

Titel des Vorhabens: Optimization of Glucosinolate Degradation Pathways for Increased Quality and Health Benefit of *Brassica* Products

Projektnummer/Aktenzeichen: J16/2017

Executive Summary

Im Rahmen der Leibniz-Junior Research Group "Optimization of Glucosinolate Degradation Pathways for Increased Quality and Health Benefit of *Brassica* Products" wurde untersucht, wie sich das Abbauverhalten von Glucosinolaten (GLS) durch Anbaubedingungen aber auch durch die Zubereitung von *Brassica*-Gemüsen wie Rotkohl im Hinblick auf die Isothiocyanatbildung verbessern lässt. GLS sind Sekundäre Pflanzenstoffe, die bei Gewebsverletzung Enzym-katalysiert abgebaut werden. Dabei entstehen in *Brassica*-Gemüsen häufig Nitrile und Epithionitrile anstelle der krebopräventiven Isothiocyanate (ITC). Die Optimierung des enzymatischen Abbaus zu ITC war daher ein Hauptziel des Projektes. Es konnte gezeigt werden, dass der Anbau von Kohl im Sommer zu einer verbesserten ITC Bildung führt als im Herbst, da mit fallender Temperatur und Licht das ESP-Protein induzieren und dadurch weniger ITC gebildet werden. Auch die Kühl-Lagerung kann sich positiv auswirken. Ein neuentdeckter Abbaumechanismus von ITC zu Amininen kann die Menge an ITC ebenfalls beeinflussen. Durch Wahl geeigneter Zubereitungsbedingungen wie das Ansäuern von Salat kann die ITC-Bildung im Gemüse jedoch deutlich erhöht werden. Beim Kochen werden GLS aber auch ITC chemisch abgebaut und es konnten neuartige Folgeprodukte aus dem Abbau von ITC identifiziert werden. Die Interaktion von Pflanzenstoffen auf die Stabilität und den thermischen Abbau von GLS konnte untersucht und das Wissen der Chemie dieser Verbindungen im Gemüse erweitert werden. Die Ergebnisse des Projektes konnte damit maßgeblich das Wissen der enzymatischen Hydrolyse und der chemischen Abbaureaktionen in *Brassica* erweitern. Die Erkenntnisse können dazu beitragen, den gesundheitlichen Nutzen des *Brassica*-Gemüse Konsums zu erhöhen.

1. Zielerreichung und Umsetzung der Meilensteine

Das Workpackage (WP1), hatte das **Ziel durch Vor- und Nacherntefaktoren die Bildung von ITC in *Brassica* Gemüsen zu optimieren**. So war es das Ziel Vorerntefaktoren zu identifizieren, die die ESP-Aktivität reduzieren, um so die Bildung von ITC zu erhöhen (M1). Doktorandin 1, die das WP bearbeitete, führte zunächst mit den schnellwachsenden Blattgemüsen Pak choi (*Brassica rapa*) und Roter Blattsenf (*Brassica juncea*) Experimente durch und stellte fest, dass innerhalb einer Pflanze jüngere Blätter um ein Vielfaches höhere GLS Gehalte haben, daher mehr Abbauprodukte bilden. Zudem kann sich die Pflanze durch gezielten GLS-Transport vor Fraßfeinden schützen (Púčíková et al. 2023, doi: 10.1021/acs.jafc.3c01997). Da Versuche mit Pak Choi zum Einfluss der Wasserversorgung sowie der Kultivierungstemperatur keine aussagekräftigen Ergebnisse erzielten, aber es Hinweise gab, dass Sommerkohl mehr ITC bildet (Wermter et al. 2020, doi: 10.3390/foods9111682) wurde der Einfluss der Wachstumsbedingungen bzw. des Erntezeitpunktes auf die Bildung von GLS-Abbauprodukten an Kopfkohl (*B. oleracea* var. *capitata*) in drei aufeinanderfolgenden Jahren im Feld untersucht. Es zeigte sich, dass Rotkohl, der im Sommer geerntet wird, mehr ITC bildet als Kohl, der im Herbst geerntet wird (Púčíková et al., doi: 10.1002/lemi.202255012). Eine Erhöhung der ESP-Expression im Herbst konnte für die Reduzierung der ITC- und den Anstieg der Nitrilbildung verantwortlich gemacht werden. Versuche unter kontrollierten Bedingungen mit Rotkohl zeigten schließlich, dass höhere Tagestemperaturen (25°C) bzw. die Kombination von viel Licht (16 Stunden Tageslänge mit bis zu 750 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ steigender Lichtintensität) und hoher Temperatur zu einer geringen ESP-Menge und daher zu erhöhter ITC-Bildung führt. Die Ergebnisse werden derzeit zur Publikation vorbereitet.

