



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **NMR spectroscopy and chemometrics-based analysis of grapevine**

Ali, K.

### **Citation**

Ali, K. (2011, September 20). *NMR spectroscopy and chemometrics-based analysis of grapevine*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/17843>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/17843>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).

## **Samenvatting**

---

Druiven en wijn zijn wereldwijd zeer belangrijke levensmiddelen. Afgezien van het feit dat druiven en wijn een integraal onderdeel vormen van vele culturen en sociale praktijken over de hele wereld, zijn ze economisch gezien van grote waarde. De chemie van druiven en wijn toont een rijke diversiteit in metabolieten en structuren. De functies en de biosynthese van deze metabolieten zijn sterk geconditioneerd door vele biotische en abiotische factoren. Tal van geneeskrachtige activiteiten zijn reeds gemeld voor druiven- en wijnmetabolieten. Zoals menig ander fruit zijn druiven gevoelig voor diverse ziekten, die grote economische verliezen voor de druiventeelt kunnen betekenen. Er is veel aandacht besteed aan de fytoalexinen in wijnstok, afweerstoffen die betrokken zijn in de afweer tegen deze ziekten. Biotechnologie heeft een mogelijkheid om deze problemen op te lossen, zodat dit gebied van onderzoek aan populariteit wint. Grote inspanningen worden gedaan om wijnstokcultivars met verhoogde weerstand te produceren, resulterend in een betere vrucht- en uiteindelijk wijnkwaliteit (**hoofdstuk 2**). De nu net iets meer dan een decennium oude methode van metabolomics is bedoeld om een accurate en uitgebreide indruk van het metabolietenprofiel van een cel, weefsel, orgaan, of een organisme te verkrijgen. De gegevens die hieruit voortkomen kunnen niet alleen gebruikt worden voor de fenotypische karakterisatie van een organisme, maar ook hulp bieden aan studies om het metabolietenprofiel te sturen, stressfysiologie, identificatie van nieuwe metabolieten, kwaliteitscontrole, en de voorspelling van farmacologische activiteiten. Momenteel worden nog veel analytische methoden gebruikt voor dergelijke analyses, die echter verschillen in hun gevoeligheid, of eenzijdig zijn gericht op specifieke klasse van metabolieten. Van de metabolomics methoden worden LC- of GC-MS en NMR-spectroscopie het meest gebruikt. Op NMR gebaseerde metabolomics wordt nu op grote schaal toegepast vanwege de vele unieke voordelen van deze techniek boven de anderen (**hoofdstuk 3**). Het in dit proefschrift beschreven onderzoek was gericht op metabole karakterisering van druivencultivars en soorten wijn met behulp van NMR-spectroscopie in combinatie met chemometrische methoden. Dezelfde aanpak werd gebruikt om verschillende fysiologische processen te bestuderen in de wijnstok, zoals rijping van het fruit en de weerstand tegen pathogene schimmels. Een andere doelstelling van dit onderzoek was om de gegevens van het metabole profiel van druiven en wijn te correleren met de gegevens omtrent bioactiviteit met behulp van verschillende multivariate-

regressiemodellen. Om deze doelen te bereiken, was de eerste stap het optimaliseren van een pre-analytische methode geschikt voor de metabolomics van druiven. Het chemische profiel van de druif bestaat uit verschillende klassen van diverse metabolieten zoals organische zuren, aminozuren en fenolen, maar wordt gedomineerd door suikers. De meest voorkomende extractieprotocollen zijn getest, maar slechts twee van hen, solid phase extraction (SPE) en directe extractie met gedeutereerd methanol en water (1:1), bleken het meest effectief. De directe extractie werkte efficiënt in het geval van organische zuren, aminozuren en suikers, maar voor fenolen bleek vooral SPE zeer effectief (**hoofdstuk 4**).

De geselecteerde protocollen werden toegepast om drie Portugese druivencultivars te karakteriseren, met name om de biochemische veranderingen te volgen die zich voordoen tijdens de vruchtontwikkeling (**hoofdstuk 5**). Deze drie cultivars waren 'Trincadeira', 'Aragones', en 'Touriga Nacional'. In 'Trincadeira' werd een laag fenolgehalte gevonden in vergelijking met de twee andere twee cultivars. De initiële groeifases, *groen* en *veraison*, toonden een relatief hoog gehalte aan fenolen en organische zuren, zoals caftaric acid en appelzuur, terwijl de latere stadia hogere glucose- en fructoseniveaus werden gemeten. *Veraison* bleek een metabolische kritieke fase in de ontwikkeling van het fruit.

