

Politechnika Gdańska
Wydział Chemiczny
Katedra Chemii Analitycznej

Rozprawa doktorska

**OCENA ROŚLIN KAPUSTOWATYCH JAKO ŹRÓDŁA SUBSTANCJI
BIOBÓJCZYCH DLA PROCESÓW BIOFUMIGACJI. POSZUKIWANIE METOD
ZWIĘKSZANIA POTENCJAŁU BIOFUMIGACYJNEGO**

mgr inż. Anna Piekarska

Promotor: prof. dr hab. inż. Jacek Namieśnik
dr hab. inż. Agnieszka Bartoszek

Gdańsk 2014

Składam serdeczne podziękowania:

prof. dr hab. Jackowi Namieśnikowi
za możliwość realizacji pracy doktorskiej na Politechnice Gdańskiej oraz
za wszechstronną pomoc w przygotowaniu niniejszej pracy

dr hab. inż. Agnieszce Bartoszek
za opiekę, zaangażowanie, pomoc merytoryczną oraz poświęcony czas

dr inż. Barbarze Kusznierewicz
za życzliwość i cenne rady przy realizacji badań

SPIS TREŚCI

1. Spis skrótów i akronimów	1
2. Wykaz nazw łacińskich roślin kapustowatych (<i>Brassicaceae</i>) opisanych w pracy	3
<u>I. CZĘŚĆ TEORETYCZNA</u>	5
I. 1 Wprowadzenie	5
I. 2. System glukozynolany - mirozyna	7
I. 2. 1 Glukozynolany	7
I. 2. 2 Mirozyna	15
I. 2. 3 Rola enzymatycznej hydrolizy glukozynolanów w roślinach	20
I. 2. 4 Produkty hydrolizy glukozynolanów i mechanizmy ich powstawania	22
I.2.4.1 Nitryle i epinitryle	22
I.2.4.2 Tiocyjaniany	26
I.2.4.3 Oksazolidyno-2-tiony	26
I.2.4.4 Izotiocyjaniany	28
I.2.4.5 Związki indolowe	28
I. 2. 5 Wykorzystanie systemu glukozynolany - mirozyna w procesie biofumigacji	29
I. 2. 6 Zdrowotne znaczenie produktów hydrolizy glukozynolanów	36
I. 3 Związki odpowiedzialne za pobieranie i akumulację metali	43
I. 3. 1 Glutation	44
I. 3. 2 Fitochelatyny	47
I. 3. 3 Metalotioneiny	49
I. 4 Pozostałe związki fitokompleksu roślin kapustowatych	52
I. 4. 1 S-metylometyonina	52
I. 4. 2 Metyloselenol	55
I. 4. 3 Butyrolaktam (2-pirolidon)	56
<u>II. CEL I ZAKRES PRACY</u>	58
<u>III. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA</u>	60
III. 1 Aparatura i odczynniki	60
III. 1. 1 Aparatura	60

III. 1. 2 Odczynniki	60
III. 2 Materiał badawczy	61
III. 2. 1 Próbki kapusty białej	61
III. 2. 2 Inne próbki roślinne	63
III. 3 Opis stosowanych procedur	64
III. 3. 1 Procedury wykorzystywane podczas oznaczania aktywności enzymatycznej mirozynyzy	64
III.3.1.1 Oznaczanie aktywności mirozynyzy w próbkach preparatu enzymatycznego z wykorzystaniem metody pH-statycznej	64
III.3.1.2 Oznaczanie aktywności mirozynyzy w próbkach roślinnych z wykorzystaniem metody pH-statycznej	65
III.3.1.3 Oznaczanie aktywności mirozynyzy w próbkach preparatu enzymatycznego z wykorzystaniem metody spektrofotometrycznej	65
III.3.1.4 Oznaczanie aktywności mirozynyzy w próbkach roślinnych z wykorzystaniem metody spektrofotometrycznej	66
III. 3. 2 Procedury stosowane w celu obliczenia stopnia konwersji glukozynolanów do izotiocyjanianów i związków indolowych	66
III.3.2.1 Oznaczanie zawartości glukozynolanów w próbkach roślinnych	67
III.3.2.2 Oznaczanie zawartości związków indolowych w próbkach roślinnych	69
III.3.2.3 Oznaczanie zawartości izotiocyjanianów w próbkach roślinnych	70
III.3.2.4 Oznaczanie zawartości pozostałych produktów hydrolizy glukozynolanów w próbkach roślinnych	71
III. 3. 3 Procedury wykorzystywane podczas określania wpływu czynników fizycznych na aktywność handlowego preparatu mirozynyzy	71
III.3.3.1 Działanie wysokiej temperatury	71
III.3.3.2 Działanie niskiej temperatury	71
III.3.3.3 Działanie wysokiego ciśnienia	71
III.3.3.4 Działanie promieniowania mikrofalowego	72
III. 3. 4 Procedury wykorzystywane podczas określania wpływu czynników fizycznych na aktywność mirozynyzy obecnej w próbkach roślinnych	72
III.3.4.1 Działanie promieniowania mikrofalowego	72
III.3.4.2 Działanie wysokiej temperatury	72
III. 3. 5 Procedury wykorzystywane do określenia aktywności biologicznej próbek roślinnych poddanych działaniu promieniowania mikrofalowego	73
III.3.5.1 Przygotowanie podłoży mikrobiologicznych	73

III.3.5.2 Przygotowanie soków z kapusty do oznaczeń mikrobiologicznych	73
III.3.5.3 Przygotowanie zawiesin drobnoustrojów	74
III.3.5.4 Oznaczenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej soków z kapusty wobec wybranych szczepów bakterii i grzybów	74
III. 4 Obróbka statystyczna wyników	74
III. 4. 1 Zastosowanie testu t-studenta	74
IV. WYNIKI I WNIOSKI	75
IV. 1 Wprowadzenie	75
IV. 2 Optymalizacja warunków oznaczania aktywności enzymatycznej mirozynyzy	76
IV. 2. 1 Dobór warunków prowadzenia reakcji hydrolizy glukozynolanów katalizowanej przez mirozynyzy	77
IV. 2. 2 Dobór stężenia substratu do oznaczania aktywności enzymatycznej mirozynyzy metodą pH-statyczną i spektrofotometryczną	79
IV. 2. 3 Ocena czułości metody pH-statycznej i spektrofotometrycznej pomiaru aktywności enzymatycznej mirozynyzy	81
IV. 2. 4 Wyznaczenie parametrów kinetycznych reakcji katalizowanej przez mirozynyzy	84
IV. 3 Aktywność enzymatyczna mirozynyzy w próbkach roślinnych	85
IV. 4 Zależność kierunku degradacji glukozynolanów w roślinach kapustowatych od aktywności enzymatycznej mirozynyzy	90
IV. 4. 1 Wpływ warunków uprawy kapusty na stopień konwersji glukozynolanów do bioaktywnych pochodnych	91
IV. 4. 2 Porównanie zawartości glukozynolanów i produktów ich degradacji w poszczególnych częściach wybranych roślin kapustowatych	96
IV. 5 Możliwość ukierunkowania hydrolizy glukozynolanów	101
IV. 5. 1 Wpływ wybranych czynników fizycznych na aktywność enzymatyczną preparatu mirozynyzy	101
IV. 5. 1. 1 Wpływ wysokiej temperatury	102
IV. 5. 1. 2 Wpływ niskiej temperatury	103
IV. 5. 1. 3 Wpływ wysokiego ciśnienia	104
IV. 5. 1. 4 Wpływ promieniowania mikrofalowego	105

IV. 5. 2 Wpływ wybranych czynników fizycznych na aktywność enzymatyczną mirozyny oraz stopień konwersji glukozynolanów w próbkach roślinnych	109
IV. 5. 2. 1 Ukierunkowanie procesu hydrolizy glukozynolanów w próbkach kiełków roślin kapustowatych	109
IV. 5. 2. 2 Ukierunkowanie procesu hydrolizy glukozynolanów w próbkach liści kapusty białej	112
IV. 5. 2. 3 Wpływ ukierunkowania procesu hydrolizy glukozynolanów w próbkach kapusty białej aktywność przeciwdrobnoustrojową soków	114
<u>V. PODSUMOWANIE</u>	117
<u>VI. STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM</u>	122
<u>VII. STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM</u>	124
<u>VIII. SPIS LITERATURY</u>	125
<u>IX. DOROBEK NAUKOWY</u>	142

1. Spis skrótów i akronimów

Skrót/ akronim	Pełna nazwa	
	termin w języku angielskim	termin w języku polskim
ACC	1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid	Kwas 1-aminocyklopropano-1-karboksyłowy
Ala	Alanine	Alanina
AITC	Allyl isothiocyanate	Izotiocyjanian allilu
AMP	5' adenosine monophosphate	Adenozyno-5'-monofosforan
ATP	Adenosine-5'-triphosphate	Adenozynotrójfosforan
BITC	Benzyl isothiocyanate	Izotiocyjanian benzylu
CA	Citric acid	Kwas cytrynowy
CYP	Cytochrome P450	Białka enzymatyczne cytochromu P450
Cys	Cysteine	Cysteina
DAD	Diode array detector	Detektor z matrycą fotodiodową
DIM	3,3'-diindolylemethane	3,3'-diindolilometan
DNA	Deoxyribonucleic acid	Kwas deoksyrybonukleinowy
EDDS	Ethylenediamine-N,N'-disuccinic acid	Kwas etylenodiaminodibursztynowy
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	Kwas etylenodiaminotetraoctowy (wersenowy)
ESI	Electrospray ionization	Jonizacja przez elektrorozpraszanie
ESM	Epithiospecifier modifier protein	Modyfikujące białko epitiospecyficzne
ESP	Epithiospecifier protein	Białko epitiospecyficzne
FLD	Fluorescence derivatization detector	Detektor fluorymetryczny
GLS	Glucosinolates	Glukozynolany
Glu	Glutamic acid	Kwas glutaminowy
Gly	Glycine	Glicyna
GSH, GSSG	Glutathione	Glutation
GSH1	γ -glutamylcysteine synthetase	Syntetaza γ -glutamylcysteiny
GSH2	Glutathione synthase	Syntetaza glutationowa

GST	Glutathione S-transferases	Transferaza S-glutationowa
GTL	Glucotropaeolin	Glukotropaeolina
HMT	Homocysteine methyltransferase	S-metylotransferaza homocysteinowa
HPLC	High performance liquid chromatography	Wysokosprawna chromatografia cieczowa
HT29	Human colon carcinoma cells	Ludzkie komórki nowotworowe jelita grubego
I3AA	Indole-3-acetic acid	Kwas indolo-3-octowy
I3C	Indole-3-methanol	Indolo-3-metanol
IACN	Indole-3-acetonitrile	Indolo-3-acetonitryl
IC ₅₀	Inhibitory concentration	Stężenie hamujące
ITC	Isothiocyanates	Izotiocyjaniany
LDL	Low density lipoprotein	Lipoproteiny o niskiej gęstości
LOD	Limit of detection	Granica wykrywalności
MBP	Myrosinase binding protein	Białko wiążące mirozynazę
MBPRP	MBP-related protein	Białko powiązane z mirozynazą
MITC	Methyl isothiocyanate	Izotiocyjanian metylu
MMT	Methionine S-methyltransferase	S-metylotransferaza metioninowa
MS	Mass spectrometry	Spektrometria mas
MT	Metallothionein	Metalotioneiny
MyAP	Myrosinase associated protein	Białko związane z mirozynazą
MYR	Myrosinase	Mirozynaza
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced)	Zredukowana forma fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego
NSP	Nitrile-specifier protein	Białko nitrylospecyficzne
NQO	NAD(P)H dehydrogenase quinone	Dehydrogenaza NAD(P)H-chinonowa
PAPS	3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate	3-fosfoadenozylu-5-fosfosiarczan
PC	Phytochelatin	Fitochelatyny
PEITC	Phenethyl isothiocyanate	Izotiocyjanian fenyloetylowy

PITC	Phenyl isothiocyanate	Izotiocyanian fenylu
PPAR	Peroxisome proliferator activated receptors	Receptory aktywowane przez proliferatory peroksysomów
SAM	S-adenosyl methionine	S-adenozyl-L-metionina
SD	Standard deviation	Odchylenie standardowe
Ser	Serine	Seryna
SIN	Sinigrin	Sinigryna
S-meMet	S-methylmethionine	S-metylometonina
TFP	Thiocyanate-forming protein	Białko tworzące tiocyjaniany
TSA	Trypticase soy agar	Agar kazeinowo-sojowy
TSB	Trypticase soy broth	Bulion kazeinowo-sojowy
QR	Quinone reductase	Reduktaza chinonowa
UDPG	Uridine diphosphate glucose	Urydynodifosfoglukoza
UV	Ultra violet	Ultrafiolet

2. Wykaz nazw łacińskich roślin kapustowatych (*Brassicaceae*) opisanych w pracy

Pełna nazwa łacińska	Nazwa polska
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Rzodkiewnik pospolity
<i>Armoracia rusticana</i>	Chrzan pospolity
<i>Brassica campestris</i>	Kapusta polna
<i>Brassica carinata</i>	Gorzycza etiopska
<i>Brassica juncea</i>	Gorzycza sarepska
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Kalafior
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> f. <i>alba</i>	Kapusta biała
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> f. <i>rubra</i>	Kapusta czerwona
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>gemmifera</i>	Brukselka
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>	Brokuły

<i>Brassica oleracea</i> var. <i>sabauda</i>	Kapusta włoska
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>sabellica</i>	Jarmuż
<i>Brassica napus</i> var. <i>napobrassica</i>	Brukiew
<i>Brassica napus</i> var. <i>oleifera</i>	Rzepak
<i>Brassica nigra</i>	Gorzycza czarna
<i>Brassica rapa</i>	Rzepa
<i>Crambe abyssinica</i>	Kapusta abisyńska
<i>Diplotaxis tenuifolia</i>	Dwurząd wąskolistny
<i>Lepidium sativum</i>	Rzeżucha
<i>Raphanus sativus</i>	Rzodkiew zwyczajna
<i>Raphanus sativus</i> var. <i>longipinnatus</i>	Rzodkiew japońska Daikon
<i>Sinapsis alba</i>	Gorzycza biała
<i>Thlaspi caerulescens</i>	Tobołek alpejski

I. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

I. 1 Wprowadzenie

Rośliny kapustowate (*Brassicaceae*) cechuje duża różnorodność związków fitochemicznych, określanych w dalszej części pracy wspólną nazwą **fitokompleks**. W ten sposób określane są wszystkie bioaktywne substancje o zróżnicowanych funkcjach obecne w danym materiale roślinnym. Brane są tu pod uwagę głównie metabolity wtórne, które nie są bezpośrednio niezbędne do wzrostu i rozwoju rośliny, ale odgrywają rolę np. w jej obronie przed patogenami czy w interakcjach z organizmami symbiotycznymi. W skład fitokompleksu kapustowatych wchodzi m.in. związki fenolowe, karotenoidy, fitosterole oraz najbardziej charakterystyczne dla roślin z tej rodziny - glukozyzyny. Zawartość związków bioaktywnych zależy od wielu czynników takich jak gatunek i odmiana rośliny, warunki klimatyczne oraz rodzaj i jakość gleby, na której rośnie. W przypadku roślin jadalnych na zawartość związków fitochemicznych w diecie wpływają także warunki uprawy oraz sposób ochrony i okres zbioru, jak również warunki przechowywania i przetwarzania [1 - 5].

Wśród związków fenolowych, występujących w rodzinie *Brassicaceae* można wyróżnić flawonoidy, przede wszystkim kwercyтынę, kamferol i mirecetynę oraz kwasy fenolowe, głównie kwas synapinowy, hydroksycynamonowy, chlorogenowy i galusowy [6]. Dodatkowo w czerwonych roślinach kapustowatych występują antocyjany, np. w kapuście czerwonej ich ilość wynosi około 25 mg/100 g [7]. Na podstawie danych literaturowych można stwierdzić, że całkowita zawartość związków fenolowych w roślinach kapustowatych waha się od 15 do 384 mg równoważników kwasu galusowego/100 g świeżej masy, odpowiednio w kapuście białej i jarmużu (tabela 1). Uważa się, że fenole wykazują właściwości przeciwutleniające, a jedną z ich funkcji jest ochrona roślin przed stresem oksydacyjnym wywołanym promieniowaniem UV [8 - 10]. Natomiast obecność tych związków w diecie człowieka jest istotna nie tylko ze względu na właściwości przeciwutleniające, ale także inne działania prozdrowotne, wśród których podkreśla się ochronę naczyń włosowatych [11].

Kolejną grupą metabolitów wtórnych tworzących fitokompleks rodziny *Brassicaceae* są karotenoidy, żółto-czerwone barwniki roślinne. Związki te także wykazują właściwości przeciwutleniające służące przede wszystkim ochronie błon biologicznych w komórkach roślinnych oraz odgrywają rolę w procesie fotosyntezy i transporcie energii. Główne związki z tej grupy występujące w roślinach kapustowatych to α -karoten, β -karoten, luteina, β -kryptoksantyna, zeaksantyna, wioloksantyna oraz neoksantyna. W organizmie ludzkim cztery pierwsze związki pełnią rolę prekursorów witaminy A, natomiast wszystkie wykazują działanie

antyoksydacyjne wspomagające endogenne mechanizmy kontrolujące homeostazę redoks [12]. Jednak warzywa kapustowate nie są zbyt bogatym źródłem karotenoidów, bowiem ilość tych związków stanowi tylko ok. 4 % całkowitej ilości karotenoidów obecnych w marchwi [13].

Tabela 1. Zawartość wybranych fitozwiązków w niektórych roślinach kapustowatych (mg/100 g świeżej masy warzyw).

Rodzaj warzywa	Brokuły	Brukselka	Kalafior	Kapusta biała	Jarmuż
α-Karoten	0,001-0,07 [1, 14]	0,006-0,01 [1, 14]	0	0	0-0,15 [12, 16]
β-Karoten	0,28-2,42 [1, 12]	0,45-1,02 [1, 12]	0,01-0,08 [1, 18]	0,02-2,3 [12, 17, 20]	2,84-9,23 [14, 16]
Fenole*	34-337 [9, 15]	35-40 [19]	28-274 [9, 10]	15-200 [9, 10]	166,7-384,9 [21, 22]

* wartości wyrażone w mg równoważników kwasu galusowego

Do najbardziej istotnych fitosteroli występujących w roślinach kapustowatych zalicza się brassikasterol, kampesterol, stigmasterol oraz sitosterol, których całkowita zawartość podawana w literaturze mieści się w przedziale 10 - 24 mg/100 g ś.m., odpowiednio w kapuście białej i brukselce [23]. Związki te umożliwiają prawidłowe funkcjonowanie roślinnych błon komórkowych [24]. Wykazano, że ich obecność w diecie człowieka ogranicza wchłanianie cholesterolu z przewodu pokarmowego i zmniejsza poziom frakcji LDL cholesterolu we krwi [25].

Oprócz wymienionych metabolitów wtórnych, rośliny kapustowate mogą także stanowić w diecie człowieka źródło witamin, głównie witaminy C w formie kwasu L-askorbinowego [26] oraz witaminy E w postaci tokoferoli lub tokotrienoli [27]. Związki te wagowo stanowią około 0,1% składników obecnych w roślinach *Brassicaceae*, co wystarcza na pokrycie dziennej zalecanej dawki przy typowym spożyciu tych warzyw (tabela 2). Witaminy C i E są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmu, a ponieważ wykazują silne właściwości przeciwutleniające przyczyniają się także do neutralizacji działania wolnych rodników i innych reaktywnych form tlenu.

Innym mechanizmem opartym na związkach siarkoorganicznych wykształconym przez przedstawicieli rodziny *Brassicaceae* jest zdolność do pobierania metali ciężkich i ich akumulacji w postaci nieszkodliwej dla rośliny. Ta właściwość wynika z obecności takich związków jak glutation czy fitochelatyny oraz wyspecjalizowanych białek metalotionein,

bogatych w grupy sulfidowe, które umożliwiają pobieranie, transport oraz detoksykację metali ciężkich. Ten roślinny mechanizm jest wykorzystywany w procesie fitoremediacji, stosowanym m.in. podczas rekultywacji terenów zdegradowanych [35].

Tabela 2. Zawartość witaminy C i E w niektórych roślinach kapustowatych (mg/100 g świeżej masy warzyw) oraz zalecane dzienne spożycie tych witamin (mg)

Rodzaj warzywa	Brokuły	Brukselka	Kalafior	Kapusta biała	Jarmuż	Zalecane dzienne spożycie ¹
Witamina C	34-146 [3, 28, 29]	76-192 [30, 31]	17,2-77,1 [30, 32, 33]	12,6-47,0 [10, 26, 20]	93-186 [26, 30]	60
Witamina E²	0,22-1,30 [19, 23]	0,15-0,90 [19, 23]	0,10-0,20 [19, 23]	0,03-0,20 [19, 23]	2,15-5,40 [1]	10

¹ dawki przyjęte przez Unię Europejską według Dyrektywy KE 90/496/EEC z 24 września 1990 r. dotyczącej znakowania produktów spożywczych

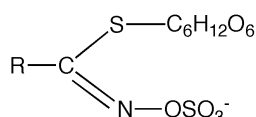
² wartości w przeliczeniu na α -tokoferol [mg]

Ponadto związki siarkoorganiczne występujące w roślinach kapustowatych, przede wszystkim produkty enzymatycznej degradacji glukozynolanów, takie jak izotiocyjaniiny oraz niektóre związki indolowe, wykazują wielokierunkowe działanie prozdrowotne. W szczególności izotiocyjaniin 4-metylosulfinylobutyli (sulforafan), występujący w największych ilościach w brokułach, jest uważany za najbardziej obiecujący związek fitochemiczny w chemoprewencji chorób cywilizacyjnych [36].

I. 2. System „glukozynolany – mirozynaza”

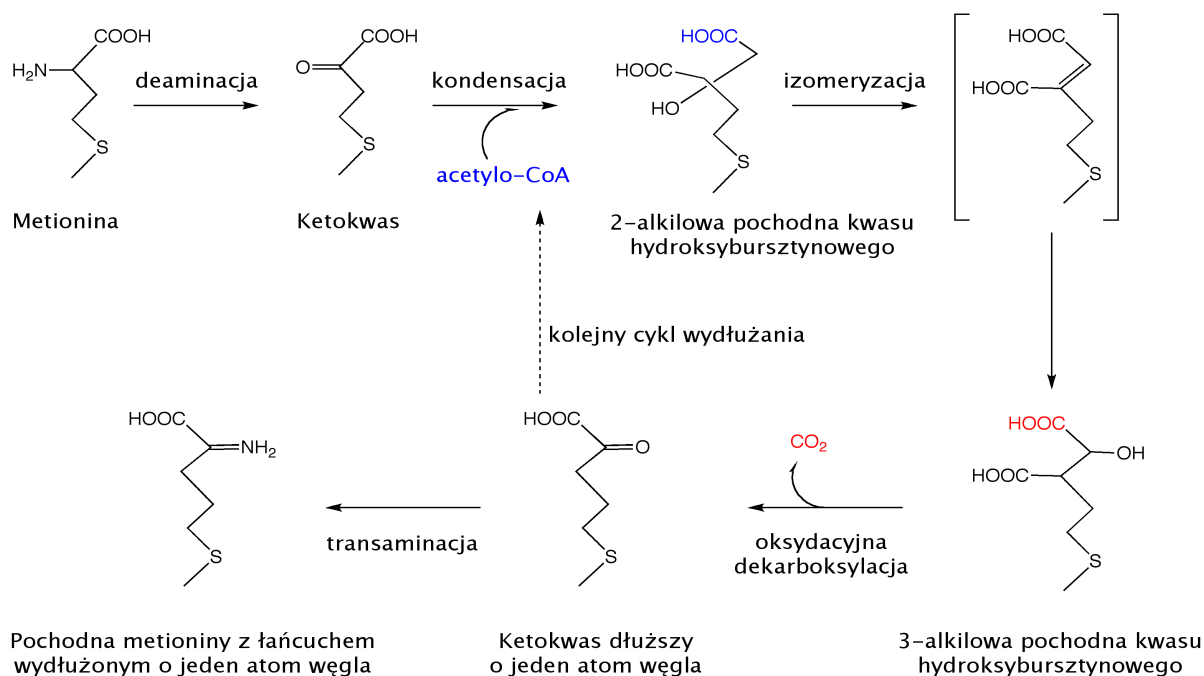
I. 2. 1 Glukozynolany

Glukozynolany (rys. 1) to związki organiczne zaliczane do drugorzędowych metabolitów roślinnych, zawierające grupę β -D-tioglukozową, sulfonowe ugrupowanie oksymowe oraz boczny łańcuch alifatyczny, aromatyczny lub indolowy.



Rysunek 1. Ogólny wzór glukozynolanów

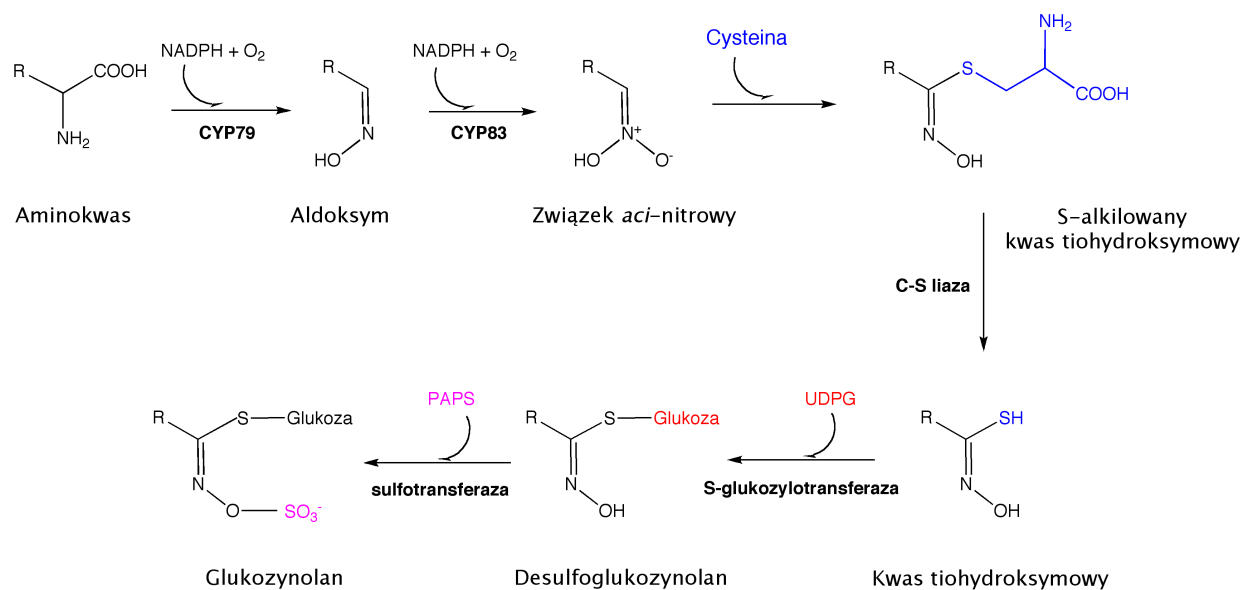
Glukozytolany alifatyczne powstają z pochodnych alaniny, waliny, leucyny i metioniny, aromatyczne z pochodnych feniloalaniny lub tyrozyny, indolowe z pochodnych tryptofanu. Na proces biosyntezy glukozytolanów składają się takie etapy jak wydłużanie łańcucha aminokwasowego, konwersja do tiohydroksymu i ewentualne dalsze modyfikacje powstałej cząsteczki. Pierwszy etap obejmujący wydłużanie łańcucha aminokwasu, rozpoczyna się deaminacją aminokwasu do odpowiedniego α -ketokwasu, który następnie ulega kondensacji z acetylo-koenzymem A do pochodnej 2-alkilowej kwasu hydroksybursztynowego (rys. 2). W wyniku izomeryzacji oraz oksydacyjnej dekarboksylacji powstaje ketokwas, którego łańcuch jest dłuższy o jeden atom węgla. Końcowy związek może przejść kolejne cykle wydłużania łańcucha (maksymalnie 9 cykli) lub ulec transaminacji do aminokwasu z bocznym łańcuchem wydłużonym stosownie do liczby cykli kondensacji i dekarboksylacji [37 - 39].



Rysunek 2. Pierwszy etap syntezy glukozytolanów z atomem siarki w łańcuchu bocznym na przykładzie przekształceń metioniny [38, 39],

Kolejnym etapem biosyntezy jest tworzenie się struktury glukozytolanu, podczas którego aminokwas jest przekształcany do aldoksymu, a ten następnie utleniany do związku *aci*-nitrowego w reakcjach katalizowanych przez enzymy cytochromu P450 [39, 40]. Związek *aci*-nitrowy jako silnie elektrofilowy, niestabilny produkt przejściowy samorzutnie reaguje z grupą sulfidową, prawdopodobnie pochodzącą od cysteiny. W wyniku tej reakcji powstaje S-alkilowana pochodna kwasu tiohydroksymowego, która pod wpływem enzymu C-S liazy jest rozkładana do kwasu tiohydroksymowego. Końcowe reakcje przeniesienia glukozy z UDPG z udziałem S-glukozylotransferazy i reszty kwasu siarkowego, katalizowane przez

sulfotransferazę, prowadzą do powstania cząsteczki glukozynolanu (rys. 3). Możliwe są dalsze modyfikacje łańcucha glukozynolanów. Mogą to być reakcje oksydacji, hydroksylacji, metoksylacji, tworzenia wiązań podwójnych, estryfikacji lub glikozylacji łańcucha bocznego. Szczególnie podatne na takie modyfikacje są łańcuchy boczne będące pochodnymi metioniny [37, 39, 41 - 43]. Reakcje te decydują o ostatecznej strukturze, zatem mają wpływ na właściwości powstałych glukozynolanów, a co za tym idzie na aktywność biologiczną produktów ich degradacji.



Rysunek 3. Końcowy etap biosyntezy glukozynolanów [44]

Glukozynolany występują w gatunkach roślin należących do rzędu kapustowców (*Brassicales*), m.in. w rodzinie roślin kapustowatych (*Brassicaceae*), kaparowatych (*Capparaceae*) oraz melonowcowatych (*Caricaceae*). Liczba dotychczas zidentyfikowanych glukozynolanów wynosi około 120 - 200 [45], jednak najbardziej prawdopodobna wydaje się liczba 132, korygująca podwójnie policzone struktury glukozynolanów mylnie określone jako różne związki [46]. Glukozynolany są obecne w różnych ilościach, zarówno w korzeniach, liściach, pędach, jak i nasionach wymienionych roślin. W roślinach z rodziny *Brassicaceae* najczęściej występującymi glukozynolanami są sinigryna, glucoiberyna, glukobrassycyna, których obecność stwierdzono odpowiednio w 63, 30 i 23 odmianach na 153 badane gatunki [43, 45 - 47]. W tabeli 3 zestawiono informacje o składzie glukozynolanów występujących w mniej znanych roślinach z rzędu *Brassicales*. Wśród nich można wyróżnić zarówno rośliny ozdobne, drzewa, zioła, jak i jadalne owoce oraz warzywa. Część tych rośliny jest rozpowszechniona, np. nasturcje, kapary, jednak niektóre z nich rosną w egzotycznych

miejscach, np. *Setchellanthus caeruleus*, ozdobny krzew z niebieskimi kwiatami uprawiany tylko w Meksyku.

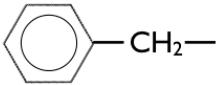
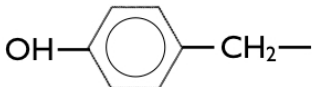
Tabela 3. Skład glukozynolanów w mniej znanych roślinach z rzędu *Brassicales*

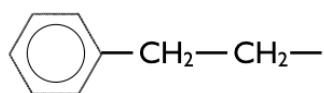
Rodzina	Gatunek	Skład glukozynolanów	Literatura
Akaniaceae	<i>Akania bidwillii</i>	glukotropaeolina, sinalbina, glukozynolan dihydroksybenzylu, glukozynolan metoksybenzylu	43, 48
	<i>Bretschneidera sinensis</i>	glukotropaeolina, sinalbina, glukozynolan hydroksymetylopropylu	
Nasturcjowate <i>Tropaeolaceae</i>	nasturcja błękitna (<i>T. azureum</i>), nasturcja trójkolorowa (<i>T. tricolorum</i>), nasturcja bulwiasta (<i>T. tuberosum</i>)	glukotropaeolina, sinalbina, glukozynolan metyloetylu, glukozynolan metylopropylu glukozynolan hydroksymetylopropylu, glukozynolan metoksybenzylu	43, 47
Moringowate <i>Moringaceae</i>	moringa olejodajna (<i>Moringa oleifera</i>)	glukotropaeolina	47, 49
Melonowcowate <i>Caricaceae</i>	papaja (<i>Carica papaya</i>)	glukotropaeolina	52

Rodzina	Gatunek	Skład glukozynolanów	Literatura
<i>Limnanthaceae</i>	kwiat cytrynowy (<i>Limnanthes alba</i>)	glukotropaeolina, glukozynolan metoksybenzylu, glukozynolan dimetoksybenzylu	43, 47
<i>Setchellanthaceae</i>	<i>Setchellanthus caeruleus</i>	glukozynolan metyloetylu, glukozynolan metylopropylu, sinalbina	43, 50
<i>Salvadoraceae</i>	<i>Azima, Salvadora, Dobera</i>	glukotropaeolina, sinigrina, N-metoksy-glukobrassycyna, glukobrassycyna	51
<i>Tovariaceae</i>	<i>Tovaria pendula</i>	glukobrassycyna, 4-metoksy-glukobrassycyna, N-acetylo-glukobrassycyna, glukotropaeolina, glukozynolan metyloetylu	43, 47
<i>Cleomaceae</i>	klome cienista (<i>Cleome spinosa</i>)	glukozynolan metylu	43, 47
Kaparowate <i>Capparaceae</i>	<i>Atamisquea emarginata,</i> <i>Capparis admirabilis,</i> <i>C. aristeguita,</i> <i>C. muco,</i> <i>C. frondosa,</i> <i>C. heterophylla</i>	glukozynolan metylu	43, 47
	<i>C. pittieri</i> <i>C. speciosa</i> <i>C. retusa</i> <i>C. bellabahia</i> <i>C. amplissima</i> <i>C. hastata</i> <i>C. scabrida</i>	glukozynolan hydroksyetylu, glukozynolan etylu glukonapina, hydroksyglukonapina glukozynolan hydroksypentylu glukozynolan metylosulfinylo alkilu glukozynolan oksopentylu glukozynolan oksoheptylu, glukozynolan oksooktylu	

W roślinach kapustowatych najczęściej występuje kilkanaście glukozyzolanów. Informacje o ich budowie i terminologii zestawiono w tabeli 4. Jednak ilość i skład tych związków w poszczególnych roślinach różni się w zależności od gatunku, odmiany, fazy rozwoju oraz warunków klimatycznych uprawy.

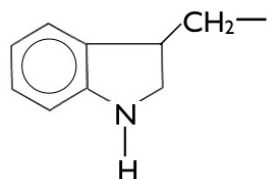
Tabela 4. Budowa i nazewnictwo glukozyzolanów najczęściej występujących w roślinach kapustowatych [53, 54]

Budowa podstawnika R	Nazwa systematyczna	Nazwa potoczna
$\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CH}_2 -$	glukozyzolan 2-propenyłu (allilu)	sinigryna
$\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 -$	glukozyzolan 3-butenyłu	glukonapina
$\text{CH}_2 = \text{CH} - \underset{\text{OH}}{\text{CH}} - \text{CH}_2 -$	glukozyzolan 2-hydroksy-3-butenyłu	progoitryna
$\text{CH}_3 - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 -$	glukozyzolan 4-metylotiobutyłu	glukoerucyna
$\text{CH}_3 - \overset{\text{O}}{\parallel} \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 -$	glukozyzolan 3-metylo- sulfinylopropyłu	glukoiberyna
$\text{CH}_3 - \overset{\text{O}}{\parallel} \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 -$	glukozyzolan 4-metylo- sulfinylobutyłu	glukorafanina
	glukozyzolan benzylu	glukotropaeolina
	glukozyzolan 4-hydroksybenzylu	sinalbina



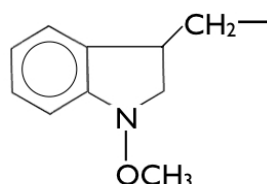
glukozynolan
2-fenyletylu

glukonasturcyna



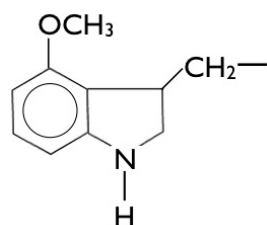
glukozynolan
3-indolometylu

glukobrassycyna



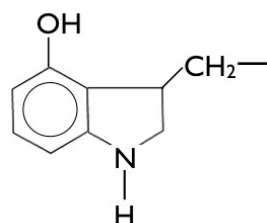
glukozynolan
1-metoksy-
3-indolometylu

neoglukobrassycyna



glukozynolan
4-metoksy-
3-indolometylu

4-metoksy-
glukobrassycyna



glukozynolan
4-hydroksy-
3-indolometylu

4-hydroksy-
glukobrassycyna

W kolejnej tabeli zestawiono informacje literaturowe odnośnie składu ilościowego i jakościowego glukozynolanów w wybranych roślinach kapustowatych (tabela 5). Największą różnorodnością pod względem składu glukozynolanów charakteryzuje się kapusta biała, która zawiera aż osiem różnych glukozynolanów. Bogaty skład glukozynolanów posiada też rzepak, jednak jego głównym związkiem jest progoitryna o właściwościach wolotwórczych. Natomiast w gorczycy w największej ilości występuje sinalbina, która w tej roślinie stanowi ponad 70 % całkowitej ilości glukozynolanów. W najmniejszej ilości glukozynolany występują w kalafiorze - całkowita zawartość tych związków wynosi około 13 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ świeżej masy.

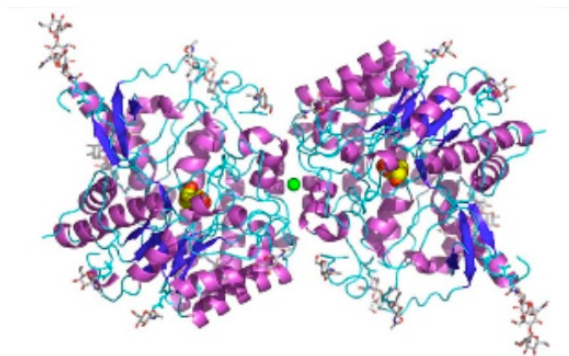
Tabela 5. Zawartość glukozynolanów w częściach jadalnych najczęściej spożywanych roślin kapustowatych

Warzywo	Glukozynolan	Zawartość ($\mu\text{mol}/100 \text{ g } \text{ś.m.}$)	Literatura
Brokuły	glukorafanina	29,4	55
	glukoiberyna	17,1	
	glukonasturcyna	4,4	
	progoitryna	3,3	
	glukonapina	2,8	
	sinigryna	1,4	
Brukselka	sinigryna	8,6	55
	glukonapina	2,7	
	progoitryna	2,4	
	glukoiberyna	1,5	
	glukonasturcyna	1,1	
	glukorafanina	0,5	
Kalafior	sinigryna	5,3	55
	glukonapina	3,4	
	glukoerucyna	2,8	
	glukoiberyna	1,3	
	progoitryna	0,4	
	glukorafanina	0,3	
Kapusta czerwona	sinigryna	33,0	56
	glukorafanina	20,8	
	metoksyglukobrassicyna	8,8	
	glukobrassicyna	8,6	
	hydroksyglukobrassicyna	5,4	

Warzywo	Glukozyzolan	Zawartość ($\mu\text{mol}/100 \text{ g } \acute{\text{s.m.}}$)	Literatura
Kapusta biała	glukoiberyna	1,7 - 90,6	57, 58
	glukobrassycyna	17,2 - 76,9	
	progoitryna	1,3 - 61,0	
	sinigryna	15,6 - 55,8	
	glukorafanina	1,4 - 27,1	
	metoksyglukobrassycyna	2,9 - 21,5	
	hydroksyglukobrassycyna	0,3 - 4,0	
	neoglukobrassycyna	0,6 - 3,4	
Rzepak	progoitryna	125,6	59
	hydroksyglukobrassycyna	39,6	
	glukonapina	38,9	
	glukobrassykonapina	13,7	
	glukonapoleiferyna	5,3	
	glukonasturcyna	5,1	
	glukobrassycyna	2,0	
Rzepa	glukonapina	62,7	60
	glukobrassycyna	15,0	
	glukobrassykonapina	14,4	
	neoglukobrassycyna	12,4	
	glukonasturcyna	12,3	
	progoitryna	8,3	
	hydroksyglukobrassycyna	4,7	
Gorzycza biała	sinalbina	90,0	61
	progoitryna	18,9	
	glukoerucyna	13,6	
	glukonapina	5,4	

I. 2. 2 Mirozynaza

Mirozynaza (β -tioglukozydaza, E.C. 3.2.1.147) to enzym odpowiedzialny za pierwszy etap hydrolizy glukozyzolanów. Najprawdopodobniej cząsteczka enzymu ma kształt cylindryczny i zbudowana jest z ośmiu α -helis i takiej samej liczby harmonijek β , a struktura stabilizowana jest przez jon Zn^{2+} znajdujący się w centrum dimeru (rys. 4) [62].



Rysunek 4. Struktura roślinnej mirozyny wyizolowanej z gorczycy białej *Sinapsis alba* [62]. Na zielono zaznaczono atom Zn^{2+} , na czerwono - centra aktywne mirozyny zawierające reszty kwasu glutaminowego

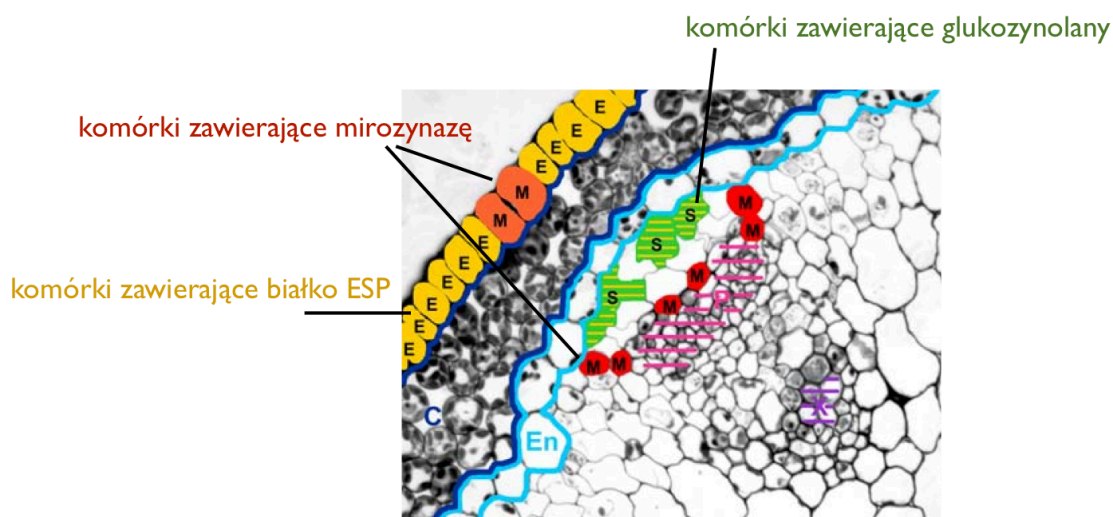
W wielu roślinach kapustowatych zauważono występowanie kilku form mirozyny. Właściwości kinetyczne i fizykochemiczne izoenzymów mogą się różnić, a ich masy mieszczą się w zakresie 59 - 78 kDa [63]. Z nasion rzepaku wyizolowano podjednostki o masie 65, 70 oraz 75 kDa, z których te największe tworzą homodimer, a pozostałe heterokompleksy z innymi białkami, np. białkami o masie 50 lub 52 kDa wiążącymi mirozynę (ang. *myrosinase binding protein*, MBP). Dodatkowo, także w rzepaku, zidentyfikowano dwa inne białka o masie 80 i 100 kDa występujące w sąsiedztwie mirozyny, które jednak nie są w stanie tworzyć z nią kompleksów i dlatego zostały nazwane białkami powiązаныmi z mirozyną (ang. *MBP-related proteins*, MBPRP) [64, 65]. Do tej pory nie stwierdzono czy białka te mają wpływ na funkcjonowanie mirozyny lub metabolizm glukozynolanów. W tych samych nasionach wykryto także glikoproteinę o masie 40 kDa, towarzyszącą mniejszym podjednostkom mirozyny (ang. *myrosinase associated protein*, MyAP), jednak strukturalnie nie jest ona podobna do MBP ani MBPRP [66]. Także do grupy MyAP zaliczane jest epitiospecyficzne białko modyfikujące (ESM) wpływające na przebieg hydrolizy glukozynolanów. Wyniki badań nad strukturą białka ESM dowodzą, że jest to lipaza lub karboksyesteraza związana z błoną retikulum endoplazmatycznego [67].



Rysunek 5. Obraz komórki mirozynowej uzyskany za pomocą elektronowego mikroskopu transmisyjnego dla próbek rzodkwi [54].

Komórka mirozynowa jest otoczona przez pozostałe komórki mięksiszu

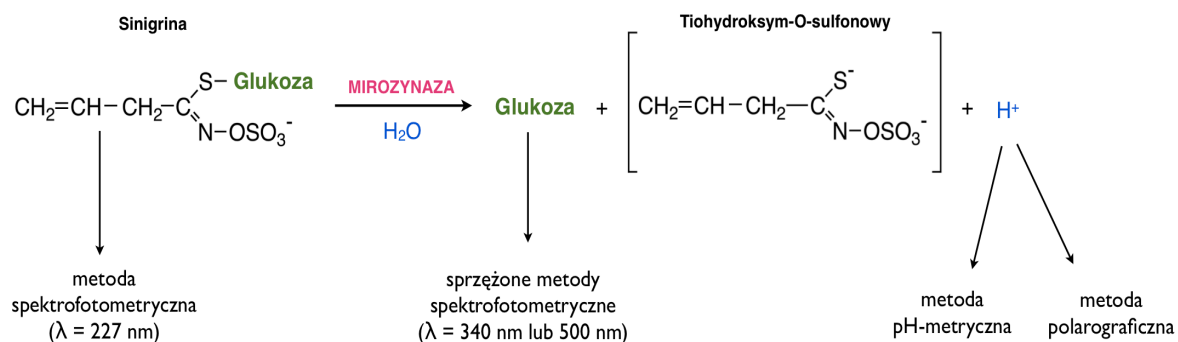
W tkankach roślin kapustowatych mirozynaza prawdopodobnie zlokalizowana jest w komórkach mirozynowych. Ich obecność zaobserwowano już w 1884 roku [68] na podstawie różnic w morfologii oraz rozmiarze w porównaniu z sąsiednimi komórkami (rys. 5). Rozmieszczenie komórek mirozynowych różni się w poszczególnych częściach roślin, zależy także od stadium rozwoju oraz gatunku rośliny. Przykładowo, u dojrzałych roślin rzepaku duża aktywność mirozynazy została stwierdzona w górnej części korzeni, a najmniejsza w łodydze oraz kwiatostanach [62]. W pobliżu komórek mirozynowych, w wakuolach, znajdują się glukozynolany (rys. 6). Do kontaktu enzymu i glukozynolanów dochodzi dopiero po uszkodzeniu komórek i wtedy może rozpocząć się reakcja hydrolizy. Dodatkowo, w komórkach mirozynowych mogą znajdować się także białka związane z mirozynazą lub jej towarzyszące. Jednak białko epitiospecyficzne ESP, promujące powstawanie epitioitryli, prawdopodobnie zlokalizowane jest w osobnych komórkach, głównie w cytozolu oraz jądrze, i nie ma bezpośredniego kontaktu z mirozynazą [54].



Rysunek 6. Rozmieszczenie systemu enzymatycznego mirozynazy w tkance rzodkiewnika [54]

Funkcjonowanie systemu enzymatycznego mirozynazy jest procesem dynamicznym i skomplikowanym. Rozmieszczenie, skład oraz działanie tego systemu zależy od wielu czynników, w związku z czym trudno jest znaleźć uniwersalne zależności w stosunku do wszystkich roślin kapustowatych.

W literaturze opisanych jest kilka metod oznaczania aktywności mirozynazy, które wykorzystują różne mechanizmy do pomiaru kinetyki reakcji katalizowanej przez ten enzym (rys. 7).



Rysunek 7. Parametry wykorzystywane w metodach oznaczania aktywności mirozyny na przykładzie hydrolizy sinigriny

Metoda spektrofotometryczna polega na pomiarze zmian absorbancji ($\lambda = 227 - 230$ nm) mieszaniny reakcyjnej na skutek enzymatycznej hydrolizy glukozynolanów [69, 70]. Jako substrat w pomiarach kinetyki reakcji najczęściej wykorzystywana jest sinigrina.

Bardziej złożoną metodą jest sprzężona metoda spektrofotometryczna, wykorzystująca zmiany absorbancji ($\lambda = 340$ nm) w trakcie redukcji NADP do NADPH pod wpływem glukozy uwalnianej podczas hydrolizy glukozynolanów [71]. Wyniki otrzymane w przypadku stosowania tej metody mogą być zafałszowane, ponieważ przy tej samej długości fali absorpcję wykazują także produkty rozkładu kwasu dehydroaskorbinowego, który powstaje po utlenieniu kwasu askorbinowego obecnego w roślinach kapustowatych [72]. Ponadto mirozyna może katalizować hydrolizę wiązań glikozydowych w skrobi, co powoduje, że oznaczana glukoza może pochodzić nie tylko z degradacji glukozynolanów, ale i z rozkładu cukrów obecnych w roślinie [73].

Kolejna metoda pomiaru aktywności mirozyny także wykorzystuje glukozę uwalnianą podczas hydrolizy glukozynolanów, która jest utleniana pod wpływem oksydazy glukozowej do kwasu glukonowego oraz H_2O_2 . Nadtlenek wodoru reaguje następnie z 4-aminoantypiryną i kwasem 4-hydroksybenzoesowym w obecności peroksydazy. Powstający w ten sposób barwny produkt wykorzystywany jest do spektrofotometrycznego ($\lambda = 500$ nm) pomiaru kinetyki reakcji katalizowanej przez mirozynę [74]. Jednak kwas askorbinowy, wykazujący aktywność przeciwutleniającą, może wpływać na zawartość H_2O_2 , w związku z czym wyniki otrzymane tą metodą nie są zbyt dokładne [72].

W przypadku pH-statycznej metody oznaczania aktywności mirozyny wykorzystuje się fakt, że reakcja enzymatycznego rozkładu glukozynolanów powoduje uwalnianie jonów H^+ i obniżenie pH mieszaniny reakcyjnej. Oznaczanie aktywności enzymu polega na pomiarze ilości NaOH zużytego podczas miareczkowania mieszaniny reakcyjnej w celu utrzymania stałego pH na poziomie 6,5, optymalnego dla działania mirozyny [70, 75]. Uwalnianie jonów

H⁺ wykorzystuje także metoda polarograficzna, jednak z uwagi na potrzebę specjalistycznego sprzętu jest ona bardzo rzadko stosowana.

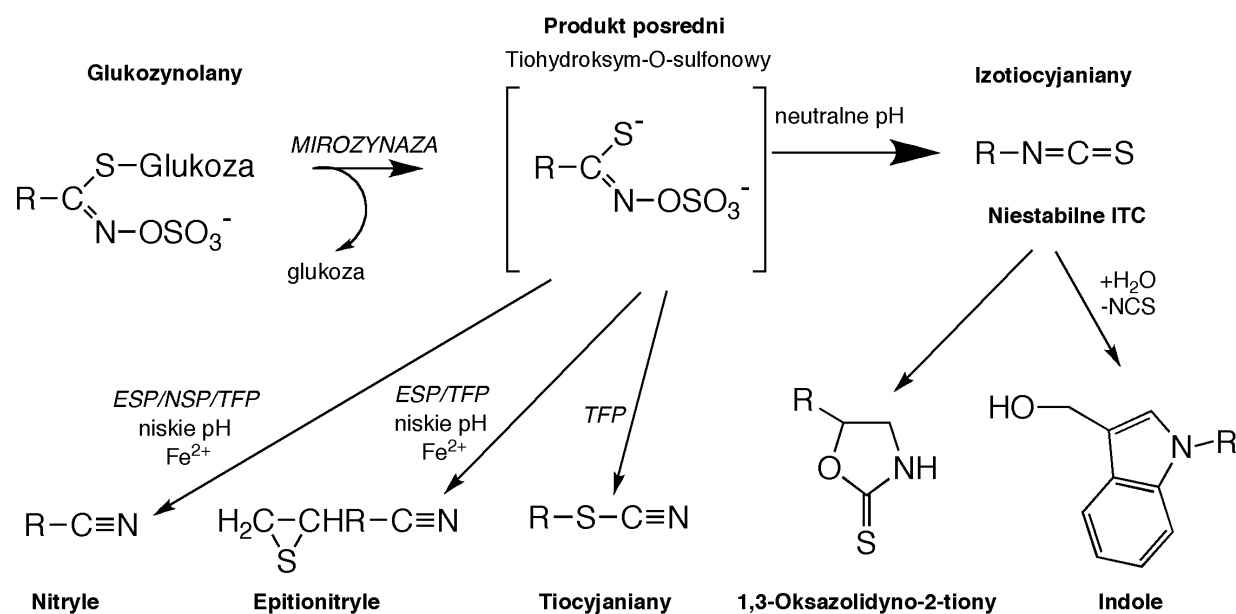
Stosowanie różnych, nie zawsze ilościowych, sposobów śledzenia kinetyki enzymatycznej degradacji glukozynolanów może być jednym z powodów trudności w ustaleniu aktywności mirozynyzy w próbkach roślin kapustowatych, stąd cytowane w literaturze wartości są tak rozbieżne (tabela 6). Jednak nawet przy wykorzystaniu tej samej metody pomiaru, oznaczana aktywność mirozynyzy obecnej w brokułach waha się między 0,32 U/mg białka [76] a 9,87 U/mg białka [74]. W niektórych doniesieniach można znaleźć informacje sugerujące, że aktywność mirozynyzy jest większa w obecności kwasu askorbinowego. Mechanizm ten tłumaczy się zmianą konformacji centrum aktywnego enzymu. Jednak dotyczyć to może tylko niskich stężeń kwasu askorbinowego (do 500 μM), bowiem jego większa ilość powoduje zahamowanie reakcji katalizowanej przez mirozynyzę [70, 77, 78].

Tabela 6. Zestawienie informacji literaturowych o aktywności enzymatycznej mirozynyzy oznaczonej z wykorzystaniem różnych metod pomiarowych w częściach jadalnych wybranych roślin kapustowatych

Roślina	Aktywność mirozynyzy		
	metoda spektrofotometryczna	sprzężona metoda spektrofotometryczna	metoda pH-statyczna
Brokuły	0,32 U/mg białka [76] 3,3 U/g s.m. [4] 9,87 U/mg białka [74]		56-91 U/g ś.m. [79]
Brukselka	0,34 U/mg białka [76]	7,6 U/ g s.m. [77]	67-68 U/g ś.m. [79]
Kapusta włoska	0,04 U/mg białka [76] 24,2-33,2 U/g s.m. [80] 2,45 U/mg białka [74]	2,2 U/g s.m. [77]	
Kapusta biała	0,11 U/mg białka [76] 6,08 U/mg białka [74]	5,2 U/g s.m. [77]	21-50 U/g ś.m. [79]
Gorzycza biała nasiona	3,47 U/mg białka [74]	0,14 nmol/min/mg ś.m. [71]	69 U/mg białka [82] 101U/g s.m. [81] 4155 U/mg s.m. [70]

I. 2. 3 Rola enzymatycznej hydrolizy glukozynolanów w roślinach

Mirozyna katalizuje proces hydrolizy wiązań tioglukozydowych glukozynolanów, w wyniku czego powstaje niestabilny produkt przejściowy - tiohydroksym O-sulfonowy, który w zależności od środowiska reakcji oraz obecności dodatkowych czynników białkowych może zostać przekształcony do izotiocyanianów (ITC), tiocyanianów, nityli lub epitionitryli. Następnie niestabilne izotiocyaniany, zawierające grupę beta-hydroksylową lub pierścień indolowy, ulegają samorzutnym przekształceniom do odpowiednio związków indolowych i oksazolidyno-2-tionów (rys. 8) [43, 53]. Do białek wpływających na skład końcowy produktów enzymatycznej degradacji glukozynolanów należą: białko epitiospecyficzne (ESP) i nitylospecyficzne (NSP), modyfikujące białko epitiospecyficzne (ESM) związane z mirozyną oraz białko tworzące tiocyaniany (TFP).



Rysunek 8. Schemat przebiegu reakcji hydrolizy glukozynolanów

(ESP - białko epitiospecyficzne, NSP - białko nitylospecyficzne, TFP - białko tworzące tiocyaniany)

Glukozynolany wraz mirozyną stanowią naturalny system obronny roślin kapustowatych przed szkodnikami. W nienaruszonej komórce tkanki roślinnej glukozynolany są oddzielone od enzymu, który znajduje się we wspomnianych komórkach mirozynowych. Gdy komórka roślinna zostanie uszkodzona, mechanicznie lub w wyniku ataku roślinożerców, dochodzi do kontaktu mirozyny z glukozynolanami. Wówczas uwalniane zostają produkty ich hydrolizy o właściwościach biobójczych, spośród których najskuteczniejsze działanie ochronne przed patogenami i szkodnikami roślinnymi wykazują izotiocyaniany. Ich szerokie spektrum działania obejmuje zarówno grzyby, bakterie, jak i roślinożerców (tabela 7). Toksyczne działanie izotiocyanianów w stosunku do patogenów i agrofagów opiera się na

dwóch głównych mechanizmach: hamowaniu syntezy ATP lub inaktywacji enzymów wewnątrzkomórkowych. U podłoża tych zjawisk leży zdolność izotiocyjanianów do rozrywania mostków disulfidowych oraz wchodzenia w reakcje z grupami NH₂ występującymi w strukturze białek [53].

