had the strongest browning potential.

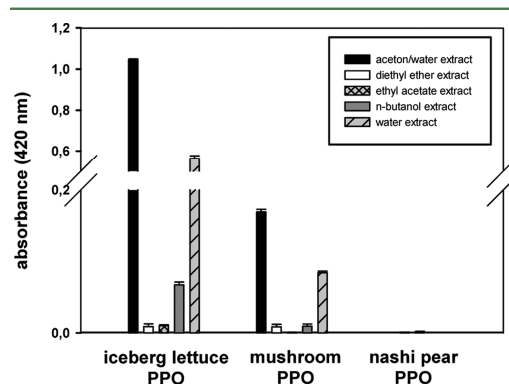


Figure 4. Effect of PPO from iceberg lettuce, mushroom, and nashi pear on browning in different extracts of iceberg lettuce.

The addition of mushroom PPO and nashi pear PPO to the extracts led to a smaller change in absorbance. The substrate specificity of the polyphenol oxidase is the responsible factor for the formation of *o*-quinones with PPOs of different sources having different affinities to specific phenolic compounds.^{27,28} Obviously for mushroom PPO and nashi pear PPO, the

phenolic profile of the extracts was much less specific, in contrast to the freshly extracted lettuce PPO. Therefore, this lettuce enzyme extract was used for further experiments. The greatest change in absorption was achieved for the acetone/water extract.

Correlation of Lettuce Ingredients with the Enzymatic Browning. In addition to the browning in the tissue and in the total extracts, the influence of the conversion of individual phenolic compounds contained in the acetone/water extract was measured by HPLC-DAD-MS techniques. As reported in previous studies, the caffeoyl acid derivatives are the important substrates for browning.^{12,27,29} Thus, in Figure 5 the phenolic

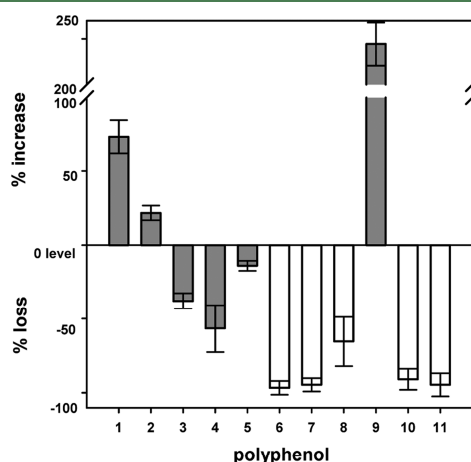


Figure 5. Percentage change of individual phenolic compounds in 24-h-aged sliced lettuce compared to fresh sliced lettuce (shaded bars, caffeic acid derivatives; white bars, flavonoids).

compounds were divided into two groups, the caffeoyl derivatives (shaded bars) and flavonoids (white bars). The comparison of the acetone/water extract of fresh sliced iceberg lettuce and of 24-h-aged sliced lettuce gave decreasing and increasing signal intensities.

Apart from 1, 2, and 9 all phenolic compounds decreased. Obviously, they were oxidized by enzymatic processes, and, thus, may contribute to color formation.

On the contrary, the concentrations of 1, 2, and 9 increased. This was in line with reports that PAL activity increases during browning,^{30,31} thus leading to de novo synthesis of phenolic compounds and other structures. Both caffeoyl derivatives and flavonoids must be involved in the color change of iceberg lettuce. However, this experiment cannot show the contribution of individual structures.

Investigation of Acetone/Water Extracts. The acetone/water extracts of fresh sliced, of 24-h-aged sliced, and of fresh sliced iceberg lettuce incubated for 24 h with lettuce PPO were analyzed by HPLC-DAD (Figure 6). For this chromatography, method 2 was used. Extracts of both the 24-h-aged sliced iceberg lettuce and the PPO-incubated sample showed an obvious increase in total color formation at 420 nm in comparison to the extract of the fresh sliced lettuce. However, only the HPLC-DAD chromatogram of the 24-h-aged sliced iceberg lettuce indicated discrete signals, in contrast to fresh

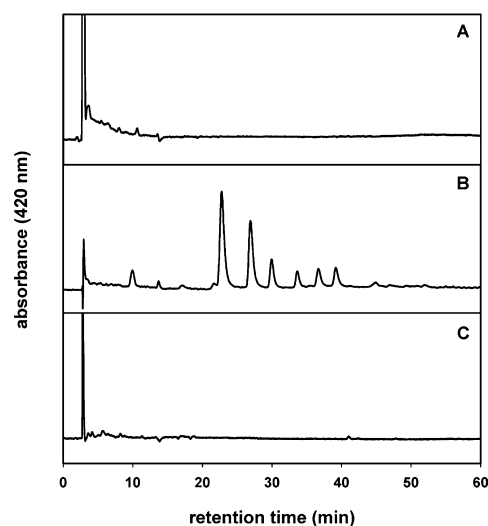


Figure 6. HPLC-DAD chromatogram of (A) acetone/water extract from fresh sliced iceberg lettuce at $\lambda = 420$ nm; (B) acetone/water extract from 24-h-aged sliced iceberg lettuce at $\lambda = 420$ nm, unknown colored structures eluted between 20 and 40 min; (C) acetone/water extract from fresh sliced iceberg lettuce incubated for 24 h with PPO.

sliced lettuce and PPO-incubated lettuce, where no signals were detected.

In an attempt to obviate the notion that with acetone/water possible browning adducts were discriminated, fresh iceberg lettuce shredded in phosphate buffer (pH 6.5) was supplemented with enzyme solution and incubated under continuous oxygen supply for 24 h. Identical to the incubated acetone/water extract (data not shown) a change in total browning was detected at 420 nm, but not colored structures were identified by HPLC-DAD.

This is in line with a previous report of the addition of lettuce PPO leading to a change in absorption, but no structures for resulting pigments were given. The authors assumed the compounds to be nonpolar.³⁰ This can be confirmed by the present investigation, as method 2 used a far more unipolar gradient profile. Obviously, PPO-induced browning is not related to the synthesis of the specific structures shown in Figure 6.

The following substances from *L. sativa* var. *capitata* were isolated and identified: caffeic acid 1, chlorogenic acid 2, syringin 3, phaseolic acid 4, chicoric acid 5, luteolin-7-*O*-glucuronide 6, quercetin-3-*O*-glucuronide 7, quercetin-3-*O*-galactoside 8, isochlorogenic acid 9, quercetin-3-*O*-glucoside 10, and quercetin-3-*O*-(6'-malonyl)-glucoside 11. Within this context, compound 3 was verified for the first time in iceberg lettuce. In addition, we clarified the influence of phenolic compounds and of polyphenol oxidase activity on the enzymatic browning in iceberg lettuce. As a result, tissue browning after cutting and storage was not related to change in concentrations of phenolic compounds or to the specific activity of PPO.

It can be concluded that additional factors are involved in the process of browning in lettuce. Besides the enzymatic browning of phenolic compounds leading to unspecific browning other

reactions such as polymerization of yet unknown educts makes the browning process of iceberg lettuce unclear. Thus, in follow-up studies, we intend to isolate the specific colored products indicated in the present study and characterize their impact on sensorial changes.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: marcus.glomb@chemie.uni-halle.de. Fax: ++49-345-5527341.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

We thank D. Ströhl from the Institute of Organic Chemistry, Halle (Germany), for recording NMR spectra, and J. Schmidt from the Leibniz Institute of Plant Biochemistry, Halle (Germany), for performing accurate mass analysis.

■ REFERENCES

- (1) AMI, A. I.-G. m. AMI-Marktbilanz Gemüse 2010; 2011; AMI-informiert.de. Bonn, AMI.
- (2) Agüero, M. V.; Ponce, A. G.; Moreira, M. R.; Roura, S. I. Lettuce quality loss under conditions that favor the wilting phenomenon. *Postharvest Biol. Technol.* **2011**, *59*, 124–131.
- (3) Fillion, L.; Kilcast, D. Consumer perception of crispness and crunchiness in fruits and vegetables. *Food Qual. Prefer.* **2002**, *13*, 23–29.
- (4) Castaner, M.; Gil, M. I.; Ruiz, M. V.; Artes, F. Browning susceptibility of minimally processed baby and romaine lettuces. *Eur. Food Res. Technol.* **1999**, *209*, 52–56.
- (5) Hodges, D. M.; Toivonen, P. M. A. Quality of fresh-cut fruits and vegetables as affected by exposure to abiotic stress. *Postharvest Biol. Technol.* **2008**, *48*, 155–162.
- (6) Moreira, N. D.; Ponce, A. G.; Del Valle, C. E.; Roura, S. I. Ascorbic acid retention, microbial growth, and sensory acceptability of lettuce leaves subjected to mild heat shocks. *J. Food Sci.* **2006**, *71*, S188–S192.
- (7) Wei, H.; Brandt, M. J.; Wolf, G.; Hammes, W. P. Optimization of acidified warm water treatment to improve the microbiological status and sensory quality of iceberg lettuce. *Eur. Food Res. Technol.* **2005**, *220*, 168–175.
- (8) Ke, D.; Saltveit, M. E. Wound-induced ethylene production, phenolic metabolism and susceptibility to russet spotting in iceberg lettuce. *Physiol. Plant.* **1989**, *76*, 412–418.
- (9) Sapers, G. M.; Hicks, K. B. Inhibition of enzymatic browning in fruits and vegetables. *ACS Symp. Ser.* **1989**, No. 405, 29–43.
- (10) 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.
- (11) Tomas-Barberan, F.; Espin, J. C. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *J. Sci. Food Agric.* **2001**, *81*, 853–876.
- (12) Heimdal, H.; Larsen, L. M.; Poll, L. Characterization of polyphenol oxidase from photosynthetic and vascular lettuce tissues (*Lactuca sativa*). *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 1428–1433.
- (13) Llorach, R.; Martínez-Sánchez, A.; Tomas-Barberan, F. A.; Gil, M. I.; Ferreres, F. Characterisation of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole. *Food Chem.* **2008**, *108*, 1028–1038.
- (14) Nicolle, C.; Carnat, A.; Fraisse, D.; Lamaison, J. L.; Rock, E.; Michel, H.; Amouroux, P.; Remesy, C. Characterisation and variation of antioxidant micronutrients in lettuce (*Lactuca sativa folium*). *J. Sci. Food Agric.* **2004**, *84*, 2061–2069.
- (15) Goupy, P. M.; Varoquaux, P. J. A.; Nicolas, J. J.; Macheix, J. J. Identification and localization of hydroxycinnamoyl and flavonol derivatives from endive (*Cichorium endivia* L. cv Geante Maraichere) leaves. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38*, 2116–2121.
- (16) Tavarini, S.; Degl'Innocenti, E.; Pardossi, A.; Guidi, L. Biochemical aspects in two minimally processed lettuces upon storage. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2007**, *42*, 214–219.
- (17) Amiot, M. J.; Tacchini, M.; Aubert, S.; Nicolas, J. Phenolic composition and browning susceptibility of various apple cultivars at maturity. *J. Food Sci.* **1992**, *57*, 958–962.
- (18) Cantos, E.; Espin, J. C.; Tomas-Barberan, F. A. Effect of wounding on phenolic enzymes in six minimally processed lettuce cultivars upon storage. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 322–330.
- (19) Fukumoto, L. R.; Toivonen, P. M. A.; Delaquis, P. J. Effect of wash water temperature and chlorination on phenolic metabolism and browning of stored iceberg lettuce photosynthetic vascular tissues. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 4503–4511.
- (20) Bradford, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.
- (21) Ferreres, F.; Gil, M. I.; Castaner, M.; Tomas-Barberan, F. A. Phenolic metabolites in red pigmented lettuce (*Lactuca sativa*). Changes with minimal processing and cold storage. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 4249–4254.
- (22) Baur, S.; Klaiber, R. G.; Koblo, A.; Carle, R. Effect of different washing procedures on phenolic metabolism of shredded, packaged iceberg lettuce during storage. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 7017–7025.
- (23) Dupont, M. S.; Mondin, Z.; Williamson, G.; Price, K. R. Effect of variety, processing, and storage on the flavonoid glycoside content and composition of lettuce and endive. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 3957–3964.
- (24) Ribas-Agusti, A.; Gratacos-Cubarsi, M.; Sarraga, C.; Garcia-Regueiro, J. A.; Castellari, M. Analysis of eleven phenolic compounds including novel *p*-coumaroyl derivatives in lettuce (*Lactuca sativa* L.) by ultra-high-performance liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometry detection. *Phytochem. Anal.* **2011**, *22*, 555–563.
- (25) Degl'Innocenti, E.; Pardossi, A.; Tattini, M.; Guidi, L. Phenolic compounds and antioxidant power in minimally processed salad. *J. Food Biochem.* **2008**, *32*, 642–653.
- (26) Ahmad, M.; Aftab, K. Hypotensive action of syringin from *Syringa vulgaris*. *Phytother. Res.* **1995**, *9*, 452–454.
- (27) Walker, J. R. L. Enzymatic browning in fruits – its biochemistry and control. *ACS Symp. Ser.* **1995**, No. 600, 8–22.
- (28) Mayer, A. M.; Harel, E. Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry* **1979**, *18*, 193–215.
- (29) Fujita, S.; Tono, T.; Kawahara, H. Purification and properties of polyphenol oxidase in head lettuce (*Lactuca sativa*). *J. Sci. Food Agric.* **1991**, *55*, 643–651.
- (30) Tomas-Barberan, F. A.; Gil, M. I.; Castaner, M.; Artes, F.; Saltveit, M. E. Effect of selected browning inhibitors on phenolic metabolism in stem tissue of harvested lettuce. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 583–589.
- (31) Tanaka, E.; Okumura, S.; Takamiya, R. Cinnamaldehyde inhibits enzymatic browning of cut lettuce by repressing the induction of phenylalanine ammonia-lyase without promotion of microbial growth. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 6705–6709.

