

## IV. Gesundheit aus dem Garten

Moderation: Dr. Hartwig Schulz

Monika Schreiner, Melanie Wiesner, Iryna Smetanska, Angelika Krumbein

### Bioaktive Inhaltsstoffe in Gemüse – Glucosinolate in Brassicales-Arten

Bioactive compounds in vegetables - glucosinolates in Brassicales species

#### Zusammenfassung

In zahlreichen epidemiologischen Studien wurde eine inverse Beziehung zwischen dem Gemüse- und Obstverzehr und dem Auftreten von chronisch-degenerativen Erkrankungen des Menschen wie Krebs und kardiovaskulären Beschwerden nachgewiesen. Dabei konnten deutliche Hinweise für eine protektive Wirkung von sekundären Pflanzenstoffen in Gemüse und Obst ermittelt werden. Die gezielte Applikation von Elicitoren kann zur einer Anregung des pflanzlichen Sekundärmetabolismus führen und damit zu einer Anreicherung von Sekundärmetaboliten wie den Glucosinolaten. Somit wird der gesundheitliche Zusatznutzen u. a. von Gemüse erhöht und ein natürliches funktionelle Lebensmittel entwickelt, wobei gleichzeitig die Aufnahme von gesundheitlich wirksamen Sekundärmetaboliten verstärkt werden kann.

Schlüsselwörter: Sekundärmetabolite, Elicitor, UV-B-Strahlung, atmosphärisches CO<sub>2</sub>, Signalmoleküle, Aminosäuren, Enterobacter

#### Abstract

Inverse associations between fruit and vegetable intake and chronic diseases, such as different types of cancer and cardiovascular disease, have been demonstrated in numerous epidemiological studies. Phytochemicals have been indicated to be responsible for this observed protective effect. Application of elicitors can trigger distinct changes in the plant's secondary metabolism. Thus, targeted elicitor treatments may be used to obtain vegetables enriched with glucosinolates for sale as fresh market products or used as raw material for functional foods and supplements, thereby promoting higher consumption of these health-promoting substances.

Key words: secondary plant metabolites, elicitor, UV-B treatment, atmospheric CO<sub>2</sub>, signalling molecules, amino acids, Enterobacter

#### Einleitung

Sekundäre Pflanzenstoffe gehören zu den bioaktiven Substanzen. Sie wurden lange Zeit als antinutritive Pflanzenstoffe abgetan. Schlagartig erhöhte sich jedoch das Interesse an sekundären Pflanzenstoffen, als Anfang der 90er Jahre mehr über ihr gesundheitsförderndes Potenzial beim Menschen bekannt wurde. Das Spektrum der ihnen zugeschriebenen Wirkungen ist ansehnlich: Es reicht von der Stimulierung des Immunsystems bis zur Senkung des Krebsrisikos (Holst und Williamson 2005).

Glucosinolate sind typische Sekundärmetabolite der Brassicales. Zu der Ordnung der Brassicales zählen alle *Brassica*-Gemüsearten, aber auch Kräuter wie Wasser- und Kapuzinerkresse und Obst wie beispielsweise Papaya. Die Glucosinolate sind  $\beta$ -D-Thioglucoside, wobei der Seitenkettenrest der Aglycone variiert. Basierend auf der chemischen Struktur ihrer Seitenketten werden die Glucosinolate in verschiedene Klassen wie aliphatische Glucosinolate, aromatische Glucosinolate und Indolglucosinolate eingeteilt. Es sind derzeit ca. 120 Glucosinolate bekannt, doch nur bei einigen Glucosinolaten bzw. bei deren Hydrolyseprodukten konnte funktionelle Effekte nachgewiesen werden. Diese Abbauprodukte entstehen bei der Zerstörung der Gewebestruktur – also z. B. beim Zerkauen. Zu den Glucosinolaten, deren Abbauprodukte nachweislich antikanzerogen wirksam sind, gehören die aliphatischen Glucosinolate Glucoraphanin (Shapiro et al. 2006) und Sinigrin (Smith et al. 2004) und die beiden aromatischen Glucosinolate Glucotropaeolin und Gluconasturtiin (Sticha et al. 2002). Auch die gesamte Gruppe der Indolglucosinolate sollte hier genannt werden, auch wenn ihre antikanzerogene Wirkung teils kontrovers diskutiert wird (Holst und Williamson 2005).