Dezelfde set van monsters is ook getest op anti-TNF $\alpha$  activiteit met menselijke lymfoomcellijnen (**hoofdstuk 6**). Wederom werd SPE gebruikt en daar de methanol:water-fractie het merendeel van de fenolen bevatte, werd een aanzienlijk hogere activiteit gevonden dan voor de 100%-methanol en 100%-waterfractie. Van de drie cultivars toonde 'Touriga Nacional' de meeste activiteit, terwijl in het algemeen de groeifasen *groen* en *veraison* het meest krachtig waren in het remmen van TNF $\alpha$  productie. Verschillende multivariate dataregressiemethoden werden toegepast zoals *projections to latent structures* (PLS), om de NMR en anti-TNF $\alpha$  activiteiten te correleren. Metabolieten zoals quercetine, myricetine, (+)- catechine, (-)-epicatechine, caftaraat, en coutaraat, bleken positief gecorreleerd met een hoge activiteit.

Voor wat betreft wijn was de eerste doelstelling het uitvoeren van een metabole profilering van witte wijnen op basis van soorten en oogst, en deze gegevens te correleren met de sensorische evaluatie uitgevoerd door een panel van deskundigen van deze wijnen (**hoofdstuk 7**). Twee Duitse witte wijnen, 'Riesling' en 'Mueller-Thurgau',

uit twee verschillende oogstjaren, werden hiervoor gebruikt. Multivariate analyse, OPLS, werd toegepast en hieruit kwam naar voren dat 'Riesling' wijnen werden gekenmerkt door een hoger niveau van (+)-catechine, proline, malaat, en citraat terwijl verbindingen als quercetine, gallaat, threonine, succinaat en lactaat vooral werden gevonden in 'Mueller-Thurgau'. De wijnen uit 2006 werden gedomineerd door leucine, fenylalanine, citraat, malaat en fenolen, terwijl valine, proline, alanine en succinaat voornamelijk aanwezig waren in de wijnoogst 2007. Er werd ook aangetoond dat sensorische analyse correleert met NMR-gebaseerde metabolische profielen van wijn met behulp van verschillende methoden chemometrie. Waargenomen werd dat de wijnen van hoge kwaliteit werden gekenmerkt door verhoogde concentraties van verbindingen als proline, malaat, quercetine, en (+)-catechine. Een verbinding met de naam 2,3-butaandiol bleek ook een indirect positief effect op de wijnsmaak te hebben. Net als voor druiven werden verschillende rode wijnen uit Portugal, van verschillende oogstjaren, geanalyseerd voor in-vitro anti-TNF-activiteit (**hoofdstuk 8**). Gebaseerd op de chemometrische methoden zoals O2PLS en O2PLS-DA, werden veel fenolen gevonden positief gecorreleerd te zijn met TNF $\alpha$ -remming in een humane cellijn. Deze metabolieten zijn quercetine, (+)-catechine, en caftarat.

Wijnbladeren zijn het derde type monsters dat geanalyseerd is tijdens dit project. De eerste doelstelling was om de metabole karakterisering van verschillende soorten wijnstok (*Vitis*) soorten uit te voeren (**hoofdstuk 9**), terwijl de tweede doelstelling was om de metabole respons van resistente en vatbare wijnstokcultivars te analyseren na inoculatie met een pathogene schimmel (**hoofdstuk 10**). Er werd waargenomen dat de resistente druivensoorten inherent verschillend zijn van de gevoelige soorten door de sterke accumulatie van fenolen zoals fenylpropanoiden en flavonoiden. Dezelfde klassen van secundaire metabolieten werden aangetoond van cruciaal belang te zijn in de afweer door wijnstok tegen schimmels. Er werd waargenomen dat deze metabolieten snel werden geproduceerd door de resistente cultivar na 24 uur van inoculatie. Aanzienlijk hogere niveaus werden waargenomen in vergelijking met de vatbare cultivar na 48 uur van de pathogeeaanval.

Veel succesvol onderzoek aan verschillende aspecten van de wijnrank, druiven en wijn met behulp van metabolomics met NMR spectroscopie en multivariate data analyse, laten zien dat deze methode nu een robuust platform is met prima toekomst

perspectieven voor allerlei toepassingen voor onderzoek naar de wijnrank, druif en wijn. De studie van de rijping van de druif, het begrijpen de wijn bereiding, druif en wijn sensorische analyse, verschillende biologische activiteiten van fenolen uit druiven en wijn, en de weerstand tegen ziekteverwekkers in de wijnrank zijn belangrijke gebieden voor verder onderzoek. Het is noodzakelijk om de verschillende “-omics” data te combineren om de complexe processen in de resistentie van de wijnrank tegen ziektes en plagen, de ontwikkeling van de druif en het maken van wijn verder te verkennen. De vooruitgang in de analytische chemische methodes en de ontwikkeling van meer gevoelige instrumenten zal onze kennis over druiven en wijn chemie verder vergroten, omdat er nog veel valt te leren op het niveau van het metabolome.