Somit wurde der **M1 vollständig erreicht**. Bezüglich des **M2, der Optimierung der ITC-Bildung durch Vor- und Nacherntefaktoren**, kann durch Anbau von Sommerkohl die ITC-Bildung optimiert werden. Zudem konnte in einem 8-monatigem Lagerversuch gezeigt werden, dass eine lange Lagerdauer (handelsübliches Kühllager) von Herbstkohl ebenfalls zu einer Erhöhung der ITC-Bildung bei Rotkohl führt (Andernach et al. 2024, doi: 10.1016/j.foodchem.2023.136969). **M2** wurde somit ebenfalls **erreicht**.

Das **WP2**, welches vom Doktoranden 2 bearbeitet wurde, beschäftigte sich mit der Frage, **inwiefern sekundäre Pflanzenstoffe den thermischen Abbau von GLS beeinflussen**. Hier konnte der **M3** erreicht werden: Ein Workflow und Methodik für die Untersuchung der Interaktion von GLS mit sekundären Pflanzenstoffen im Modell konnte etabliert werden. Da in Modellsystemen mit Einzelverbindungen und

Fe(II) die GLS-Stabilität deutlich geringer war als bei früheren Untersuchungen (Bellostas et al. 2008, doi: 10.1021/np070438d; Hanschen et al. 2012, doi: 10.1021/jf302744y), wurde zunächst das thermische Abbauverhalten anhand verschieden konzentrierter Pflanzenauszüge (Brühe) untersucht und festgestellt, dass der GLS-Abbau und die Nitrilbildung mit der Konzentration zunimmt. H₂S wurde als ein Faktor identifiziert der den GLS-Abbau begünstigt und welches beim Kochen der Brühe entstand (Renz et al. 2023, doi: 10.1016/j.foodchem.2022.134594). In Folgeversuchen wurde der Einfluss weiterer antioxidativer Pflanzenstoffe (Vitamin C, Quercetin, Phenolsäuren, H₂S, ...) sowohl in der Brühe als auch ohne Pflanzenmatrix auf den GLS-Abbau untersucht. Letztendlich konnte gezeigt werden, dass antioxidative Pflanzenstoffe Methylthioalkyl-GLS oxidieren, H₂S diese Oxidation hemmt und Fe(II) in Kombination mit Vitamin C, aber nicht alleine, den thermischen Abbau von GLS zu Nitrilen induziert (Renz et al 2024, doi: 10.1016/j.foodchem.2023.137108). **M4** (Sreening von Pflanzenstoffen die den thermischen GLS-Abbau beeinflussen) und **M5** (Evaluierung von Pflanzenstoffen, die den thermischen GLS-Abbau beeinflussen im Modell) wurden damit **erreicht**. Der **M7** (Evaluierung des Einflusses sekundärer Pflanzenstoffe auf den thermischen GLS-Abbau in der Pflanze) wurde durch die Untersuchungen in Pflanzenmatrices ebenfalls **erreicht**. Der Einsatz von Tilling-Mutanten mit dem Ziel Mutanten mit einem definierten sekundären Pflanzenstoffprofil zu identifizieren (**M6**) wurde verworfen, da er aufgrund der Datenlage **nicht mehr erforderlich** war.

Bei der Identifizierung neuartiger GLS-Abbauprodukte (**WP3**, welches das **Ziel** hatte **neuartige GLS-Abbauprodukte zu identifizieren**) konnte der **M8**, die Identifizierung neuer GLS-Abbauprodukte **erreicht** werden. 4-Hydroxythiazolidin-2-thione entstehen aus der Reaktion von ITC mit Thioglucose (Hoffmann et al. 2022, doi: 10.1016/j.foodres.2022.111237).