Tabela 7. Zakres antybiologicznego działania produktów hydrolizy glukozynolanów w stosunku do różnych gatunków roślinożerców i mikroorganizmów patogennych

Aktywność biobójcza	Rodzaj fitofagów	Związek o działaniu biologicznym	Literatura
grzybobójcza	<i>Rhizpous</i> ssp., <i>Verticillium dahliae</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , <i>Fusarium sambucinum</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Phytophthora erythroseptica</i> , <i>Pythium ultimum</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	izotiocyjanian allilu, izotiocyjanian benzylu, izotiocyjanian 3-butenyłu, izotiocyjanian 4-metylo-sulfinylobutyłu, indolo-3-acetonitryl	83, 84, 85, 86, 87, 88
bakteriobójcza	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> , <i>Erwinia chrysanthemi</i> , <i>Pseudomonas cichorii</i> , <i>Pseudomonas tomato</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> , <i>Xanthomonas juglandis</i> , <i>Phoma lingam</i> , bakterie propionowe	izotiocyjanian allilu, izotiocyjanian fenylu, izotiocyjanian 4-hydroksybenzylu, izotiocyjanian 4-metylo-sulfinylobutyłu, oksazolidynotiony	89, 90, 91
nicieniobójcza	<i>Globodera rostochiensis</i> , <i>Globodera pallida</i> , <i>Globodera rostochiensis</i> , <i>Meloidogyne incognita</i>	izotiocyjanian allilu, izotiocyjanian benzylu, izotiocyjanian 2-fenyluetylu	92, 93, 94, 95, 96
insektobójcza	<i>Cyclocephala</i> spp., <i>Limoniuss</i> spp., <i>Musca domestica</i> , <i>Rhyzopertha dominica</i> , <i>Naupactus leucoloma</i> , <i>Otiorhynchus sulcatus</i> , <i>Drosophila melanogaster</i> , <i>Diabrotica undecimpunctata howardi</i>	izotiocyjanian allilu, izotiocyjanian propenyłu, izotiocyjanian fenylu, izotiocyjanian 2-fenyluetylu, tiocyjaniany, izocyjanian allilu	97, 98, 99

Skuteczność naturalnego systemu obronnego „glukozynolany—mirozynaza” zależy od składu i ilości glukozynolanów w roślinie, przebiegu ich enzymatycznej hydrolizy oraz powstających w jej wyniku produktów. Czynniki warunkujące tworzenie się poszczególnych bioaktywnych produktów zostały opisane poniżej.

I. 2. 4 Produkty hydrolizy glukozynolanów i mechanizmy ich powstawania

I.2.4.1 Nitryle i epitionitryle

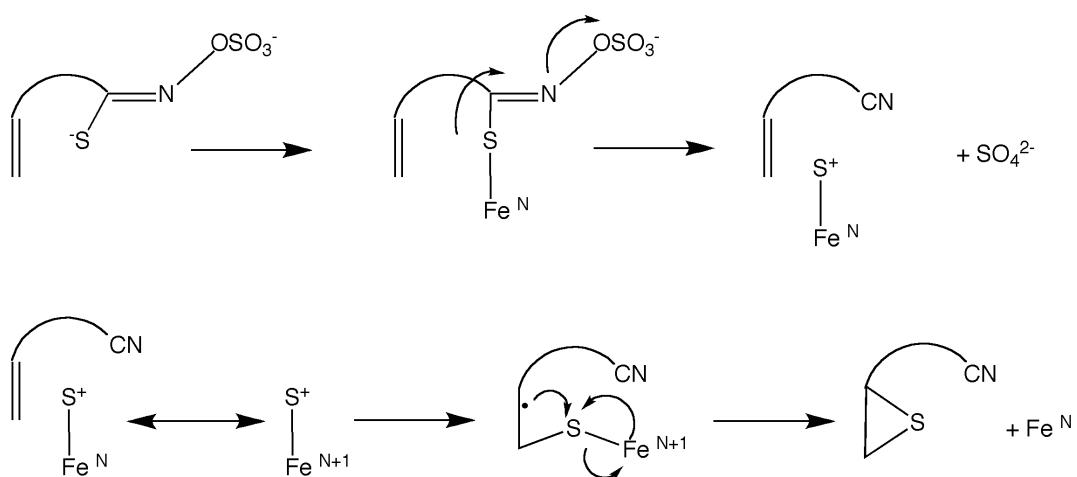
Białko epitiospecyficzne (ESP, ang. *epithiospecifier protein*) odpowiada za powstawanie epitionitryli z tiohydroksymu-O-sulfonowego utworzonego podczas reakcji katalizowanej przez mirozynazę. Białko to zidentyfikowano w niektórych roślinach z rodziny kapustowatych, w tym rzeżusze, kapuście białej i polnej. Także wyniki analizy wykonanej za pomocą metody Western blotting z wykorzystaniem przeciwciał izolowanych z królika rozpoznających białka ESP przeprowadzonej dla ekstraktów z nasion brukwi wskazują na obecność dwóch białek ESP o masie 35 kDa i 39 kDa, a w nasionach kapusty abisyńskiej jednego białka o masie 35 kDa. Przeprowadzenie podobnych badań dla próbek nasion gorzycy i rzodkwi zwyczajnej nie doprowadziło do stwierdzenia obecności takich białek [100]. Doniesienia te częściowo potwierdzają wyniki innych badań przeprowadzonych dla kiełków gorzycy, w których nie stwierdzono obecności epitionitryli, co może świadczyć o braku białek ESP, które katalizowałyby ich powstawanie [101].

Okazało się również, że w warunkach *in vitro* białko ESP współpracujące z mirozynazą nie musi pochodzić z tego samego materiału biologicznego co mirozynaza. Na przykład białko ESP z nasion brukwi wykazuje aktywność także w skojarzeniu z mirozynazą wyizolowaną z mszyc *Brevicoryne brassicae* [100].

Wyniki badań *in vitro* wykazały, że rekombinowane bakterie *Agrobacterium tumefaciens* z wbudowanym genem *ESP* pochodzącym z rzodkiewnika są zdolne w wyniku ekspresji białek ESP do tworzenia w obecności jonów żelaza i mirozynazy epitionitryli z tiohydroksymów powstałych z glukozynolanów alkenowych zawierających podwójne wiązanie między atomami węgla w łańcuchu bocznym [102]. Jony żelaza Fe^{2+} prawdopodobnie umożliwiają utworzenie produktu przejściowego pomiędzy tiohydroksymem a białkiem ESP, bowiem substratem do reakcji z udziałem tego białka jest tylko tiohydroksym-O-sulfonowy, a nie natywne glukozynolany [100, 102]. Jednak w niektórych doniesieniach literaturowych zawarte są wątpliwości odnośnie zależności aktywności białek ESP od jonów Fe^{2+} . Przykładowo, w badaniach z użyciem rekombinantów *E. coli* z ekspresją genów rzodkiewnika odpowiedzialnych za syntezę białek ESP obserwowano ich aktywność pomimo braku soli żelaza. Jednak biorąc pod uwagę, że stosowana procedura nie obejmowała etapu usuwania

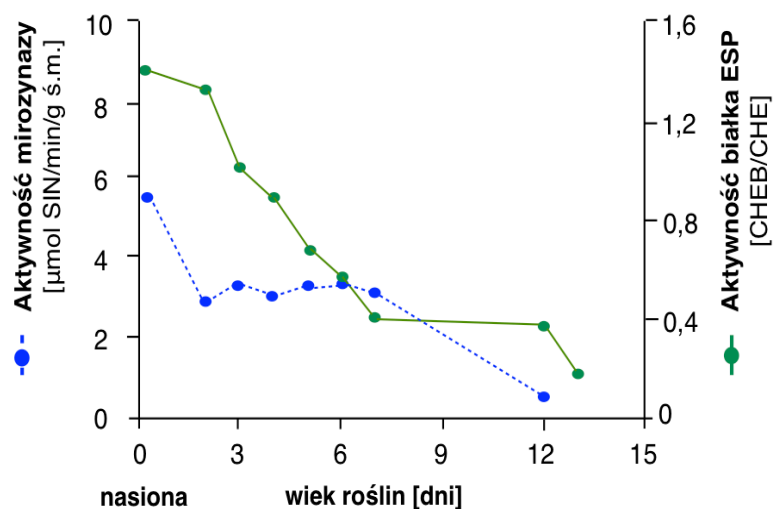
jonów żelaza, które na pewno są obecne w materiale biologicznym czy stosowanych odczynnikach, wnioski te mogą być mało wiarygodne [103].

Mechanizm reakcji katalizowanej przez białko ESP nie jest do końca poznany (rys. 9). Gdy substratem jest alkenowy glukozynolan, np. sinigryna, działające po mirozynazie białko ESP bierze udział podczas procesu syntezy epitionitryli w przeniesieniu atomu siarki do końcowej reszty alkenowej znajdującej się w łańcuch bocznym. W przypadku gdy substratem w reakcji hydrolizy są glukozynolany o innej budowie, białko ESP promuje powstawanie nitryli [67, 103].



Rysunek 9. Mechanizm tworzenia się epitionitryli oraz nitryli [100]

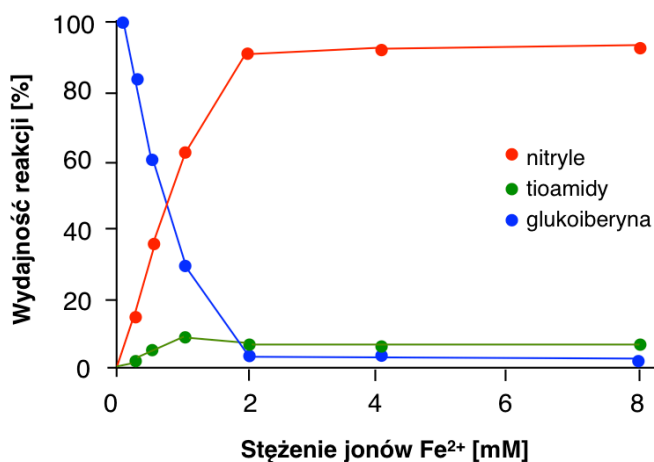
Aktywność białka ESP jest w danej roślinie zmienna i zależy od stadium jej rozwoju. Wyniki badań przeprowadzonych dla kiełków kapusty abisyńskiej sugerują, że największą aktywność białka ESP można zaobserwować podczas drugiego dnia kiełkowania, w ciągu trzech kolejnych dni widać stopniowy spadek, a od 5. dnia aktywność utrzymuje się na stałym niskim poziomie (rys. 10). Aktywność mirozynazy przedstawia się podobnie, jednak wahania w czasie nie są aż tak duże jak w przypadku białka ESP [104].



Rysunek 10. Zależność aktywności mirozynazy oraz białka ESP od czasu kiełkowania nasion kapusty abisyńskiej [104].

Aktywność białka ESP podana jest jako stosunek zawartości produktów hydrolizy epi-progoitryny CHEB/CHE, gdzie CHEB oznacza (2s)-1-cyjano-hydroksy-3,4-epitiobutan, CHE (s)-1-cyjano-2-hydroksy-3-buten

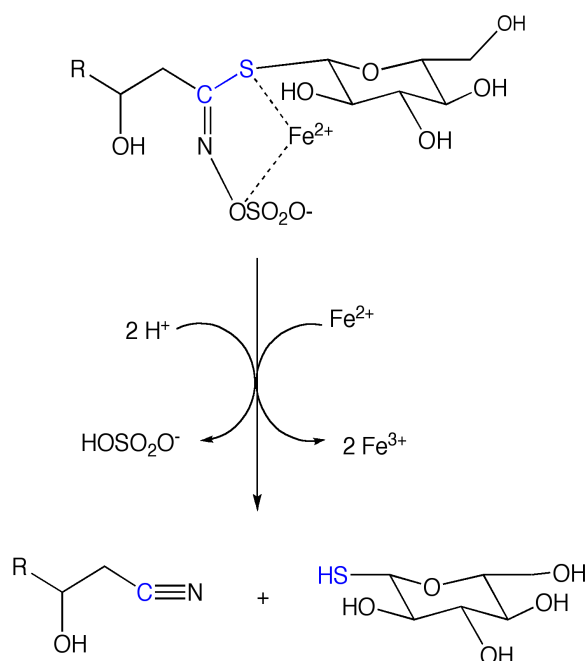
Jak wspomniano wcześniej, białko ESP może także promować konwersję do nityli po katalizowanej przez mirozynazę degradacji glukozynolanów nie zawierających grupy alkenowej w łańcuchu bocznym [103]. Wcześniej sądzono, że powstawanie nityli to rezultat tylko nieenzymatycznej degradacji glukozynolanów zależnej od obecności jonów żelaza. Wnioski takie sformułowano na podstawie wyników badań nad hydrolizą i dalszymi przemianami glukoiberyny. Nityle stanowiły aż 90% produktów hydrolizy tego glukozynolanu po 24-godzinnej reakcji w temperaturze pokojowej w roztworze o pH 5,2 zawierającym 8 mM jonów Fe^{2+} (rys. 11) [105].



Rysunek 11. Zależność typu produktów procesu degradacji glukoiberyny od stężenia jonów Fe^{2+} w mieszaninie reakcyjnej [105]

Proponowany mechanizm nieenzymatycznej degradacji glukozynolanów zakłada powstanie ligandu glukozynolan- Fe^{2+} z utworzeniem wiązań między jonem Fe^{2+} , a atomem siarki grupy tioglukozowej i atomem tlenu z ugrupowania sulfonowego. Następny etap to rozpad wiązania między atomem węgla C-0 glukozynolanu a atomem siarki ugrupowania sulfonowego z uwolnieniem tioglukozy (rys. 12). Powstawaniu nitryli sprzyja także obecność glutationu i małe stężenie kwasu askorbinowego (0,3 mM) [106, 107].

Obecnie już wiadomo, że za powstawanie nitryli odpowiedzialna jest nie tylko nieenzymatyczna hydroliza glukozynolanów czy działanie białka ESP, ale ich tworzenie katalizuje także białko nitrylospecyficzne (NSP, ang. *nitrile-specifier protein*). Zidentyfikowano je w organizmie motyla bielinka (*Pieris sp.*), który żywi się wyłącznie roślinami z rodziny kapustowatych. Białko NSP stanowi mechanizm obronny tego szkodnika przed biobójczym działaniem produktów degradacji glukozynolanów po hydrolizie przez mirozynażę, ponieważ pod jego wpływem przekształcane są one do nitryli, a nie do toksycznych dla owadów izotiocyjanianów. Mechanizm działania białka NSP nie jest jeszcze poznany. Wiadomo, że ma ono masę około 73 kDa i pod względem sekwencji aminokwasowej nie jest podobne do białka ESP pochodzącego z nasion brukwi [44]. Obecność białka NSP stwierdzono także w rzodkiewniku, a wstępne ustalenia jego III-rzędowej struktury przestrzennej wskazują na 30 - 45 % podobieństwo do struktury białka ESP pochodzącego z tej samej rośliny [108].



Rysunek 12. Proponowany mechanizm nieenzymatycznej reakcji tworzenia nitryli w następstwie degradacji glukozynolanów [105]

I.2.4.2 Tiocyjaniany

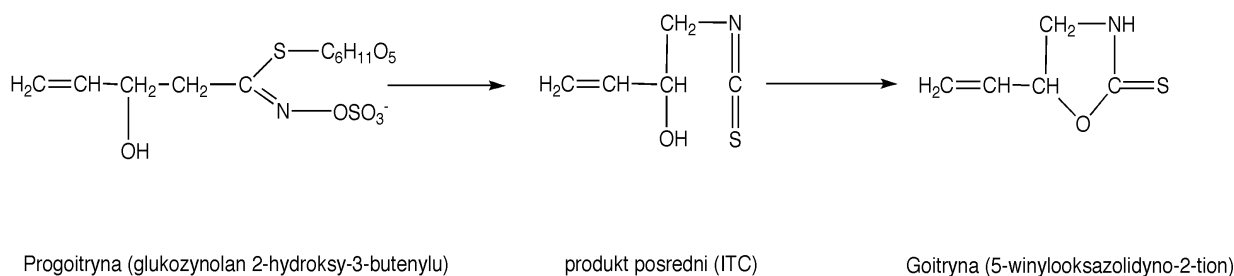
W nasionach i kwiatach rzeżuchy zostało zidentyfikowane białko tworzące tiocyjaniany (TFP, ang. *thiocyanate-forming protein*), które także ma wpływ na rodzaj produktów powstających po enzymatycznej degradacji glukozynolanów katalizowanej przez mirozynazę. Białko TFP przyczynia się do powstawania tiocyjanianów z hydroksymów otrzymanych z glukozynolanów zawierających pierścień aromatyczny w łańcuchu bocznym oraz nitryli i epitionitryli z hydroksymów pochodzących od alifatycznych glukozynolanów. Mimo nieco odmiennej aktywności biochemicznej, białko TFP z nasion rzeżuchy wykazuje 63 - 68 % podobieństwa sekwencji aminokwasowej do białka ESP pochodzącego odpowiednio z nasion rzodkiewnika oraz brokułów. Na przykładzie rzeżuchy ustalono, że aktywność białka TFP jest regulowana na poziomie transkrypcji i posttranskrypcji [109 - 112].

W odróżnieniu od izotiocyjanianów, nitryli i epitionitryli, synteza tiocyjanianów rzadko zachodzi w tkankach roślinnych. Ponadto tylko kilka glukozynolanów, m.in. glukotropaeolina i glucoerucyna, może posłużyć jako prekursorzy do otrzymania odpowiedniego tiohydroksymu, ponieważ ich struktura chemiczna pozwala na powstawanie stabilnej formy karbokationu, niezbędnej w reakcjach prowadzących do otrzymania tiocyjanianów [109]. Podczas badań nad przemianami glukozynolanów występujących w nasionach rzeżuchy, produktami enzymatycznej degradacji glukotropaeoliny były izotiocyjanian benzylu, tiocyjaniany i nitryle. Natomiast dla rekombinantów genetycznych rzeżuchy z podwyższoną aktywnością białka TFP stwierdzono większą zdolność przekierowania degradacji tiohydroksymu do tiocyjanianu benzylu oraz fenyloacetonitrylu, kosztem izotiocyjanianów [109, 110].

Wiadomo także, że białko TFP potrzebuje do swej aktywności jonów żelaza Fe^{2+} jako kofaktora. Potwierdzają to wyniki doświadczeń przeprowadzonych dla rekombinantów *E. coli* z wbudowanym genem odpowiedzialnym za syntezę białek TFP pochodzącym z rzeżuchy oraz z użyciem związku chelatującego jony żelaza (EDTA). Uzyskano w nich mniej tiocyjanianów i nitryli niż w próbce bez dodatku EDTA. Odbudowanie puli jonów Fe^{2+} w mieszaninie reakcyjnej powodowało powrót aktywności białka TFP [110]. Według innych badaczy bardziej efektywnym kofaktorem, zarówno dla białka TFP jak i ESP, są jony Fe^{3+} [111].

I.2.4.3 Oksazolidyno-2-tiony

Oksazolidyno-2-tiony mogą powstać na skutek przekształceń izotiocyjanianów utworzonych po katalizowanej przez mirozynazę hydrolizie glukozynolanów zawierających grupę hydroksylową w pozycji 2 (β -hydroksylową) [100, 113]. Wydaje się, że do przebiegu tej reakcji nie są wymagane białka o aktywności enzymatycznej ani dodatkowe kofaktory w postaci jonów metali (rys. 13).



Rysunek 13. Schemat powstawania oksazolidyno-2-tionu na przykładzie goitryny [114]

Najbardziej znanym związkiem z tej grupy jest 5-vinyloksazolidyno-2-tion o zwyczajowej nazwie goitryna. Może ona zaburzać gospodarkę jodem w organizmie oraz utrudniać prawidłowe funkcjonowanie enzymu peroksydazy tarczycowej, przez co przyczynia się do efektu wolotwórczego. Prekursor tego związku, progoitryna, występuje m.in. w kapuście, brukselce, kalafiorze i brokułach [53], jednak jej stężenie jest na tyle niskie, że przeciętne spożycie tych warzyw nie powinno powodować efektu antyżywniowego.

Obecność progoitryny i produktu jej degradacji, goitryny, stanowi problem w wykorzystaniu produktów ubocznych (śruta, makuchy lub wytloki) powstających w procesie uzyskiwania oleju z nasion rzepaku jako składnika pasz dla zwierząt. U zwierząt otrzymujących pasze zawierające dodatek rzepaku stwierdzano m.in. powiększenie wątroby i nerek; obserwowano także brak apetytu i spowolnienie wzrostu [115]. Ponadto goitryna może przechodzić do mleka zwierząt karmionych paszą z dodatkiem rzepaku [116], co z kolei wiąże się z zagrożeniem dla dzieci pijących takie mleko.

Ze względu na jakość oleju oraz wartość paszową rzepaku do Krajowego Rejestru Odmian Roślin Uprawnych oraz Katalogu Odmian Europejskich wpisywane są tylko te odmiany rzepaku, w których zawartość glukozynolanów nie przekracza odpowiednio 15 i 25 $\mu\text{moli/g}$ s.m. beztuszczowej [117, 118]. Za dopuszczalną normę zawartości glukozynolanów w rzepakowych paszach dla zwierząt przyjmuje się poziom 15 - 20 $\mu\text{moli/kg}$ s.m. pozbawionej tłuszczu [119]. Należy dodać, że w procesie uzyskiwania oleju z nasion rzepaku stosowane są takie etapy, jak podgrzewanie materiału roślinnego do temperatury ok. 100°C (np. kondycjonowanie nasion), które powodują inaktywację mirozynyazy i uniemożliwiają hydrolizę glukozynolanów, a w efekcie powstawanie goitryny. Dodatkowe procesy obejmujące działanie wysokiej temperatury i pary wodnej mają na celu usunięcie z materiału glukozynolanów i ewentualnych produktów ich degradacji [118].

I.2.4.4 Izotiocyaniany

Dotychczas sądzono, że izotiocyaniany powstają tylko na skutek dalszego samorzutnego przekształcenia tiohydroksymu-O-sulfonowego, niestabilnego produktu pośredniego hydrolizy glukozynolanów katalizowanej przez mirozynazę. Jednak wyniki najnowszych badań wskazują na rolę dodatkowego białka - epitiospecyficznego białka modyfikującego (ESM, ang. *epithiospecifier modifier protein*). Zostało ono zidentyfikowane w rzodkiewniku i promuje powstawanie izotiocyanianów, a nie nitryli, jak to ma miejsce w przypadku działania białka ESP w tej roślinie. Jeden z proponowanych mechanizmów działania białka ESM polega na bezpośrednim oddziaływaniu z białkiem ESP i/lub mirozynazą. Drugi postulowany mechanizm polega na nieenzymatycznym pośrednim oddziaływaniu z białkiem ESP. W obu przypadkach zmianie ulegają właściwości katalityczne białka ESP. W ten sposób białko ESM może stymulować powstawanie izotiocyanianów lub hamować syntezę nitryli. Ponadto białko ESM może kontrolować syntezę izotiocyanianów z tiohydroksymów zarówno w obecności białek ESP lub NSP, jak i pod ich nieobecność [67].

I.2.4.5 Związki indolowe

Podczas hydrolizy indolowych glukozynolanów powstają niestabilne indolowe izotiocyaniany lub nitryle, które w wyniku dalszych reakcji mogą zostać przekształcone do innych produktów (rys. 14). Nie do końca jednak wiadomo jakie białka czy warunki promują powstawanie indolowych izotiocyanianów a nie nitryli. Jedną z hipotez wskazuje na wpływ jonów Fe^{2+} na przekierowanie reakcji w kierunku syntezy nitryli zamiast izotiocyanianów. Druga sugeruje raczej rolę białka ESP w promowaniu powstawania nitryli, podobnie jak w przypadku glukozynolanów alifatycznych. Tę ostatnią hipotezę potwierdzają wyniki doświadczeń, podczas których przeprowadzono hydrolizę glukobrassyliny w obecności mirozynazy oraz rekombinata *E. coli* z genem rzodkiewnika odpowiedzialnym za syntezę białka ESP. Produktem hydrolizy katalizowanej przez samą mirozynazę był indolo-3-karbinol (I3C), który powstaje w wyniku przemian indolowego izotiocyanianu. Natomiast gdy do mieszaniny reakcyjnej dodano białko ESP, powstawały porównywalne ilości zarówno I3C, jak i indolo-3-acetonitrylu (IACN). Z kolei obecność białka ESM powodowała zahamowanie powstawania IACN na rzecz I3C. Podobnie w przypadku innych glukozynolanów indolowych, neoglukobrassyliny oraz 4-metoksyglukobrassyliny, w obecności białka ESP w wyniku hydrolizy uzyskano porównywalne ilości odpowiednich nitryli oraz produktów przemian niestabilnych izotiocyanianów indolowych [120].

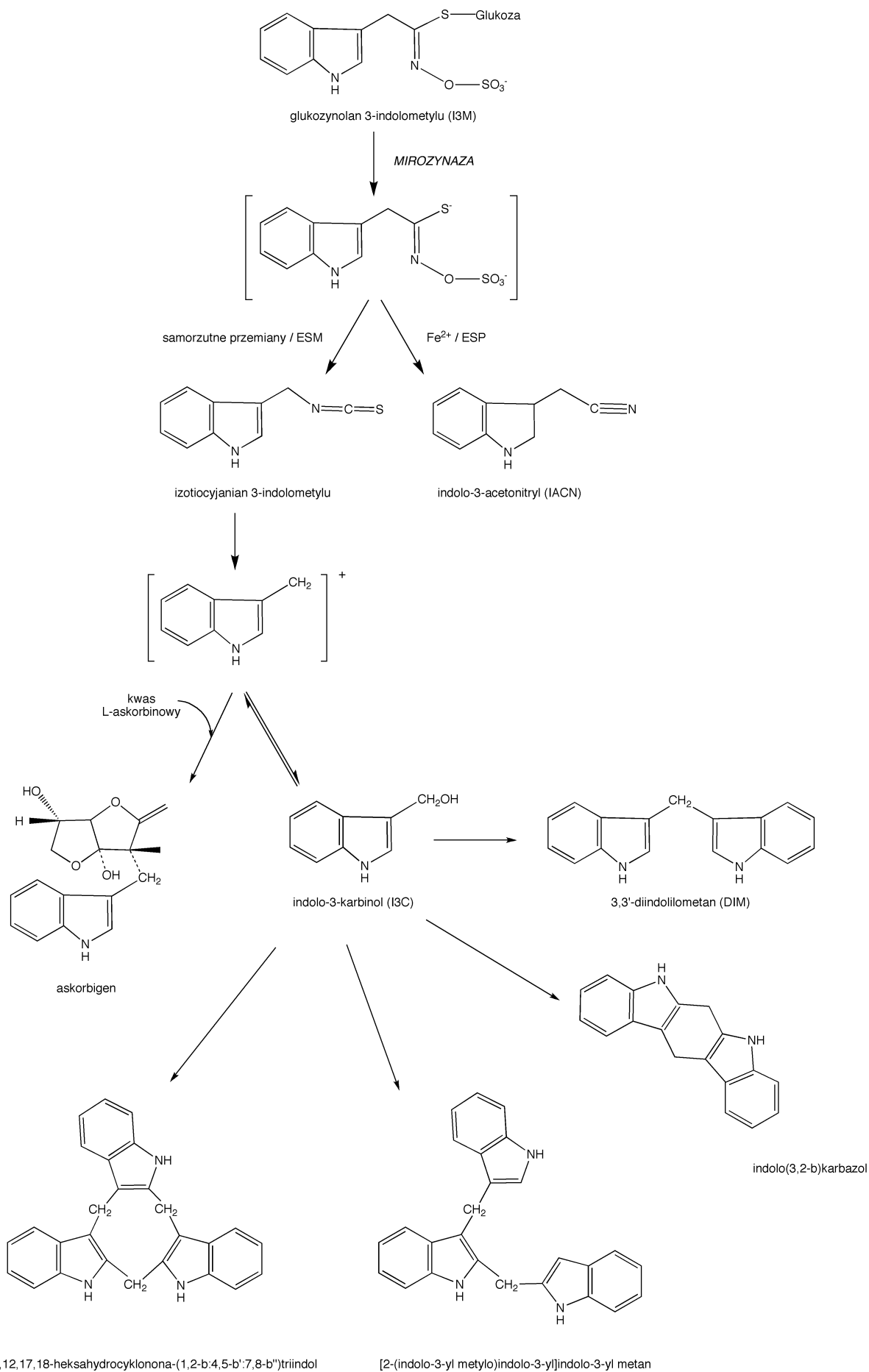
W zależności od warunków środowiska możliwe są dalsze przemiany produktów hydrolizy indolowych glukozynolanów prowadzące do powstania pochodnych alkoholowych i produktów kondensacji [121, 122].

I. 2 .5 Wykorzystanie systemu „glukozynolany—mirozynaza” w procesie biofumigacji

Omówiony uprzednio naturalny system „glukozynolany—mirozynaza”, stanowiący mechanizm obronny roślin kapustowatych, znalazł zastosowanie w procesie biofumigacji. Jak wspomniano, ten zabieg agrotechniczny polega na wykorzystaniu lotnych związków o właściwościach antybiologicznych naturalnie występujących w roślinach - biofumigantów - do zwalczania mikroorganizmów i agrofagów atakujących uprawy rolne. Pojęcia biofumigacji używa się zazwyczaj w odniesieniu do roślin z rodziny *Brassicaceae*, ponieważ zawierają one znaczne ilości prekursorów substancji o aktywności biofumigacyjnej, do których zaliczane są przede wszystkim glukozynolany. Poszczególne gatunki roślin tej rodziny charakteryzują się różną zawartością i składem glukozynolanów, a także odmienną aktywnością mirozynazy oraz dodatkowych czynników białkowych, a w związku z tym wykazują zróżnicowaną aktywność biobójczą [45]. Skuteczność procesu biofumigacji jako zabiegu agrotechnicznego zależy zatem nie tylko od gatunku rośliny, ale również od warunków hydrolizy, takich jak optymalna temperatura dla przebiegu reakcji katalizowanej przez mirozynazę, bo mogą mieć one znaczący wpływ na końcowy skład produktów degradacji glukozynolanów.

Naturalny mechanizm obronny jest uruchamiany w momencie ataku szkodników na roślinę kapustowatą. Następuje wtedy uszkodzenie komórek roślinnych, dochodzi do kontaktu mirozynazy z glukozynolanami i rozpoczyna się proces enzymatycznej hydrolizy. Wówczas uwalniane zostają produkty o właściwościach biobójczych, spośród których najskuteczniejsze działanie ochronne przed patogenami i szkodnikami roślinnymi wykazują izotiocyjaniiny. Ich szerokie spektrum działania obejmuje zarówno grzyby, bakterie, jak i roślinożerców.

Ochronne działanie roślin kapustowatych wobec innych upraw zostało zauważone już dawno i wykorzystywano je w systemie zagospodarowania ziemi uprawnej, tzw. płodozmianie, wprowadzonym na terenie Europy w IX wieku. Płodozmian polegał na przemiennej uprawie określonych rodzajów roślin, w tym kapustowatych, w celu poprawy jakości gleby, wydajności plonu oraz zwalczania chwastów.



Rysunek 14. Schemat przebiegu procesu hydrolizy glukobrassicyny

Współcześnie, jako zabiegi agrotechniczne najczęściej stosuje się dwa sposoby wprowadzenia glukozynolanów do gleby w celu ochrony upraw z wykorzystaniem mechanizmu biofumigacji. Pierwszy z nich to rozprowadzenie na polu rozdrobnionych, wysuszonych lub świeżych części roślin kapustowatych. Drugi polega na uprzedniej uprawie roślin kapustowatych i następnie zaoraniu ich na polu przed rozpoczęciem docelowej uprawy. Rośliny kapustowate wykorzystywane są wtedy jako źródło zarówno glukozynolanów, jak i łatwo przyswajalnych substancji odżywczych, stanowiąc tzw. zielony nawóz.

Przykładem pierwszego podejścia zastosowanego w warunkach szklarniowych były badania nad wpływem wysuszonych liści roślin z rodziny *Brassicaceae*, chrzanu, kapusty i jarmużu, na rozwój grzybów *Rhizoctonia solani* i *Fusarium culmorum*, powodujących zgorzel siewek podczas uprawy ogórków (*Cucumis sativus* L.). Uzyskane wyniki wskazują na największą aktywność fungistatyczną związków zawartych w chrzanie, które przyczyniły się do zniszczenia 65 - 100 % kolonii badanych grzybów w porównaniu do uprawy kontrolnej. Zastosowany zabieg biofumigacyjny skutecznie ograniczał występowanie przedwzrostowej zgorzeli siewek ogórka [123].

W innym doświadczeniu wykorzystano rozdrobnione pędy i korzenie rzepaku, które rozprowadzono na polu. Po 4 tygodniach trwania naturalnego procesu hydrolizy glukozynolanów, zachodzącego także pod wpływem mirozynazy pochodzącej z bakterii żyjących w glebie, wysiano nasiona grochu (*Pisum sativum*). Biobójcze działanie związków powstałych w wyniku degradacji glukozynolanów spowodowało 3-krotne zmniejszenie populacji szkodników *Aphanomyces euteiches*, odpowiedzialnych za choroby systemu korzeniowego grochu w porównaniu do hodowli kontrolnej na glebie nie poddanej biofumigacji [124]. Podobne postępowanie zastosowano podczas badań wpływu innych roślin kapustowatych, gorczycy czarnej i dwurzędu wąskolistnego, na rozwój grzybów *Rhizopus solani* odpowiedzialnych za gnicie warzyw i owoców. Wprowadzenie rozdrobnionych części roślin stanowiących źródło glukozynolanów (w ilości 5 g świeżej masy roślinnej/100 g gleby) do gleby zainfekowanej grzybami spowodowało 6-krotny spadek liczby badanych mikroorganizmów już po jednym miesiącu trwania procesu biofumigacji, a biobójcze działanie produktów hydrolizy glukozynolanów utrzymywało się przez 6 miesięcy prowadzenia eksperymentu [125]. Można przypuszczać, że za ten efekt odpowiedzialne były izotiocyjaniiny, jednak autorzy nie podają takiej informacji.

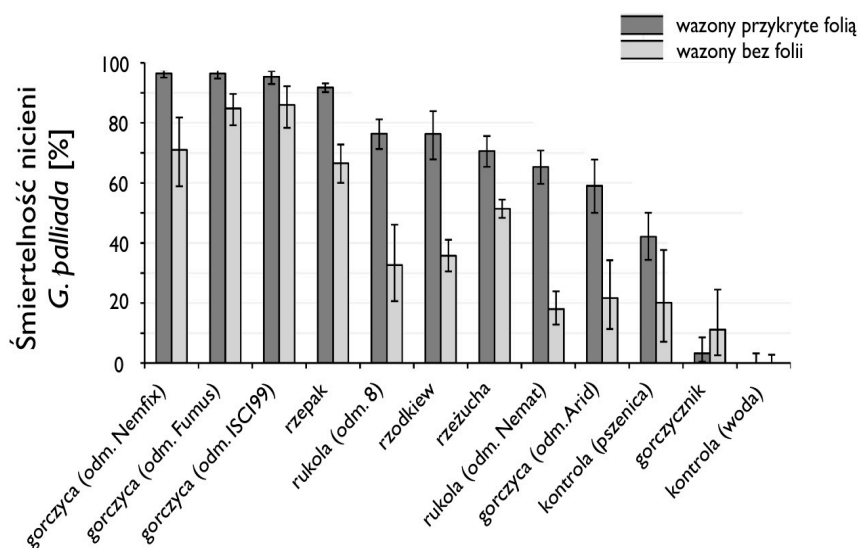
Wyniki innych badań z wykorzystaniem mączki z nasion gorczycy sarepskiej wykazały skuteczność biobójczego działania produktów enzymatycznej degradacji glukozynolanów na grzyby *Pythium abopressorium*, atakujące uprawy m.in. jabłek. W kontrolnej glebie bez dodatku mączki stopień zakażenia korzeni sadzonek jabłek wynosił 55 %, podczas gdy

w glebie wymieszanej z mączką w ilości 0,3 % (w/w) było o 20 % mniej zakażeń. Jednak największe zahamowanie infekcji (aż 92 %) udało się uzyskać w próbkach roślin rosnących na glebie z takim samym dodatkiem mączki, jednak przykrytej folią na 48 godzin tuż po wymieszaniu z mączką. W opinii autorów zapewnia to możliwość lepszego rozprowadzenia produktów degradacji glukozynolanów w glebie i ich dłuższe działanie [126]. Ponadto można przypuszczać, że w glebie przykrytej folią panowała wyższa temperatura, co mogło stworzyć lepsze warunki dla działania mirozynyzy [73]. Bez względu na sposób traktowania gleby efekt biofumigacyjny utrzymywał się do 8 tygodni [126].

Drugie podejście technologiczne, które także potwierdziło skuteczność stosowania roślin kapustowatych jako biofumigantów testowano w badaniach z wykorzystaniem gorczycy sarepskiej. Na polu przeznaczonym pod uprawę buraków cukrowych (*Beta vulgaris*) zasiano najpierw gorczycę sarepską. Z części pola zebrano gorczycę bez stosowania żadnych dodatkowych zabiegów, podczas gdy drugą część pola zaorano wraz z gorczycą. Na terenie, gdzie zaorano gorczycę, odnotowano zmniejszoną zachorowalność (o 43 - 47 %) korzeni buraka spowodowaną przez grzyby *Rhizopus solani* w porównaniu do uprawy na glebie kontrolnej. Na glebie, z której usunięto gorczycę, występowanie chorób było zmniejszone tylko o 16 - 39 % (dane z trzech lat prowadzenia eksperymentu) [127]. Większą skuteczność procesu wykorzystującego zaoranie roślin kapustowatych można tłumaczyć bardziej intensywną hydrolizą glukozynolanów na skutek rozdrobnienia tkanek roślinnych, co przyczyniło się do uwolnienia większej ilości produktów degradacji. Dodatkowo nastąpiło wymieszanie gleby z tkankami gorczycy, dzięki czemu penetracja bioaktywnych związków w głąb gleby była lepsza.

W innym eksperymencie w warunkach szklarniowych wykorzystano kilka roślin z rodziny kapustowatych, które dodawano w postaci zielonego nawozu (w ilości 5 % w/w) jako źródło glukozynolanów do ziemi zainfekowanej nicieniami *Globodera pallida*, szkodnikami upraw ziemniaków. Doświadczenie trwało 74 dni, po tym czasie określono liczbę nicieni, które przeżyły proces biofumigacji. Także w tym przypadku część badanych wazonów zakryto folią, aby zwiększyć skuteczność procesu biofumigacji. Na podstawie uzyskanych wyników (rys. 15) można wnioskować, że największą skuteczność biobójczą wykazują związki uwalniane podczas hydrolizy glukozynolanów znajdujących się w gorczycy sarepskiej. Analiza składu ilościowego i jakościowego glukozynolanów badanych roślin kapustowatych przeprowadzona przez autorów wskazuje na to, że głównym glukozynolanem obecnym w gorczycy jest sinigrina, a izotiocyjanian allilu powstający w wyniku jej hydrolizy wykazuje bardzo silne właściwości biobójcze. Ponadto poczyniono obserwację, że zakrycie wazonów folią powodowało znaczny wzrost efektywności biofumigacji w przypadku roślin zawierających

glukozynolany indolowe, np. rzodkiew i rzepak [94]. Do zwiększenia skuteczności procesu mogło się przyczynić kilka zjawisk. Wyższa temperatura panująca pod folią stwarza optymalne warunki dla reakcji katalizowanej przez mirozynazę. Folia zapobiega także utracie lotnych produktów degradacji, przez co przyczynia się do dłuższego czasu ich działania. Stwierdzono również możliwość powstawania dodatkowych toksycznych produktów w warunkach beztlenowych, a takie prawdopodobnie panowały pod folią. Podczas badań nad procesem anaerobowej degradacji (0,5 % - zawartość tlenu w atmosferze) związków obecnych w próbkach brokułów uzyskano etanol, merkaptan metylowy, siarkowodór, octan etylu, octan metylu, disulfid dimetylu, sulfid dimetylu, aldehyd octowy oraz aceton. Jednak przy większej zawartości tlenu (1,5 %) w atmosferze przechowywania, w próbkach nie wykryto etanolu, octanu etylu, aldehydu octowego, octanu metylu ani acetonu [128]. Nie wiadomo jaka była zawartość tlenu w panującej atmosferze pod folią w doświadczeniu biofumigacyjnym, jednak możliwe, że w warunkach anaerobowych dodatkowo powstały wymienione związki, także wykazujące działanie biobójcze.



Rysunek 15. Wyniki szklarniowego doświadczenia ilustrujące skuteczność roślin kapustowatych w ograniczaniu rozwoju nicieni *Globodera pallida* [na podstawie 94]

Do wazonów zawierających zainfekowaną glebę dodano rozdrobnione części roślin kapustowatych (5 % w/w) i po 74 dniach określono liczbę nicieni, które przeżyły proces biofumigacji

Biorąc pod uwagę wyniki uzyskane dla próbek rukoli lub rzodkwi, można zauważyć duże różnice w skuteczności działania wobec nicieni pomiędzy doświadczeniem przeprowadzonym z wykorzystaniem folii lub bez niej. Może to wynikać ze składu glukozynolanów w tych roślinach. W próbkach rzodkwi oznaczono duże ilości glukobrassicyny i neoglukobrassicyny, których indolowe produkty degradacji mogą być lepiej rozpuszczalne w wodzie niż alifatyczne pochodne. Biorąc pod uwagę, że zawartość wody w glebie w wazonach przykrytych folią

prawdopodobnie była większa w porównaniu do odkrytych wazonów, mogło się to przyczynić do lepszej dystrybucji rozpuszczalnych w wodzie produktów degradacji glukozynolanów. W próbkach rzodkwi w największej ilości występował alifatyczny glukozynolan 4-merkaptobutyli, jednak niewiele wiadomo o właściwościach produktów jego hydrolizy.

Wszystkie badane rośliny kapustowate wykazywały dużą skuteczność biofumigacyjną w porównaniu do próbki kontrolnej przygotowanej z wykorzystaniem wody. Znaczne biobójcze działanie okazały się także mieć związki uwalniane z pszenicy, jednak autorzy nie wyjaśniają jakie to mogą być substancje.

Jak już wspomniano, dodatkową zaletą stosowania roślin kapustowatych w procesie biofumigacji jest fakt, że są nie tylko źródłem związków o działaniu antybiologicznym, ale także dostarczają łatwo przyswajalnych pierwiastków takich jak węgiel, azot czy siarka. Wykorzystanie tych roślin jednocześnie jako środka ochrony upraw oraz formy zielonego nawozu dodatkowo skutkuje poprawą jakości gleby, co przekłada się na wyższe plony uprawianych warzyw i owoców. Jako potwierdzenie mogą posłużyć wyniki doświadczenia, w którym wykorzystano odtłuszczoną mączkę z gorczycy etiopskiej zawierającą glukozynolany, głównie sinigrinę (98%), oraz odpowiednią ilość mirozynyzy. Mączkę ręcznie rozproszano po polu, a następnie zwilżano, na 6 dni przed zasadzeniem cukinii. Efektem działania tego preparatu była poprawa jakości badanej gleby i zwiększenie plonu cukinii o 14%, w porównaniu z plonem uzyskanym z uprawy, w której wykorzystano syntetyczny preparat ochronny. Przy tym uzyskano wyraźne zahamowanie rozwoju szkodników *Meloidogyne incognita* [93].

Należy podkreślić, że agrotechniczny zabieg biofumigacji z wykorzystaniem roślin kapustowatych musi być stosowany do ochrony upraw roślin pochodzących z innej rodziny. Niektóre szkodniki roślin kapustowatych rozwinęły bowiem mechanizmy obronne niwelujące działanie systemu „glukozynolany—mirozynaza”, zatem w ich przypadku ochrona nie byłaby skuteczna. Istnieje jednak możliwość ochrony upraw roślin kapustowatych przez biofumiganty pochodzące z innych roślin. Wykazano, że w procesie biofumigacji zastosowanie mogą znaleźć także przedstawiciele rodziny psiankowatych (*Solanaceae*), np. papryka (*Capsicum annuum* L.) i pomidory (*Lycopersicon esculentum*). Wyniki badań dowodzą, że dodatek rozdrobnionych części papryki do gleby (5 - 20 g/500 g gleby) zakażonej nicieniami *Meloidogyne incognita* powodował zahamowanie rozwoju patogenów na poziomie 95% [129]. W podobnych badaniach przeprowadzonych przez ten sam zespół przetestowano także działanie innych materiałów, np. pozostałości po uprawie truskawek, ogórków i pomidorów wymieszanych z handlowo dostępnymi nawozami. W każdym przypadku uzyskano śmiertelność nicieni na poziomie wyższym o 50 % w porównaniu z kontrolną glebą bez dodatków [130]. Może to

świadczyć o skuteczności zabiegu, ale również o wysokiej wrażliwości badanego rodzaju szkodnika.

Z kolei pomidory zostały wykorzystane w badaniach dotyczących zwalczania patogennych bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Pokrojone pomidory dodawano do ziemi (w ilości 5 - 15%) zainfekowanej bakteriami. Eksperyment prowadzono w temperaturze 25°C lub 45°C, a część wazonów została przykryta folią. Całkowite zahamowanie rozwoju bakterii stwierdzono już w pierwszym tygodniu w wazonach przykrytych folią, w warunkach podwyższonej temperatury, natomiast w wazonach bez folii podobny efekt zaobserwowano dopiero w czwartym tygodniu prowadzenia eksperymentu. W przypadku wazonów bez folii przechowywanych w temperaturze 25°C, nawet po 6 tygodniach nie udało się całkowicie wyeliminować szkodliwych bakterii [131]. Nie wiadomo jednak jakie substancje są odpowiedzialne za potencjał biofumigacyjny pomidora, choć wpływ podwyższonej temperatury może sugerować konieczność działania enzymów, podobnie jak ma to miejsce w przypadku roślin kapustowatych.

Zastosowanie w biofumigacji znalazły także rośliny z rodziny astrowatych (*Asteraceae*), m.in. aksamitka (*Tagetes* spp). Mechanizm działania tej rośliny ozdobnej polega na syntezie fototoksyn, np. α -tertienylu, heterocykliczego związku o działaniu antybiologicznym zawierającego siarkę, który może hamować rozwój wirusów, bakterii, nicieni oraz insektów [132, 133]. Ponadto w procesie ochrony roślin wykorzystywany jest fakt, że aksamitka stwarza środowisko sprzyjające rozwojowi mikroorganizmów antagonistycznych wobec szkodliwych fitofagów [134]. O skuteczności działania tego procesu mogą świadczyć wyniki doświadczenia polegającego na naprzemiennej uprawie ziemniaków i aksamitki, podczas którego uzyskano zahamowanie szkodliwych nicieni *Pratylenchus penetrans* obecnych w glebie na poziomie 93% [135].

Proces biofumigacji z wykorzystaniem roślin kapustowatych jako naturalna ochrona działa wybiórczo wobec patogenów i agrofagów, bowiem mechanizm obronny jest uruchamiany wyłącznie podczas ataku szkodników. Zatem obecność drobnoustrojów i owadów, które nie atakują tych roślin, nie powoduje aktywowania systemu „glukozynolany—mirozynaza”. W związku z tym pożyteczne gatunki mikroorganizmów nie są zagrożone. Jednak rozpatrując selektywność procesu w ujęciu zabiegu agrotechnicznego, gdzie stosowane są już rozdrobnione części roślin, produkty degradacji glukozynolanów mogą działać na całą mikrofaunę glebową. Na przykładzie hodowli grzybów *Trichoderma* wykazano jednak, że mikroorganizmy pożyteczne są mniej wrażliwe na działanie izotiocyjanianów niż patogeny, np. *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* czy *Fusarium oxysporium* [136]. Ponadto szybka biodegradacja naturalnych fumigantów powoduje ograniczenie czasu ich działania wobec

pożytecznych gatunków mikrofauny.

Biofumigacja jako przyjazna środowisku technologia ochrony roślin zyskuje coraz większe znaczenie, zwłaszcza wobec rosnącej świadomości na temat zagrożeń zdrowotnych związanych z powszechnym stosowaniem pestycydów i nawozów sztucznych. Związki wykorzystywane w tym procesie nie tylko wykazują skuteczne działanie biobójcze wobec patogenów roślinnych, ale także przyczyniają się do poprawy jakości biologicznej gleby. Nie bez znaczenia jest fakt, że naturalne mechanizmy obronne wykorzystywane w ochronie upraw spotykają się z większą akceptacją konsumentów.

Jednak aby w pełni wykorzystać potencjał biofumigacyjny roślin kapustowatych, należy dokładnie poznać mechanizm degradacji glukozynolanów oraz czynniki warunkujące powstawanie poszczególnych produktów. Wtedy możliwe będzie zwiększenie efektywności procesu przez odpowiednie ukierunkowanie hydrolizy tak, aby uwalniane były najbardziej aktywne związki, m.in. izotiocyjaniiny.

I. 2. 6 Zdrowotne znaczenie produktów hydrolizy glukozynolanów

Istotnym aspektem procesu degradacji glukozynolanów jest fakt, że przynajmniej niektóre produkty ich hydrolizy mogą korzystnie wpływać na ludzkie zdrowie, przede wszystkim zmniejszając zagrożenie chorobami nowotworowymi. Wyniki dotychczas przeprowadzonych badań epidemiologicznych wskazują, że dieta bogata w rośliny kapustowate może zmniejszać ryzyko wystąpienia najczęściej diagnozowanych nowotworów, takich jak rak piersi, prostaty, płuc, żołądka czy trzustki [137 - 143]. Za najważniejsze pochodne glukozynolanów w profilaktyce nowotworowej, a także w przypadku innych dietozależnych chorób przewlekłych, uważane są izotiocyjaniiny. Chemoprewencyjne działanie warzyw kapustowatych związane jest przede wszystkim z ich obecnością, w mniejszym stopniu pochodnych indolowych. Początkowo wykazano, że izotiocyjaniiny powodują zmniejszenie aktywności enzymów fazy I, przyczyniających się do aktywacji kancerogenów, równocześnie stymulując działanie enzymów fazy II odpowiedzialnych za detoksykację ksenobiotyków. Następnie dowiedziono wpływu izotiocyjaniin na szereg równoległe zachodzących w komórce procesów poprzez inhibicję lub stymulację działania czynników transkrypcyjnych. Ta zdolność izotiocyjaniin przyczynia się do przeciwdziałania stanom zapalnym i uruchamiania szlaków sygnalizacyjnych regulujących nie tylko mechanizmy detoksykacyjne, ale również cykl komórkowy i apoptozę [138, 144 - 148]. Jak widać chemoprewencyjne właściwości izotiocyjaniin ujawniają się na wielu poziomach funkcjonowania organizmu, stąd ich wielokierunkowy potencjał prozdrowotny. Wydaje się, że inne produkty degradacji glukozynolanów takie jak epitionitryle, nitryle i tiocyjaniiny odgrywają mniejszą rolę, jednak

ich działanie nie jest aż tak dobrze poznane jak ma to miejsce w przypadku izotiocyjanianów [149 - 152].

Należy zaznaczyć, że w większości badań nad prozdrowotnym działaniem izotiocyjanianów wykorzystywane były wyizolowane związki. Uniemożliwia to określenie wpływu innych składników matrycy roślinnej na zachowanie danego bioaktywnego związku w organizmie, a mogą one tak wzmacniać, jak i zmniejszać końcowy efekt biologiczny. Jeśli nawet stosowano naturalne preparaty, to badacze zakładali, że duża zawartość glukozynolanów w badanej próbce roślinnej bezpośrednio przekłada się na dużą zawartość izotiocyjanianów. Jak wspomniano wcześniej, hydroliza glukozynolanów jest procesem złożonym, przebieg reakcji zależy od kilku czynników, a w jej wyniku uzyskiwanych jest wiele produktów i zakładanie całkowitej konwersji glukozynolanów do izotiocyjanianów może prowadzić do błędnej interpretacji wyników. Analiza wyników badań biologicznych z wykorzystaniem ekstraktów lub soków z roślin kapustowatych musi być bardziej wnikliwa, bowiem efekty uzyskane w takich doświadczeniach mogą być zarówno pochodną rzeczywistego stężenia izotiocyjanianów, jak i skutkiem obecności mniej aktywnych produktów hydrolizy. Stąd też najbardziej interesujące są wyniki doświadczeń porównujących działanie całego fitokompleksu próbki roślinnej oraz związków wyizolowanych z matrycy roślinnej w modelach biologicznych. W literaturze naukowej niestety niewiele można napotkać tego typu doniesień, i jak to wynika z poniższego omówienia opublikowanych rezultatów, interpretacja nie zawsze jest jednoznaczna.

W przypadku związków indolowych i wyników badań *in vitro* przeprowadzonych na ludzkich komórkach raka piersi (estrogeno-zależne linie MCF7 oraz MDA-MB-231) traktowanych próbkami soków z kapusty (25 mL/L) lub roztworów wyizolowanych związków indolowych obecnych w kapuście, DIM (5 μ M) oraz I3C (30 μ M), można wnioskować o zróżnicowanym działaniu wymienionych substancji na komórki nowotworowe [153]. Zawartość I3C w próbkach świeżej i kiszzonej kapusty określono odpowiednio na poziomie 13,1 oraz 26,3 μ M. Zaobserwowano zwiększoną ekspresję genów *CYP19* w komórkach nowotworowych MCF7 pod wpływem związków obecnych w sokach z kapusty, zarówno surowej, jak i kiszzonej o odpowiednio 120 i 50 % w porównaniu do poziomu ekspresji zachodzącej w komórkach hodowanych bez obecności dodatkowych substancji (po 72 h inkubacji). Tymczasem inkubacja z dodatkiem roztworu DIM lub I3C spowodowała spadek poziomu ekspresji *CYP19* w badanych komórkach aż o 75 - 80 %. Podwyższona ekspresja *CYP19*, wpływająca na metabolizm estrogenów, może przyczyniać się do powstawania i rozwoju nowotworów piersi [154, 155]. Zatem indukcja poziomu ekspresji *CYP19* przez fitokompleks soków z kapusty potencjalnie może być niebezpieczna dla zdrowia. W badaniach

określono także cytotoksyczność wymienionych związków wobec ludzkich komórek raka piersi estrogeno-zależnej linii MDA-MB-231, wyrażoną jako wskaźnik IC₅₀, czyli stężenie związku powodujące śmierć 50 % badanych komórek w porównaniu do hodowli kontrolnej. Dla próbek soków wartość ta wynosiła 7,2 i 8,4 mL/L, odpowiednio dla soku z kapusty surowej i kiszzonej, natomiast w przypadku próbek wyizolowanych związków - 17,8 oraz 51,5 μM dla roztworu DIM i I3C [153]. Według autorów wyniki wskazywały na mniejszy potencjał prozdrowotny fitokompleksu obecnego w sokach z kapusty w porównaniu do wyizolowanych związków.

W podobnym doświadczeniu *in vitro*, wykorzystującym ten sam zestaw soków z kapusty oraz związków indolowych, wykazano zróżnicowany poziom transkrypcji genów *CYP1A1* oraz *CYP1B1* pod wpływem badanych substancji [156]. Enzymy fazy I, CYP1A1 oraz CYP1B1, odgrywają rolę w metabolizmie estrogenów, które jak wspomniano, mogą przyczyniać się do wzrostu proliferacji komórek raka piersi. W wyniku reakcji z udziałem enzymu CYP1A1 ilość estrogenu w komórkach nowotworowych zmniejsza się, natomiast pod wpływem działania enzymu CYP1B1 powstają bardziej szkodliwe produkty, które mogą stymulować kancerogenezę [157]. Inkubacja (72 h) ludzkich komórek raka piersi linii MDA-MB-231 z dodatkiem soku z kapusty surowej (10 mL/L) spowodowała indukcję poziomu transkrypcji *CYP1A1* oraz *CYP1B1* o ok. 200 - 220 % w porównaniu do ekspresji zachodzącej w komórkach hodowanych bez obecności dodatkowych substancji. Fitokompleks soku z surowej kapusty w odpowiadającej dawce nie wywołał znaczących zmian w poziomie transkrypcji *CYP1A1* w badanych komórkach, natomiast przyczynił się do wzrostu poziomu transkrypcji *CYP1B1* o 150 %. Doświadczenie przeprowadzone z wykorzystaniem roztworu DIM (5 μM) skutkowało wzrostem poziomu transkrypcji, zarówno *CYP1A1*, jak i *CYP1B1*, o ok. 450 %. Najwyższy wzrost poziomu transkrypcji w komórkach nowotworowych zanotowano w przypadku działania I3C (30 μM), odpowiednio o 700 % oraz 1700 % dla *CYP1B1* i *CYP1A1*. Okazało się także, że indukcja ekspresji *CYP1* jest zależna od rodzaju badanych komórek. Wyniki uzyskane podczas doświadczenia z wykorzystaniem nienowotworowej linii ludzkich komórek tkanki piersi MCF10 wskazywały, że poziom transkrypcji *CYP1B1* pozostał niezmienny po inkubacji komórek z sokiem z kapusty surowej w porównaniu do poziomu uzyskanego dla próbek kontrolnych; ponadto substancje obecne w soku z kapusty kiszzonej przyczyniły się do spadku poziomu transkrypcji *CYP1B1* o ok. 30 %. Pod wpływem DIM oraz I3C poziom transkrypcji *CYP1B1* wzrósł zaledwie odpowiednio o 70 i 100 %. Natomiast w przypadku *CYP1A1* działanie wszystkich badanych substancji było podobne i skutkowało wzrostem poziomu transkrypcji o 300 - 500 %. Wyniki opisanych badań dowodzą roli produktów enzymatycznej degradacji glukozynolanów w procesach chemoprewencyjnych poprzez oddziaływanie na czynniki biorące udział w kancerogenezie. Wpływ ten nie jest jednoznacznie

korzystny, bowiem indukcja poziomu transkrypcji *CYP1B1*, np. przez związki indolowe, może przyczynić się do wzrostu ryzyka rozwoju nowotworu.

