



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ
ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΤΟΥΣ ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ ΣΤΑ
ΛΑΧΑΝΙΚΑ



Συγγραφέας:

ΣΟΦΙΑ ΚΑΡΑΝΙΚΟΛΟΠΟΥΛΟΥ

ΑΜ:17035

Επιβλέπουσα καθηγήτρια:

ΡΕΒΕΛΟΥ ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ-ΚΥΡΙΑΚΗ

ΑΘΗΝΑ, ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2021



UNIVERSITY OF WEST ATTICA

SCHOOL OF FOOD SCIENCE

DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY

DIPLOMA THESIS

DETERMINATION METHODS OF GLUCOSINOLATES AND THEIR
ENZYMATIC HYDROLYSIS PRODUCTS IN VEGETABLES



Author:

SOPHIA KARANIKOLOPOULOU

Registration Number: 17035

Supervisor:

PANAGIOTA-KYRIAKI REVELOU

ATHENS, SEPTEMBER 2021



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ
ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΤΟΥΣ ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ ΣΤΑ ΛΑΧΑΝΙΚΑ

Μέλη Εξεταστικής Επιτροπής συμπεριλαμβανομένου και του Εισηγητή

Η πτυχιακή/διπλωματική εργασία εξετάστηκε επιτυχώς από την κάτωθι Εξεταστική Επιτροπή:

A/a	ΟΝΟΜΑ ΕΠΩΝΥΜΟ	ΒΑΘΜΙΑΔΑ/ΙΔΙΟΤΗΤΑ	ΨΗΦΙΑΚΗ ΥΠΟΓΡΑΦΗ
1	ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ-ΚΥΡΙΑΚΗ ΡΕΒΕΛΟΥ	ΔΡ./ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΗ ΥΠΟΤΡΟΦΟΣ	
2	ΔΗΜΗΤΡΑ ΜΑΡΓΑΡΗ	ΛΕΚΤΟΡΑΣ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ	
3	ΜΥΡΤΩ ΤΡΙΑΝΤΗ	ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΗ ΥΠΟΤΡΟΦΟΣ	

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Καρανικολοπούλου Σοφία του Γεωργίου, με αριθμό μητρώου 17035, φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Η Δηλούσα



Καρανικολοπούλου Σοφία

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η διατριβή αυτή εκπονήθηκε στο Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, στο χρονικό διάστημα από τον Μάρτιο του 2021 έως τον Σεπτέμβριο του 2021, υπό την επίβλεψη της Δρ.Παναγιώτας-Κυριακής Ρεβέλου, Ακαδημαϊκής Υποτρόφου.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στην επιβλέπουσα Δρ.Παναγιώτα-Κυριακή Ρεβέλου για την τη διαρκή καθοδήγηση της, τις συμβουλές που μου παρείχε κατά την εκπόνηση της διατριβής μου καθώς και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας.

Ευχαριστίες εκφράζω επίσης προς τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, στην κα Μυρτώ Τριάντη, Ακαδημαϊκή Υπότροφο, και την κα Δήμητρα Μάργαρη, Λέκτορα Εφαρμογών, για τις πολύτιμες υποδείξεις τους ώστε το πόνημα αυτό να λάβει την τελική του μορφή. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την υπομονή, τη βοήθεια και τη στήριξή τους σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Καρανικολοπούλου Σοφία