In Kooperation mit dem Deutschen Institut für Ernährungsforschung (DIfE) wurde mit dem **WP4A (Charakterisierung der Bioaktivität neuartiger Verbindungen)** begonnen und die Bioverfügbarkeit, Toxizität sowie auch bioaktive Effekte untersucht. Die Verbindungen werden aufgenommen, waren aber weder toxisch noch bioaktiv bei den für Lebensmitteln relevanten Mengen (Hoffmann et al. 2022b, doi: 10.3389/fnut.2022.941286). In einer Humanstudie in Kooperation mit dem DIfE wurde zudem die Bioverfügbarkeit und der Metabolismus dreier Epithionitrile erstmals am Menschen untersucht (Hoffmann et al. 2023, doi: 10.1002/mnfr.202200619). Der **M9** (Untersuchung von Zytotoxizität und Genotoxizität) und **M10** (Untersuchung anderer bioaktiver Effekte) **wurden somit erreicht**. Da es sich bei den neu identifizierten Verbindungen um nichtflüchtige Substanzen handelte, die somit keinen Geruch aufweisen wurde das sensorische Potential dieser Verbindungen nicht untersucht. Jedoch wurde in Kooperation mit Prof. Michael Granvogl das sensorische Potential von thermischen ITC-Abbauprodukten untersucht (Andernach et al. 2024, doi: 10.1016/j.foodchem.2024.138939). Der **M11** (Untersuchung des sensorischen Potentials neuartiger Verbindungen) wurde damit **erreicht**.

Im Rahmen der LJRJG wurden die erzielten Forschungsergebnisse zur Optimierung des GLS-Abbaus in internationalen Journalen publiziert. Somit wurde **M12** (Publikation von Ergebnissen) **erreicht**.

Die Erreichung von **M13** (Dissertationen Doktorand 1) verzögerte sich aufgrund familiärer Gründe leider. Es wird mit dem Abschluss der Promotion Ende 2024 gerechnet. Die Promotion von Doktorand 2 wurde Ende 2023 erfolgreich abgeschlossen, **M14** ist damit **erreicht**.

Die Habilitation von Frau Dr. Hanschen wurde 2020 an der Universität Hamburg abgeschlossen, **M15** ist damit ebenfalls **erreicht**.

2. Aktivitäten und Hindernisse

Nach Einstellung der Mitarbeitenden kam es, sowohl in **WP 1** als auch in **WP2** zunächst zu Verzögerungen, da die untersuchten Faktoren keine reproduzierbaren Ergebnisse lieferten (WP1) oder das gewählte GLS-Modell unerwartet zu stabil war (WP2). Die experimentellen Abläufe konnten jedoch erfolgreich etabliert werden und ein Wechsel in die Pflanzenmatrix führte schließlich zum Erfolg (WP2). Der Einsatz von Tilling-Mutanten (M6) wurde verworfen, da er aufgrund der Datenlage und des modifizierten Versuchsdesigns nicht mehr erforderlich war.

Bei **WP1** führte ebenfalls der Wechsel der Versuchspflanze (Rotkohl) und der Umweg über einen Feldversuch schließlich zur Identifizierung der relevanten Parameter (Licht, Temperatur) auch unter kontrollierten Bedingungen (WP1).

Das **WP3** konnte wie geplant vom Post-Doc bearbeitet werden. Hier konnten neuartige GLS-Abbauprodukte identifiziert und funktionell charakterisiert werden.

Im Rahmen einer IGZ-internen Kooperation wurden zudem Enzyme des enzymatischen GLS-Abbaus in *Brassica* näher untersucht, deren Beeinflussung ja letztendlich die Basis für den **WP1** darstellt. So gelang bereits die Identifizierung und Charakterisierung dreier *epithiospecifizier proteins* (Witzel et al 2019,