Anhand von tierexperimentellen Befunden und Humanstudien konnten deutliche Hinweise für antikanzerogene Effekte der Glucosinolate ermittelt werden (Verkerk et al. 2009). Humanstudien belegen jedoch, dass erst mit einer erhöhten Verzehrsmenge von glucosinolatreichem Gemüse und damit einer erhöhten Aufnahme an Glucosinolaten gesundheitsfördernde Wirkungen auftreten. So sind z. B. tägliche Verzehrsmengen von 400 g Weißkohl oder 500 g Brokkoli erforderlich (Watzl 2001). Das isst keiner auf die Dauer. Daher wird als diätetische Vermeidungsstrategie von Krebserkrankungen derzeit neben einer niedrigen Fettaufnahme und moderatem Alkoholgenuss ein Verzehr von Lebensmitteln – also auch von Gemüse, Obst und Kräutern – mit erhöhten Gehalten an sekundären Pflanzenstoffen empfohlen (Erbersdobler 2003, Boeing et al. 2004).

Ziel der Arbeiten ist es daher, die Glucosinolatkonzentrationen im Pflanzengewebe anzureichern, um den gesundheitlichen Zusatznutzen zu erhöhen, und somit ein natürliches funktionelles Lebensmittel zu kreieren. Diese gewünschte Induktion der Glucosinolat-Biosynthese zur Glucosinolatakкумуляtion wurde über die Applikation verschiedener chemischer, physikalischer oder biogener Elicitoren erzielt werden.

### Material und Methoden

Es wurden verschiedene Brassicales-Arten (u. a. *Tropaeolum majus*, *Brassica oleracea* var. *italica*, *Brassica rapa*) mit physikalischen (UV-B-Strahlung, atmosphärisches CO<sub>2</sub>), chemischen (Signalmoleküle, Aminosäuren) oder biogenen Elicitoren (auxinproduzierenden *Enterobacter*) behandelt.

### Ergebnisse und Diskussion

Bereits sehr niedrige Dosierungen an physikalischen Elicitoren reichen aus, um die Glucosinolat-Biosynthese anzuregen. So induziert eine kurzzeitige UV-B-Applikation von nur 0.075 Wh m<sup>-2</sup> bereits eine Erhöhung der Konzentration an Glucotropaeolin in den Blüten, Blättern und Samen von *Tropaeolum majus*, ohne dass Schädigungen an der behandelten Pflanze auftreten (Schreiner et al. 2009). Jedoch ist die Reaktion der Pflanze in den verschiedenen Organen nicht uniform (Tabelle 1). Unterschiedliche Gewebedicke und unterschiedliche Oberflächenausdehnung führen zu einer ungleichen Penetrationsintensität der UV-B-Strahlung durch das Gewebe. Dies löst bei der mannigfaltigen Morphologie der einzelnen Pflanzenorgane eine variierende UV-B-Induktion der Glucosinolat-Biosynthese aus. Je geringer die Gewebestärke und je größer die Oberfläche wie bei den Blättern und insbesondere bei den Blüten, desto stärker ist die Erhöhung an Glucotropaeolin. Im Vergleich dazu zeigte sich bei der kompakten Form des Samens zwar ein ausgeprägter elicitorischer Effekt, der jedoch nur kurzzeitig einen Konzentrationsanstieg an Glucotropaeolin auslöste. Cytochrom P450 Monooxygenasen werden vermutlich durch UV-B-Applikation angeregt, auch Gamma-Strahlung als weiterer physikalischer Elicitor induziert eine verstärkte Monooxygenaseaktivität und führen damit zur Glucosinolanreicherung.