Lettucenin Sesquiterpenes Contribute Significantly to the Browning of Lettuce

Franziska Mai and Marcus A. Glomb*

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

ABSTRACT: Wound-induced changes in the composition of secondary plant compounds cause the browning of processed lettuce. Cut tissues near the lettuce butt end clearly exhibit increased formation of yellow–brown pigments. This browning reaction is typically been attributed to the oxidation of polyphenols by the enzyme polyphenol oxidase (PPO). However, in our previous study on Iceberg lettuce, we showed that, besides the enzymatic polyphenol browning, other reactions must be involved in the formation of colored structures. With the present study for the first time, we isolated yellow sesquiterpenes by multilayer countercurrent chromatography (MLCCC), followed by preparative high-performance liquid chromatography (HPLC). Further analyses by nuclear magnetic resonance (NMR) and mass spectrometry (MS) techniques identified lettucenin A and three novel derivatives. We call these compounds lettucenins A1, B, and B1. Color-dilution analyses revealed these lettucenins as key chromophores in the browning of Iceberg lettuce. A time formation curve showed the accumulation of lettucenins A and B within 40 h after cutting. Thereafter, these structures were degraded to unknown colored compounds. Lettucenin A was verified in five varieties of *Lactuca*. In contrast to that, lettucenin A was present only at trace levels in five varieties of *Cichorium*. Therefore, lettucenin A might be used as a chemosystematic marker of the genus *Lactuca*.

KEYWORDS: Iceberg lettuce, *Lactuca sativa*, multilayer countercurrent chromatography (MLCCC), enzymatic browning, lettucenin, color-dilution analyses

INTRODUCTION

Besides tomato, potato, and carrot, lettuce (*Lactuca sativa* L.) is one of the most popular vegetables in the world.¹ Favorite species are Butterhead, Romaine, and most importantly, Iceberg lettuce. In 2010, the consumption per private household in Germany amounted to 2.8 kg.¹

Browning is one of the main causes of quality loss during the postharvest storage of lettuce and minimally processed lettuce.² In general, lettuce tends toward very rapid browning specifically on the lettuce butt end after harvesting.³ Yellowish brown pigments are usually formed on bruises and cut surfaces. The huge economic loss encouraged researchers to conduct studies to understand lettuce-browning mechanisms. Numerous studies have focused on the typical enzymatic browning triggered by polyphenol oxidase (PPO). Furthermore, extensive investigations were carried out to describe beneficial effects of specific physical or chemical treatments on the prevention of discoloration.^{3,4} However, for lettuce and also other kinds of fruits or vegetables, no precise relationship was found between browning potential, PPO activity, and total or individual phenol accumulation or degradation.^{5–7} Besides the chemistry of black tea fermentation, specific products of enzymatic browning have hardly been scientifically researched.

In our recent study, the relationship between discoloration of Iceberg lettuce and enzymatic browning was thoroughly investigated.⁸ This was based on literature that described enzymatic browning as the reaction between phenolic substances and enzymes.^{4,9,10} Unexpectedly, the total concentration of polyphenols and the activity of PPO were not directly related to the browning processes. Model incubation experiments of plant extract solutions supported the argument that, in addition to the typical enzymatic browning induced by PPOs,

further mechanisms must be considered to explain total browning of lettuce.⁸

Post-infectious defense induces the formation of antimicrobial substances in plants. The German plant pathologist K. O. Müller established the term “phytoalexin” in 1940.¹¹ The induction of the secondary metabolites is often caused by biotic (microorganisms) and abiotic agents, such as heavy metals (e.g., cupric chloride), but also physical injuries (such as cutting or brushing).¹³

Lettucenin A was first reported to be a sesquiterpenoid phytoalexin of lettuce by Takasugi et al. and found to be produced by lettuce and dandelion leaves in response to stress induced by pathogenic fungus or cupric chlorid.^{12,13} Another fungitoxin was isolated and identified as costunolid from lettuce infected with *Pseudomonas cichorii*.¹² In addition, lettucenin A showed strong bioactivity against different pathogenic fungi *in vivo*.¹⁴

Monde et al. and Ahmad et al. described non-colored phytoalexins from *Cichorium intybus* and *Taraxacum wallichii*.^{15,16} Bennet et al. hypothesized further phytoalexins of the sesquiterpenoid group to be involved in defense reactions in Iceberg lettuce but were not able to show any specific structures.¹⁴ Up until now, lettucenin A is the only colored structure that might be responsible for the discoloration of lettuce.

With the present work, we were able to isolate colored sesquiterpenes from lettuce and correlate the intensive tissue

Received: January 24, 2014

Revised: April 27, 2014

Accepted: May 2, 2014

Published: May 12, 2014

browning to the formation of phytoalexins. The formation of lettuceenin A and three novel derivatives was induced solely by mechanical injury. With color-dilution analyses, we established the significance of lettuceenins in the browning of lettuce. Finally, lettuceenin A was quantitated in different varieties of Cichorieae.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. Chemicals of the highest quality available were obtained from Roth (Karlsruhe, Germany), unless otherwise indicated. High-performance liquid chromatography (HPLC)-grade methanol was purchased from Sigma-Aldrich (Taufenkirchen, Germany). Deuterated CDCl_3 was obtained from Chemotrade (Leipzig, Germany). For all experiments, ultrapure water was used.

Plant Materials. Commercial varieties of lettuce (*L. sativa* L., Romaine, Butterhead, Iceberg, Lollo Rosso, and Lollo Bionda; *C. intybus* L., Radicchio, Sugar Loaf, and Chicory; and *Cichorium endivia* L., Endive and Frisee) were obtained from local markets in Germany. The lettuce heads were prepared for further processing by removing and discarding wrapper leaves and brown spots. For some experiments, the fresh lettuce head was separated into four tissue types: green leaves, yellow leaves, leaf panicles, and butt end. Each lot was cut into squares (1×1 cm) using a sharp ceramic knife and mixed thoroughly. For browning, the processed plant materials were packed into Petri dishes and kept at room temperature for 24 and 48 h, respectively. The brown material was stored in freeze bags, freeze-dried, and stored at -20°C until used.

Extraction of Plant Material. For isolation of colored structures, 100 g of the freeze-dried mix of the entire head of Iceberg was extracted with acetone/water (7:3, v/v, 1.5 L) at 5°C for 24 h under an argon atmosphere. The filtrates were concentrated under reduced pressure ($<30^\circ\text{C}$) until complete evaporation of acetone. The residual aqueous solution was successively extracted with diethyl ether (2×200 mL) and ethyl acetate (2×200 mL). The diethyl ether and ethyl acetate extracts were evaporated to dryness, and the residues (1500 mg of diethyl ether extract and 600 mg of ethyl acetate extract) were used for multilayer countercurrent chromatography (MLCCC).

For comparative studies on browning, 1 g of freeze-dried material of 24 and 40 h aged sliced tissue types of Iceberg lettuce was extracted with 10 mL of acetone/water (7:3, v/v) at 5°C under an argon atmosphere. After 24 h, the samples were centrifuged at 4500 rpm for 10 min. A 1 mL aliquot of the clarified supernatant was dried under argon stream. The residue was extracted 2 times with 2 mL of diethyl ether. The combined diethyl ether phases were dried under an argon stream.

Analytical HPLC–Diode Array Detection (DAD)–Mass Spectrometry (MS). A Jasco system (Jasco, Gross-Umstadt, Germany) with a quaternary gradient unit PU 2080, a degasser DG 2080-54, an autosampler AS 2055, a column oven (Jasco Jetstream II), and a multiwavelength detector MD 2015 was used. Alternatively, the detector was coupled to an API 4000 triple quadrupole mass spectrometer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Chromatographic separations were performed on stainless-steel columns (Vydac CRT, 218TP54, 250×4.0 mm, RP-18, $5 \mu\text{m}$, 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). To both solvents (A and B), 0.8 mL/L of formic acid was added. Samples were analyzed using a gradient system: samples were injected at 50% B and held for 10 min. The gradient was changed linearly to 100% B in 60 min and held at 100% B for 10 min. The column temperature was always 25°C . The effluent was monitored at 280 and 420 nm.

MS ionization was achieved using the turbospray ionization source operated in positive-ion mode. Turbospray settings were as follows: curtain gas (N_2) at 40 psi, ion source gas 1 at 50 psi, ion source gas 2 at 60 psi, source temperature at 500°C , and ion spray voltage at 4500 V. The total ion current (TIC) chromatogram with a scan range between m/z 100 and 700 and mass spectral data on precursor ions were detected. Declustering potential, entrance potential, collision

energy, and cell exit potential were optimized for each analyte. For evaluation, we used Analyst software and Borwin–PDA software.

Quantitation of Lettuceenins A and B. For quantitation, the samples were analyzed with HPLC using DAD, as described above. The phytoalexins eluted with a retention time of 22.8 min (lettuceenin B) and 27.0 min (lettuceenin A). Standard solutions were prepared in methanol. The amounts of lettuceenins A and B were calculated on the basis of the published molar extinction coefficient of lettuceenin A.¹² For quantitation of lettuceenins B and B1, the authentic isolated standards were used.

MLCCC. The MLCCC system (Ito, multilayer separator–extractor model, P.C., Inc., Potomac, MD) was equipped with a constant flow pump (Waters 6000 A, Waters Corporation, Milford, MA), a Kontron spectrophotometer (Kontron 432, Kontron-Instruments, Rossdorf, Germany) operating at 420 nm, and a sample injection valve with a 10 mL sample loop. Eluted liquids were collected in fractions of 8 mL with a fraction collector (LKB Ultrarac 7000, LKB-Producter AB, Stockholm-Bromma, Sweden). Chromatograms were recorded on a plotter (Servogor 200, GMC, Nürnberg, Germany). The multilayer coil was prepared from a 1.6 mm inner diameter polytetrafluoroethylene (PTFE) tubing. The total capacity was 290 mL. MLCCC was run at a revolution speed of 790 rpm and a flow rate of 2 mL/min in head-to-tail modus.

Samples of 500 mg of dried extract were dissolved in a 1:1 mixture of light and heavy phase (10 mL) and injected into the system. Diethyl ether extracts were separated using *n*-hexane/ethyl acetate/methanol/water (3:5:3:5, v/v/v/v, solvent system A), and ethyl acetate extracts were isolated using *n*-hexane/ethyl acetate/methanol/water (4:5:4:5, v/v/v/v, solvent system B). The purified materials (fractions 35–40) were evaporated to dryness, and the residues (5–15 mg) were used for preparative HPLC–ultraviolet (UV).

Preparative HPLC–UV. A Besta HD 2-200 pump (Besta, Wilhelmsfeld, Germany) was used at a flow rate of 15 mL/min. Elution of materials was monitored by an UV detector set at 420 nm (Jasco UV-2075, Gross-Umstadt, Germany). Up to 20 mg of the above material from MLCCC was injected. Chromatographic separations were performed on a stainless-steel column (Vydac CRT, 218TP1022, 250×23 mm inner diameter, RP-18, $10 \mu\text{m}$, Hesperia, CA). The mobile phases used were solvents A and B, identical to the analytical HPLC–DAD system. An isocratic method was chosen according to the characteristics of the target structures. From the individual chromatographic fractions, solvents were removed under reduced pressure. After the addition of diethyl ether, combined solutions of lettuceenins were dried under argon stream.

Accurate Mass Determination [High-Resolution Mass Spectrometry (HRMS)]. The high-resolution positive- and negative-ion electrospray ionization (ESI) mass spectra were obtained from a Bruker Apex III Fourier transform ion cyclotron resonance (FT-ICR) mass spectrometer (Bruker Daltonics, Billerica, MA) equipped with an infinity cell, a 7.0 T superconducting magnet (Bruker, Karlsruhe, Germany), a radio frequency (RF)-only hexapole ion guide, and an external electrospray ion source (APOLLO, Agilent, off-axis spray). Nitrogen was used as the drying gas at 150°C . The samples were dissolved in methanol, and the solutions were introduced continuously via a syringe pump at a flow rate of 120 $\mu\text{L}/\text{h}$. The data were acquired with 256 000 data points and zero-filled to 1 024 000 by averaging 32 scans.

Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy. NMR experiments were performed on a Bruker Avance III 800 NMR spectrometer (Bruker, Rheinstetten, Germany) operating at 800 MHz for ^1H and 200 MHz for ^{13}C , respectively. Samples were dissolved in CDCl_3 , and all spectra were run at 27°C . Chemical shifts are given relative to external Me_4Si and were referenced to internal CDCl_3 (^1H , $\delta = 7.260$ ppm; ^{13}C , $\delta = 77.160$ ppm).

Color-Dilution Analysis. An aliquot (50 μL) of diethyl ether extract was analyzed by HPLC–DAD for determination of the color-dilution factor (CD factor). Fractions (1 mL) with material exhibiting absorption maxima at 420 nm were then stepwise 1:1 diluted with solvent B. The test was carried out in daylight against a white background. Each dilution was visually judged until the color

difference between the diluted fraction and two blanks of solvent B could just be visually detected using a triangle test. This dilution was defined as the CD factor. The CD factors evaluated by five different panelists in two independent sessions were averaged. For assignment of the total color-dilution factor (CD_{total} factor), 50 μ L of diethyl ether extract was diluted to 1 mL and treated as described above.¹⁹

RESULTS AND DISCUSSION

Browning of Lettuce Tissues. For the following studies, conventional Iceberg lettuce was sliced and browned at room temperature. After 24 h, the sliced and bruised areas of the plant material showed significant discoloration. To explain the discoloration, 24 h aged sliced Iceberg lettuce was compared to fresh sliced Iceberg lettuce. For this purpose, freeze-dried plant material was extracted as described above. The final diethyl ether extracts were screened for colored structures by analytical HPLC–DAD (Figure 1). A direct comparison of chromato-

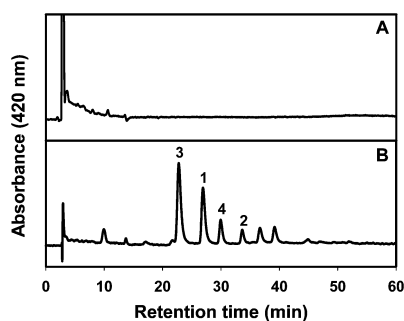


Figure 1. HPLC–DAD chromatogram of (A) acetone/water extract from fresh sliced Iceberg lettuce at $\lambda = 420$ nm and (B) acetone/water extract from 24 h aged sliced Iceberg lettuce at $\lambda = 420$ nm. Retention times are given in parentheses: (1) lettuce A (27.0 min), (2) lettuce A1 (33.7 min), (3) lettuce B (22.8 min), and (4) lettuce B1 (30.0 min).

grams A and B at 420 nm shows that, in browned lettuce, different visible absorbing compounds were detected. Because of the absorption maxima between 400 and 440 nm, these structures are indeed responsible for the discoloration (Figure 2). In the context of enzymatic browning, yellow structures with similar UV/vis spectra were previously presented in the literature but structural analysis was not performed.¹⁷ For structure elucidation, the brown soluble compounds were

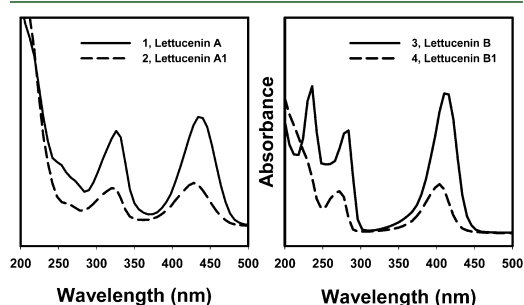


Figure 2. UV/vis spectra of (1) lettuce A, (2) lettuce A1, (3) lettuce B, and (4) lettuce B1.

isolated from the diethyl ether and ethyl acetate extracts of Iceberg lettuce.

Isolation and Elucidation of Colored Compounds. The first step of purification was separation by MLCCC using solvent system A for ethyl acetate extracts and solvent system B for *n*-butanol extracts. Afterward, fractions containing the yellowish brown material were separated by preparative HPLC to isolate pure substances. The final structural evidence was achieved by ¹H and ¹³C NMR measurements, as well as heteronuclear single-quantum coherence (HSQC), heteronuclear multiple-bond correlation (HMBC), and homonuclear correlation spectroscopy (H,H COSY) techniques.

Four structures were verified (Figure 1): lettuce A (1) and three derivatives A1 (2), B (3), and B1 (4). Thus far, only compound 1 has been isolated from Iceberg lettuce. NMR data of compound 1 were in line with the study by Takasugi et al. Lettuce A is a phytoalexin that was identified in Iceberg lettuce for the first time in 1985,¹² but no other structures have yet been published.

Compounds 1–4 were isolated as unstable yellowish crystalline substances with concentrations ranging between 0.1 and 6.0 μ g/g of fresh weight (FW) as determined by HPLC–DAD. HPLC/ESI–MS delivered for compound 1 a pseudo-molecular ion of m/z 241.2 $[M + H]^+$. This finding was confirmed by HRMS (found, m/z 241.08608 $[M + H]^+$; calculated, m/z 241.08592 $[M + H]^+$, for $C_{15}H_{13}O_3$). In comparison, HRMS gave a pseudo-molecular ion of m/z 243.2 $[M + H]^+$ for compound 3 (found, m/z 243.10157 $[M + H]^+$; calculated, m/z 243.10157 $[M + H]^+$ for $C_{15}H_{13}O_3$). HPLC/ESI(+)-tandem mass spectrometry (MS^2) experiments verified a dominant CO loss of 28 mass units for both compounds $[M + H - 28]^+$ (Table 1). The degree of unsaturation (DU) was calculated from the molecular formulas. The DUs of compounds 1 and 3 were 10 and 9, respectively. The absence of a double bond in compound 3 was also reflected in the UV/vis spectrum. The absorption maximum shifted from 440 nm for compound 1 to 416 nm for compound 3 (Figure 2). ¹H NMR experiments of compounds 1 and 3 confirmed the difference of a double bond between C-4 and C-15. For compound 3, at position C-4, an additional proton was detected and, at position C-15, a methyl group was identified, which coupled with the proton at C-4 to give a doublet (1.35 ppm, d; Table 2). This was different from lettuce A, which clearly showed a methylene signal for H-15 (5.92 ppm, m; 6.67 ppm, m). The remaining signals of compound 3 corresponded to the pattern of lettuce A.

With regard to all results, compound 3 boasts the same basic ring structure as lettuce A with the difference of saturation between C-4 and C-15 (Figure 3) and was unequivocally assigned to 2,7,8,9-tetrahydro-6,9-dimethyl-2-oxo-azuleno[4,5-*b*]furan-3-carboxaldehyde. We have named compound 3 lettuce B because of the structural similarity to lettuce A.

HPLC/ESI–MS delivered for compounds 2 and 4 pseudo-molecular ions of m/z 271.1 and 273.1 $[M + H]^+$, respectively. These findings were confirmed by HRMS (found for compound 2, m/z 271.09649 $[M + H]^+$; calculated, m/z 271.09649 $[M + H]^+$, for $C_{16}H_{15}O_4$; found for compound 4, m/z 273.11214 $[M + H]^+$; calculated, m/z 273.11214 $[M + H]^+$, for $C_{16}H_{17}O_4$; Table 1). In parallel to compounds 1 and 3, compounds 2 and 4 also showed a difference of m/z 2 to indicate an absent double bond. HPLC/ESI(+)- MS^2 experiments verified parallel losses of 14 and 32 mass units for both

Table 1. UV Spectral Data and Mass Spectrometric Data of Lettucenins

compound number	compound	HPLC–DAD, λ_{\max} (nm)	HRMS $[M + H]^+$ (m/z)	HPLC/ESI(+)-MS ² (m/z)
1	lettucenin A	440, 326	241.08608	241.2, 213.6
2	lettucenin A1	428, 326	271.09649	271.2, 257.2, 239.1
3	lettucenin B	416, 284, 236	243.10157	243.2, 215.1
4	lettucenin B1	404, 272	273.11214	273.2, 259.1, 241.2

Table 2. ¹H NMR Spectroscopic Data^a of Lettucenin A (1), Lettucenin B (3), and Lettucenin B1 (4)

C	1	3	4
1			
2	3.25 (m, 2H)	3.21 (m, 1H)	3.17 (m, 1H)
3	2.99 (m, 2H)	3.08 (m, 1H)	3.03 (m, 1H)
4		1.93 (m, 1H)	2.24 (m, 1H)
5		2.28 (m, 1H)	1.90 (m, 1H)
6		3.93 (m, 1H)	3.91 (m, 1H)
7			
8	8.91 (d, 1H, ³ J = 11.3 Hz)	8.86 (d, 1H, ³ J = 11.3 Hz)	8.73 (d, 1H, ³ J = 11.7 Hz)
9	7.94 (d, 1H, ³ J = 11.3 Hz)	7.67 (d, 1H, ³ J = 11.3 Hz)	7.55 (d, 1H, ³ J = 11.7 Hz)
10			
11			
12			
13	9.91 (s, 1H)	10.40 (s, 1H)	
14	2.60 (s, 3H)	2.52 (s, 3H)	2.48 (s, 3H)
15	5.92 (m, 1H)	1.35 (d, 3H, ³ J = 7.2 Hz)	1.32 (d, 3H, ³ J = 7.1 Hz)
16	6.67 (m, 1H)		3.93 (s, 3H)

^aAll spectra were recorded at 800 MHz in CDCl₃ in ppm. δ , chemical shift; J , coupling constant. Hydrogen/carbon assignments were verified by HMBC, HSQC, H,H COSY, and attached proton test (APT) measurements.

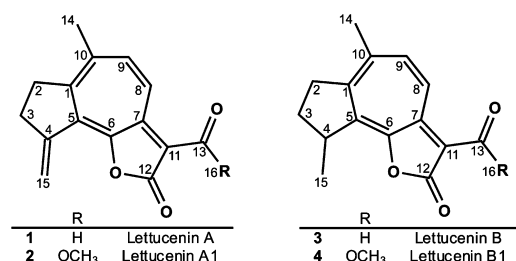


Figure 3. Isolated chromophores from processed Iceberg lettuce.

compounds 2 and 4 (Table 1). $[M + H - 32]^+$ is a characteristic fragment of methyl esters.¹⁸

Indeed, a methoxy group was verified for compound 4 by ¹H and ¹³C NMR experiments downfield at 3.93 and 51.7 ppm, respectively, in addition to the ¹H and ¹³C NMR signal pattern of lettucenin B (Tables 2 and 3). A simultaneous high-field shift of C-13 from 186.0 to 165.0 ppm and HMBC correlations between C-16 and C-13 as well as C-11 unequivocally established the proposed methyl ester and was assigned to 2,7,8,9-tetrahydro-6,9-dimethyl-2-oxo-azuleno[4,5-*b*]furan-3-carboxylic acid methyl ester. Therefore, we call compound 4 lettucenin B1.

Because of the low quantities of compound 2 found in processed lettuce, it was not possible to isolate enough material for NMR studies. Nevertheless, in comparison of the UV/vis spectra of compound 1 to compound 3 and compound 2 to compound 4, the absorption maxima shift from 440 to 416 nm

Table 3. ¹³C NMR Spectroscopic Data^a of Lettucenin A (1), Lettucenin B (3), and Lettucenin B1 (4)

C	1	3	4
1	148.1	145.9	154.5
2	34.4	35.5	35.1
3	30.9	31.0	31.0
4	157.9	41.3	41.1
5	134.5	153.3	144.2
6	152.6	156.5	152.3
7	150.5	149.5	152.2
8	128.3	129.1	128.3
9	144.8	143.9	142.6
10	143.6	143.6	141.8
10	100.0	100.5	92.4
12	170.2	169.5	166.4
13	186.3	186.0	165.0
14	24.3	26.0	25.8
15	120.0	19.6	19.5
16			51.7

^aAll spectra were recorded at 200 MHz in CDCl₃. δ , chemical shift. Hydrogen/carbon assignments were verified by HMBC, HSQC, H,H COSY, and APT measurements.

and from 428 to 404 nm, respectively; i.e., there was the same difference of 24 nm in both pairs (Figure 2). In parallel to compound 1, this indicated an extra double bond for compound 2. In comparison of compound 1 to compound 2 and compound 3 to compound 4, each with an identical UV/vis pattern, compounds 2 and 4 showed a hypsochromic shift of 12 nm. These parallels together with the HRMS, MS², and UV/

vis data strongly proposed compound 2 as the methyl ester of lettuценin A, as shown in Figure 3.

Influence of Lettucenins to Discoloration. To determine the contribution of lettucenins to the overall color of browned Iceberg lettuce, color-dilution analysis was performed (Figure 4).^{19,20} CD factors were analyzed in the diethyl ether

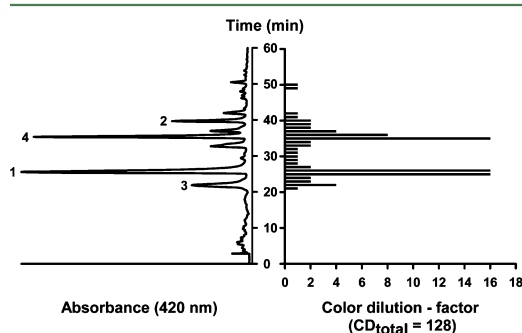


Figure 4. HPLC–DAD chromatogram ($\lambda = 420$ nm; left side) and color-dilution chromatogram (right side) of the diethyl ether extract of 24 h aged sliced Iceberg lettuce.

extract by a panel of five people. At 420 nm, chromophores were detected, which accounted for more than 50% of the total color of the diethyl ether extract. The structurally identified compounds 1–4 contributed 40% to the overall color (with the lead compound lettuценin A even at 25%). This means that the difference of 10% was related to the remaining unknown signals. In addition, in the total water/acetone extract, compounds 1–4 explained 25% of the overall color. This means that lettucenins are important coloring agents in the browning of Iceberg lettuce.