Kolejnym przykładem wpływu matrycy roślinnej na właściwości chemoprewencyjne związków bioaktywnych są wyniki uzyskane podczas doświadczeń wykorzystujących próbki wodnego ekstraktu z brukselki oraz wodne roztwory wyizolowanych glukozynolanów typowych dla tego warzywa (sinigrina, sinalbina, glukonapina, glucoiberyna, glukorafanina) [158]. Podczas badań *in vitro* określono aktywność enzymu fazy II, reduktazy chinonowej (QR), w nienowotworowej linii mysich komórek wątroby (Hepa1c1c7) traktowanych przez 24 h ekstraktem roślinnym lub wyizolowanymi związkami (5 µg/mL). Na podstawie uzyskanych danych stwierdzono, że względna aktywność enzymu QR, obliczona w odniesieniu do wzorcowej aktywności tego enzymu pochodzącego z nietraktowanych komórek badanej linii, była nieznacznie indukowana w obecności sinigriny (113 %). Natomiast dodatek do komórek sinigriny wraz z mirozynazą, katalizującą pierwszy etap konwersji do izotiocyanianów, spowodował dalsze zwiększenie aktywności enzymu - aż do 143 %. Analogiczne doświadczenie przeprowadzone z wykorzystaniem glukorafaniny skutkowało spadkiem aktywności enzymu QR do 40 % w obecności samego glukozynolanu, podczas gdy dodatek mirozynazy nie powodował zmiany aktywności enzymatycznej (100 %). Te wyniki mogą być podstawą do stwierdzenia różnic w działaniu poszczególnych glukozynolanów, które wywierają odmienny wpływ na aktywność enzymu QR. Natomiast w wyniku inkubacji komórek z ekstraktem z brukselki aktywność badanego enzymu nie ulegała zmianie. Na podstawie opisanych wyników można wnioskować o zróżnicowanym wpływie bioaktywnych związków na aktywność enzymu QR, a zatem potencjalnie mogą one w sposób zróżnicowany modulować także inne mechanizmy komórkowe. Produkty hydrolizy glukozynolanów, prawdopodobnie izotiocyaniany, ponieważ w reakcji wykorzystano wyizolowaną mirozynazę, w większym stopniu indukują aktywność badanego enzymu niż natywne glukozynolany. Ponieważ skład ekstraktu roślinnego nie został określony przez badaczy, wnioskowanie o wpływie produktów degradacji glukozynolanów obecnych w ekstrakcie jest utrudnione. Prawdopodobnie w wyniku hydrolizy powstały mniej aktywne związki lub zawartość izotiocyanianów była zbyt mała by spowodować widoczne zmiany aktywności badanego enzymu.

O decydującym wpływie izotiocyanianów na bioaktywność badanych próbek z roślin kapustowatych mogą świadczyć wyniki badań z wykorzystaniem ekstraktów otrzymanych z liofilizowanych kiełków brokułów, gorczycy i kapusty przeprowadzone w naszym zespole [101]. Pomimo dużego stężenia glukozynolanów, zawartość izotiocyanianów w ekstraktach z badanych kiełków była bardzo mała (0,09 - 0,39 µmol/g s.m.), bowiem stopień konwersji

glukozynolanów do izotiocyjanianów wynosił tylko 1%. Okazało się, że ekstrakty z tak małą zawartością izotiocyjanianów, otrzymane z liofilizatów wspomnianych kiełków, nie miały żadnego wpływu na aktywność enzymów detoksykacyjnych, ani dehydrogenazy NAD(P)H-chinonowej (NQO) ani transferaz S-glutationowych (GST), obecnych we frakcji cytozolowej wyizolowanej z komórek ludzkiego raka jelita grubego HT29. Oznacza to, że pozostałe produkty hydrolizy glukozynolanów, których obecność stwierdzono w ekstraktach (m.in. nityle, epitionityle, goitryna) nie wpływały na aktywność enzymów NQO i GST. Natomiast wyniki wcześniejszych badań dowiodły, że związki obecne w soku z kapusty zawierającej większą ilość izotiocyjanianów (3 - 5 $\mu\text{mol/g}$ s.m.) wyraźnie stymulowały aktywność wspomnianych enzymów. Na przykład już po 3-godzinnej inkubacji komórek nowotworowych HT29 z sokiem z surowej kapusty (40 % v/v), aktywność enzymatyczna GST wzrosła dwukrotnie w porównaniu z poziomem oznaczonym w komórkach kontrolnych. Indukcja aktywności enzymu NQO wymagała dłuższej (24 h) ekspozycji na związki obecne w soku [159].

Jednymi z nielicznych przykładów, gdzie w warunkach *in vivo* porównywano aktywność całego fitokompleksu soku z kapusty z wyizolowanymi związkami są doświadczenia przeprowadzone przez zespół prof. Wandy Baer-Dubowskiej z Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Uzyskane wyniki badań świadczyły o zróżnicowanym wpływie soków z kapusty, świeżej lub kiszanej, oraz wyizolowanych związków obecnych w kapuście - PEITC i I3C - na poziom ekspresji genów kodujących enzymy fazy I, CYP2B, we frakcji mikrosomalnej wątroby szczurów. Po 4 dniach stosowania u szczurów diety zawierającej soki z kapusty (1,25 mL/kg m.c.) ekspresja *CYP2B* we frakcji mikrosomalnej była na podobnym poziomie w porównaniu do kontroli. Natomiast u szczurów żywionych karmą z dodatkiem roztworów I3C lub PEITC (100 mg/kg m.c.) ekspresja *CYP2B* wzrosła o 60 - 70 % w porównaniu do kontroli [160]. Biorąc uwagę fakt, że enzymy CYP2B biorą udział w metabolicznej aktywacji kancerogenów, wzrost ich aktywności może nie być korzystny dla organizmu.

W podobnych badaniach również uzyskano wyniki wskazujące na zróżnicowany wpływ soków z kapusty i wyizolowanych z niej związków tym razem na aktywność enzymów fazy II, na przykładzie GST oraz NQO. Po 4 dniach podawania szczurom karmy z dodatkiem I3C lub PEITC (po 100 mg/kg m.c) zaobserwowano wzrost aktywności enzymów GST we frakcji cytozolowej pochodzącej z wątroby szczura o 60 % w przypadku obu związków oraz enzymu NQO odpowiednio o 81 i 113 % w porównaniu do aktywności oznaczonej u zwierząt kontrolnych. Natomiast dieta wzbogacona w sok z kapusty surowej lub kiszanej (1,25 mL soku/kg m.c) skutkowała wzrostem aktywności enzymów GST tylko o 23 - 20 %, NQO odpowiednio o 63 - 55 % [161]. Mniej skuteczna stymulacja aktywności enzymów

detoksykacyjnych przez związki zawarte w sokach z kapusty mogła być spowodowana obecnością różnych produktów hydrolizy glukozynolanów, nie tylko tych najbardziej aktywnych. Przede wszystkim jednak zawartość I3C oraz izotiocyjanianów w próbkach soków z kapusty wynosiła odpowiednio 2,74 i 0,15 $\mu\text{mol/L}$, co oznaczało mniejsze spożycie wspomnianych związków przez szczury karmione paszą wzbogaconą sokami w porównaniu do karmy z dodatkiem wyizolowanych substancji. Na podstawie danych uzyskanych podczas eksperymentów uwzględniających dwa sposoby żywienia wykazano jednak, że aktywność enzymów GST była słabiej indukowana, zarówno przez wyizolowane związki I3C oraz PEITC, jak i substancje obecne w soku, w porównaniu do stymulacji aktywności enzymatycznej oksydoreduktazy NQO.

Pomimo udokumentowanych prozdrowotnych właściwości bioaktywnych fitozwiązków roślin kapustowatych, wiedza na ich temat nie jest jeszcze pełna. Przede wszystkim pojawiają się doniesienia wskazujące na potencjalnie genotoksyczne i mutagenne działanie niektórych produktów rozpadu glukozynolanów, szczególnie związków indolowych. Podczas badań nad mutagennością wybranych glukozynolanów z wykorzystaniem testu Ames i szczepu *Salmonella typhimurium* TA100 nie stwierdzono indukcji mutacji. Jednak ten sam test przeprowadzony dla glukozynolanów w obecności mirozynazy wykazał, że produkty enzymatycznej degradacji niektórych z nich są mutagenne wobec testowych bakterii [162]. Największą mutagenność zaobserwowano w przypadku produktów degradacji sinalbiny oraz glukozynolanów indolowych: glukobrassycyny, neoglukobrassycyny i 4-metoksyglukobrassycyny. Można przypuszczać, że skoro hydroliza była katalizowana tylko przez mirozynazę wyizolowaną z nasion gorczycy, to jako produkty reakcji uzyskano izotiocyjaniany (lub związki indolowe w przypadku glukozynolanów indolowych) i właśnie one były odpowiedzialne za uzyskany wynik.

Wyniki innego doświadczenia nad mutagennością neoglukobrassycyny mogą stanowić potwierdzenie dla tezy, że sam glukozynolan nie wykazuje właściwości genotoksycznych w teście Ames. Za efekt mutageny odpowiadają produkty jego enzymatycznej degradacji, ponieważ ilość zmutowanych rewertantów zwiększyła się dopiero w obecności mirozynazy. W trakcie badań przeprowadzonych przez ten sam zespół wykorzystano wzorce nitrylu i alkoholu 1-metoksy-3-indolometylowego, czyli pochodne nie będące produktami rozpadu niestabilnego izotiocyjanianu indolowego, które nie wykazały mutagennego działania. Sugeruje to mutageny wpływ wyłącznie niestabilnego izotiocyjanianu lub intermediatów powstających w trakcie jego dalszych przemian [163].

Również wyniki innych badań nad biologicznymi właściwościami soku z brokułów, wskazują na mutageny wpływ produktów degradacji neoglukobrassycyny w nim obecnych.

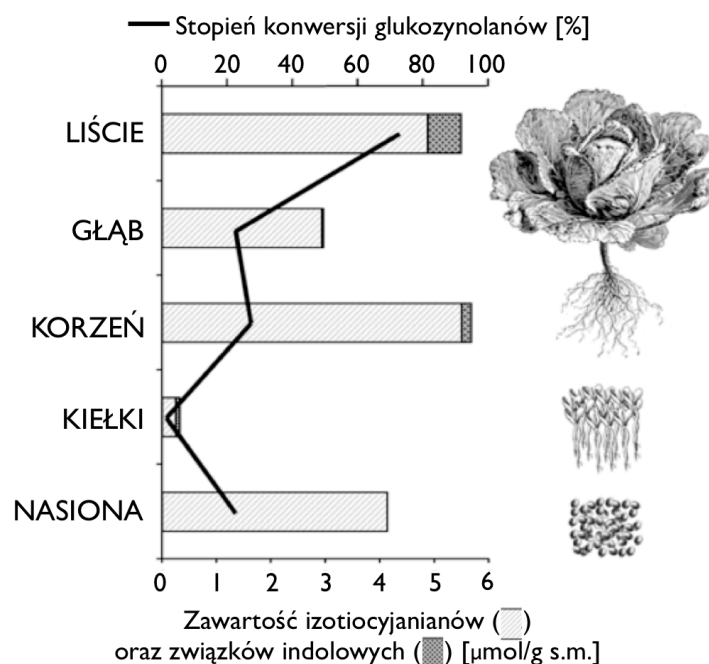
Mutagenność tych produktów, określona za pomocą testu Ames, jest porównywalna do tej oznaczonej dla benzo(a)pirenu, związku o silnych właściwościach genotoksycznych [164]. Jednak sulforafan, izotiocyjanian powstający w wyniku hydrolizy glukorafaniny, głównego glukozynolanu występującego w brokułach, nie powodował żadnego efektu mutagennego [162, 165].

Także wyniki innych badań *in vitro* oraz *in vivo* dowodzą mutagennych i genotoksycznych właściwości niektórych izotiocyjanianów, takich jak AITC, BITC, PEITC, MITC [166 -169]. U podłoża mutagennego działania produktów degradacji glukozynolanów może leżeć ich zdolność do reagowania z grupami aminowymi biomolekuł o charakterze nukleofilowym, co w przypadku izotiocyjanianów prowadzi do powstawania tiomoczników i zaburzenia struktury białek oraz DNA [162]. Przy użyciu techniki ³²P-*postlabelling* zbadano możliwość tworzenia adduktów przez produkty hydrolizy glukozynolanów z DNA [165]. Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, że produkty degradacji indolowych glukozynolanów (glukobrassycyny, neoglukobrassycyny oraz 4-metoksyglukobrassycyny) tworzą 100 razy więcej adduktów niż produkty otrzymane w wyniku enzymatycznej hydrolizy glukozynolanów alifatycznych lub aromatycznych.

Biorąc pod uwagę doniesienia o zarówno korzystnym, jak i negatywnym wpływie produktów degradacji glukozynolanów na procesy zachodzące na poziomie komórkowym, wydaje się konieczne przeprowadzenie dalszych badań uwzględniających całe spektrum możliwych pochodnych. Co najważniejsze, do tej pory nie był uwzględniany zróżnicowany stopień konwersji glukozynolanów do izotiocyjanianów w próbkach roślinnych. Oznacza to, że wyniki badań uzyskane dla wyizolowanych związków nie muszą przekładać się na rzeczywiste efekty zdrowotne spożywanych warzyw kapustowatych, a tym bardziej bazujących na tych roślinach suplementów diety, w których dawki bioaktywnych substancji wielokrotnie przewyższają poziom normalnego spożycia, a ich skład jest podawany wyłącznie na podstawie zawartości glukozynolanów obecnych w roślinnym surowcu.

Dostępnych jest zaledwie kilka prac opisujących stopień konwersji glukozynolanów do izotiocyjanianów w próbkach roślinnych. Przykładowo, w próbkach kiełków rzepy japońskiej (*R. sativus* L. major cv. 0P38) konwersja wynosiła aż 96,5 %, podczas gdy w próbkach rzodkwi (*R. sativus* L. cv. 0P153), jarmużu (*B. oleracea* L. ssp *acephala* (DC) var. *Sabellica* L. cv. 0D74) oraz brokułów (*B. oleracea* L. spp. *italica* cv. 0D22) odpowiednio 90 %, 68 % oraz 18,7 % [170]. Natomiast w próbkach kiełków rzodkwi (*Raphanus sativus* L.) stopień konwersji został oznaczony na poziomie 17 - 58 %, w zależności od odmiany [171]. Konwersja glukozynolanów może się różnić, i to drastycznie, nawet w próbkach poszczególnych części jednej rośliny (rys. 16) [172]. Przytoczone dane potwierdzają konieczność uwzględniania

stopnia przekształcenia glukozynolanów do bioaktywnych produktów podczas analizy danych biologicznych uzyskanych w badaniach wykorzystujących próbki roślin kapustowatych.



Rysunek 16. Stopień konwersji glukozynolanów do izotiocyjanianów oraz związków indolowych oznaczony w próbkach poszczególnych części kapusty białej [172]

W świetle obecnej wiedzy izotiocyjaniany to związki o najskuteczniejszych właściwościach prozdrowotnych spośród produktów degradacji glukozynolanów. Ich obecność w diecie człowieka wydaje się odgrywać ważną rolę w chemoprewencji chorób cywilizacyjnych, przede wszystkim nowotworów. Dlatego odpowiednie ukierunkowanie procesu hydrolizy glukozynolanów tak, aby otrzymać izotiocyjaniany jako jedyne produkty, może zwiększyć potencjał zdrowotny roślin kapustowatych. Teoretycznie taki efekt można uzyskać przez selektywną inaktywację dodatkowych białek, które obok mirozyny biorą udział w hydrolizie glukozynolanów i promują powstawanie mniej aktywnych produktów, takich jak nityle, epitionityle czy tiocyjaniany. W literaturze naukowej nie ma doniesień, w których opisano tego typu badania.

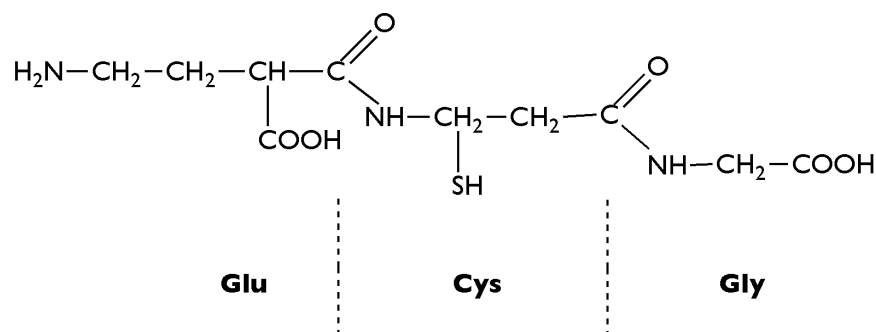
I. 3 Związki odpowiedzialne za pobieranie i akumulację metali w roślinach

Rośliny pobierają pierwiastki z gleby przez system korzeniowy. Pierwiastki te występują w środowisku na ogół w postaci związanej, czyli różnych związków chemicznych i są transportowane z korzeni dalej do organów w części nadziemnej. O składzie pobranych substancji decyduje ich obecność w glebie i do rośliny mogą wnikać tak substancje niezbędne

dla jej rozwoju, jak i toksyczne. W przypadku metali granica między zapotrzebowaniem a zagrożeniem jest ilościowa i często też znaczenie ma forma chemiczna w jakiej występują w środowisku. Różne mechanizmy ochronne zostały wykształcone przez rośliny w celu przeciwdziałania wnikaniu do wnętrza komórek zbędnych i szkodliwych metali lub zniwelowania toksycznego działania już pobranych ich związków. Roślinna tolerancja na działanie tych substancji oparta jest na wielu procesach, takich jak wiązanie metali ze ścianą komórkową, aktywny transport jonów do wakuoli, tworzenie kompleksów z kwasami organicznymi, związkami siarkoorganicznymi lub białkami [173]. Najbardziej zbadaną pod względem tych mechanizmów jest rodzina roślin kapustowatych, w których ochronną rolę wiąże się głównie z zawartością związków siarkoorganicznymi. Do najważniejszych związków zawierających siarkę w postaci wbudowanych cystein zapewniających roślinom kapustowatym odporność na nawet wysokie stężenia i toksyczne działanie metali ciężkich pobieranych ze środowiska należą: glutation, fitochelatyny oraz metalotioneiny.

I. 3. 1 Glutation

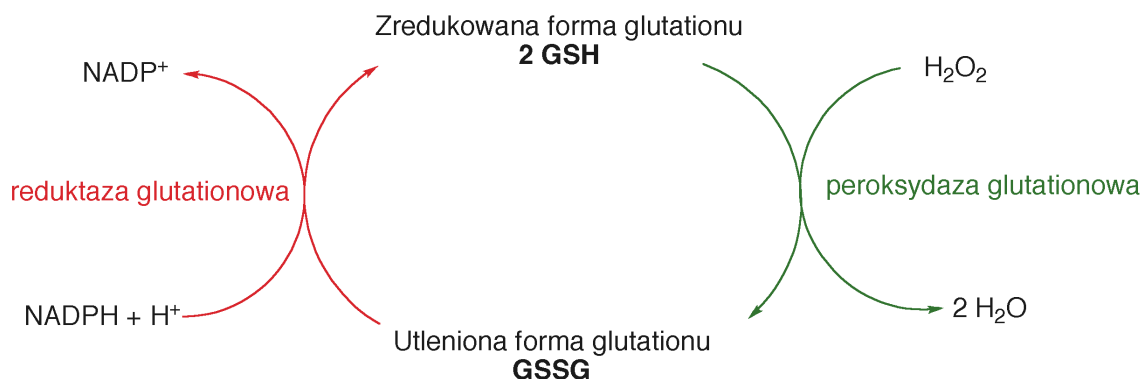
Glutation (GSH) jest tripeptydem złożonym z kwasu glutaminowego, cysteiny i glicyny (rys. 17). Związek ten występuje we wszystkich organizmach żywych, zarówno w drobnoustrojach, jak i roślinach oraz organizmach wyższych. Synteza glutationu jest katalizowana przez dwa enzymy zależne od ATP: syntetazę γ -glutamylcysteiny (GSH1, E.C. 6.3.2.2) i syntetazę glutationową (GSH2, E.C. 6.3.2.3) [174]. Pierwszy etap syntezy glutationu obejmuje, katalizowane przez enzym GSH1, utworzenie wiązania peptydowego pomiędzy grupą γ -karboksylową kwasu glutaminowego i aminową grupą cysteiny. Następnie do nowo powstałej γ -glutamylcysteiny, przy udziale enzymu GSH2, dołączana jest reszta glicyny i powstaje cząsteczka glutationu.



Rysunek 17. Wzór chemiczny glutationu

Glutation może występować w dwóch formach - zredukowanej jako tripeptyd (GSH) lub utlenionej, którą stanowi dimer połączony mostkiem disulfidowym (GSSG). Standardowy

potencjał redoks glutationu wynosi -170 mV [175]. Redukcję glutationu katalizuje reduktaza glutationowa (E.C. 1.8.1.7), wykorzystująca NADPH jako donor elektronów, utlenianie przebiega pod wpływem peroksydazy glutationowej (E.C. 1.11.1.9), selenoenzymu zawierającego selenocysteinę w centrum aktywnym (rys. 18) [174].



Rysunek 18. Cykl utleniania i redukcji glutationu pod wpływem reaktywnych form tlenu

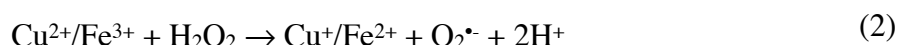
Zdolność glutationu do przechodzenia na przemian w stan utleniony i zredukowany jest niezwykle ważna w procesach oksydoredukcyjnych i chroni komórki roślinne przed negatywnymi skutkami działania reaktywnych form tlenu. Glutathion pełni również wiele innych funkcji w komórce roślinnej, m.in. wspomaga proces detoksykacji substancji szkodliwych, działa jako czynnik redukcyjny zarówno w reakcjach enzymatycznych, jak i nieenzymatycznych. Odgrywa także rolę przy podziałach komórkowych i utrzymaniu wysokiej aktywności tworzenia nowych tkanek w systemie korzeniowym rośliny. Podwyższony poziom glutationu w komórkach warunkuje szybszy wzrost roślin, w tym strefy korzeniowej oraz tworzenie się nowych liści. Związek ten bierze też udział w transporcie aminokwasów do wnętrza komórki w cyklu γ -glutamylowym, ma też wpływ na regulację ekspresji niektórych genów (np. odpowiedzialnych za syntezę peroksydazy askorbinianowej) [174, 176 - 178].

W procesach detoksykacji wykorzystywany jest nukleofilowy charakter grupy sulfidowej glutationu, która stanowi miejsce przyłączenia związków elektrofilowych, ale także jonów metali [174]. Glutathion ma dzięki temu zdolność wiązania jonów metali ciężkich z utworzeniem koniugatów, które są następnie transportowane do wakuoli, co stanowi jeden z mechanizmów ochronnych roślin przed szkodliwym działaniem metali. Zwiększona synteza glutationu w komórkach wyraźnie wpływa na wzrost odporności roślin na jony metali ciężkich, np. kadmu i niklu, oraz zwiększa ich zdolność do akumulacji kadmu w korzeniu. Przykładowo, genetycznie zmodyfikowana odmiana rzodkiewnika z ograniczoną zdolnością do syntezy glutationu jest zdecydowanie bardziej wrażliwa na obecność jonów Cd^{2+} i Cu^{2+} w glebie niż jej naturalny odpowiednik [179]. Analogicznie, rośliny z podwyższonym poziomem glutationu są

bardziej odporne na działanie metali. Poziom jonów Cd^{2+} pobranych przez gorczycę ze zwiększoną ekspresją genów odpowiedzialnych za syntezę enzymu GSH2 był 3 razy większy w porównaniu do ilości jonów oznaczonych w niemodyfikowanej roślinie [180]. Ponadto glutation jest substratem w syntezie fitochelatyn, które wiążąc jony metali także przyczyniają się do ochrony roślin (rozdział I.3.2).

Poziom glutationu w liściach roślin wyższych waha się w granicach 0,05 - 1,5 mM (jako GSH). W próbkach rzodkiewnika oznaczono różne poziomy glutationu, w zależności od badanej warstwy liścia. W komórkach wewnętrznej tkanki liścia zawartość glutationu została oznaczona na poziomie 0,08 mM, w komórkach epidermalnych stanowiących powłokę liścia - 0,14 mM, a w komórkach tworzących włoski na powierzchni liścia - 0,24 mM. Natomiast w komórkach rozwijających się korzeni tej rośliny poziom glutationu wynosił aż 2,7 - 5,5 mM [174]. Podwyższona zawartość glutationu w zewnętrznych częściach roślin może mieć związek nie tyle z ich większą ekspozycją na metale ciężkie, co raczej z ochroną przed narażeniem na działanie reaktywnych form tlenu indukowanych przez promieniowanie UV.

Zawartość glutationu w komórkach oraz stopień jego utlenienia, a tym samym ochrona rośliny przed działaniem metali ciężkich, zależą od wielu czynników. Zwiększenie ilości zredukowanej formy glutationu w tkankach roślinnych może następować pod wpływem podwyższonej temperatury (eksperyment prowadzony w temperaturze 45°C przez 1 h), naświetlania (gęstość strumienia fotonów zwiększona ze 180 do 1800 $\mu\text{moli fotonów/m}^2/\text{s}$) oraz obecności soli (200 mM NaCl) [181 - 182]. Natomiast zmniejszenie zawartości tej formy glutationu może być spowodowane obecnością soli metali przejściowych (np. CuCl_2 , Fe^{3+} -EDTA), biorących udział w reakcji Fentona:



Powstające w ten sposób rodniki OH^\bullet biorą następnie udział w reakcjach z glutationem, powodując zmianę jego stopnia utlenienia [184]. Przykładowo, po ekspozycji wyżpina jagodowego (*Silene cucubalus*) na działanie 20 μM CuSO_4 zaobserwowano spadek zawartości zredukowanej formy glutationu (GSH) w komórkach jego korzenia z 4,7 do 1,9 $\mu\text{mol/g s.m.}$, natomiast poziom GSSG wzrósł z 0,17 do 0,26 $\mu\text{moli/g s.m.}$ [185].

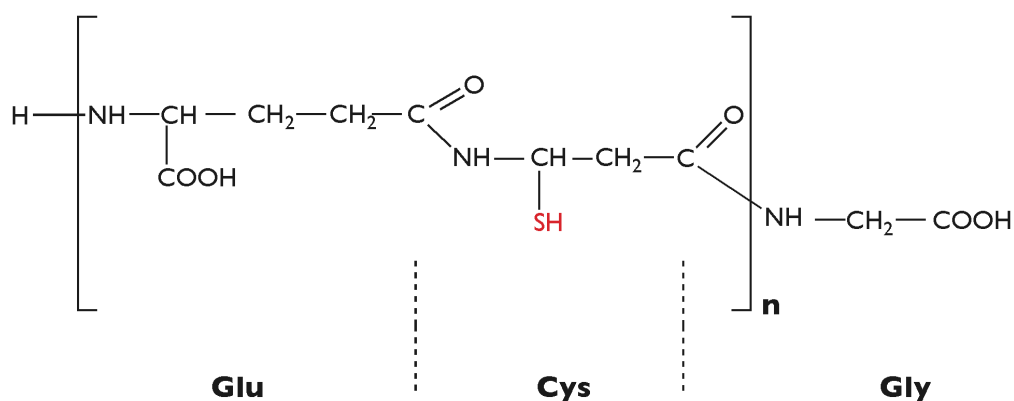
Ograniczenie dostępu rośliny do składników odżywczych może mieć także znaczący wpływ na obniżenie poziomu glutationu w komórkach, ponieważ w jego syntezie wykorzystywane są takie pierwiastki jak węgiel, azot czy siarka. Szczególnie deficyt siarki w tkankach roślinnych powoduje zmniejszenie zawartości glutationu, zarówno w korzeniach, jak i liściach, ponieważ pierwiastek ten jest niezbędny do syntezy cysteiny, aminokwasu

wchodzącego w skład glutationu. Oznacza to, że roślina, której brak podstawowych składników odżywczych, staje się bardziej wrażliwa na szkodliwe działanie metali ciężkich, zarówno z powodu obniżonej zawartości glutationu, jak i fitochelatyn, w syntezie których glutation jest substratem.

Ochronne działanie glutationu może być wykorzystane przez komórki roślinne na dwa sposoby. Zdolność wiązania jonów metali ciężkich przez glutation przyczynia się do zmniejszenia ich szkodliwego wpływu na funkcjonowanie komórek. Ponadto glutation bierze udział w neutralizacji reaktywnych form tlenu, powstających w reakcji Fentona przy udziale jonów metali przejściowych.

I. 3. 2 Fitochelatyny

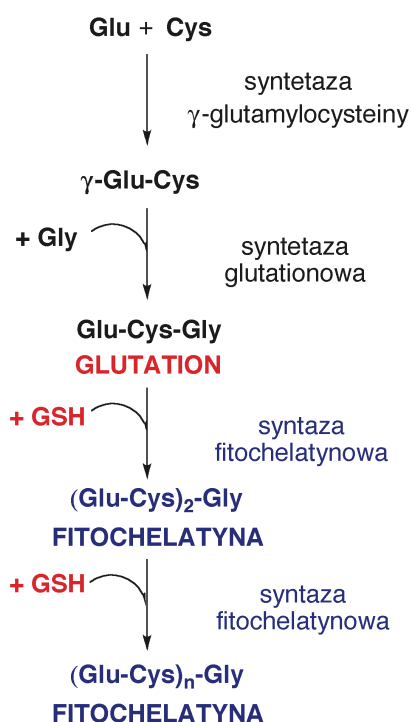
Fitochelatyny (PC, ang. *phytochelatyn*) to małowczątkowe polipeptydy o ogólnej strukturze: $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{Gly}$, gdzie $n = 2 - 11$, zdolne do wiązania metali ciężkich przez grupy sulfidowe reszt cysteinyłowych (rys. 19). Związki te mogą zawierać także inne niż glicyna C - końcowe aminokwasy, np. $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-}\beta\text{-Ala}$, $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Ser}$, $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Glu}$ lub być pozbawione końcowego aminokwasu, tworząc wtedy tzw. izo-fitochelatyny [186]. Geny kodujące enzym odpowiedzialny za syntezę fitochelatyn zidentyfikowano w wielu gatunkach roślin, ale także i w niektórych mikroorganizmach (np. grzyby *Schizosaccharomyces pombe*), nicieniach (np. *Caenorhabditis elegans*) oraz algach (np. okrzemka morska *Thalassiosira weissflogii*) [189, 198]. W roślinach kapustowatych zawartość fitochelatyn może sięgać od 20 do 400 nmoli/g ś. m. [187, 188].



Rysunek 19. Wzór chemiczny fitochelatyn, gdzie $n = 2 - 11$

Za biosyntezę fitochelatyn (rys. 20) odpowiedzialny jest enzym, γ -glutamylcysteinyllo transferaza glutationowa (E.C. 2.3.2.15), przy czym zazwyczaj używana jest krótsza nazwa - syntaza fitochelatynowa. Katalizuje ona przeniesienie reszty glutationu ($\gamma\text{-Glu-Cys}$) na inną cząsteczkę glutationu w reakcji transpeptyzacji, tworząc fitochelatynę składającą się z dwóch

podjednostek (oznacza to, że w pierwszym cyklu syntezy $n=2$) lub do dłuższego łańcucha peptydowego fitochelatyny przyczyniając się do wydłużenia oligomeru o kolejną podjednostkę ($n+1$) [189]. Zaobserwowano, że opisana reakcja jest aktywowana obecnością metali ciężkich, takich jak Cd, Pb, Zn, Ag, Hg, As, Cu, chociaż ekspresja genu syntazy fitochelatynowej zachodzi konstytutywnie i jest niezależna od obecności metali [178, 190]. Wyniki badań wykazują, że synteza fitochelatyn rozpoczyna się już po kilku minutach od ekspozycji komórek roślinnych na kadm [189].



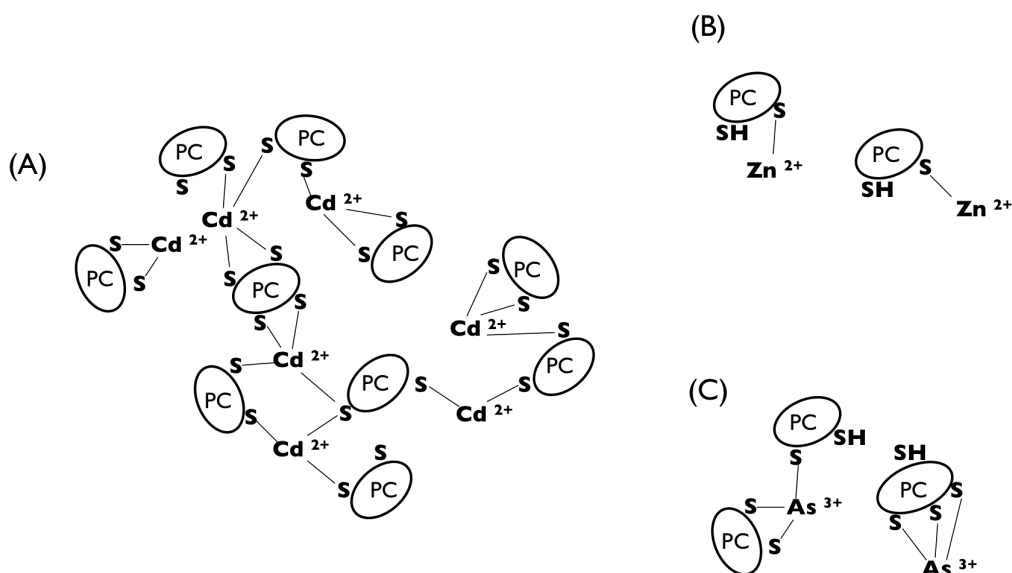
Rysunek 20. Schemat syntezy fitochelatyn [191]

Uważa się, że fitochelatyny u roślin wrażliwych biorą udział w detoksykacji jonów metali ciężkich podczas krótkiej ekspozycji na ich wysokie stężenia [192, 193]. Natomiast u roślin o wysokim poziomie tolerancji, pomimo obserwowanej indukcji syntezy fitochelatyn wywołanej obecnością metali ciężkich, rola fitochelatyn w ich neutralizacji zdaje się mieć mniejsze znaczenie dla odporności [194]. W tym przypadku wydaje się przeważać inne działanie, tzn. udział tych oligopeptydów w homeostazie niezbędnych metali oraz w metabolizmie żelaza i siarki [189].

Po związaniu metalu przez fitochelatyny powstają oligomeryczne struktury, w których jony metali są kompleksowane i w tej postaci transportowane z cytozolu do wakuoli. W protoplastach komórek tytoniu wystawionego na działanie kadmu stwierdzono obecność fitochelatyn i kadmu właśnie w wakuolach [195]. Transport kompleksów jonów metali ciężkich z fitochelatynami z poszczególnych organelli komórkowych do wakuoli możliwy jest m.in.

dzięki białkom opiekuńczym (chaperonom). Przykładem jest białko HMT1 zlokalizowane w błonie wakuoli, które przy współdziałaniu ATP w obecności jonów Mg^{2+} pośredniczy w przenoszeniu do wakuoli kompleksów fitochelatyn z kadmem, a więc także zapewne z innymi metalami, oraz apofitochelatyn pozbawionych jonów metali [196].

W badaniach w warunkach *in vitro* udało się uzyskać kompleksy fitochelatyn z jonami takich metali jak Ag, As, Cd, Cu, Hg i Pb. Jednak w trakcie badań *in vivo* dowiedziono, że tworzą się tylko kompleksy z jonami Cd, Ag, Zn oraz Cu. Proponowane oligomeryczne struktury kompleksów fitochelatyn z różnymi metalami przedstawiono na rysunku 21. Podczas wiązania jonów kadmu powstają duże amorficzne oligomery PC - Cd^{2+} , jony Zn^{2+} tworzą pojedyncze struktury, natomiast struktury PC - As^{3+} są najbardziej stabilne w trójściennym układzie [190].



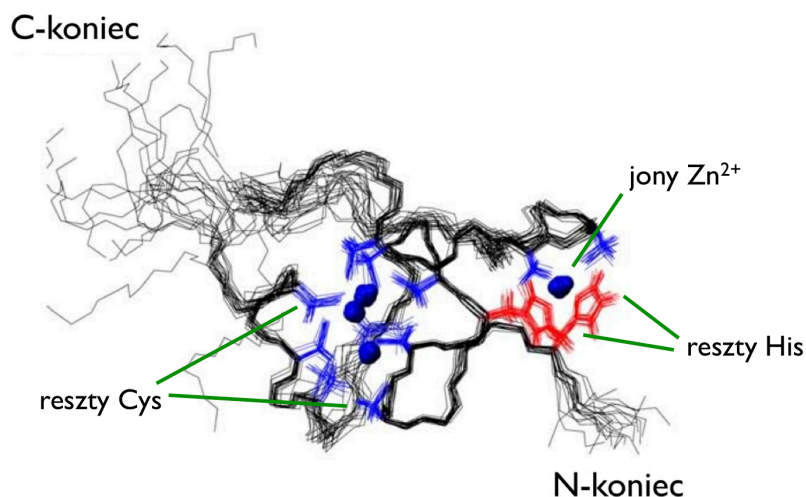
Rysunek 21. Schematyczne przedstawienie struktur fitochelatyn z jonami kadmu (A), cynku (B) i arsenu (C) [190]

I. 3. 3 Metalotioneiny

Metalotioneiny (MT, ang. *metallothionein*) to małowcząsteczkowe białka (6 - 10 kDa) wykazujące wysoką zdolność do wiązania metali. Związki te występują zarówno w organizmach zwierzęcych, jak i roślinnych. Ich główną rolą w przypadku roślin jest zapewnienie odporności na nadmiar biologicznie aktywnych metali, np. miedzi, ale także ochrona przed szkodliwym działaniem toksycznych metali [197, 198]. Metalotioneiny charakteryzują się wysoką zawartością aminokwasów siarkowych, na poziomie nawet 30%. To właśnie reszty cysteiny, ze względu na ugrupowanie sulfidowe są istotne w procesie wiązania

metali. W odróżnieniu od fitochelatyn, których obecność w roślinach uzależniona jest od aktywności odpowiednich enzymów, synteza metalotionein jest uwarunkowana genetycznie.

Ogólną strukturę roślinnych metalotionein tworzą dwie domeny (A i B) sprzężone dimerem lizynowym (rys. 22), które razem są zdolne do związania od 7 do 11 dwuwartościowych jonów metali [199]. Struktura tych makromolekuł jest stabilizowana przez jony cynku, dlatego pierwiastek ten jest niezbędny, zarówno w procesie ich biosyntezy, jak i w dalszym prawidłowym funkcjonowaniu [200].



Rysunek 22. Struktura metalotioneiny wyizolowanej z nasion pszenicy [201]

Można wyróżnić cztery rodzaje roślinnych metalotionein, podstawą ich klasyfikacji jest położenie i liczba reszt cysteinyłowych w łańcuchu polipeptydowym (tabela 8). Ponadto struktury przypisane do jednej klasy tych makromolekuł mogą być odmienne w różnych roślinach. Przykładowo metalotioneiny klasy I oraz II występujące w poszczególnych gatunkach, mogą zawierać dodatkowe reszty cysteiny lub cechować się krótszymi odstępami między domenami. Obecność genów kodujących wszystkie cztery typy metalotionein stwierdzono w wielu roślinach, m.in. w ryżu, trzcinie cukrowej oraz licznych odmianach rzodkiewnika [189, 198].

W przypadku rzodkiewnika, który jest najszerzej przebadaną rośliną pod tym względem, metalotioneiny klasy I i II kodowane są przez rodziny genów, odpowiednio *MT1a*, *MT1b*, *MT1c* oraz *MT2a*, *MT2b*. Poszczególne warianty genów mogą odmiennie reagować na obecność metali w środowisku. I tak, pod wpływem obecności jonów miedzi, w sadzonkach rzodkiewnika zachodzi ekspresja genów *MT1a*, a w liściach *MT2a* i *MT2b*. Natomiast ekspresja *MT1c* zachodzi zarówno w nasionach, dojrzałych liściach, jak i korzeniach, jednak nie dowiedziono wpływu jonów miedzi na ten proces [189, 202, 203]. Z kolei w przypadku ryżu

metalotioneiny klasy II są kodowane przez gen *OsMT2b*, którego ekspresja najsilniej zachodzi w zalążni oraz dojrzewających kłosach [204].

Tabela 8. Charakterystyka metalotionein występujących w komórkach roślinnych [189]

Klasa	Struktura	Liczba aminokwasów między domenami	Występowanie w roślinach
I	6 struktur Cys-X-Cys, gdzie X oznacza aminokwas inny niż cysteina	40 (w tym aromatyczne)	głównie w korzeniu
II	głównie Cys-Cys, na N-końcu jednej domeny znajduje się struktura Cys-Gly-Gly-Cys, C-koniec drugiej domeny zawiera strukturę Cys-X-Cys	40	głównie w częściach naziemnych
III	na N-końcu jednej domeny znajduje się struktura Cys-Gly-Asn-Cys-Asp-Cys oraz Gln-Cys-X-Lys-Lys-Gly; C-koniec drugiej domeny tworzą struktury Cys-X-Cys	40	dojrzałe owoce (banany, kiwi, jabłka), rzodkiewnik
IV	3 domeny zawierające struktury Cys-X-Cys	10-15	kiełkujące nasiona roślin

Jak wspomniano, metalotioneiny wykazują duże powinowactwo do metali, zarówno tych niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania komórek (Cu, Zn), jak i tych toksycznych. Metale szkodliwe (Cd, Hg, Pb) są silniej wiązane, co może mieć związek z bardziej efektywnym usuwaniem zagrożenia ze środowiska komórki i jej ochroną [205]. Natomiast niezbędne metale są słabiej związane z metalotioneinami, prawdopodobnie dlatego, by mogły być elastyczniej wykorzystywane w razie potrzeby w procesach komórkowych. Białka te mogą funkcjonować jako donory jonów metali (np. Zn^{2+}) dla enzymów i innych metalozależnych białek wiążących się z DNA. W związku z tym metalotioneiny pośrednio wpływają na regulację ekspresji genów i przez to na metabolizm komórki [199, 203]. W zależności od stadium rozwoju rośliny, intensywność ekspresji genów odpowiedzialnych za syntezę metalotionein może się zmieniać. W więdnących liściach znacznie wzrasta poziom

metalotionein klasy I, zwłaszcza w takich roślinach jak rzepak, rzodkiewnik i ryż. Prawdopodobną przyczyną tego zjawiska jest konieczność chelatowania jonów miedzi, które mogłyby wywołać uszkodzenia oksydacyjne i zakłócać proces więdnienia liści [189]. Synteza metalotionein, która jest indukowana obecnością metali ciężkich, ograniczeniem dostępności składników odżywczych, szokiem termicznym oraz stresem oksydacyjnym stanowi też odpowiedź roślin na czynniki stresowe.

Zdolność roślin do akumulacji metali ciężkich, wynikająca m.in. z obecności metalotionein, może być spotęgowana na skutek genetycznych modyfikacji. Takie podejście było testowane w celu zwiększenia wydajności procesu fitoekstrakcji. Przykładem może być eksperyment, w którym wykorzystano sadzonki tytoniu z wbudowanym genem odpowiedzialnym za syntezę metalotionein wyizolowanym z drożdży [206]. Rekombinantowe sadzonki uprawiano przez 3 miesiące w wazonach zawierających glebę zanieczyszczoną kadmem (5,4 mg Cd/kg gleby), a następnie poddano analizom. Zawartość kadmu oznaczona w częściach nadziemnych zmodyfikowanych sadzonek była o 60 % większa w porównaniu do kontrolnych roślin niemodyfikowanych i wynosiła odpowiednio 74,7 mg oraz 46,8 Cd/kg s.m. Ponadto symptomy toksycznego działania kadmu obserwowane w naturalnych odmianach tytoniu nie występowały w przypadku odmian modyfikowanych. Podobne podejście zastosowano podczas doświadczenia z modyfikowanymi sadzonkami topoli z wbudowanym genem *PsMTA1* wyizolowanym z groszku, odpowiadającym za syntezę metalotionein klasy II. Sadzonki hodowano przez 6 dni w medium z dodatkiem ZnSO₄ (1 mM) lub CuCl₂ (0,1 mM). Po zakończeniu hodowli, oznaczona zawartość miedzi w próbkach liści linii modyfikowanej była prawie 4 razy większa w porównaniu do liści linii niemodyfikowanej, odpowiednio 312,9 i 80,4 mg/kg s.m. Zawartość cynku w liściach sadzonek z dodatkowym genem także wzrosła, lecz tylko o 30 % w porównaniu do niemodyfikowanych sadzonek (1165,9 i 888,7 mg/kg s.m.) [207].

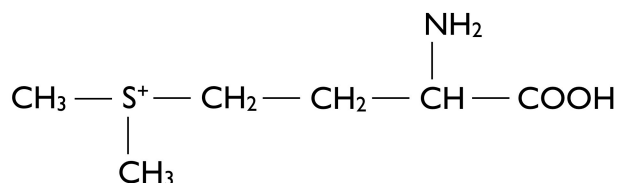
Na podstawie przytoczonych przykładów można wnioskować o znaczącej roli metalotionein w zapewnieniu roślinnej tolerancji na działanie metali ciężkich i możliwości jej kontrolowania z poziomu ekspresji tych niewielkich białek. Szczególnie, że w przypadku zwiększenia efektywności procesu fitoekstrakcji, genetyczna modyfikacja roślin nie budzi takich kontrowersji, jak ma to miejsce w produkcji żywności GMO.

I. 4 Pozostałe biologicznie aktywne związki fitokompleksu roślin kapustowatych

I. 4. 1 S-metylometionina

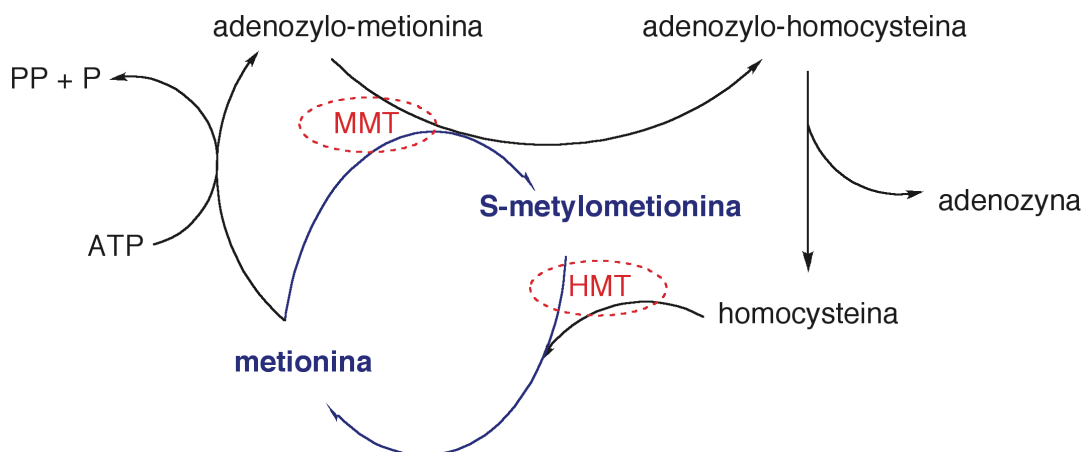
S-metylometionina (rys. 23) została zidentyfikowana po raz pierwszy w 1954 roku przez McRorie'a w soku z kapusty [208]. Obecnie wiadomo, że związek ten może występować

we wszystkich częściach roślin okrytonasiennych w różnych ilościach, od 0,5 do 3 $\mu\text{mol/g}$ s.m. [209], choć w roślinach kapustowatych jego zawartość może sięgać nawet 3,4 mg/g s.m., jak to pokazano w przypadku kapusty chińskiej [210].



Rysunek 23. Wzór strukturalny S-metylometioniny

S-metylometionina (S-meMet) jest syntetyzowana przez przyłączenie do metioniny grupy metylowej z S-adenozylometioniny w reakcji katalizowanej przez S-metylotransferazę homocysteinową (rys. 24). Funkcje S-meMet nie są do końca poznane, jednak uważa się, że związek ten bierze udział w regulacji biosyntezy metioniny [209, 211]. Uczestniczy także w reakcjach metylacji jako źródło grup metylowych. W pośredni sposób S-meMet może wpływać na aktywność enzymatyczną metylotransferaz, których inhibitorem jest adenozylohomocysteina powstająca w cyklu Met - S-meMet [212].



Rysunek 24. Cykl reakcji z udziałem S-metylometioniny [212]

Homocysteina jest metylowana w reakcji katalizowanej przez S-metylotransferazę homocysteinową (HMT, EC 2.1.1.10). Powstała w ten sposób metionina jest następnie metylowana do S-meMet przy udziale S-metylotransferazy metioninowej (MMT, EC 2.1.1.12) i grupy metylowej pochodzącej z adenozylo-metioniny

Ponadto S-metylometionina może być zarówno substratem, jak i inhibitorem reakcji katalizowanych przez syntetazę 1-aminocyklopropano-1-karboksylazy (ACC), enzymu biorącego udział w syntezie etenu, hormonu odpowiedzialnego za dojrzewanie owoców. Zarówno S-meMet, jak i S-adenozyl-L-metionina (SAM) mają podobną strukturę chemiczną,

dlatego mogą być substratami w reakcji katalizowanej przez syntetazę ACC, jednak z odmiennym skutkiem. W wyniku reakcji z SAM powstaje ACC, prekursor etenu. Natomiast, gdy w reakcji bierze udział S-meMet, możliwymi produktami są pochodne kwasu 2-aminobut-3-enowego, przekształcane następnie do 2-oksobutanu, amoniaku oraz dimetylosulfidów. Poprzez tą reakcję regulowana może być aktywność enzymatyczna syntetazy ACC, a zatem poziom S-meMet może mieć pośredni wpływ na tempo dojrzewania owoców [213, 214].

Wykazano, że S-meMet może także wspierać mechanizmy ochronne roślin uruchamiane na skutek działania czynników stresowych, takich jak niska lub wysoka temperatura czy deficyt wody w środowisku. W doświadczeniu z wykorzystaniem sadzonek grochu pochodzących z kontrolowanej uprawy wykazano, że dodatek S-meMet do medium odżywczego (0,1 g/L) spowodował znaczący wzrost poziomu niektórych poliamin, m.in. agmatyny i putrescyny, chroniących roślinę przed działaniem różnych czynników stresowych [215]. Efekt ochronny poliamin przypisuje się między innymi ich stabilizującemu działaniu względem lipidów błon cytoplazmatycznych, zdolności do neutralizowania reaktywnych form tlenu oraz pośredniego regulowania aktywności niektórych enzymów, np. dysmutazy ponadtlenkowej [216, 217]. W podobnym doświadczeniu, w którym 14-dniowe sadzonki grochu wystawiano na działanie niskiej temperatury (3°C przez 24 h), zaobserwowano mniejsze uszkodzenia ścian komórkowych oraz o ok. 20 % mniejszy wyciek elektrolitów w próbkach roślin uprawianych z dodatkiem S-meMet (0,1 g/L) w porównaniu do tych samych parametrów oznaczonych dla nietraktowanych próbek grochu. Niektóre gatunki roślin, np. spartyna (*Spartina alterniflora*, ozdobny gatunek trawy z rodziny wiechlinowatych) wykorzystują S-meMet jako prekursor w syntezie 3-dimetylosulfanylopropionianu, związku z grupy betain o działaniu osmoprotekcyjnym, pomagającym utrzymać prawidłowe ciśnienie w komórce [218].

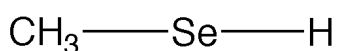
S-metylometionina znalazła także zastosowanie w medycynie i znana jest jako witamina U (od łac. *ulcus* - wrzód). Jest wykorzystywana głównie w leczeniu choroby wrzodowej żołądka, czyli ubytków błony śluzowej, któremu towarzyszy naciek zapalny lub martwica [219]. Najczęstszą przyczyną powstawania wrzodów jest zakażenie bakterią *Helicobacter pylori*, która uszkadza śluzówkę przewodu pokarmowego. Bakteria ta wytwarza ureazę, enzym rozkładający mocznik do amoniaku i ditlenku węgla, co powoduje neutralizację kwasu solnego w żołądku i wzrost kwasowości środowiska z pH 2 - 4 do wartości neutralnej, umożliwiając tym samym dalszy rozwój bakterii. Zaobserwowano, że farmakologicznemu leczeniu choroby wrzodowej sprzyja dieta bogata w warzywa kapustowate, zapewne ze

względu na dużą zawartość S-meMet, która jest inhibitorem ureazy i uniemożliwia namnażanie *H. pylori*. Dzięki temu działaniu u pacjentów z chorobą wrzodową poddawanych leczeniu z wykorzystaniem witaminy U stwierdzono zmniejszony ból, złagodzenie dolegliwości oraz skrócony czas leczenia wrzodów [220]. Ponadto wyniki badań wskazują na możliwe właściwości przeciwzapalne tego związku oraz działanie przyspieszające gojenie się ran i regenerację naskórka [210]. S-meMet może także regulować aktywność komórek tłuszczowych, tzw. adipocytów, odpowiedzialnych za magazynowanie energii w postaci triacylogliceroli [221]. Związek ten ogranicza powstawanie tych komórek poprzez zmniejszenie wpływu czynników promujących proces różnicowania preadipocytów, np. γ -receptorów aktywowanych przez proliferatory peroksysomów (γ -PPAR); oraz poprzez zwiększenie aktywności kinazy białkowej aktywowanej przez adenozyno-5'-monofosforan (AMP), która bierze udział w metabolizmie triacylogliceroli [222].

Wielokierunkowe działanie S-meMet wskazuje na ogromny potencjał tego związku i możliwości jego wykorzystania w medycynie.

I. 4. 2 Metyloselenol

Rośliny kapustowate, ze względu na opisaną wcześniej możliwość pobierania i akumulacji metali ze środowiska, mogą charakteryzować się także podwyższonym poziomem selenu. Pierwiastek ten jest pobierany najczęściej w formie nieorganicznej, a następnie może być przekształcony przez roślinę w formy organiczne, np. selenowe odpowiedniki aminokwasów, w tym głównie Se-Met, lub może być dalej metabolizowany do innych form organicznych. Jedną z możliwych pochodnych o interesujących właściwościach jest metyloselenol (rys. 25). Związek ten może powstać w wyniku samorzutnej metylacji selenków metali z udziałem S-adenozylometioniny lub innych donorów grup metylowych [223]. Metyloselenol może być także produktem reakcji redukcji kwasu metyloselenowego [224] lub degradacji metyloselenocysteiny z udziałem β -liazy [225]. Metyloselenol jest pierwszym w kolejności metabolitem powstającym po metylacji selenków, który następnie może zostać przekształcony do innych selenowych metabolitów, di- lub tri-metyloselenków, lotnych związków uwalnianych przez rośliny do atmosfery [226, 227].



Rysunek 25. Struktura metyloselenolu

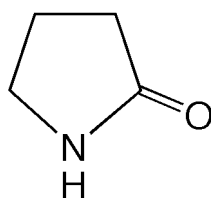
Podobnie jak wcześniej omawiana S-metylometyonina, także metyloselenol ma potencjalnie zastosowanie w medycynie. Związek ten jest jedną z kluczowych pochodnych selenowych wykazujących właściwości chemoprewencyjne i sugeruje się jego wykorzystanie w profilaktyce i terapii przeciwnowotworowej [223, 225, 228]. Opisano działanie tego związku polegające na indukcji apoptozy komórek nowotworowych zależnej od kaspaz, enzymów przyspieszających dezintegrację komórek [229]. Metyloselenol wpływa także na właściwości samych komórek nowotworowych poprzez inhibicję syntezy integryn, białek adhezyjnych umożliwiających agregację i ukierunkowaną migrację komórek [230, 231].

Mimo, że dotychczas przeprowadzone badania nad możliwością wykorzystania metyloselenolu w terapii przeciwnowotworowej dają obiecujące efekty, co przekłada się na wzrost zainteresowania tym związkiem, to jednak w literaturze mało jest informacji na temat jego naturalnych funkcji czy występowania w roślinach. Dodatkowa wiedza umożliwiłaby szersze wykorzystanie metyloselenolu, np. w produkcji suplementów diety skierowanych do grupy ludzi o podwyższonym ryzyku choroby nowotworowej.

I. 4. 3 Butyrolaktam (2-pirolidon)

Związkiem o potencjalnym działaniu biologicznym, który ostatnio zidentyfikowano w liściach kapusty, jest laktam kwasu γ -aminobutanowego (rys. 26) o zwyczajowej nazwie 2-pirolidon [232]. Frakcja wyizolowana z materiału roślinnego zawierająca ten związek wykazuje działanie przeciwutleniające, udowodniono także jej właściwości cytotoksyczne wobec komórek nowotworowych. Wyznaczone w doświadczeniach *in vitro* z wykorzystaniem ludzkich komórek nowotworowych linii HeLa (nowotwór szyjki macicy) oraz linii PC-3 (nowotwór prostaty) stężenie powodujące 50%-owe zahamowanie wzrostu komórek (IC_{50}) wynosiło dla 2-pirolidonu po 24 h inkubacji 29 - 35 μM [232]. Dla porównania, w przytoczonych wcześniej badaniach wskaźnik IC_{50} przy tej samej długości ekspozycji ludzkich komórek raka piersi estrogeno-zależnej linii MDA-MB-231 na I3C określono na poziomie 51,5 μM [153].

Pochodne 2-pirolidonu są wykorzystywane w przemyśle farmaceutycznym (np. piracetam) jako substancje wspomagające przemiany energetyczne w komórkach ośrodkowego układu nerwowego, co wiąże się z usprawnieniem zapamiętywania i przypominania, koncentracji uwagi oraz poprawą sprawności psychofizycznej. Czy frakcja wyizolowana z liści kapusty też może mieć podobne działanie nie jest na obecnym etapie zbadane.



Rysunek 26. Struktura 2-pirolidonu

Podsumowanie

Na podstawie przedstawionego przeglądu literatury można stwierdzić, że rodzina roślin kapustowatych stanowi wyjątkowo interesującą grupę ze względu na bogaty fitokompleks, w skład którego wchodzi zarówno związki fenolowe, karotenoidy, fitosterole, jak i bardziej charakterystyczne glukozynolany oraz produkty ich enzymatycznej degradacji, związki odpowiedzialne za pobieranie i akumulację metali, a także S-metylometyonina, metyloselenol i 2-pirolidon, nadające tym roślinom dodatkowe prozdrowotne właściwości.