**Tab. 1** Einfluss einer UV-B-Applikation auf die Glucotropaeolinkonzentration in verschiedenen Organen der Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus*) nach 2 und 22 h Adaptationszeit (nach Schreiner et al. 2009)

| Pflanzenorgan | UV-B-Dosis (Wh m <sup>-2</sup> ) | Adaptationszeit (h) | Glucotropaeolin (mg g <sup>-1</sup> dm) |
|---------------|----------------------------------|---------------------|---|
| Blüten        | 0                                |                     | 6.36 b                                  |
|               | 0.075                            | 2                   | 13.44 a                                 |
|               | 0.075                            | 22                  | 14.39 a                                 |
| Blätter       | 0                                |                     | 3.13 b                                  |
|               | 0.075                            | 2                   | 9.60 ab                                 |
|               | 0.075                            | 22                  | 11.84 ab                                |
| Samen         | 0                                |                     | 2.05 b                                  |
|               | 0.075                            | 2                   | 11.42 a                                 |
|               | 0.075                            | 22                  | 0.83 b                                  |

Jeder Wert repräsentiert einen Mittelwert aus drei Wiederholungen. Der Mittelwertvergleich erfolgte nach dem Tukey's Test (Signifikanz-Level  $P < 0.05$ ) separat für jedes Pflanzenorgan

Auch erhöhte atmosphärische CO<sub>2</sub>-Konzentrationen, sei es in der Umwelt oder in der Verpackung führen bei *Brassica oleracea* var. *italica* zu erhöhten Glucosinolatkonzentrationen insbesondere von Glucoraphanin, wobei dies auf eine Verschiebung des Stickstoff/Schwefel-Verhältnis in der Pflanze bzw.

auf eine *de novo* Biosynthese unter modifizierter Atmosphäre in der Nacherntephase zurückzuführen ist (Schreiner et al. 2006, Schonhof et al. 2007).

Als chemische Elicitoren wurden u. a. Salicylsäure und Methyljasmonat appliziert (Smetanska et al. 2007, Wiesner et al. 2009). Diese chemischen Elicitoren dienen als Signalmoleküle, die bei Pathogenbefall oder mechanischer Verletzung der Pflanze induziert werden. Die Anwendung von Salicylsäure und Methyljasmonat kann die Glucosinolat-Biosynthese in den Pflanzen anregen. Diese Elicitoren lösen Signalkaskaden aus, die verschiedene Verteidigungsantworten wie Zellwandverstärkung, Induktion von PR-Proteinen aber auch die Synthese von sekundären Pflanzenstoffen wie Glucosinolate beinhalten. Salicylsäure und Methyljasmonat wurden bei aeroponisch kultivierten *Brassica rapa*-Pflanzen zusammen mit der Nährlösung verabreicht, die innerhalb von 30 Tagen ein bis zu 80 cm langes, dichtes Wurzelsystem ausbildeten. Neben der Funktion als Organ für die Nährstoffaufnahme ist die Pflanzenwurzel auch in der Lage eine Vielzahl von Verbindungen in die Wurzelumgebung auszuschleiden, auch sekundäre Pflanzenstoffe. Dies bietet die Möglichkeit, ohne aufwendige Extraktion des Pflanzenmaterials aus diesen Wurzelexsudaten kontinuierlich Glucosinolate zu gewinnen. Dieses sog. Biomanufacturing-System, bei dem *Brassica rapa*-Pflanzen als lebende Glucosinolatproduzenten gezielt genutzt werden, liefert mit antikanzerogen wirksamen Gluconasturtiin hochangereicherte Wurzelexsudate (Tabelle 2), die als Ausgangsbasis für Plant-made-Pharmaceuticals oder Plant-made-Nutraceuticals Verwendung finden (Smetanska et al. 2007).