Formation of Lettuценin A in Different Lettuce. To understand the formation of lettuценin A in the plant more accurately, three varieties of lettuce were divided into four parts (green and yellow leaves, leaf panicle, and butt end) and browned at room temperature. After a browning period of 24 or 40 h, samples were collected and freeze-dried. From the samples, the lettucenins were extracted and lettuценin A as a specific marker was quantitated (Figure 5). As shown in the graphic, different concentrations of compound 1 occurred in the different parts of the Iceberg lettuce. A similar distribution was found in the varieties Butterhead and Lollo Bionda. After 24 h, the highest concentrations of compound 1 and all other lettucenin derivatives were analyzed, always in the lettuce butt end. This confirmed the visual impression of strong browning in the lettuce butt end.⁸

Because compound 1 is a reactive intermediate, there was no accumulation in the plant. This was proven by comparison to the lettuce butt end browning after 40 h. Only 5% of the concentration found in the 24 h sample could be quantitated. Figure 6 shows the time-course formation of compounds 1 and 3, where concentrations of compound 1 reached a maximum after 24 h. After that, compound 1 degraded almost to the initial level at 40 h. This also confirmed the difference between the butt end samples in Figure 5. In contrast to compound 1, compound 3 reached a maximum 16 h later at significantly lower concentrations. This strongly suggested compound 1 as the precursor structure in the formation of compound 3.

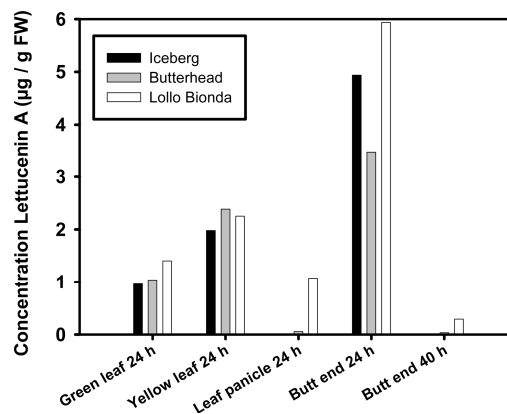


Figure 5. Lettuценin A accumulation in different parts of three varieties of lettuce after 24 and 40 h of cutting.

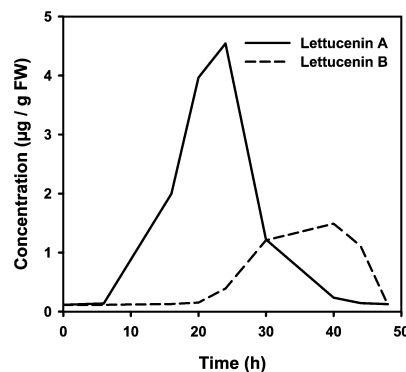


Figure 6. Time-course formation of lettuценin A and lettuценin B in sliced Iceberg lettuce.

The temperature is a crucial factor in the formation of lettucenins. At elevated temperature, the maximum concentration of compound 1 was reached much earlier (data not shown). According to studies by Tahara et al., Takasugi et al., and Sessa et al., the pathogenic bacterium *P. cichorii* or cupric chlorid and cupric sulfate also increase the concentration of lettuценin A with a maximum of 3 $\mu\text{g/g}$ of FW.^{12,13,21} Other microorganisms (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and *Botrytis cinerea*) generated yields reaching up to 9 $\mu\text{g/g}$ of FW. Lettuценin A was found within cotyledons with the red spot syndrome (6.2 $\mu\text{g/g}$ of FW) and is therefore related to a microbial infestation.²² Observations by Bestwick et al. suggest that there is a correlation of irreversible membrane damage and induction of phytoalexin accumulation.²³ Thereby, threshold levels of membrane dysfunction lead to the induction of endogenous mechanisms that cause the lettuценin biosynthesis.²³ In the present paper, samples were mechanically injured, by cutting them with a ceramic knife. Thus, a deliberate infection with microorganisms or heavy metals has to be excluded.

Importance of Lettuценin A in Different Varieties of Lettuce. In previous studies, lettuценin A was one of the most important phytoalexins in the group of composites.^{14,15} It was

identified in some European and Asian species: *Taraxacum officinale*, *Taraxacum hondoense*, *L. sativa*, *Lactuca dentate*, *Lactuca scariola*, *Sonchus oleraceus*, *Sonchus asper*, and *Ixeris repens*.^{12,13,24} As depicted in Figure 7, 10 types of Cichorieae, a

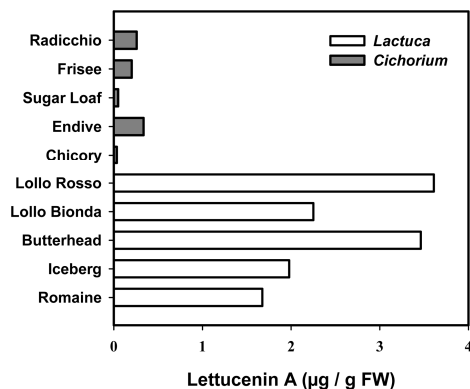


Figure 7. Lettucenin A accumulation in 24 h aged sliced stem material of 10 varieties of Cichorieae (5 varieties of *Lactuca* and 5 varieties of *Cichorium*).

tribe of flowering plants in the daisy family Asteraceae, were examined for lettuценin A, all of which are popular commercial lettuce, with 5 species belonging to the genus *Cichorium* and 5 species belonging to the genus *Lactuca*. In the genus *Cichorium*, compound 1 was detected with a maximum of 0.34 µg/g of FW, whereas in the genus *Lactuca*, concentrations ranged from 1.68 to 3.61 µg/g of FW. The levels of compound 1 in varieties of *Lactuca* were at least 5 times higher than those in varieties of *Cichorium*. Thus, there is a significant difference between these two genera. Thus far, lettuценin A was not found in uninfected samples of *L. sativa* L. (Iceberg) and, therefore, was not considered as a chemosystematic marker.²⁵ However, the present data strongly suggest that lettuценin A can indeed be used as an identity marker within the genus *Lactuca*.

In conclusion, we succeeded to extend the range of sesquiterpene chromophores in Iceberg lettuce. In contrast to published data on microbial and heavy metal stress, lettuценin formation was induced solely by mechanical distortion. The main compound was confirmed to be the phytoalexin lettuценin A. In addition, we identified unequivocally two novel colored derivatives of lettuценin A. A third structure related to lettuценins was assigned on the basis of mass spectrometric data. Color-dilution analyses revealed the major importance of lettuценins as key chromophores in browned Iceberg lettuce. Thus, sesquiterpene-based discoloration has to be added as a new aspect to the concept of enzymatic browning in vegetables previously only attributed to polyphenolic chemistry.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Fax: ++49-345-5527341. E-mail: marcus.globm@chemie.uni-halle.de.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank M. Kovermann and S. Gröger from the Institute of Physics, Biophysics Research Group, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg (Germany), for recording NMR spectra. The authors are also grateful to J. Schmidt from the Leibniz Institute of Plant Biochemistry, Halle (Germany), for performing accurate mass analysis.

REFERENCES

- (1) Agrarmarkt Informations-GmbH. *AMI-Marktbilanz Gemüse 2010*; Agrarmarkt Informations-GmbH: Bonn, Germany, 2011.
- (2) Mateos, M.; Ke, D.; Cantwell, M.; Kader, A. A. Phenolic metabolism and ethanolic fermentation of intact and cut lettuce exposed to CO₂-enriched atmospheres. *Postharvest Biol. Technol.* **1993**, *3*, 225–233.
- (3) Castaner, M.; Gil, M. I.; Ruiz, M. V.; Artes, F. Browning susceptibility of minimally processed Baby and Romaine lettuces. *Eur. Food Res. Technol.* **1999**, *209*, 52–56.
- (4) Ke, D.; Saltveit, M. E. Wound-induced ethylene production, phenolic metabolism and susceptibility to russet spotting in Iceberg lettuce. *Physiol. Plant.* **1989**, *76*, 412–418.
- (5) Tavarini, S.; Degl'Innocenti, E.; Pardossi, A.; Guidi, L. Biochemical aspects in two minimally processed lettuces upon storage. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2007**, *42*, 214–219.
- (6) Amiot, M. J.; Tacchini, M.; Aubert, S.; Nicolas, J. Phenolic composition and browning susceptibility of various apple cultivars at maturity. *J. Food Sci.* **1992**, *57*, 958–962.
- (7) Cantos, E.; Espin, J. C.; Tomas-Barberan, F. A. Effect of wounding on phenolic enzymes in six minimally processed lettuce cultivars upon storage. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 322–330.
- (8) 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.
- (9) 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.
- (10) Tomas-Barberan, F.; Espin, J. C. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *J. Sci. Food Agric.* **2001**, *81*, 853–876.
- (11) Müller, K. O.; Börger, H. Experimentelle untersuchungen über die *Phytophthora*-resistenz der kartoffel. *Arb. Biol. Reichsanst. Land-Forstwirtschaft.* **1940**, *23*, 189–231.
- (12) Takasugi, M.; Okinaka, S.; Katsui, N.; Masamune, T.; Shirata, A.; Ohuchi, M. Isolation and structure of lettuценin-A, a novel guaianolide phytoalexin from *Lactuca sativa* var. *capitata* (Compositae). *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1985**, *10*, 621–622.
- (13) Tahara, S.; Hanawa, F.; Harada, Y.; Mizutani, A. Fungitoxin inducibly produced by dandelion leaves treated with cupric chlorid. *J. Agric. Biol. Chem.* **1988**, *52*, 2947–2948.
- (14) Bennett, M. H.; Gallagher, M. D. S.; Bestwick, C. S.; Rossiter, J. T.; Mansfield, J. W. The phytoalexin response of lettuce to challenge by *Botrytis cinerea*, *Bremia lactucae* and *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **1994**, *44*, 321–333.
- (15) Monde, K.; Oya, T.; Shirata, A.; Takasugi, M. Studies on stress metabolites. 10. A guaianolide phytoalexin, cichoralexin, from *Cichorium intybus*. *Phytochem.* **1990**, *29*, 3449–3451.
- (16) Ahmad, V. U.; Yasmeen, S.; Ali, Z. Taraxacin, a new guaianolide from *Taraxacum walichii*. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1010–1011.
- (17) Tomás-Barberán, F. A.; Gil, M. I.; Castaner, M.; Artes, F.; Saltveit, M. E. Effect of selected browning inhibitors on phenolic metabolism in stem tissue of harvested lettuce. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 583–589.
- (18) Zeeh, B.; Meier, H.; Hesse, M. *Spektroskopische Methoden in der Organischen Chemie*; Thieme: Stuttgart, Germany, 2011.
- (19) Heinrich, T.; Willenberger, I.; Glomb, M. Chemistry formation during rooibos fermentation. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 5221–5228.

- (20) Frank, O.; Jezussek, M.; Hofmann, T. Characterisation of novel 1*H*,4*H*-quinolizinium-7-olate chromophores by application of colour dilution analysis and high-speed countercurrent chromatography on thermally browned pentose/*L*-alanine solutions. *Eur. Food Res. Technol.* **2001**, *213*, 1–7.
- (21) Sessa, R. A.; Bennett, M. H.; Lewis, M. J.; Mansfield, J. W.; Beale, M. H. Metabolite profiling of sesquiterpene lactones from *Lactuca* species—Major latex components are novel oxalate and sulphate conjugates of lactucin and its derivatives. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 26877–26884.
- (22) Bestwick, L.; Bennett, M. H.; Mansfield, W. Accumulation of the phytoalexin lettuceenin A and changes in 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in lettuce seedlings with the red spot disorder. *Phytochemistry* **1995**, *39*, 775–777.
- (23) Bestwick, C. S.; Bennett, M. H.; Mansfield, J. W. Hrp mutant of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* induces cell-wall alterations but not membrane damage leading to the hypersensitive reaction in lettuce. *Plant Physiol.* **1995**, *108*, 503–516.
- (24) Hanawa, F.; Kanauchi, M.; Tahara, S.; Mizutani, J. Lettuceenin A as a phytoalexin of dandelion and its elicitation in dandelion cell cultures. *J. Fac. Agric., Hokkaido Univ.* **1995**, *66* (2), 151–162.
- (25) Zidorn, C. Sesquiterpene lactones and their precursors as chemosystematic markers in the tribe Cichorieae of the Asteraceae. *Phytochemistry* **2008**, *69*, 2270–2296.