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2021

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα μελέτη ασχολείται με τους δευτερογενείς μεταβολίτες που περιέχουν θείο, οι οποίοι είναι γνωστοί ως γλυκοζινολίτες και συναντώνται φυσικά στα σταυρανθή λαχανικά. Μετατρέπονται εύκολα σε μια σειρά δραστικών ενώσεων, με σημαντικότερες τις ισοθειοκυανικές ενώσεις και τα ινδολικά παράγωγα, ύστερα από την υδρόλυσή τους από το ένζυμο β-θειογλυκοσιδάση, γνωστό ως μυροσινάση, που ενεργοποιείται ύστερα από την πρόκληση κάποιας διαταραχής στα κύτταρα. Τόσο οι γλυκοζινολίτες όσο και τα προϊόντα υδρόλυσής τους, εκτός από την χαρακτηριστική πικάντικη γεύση που προσδίδουν στα λαχανικά που συναντώνται, εμφανίζουν να έχουν βιοκτόνο δράση έναντι διαφόρων παθογόνων μικροοργανισμών όπως μυκήτων, βακτηρίων, διαφόρων εντόμων και παρασίτων, ενώ έρευνες έχουν δείξει και τη σημαντική συμβολή τους στην πρόληψη έναντι διαφόρων τύπων καρκίνου. Επιπλέον, γίνεται αναφορά σε συμβατικές και μη συμβατικές μεθόδους εκχύλισης των γλυκοζινολιτών αλλά και των προϊόντων υδρόλυσής τους, που έχουν χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς, δίνοντας έμφαση στις συνθήκες που επικρατούν κατά την εκχύλιση με σημαντικότερες να είναι η θερμοκρασία και η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη. Τέλος, επιχειρείται η παρουσίαση μεθόδων ανάλυσής τους, με κυριότερες αναλυτικές τεχνικές που έχουν χρησιμοποιηθεί να είναι φασματοσκοπικές και χρωματογραφικές, με τις τελευταίες να συνδυάζονται συχνά με φασματομετρία μάζας για βέλτιστα αποτελέσματα.

Λέξεις κλειδιά: γλυκοζινολίτες, προϊόντα υδρόλυσης, εκχύλιση, μέθοδοι ανάλυσης

ABSTRACT

The present study deals with the sulfur-containing secondary metabolites, known as glucosinolates, which are found naturally in cruciferous vegetables. They are easily converted to a number of active compounds, most common of which are isothiocyanates and indole derivatives, after their hydrolysis by the enzyme β -thioglucosidase, known as myrosinase, which is activated after cell damage. Both glycosinolates and their hydrolysis products not only give a distinguishing spicy aftertaste to the vegetables they are found in, but also appear to have biocidal action against various pathogenic microorganisms such as fungi, bacteria, various insects and parasites, while research has shown their potent chemopreventive properties against various types of cancer. In addition, reference is made to conventional and non-conventional extraction methods of glucosinolates and their hydrolysis products, which have been used from time to time, emphasizing the conditions prevailing during the extraction, with the most important being the temperature and the choice of the appropriate solvent. Finally, methods for their analysis are presented, with the most basic being spectrophotometry and chromatography, with the latter being combined with mass spectroscopy for optimal results.

Keywords: glucosinolates, hydrolysis products, extract, determination methods

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	i
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	iii
ABSTRACT.....	iv
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ.....	v
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	vii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	vii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	viii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ.....	viii
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	xiii
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΣΤΑΥΡΑΝΘΗ ΛΑΧΑΝΙΚΑ	1
1.1 ΒΟΤΑΝΙΚΗ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	1
1.1.1 Τάξη <i>Brassicales</i>	1
1.1.2 Οικογένεια <i>Brassicaceae</i> (ή <i>Cruciferae</i>)	1
1.2 ΒΟΤΑΝΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ.....	2
1.2.1 Γενικά μορφολογικά γνωρίσματα	2
1.2.2 Ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των σημαντικότερων από τα καλλιεργούμενα φυτά της οικογένειας των σταυρανθών.....	3
1.2.2.1 Λάχανο (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>)	3
1.2.2.2 Κουνουπίδι (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>)	5
1.2.2.3 Μπρόκολο (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>Italica</i>)	6
1.2.2.4 Ρέβα (<i>Brassica rapa</i> var. <i>rapa</i>)	7
1.2.2.5 Ρόκα (<i>Eruca sativa</i>)	7
1.2.2.6 Ρεπάνι (<i>Raphanus sativus</i>)	8
1.3 ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗ ΑΞΙΑ.....	10
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΕΣ	13
2.1 ΓΕΝΙΚΑ	13
2.2 ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ	15
2.3 ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΥΔΡΟΛΥΣΗ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ.....	19