W niniejszej pracy skupiono się głównie na procesie enzymatycznej degradacji glukozynolanów, katalizowanym przez mirozynazę. Spośród możliwych produktów tej reakcji, izotiocyjaniany oraz związki indolowe wykazują największą aktywność biologiczną. Właściwości te powodują, że wymienione związki są najbardziej pożądane zarówno z punktu widzenia skuteczności procesu biofumigacji, jak i chemoprewencji chorób cywilizacyjnych. Odpowiednie ukierunkowanie hydrolizy glukozynolanów tak, aby jako główne produkty uzyskać izotiocyjaniany i związki indolowe, może zwiększyć efektywność działania systemu „glukozynolany—mirozynaza” w obu dziedzinach. Sterowanie procesem hydrolizy byłoby możliwe po opracowaniu warunków selektywnej inaktywacji dodatkowych czynników białkowych, promujących powstawanie mniej aktywnych produktów, przy zachowaniu maksymalnej aktywności enzymatycznej mirozynazy.

O ile właściwości produktów degradacji glukozynolanów, głównie izotiocyjaniarów, są dobrze poznane i opisane w literaturze, to informacje na temat możliwości ukierunkowania tej reakcji są znikome. Zbadanie tych procesów było przedmiotem badań niniejszej pracy doktorskiej.

II. CEL I ZAKRES PRACY

Za właściwości roślin z rodziny *Brassicaceae* są odpowiedzialne przede wszystkim glukozynolany, a dokładniej produkty ich enzymatycznej degradacji. Spośród możliwych produktów izotiocyaniany oraz związki indolowe wykazują największą aktywność biologiczną. Substancje te są odpowiedzialne za skuteczność procesu biofumigacji, zabiegu agrotechnicznego chroniącego uprawy rolne przed atakami mikroorganizmów i agrofagów. Także te same związki wykazują wielokierunkowe działanie prozdrowotne na wielu poziomach funkcjonowania ludzkiego organizmu, przez co wykorzystywane są w profilaktyce nowotworów oraz innych dietozależnych chorób przewlekłych.

Wysoka zawartość glukozynolanów w roślinach nie musi przekładać się na porównywalną zawartość bioaktywnych produktów ich hydrolizy. W tkankach roślinnych oprócz enzymu mirozynazy, występują także dodatkowe czynniki białkowe: białko epitiospecyficzne i nitrylospecyficzne oraz białko tworzące tiocyaniany, które promują powstawanie niepożądanych produktów, takich jak epitionitryle, nitryle i tiocyaniany. Odpowiednie ukierunkowanie hydrolizy glukozynolanów tak, aby jako główne produkty uzyskać izotiocyaniany i związki indolowe, mogłoby zwiększyć efektywność działania systemu „glukozynolany—mirozynaza”. Sterowanie procesem enzymatycznej degradacji jest nowym zagadnieniem, dotychczas nie opisywanym w literaturze. W niniejszej pracy podjęto próbę opracowania warunków ukierunkowania tego procesu poprzez selektywną inaktywację dodatkowych czynników białkowych promujących powstawanie mniej aktywnych produktów. W tym celu wykorzystano metody fizyko-chemiczne o potencjalnym przemysłowym zastosowaniu.

Celem pracy było sprawdzenie potencjału biofumigacyjnego kapusty białej oraz określenie warunków możliwiających ukierunkowanie hydrolizy glukozynolanów, które pozwalałyby na zachowanie maksymalnej aktywności mirozynazy przy jednoczesnej inaktywacji dodatkowych czynników białkowych.

Postawiony cel rozprawy doktorskiej realizowano poprzez wykonanie następujących zadań:

- dopracowanie metod badawczych wykorzystywanych przy ocenie surowców roślinnych:
 - optymalizacja warunków oznaczania aktywności enzymatycznej mirozynazy za pomocą metody pH-statycznej i spektrofotometrycznej;
 - znalezienie sposobu określania aktywności dodatkowych czynników białkowych w materiale roślinnym;

- określenie wpływu stresu chemicznego (warunki uprawy, stosowane zabiegi agrotechniczne, obecność metali ciężkich) na ilość glukozynolanów oraz stopień ich konwersji do izotiocyjanianów i związków indolowych, a tym samym na aktywność dodatkowych czynników białkowych, w próbkach roślin kapustowatych;
- określenie potencjału biofumigacyjnego różnych części roślin kapustowatych (części jadalne, korzenie, liście, łodygi) oraz próbek zebranych podczas różnych faz rozwoju rośliny (nasiona, kiełki, tkanki dojrzałe) pod kątem wykorzystania ich w procesie ochrony roślin;
- próby ukierunkowania procesu hydrolizy glukozynolanów poprzez selektywną inaktywację dodatkowych czynników białkowych:
 - określenie wrażliwości mirozynyzy w formie handlowego preparatu enzymatycznego na działanie czynników fizycznych takich jak, podwyższona i niska temperatura, promieniowanie mikrofalowe o różnej mocy, wysokie ciśnienie;
 - zastosowanie wybranych parametrów fizycznych wobec próbek roślinnych (liście kapusty, kiełki wybranych roślin, próbki w formie liofilizatu, świeżych tkanek, soku);
- weryfikacja potencjału biofumigacyjnego soków z kapusty oraz skuteczności metod jego zwiększania poprzez określenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej soków wobec typowych patogenów roślinnych (*Botrytis cinerea*, *Pectobacterium carotovorum*)

Wyniki uzyskane podczas realizacji powyższych zadań pozwoliły poszerzyć wiedzę na temat właściwości mirozynyzy oraz dostarczyły informacji dotyczących możliwości włączenia procesu zwiększającego stopień konwersji glukozynolanów do izotiocyjanianów podczas produkcji biopreparatu do ochrony roślin na drodze biofumigacji. Uzyskanie takiego biopreparatu było celem projektu „Wykorzystanie kapusty białej na potrzeby fitoremediacji i biofumigacji gleby (AGROBIOKAP)“ współfinansowanego przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego.

III. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

III. 1 Aparatura i odczynniki

III. 1 .1 Aparatura

- autoklaw Systec VX-75, *De Ville Biotechnology*
- chromatograf cieczowy 1200 series wyposażony w detektor z matrycą fotodiodową DAD 1200 series oraz detektor fluorymetryczny FLD 1260 Infinity, *Agilent Technology*
- cieplarka laboratoryjna FED 53, *Binder*
- homogenizator SilentCrusher M, *Heidolph*
- liofilizator Alpha 1-4 LD plus, Alpha 2-4 LSC, *Christ*
- łaźnia wodna GD100, *Grant*
- kuchenka mikrofalowa MW71E, *Samsung*
- mieszadło magnetyczne z funkcją grzania MSC basic C, *IKA Works Inc.*
- spektrofotometr UV-Vis, NanoDrop 2000/2000c, *Thermo Scientific*
- spektrometr mas model 6130, *Agilent Technology*
- termoblok QBD4, *Grant*
- titrator T70 z elektrodą DG102i Mini, *Mettler Toledo*
- urządzenie do wytwarzania wysokich ciśnień na wyposażeniu Katedry Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności
- waga analityczna XS 204, *Mettler Toledo*
- wirówka Megafuge 16R, *Thermo Scientific*
- wirówka 5415R, *Eppendorf*
- wytrząsarka powietrzna 4518, *Scientific Inc.*

III. 1 .2 Odczynniki

- 1,2-benzenoditiol, *Sigma-Aldrich*
- β -tioglukozydaza (mirozynaza) z *Sinapis alba*, aktywność > 100 U/g s.m, *Sigma Aldrich*
- acetonitryl (czystość gradientowa do chromatografii cieczowej), *Sigma-Aldrich*
- agar, *Merck*
- desulfoglukozynolany (glukoiberyna, progoitryna, glukorafanina, epiprogoitryna, sinalbina, glukonapina, glukoerucyna, glukobrassycyna, glukonasturcyna, 4-hydroksyglukobrassycyna, metoksyglukobrassycyna, neoglukobrassycyna), otrzymane dzięki uprzejmości R. Iori z Agricultural Research Council (CRA), Włochy
- diindolilometan, *Sigma-Aldrich*
- ekstrakt maltozowy, *Merck*

- glukotropeolina, *Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Radzikowie*
- glukoza, *Merck*
- imidazol, *Merck*
- indolo-3-acetonitryl, *Merck*
- indolo-3-karbinol, *Sigma-Aldrich*
- izopropanol, *Sigma-Aldrich*
- kwas indolo-3-octowy, *Merck*
- kwas mrówkowy 98%, *POCH S.A.*
- kwas octowy 98%, *POCH S.A.*
- metanol (czystość gradientowa do chromatografii cieczowej), *Sigma-Aldrich*
- NaCl, *Chempur*
- Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, K₂HPO₄, *Chempur*
- NaOH, *Chempur*
- pepton kazeinowy, *Merck*
- pepton sojowy, *Merck*
- sinigryna, *Sigma Aldrich*
- sulfataza z *Helix pomatia* typ H1 22400 U/g s.m., *Sigma-Aldrich*
- woda demineralizowana z urządzenia Millipore Q_{PLUS}185
- żywica jonowymienna DEAE Sephadex, *Sigma-Aldrich*

III. 2 Materiał badawczy

III. 2. 1 Próbki kapusty białej

Do badań wykorzystano próbki kapusty (*Brassica oleracea* var. *capitata*) odmiany Kamienna Głowa pochodzące z upraw polowych prowadzonych w roku 2012 zlokalizowanych w kilku miejscach w Polsce. Opis lokalizacji poszczególnych upraw umieszczono w tabeli 9. Ponadto wykorzystano także próbki kapusty białej odmiany Kamienna Głowa pochodzące z kontrolowanych upraw wazonowych prowadzonych w roku 2011 i 2012 w fitotronie na terenie Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie (tabela 10). Uprawy wazonowe prowadzono w następujących warunkach:

- temperatura: 18 - 25°C w ciągu dnia; 13 - 18°C w nocy,
- rodzaj gleby: czarna ziemia o kontrolowanym stężeniu Zn i Cd,
- nasłonecznienie: oświetlenie zbliżone do naturalnego, doświetlanie podczas pochmurnych dni oraz w celu wydłużenia okresu słonecznego do 12 - 14 godzin w ciągu doby,
- zabiegi agrotechniczne: regularne podlewanie.

Tabela 9. Charakterystyka miejsc upraw polowych kapusty

Lokalizacja	Rodzaj gleby	Nasłonecznienie	Zabiegi agrotechniczne	Atak szkodników	Czas uprawy
Czapielsk	czarna ziemia	silne nasłonecznienie przez cały dzień	ręczne odchwaszczanie i usuwanie szkodników, opryski preparatem ekologicznym Spintor lub chemicznym Karate	pchełka ziemna, bielinek kapustnik, bielinek rzepnik, ślimaki	zasadzenie – 05.2012; zbiór – 09.2012
Sosnowiec Maczki, Milowice, Siemonia	czarna ziemia	silne nasłonecznienie przez cały dzień	regularne podlewanie, odchwaszczanie, ręczne usuwanie szkodników	gąsienica bielinka, ślimaki	zasadzenie – 04.2012; zbiór – 08.2012
Strzelno	czarna ziemia	silne nasłonecznienie przez cały dzień	podlewanie naturalne, zależne od warunków atmosferycznych, nawożenie saletrą amonową	brak danych	zasadzenie – 05.2012; zbiór – 08.2012
Kraków Chełm	czarna ziemia, pył ilasty, dodatek EDDS i CA	silne nasłonecznienie przez cały dzień	regularne podlewanie, nawożenie, odchwaszczanie, ręczne usuwanie szkodników	gąsienica bielinka, ślimaki	zasadzenie – 05.2012; zbiór – 08.2012
Kraków Mydlniki	czarna ziemia	umiarkowane nasłonecznienie	ręczne odchwaszczanie i usuwanie szkodników, bez oprysków	pchełka ziemna, bielinek kapustnik, bielinek rzepnik, ślimaki	zasadzenie – 05.2012; zbiór – 08.2012

Zamrożone liście kapusty poddawano procesowi liofilizacji, następnie suche liście ucierano w młynku i przechowywano w temperaturze -20°C w szczelnych opakowaniach.

Tabela 10. Charakterystyka gleb wykorzystywanych w trakcie wazonowej uprawy kapusty

Rok uprawy	Oznaczenie gleby	Rodzaj skażenia gleby
2011	Kontrola	-
	Zn 1	50 mg Zn/kg s.m. gleby
	Zn 2	200 mg Zn/kg s.m. gleby
	Cd 1	10 mg Cd/kg s.m. gleby
	Cd 2	40 mg Cd/kg s.m. gleby
2012	Kontrola	-
	Zn 2'	200 Zn mg/kg s.m. gleby
	Cd 2'	40 Cd mg/kg s.m. gleby
	Zn + Cd	200 mg Zn + 40 mg Cd/kg s.m. gleby

Próbki kapusty uzyskano na potrzeby projektu „Wykorzystanie kapusty białej na potrzeby fitoremediacji i biofumigacji gleby (AGROBIOKAP)“ współfinansowanego przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego.

III. 2. 2 Inne próbki roślinne

W badaniach wykorzystano nasiona roślin kapustowatych zakupione w Przedsiębiorstwie Nasiennictwa Ogrodniczego i Szkółkarstwa (kapusta biała, brukselka, rzodkiew) lub firmie Green-Land Service (kapusta włoska). Kiełkowanie nasion prowadzono w pomieszczeniu z kontrolowaną temperaturą (25°C) oraz fotoperiodem (16 h światła). Nasiona umieszczono na talerzach kiełkownicy i podlewano wodą 2 razy dziennie (600 mL) przez 7 dni. Po tym czasie otrzymane kiełki poddano procesowi liofilizacji.

Dojrzałe warzywa pozyskano z pól uprawnych w Czapielsku (kapusta biała i włoska, brukselka) lub Gdańsku (rzodkiew). Rośliny podzielono na poszczególne części (korzenie, liście, łodygi, głąby, części jadalne), poddawano procesowi liofilizacji, ucierano w młynku i przechowywano w temperaturze -20°C w szczelnych opakowaniach.

III. 3 Opis stosowanych procedur

III. 3. 1 Procedury wykorzystywane podczas oznaczania aktywności enzymatycznej mirozynazy

III. 3. 1. 1 Oznaczanie aktywności mirozynazy w próbkach preparatu enzymatycznego z wykorzystaniem metody pH-statycznej

Do naczynia do miareczkowania dodano roztwór NaCl o stężeniu 80 mM i pH 6,5 w ilości 15 mL oraz 150 μ L roztworu glukozynolanu (SIN lub GTL) o stężeniu 0,01 - 0,5 M (stężenie końcowe 0,1 - 5 mM). Po ustabilizowaniu się warunków pomiarowych, dodawano 150 μ L wodnego roztworu handlowego preparatu mirozynazy o różnych stężeniach białka (0,5 - 13 mg białka/mL, stężenie końcowe 0,005 - 0,13 mg białka/mL). Pomiar aktywności enzymatycznej prowadzono przez 1 godzinę w temperaturze 37°C. Do oznaczeń zastosowano titrator T70 firmy Mettler Toledo z funkcją utrzymywania stałego pH oraz wstępnego miareczkowania.

Hydroliza glukozynolanów przez mirozynazę powoduje uwalnianie jonów H⁺ w ilościach stechiometrycznych i przez to spadek pH roztworu. Oznaczanie aktywności enzymu polega na pomiarze ilości NaOH zużytego podczas miareczkowania mieszaniny reakcyjnej w celu utrzymania stałego pH na poziomie 6,5, optymalnego dla działania mirozynazy. Aktywność mirozynazy obliczana jest na podstawie ilości zużytego roztworu NaOH (wzór 1) po uwzględnieniu tylko początkowego prostoliniowego odcinka krzywej miareczkowania, świadczącego o optymalnym przebiegu reakcji enzymatycznej.

$$A_{MYR} = 1000 \frac{V_{NaOH}}{V_{próbki} \cdot t \cdot C_{MYR}} \quad (1)$$

gdzie:

A_{MYR} – aktywność mirozynazy [U/g preparatu]

V_{NaOH} – objętość 1 mM NaOH zużytego podczas miareczkowania [μ L]

$V_{próbki}$ – objętość badanej próbki (150 μ L)

t – czas reakcji [min]

C_{MYR} – stężenie handlowego preparatu enzymatycznego [mg/mL]

Obliczona aktywność mirozynazy jest wyrażona w jednostkach [U/g s.m.], które oznaczają ilość μ moli substratu (glukozynolanu) zhydrolizowanego w ciągu 1 minuty przez enzym obecny w 1 g preparatu handlowego.

III. 3. 1. 2 Oznaczanie aktywności mirozynyzy w próbkach roślinnych z wykorzystaniem metody pH-statycznej

Materiał roślinny (0,5 g), liofilizat lub roztarte nasiona roślin kapustowatych, przenoszono do naczynia do miareczkowania i dodawano 15 mL roztworu NaCl o stężeniu 80 mM (pH 6,5). Następnie próbkę poddawano homogenizacji z wykorzystaniem homogenizatora Heidolph SilentCrusher M (6500 rpm, 5 min). W celu ochrony enzymu przed wzrostem temperatury podczas rozdrabniania, próbkę przechowywano w łaźni lodowej. Po ustabilizowaniu się warunków pomiarowych, świadczących o zakończeniu hydrolizy glukozynolanów oryginalnie znajdujących się w materiale roślinnym, pH mieszaniny reakcyjnej doprowadzano do poziomu 6,5. Następnie dodawano 150 μ L wodnego roztworu glukozynolanu (SIN lub GTL) o stężeniu 0,25 M (stężenie końcowe 2,5 mM). Pomiar aktywności enzymatycznej prowadzono przez 1 godzinę w temperaturze 37°C. Aktywność mirozynyzy w próbkach roślinnych obliczono korzystając ze wzoru 1 i wyrażono jako U/g suchej lub mokrej masy (odpowiednio w przypadku liofilizatu lub nasion).

Oznaczenia aktywności enzymatycznej mirozynyzy przeprowadzono również w próbkach świeżych liści kapusty oraz soku otrzymanego z liści. Pokrojone liście kapusty poddawano homogenizacji (6500 rpm, 15 min) z dodatkiem 8 mL roztworu NaCl o stężeniu 120 mM w celu uzyskania jednolitej zawiesiny. Z liści tej samej główki kapusty wyciśnięto sok za pomocą sokowirówki. W tym przypadku mieszanina reakcyjna zawierała 4 mL soku oraz 8 mL roztworu NaCl o stężeniu 120 mM (końcowe stężenie NaCl wynosiło 80 mM, tak jak w przypadku oznaczeń z wykorzystaniem próbek liofilizatu). Następnie oznaczenia prowadzono według schematu opisanego w przypadku próbek liofilizatu i aktywność enzymatyczną mirozynyzy obliczono na podstawie wzoru 1.

III. 3. 1. 3 Oznaczanie aktywności mirozynyzy w próbkach preparatu enzymatycznego z wykorzystaniem metody spektrofotometrycznej

Do kuwety o długości ścieżki optycznej wynoszącej 1 cm dodawano roztwór NaCl o stężeniu 80 mM i pH 6,5 w ilości 1470 μ L oraz 15 μ L roztworu glukozynolanu (SIN lub GTL) o stężeniu 5 - 30 mM (stężenie końcowe 0,05 - 0,3 mM), wcześniej ogrzanych do temperatury 37°C. Po ustabilizowaniu się warunków reakcji, do mieszaniny dodawano roztwór handlowego preparatu mirozynyzy w ilości 15 μ L o różnych stężeniach białka (0,5 - 13 mg białka/mL, stężenie końcowe 0,005 - 0,013 mg białka/mL). Pomiar rozkładu glukozynolanów w wyniku reakcji enzymatycznej prowadzono w temperaturze 37°C przez 30 minut, mierząc absorbancję przy długości fali 230 nm co minutę za pomocą spektrofotometru NanoDrop. Aktywność mirozynyzy obliczano korzystając z prawa Lamberta-Beera na podstawie

prostoliniowych odcinków wykresów spadku absorbancji substratu w czasie hydrolizy (wzór 2).

$$A_{MYR} = \frac{1000V_A}{V_B} \cdot \frac{2(A_0 - A_t)}{\epsilon \cdot t} \quad (2)$$

gdzie:

A_{MYR} – aktywność mirozynyzy [U/g preparatu]

V_A – całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej [μL]

V_B – objętość badanej próbki [μL]

A_0 – absorbancja na początku reakcji

A_t – absorbancja po upływie czasu t

t – czas reakcji [min]

ϵ – molowy współczynnik ekstynkcji [$1/\text{mol} \cdot \text{cm}$], $\epsilon = 7500$ dla SIN, $\epsilon = 8770$ dla GTL

Obliczona aktywność mirozynyzy jest wyrażona w jednostkach [U/g s.m.], które oznaczają ilość μmoli substratu zhydrolizowanego w ciągu 1 minuty przez enzym obecny w 1 g preparatu handlowego.

III. 3. 1. 4 Oznaczanie aktywności mirozynyzy w próbkach roślinnych z wykorzystaniem metody spektrofotometrycznej

W celu przygotowania wodnych ekstraktów próbek roślinnych, 50 mg liofilizatu lub rozdrobnionych nasion mieszano z 1 mL wody, a następnie poddawano homogenizacji przy użyciu homogenizatora SilentCrusher M (6500 rpm, 5 min). Próbki odwirowano (13 000 rpm, 4°C, 5 min), a zebrany płyn oczyszczano z resztek osadu przepuszczając przez filtr strzykawkowy (Chromafil xtra MV-45/25 0.45 μm). Podczas oznaczania aktywności mirozynyzy w badanych próbkach, do 1470 μL 80 mM roztworu NaCl (pH 6,5) znajdującego się w kuwecie spektrofotometrycznej dodawano 15 μL 20 mM wodnego roztworu glukozynolanu (SIN lub GTL, stężenie końcowe 0,2 mM) oraz 15 μL ekstraktu roślinnego. Spadek absorbancji mieszaniny reakcyjnej mierzono co minutę przez 30 minut przy długości fali 230 nm. Aktywność mirozynyzy obecnej w próbkach roślinnych obliczano na podstawie wzoru 2 i wyrażono jako U/g suchej lub mokrej masy (odpowiednio w przypadku liofilizatu lub nasion).

III. 3. 2 Procedury stosowane w celu obliczenia stopnia konwersji glukozynolanów do izotiocyjanianów i związków indolowych

III. 3. 2. 1 Oznaczanie zawartości glukozynolanów w próbkach roślinnych [233]

Zawartość glukozynolanów oznaczono według procedury opisanej w normie PN-EN ISO 9167 – 1: 1999. W celu oznaczenia glukozynolanów przygotowano ekstrakty z liofilizatów roślinnych (0,2 g) z wykorzystaniem gorącego metanolu (3 mL 70% metanolu) inaktywującego mirozynazę. Następnie do próbek dodawano 0,2 mL 5 mM roztworu wzorca wewnętrznego (GTL) i odwirowano. Zebrano roztwór nad osadu, a do osadu ponownie dodano 3 mL gorącego 70% metanolu. Po ponownej ekstrakcji i wirowaniu, połączono zebrane roztwory nad osadu i uzupełniono je wodą redestylowaną do objętości 6 mL. Kolejnym etapem było przygotowanie odczynników do oczyszczania i desulfatacji glukozynolanów. Obejmowało to następujące czynności:

- sporządzenie wodnego roztworu mrówczanu imidazolu o stężeniu 6 M: 204 g imidazolu rozpuszczono w 113 mL kwasu mrówkowego i dopełniono wodą destylowaną do objętości 500 mL;
- przygotowanie wymiennicza jonowego (anionit): 10 g żelu DEAE Sephadex A25 wymieszano z kwasem octowym o stężeniu 2M tak, aby objętość roztworu przekroczyła dwukrotnie objętość osadu;
- sporządzenie roztworu sulfatazy: 25 mg preparatu sulfatazy zmieszano z 15 mL wody dejonizowanej.

W szklanych kolumienkach (pipety Pasteura o długości 230 mm) umieszczono watę szklaną i dodano 1,5 mL zawiesiny wymiennicza jonowego. Całość przemyto za pomocą roztworu mrówczanu imidazolu (1 mL) oraz wody (2 x 1 mL). Następnie наносono ekstrakty metanolowe z próbek kapusty i przemywano je małą ilością wody dejonizowanej (1 mL). Kolejnym krokiem było dodanie roztworu sulfatazy (0,2 mL) i inkubacja próbek przez 12 godzin w temperaturze pokojowej. Po tym czasie uzyskane desulfoglukozynolany były dwukrotnie eluowane ze złoża wymiennicza za pomocą wody dejonizowanej (2 x 0,75 mL), a eluaty zbierano do fiolek i poddawano analizie z wykorzystaniem układu HPLC-DAD-MS pracującego według programu przedstawionego w tabeli 11. Identyfikacja glukozynolanów była możliwa dzięki porównaniu czasów retencji rejestrowanych pików z czasami retencji substancji wzorcowych oraz na podstawie widm masowych poszczególnych związków. Podczas procedury ilościowego oznaczania glukozynolanów zastosowano metodę wzorca wewnętrznego (GTL) ponieważ nie stwierdzono występowania tego związku w próbkach badanych roślin. Zawartość każdego glukozynolanu, wyrażoną w jednostkach [$\mu\text{mol/g s.m.}$], obliczano korzystając z poniższego wzoru :

$$x = \frac{A_g}{A_s} \cdot \frac{n}{m} \cdot K_g \quad (3)$$

gdzie:

x – zawartość odpowiedniego glukozynolanu [$\mu\text{mol/g s.m.}$]

A_g – powierzchnia pików chromatograficznych odpowiadająca danemu analitowi

A_s – powierzchnia pików chromatograficznych odpowiadająca desulfoglukotropaeolinie

K_g – współczynnik korekcyjny desulfoglukozynolanu (wg normy)

n – ilość dodanego wzorca wewnętrznego [μmol]

m – masa próbki analitycznej [g]

Tabela 11. Podstawowe parametry toku postępowania analitycznego na etapie chromatograficznego oznaczania desulfoglukozynolanów w próbkach ekstraktów roślinnych

Parametr	Wartość
Objętość dozowanych próbek	30 μL
Skład fazy ruchomej	A - woda, B - 20% acetonitryl
Natężenie przepływu strumienia fazy ruchomej	1 mL/min
Gradient	Liniowy wzrost stężenia składnika B
Program elucji	0 min - 5% składnika B 10 min - 100% składnika B 25 min - 100% składnika B
Temperatura kolumny	30°C
Długość fali detekcji	229 nm
Kolumna	Grace Altima HP C18 AQ, 150 x 4,6 mm, 3 μm
Sposób jonizacji	ESI w trybie negatywnym i pozytywnym
Tryb pracy detektora MS	SCAN
Fragmentacja	120 V
Natężenie przepływu strumienia gazu suszącego	12 L/min
Ciśnienie gazu w rozpylaczu	35 psig
Temperatura gazu suszącego	350°C
Napięcie przyłączone do kapilary	3000 V

III. 3. 2. 2 Oznaczanie zawartości związków indolowych w próbkach roślinnych

Oznaczenie zawartości związków indolowych prowadzono przy użyciu procedury opracowanej przez mgr inż. Tadeusza Pilipczuka w ramach jego pracy doktorskiej. Na etapie uwalniania pochodnych indolowych z matrycy roślinnej wykorzystano proces ich ekstrakcji z liofilizatów roślinnych z wykorzystaniem 5 mL (0,01 M) sodowego buforu fosforanowego o pH 7,4 oraz z zastosowaniem 3-godzinnej inkubacji w temperaturze 37°C. Po inkubacji ekstrakty odwirowano (5000 rpm, 15 min, 4°C), płyn z nad osadu przenoszono do probówek typu eppendorf i ponownie wirowano (5000 rpm, 15 min, 4°C). Próbkę przygotowanych ekstraktów poddano analizie chromatograficznej z wykorzystaniem układu HPLC sprzężonego z detektorem DAD oraz detektorem fluorymetrycznym FLD pracującym według programu przedstawionego w tabeli 12. Dla każdej próbki sporządzono równoległe trzy ekstrakty. Identyfikacji analitów dokonywano na podstawie czasów retencji oraz widm UV, wykonanych dla wzorcowych, najważniejszych indolowych produktów rozpadu glukozynolanów: kwasu indolo-3-octowego (IAA), indolo-3-karbinolu (IKC), indolo-3-acetonitrylu (IAN) oraz diindolilometanu (DIM). Ilościowo zawartość pochodnych indolowych oznaczano korzystając z otrzymanych wcześniej równań prostych kalibracyjnych uzyskanych na podstawie analizy próbek roztworów wzorcowych.

Tabela 12. Podstawowe parametry toku postępowania analitycznego na etapie chromatograficznego oznaczania związków indolowych w próbkach ekstraktów roślinnych

Parametr	Wartość
Objętość dozowanych próbek	20 µL
Skład fazy ruchomej	A - 0,01% kwas mrówkowy B - acetonitryl
Natężenie przepływu strumienia fazy ruchomej	1 mL/min
Program elucji	0 min - 20% składnika B 15 min - 44% składnika B 22 min - 100% składnika B 25 min - 100% składnika B
Temperatura kolumny	30°C
Długość fali detekcji	detektor DAD 280 nm detektor FLD wzbudzenie 280 nm, emisja 360 nm
Rodzaj kolumny	Eclipse XDB C8, 150 x 4,6 mm, 3,5 µm

III. 3. 2. 3 Oznaczanie zawartości izotiocyjanianów w próbkach roślinnych

Podczas procedury oznaczania izotiocyjanianów w próbkach roślinnych wykorzystano reakcję cyklokondensacji [234]. Zasada metody polega na ilościowej reakcji izotiocyjanianów z 1,2-benzenoditiolom, dając w rezultacie cykliczny tiokarbonyl o żółtym zabarwieniu i wolne aminy [235].

Do oznaczenia izotiocyjanianów wykorzystano ekstrakty metanolowe z próbek roślinnych przygotowanych do oznaczania związków indolowych. Do 0,2 mL ekstraktu dodawano 1 mL izopropanolu w celu wytrącenia białek i po starannym wymieszaniu, próbki dwukrotnie odwirowano (13000 rpm, 2 min, 4°C). Następnie zbierano 0,6 mL klarownego roztworu z nad osadu i dodawano do 0,5 mL buforu fosforanowego o pH 8,5 oraz 0,1 mL 1,2-benzenoditiolu o stężeniu 60 mM w celu przeprowadzenia reakcji cyklokondensacji. Tak przygotowane roztwory inkubowano w temperaturze 65°C przez 1 godzinę. Po zakończeniu inkubacji, próbki ponownie odwirowano (13000 rpm, 15 min, 4°C), a zebrane z nad osadu roztwory przeznaczano do analizy chromatograficznej z wykorzystaniem układu HPLC-DAD pracującego według programu przedstawionego w tabeli 13. Jakościowej analizy produktu powstającego w wyniku reakcji 1,2-benzenoditiolu z izotiocyjanianami obecnymi w próbkach roślinnych dokonywano poprzez porównanie parametrów retencyjnych oraz widm UV wzorcowego 1,3-benzenoditiolo-2-tionu z otrzymanymi widmami. Ilościowo sumę izotiocyjanianów wyznaczano stosując metodę prostej kalibracyjnej, którą stanowiła wielkość powierzchni pików 1,3-benzenoditiolo-2-tionu w funkcji stężenia wzorcowego PITC.

Tabela 13. Podstawowe parametry toku postępowania analitycznego na etapie chromatograficznego oznaczania 1,3-benzenoditiolo-2-tionu w próbkach ekstraktów roślinnych

Parametr	Wartość
Objętość dozowanych próbek	30 µL
Skład fazy ruchomej	A - 1% kwas mrówkowy B - 20% metanol
Natężenie przepływu strumienia fazy ruchomej	1 mL/min
Gradient	Liniowy wzrost stężenia składnika B
Program elucji	0 min - 60% składnika B 12 min - 100% składnika B 15 min - 100% składnika B
Temperatura kolumny	30°C
Długość fali detekcji	365 nm
Rodzaj kolumny	Eclipse XDB C8, 150 x 4,6 mm, 3,5 µm

III. 3. 2. 4 Oznaczanie zawartości pozostałych produktów hydrolizy glukozynolanów w próbkach roślinnych

Pomiary zawartości produktów enzymatycznej hydrolizy glukozynolanów, m.in. nityli, epitionitryli, oksazolidyno-2-tionów, w próbkach kiełków roślin kapustowatych przeprowadziła dr Franziska Hanschen (Leibniz-Institute of Vegetable and Ornamental Crops) z wykorzystaniem układu chromatograficznego GC-MS [101, 236].

III. 3. 3 Procedury wykorzystywane podczas określania wpływu czynników fizycznych na aktywność handlowego preparatu mirozynyzy

III. 3. 3. 1 Działanie wysokiej temperatury

Do plastikowych probówek typu eppendorf dodawano wodny roztwór preparatu mirozynyzy (6,5 mg białka/mL) w ilości 0,5 mL i ogrzewano przez 10 minut w termobloku nagrzanym do odpowiedniej temperatury (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100°C). Dodatkowo do czasu ogrzewania doliczano 1 minutę na wyrównanie temperatury w całej objętości próbki. Po zakończeniu procesu, próbki natychmiast schładzano w łaźni lodowej.

III. 3. 3. 2 Działanie niskiej temperatury

W celu określenia wpływu niskiej temperatury na aktywność mirozynyzy próbki wodnych roztworów preparatu enzymu (6,5 mg białka/mL) przechowywano w temperaturze -20°C oraz -80°C przez okres 24 godzin lub 7 dni. Po tym czasie próbki rozmrażano w temperaturze pokojowej w celu przeprowadzenia pomiarów.

III. 3. 3. 3 Działanie wysokiego ciśnienia

Probówki o pojemności 2,5 mL zawierające próbki wodnych roztworów preparatu enzymatycznego (6,5 mg białka/mL) umieszczano w odtłuszczonych, metalowych, cylindrycznych pojemnikach wysokociśnieniowych wypełnionych wodą i dociskano je sprężyną utrzymującą próbkę w niezamarzającej strefie komory. Pojemniki zanurzano stopniowo w 10-minutowych odstępach czasu w zbiorniku kriostatu z mieszaniną niezamarzającą o składzie: alkohol etylowy - glikol propylenowy - woda (1:1:1) o temperaturze -20°C. Próbki poddawano działaniu ciśnienia (60 - 193 MPa) powstającego w wyniku częściowego wymrażania wody w pojemniku wysokociśnieniowym (tabela 14). W każdym przypadku łączny czas osiągnięcia założonego końcowego ciśnienia wynosił 40 min. Zwiększone ciśnienie obniżało temperaturę krzepnięcia wody i badany materiał w tych warunkach

znajdował się w stanie przechłodzonym. Po odpowiednim czasie pojemniki z próbkami wyjmowano ze zbiornika kriostatu i ocieplano w łaźni wodnej w temperaturze około 20°C przez 15 minut.

Tabela 14. Ciśnienie wytwarzane w komórce ciśnieniowej w zależności od temperatury [237]

Temperatura [°C]	Ciśnienie [MPa]
-5	59,8
-10	110,9
-15	156,0
-20	193,3

III. 3. 3. 4 Działanie promieniowania mikrofalowego

Próbki wodnych roztworów preparatu mirozynyzy (6,5 mg białka/mL) poddawano działaniu promieniowania mikrofalowego o różnej mocy (100, 180, 300, 450 W) przez różne okresy czasu (1-5, 10, 15, 20 minut). Po zakończeniu procesu, próbki schładzano w łaźni lodowej i przeznaczano do oznaczeń aktywności enzymatycznej.

III. 3. 4 Procedury wykorzystywane podczas określania wpływu czynników fizycznych na aktywność mirozynyzy obecnej w próbkach roślinnych

III. 3. 4. 1 Działanie promieniowania mikrofalowego

Badanym materiałem roślinnym była wodna zawiesina liofilizatu z kapusty (0,065 g/mL 0,15 M roztworu NaCl) lub kiełków (0,02 g/mL 0,15 M roztworu NaCl), świeże kiełki lub drobno pokrojone liście kapusty. Próbki umieszczano w szklanej zlewce i poddawano działaniu promieniowania mikrofalowego o mocy 100 lub 180 W przez różne okresy czasu (0,5 - 5 min). Następnie próbki wstawiano do łaźni lodowej w celu szybkiego ochłodzenia i na bieżąco poddawano analizie.

III. 3. 4. 2 Działanie wysokiej temperatury

Wodną zawiesinę liofilizatu z kapusty (0,065 g/mL 0,15 M roztworu NaCl) lub kiełków (0,02 g/mL 0,15 M roztworu NaCl) ogrzewano w termobloku w temperaturze 40, 50 lub 60°C przez 10 minut. Natomiast drobno pokrojone liście kapusty umieszczono w woreczkach strunowych i ogrzewano w łaźni wodnej w temperaturze 40 - 60°C, także przez 10 minut.

Następnie próbki wstawiano do łaźni lodowej w celu szybkiego ochłodzenia i na bieżąco poddawano analizie.

III. 3. 5 Procedury wykorzystywane do określenia aktywności biologicznej próbek roślinnych poddanych działaniu promieniowania mikrofalowego

W celu sprawdzenia skuteczności biofumigacyjnej soków z kapusty określano ich aktywność przeciwdrobnoustrojową w stosunku do typowych patogenów roślinnych. W badaniach wykorzystane zostały szczepy bakterii *Pseudomonas syringae* (PCM 1411) oraz *Pectobacterium carotovorum* (PCM 2056) pochodzące z Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu, a także szczep grzybów *Botrytis cinerea* (DSM 4709) z Niemieckiej Kolekcji Mikroorganizmów i Hodowli Komórkowych Instytutu Leibniza.

III. 3. 5. 1 Przygotowanie podłoży mikrobiologicznych

Do hodowli bakterii stosowano bulion kazeinowo-sojowy (TSB; pH 7,2) o następującym składzie: pepton kazeinowy - 7 g, pepton sojowy - 3 g, NaCl - 5 g, glukoza - 2,5 g, K₂HPO₄ - 2,5 g, H₂O - 1000 mL.

Do hodowli grzybów stosowano bulion maltozowo-sojowy (pH 5,6) o następującym składzie: ekstrakt maltozowy - 30 g, pepton sojowy - 3 g, H₂O - 1000 mL.

Do oznaczania stężenia biobójczego soków z kapusty wobec bakterii stosowano agar kazeinowo-sojowy (TSA) o następującym składzie: pepton kazeinowy - 15 g, pepton sojowy - 5 g, NaCl - 5 g, agar - 15 g, H₂O - 1000 mL.

Do oznaczania aktywności przeciwdrobnoustrojowej soków z kapusty wobec grzybów stosowano agar maltozowo-sojowy o następującym składzie: ekstrakt maltozowy - 30 g, pepton sojowy - 3 g, agar - 20 g, H₂O - 1000 mL.

Wszystkie podłoża sterylizowano w autoklawie przez 20 minut w temperaturze 121°C.

III. 3. 5. 2 Przygotowanie soków z kapusty do oznaczeń mikrobiologicznych

Główki kapusty białej zostały podzielone na trzy części. Z jednej bezpośrednio wyciskano sok za pomocą sokowirówki. Resztę kapusty pokrojono i poddawano działaniu promieniowania mikrofalowego o mocy 180 W przez 1 minutę. Następnie wyciskano z niej sok, a do połowy otrzymanego soku dodano zmielone pestki i skórki papai w ilości 20% (w/w).

Wszystkie próbki soków odwirowano, a następnie jałowiono na zimno za pomocą zestawu do filtracji membranowej (Millipore).

III. 3. 5. 3 Przygotowanie zawiesin drobnoustrojów

50 μL 24-godzinnej hodowli bakterii przenoszono jałowo do 50 mL bulionu kazeinowo-sojowego i prowadzono hodowlę wytrząsaną przez kolejne 24 godziny w temperaturze 37°C. Po tym czasie komórki znajdowały się w stacjonarnej fazie wzrostu.

50 μL 48-godzinnej hodowli grzybów przenoszono jałowo do 50 mL bulionu maltozowo-sojowego i prowadzono hodowlę wytrząsaną przez 72 godziny w temperaturze 28°C.

III. 3. 5. 4 Oznaczenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej soków z kapusty wobec wybranych szczepów bakterii i grzybów

Do probówek zawierających jałowy badany sok (5 mL) lub odpowiednią pożywkę (hodowla kontrolna) dodawano 100 μL zawiesiny mikroorganizmów, tak aby końcowe stężenie wynosiło $10^3 - 10^4$ komórek/mL i całość inkubowano w temperaturze 28°C przez 24 godziny (*P. carotovorum*, *P. syringae*) lub 72 godziny (*B. cinerea*). Dla każdego soku i każdego mikroorganizmu wykonano po 3 niezależne powtórzenia.

Po zakończonym etapie inkubacji, z każdej zawiesiny sporządzono rozcieńczenia dziesiętne w zakresie 10^{-1} do 10^{-7} i wykonywano posiew wgłębny na podłoże TSA (hodowla bakteryjna) lub agar maltozowo-sojowy (hodowla grzybów). Posiewy inkubowano w temperaturze 28°C przez 24 lub 72 godziny. Po inkubacji liczono kolonie i obliczano średnią liczbę drobnoustrojów w 1 mL próby z dwóch równoległych oznaczeń.

III. 4 Obróbka statystyczna wyników

III. 4. 1 Zastosowanie testu t-studenta

Część wyników została poddana analizie statystycznej z wykorzystaniem testu t-Studenta przeprowadzonej z wykorzystaniem programu Prism 4.0 (GraphPad Software, Inc.). Poziom istotności został ustalony na poziomie $p < 0,05$.

IV. WYNIKI I WNIOSKI

IV.1 Wprowadzenie

Biologiczne właściwości roślin kapustowatych warunkujące ich omówione wcześniej zastosowanie w rolnictwie oraz medycynie prewencyjnej wynikają z obecności wtórnych metabolitów. W przypadku rodziny *Brassicaceae* są to przede wszystkim glukozynolany, a dokładniej produkty ich enzymatycznej degradacji. Spośród możliwych produktów, izotiocyjaniany oraz związki indolowe wykazują największą aktywność biologiczną. Związki te przyczyniają się do wzrostu skuteczności procesu biofumigacji, zabiegu agrotechnicznego chroniącego uprawy rolne przed atakami mikroorganizmów i agrofagów. Także te same związki wykazują wielokierunkowe działanie prozdrowotne na wielu poziomach funkcjonowania ludzkiego organizmu, przez co wykorzystywane są w profilaktyce nowotworów oraz innych dietozależnych chorób przewlekłych.

Enzym mirozynaza odpowiada za pierwszy etap enzymatycznej degradacji glukozynolanów, jak to opisano w części teoretycznej niniejszej pracy. Jednakże rodzaj końcowych produktów powstających w wyniku hydrolizy zależy od kilku czynników, m.in. struktury glukozynolanów, warunków środowiska reakcji, obecności jonów Fe^{2+} oraz dodatkowych czynników białkowych. Odpowiednie ukierunkowanie hydrolizy glukozynolanów tak, aby jako główne produkty uzyskać izotiocyjaniany i związki indolowe, pozwoliłoby zwiększyć efektywność działania systemu „glukozynolany — mirozynaza” w przypadku ochrony plonów roślin uprawnych, a także poprawiłoby aktywność biologiczną suplementów diety czy żywności funkcjonalnej produkowanej z wykorzystaniem warzyw kapustowatych.

O ile manipulowanie składem i warunkami środowiska reakcji nie jest trudne, to sterowanie aktywnością enzymatyczną wymaga bardziej wyrafinowanego podejścia. W literaturze i zgłoszeniach patentowych opisane są różne manipulacje polegające na całkowitej inaktywacji wszystkich białek enzymatycznych odpowiadających za hydrolizę glukozynolanów, np. za pomocą gorącego metanolu lub na skutek działania wysokiej temperatury czy ciśnienia, oraz następnie dodatek egzogennej mirozynazy tak, aby umożliwić ukierunkowaną degradację glukozynolanów [238]. Można też założyć, że mirozynaza i dodatkowe białka charakteryzują się odmienną wrażliwością na czynniki fizyko-chemiczne, co pozwalałoby na wykorzystanie tych różnic do selektywnej inaktywacji białek o niepożądanym działaniu. Monitorując zachowaną aktywność mirozynazy oraz stopień konwersji glukozynolanów do izotiocyjanianów i związków indolowych można byłoby wnioskować o stopniu zahamowania aktywności dodatkowych czynników białkowych. Taką

strategię poszukiwania warunków zwiększających potencjał biologiczny produktów uzyskiwanych z wykorzystaniem roślin kapustowatych przyjęto opracowując założenia badawcze rozprawy doktorskiej.

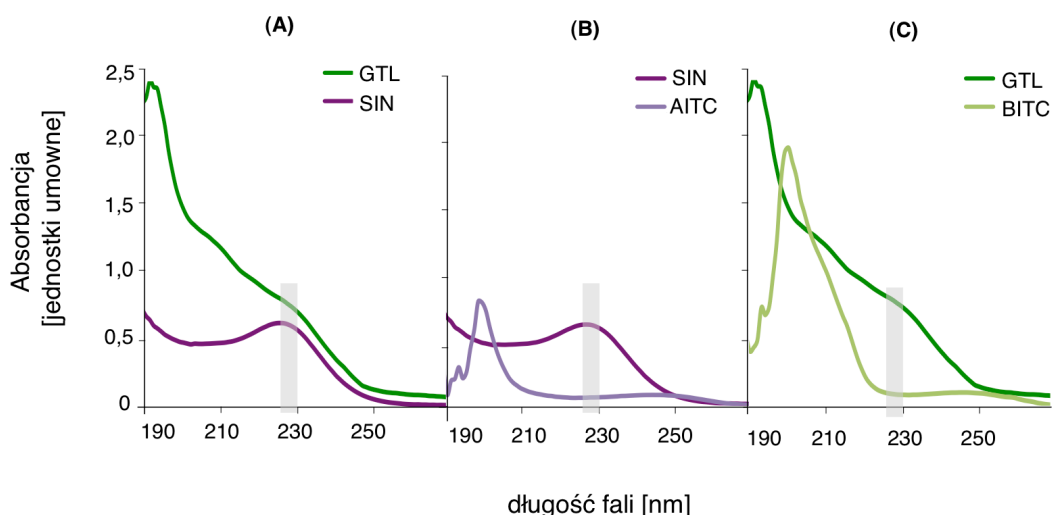
Część przedstawionych w pracy badań została przeprowadzona w ramach projektu „Wykorzystanie kapusty białej na potrzeby fitoremediacji i biofumigacji gleby (AGROBIOKAP)“ współfinansowanego przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego. Badania z wykorzystaniem kiełków roślin kapustowatych zostały wykonane na potrzeby projektu badawczego „Wpływ selenu dodanego podczas kiełkowania nasion wybranych roślin kapustowatych (*Brassicaceae*) na zawartość bioaktywnych związków w kiełkach” finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

IV. 2 Optymalizacja warunków oznaczania aktywności enzymatycznej mirozynazy

W piśmiennictwie można znaleźć wiele danych dotyczących aktywności mirozynazy w roślinach syntetyzujących ten enzym, jednak podawane wyniki oznaczeń są bardzo rozbieżne, nawet dla podobnych próbek. Może mieć to związek ze stosowaniem odmiennych metod pomiaru aktywności tego enzymu, zmiennych warunków prowadzenia reakcji, bądź różnych sposobów przygotowania próbek. Dlatego pierwszy etap badań obejmował dobór warunków prowadzenia pomiarów aktywności enzymatycznej mirozynazy w taki sposób, aby uzyskiwane dane pomiarowe były wiarygodne i powtarzalne. Spośród wielu dostępnych metod wybrano dwie: metodę spektrofotometryczną oraz pH-statyczną. Obie te metody pozwalają na śledzenie kinetyki reakcji enzymatycznej hydrolizy glukozynolanów, nie wymagają specjalistycznej aparatury, a ich zastosowanie jest powszechne, pomimo wspomnianych niezgodności pomiędzy wynikami uzyskiwanymi w różnych laboratoriach. Metoda spektrofotometryczna polega na pomiarze zmian absorbancji mieszaniny reakcyjnej przy długości fali $\lambda = 227 - 230$ nm w trakcie katalizowanej przez mirozynazę hydrolizy glukozynolanów. W przypadku metody pH-statycznej do oznaczania aktywności mirozynazy wykorzystuje się fakt, że reakcja enzymatycznego rozkładu glukozynolanów powoduje uwalnianie jonów H^+ i obniżenie pH mieszaniny reakcyjnej. Oznaczanie aktywności enzymu polega na pomiarze ilości NaOH zużywanego podczas miareczkowania mieszaniny reakcyjnej w celu utrzymania stałego pH na poziomie 6,5, optymalnego dla mirozynazy.

Optymalizacja parametrów dla obu wybranych metod oznaczania aktywności mirozynazy obejmowała dobór odpowiednich warunków prowadzenia reakcji oraz stężenia substratu. Przeprowadzono także ocenę czułości obu testów. Badania na tym etapie prowadzono z wykorzystaniem handlowego preparatu mirozynazy wyizolowanego z nasion gorczycy białej oraz dwóch wzorcowych glukozynolanów - standardowo stosowanej sinigriny (SIN) i rzadziej

używanej glukotropaeoliny (GTL). Glukotropaeolina charakteryzuje się większą wartością liczbową współczynnika ($8870 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) niż sinigrina ($7500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), co mogłoby zapewnić większą czułość pomiaru aktywności mirozyny. Ponadto, przy pomiarowej długości fali różnica absorbancji między glukozynolanem a odpowiednim izotiocyjanianem powstającym w wyniku jego degradacji jest większa w przypadku pary substrat-produkt: GTX - BITC niż SIN - AITC (rys. 27), co pozwala na zwiększenie precyzji pomiaru zmian absorbancji mieszaniny reakcyjnej.

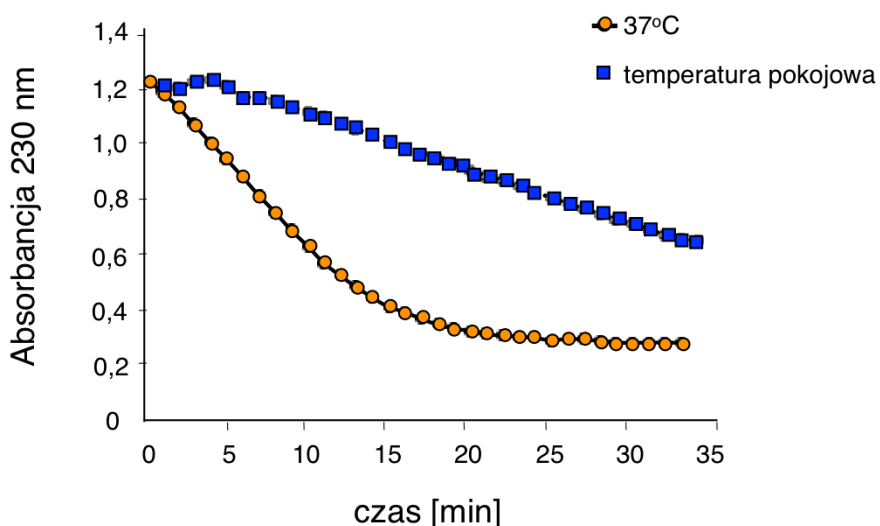


Rysunek 27. Widma UV-Vis sinigriny i glukotropaeoliny (A) oraz porównanie widm glukozynolanów i odpowiadających im izotiocyjanianów: SIN i AITC (B) oraz GTX i BITC (C)

IV. 2. 1 Dobór warunków prowadzenia reakcji hydrolizy glukozynolanów katalizowanej przez mirozynę

Reakcja enzymatycznej hydrolizy glukozynolanów może być prowadzona w temperaturze pokojowej ($20 - 25^{\circ}\text{C}$), w której hydroliza naturalnie zachodzi w roślinach. Jednakże podwyższając temperaturę do 37°C , bieg reakcji na potrzeby pomiarów można przyspieszyć bez ryzyka termicznej inaktywacji mirozyny. Zależność przedstawiona na rysunku 28 potwierdza założenie, że szybkość reakcji enzymatycznej prowadzonej w podwyższonej temperaturze jest większa w porównaniu do procesu zachodzącego w temperaturze pokojowej. Co więcej, w wyższej temperaturze reakcja przebiegała do końca, o czym świadczy ustabilizowanie się wartości absorbancji mieszaniny reakcyjnej. Dzięki temu pomiar zmian absorbancji jest obciążony mniejszym błędem i oznaczona aktywność mirozyny obliczona na podstawie krzywych kinetyki w temperaturze 37°C jest o $20 - 40 \%$ wyższa niż ta oznaczona w temperaturze pokojowej. Zastosowanie podwyższonej temperatury w trakcie oznaczania aktywności enzymatycznej zapewnia zatem lepszy, bardziej wiarygodny i miarodajny pomiar aktywności mirozyny.

W znanych procedurach pomiarowych oznaczania aktywności enzymatycznej mirozynyzy opisanych w literaturze stosowane są różne temperatury prowadzenia reakcji hydrolizy glukozynolanów: 23 - 25°C [74, 77, 79, 106], 30°C [70, 71, 76, 80] i 37°C [81, 82]. Prezentowane wyniki badań dowodzą, że przyczyną dużych różnic w wartościach aktywności mirozynyzy podawanych w literaturze mogą być właśnie wahania w warunkach prowadzenia oznaczeń (rys. 28).



Rysunek 28. Wyniki pomiarów zmian absorbancji roztworu GTL (0,2 mM) będących skutkiem spadku stężenia substratu pod wpływem działania mirozynyzy (0,13 mg preparatu/mL); reakcje prowadzono w temperaturze pokojowej lub 37°C

Zmiany pH mieszaniny reakcyjnej w zakresie 6,5 - 7,5 okazały się nie mieć tak dużego wpływu na poziom aktywności mirozynyzy jak temperatura. W podanym zakresie wartości pH, obliczona aktywność enzymatyczna była podobna. Jednak niektóre produkty hydrolizy indolowych glukozynolanów nawet w lekko kwaśnym środowisku są niestabilne i mogą być przekształcane do nowych pochodnych. Dlatego pH mieszaniny reakcyjnej na poziomie 7 - 7,5 może być zalecane szczególnie podczas pomiarów aktywności mirozynyzy w połączeniu z oznaczaniem zawartości związków indolowych w próbkach roślinnych. Jednak w opisanych w pracy badaniach pH mieszaniny reakcyjnej utrzymywano na optymalnym dla enzymu poziomie 6,5.

Zazwyczaj pomiar absorbancji w metodzie spektrofotometrycznej prowadzony jest przy długości fali 227 nm, w której sinigrina wykazuje maksimum absorbancji (rys. 27). Analizując uzyskane wyniki można stwierdzić, że podczas śledzenia kinetyk przebiegu reakcji hydrolizy glukozynolanów przy długości fali 230 nm mierzone wartości absorbancji są podobne, a przy tym bardziej stabilne w porównaniu z tymi obserwowanymi przy $\lambda = 227$ nm. Dlatego w dalszych badaniach z wykorzystaniem metody spektrofotometrycznej pomiary absorbancji

prowadzono przy długości fali 230 nm, przy której działanie spektrofotometru jest mniej podatne na zakłócenia.

Biorąc pod uwagę powyższe spostrzeżenia, dalsze pomiary aktywności mirozyny były prowadzone w temperaturze 37°C dla mieszaniny reakcyjnej o pH 6,5. W przypadku metody spektrofotometrycznej przebieg reakcji enzymatycznej śledzono przy długości fali 230 nm. Tylko prostoliniowe odcinki krzywych miareczkowania lub spadku absorbancji były brane pod uwagę przy obliczeniach aktywności mirozyny.

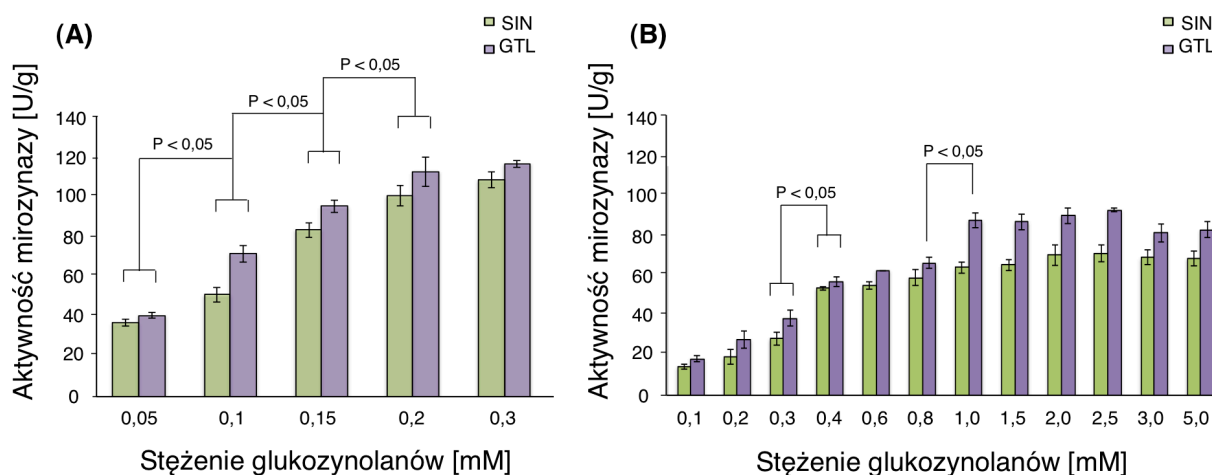
IV. 2. 2 Dobór stężenia substratu do oznaczania aktywności enzymatycznej mirozyny metodą pH-statyczną i spektrofotometryczną

Wykorzystując zoptymalizowane warunki prowadzenia reakcji enzymatycznej, przystąpiono do doboru odpowiedniego stężenia sinigriny lub glukotropaeoliny jako substratów do oznaczania aktywności mirozyny. Na etapie pomiaru aktywności enzymatycznej stężenie substratu powinno być na tyle duże, żeby umożliwić przebieg reakcji z maksymalną szybkością przez odpowiednio długi czas pozwalający na rzetelne określenie ubytku substratu. Z drugiej strony, zbyt duża ilość glukozynolanu może utrudnić prawidłowe śledzenie niewielkich zmian stężenia substratu na podstawie spadku absorbancji lub dozowania NaOH, oraz uniemożliwić precyzyjne określenie aktywności mirozyny, zwłaszcza w przypadku próbek charakteryzujących się małą aktywnością enzymatyczną.

W celu określenia odpowiedniego stężenia substratu, enzymatyczną hydrolizę glukozynolanów przeprowadzono stosując różne stężenia sinigriny i glukotropaeoliny oraz handlowy preparat o stężeniu mirozyny 0,065 mg/mL. Takie stężenie enzymu zostało wybrane na podstawie danych literaturowych, wskazujących na zawartość białka w ekstraktach roślinnych na poziomie 0,05 - 0,32 mg/mL [106].