Structural and Sensory Characterization of Novel Sesquiterpene Lactones from Iceberg Lettuce

Franziska Mai and Marcus A. Glomb*

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

ABSTRACT: *Lactuca sativa* var. *capitata* (iceberg lettuce) is a delicious vegetable and popular for its mild taste. Nevertheless, iceberg lettuce is a source of bitter substances, such as the sesquiterpene lactones. Chemical investigations on the *n*-butanol extract led to the isolation of three novel sesquiterpene lactones. All compounds were isolated by multilayer countercurrent chromatography followed by preparative high-performance liquid chromatography. The structures were verified by means of spectroscopic methods, including NMR and mass spectrometry techniques. For the first time 11 β ,13-dihydrolactucin-8-*O*-sulfate (jaquinelin-8-*O*-sulfate) was structurally elucidated and identified in plants. In addition, the sesquiterpene lactones cichorioside B and 8-deacetylmaticarin-8-*O*-sulfate were identified as novel ingredients of iceberg lettuce. Further flowering plants in the daisy family *Asteraceae* were examined for the above three compounds. At least one of the compounds was identified in nine plants. The comparison between the lettuce butt end and the leaves of five types of the *Cichorieae* tribe showed an accumulation of the compounds in the butt end. Further experiments addressed the impact of sesquiterpene lactones on color formation and bitter taste.

KEYWORDS: iceberg lettuce, *Lactuca sativa*, multilayer countercurrent chromatography (MLCCC), sesquiterpene lactones, lettuce A, bitter taste, color formation

INTRODUCTION

The frequent consumption of bitter foods and beverages enjoys great popularity. A variety of bitter substances has been attributed to numerous health benefits and a high bioactivity.^{1,2} However, excessive bitterness is usually associated with consumer rejection.³ Substantial variation in the degree of bitterness has been reported among lettuce cultivars.⁴ The content of bitter substances in lettuce rises with increasing growth time and ambient temperature and depends on the amount and type of compounds present.⁴ With increasing growth time, especially during bolting and shortly before flowering, a burst of bitter substances in the latex of lettuce was reported.^{4,5} This effect is also known for the otherwise very mild iceberg lettuce.

The bitter taste in *Lactuca* species is mainly attributed to different quantities of sesquiterpene lactones.⁶ In 1984, Pyrek succeeded in verifying the guaianolides lactucin, 8-deoxylactucin, lactucopicrin, and jaquinelin in *Cichorium intybus*.⁷ 20 years later in 2004, Flick et al. were able to identify lactucin and lactucopicrin in iceberg lettuce.⁸ In 2010, Beharav et al. delivered new results on the occurrence and distribution of bitter substances in iceberg lettuce. They identified five additional structures: 8-deoxylactucin, jaquinelin, crepidiaside B, 11 β ,13-dihydrolactucin, and lactucoside A. Furthermore, they discovered that the bitter compounds are not homogeneously distributed in the plant. While high concentrations occurred in the milky white latex of the lettuce butt end, low concentrations were determined in the leaves of the lettuce.⁹ In 2000, Sessa et al. demonstrated some corresponding oxalate derivatives in *Lactuca* species: lactucin-15-oxalate, lactucopicrin-15-oxalate, and 8-deoxylactucin-15-oxalate.⁵ According to the literature, the oxalates are representative for the species of *Cichorium* and *Lactuca*, while sulfates, such as the 15-deoxylactucin-8-sulfate,

are specific for *Lactuca* species.⁵ In a recent study, Abu-Reidah et al. identified 10 known sesquiterpene lactones as their conjugated sulfate and amino acid derivatives in the genus *Lactuca*. However, on the basis of their MS/MS experiments it was not possible to distinguish at which position the sulfate and amino acid moieties were linked to the sesquiterpene lactone backbone.¹⁰ In addition, the corresponding glycosides of some known sesquiterpene lactones have been described in *Lactuca* species.¹¹ However, there are no reports on the occurrence of guaianolide glycosides in iceberg lettuce.

Colored lettuce A is also part of the sesquiterpene lactones in iceberg lettuce. The plant forms these lettuce A as an antimicrobial defense mechanism. In 1985, Takasugi et al. isolated lettuce A from *Lactuca sativa* L. var. *capitata* after inoculation with *Pseudomonas chicorii*.¹² Induced by the mechanical injury of lettuce samples, further derivatives of lettuce A were produced, isolated, and elucidated.¹³

With the present work we were able to isolate sesquiterpene lactones from lettuce by multilayer counter current chromatography (MLCCC). Three compounds were identified as novel to iceberg lettuce. To our knowledge, one of these compounds has never been described before. These sesquiterpene lactones were verified in nine further plants in the daisy family *Asteraceae*. To investigate the possible formation of colored sesquiterpenes from noncolored sesquiterpenes, several experiments were carried out. Finally, the influence of these new sesquiterpene lactones on the bitter taste was investigated

Received: October 23, 2015

Revised: December 9, 2015

Accepted: December 13, 2015

Published: January 4, 2016

with taste dilution analysis, and the bitter threshold values were determined.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. The following chemicals of analytical grade were commercially available: acetone, *n*-butanol, methylene chloride, diethyl ether, ethyl acetate, and hexane (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany). Formic acid (99–100%), *o*-phosphoric acid (85%), dipotassium hydrogen phosphate ($\geq 99.0\%$), and potassium dihydrogen phosphate ($\geq 99.0\%$) were obtained in high quality from VWR (Darmstadt, Germany). High-performance liquid chromatography (HPLC) solvent (HPLC grade $\geq 99.8\%$) methanol was purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) and acetonitrile from VWR (Darmstadt, Germany). NMR solvent dimethyl sulfoxide (DMSO- d_6) was obtained from Chemotrade (Leipzig, Germany). For all experiments, deionized and purified water was used (Siemens Ultra Clear UV UF TM, Barsbüttel, Germany).

Plant Material. Commercial varieties of lettuce (*Lactuca sativa* L., romaine, butterhead, iceberg, lollo rosso, lollobionda; *Cichorium intybus* L., radicchio, sugar loaf, chicory; *Cichorium endivia* L., endive, frisee) were obtained from local markets in Germany. The lettuce heads were prepared for further processing by removing and discarding wrapper leaves and brown spots. The plants were cut into squares (1 × 1 cm) using a sharp ceramic knife and mixed thoroughly. The fresh material was freeze-dried and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until used.

Extraction of Plant Material. For isolation of colorless sesquiterpene lactones, 100 g of freeze-dried material was extracted with methanol/water (85:15 v/v, 1.5 L) at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24 h. The filtrate was concentrated under reduced pressure ($<30\text{ }^{\circ}\text{C}$) until complete evaporation of methanol. The residual aqueous solution was successively extracted with *n*-hexane, methylene chloride, and *n*-butanol (2 × 200 mL). The extracts were evaporated to dryness, and the residues were used for multilayer counter-current chromatography.

Analytical HPLC-DAD. A Jasco system (Gross-Umstadt, Germany) with quaternary gradient unit PU 2080, with degasser DG 2080-S4, autosampler AS 2055, column oven (Jasco Jetstream II), and multiwavelength detector MD 2015 was used for quantitation of sesquiterpene lactones. External standard solutions were prepared from isolated authentic reference material. Chromatographic separations were performed on stainless steel columns (KNAUER Eurospher 100-5 C18, 250 × 4.0 mm, 5 μm , Berlin, Germany) connected to a precolumn (KNAUER Eurospher 100-5 C18, 5.0 × 4.0 mm I.D., 5 μm ; Berlin, Germany) using a flow rate of 1.0 mL/min. The mobile phase consisted of water (solvent A) and acetonitrile/water (9:1, v/v, solvent B). To both solvents (A and B) 10 mL/L formic acid was added. Samples were analyzed using a gradient system: samples were injected at 1% B and held for 10 min. The gradient was changed linearly to 52% B in 60 min. Then the gradient changed to 100% B. Within 5 min the compositions of the eluents were changed to starting conditions and equilibrated for 10 min. The column temperature was always $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. The effluent was monitored at 256 and 420 nm.

Multilayer Counter-current Chromatography. The MLCCC system (Ito, Multilayer Separator-Extractor model, P.C. Inc., Potomac, MD) was equipped with a constant flow pump (Waters 6000 A, Waters Corporation, Milford, MA), a Kontron spectrophotometer (Kontron 432, Kontron-Instruments, Rosdorf, Germany) operating at 256 nm, and a sample injection valve with a 10 mL sample loop. Eluted liquids were collected in fractions of 8 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 multilayer coil was prepared from a 1.6 mm inner diameter polytetrafluoroethylene (PTFE) tubing. The total capacity was 290 mL. The MLCCC was operated at a revolution speed of 790 rpm and a flow rate of the mobile phase of 2 mL/min in head-to-tail modus. Separation was performed by using a binary solvent system (upper phase as stationary phase and lower phase as mobile phase). Extracts were separated by using *n*-butanol/water (1:1 v/v) as solvent system.

Samples of 500 mg of dried *n*-butanol extract were dissolved in a 1:1 mixture of upper and lower phase (10 mL) and injected into the system. The collected fractions (11–15) were evaporated to dryness and the residues (50 mg) were used for preparative HPLC-UV.

Preparative HPLC-UV. A Besta HD 2-200 pump (Besta, Wilhelmsfeld, Germany) was used at a flow rate of 15 mL/min. Elution of materials was monitored by an UV-detector set at 265 nm (Jasco UV-2075, Gross-Umstadt, Germany). Up to 25 mg of material was injected. Chromatographic separations were performed on a stainless steel column (KNAUER, Eurospher 100-10 C18, 250 × 20 mm I.D., 10 μm , Berlin, Germany) connected to a precolumn. All target substances were separated isocratically with mixtures of water and methanol containing 0.8 mL/L formic acid: system A (water/methanol, 43:7, v/v) for 1 and 2 and system B (water/methanol, 26:7, v/v) for 3. From the individual chromatographic fractions, solvents were removed under reduced pressure.

Thin-Layer Chromatography (TLC). Glucose moiety was separated on precoated TLC plates (Merck TLC silica gel 60 F₂₅₄, Darmstadt, Germany) after hydrolysis with β -glucosidase. The plates were developed twice in one direction with a mixture of acetonitrile and water (1:1; v/v). The chromatograms were air-dried and sprayed with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride solution (5% TTC in methanol and 1:1 diluted with 1 M sodium hydroxide). Sprayed plates were incubated at $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 10 min. The R_f of glucose was 0.44.

Accurate Mass Determination. High-resolution positive and negative ion mass spectrometry (HRMS) spectra were obtained from a Bruker Apex III Fourier transform ion cyclotron resonance (FT-ICR) mass spectrometer (Bruker Daltonics, Billerica, MA) equipped with an Infinity cell, a 7.0 T superconducting magnet (Bruker, Karlsruhe, Germany), a radio frequency (RF)-only hexapole ion guide, and an external electrospray ion source (APOLLO; Agilent, off-axis spray). Nitrogen was used as drying gas at $150\text{ }^{\circ}\text{C}$. The samples were dissolved in methanol, and the solutions were introduced continuously via a syringe pump at a flow rate of 120 $\mu\text{L}/\text{h}$. The data were acquired with 256k data points and zero filled to 1024k by averaging 32 scans.

MS/MS Fragmentation. Mass analyses were performed using an Applied Biosystems API 4000 quadrupole instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA) equipped with an API source using an electrospray ionization (ESI) interface. The samples were dissolved in methanol, and the solutions were introduced continuously via a syringe pump at a flow rate of 100 $\mu\text{L}/\text{h}$. For electrospray ionization in positive (negative) mode, the following specifications are used: sprayer capillary voltage, 4500 V (-4500 V); nebulizing gas flow, 60 mL/min; heating gas, 50 mL/min with source temperature at $500\text{ }^{\circ}\text{C}$; and curtain gas, 50 mL/min. Declustering potential (DP), collision energy (CE), and cell exit potential (CEP) were optimized for each analyte.

Magnetic Resonance Spectroscopy. NMR experiments were performed on a Varian VNMR5 500 spectrometer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) operating at 500 MHz for ^1H and 200 MHz for ^{13}C , respectively. Samples were dissolved in DMSO- d_6 , and all spectra were run at $27\text{ }^{\circ}\text{C}$. Chemical shifts are given relative to external Me_4Si and were referenced to internal DMSO- d_6 (^1H , $\delta = 2.500\text{ ppm}$; ^{13}C , $\delta = 39.520\text{ ppm}$). Final structural evidence was achieved by ^1H and ^{13}C NMR measurements, as well as heteronuclear single quantum coherence (HSQC), heteronuclear multiple bond correlation (HMBC), homonuclear correlation spectroscopy (H₂COSY) and attached proton test (APT) measurements.

Bitter Taste Analysis. The human bitter threshold values of sesquiterpene lactones were determined by means of a triangle test using Evian bottled water as the solvent. For the stock solution each substance was dissolved in water. Dilutions of the samples were presented in an order of ascending concentrations (2.5; 5; 10; 15; 25; 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). To imitate the yellow color of lettuce A, the blank was accentuated by adding taste-free yellow coloring (E 104, quinoline yellow).