2.4 ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΤΟΥΣ ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ ΣΤΑ ΣΤΑΥΡΑΝΘΗ ΛΑΧΑΝΙΚΑ	22
2.4.1 Περιεκτικότητα των γλυκοζινολιτών σε σταυρανθή λαχανικά.....	22
2.4.2 Περιεκτικότητα προϊόντων υδρόλυσης γλυκοζινολιτών σε σταυρανθή λαχανικά.....	24
2.5 ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ ΤΟΥΣ	26
2.5.1 Αντιμυκητιστακή δράση προϊόντων ενζυμικής υδρόλυσης γλυκοζινολιτών ..	26
2.5.2 Βακτηριοκτόνος δράση προϊόντων ενζυμικής υδρόλυσης γλυκοζινολιτών ...	28
2.5.3 Εντομοκτόνος δράση των προϊόντων ενζυμικής υδρόλυσης των γλυκοζινολιτών.....	29
2.5.4 Αντικαρκινική δράση προϊόντων ενζυμικής υδρόλυσης γλυκοζινολιτών	30
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΤΟΥΣ ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ	35
3.1 ΣΥΜΒΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ.....	35
3.2 ΜΗ ΣΥΜΒΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ	41
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΤΟΥΣ ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ.....	50
4.1 ΟΛΙΚΟΙ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΕΣ.....	50
4.2 ΑΘΙΚΤΟΙ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΕΣ	51
4.3 ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ (ΙΝΔΟΛΙΚΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ & ΙΣΟΘΕΙΟΚΥΑΝΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ).....	59
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	65
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α.....	83
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	67
Α/ ΕΛΛΗΝΙΚΗ.....	67
Β/ ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ.....	67

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

ΕΙΚΟΝΑ 1 ΛΑΧΑΝΑ ΣΤΗΝ ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	3
ΕΙΚΟΝΑ 2 ΛΑΧΑΝΑ ΣΤΟ ΤΕΛΟΣ ΤΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ.....	3
ΕΙΚΟΝΑ 3 ΔΙΑΦΟΡΟΙ ΤΥΠΟΙ ΛΑΧΑΝΟΥ	4
ΕΙΚΟΝΑ 4 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΟΥΝΟΥΠΙΔΙΟΥ	5
ΕΙΚΟΝΑ 5 ΔΙΑΦΟΡΟΙ ΤΥΠΟΙ ΚΟΥΝΟΥΠΙΔΙΟΥ.....	5
ΕΙΚΟΝΑ 6 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΜΠΡΟΚΟΛΟΥ	6
ΕΙΚΟΝΑ 7 ΔΙΑΦΟΡΟΙ ΤΥΠΟΙ ΜΠΡΟΚΟΛΟΥ	6
ΕΙΚΟΝΑ 8 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΡΕΠΑΣ.....	7
ΕΙΚΟΝΑ 9 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΗΡΕΜΗΣ ΡΟΚΑΣ.....	7
ΕΙΚΟΝΑ 10 ΆΝΘΟΣ ΡΟΚΑΣ.....	8
ΕΙΚΟΝΑ 11 ΣΠΟΡΟΣ ΡΟΚΑΣ.....	8
ΕΙΚΟΝΑ 13 <i>RAPHANUS SATIVUS</i> L.VAR. <i>NIGER</i>	9
ΕΙΚΟΝΑ 12 <i>RAPHANUS SATIVUS</i> L.VAR. <i>SATIVUS</i>	9
ΕΙΚΟΝΑ 14 ΔΙΑΦΟΡΟΙ ΤΥΠΟΙ ΡΕΠΑΝΙΩΝ	10
ΕΙΚΟΝΑ 15 ΣΥΣΚΕΥΗ CLEVANGER ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΕΙΤΑΙ ΣΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΥΔΡΟΠΟΣΤΑΞΗΣ.....	37
ΕΙΚΟΝΑ 16 ΣΥΣΚΕΥΗ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ SOXHLET.....	37
ΕΙΚΟΝΑ 17 ΈΜΜΕΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΣΤΗΛΗΣ DEAE SEPHADEX	39
ΕΙΚΟΝΑ 18 ΣΥΣΚΕΥΗ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΜΕ ΥΠΕΡΗΧΟΥΣ.....	41
ΕΙΚΟΝΑ 19 ΣΥΣΚΕΥΗ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΜΕ ΜΙΚΡΟΚΥΜΑΤΑ.....	43
ΕΙΚΟΝΑ 20 ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΜΕ ΥΠΕΡΚΡΙΣΙΜΑ ΥΓΡΑ.....	47