W przypadku metody spektrofotometrycznej w trakcie prowadzenia pomiarów występują dodatkowe ograniczenia. Po pierwsze, mierzone wartości absorbancji powinny znajdować się poniżej górnej granicy liniowej zależności między stężeniem glukozynolanów a absorbancją. Po drugie, absorbancja roztworu zawierającego substrat nie może przekraczać zakresu pomiarowego spektrofotometru. W rezultacie największym stężeniem glukozynolanu możliwym do zastosowania w metodzie spektrofotometrycznej było 0,3 mM, co odpowiadało absorbancji 1,9 oraz 1,6 odpowiednio dla roztworu glukotropaeoliny i sinigriny. W przypadku metody pH-statycznej zastosowano znacznie większy zakres stężenia substratów (rys. 29). Na podstawie wyników pomiarów obliczano aktywność mirozyny i porównano do tej deklarowanej przez producenta wynoszącej ok. 100 U/g. Dane przedstawione na rysunku 29

mogą być podstawą do stwierdzenia, że obliczona na podstawie oznaczeń aktywność mirozynyzy zależy od stężenia substratu w przypadku obu metod. Przy najmniejszym użytym stężeniu obu substratów centra aktywne enzymu nie są wysyczone i aktywność mirozynyzy osiąga ok. 21 % i 37 % oczekiwanej wartości, odpowiednio w przypadku metody pH-statycznej i spektrofotometrycznej. Wraz ze wzrostem stężenia glukozynolanów, szybkość reakcji wzrasta i oznaczana aktywność mirozynyzy zbliża się do oczekiwanego poziomu (100 U/g).



Rysunek 29. Aktywność enzymatyczna mirozynyzy oznaczona metodą spektrofotometryczną (A) oraz pH-statyczną (B) z wykorzystaniem dwóch substratów o różnych stężeniach oraz preparatu enzymatycznego o stężeniu 0,065 mg/mL.

Przedstawione wyniki są średnią z trzech pomiarów \pm SD

W przypadku metody spektrofotometrycznej, maksymalna aktywność mirozynyzy została osiągnięta przy stężeniu substratu wynoszącym 0,2 mM, dalsze zwiększanie ilości glukozynolanów nie wpływało na wynik oznaczeń. To może sugerować, że wszystkie centra aktywne enzymu zostały wysyczone i reakcja przebiegała z maksymalną szybkością. Dlatego do dalszych oznaczeń z wykorzystaniem metody spektrofotometrycznej, wybrano stężenie substratu na poziomie 0,2 mM, zarówno dla sinigriny, jak i glukotropaeoliny. W przypadku metody pH-statycznej, porównywalne wartości aktywności enzymatycznej uzyskano przy stężeniu obu substratów na poziomie 1 - 5 mM, jednak można zaobserwować nieco obniżoną aktywność mirozynyzy przy 3 i 5 mM stężeniu glukozynolanów. Taką inhibicję można tłumaczyć reakcją izotiocyjanianów, powstających podczas hydrolizy glukozynolanów, z nukleofilowymi grupami SH lub NH₂ występującymi w strukturze białka enzymatycznego. Do dalszych pomiarów z wykorzystaniem metody pH-statycznej wybrano stężenie substratu na poziomie 2,5 mM. Taka ilość glukozynolanu zapewnia przebieg reakcji enzymatycznej z maksymalną szybkością, i nie występują jeszcze efekty działania hamującego, jak w przypadku stężenia powyżej 3 mM (rys. 29B).

Znaczące różnice w optymalnym stężeniu substratu wybranym na potrzeby obu metod mogą wynikać z dwóch faktów. W metodzie pH-statycznej wpływ może mieć efekt buforujący spowodowany obecnością w preparacie enzymatycznym mirozynyzy dodatkowych białek lub innych związków pozostałych po procesie izolacji, czego efektem jest zaniżanie oznaczanej aktywności. Natomiast w przypadku metody spektrofotometrycznej aktywność mirozynyzy jest obliczana na podstawie pomiaru spadku absorbancji wywołanego przez enzymatyczną degradację glukozynolanów. Za absorbancję glukozynolanów przy pomiarowej długości fali (227 - 230 nm) odpowiada grupa C=N sprzężona z atomem siarki, stanowiąca rdzeń struktury tych związków [239]. Należy pamiętać, że każda reakcja zachodząca w mieszaninie reakcyjnej, która powoduje hydrolizę wiązań C=N może przyczynić się do obniżenia absorbancji badanego roztworu w zakresie pomiarowym. W konsekwencji taka zmiana absorbancji może być mylnie interpretowana jako efekt działania mirozynyzy i mieć wpływ na zawyżanie uzyskanych wyników.

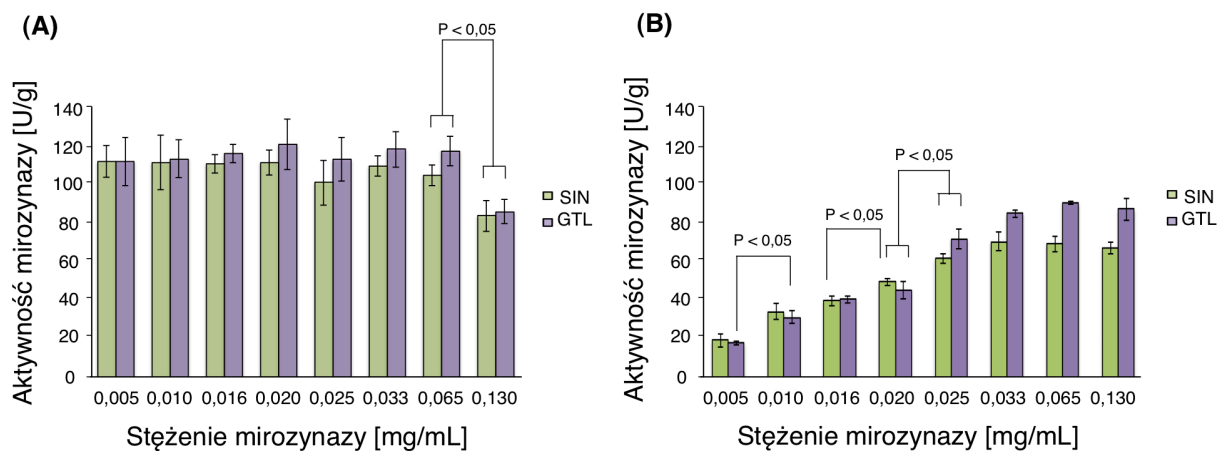
Podsumowując, na podstawie przedstawionych wyników można stwierdzić, że stężenie substratu wykorzystane podczas reakcji enzymatycznej wpływa na wiarygodność uzyskanych wyników pomiaru aktywności enzymu, jest to zatem parametr wymagający ścisłej kontroli. Bez względu na zastosowaną metodę, większą aktywność mirozynyzy oznaczano stosując glukotropaeolinę jako substrat. Jest to nieco zaskakujące, ponieważ związek ten nie występuje w nasionach gorczycy, z których pozyskano preparat mirozynyzy, więc nie jest on naturalnym substratem dla enzymu obecnego w tej roślinie.

IV. 2. 3 Ocena czułości metody pH-statycznej i spektrofotometrycznej pomiaru aktywności enzymatycznej mirozynyzy

Następnym etapem badań było określenie czułości obu metod oznaczania aktywności enzymatycznej mirozynyzy. W tym celu przeprowadzono reakcje hydrolizy glukozynolanów z zastosowaniem optymalnego stężenia substratu, właściwego dla każdej z metod (odpowiednio 0,2 mM i 2,5 mM w przypadku metody spektrofotometrycznej i pH-statycznej), oraz roztworu handlowego preparatu mirozynyzy o różnych stężeniach (rys. 30).

Wyniki uzyskane za pomocą metody spektrofotometrycznej wskazują, że aktywność enzymu nie zależy od jego stężenia w mieszaninie reakcyjnej, co jest zgodne z podstawową wiedzą o enzymach. Jedynie aktywność mirozynyzy oznaczona w roztworze zawierającym największe stężenie enzymu (0,13 mg/mL) jest mniejsza w porównaniu do wartości obliczonych dla pozostałych stężeń enzymu (0,005 - 0,065 mg/mL). Wy tłumaczeniem tego zjawiska może być limitująca ilość substratu w stosunku do tak dużego stężenia enzymu, przez co reakcja nie przebiega z maksymalną szybkością. Innym powodem może być zbyt wysoka

absorbancja badanego roztworu, zbliżająca się do granicy zakresu pomiarowego spektrofotometru, ponieważ dodatek preparatu mirozynyzy także zwiększa absorbancję mieszaniny reakcyjnej przy stosowanej długości fali.

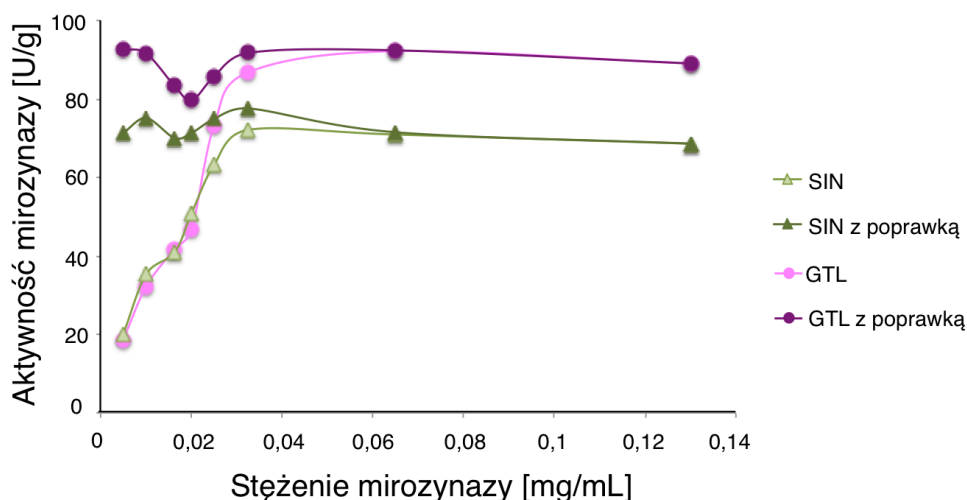


Rysunek 30. Aktywność enzymatyczna mirozynyzy oznaczona metodą spektrofotometryczną (A) lub pH-statyczną (B) z wykorzystaniem preparatu enzymatycznego o różnych stężeniach oraz glukozynolanów o stężeniu odpowiednio 0,2 mM i 2,5 mM.

Przedstawione wyniki są średnią z trzech pomiarów \pm SD

Wyniki uzyskane w przypadku korzystania z metody pH-statycznej dla najniższych stężeń mirozynyzy (0,005 - 0,020 mg/mL) mogą sugerować nieprawidłową zależność między oznaczoną aktywnością enzymatyczną a ilością enzymu w mieszaninie reakcyjnej. Tylko w zakresie stężeń preparatu wynoszącego 0,025 - 0,13 mg/mL obliczona aktywność mirozynyzy jest poprawna i niezależna od stężenia preparatu enzymatycznego. Niższa od oczekiwanej aktywność mirozynyzy przy niskich stężeniach preparatu enzymatycznego może sugerować, że metoda pH-statyczna nie jest wystarczająco czuła i aktywność oznaczona za jej pomocą nie odpowiada rzeczywistym wartościom, w przypadku gdy aktywność mirozynyzy w mieszaninie reakcyjnej spada poniżej 2 mU/mL. Problem ten został rozwiązany przy współpracy z dr hab. Karolem Dziedziulem i mgr inż. Magdaleną Meller z Wydziału Fizyki Technicznej i Matematyki Stosowanej Politechniki Gdańskiej poprzez wprowadzenie poprawki matematycznej w postaci funkcji: $y = a + b \cdot e^{-x}$, gdzie x oznacza aktywność mirozynyzy wyrażoną jako U/mL mieszaniny reakcyjnej, natomiast y jest poprawioną wartością aktywności mirozynyzy podaną jako U/g preparatu enzymatycznego. Wartości liczbowe parametrów a oraz b zostały obliczone osobno dla każdego substratu na podstawie wyników przedstawionych na rys. 30. W obu przypadkach regresji liniowej, wartości liczbowe współczynników dopasowania są duże, odpowiednio 0,97 dla glukotropaeoliny oraz 0,93 dla sinigriny. Ponadto zastosowane testy statystyczne wskazują, że zaproponowane modele matematyczne są poprawne. Aktywność

enzymatyczna oznaczona za pomocą metody pH-statycznej, a następnie skorygowana z zastosowaniem funkcji: $y = 72,599 - 56,645 \cdot e^{-x}$ dla sinigriny oraz $y = 88,102 - 81,101 \cdot e^{-x}$ dla glukotropaeoliny jest właściwa i wystarczająco stabilna, a wartości aktywności wyrażone jako U/g preparatu enzymatycznego nie zależą od stężenia enzymu w mieszaninie reakcyjnej (rys. 31).



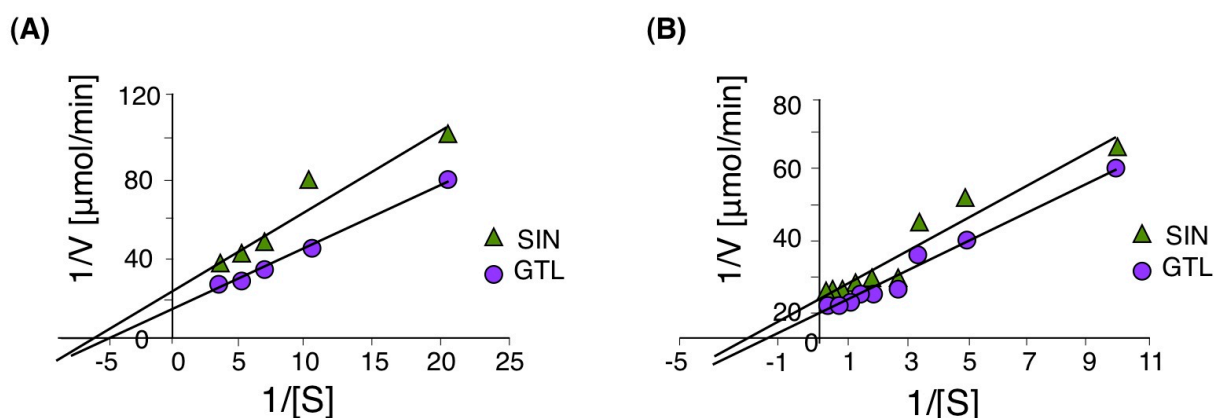
Rysunek 31. Aktywność enzymatyczna mirozynazy oznaczona metodą pH-statyczną z wykorzystaniem preparatu enzymatycznego o różnych stężeniach oraz glukozynolanów o stężeniu 2,5 mM, obliczona z zastosowaniem poprawki matematycznej lub bez niej. Przedstawione wyniki są średnią z trzech pomiarów, wartości odchylenia standardowego nie przekraczały 5 %

Analiza uzyskanych wyników może być podstawą do stwierdzenia, że czułość oznaczeń aktywności enzymatycznej mirozynazy w metodzie spektrofotometrycznej jest większa w porównaniu do wyników uzyskanych metodą pH-statyczną. Biorąc pod uwagę wartości obliczone dla handlowego preparatu mirozynazy z zastosowaniem glukozynolanów o stężeniu 0,2 mM jako substratu (rys. 29), aktywność enzymatyczna uzyskana w przypadku stosowania metody spektrofotometrycznej jest 5 razy wyższa niż ta uzyskana przy użyciu metody pH-statycznej. Na podstawie wyników przedstawionych przez Palmieriego i in. [70] w publikacji porównującej obie metody oznaczania aktywności mirozynazy można wnioskować, że w przypadku ekstraktów roślinnych uzyskane wartości aktywności oznaczone obiema metodami są podobne, jednak w metodzie pH-statycznej autorzy zastosowali znacznie wyższe stężenie substratu (5 mM) w porównaniu do metody spektrofotometrycznej (0,5 mM). Analizując wyniki przedstawione w tej pracy można stwierdzić, że aktywność enzymatyczna oznaczona za pomocą obu metod także jest porównywalna, wymaga jednak podobnie dużej różnicy stężeń substratów, np. 0,1 mM w metodzie spektrofotometrycznej oraz 1 mM w metodzie pH-statycznej.

Wyniki przedstawione w tej pracy mogą sugerować, że obie metody oznaczania aktywności enzymatycznej mirozynyzy mogą być miarodajne, a wyniki uzyskane za ich pomocą powtarzalne pod warunkiem, że reakcja jest prowadzona w zoptymalizowanych warunkach. Jednak, aby w obu metodach uzyskać porównywalne wartości aktywności enzymatycznej, wymagane są różne stężenia substratu. W przypadku metody pH-statycznej, przy niskich stężeniach mirozynyzy potrzebne jest wprowadzenie poprawki matematycznej w celu prawidłowego obliczenia rzeczywistej aktywności enzymatycznej. Należy pamiętać, że tylko zastosowanie opisanych warunków prowadzenia reakcji enzymatycznej gwarantuje poprawność przedstawionych równań i parametrów matematycznych.

IV. 2. 4 Wyznaczenie parametrów kinetycznych reakcji katalizowanej przez mirozynyzę

Do scharakteryzowania reakcji enzymatycznej niezbędne jest wyznaczenie takich parametrów kinetycznych jak stała Michaelisa K_m oraz szybkość maksymalna reakcji V_{max} . Stała Michaelisa wyraża stężenie substratu, dla którego szybkość reakcji enzymatycznej jest równa połowie szybkości maksymalnej. Wartości liczbowe parametrów K_m oraz V_{max} dla reakcji hydrolizy glukozynolanów katalizowanej przez mirozynyzę z udziałem obu substratów wyznaczono korzystając z wykresu Lineweavera-Burka (rys. 32), sporządzonego na podstawie wyników przedstawionych na rys. 29. Uzyskane wartości parametrów przedstawiono w tabeli 15.



Rysunek 32. Wyznaczenie parametrów kinetycznych K_m oraz V_{max} dla katalizowanej przez mirozynyzę reakcji hydrolizy SIN lub GTL jako substratu, z wykorzystaniem wyników uzyskanych przy użyciu metody spektrofotometrycznej (A) lub pH-statycznej (B)

Wartości liczbowe parametru V_{max} są porównywalne w przypadku obu substratów i nie różnią się znacznie w zależności od zastosowanej metody oznaczania aktywności mirozynyzy. Natomiast większe różnice można zaobserwować w wartościach parametru K_m , który zależy zarówno od rodzaju zastosowanego w reakcji glukozynolanu, co jest uzasadnione możliwymi

różnicami w powinowactwie do enzymu odmiennych strukturalnie substratów, ale także metody oznaczania. Takie rozbieżności są spotykane także w literaturze, gdzie można znaleźć wartości liczbowe parametru K_m wyznaczonego dla reakcji mirozynyzy wyizolowanej z nasion gorczycy oraz sinigriny jako substratu wahające się od 0,06 [240] do 0,2 mM [81]. Zatem wartości liczbowe parametru K_m wyznaczone w badaniach opisywanych w tej pracy mieszczą się w podanym zakresie. Opublikowane wartości liczbowe parametru K_m dla mirozynyzy pochodzącej z innych warzyw kapustowatych oraz sinigriny, wynosiły od 0,023 do 0,3 mM [77, 239, 241]. W podobnym zakresie mieszczą się wartości liczbowe parametru K_m dla katalizowanej przez mirozynazę wyizolowaną z chrzanu reakcji, w której wykorzystano sinigrinę lub glukonasturcynę jako substrat (odpowiednio 0,53 i 0,11 mM) [242].

Tabela 15. Wartości liczbowe parametrów kinetycznych mirozynyzy wyznaczone na podstawie wyników uzyskanych przy użyciu metody spektrofotometrycznej lub pH-statycznej

Parametr	Metoda oznaczania aktywności enzymatycznej			
	spektrofotometryczna		pH-statyczna	
	SIN	GTL	SIN	GTL
K_m [mmol/dm ³]	0,229 ± 0,016	0,149 ± 0,023	0,187 ± 0,001	0,261 ± 0,017
V_{max} [μmol/min]	0,052 ± 0,002	0,056 ± 0,004	0,072 ± 0,002	0,093 ± 0,002

Z punktu widzenia przewagi jednej z dwóch porównywanych metod, uzyskane wyniki nie wskazują, by ze względu na właściwości kinetyczne, któryś z badanych glukozyzolanów mógł być uznany za lepszy substrat podczas oznaczania aktywności mirozynyzy. Jedynie na podstawie wartości liczbowych parametrów kinetycznych wyznaczonych dla metody spektrofotometrycznej można wnioskować, że glukotropaeolina jest lepszym substratem, co jest zgodne z założeniami przedstawionymi we wstępie (IV.2).

IV. 3 Aktywność enzymatyczna mirozynyzy w próbkach roślinnych

Opisane metody oznaczania aktywności mirozynyzy, z uwzględnieniem optymalnych warunków reakcji oraz odpowiedniego stężenia substratu, poddano dalszej weryfikacji poprzez określenie aktywności badanego enzymu w próbkach wybranych roślin kapustowatych. W tym celu wykorzystano zarówno nasiona, jak i części jadalne roślin.

W przypadku metody pH-statycznej przetestowano również próbki roślinne w różnych formach, t.j. liofilizatu, soku oraz rozdrobnionych świeżych liści kapusty. Największą aktywność enzymatyczną mirozynyzy uzyskano w przypadku liofilizatu liści. Liofilizacja pozwala na zachowanie struktury białek i powoduje minimalne straty w ich aktywności. Dodatkowo zliofilizowane liście stanowią reprezentatywną próbkę z całej kapusty, ponieważ materiał roślinny został wymieszany i ujednociony podczas ucierania liści w moździerz. Znacznie mniejszą aktywność (o 70 %) uzyskano w oznaczeniu z wykorzystaniem świeżych liści kapusty. Można to tłumaczyć stratami aktywności enzymu podczas przygotowania próbki (siekanie, homogenizacja) oraz jej utlenieniem. Ponadto oznaczana aktywność może zależeć od rodzaju badanej tkanki, np. liście zewnętrzne lub wewnętrzne, rdzeń liścia lub jego tkanka miękka. Najmniejsza aktywność mirozynyzy została stwierdzona w próbce soku otrzymanego z liści kapusty. Oprócz strat w aktywności spowodowanych przygotowaniem próbki, niski wynik może być skutkiem związania enzymu z częściami stałymi i nieprzechodzeniem białek enzymatycznych do soku. Biorąc pod uwagę przedstawione wyniki podjęto decyzję, by do dalszych badań z wykorzystaniem metody pH-statycznej zastosowano materiał roślinny w postaci liofilizatu.

W przypadku metody spektrofotometrycznej okazało się, że ze względu na mętność i brak przejrzystości ekstraktów uzyskanych po homogenizacji wodnej zawiesiny zliofilizowanego materiału roślinnego, zastosowanie metody opartej na pomiarze zmian absorbancji zostało ograniczone. Jednak możliwe było wykorzystanie tej metody do oznaczenia aktywności mirozynyzy w ekstraktach z nasion roślin kapustowatych. Ponieważ mirozyna wykazuje większą aktywność w nasionach niż w tkankach dojrzałych roślin, możliwe było dodanie na tyle małej objętości ekstraktu, która nie powodowała zmętnienia mieszaniny reakcyjnej i pozwalała na pomiar spadku absorbancji. Na podstawie uzyskanych wyników (tabela 16) można wnioskować, że niezależnie od zastosowanej metody, zmierzona aktywność mirozynyzy z wykorzystaniem glukotropaeoliny jako substratu jest większa niż w przypadku sinigriny. Taką sytuację w metodzie spektrofotometrycznej można tłumaczyć większą wartością liczbową współczynnika ekstynkcji glukotropaeoliny w porównaniu do sinigriny, co przyczynia się do zwiększenia czułości metody z zastosowaniem glukotropaeoliny. Dodatkowo, w próbkach roślin naturalnie zawierających glukotropaeolinę (np. rzepak), mirozyna może wykazywać większe powinowactwo do tego związku jako naturalnego substratu. Największą aktywność mirozynyzy oznaczono w próbkach nasion gorczycy białej, bez względu na rodzaj substratu i zastosowaną metodę pomiaru aktywności enzymatycznej.

Tabela 16. Aktywność enzymatyczna mirozynazy oznaczona w próbkach nasion wybranych roślin kapustowatych z wykorzystaniem metody spektrofotometrycznej i pH-statycznej oraz SIN i GTL jako substratów. Przedstawione wyniki są średnią z dwóch pomiarów \pm SD

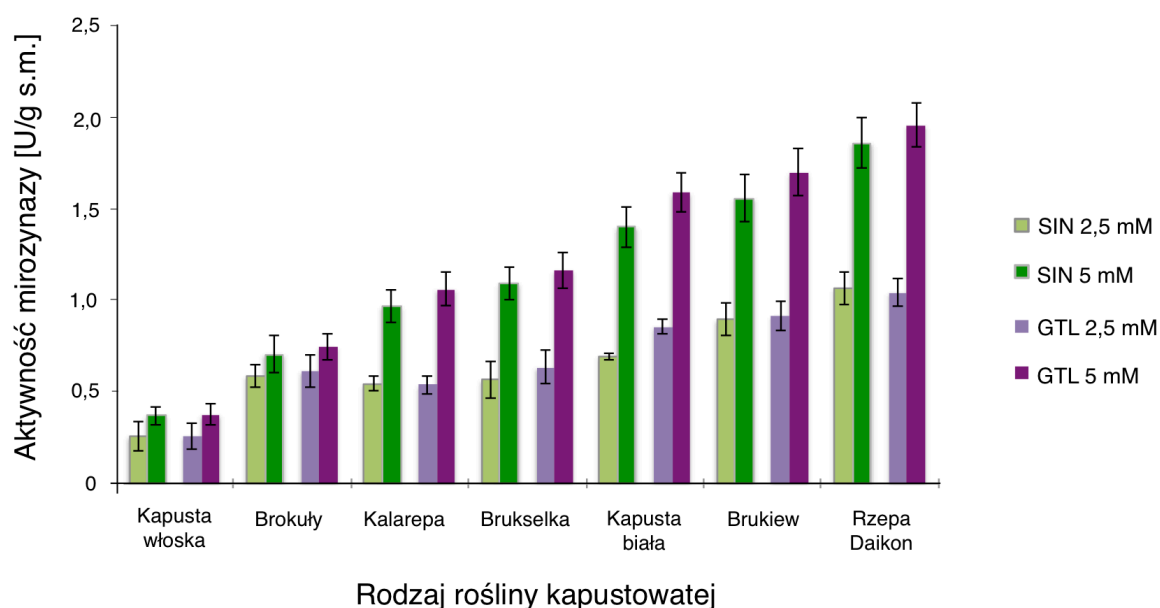
Aktywność enzymatyczna mirozynazy [U/ g sm]						
Rodzaj nasion	Metoda spektrofotometryczna		Metoda pH-statyczna			
	0,2 mM GLS		2,5 mM GLS		5 mM GLS	
	SIN	GTL	SIN	GTL	SIN	GTL
Gorzycza	22,93 \pm 0,70	25,60 \pm 0,70	2,14 \pm 0,11	2,98 \pm 0,31	3,45 \pm 0,37	3,88 \pm 0,19
Rzepak	2,79 \pm 0,25	3,52 \pm 0,28	1,23 \pm 0,34	1,66 \pm 0,27	2,74 \pm 0,15	2,92 \pm 0,20
Brokuły	3,78 \pm 0,21	4,21 \pm 0,11	1,22 \pm 0,14	1,47 \pm 0,40	2,02 \pm 0,09	2,22 \pm 0,15
Kapusta włoska	2,43 \pm 0,25	2,97 \pm 0,11	0,96 \pm 0,17	1,03 \pm 0,08	2,00 \pm 0,11	2,11 \pm 0,41
Kalarepa	1,61 \pm 0,15	2,26 \pm 0,26	1,08 \pm 0,12	1,29 \pm 0,36	2,11 \pm 0,27	2,25 \pm 0,13
Kapusta biała	2,71 \pm 0,58	3,16 \pm 0,18	1,21 \pm 0,07	1,38 \pm 0,06	2,33 \pm 0,35	2,74 \pm 0,27

Na podstawie przedstawionych rezultatów można dodatkowo wnioskować, że wyniki uzyskane metodą spektrofotometryczną dają powtarzalnie wyższe wartości niż te pochodzące z metody pH-statycznej. Jak wspomniano wcześniej, zaniżone wyniki z metody pH-statycznej można tłumaczyć efektem buforującym białek roślinnych obecnych w badanych próbkach. Natomiast w przypadku metody spektrofotometrycznej dodatkowe, niezależne od mirozynazy, reakcje zachodzące w obrębie charakterystycznych wiązań (C=N) odpowiadających za absorbancję glukozynolanów przy pomiarowej długości fali (227 - 230 nm) mogą przyczynić się do obniżenia absorbancji badanego roztworu i w rezultacie zawyżać wyniki pomiarów aktywności enzymatycznej.

Aby zniwelować efekt buforujący, podczas pomiarów aktywności mirozynazy w próbkach roślinnych z wykorzystaniem metody pH-statycznej zastosowano dodatkowo wyższe stężenie substratu (5 mM). Efekt buforujący występował podczas doboru optymalnych warunków z wykorzystaniem wyizolowanego białka enzymatycznego w postaci handlowego preparatu mirozynazy, ale nasilił się podczas oznaczeń prowadzonych dla próbek roślinnych (liofilizatów). Można to tłumaczyć znacznie większą zawartością dodatkowych białek roślinnych, aminokwasów, kwasów organicznych, fosforanów i węglanów, czyli związków wpływających na właściwości buforowe mieszaniny reakcyjnej. Zwiększenie stężenia substratu podczas pomiarów aktywności mirozynazy zapewniało dłuższy czas reakcji przy zachowaniu

maksymalnej szybkości i co za tym idzie wystarczającą ilość uwalnianych podczas hydrolizy jonów H^+ , pozwalającą na przewyciężenie efektu buforującego dodatkowych związków obecnych w próbce roślinnej oraz na wiarygodny pomiar zużycia neutralizującego roztworu NaOH.

Biorąc pod uwagę fakt, że w przypadku metody pH-statycznej nie ma ograniczeń co do rodzaju i przejrzystości mieszaniny reakcyjnej, metodę tą można było wykorzystać do oznaczenia aktywności mirozynazy nie tylko w nasionach, ale także w częściach jadalnych roślin kapustowatych. Część próbek roślinnych poddano analizie korzystając z glukozynolanów o dwóch stężeniach, tzn. 2,5 i 5 mM (rys. 33). Dodatkowo przeprowadzono oznaczenia z wykorzystaniem jeszcze większego stężenia glukozynolanów - 7,5 mM oraz liofilizatów roślinnych zawierających mirozynazę. Jednak aktywność enzymu uzyskana przy najwyższym stężeniu substratu (7,5 mM) była porównywalna z wartościami otrzymanymi przy zastosowaniu stężenia 5 mM. Na tej podstawie można wnioskować, że stężenie glukozynolanów na poziomie 5 mM jest wystarczające do pokonania efektu buforującego innych składników mieszaniny i zapewnia możliwość uzyskiwania rzetelnych wyników pomiarów aktywności mirozynazy w próbkach roślinnych.

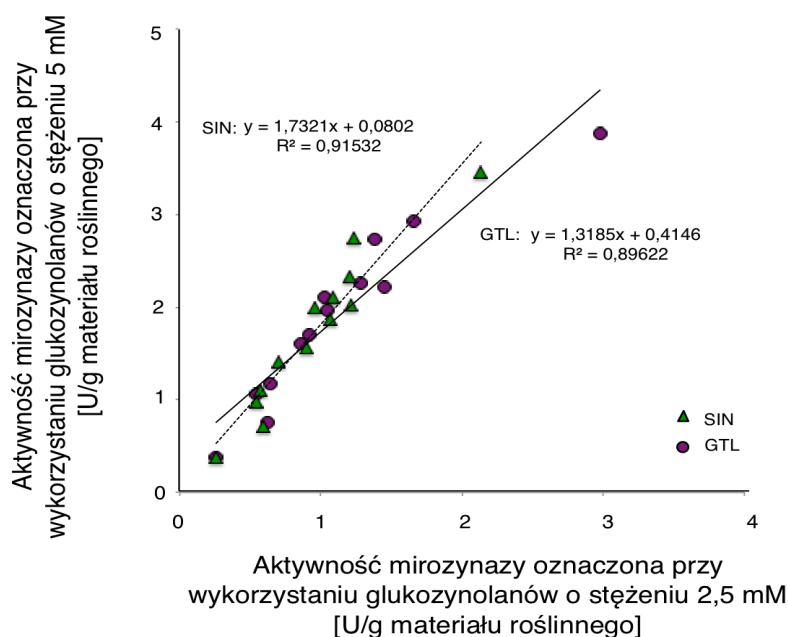


Rysunek 33. Różnice w aktywności enzymatycznej mirozynazy oznaczone w liofilizatach części jadalnych wybranych roślin kapustowatych za pomocą metody pH-statycznej w zależności od stężenia substratu: sinigriny (SIN) lub glukotropaeoliny (GTL).

Przedstawione wyniki są średnią z dwóch pomiarów \pm SD

Na podstawie danych przedstawionych na rys. 33 można wnioskować o wysokiej korelacji pomiędzy aktywnością mirozynazy oznaczoną przy zastosowaniu stężenia glukozynolanów na poziomie 2,5 mM oraz 5 mM. Wyniki te wykorzystano do wyznaczenia

prostych korelacyjnych, a wartości liczbowe współczynników determinacji R^2 oraz współczynników Pearsona (0,957 dla SIN oraz 0,946 dla GTL) potwierdziły istnienie silnej korelacji liniowej (rys. 34). Oznacza to, że zaniżone wartości aktywności mirozynazy wyznaczone przy niższym stężeniu substratu mogą być przeliczone na poprawne wartości, tzn. takie, jakie uzyskiwane są przy zastosowaniu właściwego stężenia substratu (5 mM). Z powodu wysokich cen handlowo dostępnych glukozynolanów, w dalszych badaniach opisanych w pracy, zdecydowano się na zastosowanie niższego stężenia substratu (2,5 mM) oraz korektę wyników z wykorzystaniem równań, które przedstawiono na rys. 34.



Rysunek 34. Korelacja pomiędzy aktywnością mirozynazy oznaczoną w próbkach roślin kapustowatych oznaczoną metodą pH-statyczną z wykorzystaniem 2,5 mM lub 5 mM stężenia SIN oraz GTL

Porównanie uzyskanych wyników z danymi literaturowymi jest utrudnione ze względu na odmienne jednostki oraz duże różnice w cytowanych wartościach. Rozbieżności, jak już wspomniano, mogą być spowodowane wieloma przyczynami technicznymi: odmienną metodą oznaczania aktywności enzymatycznej, zróżnicowanym sposobem przygotowania próbek roślinnych, warunkami prowadzenia reakcji, mogą także wynikać z naturalnych różnic pomiędzy odmianami i pochodzeniem badanych roślin, a nawet cyklem dobowym. Przykładem mogą być wartości aktywności w zakresie 0,108 - 6,08 U/mg białka uzyskane przez różnych badaczy dla próbek kapusty białej z wykorzystaniem metody spektrofotometrycznej i sinigriny jako substratu [74, 76]. Aktywność mirozynazy zależy także od pory zbioru warzyw. W próbkach kapusty zbieranych jesienią aktywność tego enzymu określono na poziomie

21 U/g ś.m., podczas gdy w próbkach pochodzących ze zbioru wiosennego aktywność ta wynosiła aż 50 U/g ś.m. [79]. Duże różnice w aktywności mirozynyzy obserwuje się także w zależności od odmiany badanej rośliny, dla kilku odmian kapusty abisyńskiej wyniki wahają się od 71 do 102 U/g s.m. [81]. Wśród cytowanych wyników można jednak znaleźć pewną zależność - najmniejsza aktywność mirozynyzy jest zazwyczaj oznaczana w kapuście włoskiej, wartości dla próbek kapusty białej, brokułów i brukselki są zbliżone, jednak mniejsze od tych uzyskanych dla gorczycy i rzepy Daikon. Wyniki przedstawione w tej rozprawie również pasują do tego wzoru. Dodatkowo, porównując wyniki uzyskane dla nasion i odpowiadających im dojrzałych roślin, można stwierdzić, że nasiona zwykle cechują się większą aktywnością mirozynyzy.

IV. 4 Zależność kierunku degradacji glukozynolanów w roślinach kapustowatych od aktywności enzymatycznej mirozynyzy

Analizując przedstawione wyniki nasuwa się pytanie czy zróżnicowana aktywność mirozynyzy w roślinach kapustowatych ma wpływ na przebieg procesu enzymatycznej degradacji glukozynolanów oraz rodzaj powstających produktów. Odpowiedzi powinno dostarczyć porównanie zawartości glukozynolanów, jako substratu reakcji katalizowanej przez mirozynyzę, oraz izotiocyanianów i indoli, jako możliwych produktów degradacji. Podobna ilość substratów i produktów może świadczyć o tym, że w danej próbce roślinnej mirozyna jest dominującym białkiem enzymatycznym biorącym udział w hydrolizie glukozynolanów. Natomiast im większa różnica w bilansie, tym większe prawdopodobieństwo, że produkt przejściowy (tiohydroksym O-sulfonowy) po pierwszym etapie enzymatycznej hydrolizy glukozynolanów pod wpływem dodatkowych białek został przekształcony w mniej pożądane produkty, takie jak tiocyaniany, nitryle czy epitionitryle.

Stopień konwersji glukozynolanów do bioaktywnych pochodnych może decydować o przydatności surowców roślinnych do zastosowania w naturalnym procesie ochrony roślin na drodze biofumigacji. Im większa wydajność uwalniania izotiocyanianów, tym większy potencjał do wykorzystania surowca w walce ze szkodnikami i agrofagami. Bilans procesu degradacji glukozynolanów, a tym samym skuteczność biofumigacyjną, określono na podstawie wyników badań próbek kapusty w zależności od warunków uprawy i obecności metali ciężkich, a także dla poszczególnych części tej rośliny.

IV. 4. 1 Wpływ warunków uprawy kapusty na stopień konwersji glukozynolanów do bioaktywnych pochodnych

Polowe uprawy kapusty odmiany Kamienna Głowa zlokalizowane były na terenach charakteryzujących się zróżnicowaną intensywnością antropopresji. Pozwala to na lepsze prześledzenie zależności pomiędzy kierunkiem degradacji glukozynolanów a warunkami ekologicznymi, wiadomo bowiem, że wzmożony stres chemiczny może stymulować syntezę wtórnych metabolitów roślinnych [243]. W przypadku kilku upraw zastosowano dodatkowe zabiegi agrotechniczne mające na celu ochronę kapusty przed szkodnikami lub zwiększenie biodostępności metali ciężkich obecnych w glebie. Oprócz upraw polowych prowadzono także kontrolowane uprawy wazonowe na glebie ze zróżnicowanym ale ściśle kontrolowanym dodatkiem cynku i/lub kadmu.

W niniejszej pracy przedstawiono wyniki wybranych analiz próbek kapusty Kamienna Głowa pochodzących z upraw polowych (2012) oraz upraw wazonowych (2011, 2012). W tabeli 9 oraz 10 w Części Doświadczalnej (III.2.1) zestawiono informacje, które charakteryzują miejsca upraw, natomiast w następnej tabeli 17 przedstawiono wyniki oznaczeń zawartości poszczególnych bioaktywnych związków w próbkach kapusty pochodzących z upraw polowych (2012). Na podstawie tych danych obliczono bilans procesu przekształcenia glukozynolanów do izotiocyanianów oraz związków indolowych (rys. 35).

Zawartość związków bioaktywnych różni się w badanych próbkach w zależności od miejsca uprawy kapusty. Największą zawartość glukozynolanów (11,78 $\mu\text{mol/g}$ s.m.) stwierdzono w próbkach kapusty uprawianej w Sosnowcu Maczkach. W tym samym materiale odnotowano także największą zawartość izotiocyanianów (11,32 $\mu\text{mol/g}$ s.m.) oraz stopień przekształcenia glukozynolanów do pożądaných bioaktywnych produktów (ok. 99 %, rys. 35). Także duża aktywność enzymatyczna mirozynyazy oznaczona w próbkach tej kapusty pozwala wnioskować o niewielkiej aktywności dodatkowych białek zmieniających kierunek hydrolizy glukozynolanów. Za czynnik wpływający na wysokie stężenie badanych związków w próbkach kapusty pochodzącej ze wspomnianej lokalizacji można uznać większe niż w innych rejonach Polski zanieczyszczenie środowiska, które wywołując stres chemiczny w roślinach mogło indukować biosyntezę wtórnych metabolitów. Jednak w próbkach kapust uprawianych w dwóch innych dzielnicach Sosnowca nie stwierdzono podobnej zależności.

Z kolei wyniki uzyskane dla próbek kapusty uprawianej w Czapielsku można wykorzystać dodatkowo do oceny wpływu stosowanych środków ochrony na zawartość

Tabela 17. Zawartość bioaktywnych związków oraz aktywność enzymatyczna mirozyny oznaczone w próbkach liofilizatów liści kapust odmiany Kamienna Głowa pochodzących z upraw zlokalizowanych na terenach o różnej intensywności antropopresji

Miejsce uprawy/ dodatkowy zabieg agrotechniczny		¹ Glukozynolany [$\mu\text{mol/g s.m.}$]			¹ Izotiocyjaniany	¹ Związki indolowe	² Aktywność mirozyny
		alifatyczne	indolowe	suma	[$\mu\text{mol/g s.m.}$]	[$\mu\text{mol/g s.m.}$]	[U/g s.m.]
Czapielsk	bez oprysków	7,15 ± 0,53	0,68 ± 0,08	7,83 ± 0,32	3,97 ± 0,31	0,38 ± 0,01	1,12 ± 0,14
	Spintor	8,10 ± 1,09	0,89 ± 0,23	8,99 ± 0,61	1,69 ± 0,11	0,31 ± 0,01	1,33 ± 0,05
	Karate	6,58 ± 0,68	0,44 ± 0,18	7,02 ± 0,35	2,15 ± 0,06	0,31 ± 0,01	1,34 ± 0,08
Kraków Mydlniki		2,43 ± 0,14	0,06 ± 0,01	2,49 ± 0,11	0,91 ± 0,11	0,28 ± 0,01	2,11 ± 0,04
Kraków Chełm	kontrola	4,15 ± 0,08	0,13 ± 0,03	4,28 ± 0,04	0,93 ± 0,08	0,12 ± 0,01	1,70 ± 0,49
	CA	4,38 ± 0,16	0,11 ± 0,03	4,49 ± 0,09	1,30 ± 0,16	0,25 ± 0,01	1,75 ± 0,12
	EDDS	2,71 ± 0,07	0,24 ± 0,04	2,95 ± 0,02	0,34 ± 0,05	0,37 ± 0,02	1,76 ± 0,05
Gdańsk Orunia		6,80 ± 0,97	0,12 ± 0,07	6,92 ± 0,64	5,12 ± 0,15	0,21 ± 0,01	1,32 ± 0,09
Sosnowiec	Milowice	6,39 ± 0,66	0,31 ± 0,11	6,71 ± 0,39	2,28 ± 0,14	0,62 ± 0,04	1,43 ± 0,13
	Maczki	11,59 ± 1,25	0,21 ± 0,04	11,78 ± 0,85	11,32 ± 0,13	0,44 ± 0,01	1,85 ± 0,22
	Siemonia	3,86 ± 0,11	0,06 ± 0,01	3,92 ± 0,07	1,55 ± 0,05	0,32 ± 0,01	2,09 ± 0,21

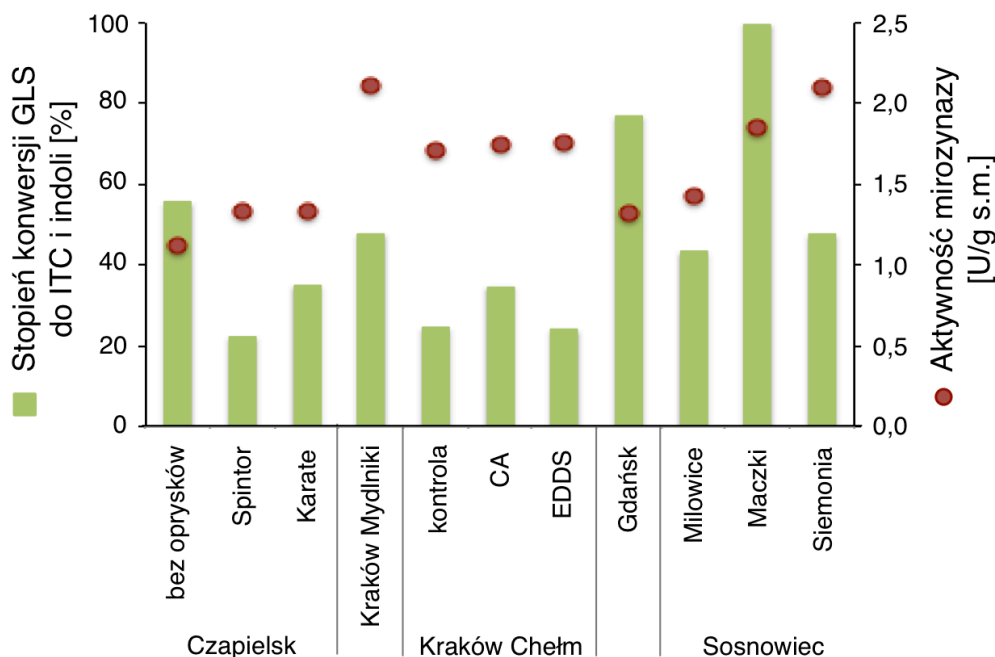
¹ Wyniki są średnią z trzech niezależnych oznaczeń

² Wyniki są średnią z dwóch niezależnych oznaczeń

i konwersję glukozynolanów do bioaktywnych pochodnych. Do ochrony tej uprawy wykorzystano ekologiczny preparat Spintor oraz syntetyczny środek Karate. Spintor to preparat owadobójczy zawierający naturalną substancję aktywną z grupy spinosyn, otrzymywaną w wyniku fermentacji bakterii *Saccharopolyspora spinosa*. Związek ten działa wybiórczo na szkodniki roślinne i według producenta jest bezpieczny dla owadów pożytecznych. Natomiast substancją aktywną w preparacie Karate jest związek z grupy pyretroidów o szerokim spektrum działania owadobójczego. Analiza przedstawionych wyników może być podstawą do stwierdzenia, że ekologiczny preparat ochronny przyczynił się do zwiększenia zawartości zarówno glukozynolanów alifatycznych, jak i indolowych w próbkach kapusty, jednak równocześnie spowodował spadek zawartości bioaktywnych produktów ich hydrolizy. Prawdopodobnie związki obecne w preparacie Spintor indukują aktywność dodatkowych czynników białkowych. Świadczy o tym fakt, że mimo porównywalnej aktywności mirozynazy we wszystkich próbkach kapusty uprawianych w Czapielsku, stopień przekształcenia glukozynolanów do izotiocyjanianów w przypadku kapusty chronionej preparatem Spintor jest najmniejszy (ok. 22 %), podczas gdy dla uprawy chronionej środkiem Karate wynosił on ok. 35 %, a dla uprawy kontrolnej aż 55 %.

W przypadku upraw kapusty odmiany Kamienna Głowa, udostępnionych dzięki uprzejmości dr Renaty Bączek-Kwinty, sprawdzono wpływ czynników zwiększających działanie hiperakumulatorów roślinnych. Podczas uprawy zastosowano dodatek związków chelatujących metale, t.j. kwasu etylenodiaminodibursztynowego (EDDS) oraz kwasu cytrynowego (CA), które zwiększają biodostępność metali pobieranych z gleby. EDDS posiada podobne właściwości chelatujące jak EDTA, jednak jest to związek biodegradowalny. Skuteczność obu kwasów organicznych w zwiększaniu efektywności procesu pobierania metali ciężkich, m.in. Cu, Cd, Pb, Zn, Ni przez rośliny została potwierdzona w licznych publikacjach [244 - 248]. Lektura publikacji może stanowić podstawę do wniosku, że metale ciężkie pobierane przez rośliny kapustowate mogą wpływać na biosyntezę glukozynolanów [243]. W przypadku uprawy zlokalizowanej w Krakowie zwiększona została ilość metali zaabsorbowanych przez kapustę. Stężenie cynku w liściach kapusty wzrosło z 19,03 µg/g s.m. w próbkach kontrolnych do 25,39 µg/g s.m. i 28,15 µg/g s.m. odpowiednio dla próbek z dodatkiem CA i EDDS. Dodatek kwasu cytrynowego spowodował wzrost zawartości zarówno glukozynolanów, jak i izotiocyjanianów w próbkach kapusty w porównaniu do uprawy kontrolnej. Stopień konwersji zwiększył się z ok. 24 % w przypadku kontroli do ok. 35 %. Natomiast dodatek EDDS przyczynił się do zmniejszenia ilości glukozynolanów alifatycznych,

podczas gdy zawartość glukozynolanów indolowych zwiększyła się dwukrotnie w porównaniu do uprawy kontrolnej.



Rysunek 35. Dane obrazujące stopień przekształcenia glukozynolanów do izotiocyjanianów i związków indolowych oraz aktywności mirozynazy w poszczególnych próbkach kapusty odmiany Kamienna Głowa pochodzących z upraw zlokalizowanych na terenach o różnej intensywności antropopresji.

Wykres sporządzono na podstawie danych przedstawionych w tabeli 17

Jednak najprecyzyjniej o wpływie metali ciężkich na zawartość i konwersję glukozynolanów do bioaktywnych pochodnych można wnioskować na podstawie wyników uzyskanych w trakcie analizy próbek kapusty pochodzących z upraw wazonowych na glebie o kontrolowanej zawartości Zn i Cd wzbogaconej znanym dodatkiem wymienionych metali ciężkich (tabela 18). Mimo podobnych warunków uprawy w roku 2011 i 2012, zaobserwowano odmienne zależności. W przypadku próbek z 2011 roku największe stężenie glukozynolanów oznaczono w próbkach kapusty kontrolnej, a obecność metali hamowała syntezę tych związków. Z kolei w roku 2012 zaobserwowano korelację świadczącą o indukcji syntezy glukozynolanów w obecności Zn oraz Cd w glebie. O podobnej zależności można wnioskować na podstawie wyników uzyskanych dla próbek kapusty z wcześniejszych lat uprawy w takich samych warunkach [249]. Zgodnie z danymi literaturowymi także w przypadku innego hiperakumulatora - tobołka alpejskiego - zaobserwowano, że kumulacja Zn powodowała wzmożoną syntezę jednego z typowych dla tej rośliny glukozynolanów - sinalbiny [250]. Z kolei w próbkach rzepaku, obecność Zn wpłynęła na zwiększenie zawartości

Tabela 18. Zawartość bioaktywnych związków oraz aktywność enzymatyczna mirozyny oznaczone w próbkach liofilizatów kapust odmiany Kamienna Głowa pochodzących z upraw wazonowych o kontrolowanej zawartości metali ciężkich

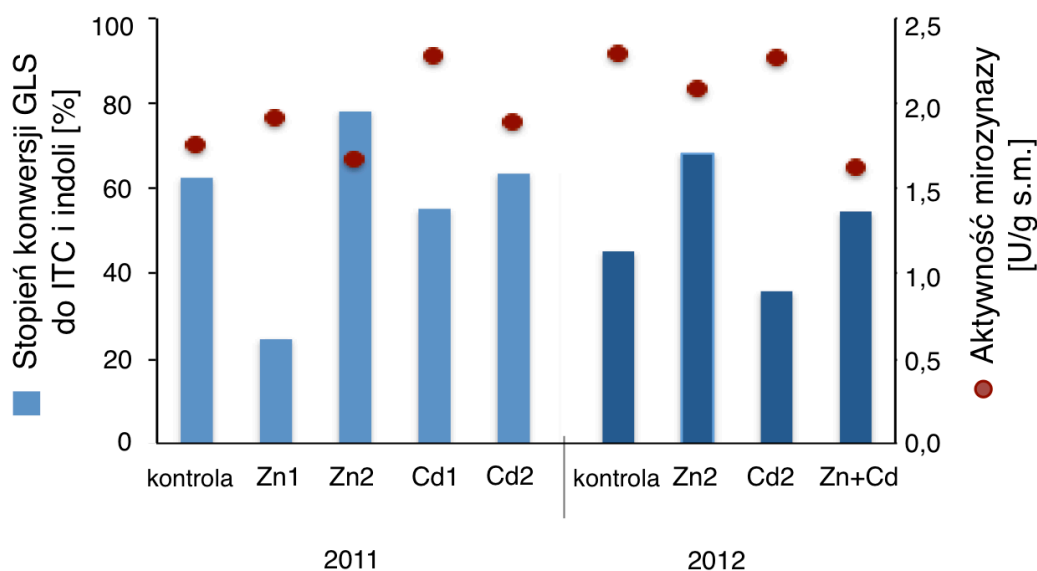
Rodzaj próbki	¹ Glukozynolany [$\mu\text{mol/g s.m.}$]			¹ Izotio- cyjaniany	¹ Związki indolowe	² Aktywność mirozyny	¹ Zawartość metali ciężkich [$\mu\text{g/g s.m.}$]		
	alifatyczne	indolowe	suma	[$\mu\text{mol/g s.m.}$]	[$\mu\text{mol/g s.m.}$]	[U/g s.m.]	Zn	Cd	
Kontrola	4,73 \pm 0,31	0,24 \pm 0,04	4,96 \pm 0,34	2,96 \pm 0,41	0,15 \pm 0,09	1,76 \pm 0,25	48,91 \pm 6,32	0,09 \pm 0,01	
2011	Zn 1	3,08 \pm 0,18	0,26 \pm 0,01	3,34 \pm 0,19	0,69 \pm 0,11	0,14 \pm 0,01	1,91 \pm 0,05	73,68 \pm 2,61	0,09 \pm 0,01
	Zn 2	3,80 \pm 0,33	0,22 \pm 0,07	4,02 \pm 0,39	3,02 \pm 0,39	0,13 \pm 0,01	1,67 \pm 0,21	123,28 \pm 2,83	0,08 \pm 0,01
	Cd 1	2,07 \pm 0,17	0,52 \pm 0,03	2,59 \pm 0,21	1,31 \pm 0,23	0,14 \pm 0,01	2,28 \pm 0,17	48,34 \pm 6,12	4,82 \pm 1,22
	Cd 2	2,91 \pm 0,19	0,21 \pm 0,04	3,11 \pm 0,24	1,75 \pm 0,11	0,23 \pm 0,02	1,89 \pm 0,11	51,67 \pm 6,73	13,06 \pm 1,15
2012	Kontrola	3,31 \pm 0,12	0,74 \pm 0,33	4,05 \pm 0,45	1,69 \pm 0,12	0,14 \pm 0,01	2,29 \pm 0,37	16,76 \pm 1,14	0,07 \pm 0,01
	Zn 2	5,21 \pm 0,38	0,39 \pm 0,37	5,60 \pm 0,75	3,68 \pm 0,19	0,15 \pm 0,01	2,08 \pm 0,13	167,76 \pm 4,21	0,06 \pm 0,01
	Cd 1	4,94 \pm 0,49	0,18 \pm 0,03	5,12 \pm 0,52	1,67 \pm 0,04	0,17 \pm 0,02	2,27 \pm 0,21	24,30 \pm 1,11	6,25 \pm 1,21
	Zn + Cd	7,09 \pm 0,21	0,27 \pm 0,13	7,37 \pm 0,35	3,73 \pm 0,36	0,31 \pm 0,02	1,62 \pm 0,14	119,42 \pm 5,65	1,01 \pm 0,05

¹ Wyniki są średnią z trzech niezależnych oznaczeń

² Wyniki są średnią z dwóch niezależnych oznaczeń

glukozynolanów indolowych, jednocześnie zanotowano zmniejszenie zawartości glukozynolanów alifatycznych, m.in. glukonapiny [251]. Wpływ metali na proces syntezy glukozynolanów nie jest do końca wyjaśniony, ponieważ wyniki niektórych badań wskazują na zwiększenie zawartości tych związków w roślinach kapustowatych kumulujących metale ciężkie [252], natomiast na podstawie innych wyników można wnioskować o przeciwnym efekcie [243, 253 - 255] lub nawet braku takiej zależności [250].

W próbkach kapusty uprawianej na glebie z dodatkiem cynku w ilości 200 mg/kg można zaobserwować podwyższony stopień konwersji glukozynolanów do pożądaných pochodnych w porównaniu do kontroli (rys. 36). W tych próbkach, opisanych jako Zn2, oznaczono najwięcej izotiocyjanianów. Może to świadczyć o selektywnym hamującym wpływie wysokich stężeń cynku na działanie dodatkowych czynników białkowych zmieniających kierunek hydrolizy glukozynolanów. Innym wyjaśnieniem jest to, że być może podwyższona zawartość cynku w liściach kapusty wpływa stabilizująco na samą mirozynazę, która w swej strukturze zawiera jony Zn^{2+} . Podobny efekt można zaobserwować także w próbkach kapusty uprawianej na glebie z jednoczesnym dodatkiem Zn i Cd, choć wydaje się, że obecność Cd ogranicza pozytywny wpływ cynku.



Rysunek 36. Informacje obrazujące stopień przekształcenia glukozynolanów do izotiocyjanianów i związków indolowych oraz aktywność mirozynazy w próbkach kapusty odmiany Kamienna Głowa pochodzących z dwóch okresów upraw wazonowych o kontrolowanej zawartości metali ciężkich.

Wykres sporządzono na podstawie danych przedstawionych w tabeli 18. Wykorzystane oznaczenia odnoszą się do upraw o określonego dodatku metali ciężkich: Zn1 - 50 mg Zn/kg s.m. gleby, Zn2 - 200 mg Zn/kg s.m. gleby, Cd1 - 10 mg Cd/ kg s.m. gleby, Cd2 - 40 mg Cd/ kg s.m. gleby, Zn+Cd - 200 mg Zn + 40 mg Cd/ kg s.m. gleby

Innym pierwiastkiem, którego wpływ na stopień konwersji glukozynolanów w roślinach kapustowatych oceniano jest selen. Badania te służyły dwóm celom - ocenie zdolności akumulacji selenu, gdy stanowi on zanieczyszczenie środowiskowe, oraz możliwości wzbogacenia w selen żywności funkcjonalnej służącej zwalczaniu niedoborów żywieniowych tego mikroelementu. Drugi powód zadecydował o wyborze materiału badawczego – kiełków roślin kapustowatych.