Each trial consisted of one test solution and two blanks in a different order. A 2 mL portion of each sample was tested, and the sensory panelists were then asked to move their tongue forward and backward toward the palate for 30 s and to identify the bitterness. Whenever the panelist selected incorrectly, the next trial took place at the next higher

concentration step. The geometric mean of the last and the second last concentration was calculated and taken as the individual recognition threshold. Seven different panelists evaluated the threshold value in two independent sessions.

For determination of the taste dilution factor (TD factor) an aliquot (50 μL) of *n*-butanol extract was analyzed by HPLC-DAD (the method described above). The effluent was separated into 45 fractions of 1 mL, which were separately collected with a coupled Advantec fraction collector CHF122SB (Advantec MFS Inc., Tokyo, Japan). The fractions were freeze-dried several times; the residues of five repeated injections were combined and taken up in 2 mL of Evian bottled water. The test solutions were stepwise 1:1 diluted with water and used for the tasting panel. Each dilution was tested with the triangle test as described above. The final dilution that was chosen correctly was defined as the TD factor. The TD factors evaluated by five different panelists in two independent sessions were averaged.

Purification of Lettuce Enzymes. The enzyme solution was prepared using the method of Fukumoto et al., with some modifications.¹⁴ Fresh iceberg samples were cut in 1 \times 1 cm squares using a ceramic knife. A 12.5 g sample was homogenized in a semimicro blender (Ultra-Turrax, IKA, Staufen, Germany) with 25 mL of chilled 0.05 M phosphate buffer (pH 6.2) and 1.88 g of polyvinylpyrrolidone (PVP). The mixture was blended for 60 s, filtered through four layers of Schleicher & Schuell papers no. 905¹, and centrifuged at 4500 rpm for 30 min at 4 $^{\circ}\text{C}$. The supernatant was filtered through Schleicher & Schuell papers no. 589¹, and the clarified filtrate was kept for a maximum of 5 h on ice until assayed.

Incubation of Lettuce Extract. Dried *n*-butanol extracts (100 mg) were dissolved in 1 mL of solvent B and diluted 1:4 with solvent A. An aliquot (50 μL) was then separated by analytical HPLC-DAD (the method described above). The effluent was separated into 52 fractions of 1 mL, which were separately collected with a coupled Advantec fraction collector CHF122SB (Advantec MFS Inc., Tokyo, Japan). The corresponding fractions obtained from five HPLC runs were collected, combined, and, after evaporation, dissolved in 250 μL of phosphate buffer (0.2 M, pH 6.5). After adding of 10 μL of above enzyme solution to 100 μL dissolved fraction and adjustment to 200 μL with buffer, the samples were incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 45 min. The absorbance of these solutions was measured at 420 nm every 1 min with a Tecan Infinite M200 Microplate reader including i-control software (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland). After 30 min, the incubations reached a plateau. The corresponding absorbance change was plotted in graphs.

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation and Elucidation of Sesquiterpene Lactones.

The plant material was extracted with methanol and water from freeze-dried iceberg lettuce. The resulting methanolic extract was screened by analytical HPLC-DAD. On the basis of the typical UV/vis spectra and by means of ESI-MS techniques, known and unknown sesquiterpene lactones were identified (Figure 1). The focus of further investigation was put on the isolation of unknown structures. Therefore, the aqueous residue of the methanolic extract was extracted with organic solvents of different polarity. In the *n*-butanol extract, three peaks were identified as novel sesquiterpene lactones in iceberg lettuce (Figure 2A). The first step of purification was the separation by MLCCC (Figure 2B) into 20 fractions. Afterward, fractions containing the three compounds (Figure 2C) were separated by preparative HPLC to yield pure substances.

The final structural evidence was achieved by ESI-MS and ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance measurements. The ESI-MS spectrum of compound 1 displayed a pseudo molecular ion peak at m/z 357.1 $[\text{M}-\text{H}]^-$ and HRMS gave molecular formula of $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_8\text{S}$ (m/z 357.06549 $[\text{M}-\text{H}]^-$ observed; m/z 357.06496, calculated; Table 1). Abu-Reidah et al. proposed a sulfate conjugated sesquiterpene lactone for this molecular

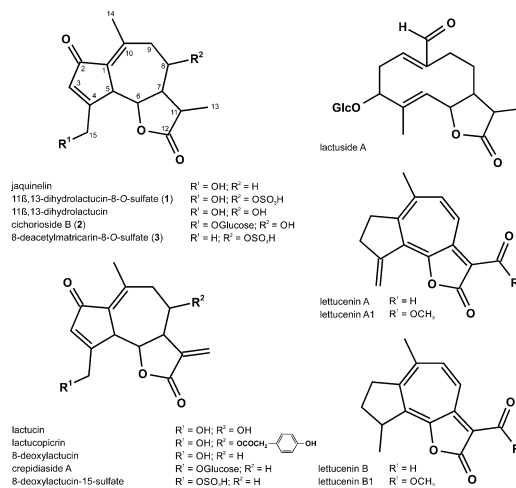


Figure 1. Structures of compounds characterized in iceberg lettuce.

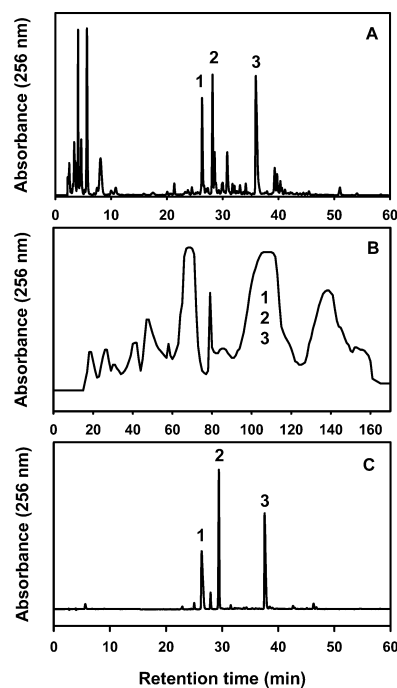


Figure 2. (A) HPLC-DAD chromatogram of *n*-butanol extract from iceberg lettuce at $\lambda = 256$ nm. Peaks: 1, 11 β ,13-dihydrolactucin-8-O-sulfate (27.5 min); 2, cichorioside B (28.7 min); 3, 8-deacetylmatricarin-8-O-sulfate (36.3 min). Retention times are given in parentheses. (B) MLCCC chromatogram of *n*-butanol extract from iceberg lettuce at $\lambda = 256$ nm; 1, 2 and 3 elute between 88 and 120 min (fractions 11 to 15). (C) HPLC-DAD chromatogram of MLCCC fraction at 104 min.

formula in *Lactuca sativa*, but no structure elucidation was presented.¹⁰ The present ^{13}C NMR and APT spectra of 1

Table 1. UV and HRMS Data of Sesquiterpene Lactones from Iceberg Lettuce

peak no.	compound	RT (min)	HPLC-DAD λ_{\max} (nm)	observed m/z [M-H] ⁻	calculated m/z [M-H] ⁻	molecular-formula
1	11 β ,13-dihydroxy-lactucin-8-O-sulfate	27.5	256	357.06549	357.06496	C ₁₅ H ₁₈ O ₈ S
2	cichorioside B	28.7	256	439.16205	439.16097	C ₂₁ H ₂₈ O ₁₀
3	8-deacetylmaticarin-8-O-sulfate	36.3	256	341.06965	341.07005	C ₁₅ H ₁₈ O ₇ S

showed 15 carbon signals including two methyl, two methylene, six methine, and five quaternary carbons. The ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data of **1** (Tables 2 and 3) were very close

Table 2. ¹H NMR Spectroscopic Data of Sesquiterpene Lactones 1, 2, and 3 Isolated from Iceberg Lettuce^a

C	1	2	3
1	–	–	–
2	–	–	–
3	6.27 (s, 1H)	6.57 (s, 1H)	6.16 (s, 1H)
4	–	–	–
5	3.69 (d, 1H, ³ J = 10.1 Hz)	3.74 (d, 1H, overlapped with H-6)	3.62 (d, 1H, ³ J = 10.1 Hz)
6	3.81 (m, 1H)	3.73 (m, 1H, overlapped with H-5)	3.55 (m, 1H)
7	2.24 (m, 1H)	2.13 (m, 1H)	2.27 (m, 1H)
8	4.08 (m, 1H)	3.56 (dt, 1H, ³ J = 10.5, 1.7 Hz)	4.08 (dt, 1H)
9	2.66 (dd, 1H, overlapped with H-11) 3.25 (m, 1H)	2.25 (dd, 1H, ³ J = 13.8, 1.7 Hz)	2.66 (dd, 1H, overlapped with H-11) 3.11 (m, 1H)
		2.70 (dd, 1H, ³ J = 13.8, 10.5 Hz)	
10	–	–	–
11	2.63 (dq, 1H, ³ J = 11.8, 6.9 Hz)	2.63 (dq, 1H, ³ J = 11.8, 6.9 Hz)	2.62 (dq, 1H, ³ J = 11.8, 6.9 Hz)
12	–	–	–
13	1.25 (d, 3H, ³ J = 6.9 Hz)	1.25 (d, 3H, ³ J = 6.9 Hz)	1.25 (d, 3H, ³ J = 6.9 Hz)
14	2.31 (s, 3H)	2.34 (s, 3H)	2.29 (s, 3H)
15	4.21 (d, 1H, ³ J = 18.7 Hz)	4.58 (d, 1H, ³ J = 18.0 Hz)	2.20 (s, 3H)
	4.64 (d, 1H, ³ J = 18.7 Hz)	4.66 (d, 1H, ³ J = 18.0 Hz)	
		Glucosyl Moiety	
1'	–	4.23 (d, 1H, ³ J = 7.8 Hz)	–
2'	–	3.03 (dd, 1H, ³ J = 9.1, 7.8 Hz)	–
3'	–	3.17 (dd, 1H, ³ J = 9.1, 8.6 Hz)	–
4'	–	3.10 (dd, 1H, ³ J = 9.7, 8.6 Hz)	–
5'	–	3.12 (m, 1H)	–
6'	–	3.46 (dd, 1H, ³ J = 11.9, 5.3 Hz)	–
		3.67 (dd, 1H, ³ J = 11.9, 1.8 Hz)	

^aAll spectra were recorded at 500 MHz in DMSO-*d*₆ in ppm; δ , chemical shift; *J*, coupling constant; hydrogen and carbon assignments were verified by HMBC, HSQC, H₂H-COSY, and APT measurements

to those of jaquinelin.^{15,16,19} ESI-MS analysis showed characteristic fragment ions at m/z 80 [SO₃]⁻ and 97 [HSO₄]⁻, which are consistent with the presence of a sulfate functionality in **1**. The major difference between the ¹H and ¹³C NMR data of both compounds were the chemical shifts of H-7, H-8, H-9 and C-7, C-8, C-9. The downfield shift of C-8 and the loss of the methylene group in position 8 revealed that the sulfate group is

Table 3. ¹³C NMR Spectroscopic Data of Sesquiterpene Lactones 1, 2, and 3 Isolated from Iceberg Lettuce^a

C	1	2	3
1	132.4	131.5	133.0
2	194.4	194.5	194.9
3	131.7	132.8	134.7
4	175.4	170.1	170.6
5	47.7	48.1	50.3
6	80.3	80.4	80.9
7	58.4	59.9	58.6
8	72.5	67.8	72.6
9	44.8	48.3	44.7
10	146.6	147.0	145.9
11	40.5	40.5	40.3
12	177.8	177.8	177.8
13	14.8	15.2	14.8
14	20.7	21.1	20.7
15	61.4	67.9	19.4
		Glucosyl Moiety	
1'		102.8	
2'		73.6	
3'		76.8	
4'		69.8	
5'		76.4	
6'		60.9	

^aAll spectra were recorded at 200 MHz in DMSO-*d*₆; δ , chemical shift; hydrogen and carbon assignments were verified by HMBC, HSQC, H₂H-COSY, and APT measurements

located at C-8. This was also confirmed by comparison with other C-8 sulfate-substituted sesquiterpene lactones (e.g., 15-deoxylactucin-8-sulfate)⁵ to unequivocally verify **1** as the sulfate form of jaquinelin, i.e., 11 β ,13-dihydroxylactucin-8-O-sulfate.