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ I ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΕΣ ΠΟΥ ΑΝΗΚΟΥΝ ΣΤΗΝ ΤΑΞΗ BRASSICALES.....	1
ΠΙΝΑΚΑΣ II ΕΔΩΔΙΜΑ ΣΤΑΥΡΑΝΘΗ ΛΑΧΑΝΙΚΑ.....	2
ΠΙΝΑΚΑΣ III ΕΚΑΤΟΣΤΙΑΙΑ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ (G ANA 100G ΝΩΠΟΥ ΒΡΩΣΙΜΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ) ΟΡΙΣΜΕΝΩΝ ΣΤΑΥΡΑΝΘΩΝ ΛΑΧΑΝΙΚΩΝ ΣΕ ΝΕΡΟ, ΕΝΕΡΓΕΙΑ, ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΕΣ ΚΑΙ ΛΙΠΗ.	10
ΠΙΝΑΚΑΣ IV ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΟΡΙΣΜΕΝΩΝ ΣΤΑΥΡΑΝΘΩΝ ΛΑΧΑΝΙΚΩΝ ΣΕ ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ.	11
ΠΙΝΑΚΑΣ V ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΟΡΙΣΜΕΝΩΝ ΣΤΑΥΡΑΝΘΩΝ ΛΑΧΑΝΙΚΩΝ ΣΕ ΑΝΟΡΓΑΝΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ.	12
ΠΙΝΑΚΑΣ VI ΟΝΟΜΑΤΑ ΚΑΙ ΔΟΜΕΣ ΚΥΡΙΩΝ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ ΣΕ ΣΤΑΥΡΑΝΘΗ ΛΑΧΑΝΙΚΑ.	14
ΠΙΝΑΚΑΣ VII ΕΠΙΠΕΔΑ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ ΛΥΟΦΙΛΙΟΜΕΝΩΝ ΛΑΧΑΝΙΚΩΝ BRASSICA (MMOL G ⁻¹ ΞΗΡΟΥ ΒΑΡΟΥΣ)	23
ΠΙΝΑΚΑΣ VIII ΔΟΜΗ ΒΑΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ.....	24
ΠΙΝΑΚΑΣ IX ΚΥΡΙΕΣ ΠΗΓΕΣ ΛΑΧΑΝΙΚΩΝ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ.....	25
ΠΙΝΑΚΑΣ X ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ ΜΕ ΑΝΤΙΜΥΚΗΤΙΣΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ.	27
ΠΙΝΑΚΑΣ XI ΒΑΚΤΗΡΙΟΚΤΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ	29

ΠΙΝΑΚΑΣ XII ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ ΚΑΠΟΙΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ	
ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ.....	30
ΠΙΝΑΚΑΣ XIII ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ.....	34
ΠΙΝΑΚΑΣ XIV ΣΥΜΒΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ.....	38
ΠΙΝΑΚΑΣ XV ΣΥΜΒΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ.....	40
ΠΙΝΑΚΑΣ XVI ΜΗ-ΣΥΜΒΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ ΑΠΟ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΠΗΓΕΣ	
ΛΑΧΑΝΙΚΩΝ.....	44
ΠΙΝΑΚΑΣ XVII ΜΗ-ΣΥΜΒΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΙΣΟΘΕΙΟΚΥΑΝΙΚΩΝ ΑΠΟ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΠΗΓΕΣ	
ΛΑΧΑΝΙΚΩΝ.....	48
ΠΙΝΑΚΑΣ XVIII ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΜΕΘΟΔΩΝ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΟΛΙΚΩΝ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ.	51
ΠΙΝΑΚΑΣ XIX ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΣΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ ΓΙΑ	
ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ ΣΕ ΣΤΑΥΡΑΝΘΗ ΛΑΧΑΝΙΚΑ.....	54
ΠΙΝΑΚΑΣ XX ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΜΕΘΟΔΩΝ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ. .	58
ΠΙΝΑΚΑΣ XXI ΧΡΗΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΣΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΟΥΣ ΑΝΙΧΝΕΥΤΕΣ	
ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ.....	61
ΠΙΝΑΚΑΣ XXII ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΜΕΘΟΔΩΝ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ	
ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ.....	64