**Tab. 2** Einfluss einer Methionin-Applikation auf die Glucosinolatkonzentration im Kopf von Brokkoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) (nach Scheuner et al. 2005)

|     | Methioningabe pro Pflanze (mg) |  | Glucosinolate (mg 100 g <sup>-1</sup> FM) |          |
|-----|--------------------------------|--|---|----------|
|     | Gesamt                         |  | Methylsulphinylalkyl GS                   | Indol GS |
| 10  | 72.17                          |  | 56.10                                     | 14.07    |
| 30  | 74.50                          |  | 59.90                                     | 14.60    |
| 60  | 78.13                          |  | 62.87                                     | 15.26    |
| 90  | 75.71                          |  | 61.03                                     | 14.68    |
| 150 | 82.93 0                        |  | 71.10*                                    | 14.02    |

Jeder Wert repräsentiert einen Mittelwert aus drei Wiederholungen. Der Mittelwertvergleich erfolgte nach dem Tukey's Test (Signifikanz-Level  $P < 0.05$ ). \* signifikant, GS - Glucosinolat

Auch Aminosäure-Applikationen können eine Glucosinolaterhöhung auslösen. Ausgangsmetabolit der Glucosinolate sind bestimmte Aminosäuren; bei Glucoraphanin ist es Methionin. So führte Methionin, appliziert als Blattstielinfusion bei *Brassica oleracea* var. *italica* (Tabelle 3), zu einer 30%igen Glucoraphaninsteigerung im Brokkolikopf (Scheuner et al. 2005).

**Tab. 3** Einfluss einer Signalmolekül-Applikation auf die Glucotropaeolinkonzentration (mg Pflanze<sup>-1</sup>) in verschiedenen Organen der Teltower Rübe (*Brassica rapa*) (nach Smetanska et al. 2007)

| Glucosinolat    | Behandlung | Blätter | sekundäre Wurzeln | primäre Wurzeln | Wurzelexsudat |
|-----------------|------------|---------|-------------------|-----------------|---------------|
| Glucotropaeolin | Kontrolle  | nn      | 1.2 b             | 0.6 b           | 1.1b          |
|                 | SA         | 0.4 a   | 2.3 a             | 3.4 a           | 1.8 a         |
|                 | MJ         | 0.6 a   | 2.8 a             | 3.8 a           | 1.9 a         |

Jeder Wert repräsentiert einen Mittelwert aus drei Wiederholungen. Der Mittelwertvergleich erfolgte nach dem Tukey's Test (Signifikanz-Level  $P < 0.05$ ) separat für jedes Pflanzenorgan.

nn – nicht nachweisbar, SA – Salicylsäure, MJ - Methyljasmonat

Die mikrobielle Besiedlung der Pflanzen wird zum einen sehr stark von dem Sekundärmetabolitprofil der Pflanze bestimmt (Ruppel et al. 2008), zum anderen können auch Mikroorganismen als biogene Elicitoren verwendet werden (Schreiner et al. 2009). Bei Indolglucosinolaten als auch bei Auxin ist Tryptophan der Ausgangspunkt der Biosynthese, dass über Oxidation zum Indol-3-Acetaldoxim formiert wird. Indol-3-Acetaldoxim wird dann sowohl zu Indolglucosinolaten als auch zu Auxin metabolisiert. Ein auxinproduzierender Bakterienstamm ist *Enterobacter radicincitans*. Applikationen mit

*E. radicinicans* könnten über die bakterielle Auxinbildung eine bevorzugte Umwandlung des Indol-3-Acetaldoxim zu Indolglucosinolaten auslösen. So konnte sich *E. radicinicans* bei verschiedenen *Brassica*-Arten in Abhängigkeit vom Sekundärmetabolit- und Zuckerprofil zwar sehr gut in der Phyllosphäre etablieren, jedoch war eine Erhöhung der Konzentrationen an gewünschten Glucosinolaten nicht die Folge, vermutlich aufgrund zu geringer Auxin-Implementierung in den pflanzlichen Metabolismus (Schreiner et al. 2009).

Eine Erhöhung der Konzentration an gesundheitswirksamen Glucosinolaten bzw. deren Hydrolyseprodukten im pflanzlichen Gewebe bedeutet jedoch noch nicht, dass das glucosinolat-angereicherte Gemüse funktionelle Effekte aufweist. Das muss in Tierexperimenten oder besser noch in Humanstudien geprüft werden.