ESI-MS delivered for compound **2** a pseudo molecular ion of m/z 439.2 [M-H]⁻ and a molecular formula of C₂₁H₂₈O₁₀ based on HRMS (m/z 357.06549 [M-H]⁻ observed; m/z 357.06496 calculated). After hydrolysis by β -glucosidase, thin-layer chromatography indicated the presence of a glucose moiety. This was verified by NMR spectroscopy with ¹H signals at δ_{H} 3.03–3.67 ppm for H-2' to H-6' and the anomeric proton H-1' at δ_{H} 4.23 (d, ³J = 7.8 Hz) and with six carbon resonances at δ_{C} 102.8 ppm for the ketalic carbon C-1' and δ_{C} 73.6 ppm (CH), 76.8 ppm (CH), 69.8 ppm (CH), 76.4 ppm (CH), and 60.9 ppm (CH₂) for C-2' to C-6'. Coupling constant and chemical shifts verified the glucopyranoside moiety to be β -glycosidic attached to the sesquiterpenoid skeleton at C-15. This was indicated by a significant downfield shift of C-15 compared to **1** (δ_{C} 67.9 vs (δ_{C} 61.4 ppm)) and unequivocally confirmed by long-range HMBC correlations between H-1' to C-15 (δ_{C} 67.9 ppm) and H-15 (δ_{H} 4.58 ppm) to C-1'. Consequently, compound **2** was elucidated as cichorioside B with the spectroscopic data in agreement with the literature.^{17,18}

The ESI-MS spectrum of compound **3** displayed a pseudo molecular ion peak at m/z 341.1 [M-H]⁻ with the molecular

formula $C_{15}H_{18}O_7S$ confirmed by HRMS (m/z 341.06965 [M-H]⁻ observed; m/z 341.07005 calculated). ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data of **3** exhibited signals for a sesquiterpene moiety (Tables 2 and 3), almost superimposable to data reported for leucodine¹⁹ and the above data for **1**. In contrast to leucodine, a downfield shift was recorded at position 8 due to the additional sulfate group as also found in **1**. In contrast to **1**, the pair of doublets at position C-15 for the methylene group was replaced by a singlet (δ_H 2.20 ppm, 3H) for a methyl group. Thus, the isolated sulfate was verified as 8-deacetylmatricarin-8-*O*-sulfate, also named austricin-8-*O*-sulfate.

The identified compounds are all members of the lactucin-type subclass of guaianolides.¹ To our knowledge, 11 β ,13-dihydroxylactucin-8-*O*-sulfate has not been previously isolated and structurally characterized from *Lactuca sativa* L. or any other plants. Cichorioside B was reported for various plants of the Asteraceae family, but was not specifically identified in iceberg lettuce.^{1,18,20} 8-Deacetylmatricarin-8-*O*-sulfate has been reported from *Taraxacum alpinum*,¹⁶ however, this is the first verification in iceberg lettuce.

Occurrence in Asteraceae. The existing literature reports that lactucin and its derivatives occur in various species of the Asteraceae family and that the yields are higher in the latex of the lettuce butt end than in the leaves.^{1,21,30} Compounds **1–3** were analyzed by means of HPLC-DAD. Table 4 shows the distribution of the sesquiterpene lactones and quantitative differences among these compounds in leaves and butt end,

compared to the entire head of lettuce for 10 different varieties of Cichorieae (5 varieties of *Cichorium* and 5 varieties of *Lactuca*). One or more of these lactucin-type guaianolides were identified in all investigated *Cichorium* and *Lactuca* species. In iceberg lettuce, the concentrations for 11 β ,13-dihydroxylactucin-8-*O*-sulfate (**1**) were 17 ± 8 mg/kg dry weight in the entire head, for cichorioside B 41 ± 10 , and for 8-deacetylmatricarin-8-*O*-sulfate 33 ± 11 . The high error margins must be explained by natural concentration fluctuations in the plants, especially in commercial varieties of lettuce from local markets. Large variations in the concentration (up to 5 times higher) were found in lettuce butt ends after dissection. Nevertheless, our findings confirm that sesquiterpenes are unevenly distributed in *Lactuca sativa* L.^{5,21}

The glycoside cichorioside B (**2**) was the most frequently detected sesquiterpene lactone in the species examined. As opposed to that, the sulfate conjugated sesquiterpene lactones **1** and **3** were detected in only five species at concentration levels between 11 and 100 mg/kg dry weight and in butterhead at even lower levels. The data shows that component **1** occurred only if **3** was detected, and the concentration levels of **3** were generally higher than the levels of **1**. The highest concentrations of **1–3** were determined in radicchio followed by iceberg lettuce and endive. In general, the comparison of the concentrations in the various parts of the plant (leaves, butt end, entire head) indicates that the highest level was found in the lettuce butt end, whereas they were lower in the leaves. Furthermore, the concentrations were also lower in the entire head sample (leaves predominate) compared to the lettuce butt end. In this context, it should be pointed out that compounds **1–3** occur not only in members of the genus *Lactuca*, but also in other genera of the tribe *Lactuceae*, including *Cichorium*.

Nevertheless, this implies that sulfate and glucoside sesquiterpenoids might be much more common in the plant kingdom than previously assumed.¹ Sesquiterpene lactones, which are present in *Lactuca* species are constitutive components of the latex of the lettuce butt end and roots.²⁹ These latex-associated sesquiterpene lactones, particularly lactucin-type guaianolides, are mainly responsible for the bitterness of lettuce. Furthermore, these bitter substances are associated with antitumor, cytotoxic, antimicrobial, and phytotoxic activity and they act as insect feeding deterrents.^{22,23}

Formation of Lettucenin A. According to de Kraker et al., costunolide is considered to be an educt in the formation of sesquiterpene lactones in plants.²⁴ In 2002, they identified 11 β ,13-dihydrocostunolide and leucodine as possible intermediates within the formation of sesquiterpene lactones from costunolide after incubation with NADPH and oxygen.²⁵ Comparing **1–3** with the structure of leucodine implies that **1–3** might also be biosynthetic products of leucodine. It has been suggested that the conjugation to sulfate and sugars may represent a type of detoxification mechanism to inactivate potentially harmful products by solubilization.²⁶ A similar process of derivatization is conceivable for leucodine. Furthermore, based on studies by Bennett et al., it can be speculated that compounds **1–3** beside costunolide are also precursors for the synthesis of lettucenin A.²⁷ Nevertheless, intermediates within this enzymatic reaction cascade remain unknown.

In a first attempt, it was examined whether lettucenin A can be synthesized from structures **1–3**. During the browning of sliced iceberg lettuce, the concentrations of **1–3** were observed over a period of 55 h and correlated to the formation of

Table 4. Distribution of Sesquiterpene Lactones (**1–3**) in Various Species of Asteraceae^a

family	binomial name	cultivars	part	compound		
				1	2	3
Asteraceae	<i>Lactuca sativa</i> var. <i>capitata</i>	iceberg (crisphead)	E	+	+	+
			L	(+)	+	(+)
Asteraceae	<i>Lactuca sativa</i> var. <i>capitata</i>	butterhead	E	–	+	–
			L	–	+	–
			B	–	+	(+)
Asteraceae	<i>Cichorium intybus</i> var. <i>foliosum</i>	radicchio	E	+	++	+
			L	+	++	+
			B	+	++	++
Asteraceae	<i>Cichorium endivia</i> var. <i>latifolia</i>	endive	E	+	++	+
			L	+	+	+
			B	+	++	+
Asteraceae	<i>Cichorium intybus</i> L.	chicory	E	–	+	–
			L	–	+	–
			B	–	++	–
Asteraceae	<i>Lactuca sativa</i> var. <i>longifolia</i>	romaine	E	–	+	+
Asteraceae	<i>Lactuca sativa</i> var. <i>crispa</i>	lollo rosso	E	–	+	–
Asteraceae	<i>Lactuca sativa</i> var. <i>crispa</i>	lollo bionda	E	–	+	–
Asteraceae	<i>Cichorium endivia</i> var. <i>crispum</i>	frisee	E	+	+	+
Asteraceae	<i>Cichorium intybus</i> var. <i>foliosum</i>	sugar loaf	E	–	+	–

^a–, not detected; (+), less than 10 mg/kg of the dry weight (DW); +, 11–100 mg/kg DW; ++, 101–1000 mg/kg DW; E, entire head (complete plant); L, leaves; B, butt end.

lactucenin A and to the total browning at 420 nm in Figure 3. The maximum of formation for 1–3 was 20 h, followed by a

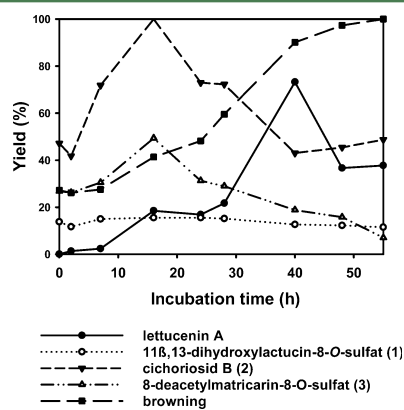


Figure 3. Concentrations of sesquiterpene lactones (1, 2, 3, and lactucenin A) in sliced iceberg lettuce over a period of 55 h, expressed as percentage of total sesquiterpene concentration. Browning: absorbance monitored at $\lambda = 420$ nm.

steady decrease. In parallel to degradation, the synthesis of lactucenin A and an increase in absorbance at 420 nm were observed, suggesting indeed a biochemical relationship between 1–3 and lactucenin A. To directly test for this pathway, the *n*-butanol extract was fractionated by analytical HPLC-DAD and the obtained fractions were incubated with a lettuce extract, reported to contain enzyme activities.¹⁴ The resulting change in absorbance was measured at 420 nm (Figure 4). Obviously, there was no specific reaction of 1, 2, or 3 after treatment with this crude enzyme solution, although a slight browning was observed. No lactucenin A was detected in any of the incubated fractions. Instead, the peak eluting after 2 containing a caffeoyl derivative (peaks marked with asterisks * were characterized by authentic standards based on their UV/vis spectra²⁸) led to a significant change in absorbance at 420 nm. This browning potential of caffeoyl derivatives was also apparent for two peaks eluting from 37 to 39 min. In a previous study we investigated the browning of polyphenolic ingredients of iceberg lettuce. We demonstrated that caffeoyl derivatives are involved in the color change of cut or bruised iceberg lettuce. However, as seen here, the experiments did not lead to specific colored structures from the individual polyphenols.²⁸

For future studies on the formation of lactucenin A from colorless sesquiterpene lactones it seems necessary to use germacrene A as a precursor. Bennett et al. postulated a mechanism of formation of lactucenin A starting from farnesyl diphosphate to germacrene A via costunolide or guaiane by multistage enzyme reactions.^{27,29} The key enzyme of germacrene A synthesis is the sesquiterpensynthase. This membrane-bound cytochrome P450 enzyme and additional NADP⁺-dependent dehydrogenases are suggested to be responsible for further modifications at the sesquiterpene lactone backbone.²⁵

Sensory Effects of Sesquiterpene Lactones. Another characteristic of sesquiterpene lactones is their bitter taste. Lactucin and lactucopicrin have long been known to be responsible for the bitterness in lettuce.⁸ In 1990, Van Beek et

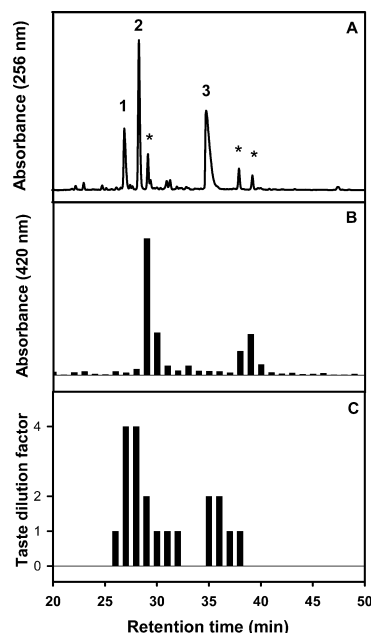


Figure 4. (A) HPLC-DAD chromatogram of *n*-butanol extract from iceberg lettuce at $\lambda = 256$ nm. Peaks marked with asterisks * are caffeoyl derivatives. (B) Absorbance at $\lambda = 420$ nm of collected fractions after incubation with iceberg lettuce extract. (C) Taste dilution chromatogram of *n*-butanol extract from iceberg lettuce.

al. showed that lactucopicrin (0.5 ppm) and dihydroxylactucenicrin (0.2 ppm) have lower bitter thresholds than quinine hydrochloride (1.6 ppm). Other investigated lactones, for example lactucin (1.7 ppm) and dihydroxylactucin (1.4 ppm), displayed a comparable bitterness.³⁰ In fact, sesquiterpene lactones influence the overall bitterness of lettuce.⁶ To locate bitter tasting compounds in the above fractionated *n*-butanol extract, the extract was also subjected to taste dilution analysis. After freeze-drying and reconstitution, each fraction was stepwise diluted 1:1 with water and tested by a trained sensory panel until the threshold was reached. Compounds 1–3 were elucidated as the bitter principles of the butanolic extract with compound 2 having the highest impact on bitterness, followed by compounds 1 and 3 (Figure 4C).

The influence of concentration in taste dilution analysis was eliminated by determination of the bitter threshold of each individual novel compound, which were 30, 25, and 50 ppm for 1, 2 and 3, respectively. The literature suggests that substitution at the β -position lowers the bitterness threshold value and that reduction of the exocyclic methylene group of the α,β -unsaturated lactone ring enhances the bitterness.³⁰ Obviously from our data an additional substituent at C-8 or C-15 has a major impact on the bitter taste, i.e., glucose or sulfate modification leads to a significant reduction of bitterness compared to hydroxyl groups, as in dihydroxylactucenicrin, by a factor of more than 100. Because lactucenin A shows the same basic sesquiterpenic structure, however at a higher degree of unsaturation, and sensory qualities of this colored lead compound have not been published to date, our sensory panel also determined its bitter threshold at 15 ppm.