doi: 10.3389/fpls.2019.01552). Zudem wurde, teilweise im Rahmen eines im Projektzeitraum eingeworbenen DFG-Projektes, untersucht, inwiefern sich durch die Zubereitungsweise der enzymatische und thermische GLS-Abbau optimieren lässt und welche Folgeprodukte dabei entstehen (Hanschen 2020, doi: 10.1016/j.foodchem.2020.126694; Hanschen 2024, doi: 10.1016/j.foodres.2024.114004; Renz, Andernach et al. doi: 10.1016/j.foodchem.2023.137550). Dabei konnte auch festgestellt werden, dass Amine in der Pflanze durch enzymatischen Abbau aus ITC entstehen können und Hauptabbauprodukte von GLS darstellen können (Andernach et al 2023a, doi: 10.1016/j.foodchem.2022.134907). Auf Basis dieses Ergebnisses wurde ein DFG-Projekt eingeworben, um das entsprechende Enzym zu identifizieren und zu charakterisieren. In Kooperation mit Prof. Lamy (Universitätsklinikum Freiburg) wurden zudem zwei Artikel zur Bioaktivität von ITC veröffentlicht (Tran et al. 2021, doi: 10.3389/fimmu.2021.669005; Herz et al. 2023, doi: 10.3389/fnut.2023.1223158). In Kooperation mit Prof. Rohn wurde der Einfluss des Backens auf die GLS-Abbau Mechanismen in Brot untersucht (Krell et al. 2021, doi: 10.3390/foods10061300; Krell et al. 2022, doi: 10.1016/j.foodres.2022.111492). Ein Review zum Einsatz des GLS-Abbaus (Biofumigation) in der Bekämpfung der Nachbaurkrankheit im Gehölzbau konnte zudem veröffentlicht werden (Hanschen und Winkelmann 2020, doi: 10.3390/agronomy10030425). Zudem wurde das Vorkommen und der Abbau von S-Methyl-L-cysteinsulfoxid, ebenfalls ein schwefelhaltiger bioaktiver Pflanzenstoff, in Kohl untersucht (Friedrich et al. 2022, doi: 10.1016/j.foodchem.2022.132544; Andernach et al. 2023b, doi: 10.1016/j.foodchem.2023.136969; Hanschen 2024; doi: 10.1016/j.foodres.2024.114004). Außerdem konnte ein BMBF-Projekt zur Untersuchung wertgebender Pflanzenstoffe in Wildpflanzen eingeworben werden.

Auf Basis dieser Erfolge konnte zudem ein Antrag im Leibniz-Professorinnen Förderprogramm gestellt werden, der Mitte 2022 bewilligt wurde (Leibniz Professorship for Phytonutrient Management at Technische Universität Berlin, P126/2021). Die Berufung von Dr. Hanschen an der TU Berlin erfolgt voraussichtlich im Laufe des Jahres 2024.

Im Verlauf des Projektes kam es durch verschiedene nicht planbare Ereignisse zu Verzögerungen: Mitte Dezember 2019 kam es am IGZ zu einem Brand im Laborgebäude, in dessen Folge die Labore etwa zweieinhalb Monate nicht nutzbar waren (bis Ende Februar). Aufgrund der Corona-Pandemie und der daraus abgeleiteten Maßnahmen (Präsenznotbetrieb, Abstandsmaßnahmen) kam es anschließend zu weiteren Verzögerungen (insgesamt etwa 4 Monate). Durch Corona-Verlängerungen (Doktorand 2, Leibniz und IGZ finanziert; Post-Doc, IGZ finanziert) konnten dennoch alle Ziele erreicht werden und das Projekt erfolgreich bearbeitet werden. Aufgrund von Mutterschutz und Elternzeit (Januar 2020-Januar 2021) sowie Probleme mit der dem Auffinden einer ausreichenden Kinderbetreuung (Kitaplatz) verzögerte sich zudem der Fortschritt im **WP1**. Das **WP1** konnte durch Finanzierung des vierten Promotionsjahrs seitens des IGZ trotzdem innerhalb der Projektlaufzeit erfolgreich abgeschlossen werden.