## Literatur

- Boeing, H., Barth, C., Kluge, S., Walter, D., 2004 Tumorentstehung – hemmende und fördernde Ernährungsfaktoren. In Deutsche Gesellschaft für Ernährung (Ed.), Ernährungsbericht 2004 Bonn: DGE Medien-Service, 235-282.
- Erbersdobler, H., 2003: Wirkstoffe. In: Erbersdobler, H. & Meyer, A. (Eds.), Praxishandbuch Functional Food. Hamburg: Behr's Verlag GmbH & Co, 1-14.
- Holst, B., Williamson, G., 2004: A critical review of the bioavailability of glucosinolates and related compounds. Nat. Prod. Rep. **21**, 425-447.
- Ruppel, S., Krumbein, A., Schreiner, M., 2008: Bacterial phyllosphere colonization of vegetable plants with different glucosinolate and carotenoid compositions. Micr. Ecol., **56**, 364-372.
- Scheuner, E., Krumbein, A., Schonhof I., Schreiner, M., 2005: Increasing the alkyl glucosinolate level in broccoli by leafstalk infusion of methionine. Appl. Bot. Food Qual. **79**, 175-178.
- Schonhof, I., Kläring, H.-P., Krumbein, A., Schreiner, M., 2007: Interaction between atmospheric CO<sub>2</sub> and glucosinolates in broccoli. J. Chem. Ecol. **33**, 105 -114.
- Schreiner, M., Krumbein, A., Mewis, I., Ulrichs, C., Huyskens-Keil, S., 2009: Short-term UV-B radiation effects on secondary metabolism in different organs of *Tropaeolum majus* L. Innovative Food Emerging Technol. **10**, 93–96.
- Schreiner, M., Krumbein, A., Ruppel, S., 2009: Interaction between plants and bacteria: glucosinolates and phyllospheric colonization of cruciferous vegetables by *Enterobacter radicinicans* DSM 16656. J. Mol. Microbiol. Biotechnology, DOI: 10.1159/000226589.
- Schreiner, M., P. Peters, Krumbein, A., 2006: Glucosinolates in mixed packaged mini broccoli and mini cauliflower under modified atmosphere. J. Agric. Food Chem., **54**, 2218-2222.
- Shapiro, T., Fahey, J., Dinkova-Kostova, A. , Holtzclaw, W., Stephenson, K., Wade, K., Ye, L., Talalay, P., 2006: Safety, tolerance, and metabolism of broccoli sprout glucosinolates and isothiocyanates: A clinical phase I study. Nut. Cancer Int. J., **55**, 53-62.
- Smetanska, I., Krumbein, A., Schreiner, M., Knorr, D., 2007: Influence of salicylic acid and methyl jasmonate on glucosinolate level in leaves and roots of turnip. J. Hort. Sci. Biotechnol. **82**, 690-694.
- Smith, T.K., Lund, E.K., Parker, M.L., Clarke, R., Johnson, I. T., 2004: Allyl-isothiocyanate causes mitotic block, loss of cell adhesion and disrupted cytoskeletal structure in HT29 cells. Carcinogenesis **25**, 1409-1415.
- Sticha, K., Kenney, P, Boysen, G., Liang, H., Su, X., Wang, M., Upadhyaya, Hecht, S., 2002: Effects of benzyl isothiocyanate and phenethyl isothiocyanate on DNA adduct formation by a mixture of benzo[a]pyrene and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in A/J mouse lung. Carcinogenesis **23**, 1433-1439.
- Verkerk, R., Schreiner, M., Krumbein, A., Ciska, E., Holst, B., Rowland, I., De Schrijver, R., Hansen, M., Gerhäuser, C., Mithen, R., Dekker, M., 2009: Glucosinolates in Brassica vegetables - The influence of the food supply chain on intake, bioavailability and human health. Mol. Nutr. Food Res. DOI 10.1002/mnfr.200800065.
- Watzl, B., 2001: Krebsprotektive Nahrungsinhaltsstoffe. Ernährungs-Umschau **48**, 52–55.