In conclusion, three novel sesquiterpene lactones, 11 β ,13-dihydroxylactucin-8-O-sulfate, cichoriosid B, and 8-deacetylmartricarin-8-O-sulfate, were unequivocally identified in iceberg lettuce and other members of the *Asteraceae* family, which contribute to the bitterness of this group of vegetables. The role of these and other sesquiterpenes on the biochemical formation of colored structures could not be clarified and is the subject of current investigations.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: marcus.glomb@chemie.uni-halle.de. Fax: ++49-345-5527341.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank D. Ströhl from the Institute of Organic Chemistry, Halle (Germany), for recording NMR spectra. We are also grateful to J. Schmidt from the Leibniz Institute of Plant Biochemistry, Halle (Germany), for performing accurate mass analysis.

REFERENCES

- Zidorn, C. Sesquiterpene lactones and their precursors as chemosystematic markers in the tribe *Cichorieae* of the *Asteraceae*. *Phytochemistry* **2008**, *69*, 2270–2296.
- Bäumler, S. *Heilpflanzenpraxis heute: Porträts, Rezepturen, Anwendung*; Elsevier GmbH: Munich, Germany, 2006.
- Drewnowski, A.; Gomez-Carneros, C. Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: A review. *Am. J. Clin. Nutr.* **2000**, *72*, 1424–1435.
- Bunning, M. L.; Kendall, P. A.; Stone, M. B.; Stonaker, F. H.; Stushnoff, C. Effects of Seasonal Variation on Sensory Properties and Total Phenolic Content of 5 Lettuce Cultivars. *J. Food Sci.* **2010**, *75* (3), S156–S161.
- Sessa, R. A.; Bennett, M. H.; Lewis, M. J.; Mansfield, J. W.; Beale, M. H. Metabolite profiling of sesquiterpene lactones from *Lactuca* species - Major latex components are novel oxalate and sulphate conjugates of lactucin and its derivatives. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 26877–26884.
- Price, K. R.; Dupont, M. S.; Shepherd, R.; Chan, H. W. S.; Fenwick, G. R. Relationship between the Chemical and Sensory Properties of Exotic Salad Crops - Colored Lettuce (*Lactuca-Sativa*) and Chicory (*Cichorium-Intybus*). *J. Sci. Food Agric.* **1990**, *53*, 185–192.
- Pyrek, J. S. Sesquiterpene lactones of *Cichorium intybus* and *Leontodon autumnalis*. *Phytochemistry* **1985**, *24*, 186–188.
- Flick, G.; Meier, J.; Schultze, D. Bitter principles of iceberg lettuce (*Lactuca sativa*) as a criterion for cultivation assessment of head lettuce. *VDLUFA-Schriften* **2004**, *59*, 510–515.
- Beharav, A.; Ben-David, R.; Malarz, J.; Stojakowska, A.; Michalska, K.; Dolezalova, I.; Lebeda, A.; Kisiel, W. Variation of sesquiterpene lactones in *Lactuca aculeata* natural populations from Israel, Jordan and Turkey. *Biochem. Syst. Ecol.* **2010**, *38*, 602–611.
- Abu-Reidah, I. M.; Contreras, M. M.; Arráez-Román, D.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A. Reversed-phase ultra-high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization–quadrupole–time-of-flight mass spectrometry as a powerful tool for metabolic profiling of vegetables: *Lactuca sativa* as an example of its application. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1313*, 212–227.
- Michalska, K.; Kisiel, W. A new guaianolide glucoside from aerial parts of *Lactucaaculeata*. *Phytochem. Lett.* **2012**, *5*, 301–303.
- Takasugi, M.; Okinaka, S.; Katsui, N.; Masamune, T.; Shirata, A.; Ohuchi, M. Isolation and Structure of Lettucenin-A, A Novel Guaianolide Phytoalexin from *Lactuca sativa* var. *capitata* (*Compositae*). *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1985**, *10*, 621–622.
- Mai, F.; Glomb, M. A. Lettucenin Sesquiterpenes Contribute Significantly to the Browning of Lettuce. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 4747–4753.
- Fukumoto, L. R.; Toivonen, P. M. A.; Delaquis, P. J. Effect of Wash Water Temperature and Chlorination on Phenolic Metabolism and Browning of Stored Iceberg Lettuce Photosynthetic Vascular Tissues. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 4503–4511.
- Adegawa, S.; Miyase, T.; Ueno, A.; Noro, T.; Kuroyanagi, M.; Fukushima, S. Sesquiterpene glycosides from *Crepidiastrum Keiskeanum* Nakai. *Chem. Pharm. Bull.* **1985**, *33*, 4906–4911.
- Michalska, K.; Kisiel, W. A guaianolide sulfate conjugate and other constituents from *Taraxacum alpinum*. *ChemInform* **2007**, *38*, 515–519.
- Seto, M.; Miyase, T.; Umehara, K.; Ueno, A.; Hirano, Y.; Otani, N. Sesquiterpene lactones from *Cichorium endivia* L. and *C. intybus* L. and cytotoxic activity. *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, *36*, 2423–2429.
- Kim, K. H.; Lee, K. H.; Choi, S. U.; Kim, Y. H.; Lee, K. R. Terpene and phenolic constituents of *Lactuca indica* L. *Arch. Pharmacol. Res.* **2008**, *31*, 983–988.
- Glasl, S.; Mucaji, P.; Werner, I.; Presser, A.; Jurenitsch, J. Sesquiterpenes and Flavonoid Aglycones from a Hungarian Taxon of the *Achillea millefolium* Group. *Z. Naturforsch., C: J. Biosci.* **2002**, *57c*, 976–982.
- Han, Y.; Cao, G.; Gao, X.; Xia, M. Isolation and characterization of the sesquiterpene lactones from *Lactuca sativa* L. var. *anagustata*. *Food Chem.* **2010**, *120*, 1083–1088.
- Michalska, K.; Stojakowska, A.; Malarz, J.; Dolezalova, I.; Lebeda, A.; Kisiel, W. Systematic implications of sesquiterpene lactones in *Lactuca* species. *Biochem. Syst. Ecol.* **2009**, *37*, 174–179.
- Rodriguez, E.; Towers, G. H. N.; Mitchell, J. C. Biological activities of sesquiterpene lactones. *Phytochemistry* **1976**, *15*, 1573–1580.
- Picman, A. K. Biological activities of sesquiterpene lactones. *Biochem. Syst. Ecol.* **1986**, *14*, 255–281.
- de Kraker, J. W.; Franssen, M. C. R.; Dalm, M. C. F.; De Groot, A.; Bouwmeester, H. J. Biosynthesis of germacrene A carboxylic acid in chicory roots. Demonstration of a cytochrome P450 (+)-germacrene A hydroxylase and NADP⁺-dependent sesquiterpenoid dehydrogenase(s) involved in sesquiterpene lactone biosynthesis. *Plant Physiol.* **2001**, *125*, 1930–1940.
- de Kraker, J. W.; Franssen, M. C. R.; Joerink, M.; De Groot, A.; Bouwmeester, H. J. Biosynthesis of costunolide, dihydrocostunolide, and leucodin. Demonstration of cytochrome P450-catalyzed formation of the lactone ring present in sesquiterpene lactones of chicory. *Plant Physiol.* **2002**, *129*, 257–268.
- Harborne, J. B. Phenolic compounds derived from shikimate. *Biosynth.* **1977**, *5*, 34–55.
- Bennett, M. H.; Gallagher, M. D. S.; Bestwick, C. S.; Rossiter, J. T.; Mansfield, J. W. The Phytoalexin Response of Lettuce to Challenge by *Botrytis cinerea*, *Bremia lactucae* and *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **1994**, *44*, 321–333.
- 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.
- Bennett, M. H.; Mansfield, J. W.; Lewis, M. J.; Beale, M. H. Cloning and expression of sesquiterpene synthase genes from lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Phytochemistry* **2002**, *60*, 255–261.
- Van Beek, T. A.; Maas, P.; King, B. M.; Leclercq, E.; Voragen, A. G. J.; De Groot, A. Bitter sesquiterpene lactones from chicory roots. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38*, 1035–1038.

12 Lebenslauf

Persönliche Daten

Franziska Mai (geboren Woyand)
geboren am 02. Juni 1983 in Leipzig

Berufstätigkeit und wissenschaftlicher Werdegang

Seit 10/2014	Laborleiterin und Qualitätsmanagementbeauftragte Markranstädt
10/2012 – 9/2014	Elternzeit
10/2008 – 9/2012	wissenschaftliche Mitarbeiterin und Promotion Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Institut für Chemie - Lebensmittelchemie und Umweltchemie Arbeitskreis Professor Glomb
05/2008 – 09/2008	wissenschaftliche Mitarbeiterin, Vertretung Oberassistent Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg Institut für Chemie - Lebensmittelchemie und Umweltchemie Arbeitskreis Professor Glomb

Studium/Ausbildung

05/2007 – 04/2008	Landesamt für Verbraucherschutz Sachsen-Anhalt, Halle Ausbildung zur staatlich geprüften Lebensmittelchemikerin Abschluss: Staatlich geprüfte Lebensmittelchemikerin
10/2002 – 04/2007	Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg Studium Lebensmittelchemie Abschluss: Diplom-Lebensmittelchemikerin

Schulbildung

08/1998 – 06/2002	Wiprecht-Gymnasium, Groitzsch Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
08/1994 – 06/1998	Max-Klinger-Gymnasium, Leipzig
08/1990 – 06/1994	Grundschule, Leipzig

13 Publikationsliste

Publikationen

Mertens, N.; Mai, F.; Glomb, M.A.: Influence of Nucleophilic Amino Acids on Enzymatic Browning Systems *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, Volume 67, Issue 6, pages 1719-1725, January **2019**

Mai, F.; Glomb, M.A.: Structural and Sensory Characterization of Novel Sesquiterpene Lactones from Iceberg Lettuce *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, Volume 64, Issue 11, pages 295-301, January **2016**

Mai, F.; Glomb, M.A.: Lettucenin Sesquiterpenes Contribute Significantly to the Browning of Lettuce. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, Volume 62, Issue 20, pages 4747-4753, May **2014**

Mai, F.; Glomb, M.A.: Isolation of Phenolic Compounds from Iceberg Lettuce and Impact on Enzymatic Browning. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, Volume 61, Issue 11, pages 2868–2874, March **2013**

Krafczyk, N.; Woyand, F.; Glomb, M.A.: Structure-antioxidant relationship of flavonoids from fermented rooibos. *Molecular Nutrition & Food Research*, Volume 53, Issue 5, pages 635–642, May **2009**

Wissenschaftliche Vorträge

Woyand, F.; Glomb, M.A.: Isolierung und Charakterisierung von farbigen Verbindungen aus gebräuntem Eisbergsalat. Lebensmittelchemische Gesellschaft, 40. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 14. September **2011**
Halle (Saale)

Posterbeiträge

Woyand, F.; Bock, S.; Glomb, M.A.: Der Einfluss von Salatinhaltsstoffen auf die Sensorik. Lebensmittelchemische Gesellschaft, 41. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 10. - 12. September **2012**, Münster

- Woyand, F.; Schuldt, S.; Glomb, M.A.: Strukturaufklärung von Bräunungsprodukten im Salat. Lebensmittelchemische Gesellschaft, 40. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 12. - 14. September **2011**, Halle (Saale)
- Bürger, F.; Woyand, F., Glomb, M.A.: Isolierung und Charakterisierung von Inhaltsstoffen im Eisbergsalat. Lebensmittelchemische Gesellschaft, 40. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 12. - 14. September **2011**, Halle (Saale)
- Woyand, F.; Sandmann, D.; Glomb, M.A.: Polyphenolische Inhaltsstoffe von Salat. Lebensmittelchemische Gesellschaft, 39. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 20. - 22. September **2010**, Stuttgart Hohenheim
- Bauherr, A.; Woyand, F., Glomb, M.A.: Modellsysteme zur enzymatischen Bräunung von schwarzem Tee. Lebensmittelchemische Gesellschaft, 38. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 14. - 16. September **2009**, Berlin
- Haupt, N.; Woyand, F., Glomb, M.A.: Charakterisierung der Struktur-Wirkungsbeziehungen in vitro und in vivo und Isolierung von Flavonoiden aus Rooibostee. Lebensmittelchemische Gesellschaft, 36. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 10. - 12. September **2007**, Erlangen-Nürnberg
- Woyand, F.; Haupt, N.; Glomb, M.A.: Untersuchung der antioxidativen Kapazität ausgesuchter Polyphenole des Rooibostees in vivo. Lebensmittelchemische Gesellschaft, 36. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 10. - 12. September **2007**, Erlangen-Nürnberg

14 Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Franziska Mai (geb. Woyand), dass ich die eingereichte Dissertation „Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe und ihr Einfluss auf die enzymatische Bräunung von *Lactuca sativa* var. *capitata*“ von mir selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt habe. Die den benutzen Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche kenntlich gemacht. Diese Arbeit wurde bisher an keiner anderen Einrichtung zur Begutachtung vorgelegt.

.....

Datum, Unterschrift