3. Ergebnisse und Erfolge

Während der Projektlaufzeit konnten zahlreiche Erfolge erzielt werden: So wurden insgesamt 21 begutachtete Forschungsartikel im Rahmen des Projektes veröffentlicht, davon 15 zur Aufklärung des enzymatischen GLS-Abbaus sowie der chemischen Abbauwege während der Zubereitung von *Brassica*-Gemüsen, wodurch Strategien zur Optimierung des GLS-Abbaus durch die Zubereitung von Kohl abgeleitet werden konnten. Untersuchungen zum Einfluss von GLS-Abbauprodukten auf den Menschen konnten in vier weiteren begutachteten Forschungsartikeln veröffentlicht werden. Diese Erkenntnisse wurden zudem in einigen Artikeln in Fachzeitschriften einem weiteren Publikum vorgestellt, sowie ein Interview zur Frage „Schützt Kohl vor Krebs?“ mit Dr. Hanschen im Leibniz Journal veröffentlicht werden. Formate wie Book a Scientist sowie zwei Fernsehbeiträge wurden ebenfalls genutzt um die Forschungsergebnisse einer breiteren Masse zugänglich zu machen.

Auf nationalen und internationalen Tagungen konnten Ergebnisse der Arbeitsgruppe und des Projektes in Vorträgen und Postern präsentiert und als Artikel in Tagungsbänden veröffentlicht werden. Dr. Hanschen engagierte sich in der Zeit als stellvertretende Vorsitzende des Regionalverband Nordost, der Lebensmittelchemischen Gesellschaft (LChG, Fachgruppe der Gesellschaft Deutscher Chemiker) und Co-organisierte in diesem Zusammenhang vier Regionalverbandstagungen sowie ein Kolloquium.

Im Jahr 2020 konnte sich Dr. habil Hanschen habilitieren und erhielt den Werner-Baltes Preis des Jungen Lebensmittelchemikers der LChG sowie einen Ruf auf eine Professur an die Hochschule Anhalt, den sie schließlich ablehnte.

In der Projektlaufzeit wurden in der Arbeitsgruppe vier externe Diplom/Masterarbeiten sowie eine Bachelorarbeit betreut und abgeschlossen. Zudem wurden vier Promovierende betreut, von denen eine Arbeit bereits abgeschlossen werden konnte. Im Projektzeitraum wurden zudem zwei DFG-Projekte, ein BMBF und ein Projekt der Leibniz-Gemeinschaft eingeworben mit einem Gesamtwert von rund 1,7 Mio €.

4. Chancengleichheit, Karriereförderung und Internationalisierung

Um Chancengleichheit in Bezug auf Geschlecht und Internationalisierung zu wahren, wurden alle Stellen sowohl national als auch international in deutscher und englischer Sprache ausgeschrieben und die Auswahl der Kandidat*innen erfolgte nur basierend auf deren Eignung und Motivation. Die Gespräche wurden so konzipiert, dass alle Kandidat*innen möglichst die gleichen Bedingungen hatten (englischsprachiger Vortrag und anschließend Fragen eines Fragekatalogs beantworten).

Insgesamt setzten sich die Wissenschaftler*innen der LJRG aus vier Deutschen (1 x w, 3 x m) und 3 Personen mit internationaler Staatsbürgerschaft (2 x w, 1 x m) zusammen (über SAW zwei weibliche und zwei männliche Mitglieder, davon drei Personen mit deutscher Nationalität sowie ein Mitglied mit slowakischer Nationalität).

Alle Mitarbeitenden der Nachwuchsgruppe wurden regelmäßig auf die Angebote der Potsdam Graduate School der Universität Potsdam aufmerksam gemacht, mit der das IGZ eine Kooperation hat. Alle Arbeitsgruppenmitglieder nahmen solche Möglichkeiten wahr sowie nahmen sie regelmäßig an nationalen und internationalen Tagungen teil. Die Promovierenden der LJRG wurden in das IGZ Promovierendenprogramm integriert und besuchten wöchentlich stattfindende „Student Seminar“, bei dem sie regelmäßig auch ihre eigenen Ergebnisse präsentierten. Innerhalb der Arbeitsgruppe fanden alle zwei Wochen Gruppenbesprechungen statt, sowie gab es regelmäßig Besprechungen zwischen der LJRG-Leitung und den einzelnen Team-Mitgliedern.

Die LJRG-Leiterin hat am IGZ den gleichen Status wie andere Forschungsgruppenleitungen und wird auf dieser Ebene in anstehende Planungen usw. eingebunden. Sie besuchte die von der Leibniz-Gemeinschaft angebotene Schulung für die LJRG-Leiter*innen zum Thema Führung, die sehr hilfreich war.