Całkowita zawartość selenu w otrzymanych kiełkach wynosiła od 2,6 do 4,1 $\mu\text{g/g}$ s.m. dla próbek kiełków uprawianych bez dodatku selenu oraz 138 - 400 $\mu\text{g/g}$ s.m. dla kiełków podlewanych wodą z dodatkiem SeO_2 (tabela 19). Znaczna zmiana zawartości potwierdza tezę, że rośliny kapustowate charakteryzują się zdolnością do pobierania i kumulowania określonych związków, w tym przypadku ditlenku selenu. Wyniki uzyskane w trakcie analiz próbek wskazują, że dodatek selenu podczas kiełkowania nie ma wpływu na zawartość glukozynolanów w otrzymanych kiełkach. O braku zależności między obecnością selenu a zawartością i profilem glukozynolanów można również wnioskować na podstawie wyników badań przeprowadzonych dla próbek dojrzałych brokułów, w których zawartość selenu po 6 tygodniach uprawy z dodatkiem Na_2SeO_4 oznaczono na poziomie 400 $\mu\text{g/g}$ s.m. [256]. Podobne wyniki uzyskano w trakcie badań próbek kiełków brokułów hodowanych przez 7 dni na pożywkach zawierających selen (50 μM Na_2SeO_4 lub Na_2SeO_3), w których zawartość selenu oznaczono odpowiednio w ilości 178,9 i 97,8 $\mu\text{g/g}$ s.m [257]. Jednak wyniki innych badań wskazują na obniżoną, nawet o 70 %, zawartość glukozynolanów w próbkach brokułów wzbogaconych w selen w porównaniu do próbek kontrolnych [258, 259].

Zwiększona zawartość selenu w otrzymanych kiełkach nie miała również wpływu na aktywność enzymatyczną mirozynazy. Zawartość izotiocyjanianów w przypadku wszystkich roślin kapustowatych została oznaczona na podobnym poziomie (0,09 - 0,39 $\mu\text{mol/g}$ s.m.), co stanowiło mniej niż 1 % całkowitej zawartości glukozynolanów (rys. 37). Stwierdzono wyższe poziomy zawartość nityli oraz epitionityli. Może to świadczyć o znaczącej aktywności białek ESP w badanych kiełkach. Wśród pozostałych produktów hydrolizy glukozynolanów oznaczonych w próbkach kiełków można wymienić goitrynę w przypadku próbek kiełków kapusty oraz alkohol 4-hydroksybenzylowy i kwas 4-hydroksybenzylloctowy w próbkach kiełków gorczycy. Fakt, że suma wszystkich produktów hydrolizy oznaczonych w próbkach kiełków jest mniejsza niż początkowa ilość glukozynolanów może świadczyć o dalszych przemianach powstałych związków i powstawaniu wtórnych pochodnych, które nie były wykrywane przy użyciu zastosowanych procedur analitycznych.

Tabela 19. Zawartość glukozynolanów i produktów ich enzymatycznej degradacji [$\mu\text{mol/g s.m.}$], zawartość selenu [$\mu\text{mol/g s.m.}$] oraz aktywność enzymatyczna mirozynyzy [U/g s.m.] oznaczone w próbkach liofilizatów kiełków wybranych roślin kapustowatych

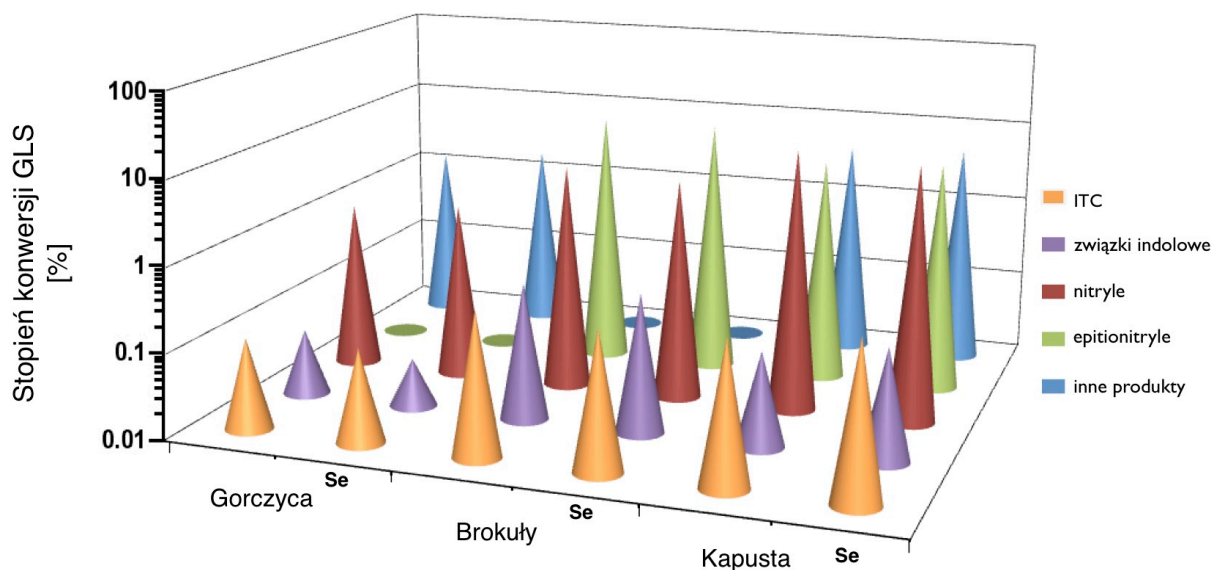
Rodzaj kiełków	¹ Zawartość selenu [$\mu\text{mol/g s.m.}$]	¹ Glukozynolany [$\mu\text{mol/g s.m.}$]	¹ Izotiocyaniany [$\mu\text{mol/g s.m.}$]	¹ Związki indolowe [$\mu\text{mol/g s.m.}$]	¹ Nitryle [$\mu\text{mol/g s.m.}$]	¹ Epi-tionitryle [$\mu\text{mol/g s.m.}$]	¹ Inne produkty *	² Aktywność mirozynyzy [U/g s.m.]	Sumaryczny stopień konwersji GLS [%]**
Brokuły	2,60 ± 0,82	67,11 ± 7,45	0,31 ± 0,01	0,33 ± 0,02	3,27 ± 0,11	7,86 ± 0,28	nie oznaczono	1,12 ± 0,15	18,82
Brokuły + Se	400 ± 29	72,95 ± 8,34	0,39 ± 0,04	0,31 ± 0,03	4,18 ± 0,22	8,97 ± 0,14	nie oznaczono	0,87 ± 0,11	17,51
Kapusta	4,1 ± 1,6	46,57 ± 5,16	0,35 ± 0,01	0,07 ± 0,01	5,76 ± 0,71	2,98 ± 0,35	2,36 ± 0,15	1,15 ± 0,12	25,58
Kapusta + Se	382 ± 17	48,19 ± 0,02	0,25 ± 0,01	0,10 ± 0,02	7,10 ± 0,47	2,57 ± 0,26	2,12 ± 0,31	1,11 ± 0,11	25,19
Gorzycza	3,6 ± 1,1	83,94 ± 2,07	0,11 ± 0,03	0,05 ± 0,02	1,19 ± 0,06	brak	1,58 ± 0,14	1,43 ± 0,21	2,75
Gorzycza + Se	138 ± 12	72,87 ± 8,49	0,09 ± 0,04	0,03 ± 0,01	0,81 ± 0,29	brak	1,02 ± 0,08	1,31 ± 0,13	3,50

¹ Wyniki są średnią z trzech niezależnych oznaczeń

² Wyniki są średnią z dwóch niezależnych oznaczeń

* w próbkach kiełków gorzycy: alkohol 4-hydroksybenzylowy oraz kwas 4-hydroksybenzylowoctowy, w próbkach kiełków kapusty: goitryna

** uwzględniono wyłącznie stopień przekształcenia glukozynolanów do wszystkich oznaczonych produktów hydrolizy



Rysunek 37. Informacje obrazujące stopień przekształcenia glukozynolanów do poszczególnych produktów enzymatycznej degradacji oznaczony w próbkach kiełków roślin kapustowatych o standardowej lub podwyższonej zawartości selenu.

Wykres sporządzono na podstawie danych przedstawionych w tabeli 19

Celem przedstawionych badań było określenie zależności pomiędzy obecnością metali ciężkich (cynk, kadm) oraz selenu w środowisku wzrostowym a zdolnością ich akumulacji przez rośliny kapustowate oraz stopniem konwersji glukozynolanów do bioaktywnych pochodnych. Nie udało się zaobserwować jednoznacznej korelacji między ilością zakumulowanych pierwiastków a biologiczną odpowiedzią rośliny, których miarą jest zawartość bioaktywnych związków, aktywność mirozynyazy czy dodatkowych czynników białkowych. Należy jednak pamiętać, że stres chemiczny nie jest jedynym czynnikiem warunkującym metabolizm glukozynolanów, także warunki klimatyczne oraz narażenie na ataki szkodników mogą wpływać na kondycję uprawianych roślin.

Z punktu widzenia konsumenta należy pamiętać, że zdolność roślin kapustowatych do akumulacji metali ciężkich niesie ze sobą ryzyko zdrowotne spożycia pobranych zanieczyszczeń wraz z żywnością.

IV.4.2 Porównanie zawartości glukozynolanów i produktów ich degradacji w poszczególnych częściach wybranych roślin kapustowatych

Biorąc pod uwagę fakt, że glukozynolany są obecne we wszystkich częściach roślin kapustowatych [45], pozostałości po wykorzystaniu części jadalnych, takie jak korzenie, liście, łodygi, mogą być źródłem bioaktywnych związków siarkoorganicznych i stanowić cenny

surowiec, np. do produkcji suplementów diety. Na rynku są już dostępne preparaty produkowane z nasion rzodkwi, kiełków oraz korzenia brokuła i jarmużu (np. firmy Solgar, USA). Pozostałości te można także wykorzystać do produkcji środków ochrony roślin działających na drodze biofumigacji.

W tabeli 20 przedstawiono wyniki oznaczeń zawartości glukozynolanów i wybranych produktów ich hydrolizy oraz aktywności enzymatycznej mirozynazy dla próbek poszczególnych części roślin kapustowatych - kapusty białej i włoskiej, rzodkwi oraz brukselki. Na tej podstawie obliczono stopień konwersji glukozynolanów do izotiocyjanianów oraz związków indolowych jako najbardziej pożądaných pochodnych (rys. 38).

Z danych przedstawionych w tabeli 20 można wnioskować, że zawartość bioaktywnych związków różni się w obrębie jednej rośliny nie tylko w zależności od stadium jej rozwoju, ale także badanej części. Przykładowo, całkowita zawartość glukozynolanów w próbkach brukselki waha się od 1,8 do 27,5 $\mu\text{mol/g}$, odpowiednio dla liści i nasion. W przypadku każdej badanej rośliny największe ilości glukozynolanów oznaczano w próbkach nasion i kiełków. Co ciekawe, w próbkach nasion nie wykryto glukozynolanów indolowych (poniżej wartości liczbowej parametru LOD), a zawartość związków indolowych po hydrolizie oznaczono na minimalnym poziomie. Dane literaturowe także wskazują na brak glukozynolanów indolowych lub ich śladowe ilości w nasionach rzodkiewnika [260] oraz kapusty białej [261]. Całkowita zawartość glukozynolanów oznaczona w próbkach nasion była około dwa razy większa w porównaniu do zawartości glukozynolanów w próbkach kiełków. Wyjątkiem były próbki kapusty białej, w których zaobserwowano odwrotną zależność. W literaturze także można znaleźć doniesienia o spadku zawartości glukozynolanów podczas kiełkowania nasion. Przykładowo, w próbkach nasion brokułów zawartość glukozynolanów oznaczono na poziomie 910 mg/100 g s.m., podczas gdy po 3 dniach kiełkowania wartość ta spadła do 520 mg/100 g s.m. Wraz z rozwojem kiełków, zawartość glukozynolanów była coraz mniejsza, odpowiednio 195 i 176 mg/100 g s.m. po 7 i 14 dniach [262]. Podobną zależność zaobserwowano także dla nasion i kiełków rukoli, dwurzędu [263], gorczycy czarnej [264], rzodkiewnika [260] oraz rzodkwi [265].

Zawartości glukozynolanów w poszczególnych częściach dojrzałych roślin jest bardzo zróżnicowana, jednak ich najmniejszą ilość oznaczono w części jadalnej każdej z roślin. Stosunkowo duża ilość glukozynolanów (7,9 - 22,1 $\mu\text{mol/g}$ s.m.) występuje w próbkach korzeni. Jest to zgodne z danymi literaturowymi, gdzie zawartość tych związków w próbkach korzeni badanych gatunków roślin kapustowatych podawana w różnych doniesieniach była na poziomie 15 - 24 $\mu\text{mol/g}$ s.m. [260, 266].

Tabela 20. Zawartość glukozynolanów, izotiocyjanianów, związków indolowych oraz aktywność enzymatyczna mirozynazy oznaczone w próbkach liofilizatów uzyskanych z poszczególnych części badanych roślin kapustowatych

Rodzaj próbki	¹ Glukozynolany [$\mu\text{mol/g s.m.}$]			¹ Izotiocyjaniany	¹ Związki indolowe	² Aktywność mirozynazy	
	alifatyczne	indolowe	suma	[$\mu\text{mol/g s.m.}$]	[$\mu\text{mol/g s.m.}$]	[U/g s.m.]	
Kapusta biała	nasiona	21,03 \pm 3,52	< LOD	21,03 \pm 3,52	4,14 \pm 0,14	0,0058 \pm 0,0003	1,38 \pm 0,06
	kiełki	41,01 \pm 7,97	0,29 \pm 0,21	41,30 \pm 7,76	0,25 \pm 0,01	0,073 \pm 0,005	1,15 \pm 0,12
	liście (część jadalna)	5,70 \pm 1,09	1,84 \pm 0,34	7,54 \pm 0,72	4,88 \pm 0,21	0,61 \pm 0,07	0,53 \pm 0,13
	głąb	13,15 \pm 2,59	0,08 \pm 0,02	13,23 \pm 0,68	2,94 \pm 0,14	0,027 \pm 0,001	0,35 \pm 0,06
	korzeń	21,68 \pm 4,46	0,41 \pm 0,03	22,09 \pm 1,97	5,51 \pm 0,11	0,17 \pm 0,01	0,78 \pm 0,07
Kapusta włoska	nasiona	33,38 \pm 4,08	< LOD	33,38 \pm 4,08	23,74 \pm 0,61	0,034 \pm 0,001	1,03 \pm 0,08
	kiełki	16,25 \pm 1,27	0,84 \pm 0,13	17,09 \pm 1,39	0,79 \pm 0,02	0,14 \pm 0,01	0,92 \pm 0,01
	liście (część jadalna)	1,59 \pm 0,13	2,09 \pm 0,27	3,68 \pm 0,13	1,17 \pm 0,11	0,079 \pm 0,005	0,31 \pm 0,07
	korzeń	8,14 \pm 0,58	3,26 \pm 0,76	11,39 \pm 0,18	0,67 \pm 0,02	0,17 \pm 0,01	0,78 \pm 0,21

Rodzaj próbki	Glukozynolany [$\mu\text{mol/g s.m.}$]			Izotiocyjaniany	Związki indolowe	Aktywność mirozynazy	
	alifatyczne	indolowe	suma	[$\mu\text{mol/g s.m.}$]	[$\mu\text{mol/g s.m.}$]	[U/g s.m.]	
Brukselka	nasiona	27,48 \pm 4,89	< LOD	27,48 \pm 4,89	4,79 \pm 0,04	0,0036 \pm 0,0001	0,92 \pm 0,11
	kiełki	12,36 \pm 0,78	3,67 \pm 0,44	16,03 \pm 1,76	0,38 \pm 0,01	0,15 \pm 0,01	1,15 \pm 0,02
	główki liściaste (część jadalna)	1,32 \pm 0,13	4,52 \pm 0,61	5,83 \pm 0,47	3,36 \pm 0,23	0,089 \pm 0,005	0,64 \pm 0,09
	łodyga	15,64 \pm 0,17	0,32 \pm 0,07	15,96 \pm 0,18	3,07 \pm 0,11	0,093 \pm 0,003	0,72 \pm 0,27
	liście	1,48 \pm 0,05	0,37 \pm 0,04	1,84 \pm 0,07	0,08 \pm 0,01	0,024 \pm 0,001	1,01 \pm 0,33
	korzeń	6,72 \pm 0,28	1,26 \pm 0,26	7,98 \pm 0,02	4,49 \pm 0,03	0,16 \pm 0,01	0,82 \pm 0,15
Rzodkiew	nasiona	41,09 \pm 6,71	< LOD	41,09 \pm 6,71	2,74 \pm 0,07	0,014 \pm 0,001	1,35 \pm 0,14
	kiełki	20,41 \pm 3,02	1,03 \pm 0,01	21,44 \pm 3,01	9,67 \pm 0,03	0,0091 \pm 0,0004	1,32 \pm 0,17
	korzeń (część jadalna)	2,67 \pm 0,31	0,44 \pm 0,01	3,12 \pm 0,29	0,16 \pm 0,01	0,016 \pm 0,001	0,71 \pm 0,08
	łodyga	3,01 \pm 0,07	0,23 \pm 0,02	3,24 \pm 0,05	2,19 \pm 0,07	0,077 \pm 0,001	1,04 \pm 0,04
	liście	3,82 \pm 0,28	0,89 \pm 0,75	4,71 \pm 0,47	4,61 \pm 0,16	0,25 \pm 0,01	0,71 \pm 0,11

< LOD - poniżej granicy wykrywalności

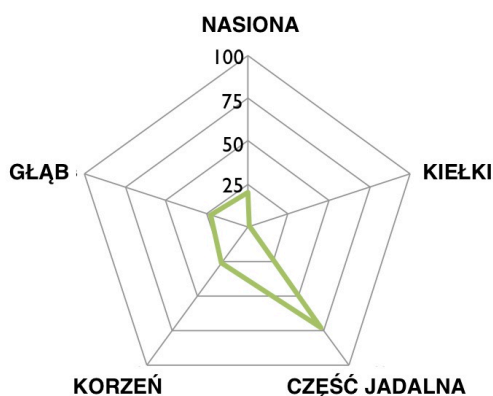
¹ Wyniki są średnią z trzech niezależnych oznaczeń

² Wyniki są średnią z dwóch niezależnych oznaczeń

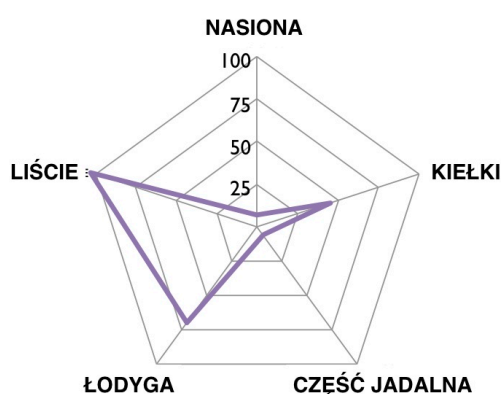
Biorąc pod uwagę oznaczoną aktywność enzymatycznej mirozynyzy, można stwierdzić, że największą aktywnością tego enzymu charakteryzują się próbki nasion oraz kiełków. W porównaniu do części jadalnych większą aktywność tego enzymu stwierdzono także w próbkach nasion brokułów, rzepy, kalarepy oraz kapusty białej i włoskiej [73]. Jak wspomniano w części teoretycznej pracy, aktywność mirozynyzy w próbkach kapusty abisyńskiej została oznaczona na najwyższym poziomie w próbkach nasion i zmniejszała się wraz z rozwojem rośliny. Jednocześnie obserwowano stopniowy spadek aktywności białka ESP [112]. Na podstawie różnic w stopniu konwersji glukozynolanów do izotiocyjanianów oraz związków indolowych w badanych próbkach można także wnioskować o obecności i znacznej aktywności dodatkowych czynników białkowych wpływających na kierunek hydrolizy glukozynolanów, często wręcz decydującej o bardzo niskiej zawartości pożądaných produktów.

Na podstawie przedstawionych wyników (rys. 38) nie można określić jednoznacznej korelacji między stadium rozwoju rośliny a stopniem konwersji glukozynolanów do bioaktywnych pochodnych. W próbkach nasion oznaczono dość mały stopień konwersji (6,7 - 19,7 %), jednak od zależności tej odbiegają wyniki analiz przeprowadzonych dla próbek nasion kapusty włoskiej, w których stopień konwersji oznaczono na najwyższym poziomie (71,2 %) w porównaniu do pozostałych części tej rośliny. Stopień konwersji w próbkach kiełków oznaczono na bardzo małym poziomie (0,8 - 5 %), jednak w próbkach kiełków rzodkwi wartość ta wynosi aż ok. 45 %. Takie zróżnicowanie pomiędzy wynikami uzyskanymi dla odmiennych rodzajów kiełków są zgodne z danymi literaturowymi. Przykładowo, w próbkach rzodkwi stopień konwersji glukozynolanów do izotiocyjanianów oraz związków indolowych został oznaczony na poziomie 17 - 58 %, w zależności od odmiany [171], a w próbkach kiełków rzepy japońskiej wynosił aż 94 % [170]. Natomiast dla próbek kiełków gorczycy i brokułów stopień konwersji określono na poziomie odpowiednio 0,2 i 1 % [101]. Na podstawie tych wyników można kwestionować powszechny pogląd o wysokim potencjale zdrowotnym kiełków roślin kapustowatych, ponieważ zawierają one małe ilości izotiocyjanianów. Jednocześnie oznacza to, że w wyniku hydrolizy glukozynolanów powstały inne produkty o mniej korzystnych właściwościach prozdrowotnych, jak to wykazano w innych badaniach [101].

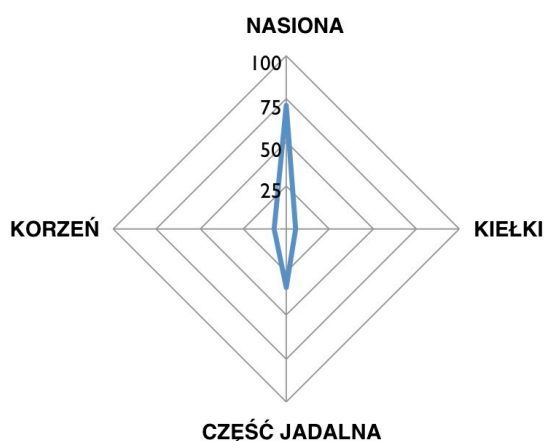
KAPUSTA BIAŁA



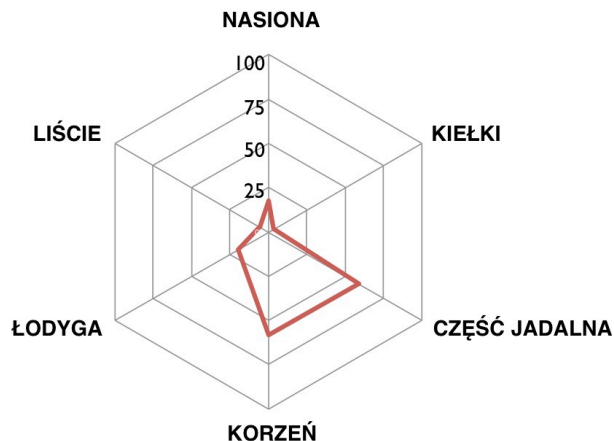
RZODKIEW



KAPUSTA WŁOSKA



BRUKSELKA



Rysunek 38. Informacje obrazujące stopień przekształcenia glukozynolanów do izotiocyjanianów oraz związków indolowych w poszczególnych częściach badanych roślin kapustowatych.

Na osiach umieszczono stopień konwersji wyrażony w procentach. Wykresy sporządzono na podstawie danych przedstawionych w tabeli 20

Stopień konwersji w próbkach korzeni badanych roślin oznaczono na poziomie ok. 7 - 59 %. Ze względu na ważne funkcje korzenia, m.in. dostarczanie wody i substancji odżywczych, można by się spodziewać większej konwersji w badanych próbkach, ponieważ ochrona tej części przed atakami szkodników jest kluczowa dla rozwoju rośliny. W próbkach części jadalnych także oznaczono różny stopień konwersji w zakresie 6 - 73 %, odpowiednio dla rzodkwi i kapusty białej. Porównanie uzyskanych wyników z danymi literaturowi jest niemożliwe ze względu na brak prac opisujących podobne analizy. Większość opisanych dostępnych wyników służy określeniu zawartości i profilu glukozynolanów albo osobno izotiocyjanianów w roślinach kapustowatych, jednak brakuje powiązania między tymi danymi.

Uzyskane wyniki pozwalają na wielokierunkową interpretację. Na ich podstawie można wnioskować o roli glukozynolanów w naturalnej ochronie roślin, nie należy bowiem zapominać, że system „glukozynolany – mirozyna” służy roślinie przede wszystkim jako obrona przed atakami szkodników. Różna zawartość glukozynolanów, odmienny kierunek ich degradacji (czyli zróżnicowana aktywność czynników białkowych) i wynikający z tego nierównomierny stopień ochrony może sugerować, które części dla rośliny są ‘cenniejsze’ i wymagające większego zabezpieczenia.

Analiza wyników pod kątem żywienia człowieka pozwala wnioskować, że obecność w diecie warzyw kapustowatych niekoniecznie musi oznaczać spożycia dużej ilości prozdrowotnych izotiocyjanianów. Tak cenione do tej pory kiełki, w świetle przedstawionych wyników badań, wcale nie wydają się aż tak bogatym źródłem bioaktywnych fitozwiązków. Ponadto ich spożycie, ze względu na zawartość indolowych oraz niewiadomych pochodnych degradacji glukozynolanów o nieznanym działaniu biologicznym może przynieść wręcz odwrotny od zmierzonego skutek zdrowotny. Dlatego należy zmienić powszechny sposób oceny zdrowotności warzyw kapustowatych według zawartości glukozynolanów.

Tym niemniej wysoka zawartość glukozynolanów oraz korzystny przebieg procesu ich degradacji skutkujący stosunkowo wysokim poziomem izotiocyjanianów wskazuje na potencjalne możliwości wykorzystania innych niż jadalne części roślin kapustowatych jako surowca do produkcji suplementów diety oraz biofumigantów. Pozostałości te stanowią doskonałe źródło bioaktywnych związków siarkoorganicznych, których potencjał jest obecnie niewykorzystany. Wyjątkowo zachęcająco wyglądają wyniki uzyskane dla próbek liści rzodkwi, w których stopień konwersji glukozynolanów oznaczono na poziomie bliskim 100 %. W związku z tym materiał ten mógłby być wykorzystany jako naturalny środek ochrony roślin zarówno w formie nawozu, jak i specjalnie przygotowanego preparatu. Gdyby pozostałe niejadalne części roślin, w którym oszacowany stopień konwersji glukozynolanów jest niższa, mogły zostać poddane dodatkowym procesom mającym na celu zwiększenie zawartości izotiocyjanianów poprzez selektywną inaktywację dodatkowych czynników białkowych promujących powstawanie mniej aktywnych produktów, stałyby się one tanim, dostępnym i cennym surowcem dla różnych gałęzi przemysłu rolno-spożywczego. Opracowanie takiego sposobu na zwiększenie stopnia konwersji było przedmiotem badań, które opisano w dalszej części pracy. Uwzględniono przy tym także możliwość zwiększenia skali procesu do poziomu uzasadniającego ekonomicznie przemysłową produkcję.

IV. 5 **Możliwość ukierunkowania hydrolizy glukozynolanów**

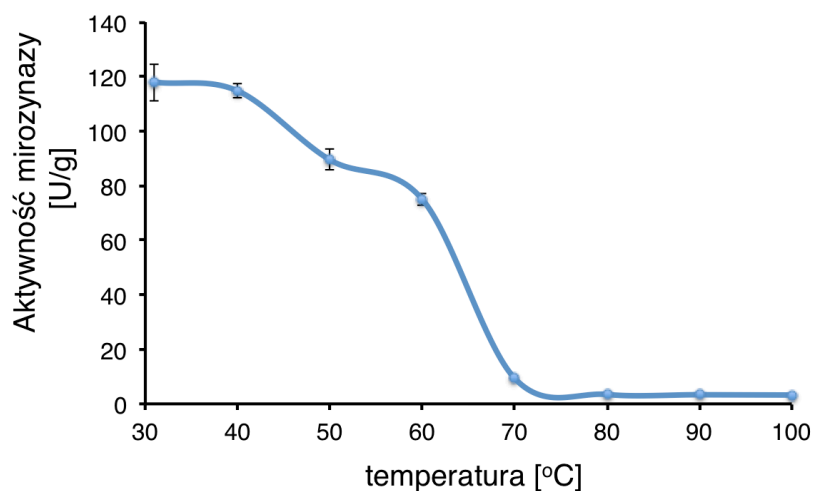
Na podstawie wyników przedstawionych w poprzednim rozdziale można wnioskować, że nie tylko zawartość glukozynolanów, ale także ich hydroliza do bioaktywnych produktów przebiega odmiennie w zależności od rodzaju badanej rośliny, jej części i fazy rozwoju, a także warunków klimatycznych oraz poziomu antropopresji na terenie uprawy. Z kolei na kierunek reakcji podczas pierwszego etapu enzymatycznej degradacji glukozynolanów, jak już wspomniano, wpływ ma aktywność mirozynyzy, a na kolejnych etapach hydrolizy dodatkowe czynniki białkowe biorące udział w dalszych przemianach tiohydroksymu-O-sulfonowego. Ostateczny skład powstałych pochodnych będzie więc zależny przede wszystkim od składu i aktywności wspomnianych czynników. W dalszej części rozprawy przedstawiono wyniki badań nad możliwością ukierunkowania procesu degradacji glukozynolanów poprzez selektywną inaktywację tych czynników białkowych, których obecność zmniejsza wydajność tworzenia izotiocyanianów. Opracowanie odpowiedniej metody inaktywacji tych białek, przy zachowaniu jak największej aktywności mirozynyzy ma na celu stworzenie optymalnych warunków przebiegu procesu hydrolizy glukozynolanów, tzn. prowadzącej do powstawania tylko izotiocyanianów, czyli produktów najbardziej pożądaných z punktu widzenia procesu biofumigacji oraz skuteczności profilaktyki nowotworów i innych dietozależnych chorób przewlekłych.

IV. 5. 1 **Wpływ wybranych czynników fizycznych na aktywność enzymatyczną preparatu mirozynyzy**

Początkowy etap badań obejmował określenie wpływu wybranych czynników fizycznych (wysoka i niska temperatura, wysokie ciśnienie, promieniowanie mikrofalowe) na aktywność enzymatyczną wodnych roztworów handlowego preparatu mirozynyzy wyizolowanej z nasion gorczycy. Kluczowym założeniem przy podejmowaniu tych badań było to, że można znaleźć takie warunki fizyko-chemiczne, które zachowują aktywność mirozynyzy ale powodują inaktywację innych czynników białkowych odpowiedzialnych za przemiany glukozynolanów. Pierwszy krok wymagał ustalenia odporności mirozynyzy na czynniki środowiskowe. Ze względu na większą czułość metody, oznaczenia aktywności enzymatycznej prowadzono korzystając z metody spektrofotometrycznej wykorzystując glukotropaeolinę jako substrat. Uzyskane wyniki stały się podstawą do wyboru parametrów poszczególnych procesów, które następnie zostały zastosowane w dalszych badaniach nad ukierunkowaniem procesu degradacji glukozynolanów z wykorzystaniem materiału roślinnego.

IV. 5. 1. 1 Wpływ wysokiej temperatury

Na rysunku 39 przedstawiono wyniki obrazujące wpływ ogrzewania na aktywność enzymatyczną preparatu handlowego mirozynyzy. Na ich podstawie można stwierdzić, że wzrost temperatury w zakresie 40 - 60°C powoduje stopniową utratę aktywności enzymu, natomiast w temperaturze powyżej 70°C następuje jego całkowita inaktywacja.



Rysunek 39. Wpływ podwyższonej temperatury na aktywność enzymatyczną handlowego preparatu mirozynyzy.

Przedstawione wyniki są średnią z trzech pomiarów \pm SD, aktywność enzymu oznaczono za pomocą metody spektrofotometrycznej.

Uzyskane wyniki zgodne są z obserwacjami innych badaczy dotyczącymi wpływu podwyższonej temperatury na aktywność enzymatyczną mirozynyzy zawartej w różyczkach brokułów, gdzie wykazano, że stopniowa inaktywacja tego enzymu rozpoczyna się po 10-minutowym okresie ogrzewania w temperaturze 45°C, a całkowita utrata aktywności następuje w temperaturze powyżej 70°C. Natomiast wartości te dla enzymu obecnego w soku z brokułów są niższe, bowiem znaczny spadek aktywności, aż o 80 %, obserwowany był już w temperaturze 50°C [267]. Z kolei ten sam enzym wyizolowany z brokułów traci aktywność już po ogrzewaniu w temperaturze 35°C [268]. Taka różnica w termostabilności może świadczyć o stabilizującym wpływie matrycy roślinnej na enzym. Natomiast wyniki badań nad aktywnością mirozynyzy obecnej w kapuście białej mogą być podstawą do stwierdzenia, że enzym ten jest stabilny podczas 10-minutowego ogrzewania w temperaturze 35°C. Całkowita utrata aktywności enzymu następuje po ogrzewaniu roztworu wodnego zawierającego liofilizat z kapusty przez 10 minut w temperaturze 60°C [269]. Inne dane literaturowe wskazują na największą termostabilność mirozynyzy pochodzącej z nasion gorczycy białej, nawet 10-minutowe ogrzewanie w temperaturze 60°C nie powodowało zmniejszenia aktywności enzymu. Wyniki te uzyskano dla enzymu wyizolowanego z materiału roślinnego

i zawieszono w roztworze buforowym (bufor Bis-Tris, pH 6,5) zawierającym 3,38 mM kwasu askorbinowego oraz 0,15 mM MgCl₂ [270]. Poniżej przedstawiono dane literaturowe na temat termostabilności mirozynazy w wybranych roślinach kapustowatych (tabela 21).

Tabela 21. Informacje literaturowe na temat termostabilności mirozynazy w wybranych roślinach kapustowatych (po 10 minutach ogrzewania)

Warzywo	Typ próbki	Temperatura, po której następuje spadek aktywności enzymatycznej*	Literatura
Rzepak	nasiona wodny ekstrakt	90°C 65°C	271
Gorzycza	wodny ekstrakt	60°C	270
Biała kapusta	wodny ekstrakt wodny ekstrakt	60°C 35°C	80, 269
Czerwona kapusta	wodny ekstrakt sok	60°C 40°C	56, 80
Brukselka	wodny ekstrakt	50°C	272
Brokuły	różyczki sok wodny ekstrakt	45°C 40°C 30°C	267, 268

* po działaniu temperatury wyższej niż określona następuje zmniejszenie aktywności mirozynazy w porównaniu do próbki kontrolnej nie poddanej żadnej obróbce

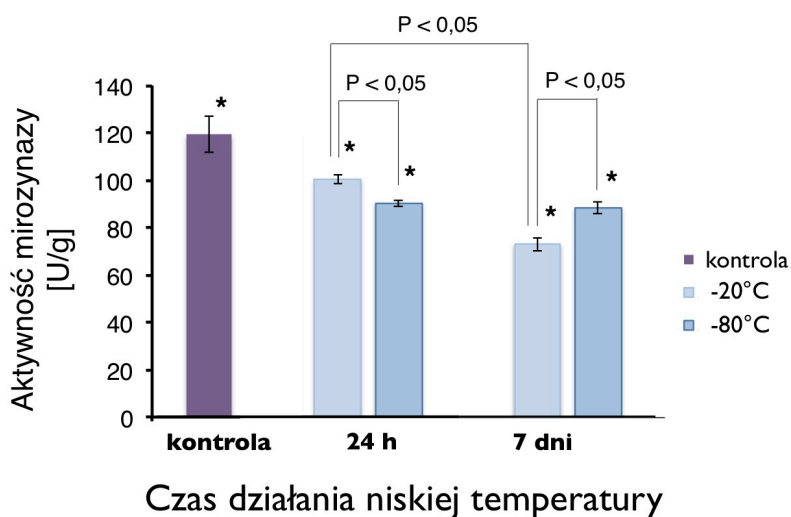
Na podstawie przedstawionych wyników można stwierdzić, że termostabilność mirozynazy zależy do rodzaju rośliny, z której enzym pochodzi oraz postaci, do jakiej został zatężony. Niezależnie od postaci preparatu enzymatycznego można wnioskować, że badany enzym jest wrażliwy na działanie podwyższonej temperatury.

IV. 5. 1. 2 Wpływ niskiej temperatury

Wpływ działania niskiej temperatury na aktywność enzymatyczną mirozynazy zbadano wykorzystując próbki roztworu preparatu enzymatycznego przechowywanego w dwóch temperaturach przez różne okresy czasu (rys. 40). Przechowywanie próbek w temperaturze -80°C przez 24 godziny spowodowało większą utratę aktywności enzymu niż w temperaturze -20°C, jednak osiągnięta aktywność utrzymywała się na stabilnym poziomie przez dłuższy czas. Natomiast w przypadku zamrożenia w temperaturze -20°C aktywność spadła znacząco po 7-dniowym przechowywaniu. Jest to dodatkowa wskazówka, że planując oznaczenia

aktywności mirozynyzy nie powinno się przechowywać roztworu enzymu, tylko przygotowywać go bezpośrednio przez pomiarami.

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że mirozyna nie jest wrażliwa na działanie niskiej temperatury, zatem operacje wykorzystujące takie warunki są bezpieczne dla enzymu i nie grożą utratą jego aktywności.



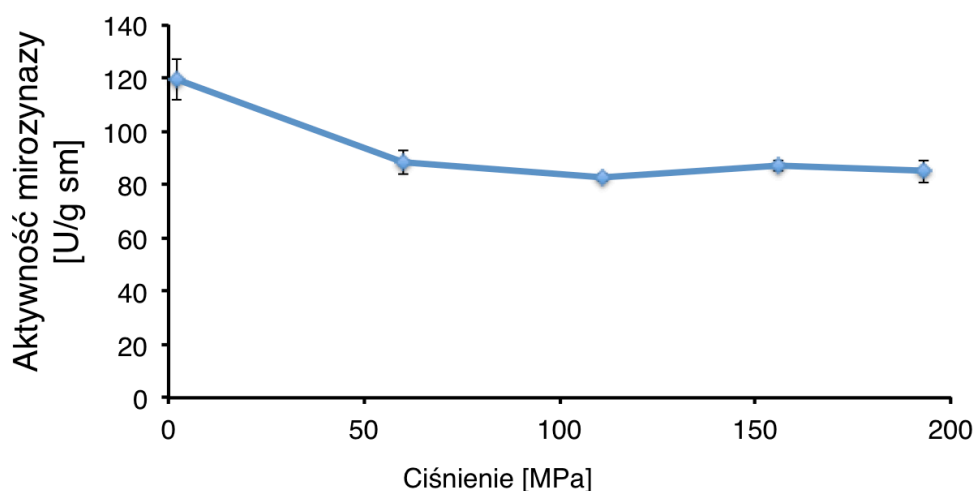
Rysunek 40. Wyniki pomiarów obrazujących wpływ niskiej temperatury na aktywność enzymatyczną handlowego preparatu mirozynyzy.

Przedstawione wyniki są średnią z trzech pomiarów \pm SD, aktywność enzymu oznaczono za pomocą metody spektrofotometrycznej. Różnice statystycznie istotne (test t-studenta) między wartościami uzyskanymi dla kontroli i próbek preparatu oznaczono (*)

IV. 5. 1. 3 Wpływ wysokiego ciśnienia

Następnym badanym czynnikiem rozważanym w kontekście selektywnej inaktywacji niepożądanych czynników białkowych, który może mieć także wpływ na aktywność mirozynyzy, było działanie wysokiego ciśnienia. Zastosowana metoda osiągania wysokiego ciśnienia polegała na stopniowym wymrażaniu wody w pojemniku zawierającym próbkę i wytwarzaniu ciśnienia pod wpływem tworzącego się lodu. Uzyskane wyniki wskazują, że enzym jest stabilny w zakresie ciśnienia 0 - 193 MPa (rys. 41). Widoczny jest niewielki spadek aktywności w stosunku do próbki kontrolnej nie poddanej działaniu ciśnienia, jednak osiągnięta aktywność utrzymuje się na stałym poziomie bez względu na zastosowaną wielkość ciśnienia. Umożliwia to zastosowanie szerokiego zakresu ciśnień bez ryzyka utraty aktywności przez mirozynazę, ale jednocześnie daje możliwość, że w takich warunkach nastąpi inaktywacja dodatkowych czynników białkowych negatywnie wpływających na kierunek hydrolizy glukozynolanów. Dane literaturowe wskazują, że mirozyna stopniowo traci aktywność pod wpływem działania wysokiego ciśnienia w zakresie 300 - 500 MPa, aż do całkowitej

inaktywacji przy 600 MPa [78, 267]. Osiągnięcie takich wartości ciśnienia za pomocą stosowanej metody nie było możliwe. Należy także zauważyć, że w przedstawionych badaniach wykorzystano unikatową aparaturę laboratoryjną i przeniesienie tej metody na większą skalę byłoby co najmniej kłopotliwe. Doświadczenia te pozwoliły jednak poszerzyć wiedzę na temat właściwości mirozynazy i mogą być cenne np. przy rozważaniu ciśnieniowych opakowań żywności produkowanej z użyciem warzyw kapustowatych.

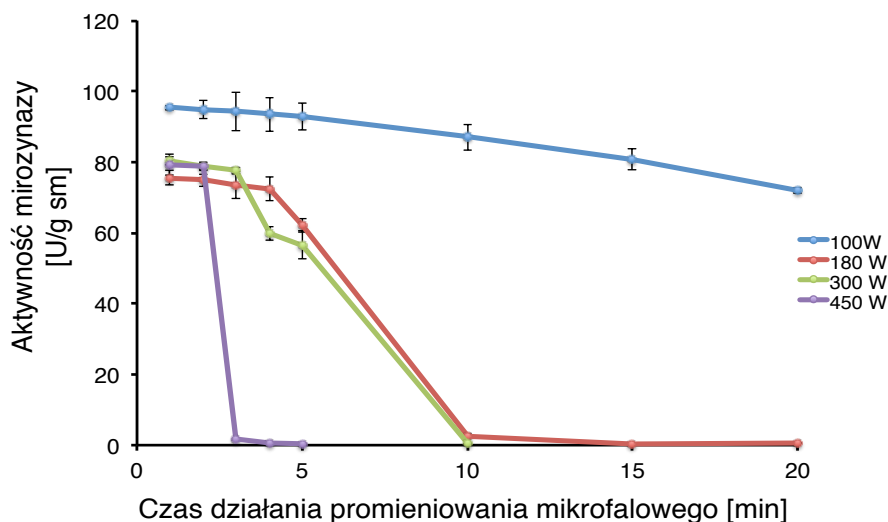


Rysunek 41. Wpływ wysokiego ciśnienia na aktywność enzymatyczną handlowego preparatu mirozynazy.

Przedstawione wyniki są średnią z trzech pomiarów \pm SD, aktywność enzymu oznaczono za pomocą metody spektrofotometrycznej

IV. 5. 1. 4 Wpływ promieniowania mikrofalowego

Wpływ promieniowania mikrofalowego na aktywność handlowego preparatu mirozynazy został zbadany poprzez umieszczenie próbek roztworu enzymu w kuchence mikrofalowej nastawionej na określoną moc przy różnych okresach czasu. Działanie promieniowania o najmniejszej mocy (100 W) skutkowało niewielkim obniżeniem aktywności enzymu, nawet po 20 minutach trwania procesu (rys. 42). Można zauważyć, że im większa moc promieniowania, tym szybciej następuje inaktywacja enzymu. W przypadku zastosowania największej mocy promieniowania (450 W) enzym zachował aktywność jedynie po 2-minutowym ogrzewaniu. Przedstawione wyniki są zgodne z tymi opisanymi w literaturze, z których wynika, że 3-minutowa obróbka próbek kapusty czerwonej przy użyciu promieniowania mikrofalowego o mocy 180 W nie powodowała znaczącego spadku aktywności mirozynazy [56].



Rysunek 42. Wpływ promieniowania mikrofalowego o różnej mocy na aktywność enzymatyczną handlowego preparatu mirozynazy.

Przedstawione wyniki są średnią z trzech pomiarów \pm SD, aktywność enzymu oznaczono za pomocą metody spektrofotometrycznej

Działanie promieniowania mikrofalowego polega na wprawianiu cząsteczek wody obecnych w danym produkcie w drgania rotacyjne. Energia drgających cząsteczek wody jest następnie przekazywana pozostałym cząsteczkom, co skutkuje wzrostem energii termicznej i temperatury roztworu. Ogrzanie roztworu do temperatury 100°C następuje po działaniu mikrofal o mocy 900 W w czasie 3 minut lub o mocy 540 W przez 5 minut [56]. Zatem inaktywujące działanie promieniowania mikrofalowego może wynikać ze wzrostu temperatury w badanych próbkach, ale tylko przy przedłużonej ekspozycji. Pod wpływem promieniowania mikrofalowego możliwe są także zmiany w konformacji enzymu, które obniżają jego aktywność. Takie zmiany mogą zachodzić przy mocy promieniowania nieznacznie podnoszącego temperaturę roztworu enzymu, a zaburzającego oddziaływanie między resztami aminokwasowymi białek a cząsteczkami wody związanymi w cząsteczce białka.

Porównanie strat w aktywności enzymatycznej zachodzących w wyniku zastosowania podwyższonej temperatury i promieniowania mikrofalowego wskazuje na możliwość zmian strukturalnych w enzymie dodatkowo obniżających jego aktywność. Według danych literaturowych [56] działanie promieniowania mikrofalowego o mocy 180 W przez 10 minut powoduje wzrost temperatury materiału roślinnego do ok. 60°C. W przypadku badanych próbek roztworu preparatu mirozynazy taka obróbka powoduje stratę 98 % aktywności enzymatycznej (rys. 42), podczas gdy 10 minutowe ogrzewanie w temperaturze 60°C skutkuje stratą tylko 40 % aktywności (rys. 39). Pomimo działania podobnej temperatury na preparat enzymatyczny przez ten sam okres czasu, większą stratę aktywności zanotowano w przypadku zastosowania promieniowania mikrofalowego. Może to świadczyć właśnie o dodatkowych zmianach

(np. zmiany struktury trzeciorzędowej) zachodzących podczas działania promieniowania mikrofalowego i skutkujących obniżeniem aktywności mirozynazy.

Poniżej zestawiono informacje o względnej aktywności mirozynazy oznaczonej po zastosowaniu wybranych czynników fizycznych o różnych parametrach (tabela 22), obliczoną w stosunku do próbki kontrolnej nie poddanej działaniu żadnego z wymienionych procesów. Na czerwono zaznaczono procesy, po których enzym zachował ponad 70 % początkowej aktywności. Właśnie te wybrane parametry poszczególnych procesów zostały wykorzystane w dalszych badaniach nad możliwością selektywnej inaktywacji dodatkowych czynników białkowych w granicach stabilności mirozynazy w próbkach roślinnych.

Tabela 22. Aktywność handlowego preparatu mirozynazy oznaczona po poddaniu go działaniu wybranych czynników fizycznych

Proces	Parametry	Aktywność mirozynazy* [%]	
PRÓBKA KONTROLNA		100	
PODWYŻSZONA TEMPERATURA	30°C	98,65	
	40°C	93,67	
	50°C	72,45	
	60°C	60,30	
	70°C	5,32	
	80°C	0,37	
	90°C	0,29	
	100°C	0,21	
NISKA TEMPERATURA	-20°C przez 24h	84,09	
	-20°C przez 7 dni	61,05	
	-80°C przez 24h	75,53	
	-80°C przez 7 dni	74,05	
WYSOKIE CIŚNIENIE	60 MPa	73,92	
	111 MPa	69,31	
	156 MPa	72,80	
	193 MPa	71,18	
PROMIENIOWANIE MIKROFALOWE	100 W	1 min	79,92
		2 min	79,57
		3 min	79,08
		4 min	78,36
		5 min	77,88
		10 min	72,92
		15 min	67,69
		20 min	60,26

Tabela 22 cd. Aktywność handlowego preparatu mirozynyzy oznaczona po poddaniu go działaniu wybranych czynników fizycznych

Proces	Parametry	Aktywność mirozynyzy* [%]	
PROMIENIOWANIE MIKROFALOWE	180 W	1 min	63,30
		2 min	62,75
		3 min	61,46
		4 min	60,67
		5 min	51,95
		10 min	2,20
		15 min	0,28
	20 min	0,50	
	300 W	1 min	67,32
		2 min	65,95
		3 min	64,97
		4 min	50,14
		5 min	47,43
		10 min	0,42
	450 W	1 min	66,49
		2 min	65,99
		3 min	1,31
		4 min	0,58
5 min		0,33	

* względna aktywność mirozynyzy oznaczona w stosunku do próbki kontrolnej nie poddanej działaniu żadnego z wymienionych czynników

Celem zastosowania wybranych procesów wobec materiału roślinnego była inaktywacja dodatkowych czynników białkowych, które mają niekorzystny wpływ na przebieg reakcji, a co za tym idzie na skład ostatecznych produktów, hydrolizy glukozyolanów. Przy zachowaniu aktywności mirozynyzy, bez udziału dodatkowych czynników białkowych, takich jak białko epitiospecyficzne, białko nitrylospecyficzne czy białko tworzące tiocyjaniany, powinno stać się możliwe otrzymywanie tylko związków o najsilniejszych właściwościach biobójczych wobec patogenów, czyli izotiocyjanianów, oraz związków indolowych, powstających w wyniku samorzutnych przemian niestabilnych izotiocyjanianów. O obecności lub aktywności dodatkowych czynników białkowych świadczy bilans substratów i produktów reakcji hydrolizy katalizowanej przez mirozynazę. Duże znaczenie ma także możliwość przeprowadzenia wybranego procesu na większą skalę w przypadku produkcji biopreparatu do ochrony roślin na drodze biofumigacji. Przedstawione powyżej wyniki uzyskane w trakcie badania wpływu różnych czynników fizycznych na aktywność wyizolowanej mirozynyzy pozwoliły

wyselekcjonować takie warunki, które także w materiale roślinnym powinny pozwolić na zachowanie aktywności tego enzymu, przy jednoczesnym zahamowaniu niepożądanego działania innych czynników białkowych.

IV. 5. 2 Wpływ wybranych czynników fizycznych na aktywność enzymatyczną mirozynyzy oraz stopień konwersji glukozynolanów w próbkach roślinnych

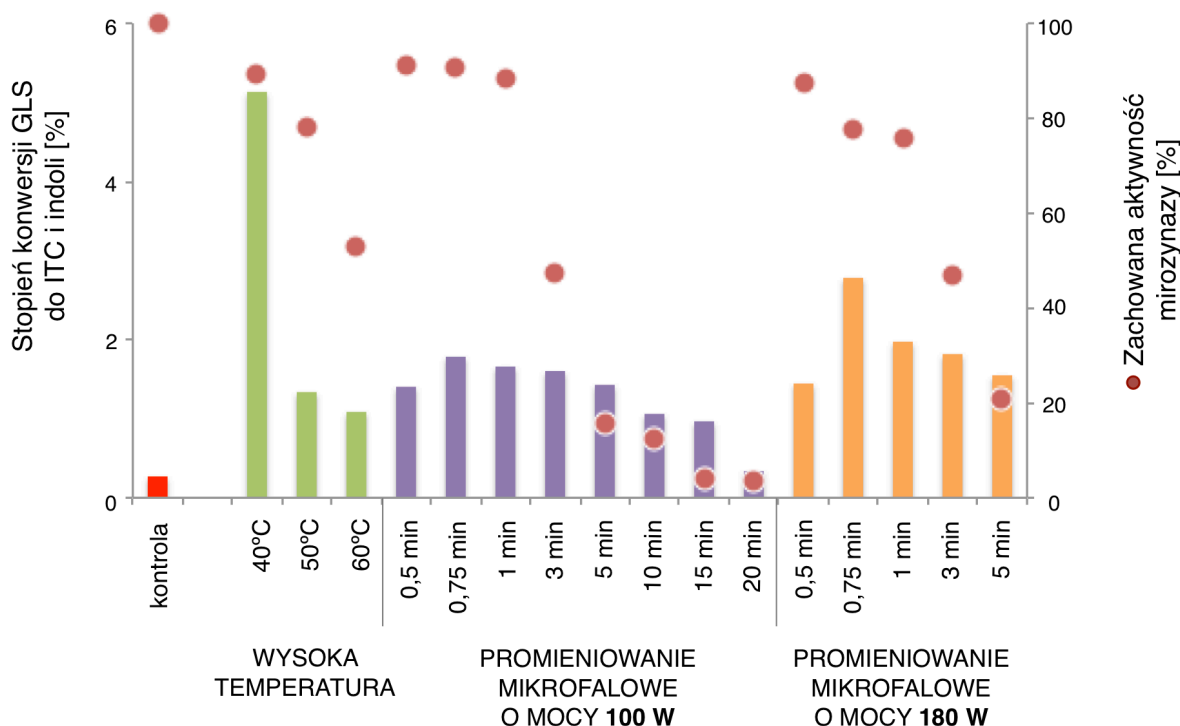
Biorąc pod uwagę wyniki, które przedstawiono powyżej, do dalszych badań nad inaktywacją dodatkowych czynników białkowych w próbkach roślinnych wybrano działanie wysokiej temperatury oraz promieniowania mikrofalowego, zgodnie z informacją zawartą w tabeli 22. Jako materiał roślinny posłużyły próbki kiełków roślin kapustowatych oraz próbki liści kapusty białej. Skuteczność danego procesu w inaktywacji tych czynników oceniano po stopniu konwersji glukozynolanów do izotiocyjanianów oraz związków indolowych. Im większy stopień przekształcenia glukozynolanów do pożądaných produktów, tym większe prawdopodobieństwo, że dodatkowe czynniki białkowe zostały zainaktywowane, a aktywność mirozynyzy została zachowana na poziomie na tyle wysokim, że możliwa była hydroliza substratu. Należy pamiętać, że stosowane warunki oznaczeń (opisane w rozdziale III. 3. 2. 2 - 4) pozwoliły na całkowitą hydrolizę glukozynolanów, więc różnice w bilansie w żadnym stopniu nie wynikały z niekompletnego procesu enzymatycznej degradacji tych związków.

IV. 5. 2. 1 Ukierunkowanie procesu hydrolizy glukozynolanów w próbkach kiełków roślin kapustowatych

Kiełki roślin kapustowatych zostały wybrane jako materiał modelowy do badań nad inaktywacją dodatkowych czynników białkowych ze względu na małą ilość izotiocyjanianów oznaczonych w próbkach oraz znikomy stopień konwersji glukozynolanów do bioaktywnych związków (poniżej 1 %). W trakcie pierwszego etapu badań wykorzystano próbki wodnych zawiesin liofilizatów kiełków gorczycy (0,2 g/mL). Poddano je działaniu podwyższonej temperatury (40, 50, 60°C) w czasie 10 minut lub działaniu promieniowania mikrofalowego o mocy 100 i 180 W przez różne okresy czasu (0,5 - 20 min). Zawartość glukozynolanów została określona w próbkach wyjściowego liofilizatu kiełków, natomiast zawartość izotiocyjanianów oraz związków indolowych, jak również aktywność mirozynyzy oznaczono w zawiesinach liofilizatów poddanych działaniu czynników fizycznych (rys. 43).

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że największy wzrost stopnia konwersji uzyskano w próbce poddanej działaniu temperatury 40°C (ok. 5 %) w porównaniu do próbki kontrolnej (ok. 0,3 %). Jest to temperatura zbliżona do optymalnej dla działania

mirozynazy, jednak można wnioskować, że zbyt wysoka dla dodatkowych czynników białkowych. W próbkach ogrzewanych w wyższej temperaturze zanotowano niższy stopień konwersji w porównaniu do próbki ogrzewanej w temperaturze 40°C. Prawdopodobnie ma to związek ze stopniową utratą aktywności przez mirozynazę, co utrudnia pierwszy etap hydrolizy glukozynolanów. Analiza uzyskanych wyników może być podstawą do stwierdzenia, że badany enzym jest mniej stabilny w próbce roślinnej w porównaniu do handlowego preparatu mirozynazy (rys. 39). Ogrzewanie w temperaturze 60°C próbki zawiesiny liofilizatu kiełków gorczycy spowodowało utratę ok. 57 % aktywności mirozynazy, natomiast takie same warunki traktowania roztworu preparatu enzymatycznego skutkowały stratą aktywności na poziomie 38 %. Jest to dość zaskakujące, ponieważ zazwyczaj wyizolowany enzym jest bardziej wrażliwy na działanie czynników zewnętrznych ze względu na brak stabilizującego wpływu innych składników obecnych w komórce.



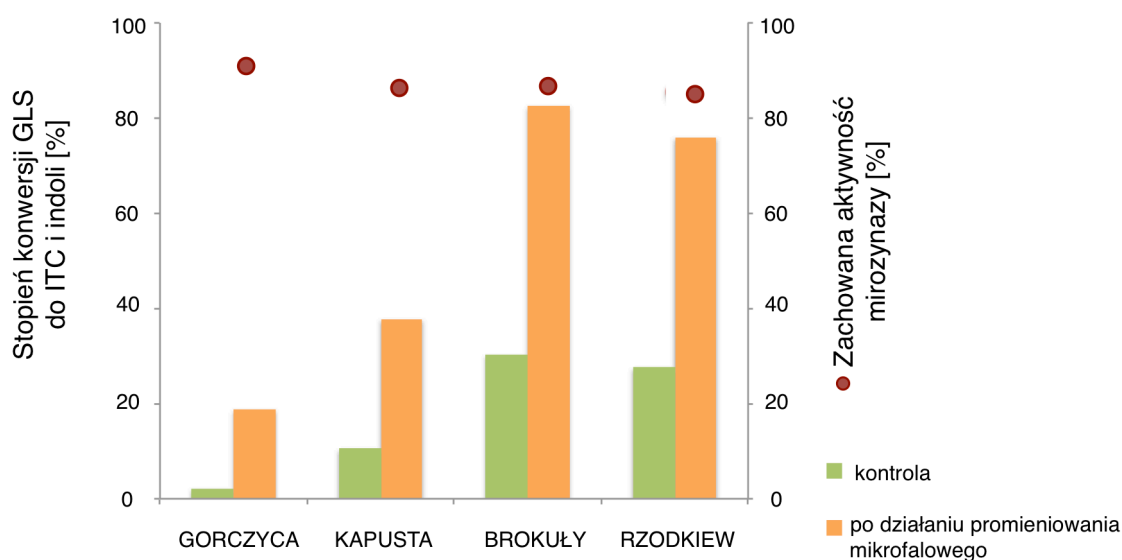
Rysunek 43. Informacje obrazujące stopień przekształcenia glukozynolanów do izotiocyjanianów i związków indolowych oraz zachowanej aktywności mirozynazy w próbkach kiełków gorczycy poddanych działaniu wysokiej temperatury lub promieniowania mikrofalowego (wodna zawiesina liofilizatu).