5. Strukturen und Kooperationen

Während der Projektlaufzeit wurden zusammen mit Prof. Rohn (Universität Hamburg/TU Berlin) eine gemeinsame Masterarbeiten sowie Promotionsarbeiten. Zudem konnte der Doktorand 2 (**WP2**) einen vierwöchigen Forschungsaufenthalt im Arbeitskreis von Prof. Rohn an der Universität Hamburg absolvieren, sowie mit Dr. Dekker (Wageningen University and Research) am an der Reaktionskinetik des thermischen GLS Abbaus arbeiten. Zusammen mit Prof. Grune vom Deutschen Institut für Ernährungsforschung (Dife) konnte der PostDoc Untersuchungen zur Bioaktivität der GLS-Abbauprodukte durchführen (**M9**). Mit Prof. Lamy Universitätsklinikum Freiburg wurden weitere Untersuchungen zu Bioaktivität durchgeführt.

Mit Prof. Winkelmann von der Leibniz-Universität Hannover wurde ein gemeinsames Review veröffentlicht. Eine Kooperation mit Prof. Wittstock von der TU Braunschweig konnte im Bereich Aminanalytik etabliert werden, mit dem verstorbenen Prof. Granvogl wurde im Bereich sensorische Charakterisierung (**WP4B**) zusammengearbeitet. Mit Prof. Halkier (University of Copenhagen) wurde zudem im Bereich Wurzelexsudatanalytik zusammengearbeitet.

6. Qualitätssicherung

Alle LJRG-Mitarbeiter haben sich nach den IGZ-Qualitätssicherungsmaßnahmen verpflichtet, die DFG-Regeln zur Sicherung der guten wissenschaftlichen Praxis zu befolgen. Dies beinhaltet die Dokumentation aller Versuche in Laborbüchern (und die Archivierung dieser), die regelmäßige Sicherung und Archivierung der von Messdaten und letztendlich die Aufbewahrung all dieser analogen und digitalen Daten für mindestens 10 Jahre.

Die Forschungsergebnisse wurden überwiegend in Open Access Journalen veröffentlicht. In den Fällen, bei denen dies aus strategischen Gründen ungünstig war, wurden die Daten nach der Embargo-Zeit zugänglich gemacht oder auf Preprint-Servern verfügbar gemacht. Die Daten wurden zudem über Supplementals nach FAIR Principles zugänglich gemacht bzw. wurden Proteomics-Rohdaten in Data Repositories veröffentlicht. Im Rahmen des Projektes wurden keine Tierversuche aber nach Ethikvotum ein Humanversuch durchgeführt.

7. Zusätzliche Ressourcen

Die Kofinanzierung des IGZ betrug laut Antrag 418.428 € (40 % des Gesamtbudgets). Davon erbrachte das IGZ 500.131 €. 434.996 € der erbrachten „In-kind“-Leistungen wurden in Form von Personalkosten erbracht, 65.135 € der „In-kind“-Leistungen wurden in Form von Sachmitteln erbracht. Zudem wurden weitere „In-kind“-Leistungen 221.046 € an Personalkosten von unterstützendem Personal, welches nicht über das Projekt finanziert wurde aber das Projekt unterstützt hat, erbracht.

8. Ausblick

Der enzymatische Abbau von GLS in *Brassica*-Gemüse ist sehr komplex und wird neben Myrosinase durch eine Vielzahl von Spezifere Proteinen reguliert, von denen es oft mehr Isoformen gibt als in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*. Um den enzymatischen Abbau der GLS in *Brassica*-Gemüsen auf genetischer und molekularer Ebene besser zu verstehen, sollten die am Abbau beteiligten Enzyme daher identifiziert und ihre Funktion in *Brassica* Gemüse untersucht werden. Zudem sollte die Rolle der Aminbildung aus ITC in *Brassica* untersucht und das verantwortliche Enzym identifiziert werden. Neben GLS kommen in solchen Gemüsen auch weitere sekundäre Pflanzenstoffe vor. Mögliche Interaktionen zwischen der biosynthetischen Regulierung von verschiedenen Pflanzenmetaboliten aber auch bei der thermischen Zubereitung der Gemüse sollten daher zukünftig näher untersucht werden.