Aktywność enzymu oznaczono za pomocą metody pH-statycznej. Przedstawione wyniki są średnią z trzech pomiarów, SD nie przekraczało 10 %.

Biorąc pod uwagę możliwość zastosowania procesu selektywnej inaktywacji dodatkowych czynników białkowych na większą skalę, np. przy produkcji kiełków o podwyższonej jakości zdrowotnej, działanie promieniowania mikrofalowego na próbki

roślinne wydaje się bardziej obiecujące w porównaniu do działania wysokiej temperatury. Zastosowanie promieniowania o mocy 180 W w czasie 45 s skutkowało podwyższeniem stopnia konwersji glukozynolanów do ok. 3 % przy zachowaniu dużej aktywności mirozynazy (ok. 78 %). Dlatego promieniowanie o tych parametrach zastosowano wobec próbek świeżych kiełków roślin kapustowatych w dalszych badaniach. Próbki świeżych kiełków zliofilizowano dopiero poddaniu ich działaniu promieniowania mikrofalowego i przeznaczono do standardowych oznaczeń. W badaniach wykorzystano kiełki kapusty i gorczycy, pochodzące z własnej hodowli, oraz kiełki brokułów i rzodkwi, zakupione w sklepie.

Na podstawie uzyskanych wyników (rys. 44) można stwierdzić, że zastosowanie promieniowania mikrofalowego o mocy 180 W w czasie 45 s wobec próbek kiełków, jest skutecznym sposobem zwiększania stopnia konwersji glukozynolanów do izotiocyjanianów i związków indolowych. W wyniku takiej obróbki świeżych kiełków udało się osiągnąć stopień konwersji na poziomie nawet ok. 82 %. Można także zauważyć, że w próbkach kiełków zakupionych w sklepie, produkowanych komercyjnie, oznaczono większy stopień konwersji w porównaniu do próbek kiełków hodowanych w warunkach laboratoryjnych. Jednak w każdym przypadku dodatkowe czynniki białkowe, wpływające na kierunek hydrolizy glukozynolanów, zostały selektywnie zainaktywowane, natomiast aktywność mirozynazy została zachowana na wysokim poziomie (83 - 91 %).



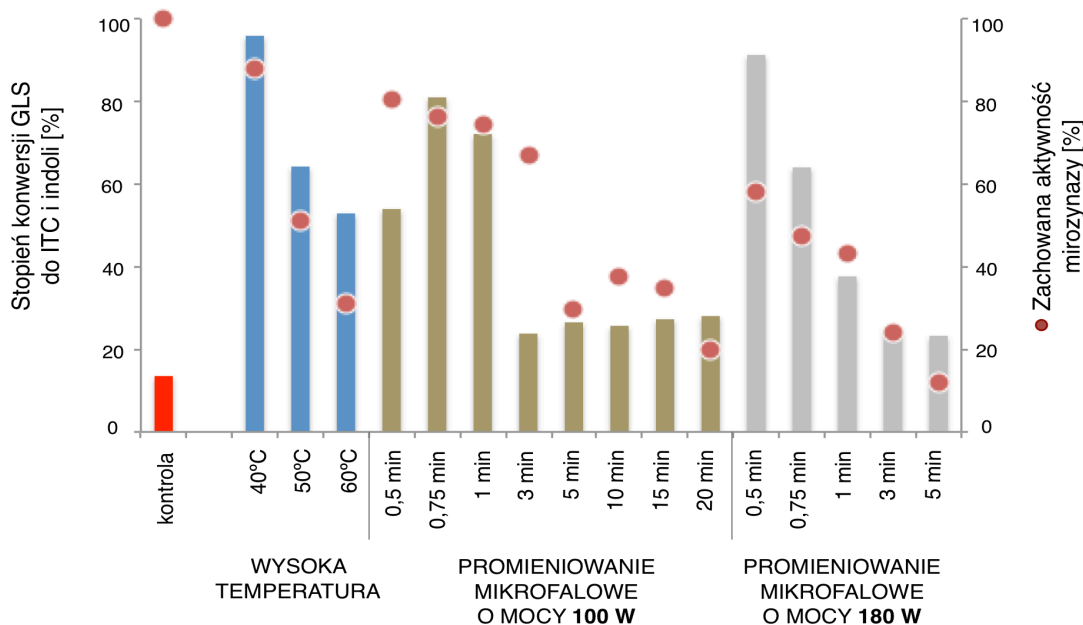
Rysunek 44. Informacje obrazujące stopień przekształcenia glukozynolanów do izotiocyjanianów i związków indolowych oraz zachowanej aktywności mirozynazy w próbkach kiełków roślin kapustowatych poddanych działaniu promieniowania mikrofalowego o mocy 180 W w czasie 45 s (świeże kiełki).

Aktywność enzymu oznaczono za pomocą metody pH-statycznej. Przedstawione wyniki są średnią z trzech pomiarów, SD nie przekraczało 10 %.

IV. 5. 2. 2 Ukierunkowanie procesu hydrolizy glukozynolanów w próbkach liści kapusty białej

Wyniki badań przeprowadzonych z wykorzystaniem modelowych próbek kiełków roślin kapustowatych potwierdzają możliwość selektywnej inaktywacji dodatkowych czynników białkowych niekorzystnie wpływających na kierunek hydrolizy glukozynolanów. Dobór odpowiednich parametrów zastosowanych wobec materiału roślinnego może przyczynić się do zwiększenia zawartości bioaktywnych izotiocyjanianów w próbkach po enzymatycznej degradacji glukozynolanów. Jak wspomniano wcześniej, izotiocyjaniany wykazują najskuteczniejsze właściwości biobójcze wobec patogenów i szkodników roślinnych, zatem duża zawartość tych związków warunkuje większą efektywność biofumigacyjną roślin kapustowatych. Ponieważ część badań, których wyniki przedstawiono w tej pracy, została wykonana na potrzeby projektu Agrobiokap, zakładającego otrzymanie biopreparatu z kapusty białej do ochrony roślin na drodze biofumigacji, próbki kapusty także poddano działaniu wybranych czynników fizycznych w celu zwiększenia stopnia konwersji glukozynolanów do bioaktywnych pochodnych.

W pierwszy etapie badań wykorzystano próbki wodnej zawiesiny liofilizatu z liści kapusty, które poddano działaniu wysokiej temperatury lub promieniowania mikrofalowego (rys. 45).



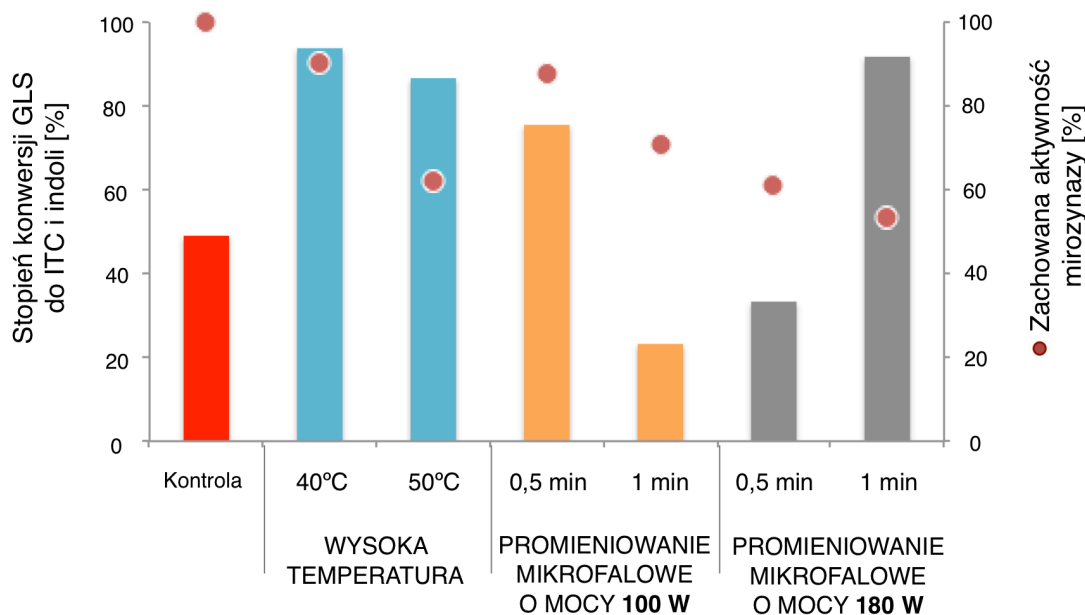
Rysunek 45. Informacje obrazujące stopień przekształcenia glukozynolanów do izotiocyjanianów i związków indolowych oraz zachowanej aktywności mirozyny w próbkach kapusty białej poddanych działaniu wysokiej temperatury lub promieniowania mikrofalowego (wodna zawiesina liofilizatu).

Aktywność enzymu oznaczono za pomocą metody pH-statycznej. Przedstawione wyniki są średnią z trzech pomiarów, SD nie przekraczało 10 %.

Podobnie jak w przypadku próbek kiełków duży stopień konwersji uzyskano dla próbek ogrzewanych w temperaturze 40°C (ok. 96 %) oraz poddanych działaniu promieniowania mikrofalowego o mocy 100 W w czasie 45 s (ok. 81 %). Zwiększenie mocy promieniowania mikrofalowego do 180 W i skrócenie czasu jego działania do 30 s spowodowało wzrost stopnia konwersji w badanych próbkach do ok. 91 %, mimo że aktywność mirozynyzy została znacząco obniżona. Działanie promieniowania mikrofalowego dłuższe niż 1 minuta skutkuje dużymi stratami w aktywności enzymu, w związku z czym przebieg hydrolizy jest utrudniony, a powstające produkty mogą być również efektem termicznej degradacji glukozyzolanów. W dalszych badaniach z wykorzystaniem świeżych liści kapusty zastosowano działanie podwyższonej temperatury (40, 50°C) oraz promieniowania mikrofalowego o mocy 100 lub 180 W w krótkim czasie (odpowiednio 1 i 0,5 min).

Na podstawie przedstawionych wyników (rys. 46) można wnioskować, że największy wzrost stopienia konwersji uzyskano w próbkach świeżych liści kapusty poddanych działaniu temperatury 40°C (ok. 94 %) oraz poddanych działaniu promieniowania mikrofalowego o mocy 180 W w czasie 1 min (ok. 92 %). Obniżenie mocy promieniowania do 100 W przy zachowaniu tego samego czasu działania jest niewystarczające do zainaktywowania dodatkowych czynników białkowych, ponieważ w danych próbkach oznaczono małą zawartość izotiocyjanianów, świadczącą o niskim poziomie konwersji glukozyzolanów do pożądaných pochodnych. Można nawet wnioskować, że zastosowane parametry wspomagają działanie dodatkowych białek, ponieważ stopień konwersji w tych próbkach jest niższy niż w przypadku próbki kontrolnej.

Warto zauważyć, że stopień konwersji oznaczony w próbkach kontrolnych dla kapusty pochodzącej z innego źródła użytej na tym etapie badań (ok. 49 %, rys. 46) różni się od tego obliczonego dla próbek kapusty stosowanych w poprzednim etapie (ok. 13 %, rys. 45). Świadczy to o odmiennym składzie i aktywności dodatkowych czynników białkowych, jednak mimo wszystko udało się osiągnąć wzrost stopnia konwersji pod wpływem odpowiedniego traktowania próbek uprzednio wybranymi czynnikami fizycznymi. Dowodzi to uniwersalności zastosowanego procesu, bez względu na skład białek odpowiedzialnych za degradację glukozyzolanów w próbce roślinnej.



Rysunek 46. Informacje obrazujące stopień przekształcenia glukozynolanów do izotiocyanianów i związków indolowych oraz zachowanej aktywności mirozynyzy w próbkach kapusty białej poddanych działaniu wysokiej temperatury lub promieniowania mikrofalowego (świeże liście).

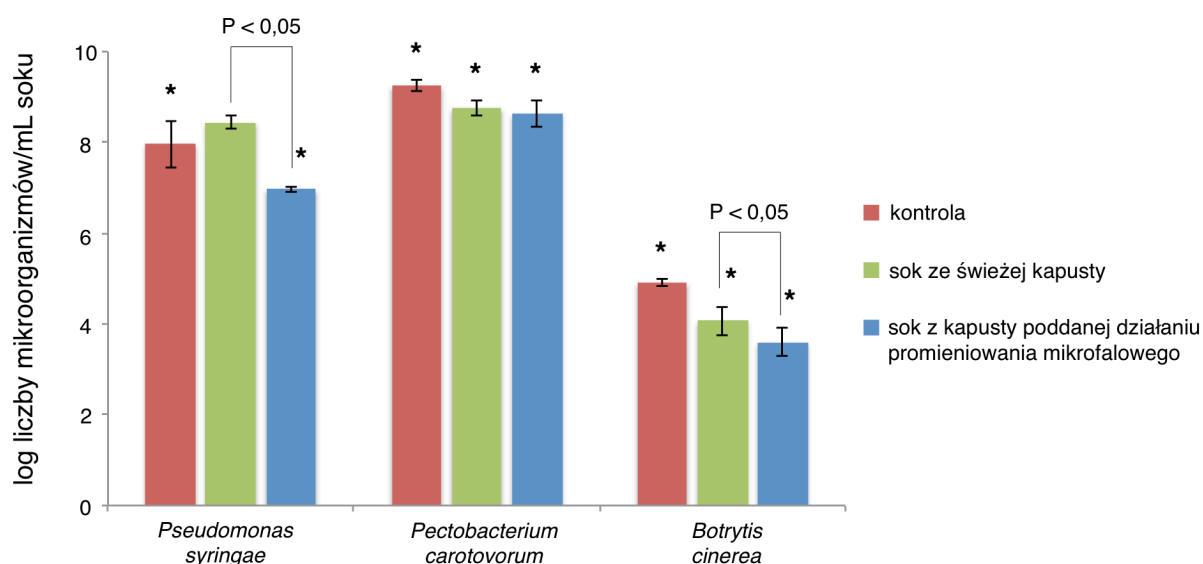
Aktywność enzymu oznaczono za pomocą metody pH-statycznej. Przedstawione wyniki są średnią z trzech pomiarów, SD nie przekraczało 10 %.

IV. 5. 2. 3 Wpływ ukierunkowania procesu hydrolizy glukozynolanów w próbkach kapusty białej na aktywność przeciwdrobnoustrojową soków

W niniejszej rozprawie możliwość ukierunkowania enzymatycznej degradacji glukozynolanów rozpatrywana jest w kontekście zwiększenia skuteczności procesu biofumigacji i produkcji efektywnego biopreparatu do ochrony roślin. Dalsza część przedstawionych badań została poświęcona określeniu zdolności związków obecnych w soku z kapusty do hamowania rozwoju typowych patogenów roślinnych, takich jak szczepy bakterii *Pseudomonas syringae* i *Pectobacterium carotovorum* oraz grzyba *Botrytis cinerea*.

Do badań wykorzystano sok z kapusty świeżej oraz sok z kapusty poddanej działaniu promieniowania mikrofalowego (180 W w czasie 1 min) w celu selektywnej inaktywacji dodatkowych czynników białkowych i zwiększenia ilości izotiocyanianów w próbce. Zawartość glukozynolanów w próbkach liofilizatów kapusty oznaczono na poziomie 1,65 $\mu\text{mol/g}$ s.m., natomiast zawartość izotiocyanianów w próbkach soku otrzymanych z tej kapusty oznaczono na poziomie 0,064 i 0,085 $\mu\text{mol/mL}$, odpowiednio w przypadku soku ze świeżej kapusty i poddanej promieniowaniu mikrofalowemu (ok. 35 % i 47 % konwersji). Na tej podstawie można ponownie wnioskować o skuteczności zastosowanego procesu w zwiększaniu zawartości bioaktywnych związków.

Analiza wyników uzyskanych w doświadczeniach mikrobiologicznych (rys. 47) może być podstawą do stwierdzenia, że soki z kapusty wykazują zróżnicowaną aktywność przeciwdrobnoustrojową. Pod wpływem związków zawartych w soku z kapusty poddanej działaniu promieniowania mikrofalowego uzyskano mniejszą o jeden rząd liczby bakterii *P. syringae* w porównaniu do kontroli, czyli hodowli mikroorganizmów z dodatkiem sterylnej wody zamiast próbki soku. Podobną różnicę zaobserwowano w porównaniu do hodowli traktowanej sokiem ze świeżej kapusty. W przypadku bakterii *P. carotovorum* związki zawarte w obu próbkach soków spowodowały statystycznie istotną redukcję liczby badanych mikroorganizmów w porównaniu do próbki kontrolnej. Związki zawarte w sokach z kapusty okazały się także skuteczne w zwalczaniu grzybów *B. cinerea*. Liczba ich kolonii została statystycznie istotnie obniżona zarówno w przypadku próbki soku z kapusty świeżej, jak i tej poddanej promieniowaniu mikrofalowemu.



Rysunek 47. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa soków z kapusty świeżej i poddanej działaniu promieniowania mikrofalowego (180 W w czasie 1 min) określona wobec typowych patogenów roślinnych.

Różnice statystycznie istotne (test t-studenta) między wartościami uzyskanymi dla kontroli i próbek soków oznaczono (*). Przedstawione wyniki są średnią z dwóch równoległych oznaczeń \pm SD

W przypadku badanych mikroorganizmów większą aktywność przeciwdrobnoustrojową uzyskano dla próbek soku uzyskanego z kapusty poddanej działaniu promieniowania mikrofalowego. Może mieć to związek ze zwiększoną zawartością izotiocyjanianów w próbkach tego soku. Jak wspomniano wcześniej, izotiocyjaniany wykazują najsilniejsze właściwości biobójcze wobec szerokiego spektrum patogenów roślinnych. Przedstawione

wyniki potwierdzają aktywność przeciwdrobnoustrojową tych związków obecnych w sokach z kapusty zarówno wobec grzybów, jak i bakterii.

Na podstawie wyników przedstawionych w tym rozdziale można stwierdzić, że odpowiednie przygotowanie materiału roślinnego przyczynia się do zwiększenia jego potencjału biofumigacyjnego. Możliwe jest dobranie takich parametrów obróbki surowca, które pozwalają na selektywną inaktywację dodatkowych czynników białkowych oraz zachowanie maksymalnej aktywności mirozyny, co w rezultacie pozwala na zwiększenie konwersji glukozynolanów do bioaktywnych pochodnych. Taki sposób obróbki można wykorzystać zarówno w procesie przygotowania surowca przeznaczonego jako naturalny środek ochrony roślin na drodze biofumigacji, jak i do zwiększenia potencjału prozdrowotnego roślin kapustowatych, np. przy produkcji suplementów diety.

V. PODSUMOWANIE

Właściwości biobójcze roślin kapustowatych wynikają z obecności systemu „glukozynolany—mirozynaza”. W wyniku procesu enzymatycznej hydrolizy glukozynolanów, katalizowanej przez mirozynazę, powstaje niestabilny produkt przejściowy - tiohydroksym O-sulfonowy, który w zależności od środowiska reakcji oraz obecności dodatkowych czynników białkowych może zostać przekształcony do izotiocyanianów, tiocyanianów, nitryli lub epitionitryli. Niestabilne izotiocyaniany, zawierające grupę beta-hydroksylową lub pierścień indolowy, ulegają samorzutnym przekształceniom do odpowiednio związków indolowych i oksazolidyno-2-tionów. Spośród możliwych produktów, izotiocyaniany oraz związki indolowe wykazują największą aktywność biologiczną. Właściwości te powodują, że wymienione związki są najbardziej pożądane zarówno z punktu widzenia skuteczności procesu biofumigacji, jak i chemoprewencji chorób cywilizacyjnych. Odpowiednie ukierunkowanie hydrolizy glukozynolanów tak, aby jako główne produkty uzyskać izotiocyaniany i związki indolowe, może zwiększyć efektywność działania systemu „glukozynolany—mirozynaza” w obu dziedzinach.

Do czynników obecnych w roślinie negatywnie wpływających na skład końcowy produktów enzymatycznej degradacji glukozynolanów zmniejszających zawartość pożądanych pochodnych należą: białko epitiospecyficzne i nitrylospecyficzne oraz białko tworzące tiocyaniany. W niniejszej pracy przyjęto, że ukierunkowanie procesu hydrolizy jest możliwe poprzez selektywną inaktywację wspomnianych czynników białkowych, promujących powstawanie mniej aktywnych produktów. Ponieważ zadowalających metod oznaczania aktywności tych białek dotychczas nie opracowano, o aktywności dodatkowych czynników białkowych można jedynie wnioskować, co też uczyniono w niniejszej pracy, na podstawie bilansu ilości glukozynolanów, jako substratu reakcji katalizowanej przez mirozynazę, oraz ilości powstających produktów, izotiocyanianów oraz związków indolowych. Równa ilość substratów i produktów może świadczyć o braku białek przeszkadzających lub ich znikomej aktywności. Im większa różnica w bilansie, tym większe prawdopodobieństwo, że produkt przejściowy po pierwszym etapie enzymatycznej hydrolizy glukozynolanów został przekształcony pod wpływem dodatkowych białek w mniej pożądane produkty, takie jak tiocyaniany, nitryle czy epitionitryle. Podobne podejście wykorzystano podczas oceny skuteczności przetestowanych procesów fizycznych w inaktywacji tych czynników białkowych. Zwiększony stopień przekształcenia glukozynolanów do pożądanych produktów, uznano za świadczący o tym, że dodatkowe czynniki białkowe zostały zainaktywowane, a aktywność mirozynazy zachowana na tak wysokim poziomie, że możliwa była hydroliza substratu.

Rozpoczęcie właściwych badań zmierzających do zaproponowania rozwiązań pozwalających na zwiększenie wydajności uzyskiwania izotiocyanianów i związków indolowych wymagało na wstępie prac rozwiązania pewnych problemów metodologicznych dotyczących oznaczania aktywności mirozyny oraz wiarygodnego sprawdzenia bilansu hydrolizy glukozynolanów.

Uzyskane wyniki stały się podstawą do sformułowania wniosków przedstawionych poniżej w postaci punktów.

1. Przed przystąpieniem do właściwych badań nad ukierunkowaniem hydrolizy glukozynolanów konieczne było dopracowanie metod badawczych. Do oznaczania aktywności enzymatycznej mirozyny wykorzystano znane metody, pH-statyczną oraz spektrofotometryczną, jednak konieczne było określenie optymalnych warunków ich stosowania. Podczas tego etapu stwierdzono, że:

- powtarzalne wyniki aktywności enzymatycznej mirozyny są uzyskiwane przy zastosowaniu jako substratu roztworu glukotropaeoliny w końcowym stężeniu 0,2 mM i 2,5 mM, odpowiednio w przypadku metody spektrofotometrycznej i pH-statycznej;
- pomiar aktywności mirozyny powinien być prowadzony w temperaturze 37°C;
- w przypadku metody pH-statycznej, przy niskich stężeniach mirozyny potrzebne jest wprowadzenie poprawki matematycznej w celu uzyskania poprawnych wartości aktywności enzymatycznej;
- aby zniwelować efekt buforujący, występujący podczas oznaczeń aktywności mirozyny z wykorzystaniem metody pH-statycznej w materiale roślinnym należy zastosować wyższe stężenie substratu (5 mM).

Z powodu braku zadowalających metod oznaczania aktywności dodatkowych czynników białkowych, o aktywności tych białek wnioskowano na podstawie bilansu ilości glukozynolanów, jako substratu reakcji katalizowanej przez mirozynę, oraz ilości powstających produktów, izotiocyanianów oraz związków indolowych. Takie podejście dotychczas nie było opisane w literaturze światowej, ale również samo zagadnienie stopnia konwersji glukozynolanów do pożądaných pochodnych jest nowe.

2. Po przygotowaniu odpowiedniego warsztatu metodologicznego, przystąpiono do badań z wykorzystaniem próbek kapusty białej pochodzącej z upraw zlokalizowanych na terenach o zróżnicowanym poziomie stresu chemicznego oraz kontrolowanych upraw wazonowych. Celem tego etapu było określenie wpływu warunków uprawy (stopień zanieczyszczenia gleby,

stosowane zabiegi agrotechniczne) na ilość glukozynolanów oznaczonych w próbkach kapusty. Co prawda, jest to zagadanie opisane w literaturze, jednak brak jest jednoznacznych wniosków na temat tych zależności. Szczególną nowością w niniejszej pracy jest to, że na podstawie uzyskanych wyników wnioskowano także o wpływie stresu chemicznego na stopień konwersji glukozynolanów do pożądaných pochodnych, wykorzystując do tego wcześniej wspomnianą metodę bilansu ilości substratów i produktów. Na tym etapie za materiał badawczy posłużyły także próbki kiełków roślin kapustowatych wzbogacone w selen, aby sprawdzić uniwersalność uzyskanych wniosków.

Podczas analizy wyników doświadczeń stwierdzono, że:

- aktywność enzymatyczna mirozynyzy oraz zawartość glukozynolanów, izotiocyjanianów i związków indolowych oznaczona w badanych próbkach kapusty białej różni się w zależności od warunków uprawy, stosowanych zabiegów agrotechnicznych i intensywności antropopresji na obszarze lokalizacji upraw;
- stopień konwersji glukozynolanów do izotiocyjanianów i związków indolowych, a tym samym aktywność dodatkowych czynników białkowych w badanych próbkach kapusty białej także zależą od wymienionych wyżej czynników;
- sposób ochrony uprawy kapusty przed szkodnikami (m.in. rodzaj zastosowanego środka chemicznego) może mieć wpływ na stopień konwersji glukozynolanów; w przypadku badanych próbek zastosowanie zarówno preparatu ekologicznego Spintor, jak i syntentycznego Karate podczas uprawy kapusty spowodowało zmniejszenie zawartości pożądaných produktów w porównaniu do próbek pochodzących z niechronionej uprawy kontrolnej;
- na podstawie wyników uzyskanych podczas analizy próbek kapusty pochodzących z upraw kontrolowanych (fitotron) można stwierdzić, że wpływ metali ciężkich (Zn, Cd) na zawartość oraz stopień konwersji glukozynolanów w próbkach kapusty jest niejednoznaczny;
- dodatek selenu (SeO_2) podczas kiełkowania nasion wybranych roślin kapustowatych nie ma wpływu ani na aktywność mirozynyzy ani na zawartość oraz stopień konwersji glukozynolanów w próbkach otrzymanych kiełków.

3. Koncentrując się na udziale roślin kapustowatych w procesie biofumigacji, postanowiono zbadać pod kątem potencjału biofumigacyjnego także inne niż jadalne części roślin kapustowatych. Temat określenia w takich próbkach stopnia konwersji glukozynolanów do

pożądanych pochodnych, a tym samym przydatności wspomnianego materiału odpadowego w procesie ochrony roślin nie był wcześniej opisywany w literaturze naukowej.

Analiza wyników uzyskanych dla próbek poszczególnych części roślin kapustowatych była podstawą do sformułowania następujących wniosków:

- zawartość glukozynolanów w poszczególnych częściach roślin jest bardzo zróżnicowana, ich najmniejszą ilość oznaczono w części jadalnej każdej z roślin, natomiast największą w próbkach nasion i kiełków;
- największą aktywnością mirozynyzy charakteryzują się próbki nasion oraz kiełków;
- stopień konwersji glukozynolanów do bioaktywnych pochodnych różni się w obrębie jednej rośliny w zależności od stadium jej rozwoju lub badanej części, jednak nie można określić jednoznacznej zależności pomiędzy tymi parametrami;
- duża zawartość glukozynolanów oraz korzystny przebieg ich degradacji skutkujący stosunkowo wysokim poziomem izotiocyjanianów wskazuje na potencjalne możliwości wykorzystania innych niż jadalne części roślin kapustowatych jako surowca do produkcji biofumigantów oraz suplementów diety.

4. Po przeprowadzeniu oceny surowca, tzn. badanych roślin kapustowatych jako potencjalnych biofumigantów, przystąpiono do prób zwiększenia zawartości pożądanych produktów degradacji glukozynolanów poprzez selektywną inaktywację dodatkowych czynników białkowych. Do ukierunkowania procesu hydrolizy wykorzystano metody fizyko-chemiczne o potencjalnym przemysłowym zastosowaniu. Należy podkreślić innowacyjne podejście do zagadnienia sterowania procesem hydrolizy glukozynolanów, ponieważ brak jest danych literaturowych opisujących podobne sposoby sterowania zawartością izotiocyjanianów i związków indolowych w materiale roślinnym.

W trakcie badań nad możliwością ukierunkowania hydrolizy glukozynolanów stwierdzono, że:

- dodatkowe czynniki białkowe wpływające na kierunek hydrolizy glukozynolanów są bardziej wrażliwe na działanie wysokiej temperatury oraz promieniowania mikrofalowego niż mirozyna;
- możliwy jest taki dobór parametrów wybranych czynników fizycznych (działanie wysokiej temperatury oraz promieniowania mikrofalowego), które powodują inaktywację dodatkowych czynników białkowych, ale jednocześnie pozwalają na zachowanie aktywności enzymatycznej mirozynyzy;
- największy wzrost konwersji glukozynolanów do izotiocyjanianów oraz związków indolowych odnotowano po zastosowaniu działania promieniowania mikrofalowego o mocy

180 W przez czas 45 s (w przypadku próbek kiełków) lub 60 s (w przypadku próbek liści kapusty białej), co sugeruje, że warunki powinny być każdorazowo sprawdzane dla określonego surowca;

- opisany proces ukierunkowania hydrolizy glukozyolanów poprzez selektywną inaktywację dodatkowych czynników białkowych wydaje się uniwersalny, ponieważ wykazuje skuteczność zarówno w przypadku zastosowania kilku rodzajów materiału roślinnego (liofilizat, świeże tkanki roślinne, sok), jak i roślin w różnym stadium rozwoju (kiełki, dojrzałe liście);
- odpowiedni sposób obróbki materiału roślinnego można wykorzystać w procesie przygotowania surowca przeznaczonego jako naturalny środek ochrony roślin na drodze biofumigacji, ale także do zwiększenia potencjału prozdrowotnego roślin kapustowatych, np. przy produkcji żywności funkcjonalnej lub suplementów diety.

5. Korzyści wynikające z możliwości ukierunkowania hydrolizy glukozyolanów dla procesu biofumigacji zweryfikowano określając zahamowanie wzrostu typowych patogenów roślinnych pod wpływem związków obecnych w soku z kapusty. Wyniki przeprowadzonych badań mikrobiologicznych potwierdziły potencjał biofumigacyjny soków z kapusty białej i wskazały na możliwość zwiększenia tego potencjału, co było głównym założeniem pracy.

Podczas końcowego etapu badań, stwierdzono, że:

- związki obecne w soku z kapusty wykazują aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec typowych patogenów roślinnych (*Botrytis cinerea*, *Pectobacterium carotovorum*), co sugeruje, że nie tylko preferowane obecnie rośliny, takie jak gorczyca, ale dowolna roślina kapustowata może być wykorzystana jako źródło biofumigantów;
- poddanie kapusty działaniu promieniowania mikrofalowego w opracowany sposób przed przygotowaniem soku przyczyniło się do wzrostu stopnia konwersji glukozyolanów do pożądaných produktów, a co za tym idzie zwiększenia zawartości izotiocyjanianów w soku oraz wzmocnienia jego potencjału biofumigacyjnego.

Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki można stwierdzić, że w ramach niniejszej rozprawy opracowano podejście technologiczne, które pozwala na efektywniejsze wykorzystanie innych niż jadalne części roślin kapustowatych na potrzeby biofumigacji. Dzięki wszechstronności tego rozwiązania, wspomniany materiał może zostać także zastosowany w innych działach gospodarki, np. przy produkcji nutraceutyków i nutrikosmetyków, które wykorzystują cenne właściwości izotiocyjanianów.

VI. STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

System „glukozynolany—mirozynaza”, charakterystyczny dla roślin z rodziny *Brassicaceae*, który funkcjonuje jako naturalny sposób ochrony roślin przed atakami agrofagów, przyczynił się do wzrostu zainteresowania roślinami kapustowatymi. Produkty enzymatycznej degradacji glukozynolanów katalizowanej przez mirozynazę są wykorzystywane zarówno w procesie biofumigacji, jak również w chemoprewencji chorób cywilizacyjnych. Najbardziej pożądanymi produktami, wykazującymi najsilniejsze właściwości biologiczne są izotiocyjaniiny oraz związki indolowe. Jednak ich powstawaniu mogą przeciwdziałać dodatkowe czynniki białkowe obecne w roślinach kapustowatych, które oprócz mirozynazy biorą udział w procesie hydrolizy glukozynolanów.

Odpowiednie ukierunkowanie degradacji glukozynolanów tak, aby jako główne produkty uzyskać izotiocyjaniiny i związki indolowe, może zwiększyć efektywność działania systemu „glukozynolany—mirozynaza” oraz przyczynić się do wzrostu potencjału biologicznego roślin kapustowatych. Sterowanie procesem enzymatycznej hydrolizy jest możliwe poprzez dobór odpowiednich warunków pozwalających na zachowanie maksymalnej aktywności mirozynazy przy jednoczesnej inaktywacji dodatkowych czynników białkowych.

W ramach pracy przeprowadzono optymalizację warunków oznaczania aktywności enzymatycznej mirozynazy za pomocą dwóch metod, spektrofotometrycznej oraz pH-statycznej. Znalaziono także sposób oceny aktywności dodatkowych czynników białkowych za pomocą bilansu ilości glukozynolanów, jako substratu reakcji katalizowanej przez mirozynazę, oraz ilości powstających produktów, izotiocyjaniinów oraz związków indolowych. Następnie na podstawie wyników analiz próbek kapusty białej pochodzącej z upraw kontrolowanych oraz z terenów o zróżnicowanym poziomie antropopresji określono zależność między zawartością i stopniem konwersji glukozynolanów do bioaktywnych związków a warunkami uprawy i stresem chemicznym.

Uzyskane wyniki świadczące o różnorodnym przebiegu hydrolizy glukozynolanów skłoniły do dalszych badań, tym razem z wykorzystaniem różnych części warzyw kapustowatych pod kątem innowacyjnego wykorzystania, także innych niż jadalne części, w produkcji przyjaznych środowisku środków do ochrony roślin na drodze biofumigacji. Zaproponowany został skuteczny sposób ukierunkowania hydrolizy glukozynolanów poprzez selektywną inaktywację dodatkowych czynników białkowych, promujących powstawanie innych produktów niż pożądanne bioaktywne związki, przy użyciu promieniowania mikrofalowego. Dzięki temu możliwe jest zwiększenie potencjału biofumigacyjnego roślin kapustowatych, co zostało potwierdzone poprzez porównanie zahamowania wzrostu typowych

patogenów roślinnych pod wpływem związków obecnych w soku z kapusty poddanej lub nie działaniu promieniowania mikrofalowego. Mimo, że badania przedstawione w niniejszej rozprawie były prowadzone pod kątem procesu biofumigacji, ich rezultaty są na tyle uniwersalne, że możliwe jest zastosowanie opisanych rozwiązań także w innych dziedzinach, np. przy produkcji żywności funkcjonalnej czy suplementów diety.

VII. STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM

Glucosinolate-myrosinase system, present in brassicas, is involved in natural plant defence against herbivores. Myrosinase catalysed degradation of glucosinolates results in bioactive products used in the biofumigation process as well as in disease chemoprevention. The most desirable products includes isothiocyanates and indoles exhibiting the strongest biological properties. However, there are some additional protein factors, that except myrosinase participate in hydrolysis process and promote formation of other, less bioactive products.

Possibility of targeting glucosinolate hydrolysis in order to receive only isothiocyanates and indoles as final products may increase efficacy of glucosinolate-myrosinase system and enhance the biological potential of brassicas. Control of glucosinolate degradation is possible by choosing proper conditions, which allow myrosinase action and in the same time inactivate additional protein factors.

During PhD research optimisation of conditions of myrosinase activity determination using spectrophotometric and pH-stat methods was carried out. Also way of estimating additional protein factors activity was presented by comparison of substrate (glucosinolates) and products (isothiocyanates and indoles) amount involved in myrosinase-catalysed hydrolysis. Next step included analysis of cabbage samples grown in different conditions and in the phytotron. Taking obtained results into consideration the relation between glucosinolate content, their conversion rate to bioactive compounds and growing condition as well as chemical stress was defined. Additionally those results confirmed that white cabbage is proper *Brassica* vegetable to use both in phytoremediation and biofumigation processes.

Obtained results on diverse course of glucosinolates hydrolysis encouraged to further research using different parts of brassicas in order to apply these residues in the production of environmental-friendly biofumigation prepare. Also the effective way of targeting glucosinolate hydrolysis was proposed towards selective inactivation of additional protein factors promoting formation of less bioactive products by microwaving of plant material. This process enhances biofumigation potential of brassicas, which was confirmed by comparison of typical plant pathogens' suppression by compounds present in microwaved or not cabbage juices. Although presented research were carried out in the interest of biofumigation, obtained results are universal and proposed solutions can be implemented in other areas like production of diet supplements or functional food.

VIII. SPIS LITERATURY

1. Kurilich A., Tsau G., Brown A., Howard L., Klein B., Jeffery E., Carotene, tocopherol, and ascorbate contents in subspecies of *Brassica oleracea*, *J. Agric. Food Chem.*, 47, 1576–1581, 1999.
2. Jeffery E., Brown A., Kurilich A., Matusheski N., Klein B., Variation in content of bioactive components in broccoli. Study review, *J. Food Compos. Anal.* 16, 323-330, 2003.
3. Vallejo F., Tomas-Barberan F., Garcia-Viguera C., Potential bioactive compounds in health promotion from broccoli cultivars grown in Spain, *J. Sci. Food Agric.* 82, 1293–1297, 2002.
4. Lisiewska Z., Kmiecik W., Effects of level of nitrogen fertilizer, processing conditions and period of storage of frozen broccoli and cauliflower on vitamin C retention, *Food Chem.* 57, 267-270, 1996.
5. Van der Berg H., Faulks R., Granado F., Hirschberg J., Olmedilla B., Sandmann G., The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects, *J. Sci. Food Agric.* 80, 880-912, 2000.
6. Czczot H., Biological activities of flavonoids-a review, *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 950, 3-13, 2000.
7. Wang L., Chiao J., Prostate cancer chemopreventive activity of phenethyl isothiocyanate through epigenetic regulation (review), *Int. J. Oncol.* 37, 533-539, 2010.
8. Podsędek A., Natural antioxidants and antioxidant capacity of *Brassica* vegetables: A review, *LWT* 40, 1–11 2007.
9. Wu X., Beecher G., Holden J., Haytowitz D., Gebhardt S., Prior R., Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States, *J. Agric. Food Chem.* 52, 4026–4037, 2004.
10. Bahorun T., Luximon-Ramma A., Crozier A., Aruoma O., Total phenol, flavonoid, proanthocyanidin and vitamin C levels and antioxidant activities of Mauritian vegetables, *J. Sci. Food Agric.*, 84, 1553-1561, 2004.
11. Hollman P., Hertog M., Katan M., Analysis and health effects of flavonoids, *Food Chem.* 57, 43-46, 1996.
12. Muller H., Determination of the carotenoid content in selected vegetables and fruit by HPLC and photodiode array detection, *Z. Lebensm- Unters. For. A*, 204, 88–94, 1997.
13. Smoleń S., Sady W., The effect of various nitrogen fertilization and foliar nutrition regimes on the concentrations of sugars, carotenoids and phenolic compounds in carrot (*Daucus carota* L.), *Sci. Hort.* 120, 315–324, 2009.
14. Holden J., Eldridge A., Beecher G., Buzzard I., Bhagwat S., Davis C., Carotenoid content of US foods: An update of the database, *J. Food Compos. Anal.* 12, 169–196, 1999.
15. Zhang D., Hamauzu Y., Phenolics, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant activity of broccoli and their changes during conventional and microwave cooking, *Food Chem.*, 88, 503–509, 2004.
16. De Sa M., Rodriguez-Amaya D., Optimization of HPLC quantification of carotenoids in cooked green vegetables—Comparison of analytical and calculated data, *J. Food Compos. Anal.* 17, 37–51, 2004.

17. Murkovic M., Gams K., Draxl S., Pfannhauser W., Development of an Austrian carotenoid database, *J. Food Compos. Anal.*, 13, 435–440, 2000.
18. Heinonen M., Ollilainen V., Linkola E., Varo P., Koivistoinen P., Carotenoids in Finnish foods: Vegetables, fruits, and berries, *J. Agric. Food Chem.* 37, 655–659, 1989.
19. Singh J., Upadhaya A., Prasad K., Bahadyr A., Rai M., Variability of carotenoids, vitamin C, E and phenolics in *Brassica* vegetables, *J Food Compost Anal.* 20, 106-112, 2007.
20. Batista C., Barros L., Carvalho A., Ferreira I., Nutritional and nutraceutical potential of rape (*Brassica napus* L. var. *napus*) and “tranchuda” cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *costata*) inflorescences, *Food Chem. Toxicol.* 49, 1208-1214, 2011.
21. Korus A., Lisiewska Z, Effect of preliminary processing and method of preservation on the content of selected antioxidative compounds in kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) leaves, *Food Chem.* 129, 149–154, 2011.
22. Hagen S, Borge G, Solhaug K, Bengtsson G, Effect of cold storage and harvest date on bioactive compounds in curly kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*), *Postharvest Biol. Tec.* 51, 36–42, 2009.
23. Chemical and Functional Properties of Food Components, praca zbiorowa pod red. Z. Sikorskiego, CRC Press Inc., 2000.
24. Quilez J., Garcia-Lorda P., Salas-Salvado J., Potential uses and benefits of phytosterols in diet: present situation and future directions, *Clin. Nutr.* 22, 343–351, 2003.
25. Bradfield C., Bjeldanes L., High performance liquid chromatographic analysis of anticarcinogenic indoles in *Brassica oleracea*, *J. Agric. Food Chem.* 35, 46-49, 1987.
26. Davey M., van Montagu M., Inze D., Sanmartin M., Kanellis A., Smirnoff N., Plant L-ascorbic acid: Chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing, *J. Sci. Food Agric.* 80, 825–860, 2000.
27. Piironen V., Syvaaja E., Varo P., Salminen K., Koivistoinen P., Tocopherols and tocotrienols in Finnish foods: Vegetables, fruits and berries, *J. Agri. Food Chem.* 34, 742-746, 1986.
28. Goncalves E., Abreu M., Brandão T., Silva C., Degradation kinetics of colour, vitamin C and drip loss in frozen broccoli (*Brassica oleracea* L. ssp. *Italica*) during storage at isothermal and non-isothermal conditions, *Int. J. Refrig.* 34, 2136-2144, 2011.
29. Franke A., Custer L., Arakaki C., Murphy S., Vitamin C and flavonoid levels of fruits and vegetables consumed in Hawaii, *J. Food Compos. Anal.* 17, 1–35, 2004.
30. Pfendt L., Vukasinovic V., Blagojevic N., Radojevic M., Second order derivative spectrophotometric method for determination of vitamin C content in fruits, vegetables and fruit juices, *Eur. Food Res. Technol.* 217, 269–272, 2003.
31. Czarniecka-Skubina E., Effect of the material form, storage and cooking methods on the quality of Brussels sprouts, *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 52, 75–82, 2002.
32. Puupponen-Pimia R., Hakkinen S., Aarni M., Suortti T., Lampi A., Euroola M., Blanching and long-term freezing affect various bioactive compounds of vegetables in different ways, *J. Sci. Food Agric.* 83, 1389–1402, 2003.
33. Volden J., Bengtsson G., Wicklund T., Glucosinolates, L-ascorbic acid, total phenols, anthocyanins, antioxidant capacities and colour in cauliflower (*Brassica oleracea* L. ssp. *botrytis*); effects of long-term freezer storage, *Food Chem.* 112, 967–976, 2009.
34. Piekarska A., Bartoszek A., Namieśnik J., Biofumigacja jako alternatywna metoda ochrony roślin, *Ecol. Chem. Eng. S*, 17, 527-547, 2010.

35. Szczygłowska M., Piekarska A., Konieczka P., Niemiśnik J., Use of *Brassica* plants in the phytoremediation and biofumigation processes, *Int. J. Mol. Sci.* 12, 7760-7771, 2011.
36. Zhang Y., Talalay P., Cho, C., Posner G., A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 2399-2403, 1992.
37. Mikkelsen M., Petersen B., Olsen C., Halkier B., Biosynthesis and metabolic engineering of glucosinolates, *Amino Acids* 22, 279-295, 2002.
38. Halkier B., Gershenzon J., Biology and biochemistry of glucosinolates, *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 303-333, 2006.
39. Redovnikovic I., Glivetic T., Delonga K., Vorkapić-Furac J., Glucosinolates and their potential role in plant, *Period. Biol.* 110, 297-309, 2008.
40. Bak S., Feyereisen R., The involvement of two P450 enzymes, CYP83B1 and CYP83A1, in auxin homeostasis and glucosinolate biosynthesis, *Plant Physiol.* 127, 108-118, 2001.
41. Grubb C., Abel S., Glucosinolate metabolism and its control, *Trends Plant Sci.* 11, 89-100, 2006.
42. Rask L., Andreasson E., Ekblom B., Eriksson S., Pontoppidan B., Meijer J., Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in *Brassicaceae*, *Plant Mol. Biol.* 42, 93-114, 2000.
43. Mithen R., Glucosinolates – biochemistry, genetics and biological activity, *Plant Growth Regul.* 34, 91–103, 2001.
44. Wittstock U, Halkier B, Glucosinolate research in the *Arabidopsis* era, *Trends Plant Sci.* 7, 263-270, 2002.
45. Clarke B., Glucosinolates, structures and analysis in food, *Anal. Methods*, 2, 310-325, 2010.
46. Agerbirk N., Olsen C., Glucosinolate structures in evolution, *Phytochem.* 77, 16–45, 2012.
47. Fahey J., Zalcmann A., Talalay P., The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants, *Phytochem.* 56, 5-51, 2001.
48. Boufford, D.E., Kjaer, A., Ogaard Madsen, J., Skrydstrup, T., Glucosinolates in *Bretschneideraceae*, *Biochem. Syst. Ecol.* 21, 607–616, 1989.
49. Bennett R., Mellon F., Foidl N., Pratt J., Dupont M., Perkins L., Kroon P., Profiling glucosinolates and phenolics in vegetative and reproductive tissues of the multi-purpose trees *Moringa oleifera* L. (horseradish tree) and *Moringa stenopetala* L., *J. Agric. Food Chem.* 51, 3546-3553, 2003.
50. Tobe H., Carlquist S., Iltis H., Reproductive anatomy and relationships of *Setchellanthus caeruleus* (*Setchellantitaceae*), *Taxon* 48, 277–283, 1999.
51. Bennett R., Mellon F., Rosa E., Perkins L., Kroon P., Profiling glucosinolates, flavonoids, alkaloids and other secondary metabolites in tissues of *Azima tetraacantha* L. (*Salvadoraceae*), *J. Agric. Food Chem.* 52, 5856-862, 2004.
52. Williams D., Pun S., Chaliha M., Scheelings P., O'Hare T., An unusual combination in papaya (*Carica papaya*): The good (glucosinolates) and the bad (cyanogenic glycosides), *J. Food Compos. Anal.* 29, 82-86, 2013.
53. Vig A., Rampal G., Singh T., Arora S., Bio-protective effects of glucosinolates – a review, *LWT* 42, 1561-1572, 2009.

54. Kissen R, Rossiter J, Bones A, The 'mustard oil bomb': not so easy to assemble?! Localization, expression and distribution of the components of the myrosinase enzyme system, *Phytochem Rev* . 8, 69–86, 2009.
55. Song L., Thornalley P., Effect of storage, processing and cooking on glucosinolate content of *Brassica* vegetables, *Food Chem. Toxicol.* 45, 216-224, 2007.
56. Verkerk R., Dekker M., Glucosinolates and myrosinase activity in red cabbage after various microwave treatments, *J. Agric. Food Chem.* 52, 7318-7323, 2004.
57. Volden J., Wicklund T., Verkerk R., Dekker M., Kinetics changes in glucosinolate concentrations during long-term cooking of white cabbage, *J. Agric. Food Chem.* 56, 2068-2073, 2008.
58. Kusznierewicz B., Bartoszek A., Wolska L., Drzewiecki J., Gorinstein S., Namieśnik J., Partial characterization of white cabbages (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *alba*) from different regions by glucosinolates, bioactive compounds, total antioxidant activities and proteins, *LWT*, 41, 1–9, 2008.
59. Millan S, Sampedro M., Gallejones P., Castellon A., Ibargoitia M., Goicolea M., Barrio R., Identification and quantification of glucosinolates in rapeseed using liquid chromatography- ion mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 294, 1661-1669, 2009.
60. Francisco M., Velasco P., Moreno D., García-Viguera, Cartea M., Cooking methods of *Brassica rapa* affect the preservation of glucosinolates, phenolics and vitamin C, *Food Res. Int.* 43, 1455–1463, 2010.
61. Brown P., Morra M., *Brassicaceae* tissues as inhibitors of nitrification in soil, *J. Agric. Food Chem.* 57, 7706–7711, 2009.
62. Bones A, Distribution of β -thioglucosidase activity in intact plants, cell and tissue cultures and regenerated plants of *Brassica napus* L, *J. Exp. Bot.* 41, 737-744, 1990.
63. Eriksson S, Ek B, Xue J., Identification and characterization of soluble and insoluble myrosinase isoenzymes in different organs of *Sinapis alba*, *Physiol Plant* 111, 353– 364, 2001.
64. Falk A., Ek B., Rask L., Characterization of a new myrosinase in *Brassica napus*. *Plant Mol Biol.* 27, 863– 874, 1995.
65. Eriksson S., Andreasson E., Ekbohm B., Complex formation of myrosinase isoenzymes in oilseed rape seeds are dependent on the presence of myrosinase-binding proteins, *Plant Physiol.* 129, 1592–1599, 2002.
66. Akoh C., Lee G., Liaw Y., GDSL family of serine esterases/lipases, *Prog Lipid Res.* 43, 534-552, 2004.
67. Zhang Z., Ober J., Kliebenstein D., The gene controlling the quantitative trait locus epithiospecifier modifier 1 alters glucosinolate hydrolysis and insect resistance in *Arabidopsis*, *Plant Cell* 18, 1524-1536, 2006.
68. Heinricher E., Uber Eiweisstoffe fuhrende Idioblasten bei einigen Cruciferen, *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 463-467, 1884.
69. Gil V., McLeod A., Degradation of glucosinolates of *Nasturtium officinale* seds, *Phytochem.* 19, 1657-1660, 1980.
70. Palmieri S., Iori R., Leoni O., Comparison of methods for determining myrosinase activity, *J. Agric. Food Chem.* 35, 617 – 621, 1987.

71. Wilkinson A., Rhodes M., Fenwick R., Myrosinase activity of cruciferous vegetables, *J. Sci. Food Agric.* 35, 543 – 552, 1984.
72. Kleinwächter M., Selmar D., A novel approach for reliable activity determination of ascorbic acid depending myrosinases, *J. Biochem. Biophys. Methods* 59, 253–265, 2004.
73. Piekarska A., Kusznerewicz B., Meller M., Dziedziul K., Namieśnik J., Bartoszek A., Myrosinase activity in different plant samples; optimisation of measurement conditions for spectrophotometric and pH-stat methods, *Ind Crop Prod.* 50, 58–67, 2013.
74. Travers-Martin N., Kuhlmann F., Muller C., Revised determination of free and complexed myrosinase activities in plant extracts, *Plant Physiol. Biochem.* 46, 506-516, 2008.
75. Tookey H., Wolff I, Effect of organic reducing agents and ferrous ion on thioglucosidase activity of *Crambe abyssinica* seed, *Can. J. Biochem.* 48, 1024-1028, 1970.
76. Singh J., Rai M., Upadhyay A.K., Prasad K., Sinigrin (2-propenyl glucosinolate) content and myrosinase activity in *Brassica* vegetables, *Int. J. Veget. Sci.* 13, 21-31, 2007.
77. Shikita M., Fahey, J., Golden T., Holtzclaw W., Talalay P., An unusual case of ‘uncompetitive activation’ by ascorbic acid: purification and kinetic properties of a myrosinase from *Raphanus sativus* seedlings, *Biochem. J.* 341, 725–732, 1999.
78. Ludikhuyze L., Rodrigo L., Hendrickx M., The activity of myrosinase from broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*): Influence of intrinsic and extrinsic factors, *J. Food Prot.* 63, 400-403, 2000.
79. Charron C., Saxton A., Sams C., Relationship of climate and genotype to seasonal variation in the glucosinolate – myrosinase system. II. Myrosinase activity in ten cultivars of *Brassica oleracea* grown in fall and spring seasons. *J. Sci. Food Agric.* 85, 682-690, 2005.
80. Yen G., Wei Q., Myrosinase activity and total glucosinolate content of cruciferous vegetables, and some properties of cabbage myrosinase in Taiwan, *J. Sci. Food Agric.* 61, 471-475, 1993.
81. Finiguerra M., Iori R., Palmieri S., Soluble and total myrosinase activity in defatted *Crambe abyssinica* meal, *J. Agric. Food Chem.* 49, 840-845, 2001.
82. Bernardi R., Finiguerra M., Rossi A., Palmieri S., Isolation and biochemical characterization of a basic myrosinase from ripe *Crambe abyssinica* seeds, highly specific for epi – progoitrin, *J. Agric. Food Chem.* 51, 2737-2744, 2003.
83. Lazzeri L., Leoni O., Manici L., Biocidal plant dried pellets for biofumigation, *Ind. Crop Prod.* 20, 59–65, 2004.
84. Manici L., Lazzeri L., Baruzzi G., Leoni O., Galletti S., Palmieri S., Suppressive activity of some glucosinolate enzyme degradation products on *Pythium irregulare* and *Rhizoctonia solani* in sterile soil, *Pest Manag. Sci.* 56, 921-926, 2000.
85. Mari M., Leoni O., Bernardi R., Neri F., Palmieri S., Control of brown rot on stonefruit by synthetic and glucosinolate-derived isothiocyanates, *Postharvest. Biol. Technol.* 47, 61-67, 2008.
86. Mattner S., Porter I., Gounder R., Shanks A., Wren D., Allen D., Factors that impact on the ability of biofumigants to suppress fungal pathogens and weeds of strawberry, *Crop Prot.* 27, 1165–1173, 2008.
87. Sanchi S., Odorizzi S., Lazzeri L., Marciano P., Effect of *Brassica carinata* seed meal treatment on the *Trichoderma harzianum* t39–*Sclerotinia* species interaction, *Acta Hort.* 698, 287–292, 2005.

88. Smolińska U., Morra M., Knudsen G., James, R., Isothiocyanates produced by *Brassicaceae* species as inhibitors of *Fusarium oxysporum*, *Plant Dis.* 87, 407-412, 2003.
89. Aires A., Carvalho R., Barbosa M., Rosa E., Suppressing potato cyst nematode, *Globodera rostochiensis* with extracts of *Brassicaceae* plants, *Am. J. Pot. Res.* 86, 327-333, 2009.
90. Lin C., Preston J., Wei C., Antibacterial mechanism of allyl isothiocyanate, *J. Food Prot.* 63, 727-34, 2000.
91. Ward S., Delaquis P., Holley R., Mazza G., Inhibition of spoilage and pathogenic bacteria on agar and pre-cooked roast beef by volatile horseradish distillates, *Food Res. Int.* 31, 19-26, 1998
92. Lazzeri L., Curto G., Leoni O., Dallavalle E., Effects of glucosinolates and their enzymatic hydrolysis products via myrosinase on the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid et White) Chitw., *J. Agric. Food Chem.* 52, 6703-6707, 2004.
93. Lazzeri L., Curto G., Dallavalle E., D'Avino L., Malaguti I., Santi R., Patalano, G., Nematicidal efficacy of biofumigation by defatted *Brassicaceae* meal for control of *Meloidogyne incognita* (Kofoid et White) Chitw. on a full field zucchini crop, *J. Sustain. Agric.* 33, 349-358, 2009.
94. Lord J., Lazzeri L., Atkinson H., Urwin P., Biofumigation for control of pale potato cyst nematodes: Activity of *Brassica* leaf extracts and green manures on *Globodera pallida* *in vitro* and in soil, *J. Agric. Food Chem.* 59, 7882-7890, 2011.
95. Lugauskas A., Repečkienė J., Uselis N. and Rašinskienė A., Problems on a longtime strawberry growing in one plot, *Hort. Cult.* 2, 59-68, 2003.
96. Zasada I., Ferris H., Nematode suppression with brassicaceous amendments: application based upon glucosinolate profiles, *Soil Biol. Biochem.* 36, 1017-1024, 2004.
97. Borek V., Elberson L., McCaffrey J., Morra M., Toxicity of rapeseed meal and methyl isothiocyanate to larvae of the black vine weevil (Coleoptera: *Curculionidae*), *J. Econ. Entomol.* 90, 109-112, 1997.
98. Elberson L., Borek V., McCaffrey J., Morra M., Toxicity of rapeseed meal-amended soil to wireworms, *Limonijs californicus* (Coleoptera: *Elateridae*), *J. Agric. Entomol.* 13, 323-330, 1996.
99. Rice M., Damage assessment of the annual white grub, *Cyclocephala lurida* (Coleoptera: *Scarabaeidae*), in corn and soybean, *J. Econ. Entomol.* 87, 220-222, 1994.
100. Foo H., Grønning L., Goodenough L., Bones A., Danielsen B., Whiting D., Rossiter J., Purification and characterisation of epithiospecifier protein from *Brassica napus*: enzymic intramolecular sulphur addition within alkenyl thiohydroximates derived from alkenyl glucosinolate hydrolysis, *FEBS Lett.* 468, 243-246, 2000.
101. Piekarska A., Kołodziejcki D., Pilipczuk T., Bodnar M., Konieczka P., Kusznierevich B., Hanschen F., Schreiner M., Cyprys J., Groszewska M., Namieśnik J., Bartoszek A., The influence of selenium addition during germination of *Brassica* seeds on health-promoting potential of sprouts, *Int J Food Sci Nutr*, 2013, doi. 10.3109/09637486.2014.917148
102. de Torres Zabala M., Grant M., Bones A., Bennett R., Yin Sze Lim, Kissen R., Rossiter J., Characterisation of recombinant epithiospecifier protein and its over-expression in *Arabidopsis thaliana*, *Phytochem.* 66, 859-867, 2005.
103. Lambrix V., Reichelt M., Mitchell-Olds T., Kliebenstein D., Gershenzon J., The *Arabidopsis* epithiospecifier protein promotes the hydrolysis of glucosinolates to nitriles

- and influences *Trichoplusia ni* herbivory, *Plant Cell* **13**, 2793–2807, 2001.
104. Williams D., Critchley C., Pun S., Chaliha M., O'Hare T., Differing mechanisms of simple nitrile formation on glucosinolate degradation in *Lepidium sativum* and *Nasturtium officinale* seeds, *Ph Travers ytochem.* **70**, 1401-1409, 2009.
 105. Bellostas N., Sørensen A., Sørensen J., Sørensen H., Fe²⁺-catalyzed formation of nitriles and thionamides from intact glucosinolates, *J. Nat. Prod.* **71**, 76-80, 2008.
 106. Bellostas N., Petersen I., Sorensen J., Sorensen H., A fast and gentle method for the isolation of myrosinase complexes from *Brassicaceous* seeds, *J. Biochem. Biophys. Meth.* **70**, 918-925, 2008.
 107. Bellostas N., Sørensen A., Sørensen J., Sørensen H., Type and concentration of redox reagents influencing nitrile formation upon myrosinase (*Brassica carinata*)-catalyzed hydrolysis of glucosibarin, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **57**, 229-236, 2009.
 108. Kissen R., Bones AM., Nitrile-specifier proteins involved in glucosinolate hydrolysis in *Arabidopsis thaliana*, *J. Biol. Chem.* **284**, 12057–12070, 2009.
 109. Burow M., Market J., Gershenzon J., Wittstock U., Comparative biochemical characterisation of nitrile-forming proteins from plants and insects that alter myrosinase-catalysed hydrolysis of glucosinolates, *FEBS Journal* **273**, 2432– 2446, 2006.
 110. Burow M., Bergner A., Gershenzon J., Wittstock U., Glucosinolate hydrolysis in *Lepidium sativum*-identification of the thiocyanate-forming protein, *Plant Mol. Biol.* **63**, 49–61, 2007.
 111. Morant A., Jørgensen K., Jørgensen C., Paquette S., Sánchez-Pérez R., Møller B., Bak S., β -Glucosidases as detonators of plant chemical defense, *Phytochem.* **69**, 1795–1813, 2008.
 112. Williams C., Critchley C., Pun S., Nottingham S., O'Hare T., Epithiospecifier protein activity in broccoli: The link between terminal alkenyl glucosinolates and sulphoraphane nitrile, *Phytochem.* **69**, 2765–2773, 2008.
 113. Carlson D, Daxenbichler M., Tookey H., Kwolek W., Hill C., Williams P., Glucosinolates in turnip tops and roots: cultivars grown for greens and/or roots, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **112**, 179-183, 1987.
 114. Xie Z., Shi Y., Wang Z., Wang R., Li Y., Biotransformation of glucosinolates epiprogoitrin and progoitrin to (R)- and (S)-Goitrin in *Radix isatidis*, *J Agric Food Chem.* **59**, 12467-12472, 2011.
 115. Hanczakowska E., Świątkiewicz M., Węglarzy K., Wykorzystanie produktów ubocznych produkcji biopaliw: makuchu rzepakowego i glicerolu w żywieniu prosiąt, *Zeszyty Naukowe UP we Wrocławiu-Biologia zwierząt*, **580**, 199- 206, 2011.
 116. Bachmann M., Theus R., Luthy J., Schlatter C., The occurrence of goitrogenic substances in milk. 1. Release of goitrin in the milk of cows fed on rapeseed extract cakes, *Z Lebensm Unters Forsch.* **181**, 375-378, 1985.
 117. Brzóska F., Śliwiński B., Michalik-Rutkowska O., Pasze rzepakowe – wykorzystanie w żywieniu zwierząt oraz bioenergetyce. Cz. 2, *Wiadomości Zootechniczne*, **2–3**, 19–29, 2010.
 118. Brzóska F., Śliwiński B., Michalik-Rutkowska O., Pasze rzepakowe – miejsce w bilansie białkowym kraju oraz wartość pokarmowa. Cz. 1, *Wiadomości Zootechniczne*, **2–3**, 11–18, 2010.

119. Smulikowska S., Brązowe zabarwienie skorupy jaj ogranicza zastosowanie pasz rzepakowych w żywieniu niosek, *Pol. Drob.*, 12, 18–19, 2002.
120. Burow M., Zhang Z., Ober J., Lambrix V., Wittstock U., Gershenzon J., Kliebenstein D., ESP and ESM1 mediate indol-3-acetonitrile production from indol-3-ylmethyl glucosinolate in *Arabidopsis*, *Phytochem.* 69, 663–671, 2008.
121. Broadbent T., Broadbent H., The chemistry and pharmacology of indole-3-carabinol (indole-3-methanol) and 3-(methoxymethyl)indole, *Curr. Med. Chem.* 5, 337-352, 469-491, 1998.
122. Grose K., Bjeldanes L., Oligomerization of indole-3-carabinol in aqueous acid, *Chem. Res. Toxicol.* 5, 188-193, 1992.
123. Burgiel Z., Badania nad możliwością wykorzystania wybranych roślin z rodziny *Brassicaceae* w ochronie ogórka przed zgorzelą siewek powodowaną przez *Rhizoctonia solani* Kuhn i *Fusarium culmorum* (W.G. Smith) Sacc., *Acta Agrobot.* 2, 171-178, 2005.
124. Williams-Woodward J., Pflieger F., Fritz V., Allmaras R., Green manures of oat, rape and sweet corn for reducing common root rot in pea (*Pisum sativum*) caused by *Aphanomyces euteiches*, *Plant Soil*, 188, 43–48, 1997.
125. Yulianti T., Sivasithamparam K., Turner D., Saprophytic and pathogenic behaviour of *R. solani* AG2-1(ZG-5) in a soil amended with *Diplotaxis tenuifolia* or *Brassica nigra* manures and incubated at different temperatures and soil water content, *Plant Soil* 294, 277–289, 2007.
126. Weerakoon D., Reardon C., Paulitz T., Izzo A., Mazzola M., Long-term suppression of *Pythium abappressorium* induced by *Brassica juncea* seed meal amendment is biologically mediated, *Soil Biol. Biochem.* 51, 44-52, 2012.
127. Motisi N., Montfort F., Faloya V., Lucas P., Dore ´ T., Growing *Brassica juncea* as a cover crop, then incorporating its residues provide complementary control of *Rhizoctonia* root rot of sugar beet, *Field Crop Res.* 113, 238–245, 2009.
128. Forney C., Mattheis J., Austin R., Volatile compounds produced by broccoli under anaerobic conditions, *J. Agric. Food Chem.* 39, 2257-2259, 1991.
129. Piedra Buena A., García-Álvarez A., Díez-Rojo M., Ros C., Fernández P., Lacasa A., Bello A., Use of pepper crop residues for the control of root-knot nematodes, *Biores. Tech.* 98, 2846–2851, 2007.
130. Piedra Buena A., García-Álvarez A., Díez-Rojo M., Bello A., Use of crop residues for the control of *Meloidogyne incognita* under laboratory conditions, *Pest Manag. Sci.* 62, 919–926, 2006.
131. Zanon M., Jorda C., Eradication of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by incorporating fresh crop debris into soil: Preliminary evaluations under controlled conditions, *Crop Prot.* 27, 1511–1518, 2008.
132. Marles R., Hudson J., Graham E., Breau C., Morand P., Compadre R., Compadre C., Towers G., Arnason J., Structure–activity studies of photoactivated antiviral and cytotoxic thiophenes, *Phytochem. Phytobiol.* 56, 479–487, 1992.
133. Hooks C., Wang K-H., Ploeg A., McSorley R., Using marigold (*Tagetes* spp.) as a cover crop to protect crops from plant-parasitic nematodes, *App. Soil Ecol.* 46, 307–320, 2010.
134. Sturz A., Kimpinski J., Endoroot bacteria derived from marigold (*Tagetes* spp.) can decrease soil population densities of root-lesion nematodes in the potato root zone, *Plant Soil* 262, 241–249, 2004.

135. Alexander S., Waldenmaier C., Suppression of *Pratylenchus penetrans* populations in potato and tomato using African marigolds, *J. Nematol.* 34, 130-134, 2002.
136. Galletti S., Sala E., Leoni O., Burzi P., Cerato C., *Trichoderma* spp. tolerance to *Brassica carinata* seed meal for a combined use in biofumigation, *Biol. Control.* 45, 319–327, 2008.
137. Śmiechowska A., Bartoszek A., Namieśnik J., Cancer chemopreventive agents: Glucosinolates and their decomposition products in white cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*), *Postępy Hig. Med. Dośw.* 62, 125-140, 2008.
138. Srivastava S., Singh S., Cell cycle arrest, apoptosis induction and inhibition of nuclear factor Kappa B activation in anti-proliferative activity of benzyl isothiocyanate against human pancreatic cancer cells, *Carcinogen.* 25, 1701–1709, 2004.
139. Sehrawat A., Singh S., Benzyl isothiocyanate inhibits epithelial-mesenchymal transition in cultured and xenografted human breast cancer cells, *Cancer Prev. Res.* 4, 1107-1117, 2011.
140. Higdon J., Delage B., Williams D., Dashwood R., Cruciferous vegetables and human cancer risk: epidemiologic evidence and mechanistic basis, *Pharmacol. Res.* 55, 224-236, 2007.
141. Kim S., Nagalingam A., Saxena N., Singh S., Sharma D., Benzyl isothiocyanate inhibits oncogenic actions of leptin in human breast cancer cells by suppressing activation of signal transducer and activator of transcription 3, *Carcinogen.* 32, 359–367, 2011.
142. Kuang Y., Chen Y., Induction of apoptosis in a non-small cell human lung cancer cell line by isothiocyanates is associated with P53 and P21, *Food Chem. Toxicol.* 42, 1711–1718, 2004.
143. Wang E., Lee H., Allyl isothiocyanate and its N-acetylcysteine conjugate suppress metastasis via inhibition of invasion, migration, and matrix metalloproteinase 2/-9 activities in SK-Hep 1 human hepatoma cells, *Exp. Biol. Med.* 231, 421–430, 2006.
144. Yoon K., Lee S., Cho S., Kim K., Khan K., Safe S., Activation of nuclear TR3 (NR4A1) by a diindolylmethane analog induces apoptosis and proapoptotic genes in pancreatic cancer cells and tumors, *Carcinogen.* 32, 836–842, 2011.
145. Zhang Y., Allyl isothiocyanate as a cancer chemopreventive phytochemical, *Mol. Nutr. Food Res.* 54, 127–135, 2010.
146. Peng Y., Bao-An C., De-Long L., Anticancer mechanisms and researches of isothiocyanates, *Chin. J. Nat. Med.* 6, 325–332, 2008.
147. Miyoshi N., Uchida K., Osawa T., Nakamura Y., A link between benzyl isothiocyanate-induced cell cycle arrest and apoptosis: involvement of mitogen-activated protein kinases in the Bcl-2 phosphorylation, *Cancer Res.* 64, 2134–2142, 2004.
148. Manesh C., Kuttan G., Effect of naturally occurring isothiocyanates on the immune system, *Immunotoxicol.* 25, 451-459, 2003.
149. Cover C., Hsieh S., Tran S., Hallden G., Kim G., Bjeldanes L., Firestone G., Indole-3-carbinol inhibits the expression of cyclin-dependent kinase-6 and induces a G1 cell cycle arrest of human breast cancer cells independent of estrogen receptor signaling, *J. Biol. Chem.* 273, 3838–3847, 1998.
150. Kim S., Ryu J., Li H., Park W., Yun H., Baek K., Kwon N., Sohn U., Kim D., UVB-activated indole-3-acetic acid induces apoptosis of PC-3 prostate cancer cells, *Anticancer Res.* 30, 4607-12, 2010.

151. Wortelboer H., De Kruif C., van Iersel A., Falke H., Noordhoek J., Blaauboer B., Acid reaction products of indole-3-carbinol and their effects on cytochrome P450 and phase II enzymes in rat and monkey hepatocytes, *Biochem. Pharm.* 43, 1439-1447, 1992.
152. Tiwari, R. K., Guo, L., Bradlow, H. L., Telang, N. T., & Osborne, M., Selective responsiveness of human breast cancer cells to indole-3-carbinol, a chemopreventive agent, *J. Nat. Cancer Inst.* 86, 126–131, 1994.
153. Licznerska B., Szaefer H., Murias M., Bartoszek A., Baer-Dubowska W., Modulation of CYP19 expression by cabbage juices and their active components: indole-3-carbinol and 3,3'-diindolylmethene in human breast epithelial cell lines, *Eur J Nutr.* 52, 1483–1492, 2013.
154. Lu Q., Nakmura J., Savinov A., Yue W., Weisz J., Dabbs F., Wolz G., Brodie A., Expression of aromatase protein and messenger ribonucleic acid in tumor epithelial cells and evidence of functional significance of locally produced estrogen in human breast cancer, *Endocrinology* 137, 3061–30686, 1996.
155. Yue W., Wang J., Hamilton C., Demers L., Santen R., In situ aromatization enhances breast tumor estradiol levels and cellular proliferation. *Cancer Res* 58, 927–932, 1998.
156. Szaefer H., Licznerska B., Krajka-Kuźniak V., Bartoszek A., Baer-Dubowska W., Modulation of CYP1A1, CYP1A2 and CYP1B1 expression by cabbage juices and indoles in human breast cell lines, *Nutr Cancer*, 64, 1–10, 2012.
157. Tsuchiya Y., Nakajima M., Yokoi T., Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human, *Cancer Lett* 227, 115–124, 2005.
158. Zhu C., Loft S., Effect of chemopreventive compounds from Brassica vegetables on NAD (P)H:quinone reductase and induction of DNA strand breaks in murine hepa1c1c7 cells, *Food Chem Toxicol* 41, 455–462, 2003.
159. Kusznierewicz B., Piasek A., Lewandowska J., Śmiechowska A., Bartoszek A., Właściwości przeciwnowotworowe kapusty białek, *Żywn. Nauk. Technol. Jakość* 6, 20-34, 2007.
160. Szaefer H., Krajka-Kuźniak V., Bartoszek A., Baer-Dubowska W., Modulation of carcinogen metabolizing cytochromes P450 in rat liver and kidney by cabbage and sauerkraut juices: comparison with the effects of indole-3-carbinol and phenethyl isothiocyanate, *Phytother Res.* 26, 1148-1155, 2012.
161. Krajka-Kuźniak V., Szaefer H., Bartoszek A., Baer-Dubowska W., Modulation of rat hepatic and kidney phase II enzymes by cabbage juices: comparison with the effects of indole-3-carbinol and phenethyl isothiocyanate, *Brit. J. Nutr.* 105, 816–826, 2011.
162. Baasanjav-Gerber C., Monien B., Mewis I., Schreiner M., Barillari J., Iori R., Glatt H., Identification of glucosinolate congeners able to form DNA adducts and to induce mutations upon activation by myrosinase, *Mol. Nutr. Food Res.* 55, 783–792, 2011.
163. Glatt H., Baasanjav-Gerber C., Schumacher F., Monien B., Schreiner M., Frank H., Seidel A., Engst W., 1-Methoxy-3-indolylmethyl glucosinolate; a potent genotoxicant in bacterial and mammalian cells: Mechanisms of bioactivation, *Chem-Biol. Interact.* 192, 81–86, 2011.
164. McCann J., Choi E., Yamasaki E., Ames B., Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: assay of 300 chemicals, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 72, 5135–5139, 1975.
165. Baasanjav-Gerber C., Hollnagel H., Brauchmann J., Iori R., Glatt H., Detection of genotoxicants in *Brassicales* using endogenous DNA as a surrogate target and adducts

- determined by ³²P-postlabelling as an experimental endpoint, *Mutagen.* 26, 407-413, 2011.
166. Kassie F., Parzefall W., Musk S., Johnson I., Lamprecht G., Sontag G., Knasmüller S., Genotoxic effects of crude juices from Brassica vegetables and juices and extracts from phytopharmaceutical preparations and spices of cruciferous plants origin in bacterial and mammalian cells, *Chem. Biol. Interact.* 102, 1-16, 1996.
 167. Kassie F., Knasmüller S., Genotoxic effects of allyl isothiocyanate (AITC) and phenethyl isothiocyanate (PEITC), *Chem. Biol. Interact.* 127, 163-180, 2000.
 168. Kassie F., Laky B., Nobis E., Kundi M., Knasmüller S., Genotoxic effects of methyl isothiocyanate, *Mut. Res.* 490, 1-9, 2001.
 169. Yamaguchi T., Mutagenicity of isothiocyanates, thiocyanates and thioureas on *Salmonella typhimurium*, *J. Agric. Biol. Chem.* 44, 3017-3018, 1980.
 170. De Nicola G., Bagatta M., Pagnotta E., Angelino D., Gennari L., Ninfali P., Rollin P., Iori R., Comparison of bioactive phytochemical content and release of isothiocyanates in selected brassica sprouts, *Food Chem.* 141, 297-303, 2013.
 171. Hanlon P., Barnes D., Phytochemical composition and biological activity of 8 varieties of radish (*Raphanus sativus* L.) sprouts and mature taproots, *J. Food Sci.* 76, 185-192, 2011.
 172. Piekarska A., Kusznierecz B., Kołodziejcki D., Pilipczuk T., Szczygłowska M., Bodnar M., Bączek-Kwinta R., Konieczka P., Namieśnik J., Bartoszek A., The innovative exploitation of Brassica vegetables in the health quality food production chain, *Acta Hort.*, 1005, 71-85, 2013.
 173. Baranowska-Morek A., Roślinne mechanizmy tolerancji na toksyczne działanie metali ciężkich, *Kosmos. Problemy nauk biologicznych*, 52, 283-298, 2003.
 174. Mullineaux P., Rausch T., Glutathione, photosynthesis and the redox regulation of stress-responsive gene expression, *Photosynth. Res.* 86, 459-474, 2005
 175. Appenzeller-Herzog C., Glutathione and non-glutathione-based oxidant control in the endoplasmic reticulum, *J Cell Sci* 124, 847-855, 2011.
 176. Ball L., Accotto G., Bechtold U., Creissen G., Funck D., Jimenez A., Kular B., Leyland N., Mejia-Carranza J., Reynolds H., Karpinski S., Mullineaux P., Evidence for a direct link between glutathione biosynthesis and stress defense gene expression in *Arabidopsis*, *Plant Cell* 16, 2448-2462, 2004.
 177. Yeung E., Belmonte M., Luu T., Stasolla C., Glutathione modulation of in vitro development, *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 41, 584-590, 2005.
 178. Yadav S., Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatin in heavy metal stress tolerance of plants, *S. Afr. J. Bot.* 76, 167-179, 2010.
 179. Howden R., Goldsbrough P., Anderson C., Cobbett C., Cadmiumsensitive, cad1 mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin deficient, *Plant Physiol.* 107, 1059-1066, 1995.
 180. Zhu Y., Pilon-Smits E., Jouanin L., Terry N., Overexpression of glutathione synthetase in Indian mustard enhances cadmium accumulation and tolerance, *Plant Physiol.* 119, 73-80, 1999.
 181. Borsani O., Valpuesta V., Botella M., Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in *Arabidopsis* seedlings, *Plant Physiol* 126, 1024-1030, 2011.

182. Dat J., Foyer C, Scott I., Changes in salicylic acid and antioxidants during induced thermotolerance in mustard seedlings, *Plant Physiol.* 118, 1455-1461, 1998.
183. Muller-Moule P., Havaux M., Niyogi K., Zeaxanthin deficiency enhances the high light sensitivity of an ascorbate-deficient mutant of *Arabidopsis*, *Plant Physiol.* 133, 748–760, 2003.
184. Karpińska A., Gromadzka G., Stres oksydacyjny i naturalne mechanizmy antyoksydacyjne – znaczenie w procesie neurodegeneracji. Od mechanizmów molekularnych do strategii terapeutycznych, *Postepy Hig Med Dosw* 67, 43-53, 2013.
185. de Vos C., Vonk M., Vooijs R., Schat H., Glutathione depletion due to copper-induced phytochelatin synthesis causes oxidative stress in *Silene cucubalus*, *Plant Physiol.* 98, 853-858, 1992.
186. Pawlik- Skowrońska B., Pirszel J., Kalinowska R., Skowroński T., Arsenic availability, toxicity and direct role of GSH and phytochelatin in As detoxification in the green alga *Stichococcus bacillaris*, *Aquat. Technol.* 70, 201-212, 2004.
187. Gasic K., Korban S., Expression of *Arabidopsis* phytochelatin synthase in Indian mustard (*Brassica juncea*) plants enhances tolerance for Cd and Zn, *Planta*, 225, 1277-1285, 2007.
188. Gadapati W., Macfie S., Phytochelatin are only partially correlated with Cd-stress in two species of *Brassica*, *Plant Sci.* 170, 471-480, 2006.
189. Cobbett C., Goldsbrough P., Phytochelatin and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis, *Annu. Rev. Biol.* 53, 159–182, 2002
190. Pal-Pal R., Rai J., Phytochelatin: peptides involved in heavy metal detoxification, *Appl Biochem Biotechnol.* 160, 945–963, 2010.
191. Hirata K., Tsujimoto Y., Namba A., Ohta T., Hirayanagi N., Miyasaka H., Zenk M., Miyamoto K., Strong induction of phytochelatin by zinc in marine *Dunaliella tertiolecta*, *J. Biosci. Bioeng.* 92, 24-29, 2001.
192. Mishra S., Srivastava S., Tripathi R., Kuriakose S., Prasad M., Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri*, *Plant Physiol. Bioch.* 44, 25–37, 2006.
193. Seth C., Chaturvedi P., Misra V., The role of phytochelatin and antioxidants in tolerance to Cd accumulation in *Brassica juncea* L., *Ecotox. Environ. Safe* 71, 76–85, 2008.
194. Ebbs S., Lau I., Ahner B., Kochian L., Phytochelatin synthesis is not responsible for Cd tolerance in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* (J. and C. Presl), *Planta* 214, 635–640, 2002.
195. Vogeli-Lange R., Wagner G., Subcellular localization of cadmium and cadmium-binding peptides in tobacco leaves. Implication of a transport function for cadmium-binding peptides, *Plant Physiol.* 92, 1086-1093, 1990.
196. Clemens S., Schroeder J., Degenkolb T., *Caenorhabditis elegans* expresses a functional phytochelatin synthase, *Eur. J. Biochem.* 268, 3640-3643, 2001.
197. Amiard J., Amiard-Triquet C., Barka S., Pellerin J., Rainbow P., Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers, *Aquat Toxicol.* 76, 160–202, 2006.
198. Clemens S., Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis, *Planta* 212, 475-486, 2001

199. Haq F., Mahoney M., Koropatnik J., Signaling events for metallothionein induction, *Mutat. Res.* 533, 211-226, 2003.
200. Floriańczyk B., Metalotioneiny a wrażliwość nowotworów na chemioterapię i radioterapię, *Nowiny Lekarskie*, 68, 829-837, 1999.
201. Peroza E., Schmucki R., Güntert P., Freisinger E., Zerbe O., The β -domain of wheat Ec-1 metallothionein: a metal-binding domain with a distinctive structure, *J. Mol. Biol.* 387, 207-218, 2009.
202. Murphy A., Zhou J., Goldsbrough P., Taiz L., Purification and immunological identification of metallothioneins 1 and 2 from *Arabidopsis thaliana*, *Plant Physiol.* 113, 1293-1301, 1997.
203. Olko A., Fizjologiczne aspekty tolerancji roślin na metale ciężkie, *Kosmos- Postępy Nauk Biologicznych*, 58, 221-228, 2009.
204. Yuan J., Chen D., Ren Y., Zhang X., Zhao J., Characteristic and expression analysis of a metallothionein gene, *OsMT2b*, down-regulated by cytokinin suggests functions in root development and seed embryo germination of rice, *Plant Physiol.* 146, 1637-1650, 2008.
205. Nielson K., Atkin C., Winge D., Distinct metal-binding configurations in metallothionein. *J. Biol. Chem.*, 260, 5342-50, 1985.
206. Pavlikova D., Macek T., Mackova M., Szakova J., Balik J., Cadmium tolerance and accumulation in transgenic tobacco plants with a yeast metallothionein combined with a polyhistidine tail, *Int Biodeter Biodegr.* 54, 233-237, 2004.
207. Turchia A, Tamantini I, Camussia A, Racchia M., Expression of a metallothionein A1 gene of *Pisum sativum* in white poplar enhances tolerance and accumulation of zinc and copper, *Plant Sci.* 183, 50-56, 2012.
208. McRorie R., Sutherland G., Lewis G., Barton M., Glazener M., Shive W., Isolation and identification of a naturally occurring analog of methionine, *J Am Chem Soc.* 76, 115-118, 1954.
209. Bourgis F., Roje S., Nuccio M., Fisher D., Tarczynski M., Li C., Herschbach C., Rennenberg H., Pimenta M, Shen TL, Gage D., Hanson A., S-Methylmethionine plays a major role in phloem sulfur transport and is synthesized by a novel type of methyltransferase, *Plant Cell*, 11, 1485-1497, 1999.
210. Kim W., Yang Y., Min H., Song M., Lee J., Park K., Kim J., Sung J., Choi J., Cha H., Accelerated wound healing by S-methylmethionine sulfonium: evidence of dermal fibroblast activation via the ERK1/2 pathway. *Pharmacology* 85, 68-76, 2010.
211. Augspurger N., Scherer C., Garrow T., Baker D., Dietary S-Methylmethionine, a component of foods, has choline-sparing activity in chickens, *J. Nutr.* 135, 1712-1717, 2005.
212. Kocsis M., Ranocha P., Gage D., Simon E., Rhodes D., Peel G., Mellema S., Saito K., Awazuhara M., Li C., Meeley R., Tarczynski M., Wagner C., Hanson A., Insertional inactivation of the methionine S-methyltransferase gene eliminates the S-methylmethionine cycle and increases the methylation ratio, *Plant Physiol*, 131, 1808-1815, 2003.
213. Ko S., Eliot A., Kirsch I., S-methylmethionine is both a substrate and an inactivator of 1-aminocyclopropane- 1-carboxylate synthase, *Arch Biochem Biophys.* 421, 85-90, 2004.

214. Feng L., Kirsch J., L-Vinylglycine is an alternative substrate as well as a mechanism-based inhibitor of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, *Biochem.* 39, 2436–2444, 2000.
215. Racz I., Paldi E., Szalai G., Janda T., Pal M., Lasztity D., S-methylmethionine reduces cell membrane damage in higher plants exposed to low-temperature stress, *J. Plant Physiol.* 165, 1483-1490, 2008.
216. Kubiś J., The effect of exogenous spermidine on superoxide dismutase activity, H₂O₂ and superoxide radical level in barley leaves under water deficit conditions, *Acta Physiol. Plant.* 27, 289–295, 2005.
217. Kubiś J., Poliaminy i ich udział w reakcjach roślin an warunki stresowe środowiska, *Kosmos*, 55, 209-215, 2006.
218. Kocsis M., Nolte K., Rhodes D., Shen T., Gage D., Hanson A., Dimethylsulfoniopropionate biosynthesis in *Spartina alterniflora*. Evidence that S-methylmethionine and dimethylsulfoniopropylamine are intermediates, *Plant Physiol.* 117, 273–281, 1998.
219. Watanabe T., Ohara S., Ichikawa T., Saigenji K., Hotta K., Mechanism for cytoprotection by vitamin U form ethanol-induced gastric mucosal damage in rats, *Dig Dis Sci.* 41, 49-54, 1996.
220. Cheney G., Waxler S., Miller I., Vitamin U therapy of peptic ulcer-Experience at San Quentin Prison, *Calif Med.* 84, 39–42, 1956.
221. Lee N., Park K., Min H., Song K., Lim Y., Park J., Kim B., Kim M., Inhibitory effect of vitamin U (S-methylmethionine sulfonium chloride) on differentiation in 3T3-L1 pre-adipocyte cell lines, *Ann. Dermatol.* 24, 39–44, 2012.
222. Sarnowska E., Balcerak A., Olszyna-Serementa M., Kotlarek D., Sarnowski T., Siedlecki J., Kinaza białkowa aktywowana przez AMP (AMPK) jako cel terapeutyczny, *Postepy Hig Med Dosw.* 67, 750-760, 2013.
223. Fernandes A., Wallenberg M., Gandin V., Misra S., Tisato F., Marzano C., Rigobello M., Kumar S., Bjornstedt M., Methylselenol formed by spontaneous methylation of selenide is a superior selenium substrate to the thioredoxin and glutaredoxin systems, *Plosone*, 7, 1-12, 2012.
224. Suzuki K., Tsuji Y., Ohta Y., Suzuki N., Preferential organ distribution of methylselenol source Se-methylselenocysteine relative to methylseleninic acid, *Toxicol. Appl. Pharm.* 227, 76–83, 2008.
225. Ip C., Dong Y., Ganther H., New concepts in selenium chemoprevention, *Cancer Metast. Rev.* 21, 281–289, 2002.
226. Kremer D., Ilgen G., Feldmann J., GC-ICP-MS determination of dimethylselenide in human breath after ingestion of (77)Se-enriched selenite: monitoring of in-vivo methylation of selenium, *Anal. Bioanal. Chem.* 383, 509–515, 2005.
227. Ohta Y, Suzuki K., Methylation and demethylation of intermediates selenide and methylselenol in the metabolism of selenium, *Toxicol. Appl. Pharm.* 226, 169–177, 2008.
228. Zeng H, Wu M, Botnen J., Methylselenol, a selenium metabolite, induces cell cycle arrest in G1 phase and apoptosis via the extracellular-regulated kinase 1/2 pathway and other cancer signaling genes, *J Nutr* 139, 1613–1618, 2009.

229. Kim A., Oh J., Park J., Chung A., Methylselenol generated from selenomethionine by methioninase downregulates integrin expression and induces caspase-mediated apoptosis of B16F10 melanoma cells, *J Cell Physiol* 212, 386–400, 2007.
230. Kim A., Jung J., Son M., Lee S., Lim J., Long exposure of non- cytotoxic concentrations of methylselenol suppresses the invasive potential of B16F10 melanoma, *Oncol Rep* 20, 557–565, 2008.
231. Pinto J., Lee J., Sinha R., Macewan M., Cooper A., Chemopreventive mechanisms of alpha-keto acid metabolites of naturally occurring organoselenium compounds, *Amino Acids* 41, 29–41, 2011.
232. Thangam R., Suresh V., Rajkumar M., Vincent J., Gunasekaran P., Anbazhagan C., Kaveri K., Kannan S., Antioxidant and *in vitro* anticancer effects of 2-pyrrolidinone rich fraction of *Brassica oleracea* var. *capitata* through induction of apoptosis in human cancer cells, *Phytother. Res.* 27, 164-1670, 2013.
233. Kusznierevicz B., Iori R., Piekarska A., Namieśnik J., Bartoszek A., Convenient identification of desulfoglucosinolates on the basis of mass spectra obtained during liquid chromatography–diode array–electrospray ionization mass spectrometry analysis: method verifications for sprouts of different *Brassicaceae* species extracts, *J. Chromatogr A.* 1278, 108–115, 2013.
234. Zhang Y., Wade K., Prester T., Talalay P., Quantitative determination of isothiocyanates, dithiocarbamates, carbon disulfide, and related thiocarbonyl compounds by cyclocondensation with 1,2-benzenedithiol, *Anal Biochem.* 239, 160-167, 1996
235. Śmiechowska A., Bartoszek A., Namieśnik J., Determination of glucosinolates and their decomposition products: indoles and isothiocyanates in cruciferous vegetables, *Crit Rev Anal Chem.* 40, 202-216, 2010
236. Hanschen F., Platz S., Mewis I., Schreiner M., Rohn S., Kroh L., Thermally induced degradation of sulfur-containing aliphatic glucosinolates in broccoli sprouts (*Brassica oleracea* var. *italica*) and model systems, *J. Agric. Food Chem.* 60, 2231-41, 2012.
237. Kalichevsky M., Knorr D., Lillford P., Potential food applications of high-pressure effects on ice-water transitions, *Trends Food Sci. Tech.* 6, 253–258, 1995.
238. Patent US-5686108 (Pustaeri D., Chlang W., Letiz R., Sperrazzo P.)
239. Durham P., Poulton J., Enzymatic properties of purified myrosinase from *Lepidium sativum* seedlings, *Z. Naturforsch. C, J. Biosci.* 45, 173-178, 1990.
240. Björkman R., Lönnerdal B., Studies on myrosinase 3: Enzymatic properties of myrosinases from *Sinapsis alba* and *Brassica napus* seeds, *Biochim. Biophys. Acta* 327, 121-131, 1973.
241. Li X., Kushad M., Purification and characterization of myrosinase from horseradish (*Armoracia rusticana*) roots, *Plant Physiol. Biochem.* 43, 503–511, 2005.
242. Loebers A., Müller-Uri F., Kreis W., A young root-specific gene (ArMY2) from horseradish encoding a MYR II myrosinase with kinetic preference for the root-specific glucosinolate gluconasturtiin, *Phytochem.* 99, 26–35, 2014.
243. Mathys W., The role of malate, oxalate, and mustard oil glucosides in the evolution of zinc resistance in herbage plants, *Physiol Plantarum* 40, 130–136, 1977.
244. Chen Y., Lin Q., Luo Y., He Y., Zhen S., Yu Y., Tian G., Wong M., The role of citric acid on the phytoremediation of heavy metal contaminated soil, *Chemosphere* 50, 807-811, 2003.

245. Luo C., Shen Z., Luo L., Li X., EDDS and EDTA enhanced phytoextraction of metals from artificially contaminated soil and residual effects of chelant compounds, *Environ. Pollut.* 144, 862–871, 2006.
246. Mohtadi A., Majid Ghaderian S., Schat H., The effect of EDDS and citrate on the uptake of lead in hydroponically grown *Matthiola flavida*, *Chemosphere*, 93, 986–989, 2013.
247. Tandy S., Schulin R., Nowack B., The influence of EDDS on the uptake of heavy metals in hydroponically grown sunflowers, *Chemosphere* 62, 1454–1463, 2006.
248. Turgut, C., Pepe, M., Cutright, T., The effect of EDTA and citric acid on phytoremediation of Cd, Cr, and Ni from soil using *Helianthus annuus*, *Environ Pollut.* 131, 147–154, 2004.
249. Kuzniewicz B., Bączek-Kwinta R., Bartoszek A., Piekarska A., Huk A., Manikowska A., Antonkiewicz J., Namieśnik J., Konieczka P., The dose dependent influence on zinc and cadmium contamination of soil on their uptake and glucosinolate content in white cabbage (*Brassica oleracea* var. capitata f. alba), *Environ Toxicol Chem.* 31, 2482–2489, 2012.
250. Tolrà R., Poschenrieder C., Alonso R., Barceló D., Barceló J., Influence of zinc hyperaccumulation on glucosinolates in *Thlaspi caerulescens*, *New Phytol.* 151, 621–626, 2001.
251. Coolong T., Randle W., Toler H., Sams C., Zinc availability in hydroponic culture influences glucosinolate concentrations in *Brassica rapa*, *Hortsci.* 39, 84–86, 2004.
252. World Health Organization, Ecological aspects of sulfur metabolism. In Rennenberg H, Brunold C, De Kok LJ, Stulen I, eds, Sulfur Nutrition and Sulphur Assimilation in Higher Plants. SPB Academic, The Hague, The Netherlands, 131–144, 1990.
253. Davis M., Boyd R., Dynamics of Ni-based defence and organic defences in the Ni hyperaccumulator, *Streptanthus polygaloides* (*Brassicaceae*), *New Phytol.* 146, 211–217, 2000.
254. Newman R., Hanscom Z., Kerfoot W., The watercress glucosinolate-myrosinase system: A feeding deterrent to caddisflies, snails and amphipods. *Oecologia*, 92, 1–7, 1992.
255. Noret N., Meerts P., Vanhaelen M., Dos Santos A., Escarre J., Do metal-rich plants deter herbivores? A field study of the defence hypothesis, *Oecologia* 152, 1432–1439, 2007.
256. Hsu F., Wirtz M., Heppel S., Bogs J., Kramer U., Khan M., Bub A., Hell R., Rausch T., Generation of Se-fortified broccoli as functional food: impact of Se fertilization on S metabolism, *Plant Cell Environ.* 34, 192–207, 2011.
257. Ávila F., Faquin V., Yang Y., Ramos S., Guilherme L., Thannhauser T., Li L., Assessment of the anticancer compounds Se-methylselenocysteine and glucosinolates in Se-biofortified broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) sprouts and florets, *J. Agric. Food Chem.* 61, 6216–6223, 2013.
258. Charron C., Kopsell D., Randle W., Sams C, Sodium selenate fertilisation increases selenium accumulation and decreases glucosinolate concentration in rapid-cycling *Brassica oleracea*, *J. Sci. Food Agric.* 81, 962–966, 2001.
259. Finley J., Sigrid-Keck A., Robbins R., Hintze K., Selenium enrichment of broccoli: interactions between selenium and secondary plant compounds, *J. Nutr.* 135, 1236–1238, 2005.
260. Brown P., Tokuhisa J., Reichelt M., Gershenzon J., Variation of glucosinolate accumulation among different organs and developmental stages of *Arabidopsis thaliana*, *Phytochem.* 62, 471–481, 2003.

261. Sang J., Minchinton I., Johnstone P., Truscott R., Glucosinolate profiles in the seed, root and leaf tissue of cabbage, mustard, rapeseed radish and swede, *Can. J. Plant Sci.* 64, 77–93, 1984.
262. Pérez-Balibrea S., Moreno D., García-Viguera C., Genotypic effects on the phytochemical quality of seeds and sprouts from commercial broccoli cultivars, *Food Chem.* 125, 348-354, 2011.
263. Bennett R., Rosa E., Mellon F., Kroon, P., Ontogenic profiling of glucosinolates, flavonoids, and other secondary metabolites in *Eruca sativa* (salad rocket), *Diplotaxis erucooides* (wall rocket), *Diplotaxis tenuifolia* (wild rocket), and *Bunias orientalis* (Turkish rocket), *J. Agric. Food Chem.* 54, 4005-4015, 2006.
264. Rangkadilok N., Nicolas M., Bennett R., Premier R., Eagling D., Taylor P., Developmental changes of sinigrin and glucoraphanin in three Brassica species (*Brassica nigra*, *Brassica juncea* and *Brassica oleracea* var. *italica*), *Sci. Hortic.* 96, 11–26, 2002.
265. Martinez-Villaluenga C., Peñas E., Ciska E., Piskula M., Kozłowska H., Vidal- Valverde C., Frias J., Time dependence of bioactive compounds and antioxidant capacity during germination of different cultivars of broccoli and radish seeds, *Food Chem.* 120, 710-716, 2010.
266. Morra M., Kirkegaard J., Isothiocyanate release from soil-incorporated *Brassica* tissues, *Soil Biol. Biochem.* 34, 1683-1690, 2002.
267. Van Eylen D., Oey I., Hendrickx M., Van Loey A., Effects of pressure/temperature treatments on stability and activity of endogenous broccoli (*Brassica oleracea* L. cv. *Italica*) myrosinase and on cell permeability, *J. Food Eng.* 89, 178–186, 2008.
268. Ludikhuyze L., Ooms V., Weemaes C., Hendrickx M., Kinetic study of the irreversible thermal and pressure inactivation of myrosinase from broccoli (*Brassica oleracea* L cv. *italica*), *J. Agric. Food Chem.* 47, 1794–1800, 1999.
269. Ghawi S., Methven L., Rastall R., Niranjana K., Thermal and high hydrostatic pressure inactivation of myrosinase from green cabbage: A kinetic study, *Food Chem.* 131, 1240–1247, 2012.
270. Van Eylen D., Indrawati M., Hendrickx M., Van Loey A., Temperature and pressure stability of mustard seed (*Sinapsis alba* L.) myrosinase, *Food Chem.* 97, 263-271, 2006.
271. Kozłowska H., Nowak H., Nowak J., Characterisation of myrosinase in polish varieties of rapeseed, *J. Sci. Food Agric.* 34, 1171-1180, 1983.
272. Springett M., Adams J., Properties of brussels sprouts thioglucosidase, *Food Chem.* 33, 173-186, 1989.

IX. DOROBEK NAUKOWY

Publikacje z Listy Filadelfijskiej

1. **A. Piekarska**, D. Kołodziejski, T. Pilipczuk, M. Bodnar, P. Konieczka, B. Kuszniereicz, F. Hanschen, M. Schreiner, J. Cyprys, M. Groszewska, J. Namieśnik, A. Bartoszek, The influence of selenium addition during germination of Brassica seeds on health-promoting potential of sprouts, *Int J Food Sci Nutr*, 2013, doi. 10.3109/09637486.2014.917148
2. **A. Piekarska**, B. Kuszniereicz, D. Kołodziejski, T. Pilipczuk, M. Szczygłowska, M. Bodnar, R. Bączek-Kwinta, P. Konieczka, J. Namieśnik, A. Bartoszek, The innovative exploitation of Brassica vegetables in the health quality food production chain, *Acta Hort.* 1005, 71-85, 2013.
3. **A. Piekarska**, B. Kuszniereicz, M. Meller, K. Dziedziul, J. Namieśnik, A. Bartoszek, Myrosinase activity in different plant samples; optimisation of measurement conditions for spectrophotometric and pH-stat methods, *Ind Crop Prod.* 50, 58–67, 2013.
4. B. Kuszniereicz, R. Iori, **A. Piekarska**, J. Namieśnik, A. Bartoszek, Convenient identification of desulfoglucosinolates on the basis of mass spectra obtained during liquid chromatography-diode array-electrospray ionization mass spectrometry analysis: Method verifications for sprouts of different Brassicaceae species extracts, *J Chromatogr A.* 1278, 108–115, 2013.
5. B. Kuszniereicz, **A. Piekarska**, B. Mrugalska, P. Konieczka, J. Namieśnik, A. Bartoszek. Phenolic composition and antioxidant properties of polish blue-berried honeysuckle genotypes by HPLC-DAD-MS, HPLC post-column derivatization with ABTS or FC, and TLC with DPPH visualization, *J Agric Food Chem.* 60, 1755–1763, 2012.
6. B. Kuszniereicz, R. Bączek-Kwinta, A. Bartoszek, **A. Piekarska**, A. Huk, A. Manikowska, J. Antonkiewicz, J. Namieśnik, P. Konieczka, The dose dependent influence on zinc and cadmium contamination of soil on their uptake and glucosinolate content in white cabbage (*Brassica oleracea* var. capitata f. alba), *Environ Toxicol Chem.* 31, 2482-2489, 2012.
7. M. Szczygłowska, **A. Piekarska**, P. Konieczka, J. Namieśnik, Use of *Brassica* plants in the phytoremediation and biofumigation processes, *Int J Mol Sci.* 12, 7760-7771, 2011.

8. A. Piasek, B. Kuszniereicz, I. Grzybowska, E. Malinowska-Pańczyk, **A. Piekarska**, A. Azqueta, A.R. Collins, J. Namieśnik, A. Bartoszek, The influence of sterilization with EnbioJet® Microwave Flow Pasteurizer on composition and bioactivity of aronia and blueberry honeysuckle, *J Food Compos Anal.* 24, 880-888, 2011.
9. **A. Piekarska**, A. Bartoszek, J. Namieśnik, 2010, Biofumigacja jako alternatywna metoda ochrony roślin, *Ecol Chem Eng S.* 17, 527-547, 2010.

Publikacje spoza Listy Filadelfijskiej

1. **A. Piekarska**, A. Bartoszek, J. Namieśnik, Biofumigacja jako alternatywna, przyjazna środowisku technologia ochrony roślin, *Ekonatura* 6, 11-13, 2010.
2. M. Szczygłowska, **A. Piekarska**, P. Konieczka, J. Namieśnik, Fitoremediacja - technologia z przyszłością oczyszczania gleb z metali ciężkich, *Analytica* 4, 48-51, 2011.
3. **A. Piekarska**, M. Szczygłowska, B. Kuszniereicz, R. Bączek-Kwinta, White cabbage in the biofumigation process- expectations and perspectives, Monografia konferencyjna 14th International Symposium of Students and Young Mechanical Engineers "Advances in Chemical and Mechanical Engineering", tom 2, 171-174, 2011
4. M. Szczygłowska, **A. Piekarska**, P. Konieczka, J. Namieśnik, R. Bączek-Kwinta, The use of Kamienna głowa cabbage species for phytoextraction of zinc and cadmium from the soil, Monografia konferencyjna 14th International Symposium of Students and Young Mechanical Engineers "Advances in Chemical and Mechanical Engineering", tom 2, 268-271, 2011
5. **A. Piekarska**, M. Sztąberska, B. Kuszniereicz, J. Namieśnik, A. Bartoszek, Porównanie sinigryny i glukotrapeoliny jako substratów podczas oznaczania aktywności enzymatycznej mirozynazy, Monografia konferencyjna „Biotechnology: from basic research to practical applications” 61-64, 2011
6. J. Cyprys, M. Groszewska, J. Wittbrodt, D. Kołodziejski, **A. Piekarska**, The influence of selenium addition during seeds' germination on the biological properties of obtained sprouts, Monografia konferencyjna 15th International Symposium of Students and Young Mechanical Engineers "Advances in Chemical and Mechanical Engineering", tom 1, 77-84, 2012

Wystąpienia konferencyjne

1. **A. Piekarska**, M. Szczygłowska, T. Pilipczuk, A. Kowalska, B. Kusznierevicz, R. Bączek-Kwinta, J. Namieśnik, P. Konieczka, A. Bartoszek, Wpływ metali ciężkich na aktywność enzymatyczną mirozynyzy w kapuście białej pochodzącej z upraw kontrolowanych, Materiały konferencji „Fitoremediacja: skuteczny zabieg sozotechniczny”, Gdańsk, 5-7.06.2013, str. 31
2. **A. Piekarska**, D. Kołodziejcki, T. Pilipczuk, M. Bodnar, P. Konieczka, B. Kusznierevicz, A. Bartoszek, Zdolność roślin z rodziny kapustowatych (*Brassicaceae*) do akumulacji selenu. Badania modelowe z użyciem nasion kiełkowanych na pożywkach z selenem. Materiały konferencji „Fitoremediacja: skuteczny zabieg sozotechniczny”, Gdańsk, 5-7.06.2013, str. 32
3. Z. Poleska-Muchlado, **A. Piekarska**, M. Szczygłowska, T. Pilipczuk, A. Kowalska, I. Hincă, R. Tylingo, B. Kusznierevicz, R. Bączek-Kwinta, K. Dziedziul, J. Namieśnik, P. Konieczka, A. Bartoszek, Aktywność cytotoksyczna wyrażona jako Skumulowany Indeks Przeżywalności- wykorzystanie do przewidywania potencjału fitoremediacyjnego i biofumigacyjnego roślin kapustowatych, Materiały konferencji „Fitoremediacja: skuteczny zabieg sozotechniczny”, Gdańsk, 5-7.06.2013, str. 34
4. B. Kusznierevicz, A. Kowalska, M. Szczygłowska, T. Pilipczuk, **A. Piekarska**, K. Dziedziul, P. Konieczka, J. Namieśnik, A. Bartoszek, Wpływ zanieczyszczenia gleby metalami ciężkimi na zawartość substancji bioaktywnych w uprawach kapusty białej, Materiały konferencji „Fitoremediacja: skuteczny zabieg sozotechniczny”, Gdańsk, 5-7.06.2013, str. 27
5. B. Kusznierevicz, A. Kowalska, **A. Piekarska**, T. Pilipczuk, Z. Poleska-Muchlado, A. Bartoszek, Wpływ wybranych środków ochrony roślin na zawartość substancji bioaktywnych w uprawach kapusty białej, Materiały konferencji „Fitoremediacja: skuteczny zabieg sozotechniczny”, Gdańsk, 5-7.06.2013, str. 26
6. **A. Piekarska**, D. Kołodziejcki, T. Pilipczuk, B. Kusznierevicz, J. Namieśnik, A. Bartoszek, Brassica sprouts as a functional food enriched in organic forms of selenium, Materiały konferencji Eurofoodchem XVII, Istambuł, 7-10.05.2013, str. 552

7. D. Kołodziejcki, **A. Piekarska**, T. Pilipczuk, R. Meyer, M. Emanuel, B. Kusznierevicz, J. Namieśnik, A. Bartoszek, Brassica sprouts as a functional food enriched in organic forms of selenium: influence on activity of cytoprotective enzymes, Materiały konferencji Eurofoodchem XVII, Istambuł, 7-10.05.2013, str. 553
8. Z. Poleska-Muchlado, **A. Piekarska**, B. Kusznierevicz, T. Pilipczuk, M. Szczygłowska, E. Malinowska-Pańczyk, P. Konieczka, J. Namieśnik, A. Bartoszek, The comparison of biological potential of white cabbage varieties using the accumulated survival index (ASI) concept, Materiały konferencji Eurofoodchem XVII, Istambuł, 7-10.05.2013, str. 595
9. B. Kusznierevicz, A. Graff, M. Szczygłowska, T. Pilipczuk, **A. Piekarska**, K. Dziedziul, P. Konieczka, J. Namieśnik, A. Bartoszek, The impact of soil contamination by heavy metals on bioactive compounds in white cabbage, Materiały konferencji Eurofoodchem XVII, Istambuł, 7-10.05.2013, str. 307
10. **A. Piekarska**, J. Namieśnik, A. Bartoszek, Optimization of methods of myrosinase activity determination, Materiały konferencji 6th International Symposium on Brassica and 18th Crucifer Genetics Workshop, Catania, 12-16.11.2012
11. **A. Piekarska**, D. Kołodziejcki, T. Pilipczuk, B. Kusznierevicz, J. Namieśnik, A. Bartoszek, The influence of selenium addition during germination of *Brassica* seeds on the content of bioactive compounds in sprouts, Materiały konferencji Polish- German Biochemical Societies Joint Meeting, Acta Biochimica Polonica 59(3), Poznań, 11-14.09.2012, str. 205
12. Z. Poleska-Muchlado, B. Kusznierevicz, M. Jarmolińska, R. Bączek-Kwinta, **A. Piekarska**, T. Pilipczuk, D. Kołodziejcki, A. Bartoszek, The cultivation of cabbage (*Brassica oleracea var. capitata*) on heavy metal polluted soils increases glucosinolate biosynthesis and biological potential, Materiały konferencji European Environmental Mutagen Society, Warszawa, 16-20.09.2012, str. 125
13. B. Kusznierevicz, **A. Piekarska**, P. Konieczka, J. Namieśnik, A. Bartoszek, Identification of desulfo-glucosinolates on the basis of MS spectra obtained during HPLC-DAD-MS analysis of different *Brassicaceae* species extracts, Materiały konferencji 29th Symposium on Chromatography, Toruń, 9-13.09.2012, str. 558
14. **A. Piekarska**, B. Kusznierevicz, Z. Poleska-Muchlado, A. Milewczyk, N. Kujawska, J. Namieśnik, A. Bartoszek, Partial characterisation of different cultivars of white cabbage

by total antioxidant activity and glucosinolate content, *Materiały V Międzynarodowej Konferencji „Quality and safety in food production chain“*, Wrocław, 19-20.09.2011, str. 132

15. B. Kusznierevicz, **A. Piekarska**, M. Buszewska, J. Namieśnik, A. Bartoszek, The influence of different methods of preservation on the content of bioactive compounds in aronia and blueberry honeysuckle juice, *Materiały V Międzynarodowej Konferencji „Quality and safety in food production chain“*, Wrocław, 19-20.09.2011, str. 93

16. T. Pilipczuk, B. Kusznierevicz, **A. Piekarska**, J. Namieśnik, A. Bartoszek, Influence of cultivation conditions in the content of isothiocyanates in white cabbage, *Materiały V Międzynarodowej Konferencji „Quality and safety in food production chain“*, Wrocław, 19-20.09.2011, str. 137

17. **A. Piekarska**, T. Pilipczuk, B. Kusznierevicz, A. Bartoszek, J. Namieśnik, The influence of cultivation conditions on the myrosinase activity and glucosinolate content in white cabbage, *Materiały konferencji The 2nd Polish Congress of Biochemistry and Cell Biology, 11th Conference of the Polish Cell Biology Society*, Kraków, 5-9.09.2011, str. 262

18. **A. Piekarska**, B. Kusznierevicz, Z. Poleska-Muchlado, A. Milewczyk, N. Kujawska, J. Namieśnik, A. Bartoszek- Influence of cultivation conditions of white cabbage on the content of bioactive compounds, *Materiały konferencji EuroFoodChem XVI- Polish Journal of Food and Nutrition Sciences 2011*, vol. 61 (1), Gdańsk, 6-8.07.2011, str 32

19. B. Kusznierevicz, **A. Piekarska**, M. Paszowska, O. Matusik, Z. Poleska-Muchlado, A. Bartoszek- The influence of sterilization with EnbioJet microwave flow pasteurizer on composition and bioactivity of blueberry honeysuckle juice, *Materiały międzynarodowej konferencji EuroFoodChem XVI- Polish Journal of Food and Nutrition Sciences 2011*, vol. 61(1), Gdańsk, 6-8.07.2011, str 84

20. A. Bartoszek, A. Śmiechowska, W. Przychodzeń, **A. Piekarska**, J. Namieśnik- Chemical detoxification of carcinogenic heterocyclic aromatic amines by isothiocyanates, *Materiały międzynarodowej konferencji EuroFoodChem XVI- Polish Journal of Food and Nutrition Sciences 2011*, vol. 61(1) , Gdańsk, 6-8.07.2011, str.73

21. **A. Piekarska**, M. Szczygłowska, B. Kusznierevicz, R. Bączek-Kwinta, White cabbage in the biofumigation process- expectations and perspectives, *Materiały 14th International Symposium of Students and Young Mechanical Engineers "Advances in chemical and mechanical engineering"*, Gdańsk, 5-7.05.2011, str. 171-174 (komunikat)

22. M. Szczygłowska, **A. Piekarska**, P. Konieczka, J. Namieśnik, R. Bączek-Kwinta, The use of Kamienna głowa cabbage species for phytoextraction of zinc and cadmium from the soil, Materiały 14th International Symposium of Students and Young Mechanical Engineers "Advances in chemical and mechanical engineering", Gdańsk, 5-7.05.2011, str. 268-271 (komunikat)
23. **A. Piekarska**, M. Sztąberska, B. Kusznierevicz, J. Namieśnik, A. Bartoszek, Porównanie sinigryny i glukotrapeoliny jako substratów podczas oznaczania aktywności enzymatycznej mirozynyzy, Materiały międzynarodowej konferencji „Biotechnology: from basic research to practical applications” Rzeszów, 31.03.2011, str. 61-64
24. **A. Piekarska**, A. Bartoszek, J. Namieśnik, Biofumigacja jako alternatywna metoda ochrony roślin, Materiały VI Międzynarodowej Konferencji Naukowej ”Toksyczne substancje w środowisku”, Kraków, 7-8.09.2010, str. 50 (komunikat)
25. **A. Piekarska**, B. Kusznierevicz, A. Bartoszek, J. Namieśnik, Próby izolacji i identyfikacji związków powstających podczas obróbki kulinarnej kapusty, Materiały VIII Polskiej Konferencji Chemii Analitycznej “Analityka dla społeczeństwa XXI wieku”, Kraków, 4-9.07.2010, str. 539
26. A. Piasek, J. Namieśnik, **A. Piekarska**, I. Grzybowska, B. Kusznierevicz, E. Malinowska- Pańczyk, A. Bartoszek, M. Krajczyński, M. Konczakowski, S. Kwiatkowski, P. Bojanowski, Ocena skuteczności procesu przetwarzania soków z aronii oraz suchodrzewu jadalnego za pomocą mikrofalowego sterylizatora przepływowego EnbioJet pod kątem zachowania związków bioaktywnych oraz eliminacji mikroorganizmów, Materiały Seminarium Politechniki Gdańskiej - uniwersytet przedsiębiorczy XXI wieku, Gdańsk, 24-25.05.2010
27. **A. Piekarska**, B. Kusznierevicz, Próby izolacji i identyfikacji związków powstających podczas obróbki kulinarnej kapusty, Materiały XV Sesji Naukowej Sekcji Młodej Kadry Naukowej Polskiego Towarzystwa Technologów Żywności “Jakość i prozdrowotne cechy żywności” Wrocław, 20-21.05.2010, str. 145

Nagrody i wyróżnienia

1. Stypendium w ramach projektu „Innodoktorant - stypendia dla doktorantów, V edycja” przyznane przez Urząd Marszałkowski Województwa Pomorskiego

2. Stypendium w ramach projektu „Rozwój interdyscyplinarnych studiów doktoranckich na Politechnice Gdańskiej w zakresie nowoczesnych technologii” współfinansowanego przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego
3. Stypendia Rektora Politechniki Gdańskiej za osiągnięcia naukowe
4. Stypendium z dotacji podmiotowej na dofinansowanie zadań projakościowych
5. Stypendium w ramach programu „Mistrz” finansowane przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej

Projekty badawcze finansowane ze środków na naukę

1. Udział w projekcie „Wykorzystanie kapusty białej na potrzeby fitoremediacji i biofumigacji (AGROBIOKAP)”. Projekt realizowany w ramach Działania 1.3 Poddziałania 1.3.1, współfinansowany ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka 2007-2013
2. Projekt badawczy „Wpływ selenu dodanego podczas kiełkowania nasion wybranych roślin kapustowatych (*Brassicaceae*) na zawartość bioaktywnych związków w kiełkach” finansowany przez Narodowe Centrum Nauki