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

ΣΧΗΜΑ 1 ΔΟΜΗ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΗ	13
ΣΧΗΜΑ 2 ΕΠΙΜΗΚΥΝΣΗ ΑΝΘΡΑΚΙΚΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ ΜΕΘΕΙΟΝΙΝΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ	
ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ.....	16
ΣΧΗΜΑ 3 ΜΕΤΑΤΡΟΠΗ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΑΜΙΝΟΞΕΘΣ ΣΤΟ ΒΑΣΙΚΟ ΠΥΡΗΝΑ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΗ. .	17
ΣΧΗΜΑ 4 ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΠΛΕΥΡΙΚΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ ΣΕ ΑΛΕΙΦΑΤΙΚΟΥΣ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΕΣ.	18
ΣΧΗΜΑ 5 ΚΥΡΙΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ.	20
ΣΧΗΜΑ 6 ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΥΔΡΟΛΥΣΗ ΓΛΥΚΟΜΠΡΑΣΙΚΙΝΗΣ.	21

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

A: Ρετινόλη

ANDSA: 7-αμινο ναφθαλιν-1,3-σουλφονικό οξύ

ARE: Αντιοξειδωτικό Στοιχείο Απόκρισης

ATR-FTIR: Φασματοσκοπία Υπερύθρου Μετασχηματισμού Fourier με Αποσβένουσα Ολική Ανάκλαση

B1: Θειαμίνη

B2: Ριβοφλαβίνη

B3: Νιασίνη

B6: Πυριδοξίνη

B9: Φυλλικό ή Φολικό οξύ

BCAT: Τρανσαμινάση αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας

C: Ασκορβικό οξύ

Ca: Ασβέστιο

CE: Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση

CSA: Διάταξη Χρωματομετρικών Αισθητήρων

CZE: Ηλεκτροφόρηση Τριχοειδών Ζωνών

DAD: Ανιχνευτής Συστοιχίας Διόδων

DCM: Μεθυλενοχλωρίδιο

DW: Ξηρό βάρος

E: Τοκοφερόλη

ELISA: Ενζυμικός Ανοσοπροσροφητικός Προσδιορισμός

ESI: Ιονισμός Ηλεκτροψεκασμού

ESP: Επιθειοσπεσιφίερο Πρωτεΐνη

Fe: Σίδηρος

FID: Ανιχνευτής Ιονισμού Φλόγας

FW: Φρέσκο Βάρος

GA: Γλυκουρονικό Οξύ

GC: Αέρια Χρωματογραφία

GC-FID: Αέρια Χρωματογραφία με Ανιχνευτή Ιονισμού Φλόγας

GC-MS Αέρια Χρωματογραφία σε συνδυασμό με Φασματομετρία Μάζας

GLC: Αέρια Χρωματογραφία Υγρής Στατικής Φάσης

GLs: Γλυκοζινολίτες

HILIC: Υδρόφιλη Υγρή Χρωματογραφία Αλληλεπίδρασης

HILIC- MS / MS: Υδρόφιλη Υγρή Χρωματογραφία Αλληλεπίδρασης σε συνδυασμό με Φασματομετρία Μάζας

HP: Υψηλή Πίεση

HPLC: Υψηλής Απόδοσης Υγρή Χρωματογραφία

HPLC-DAD-ESI-MS / MS: Υψηλής Απόδοσης Υγρή Χρωματογραφία με Ανιχνευτή Συστοιχίας Διόδων σε συνδυασμό με Φασματομετρία Μάζας Ιονισμού Ηλεκτροψεκασμού

HPLC-Q-TOF-ESI-MS / MS: Υψηλής Απόδοσης Υγρή Χρωματογραφία σε συνδυασμό με Φασματομετρία Μάζας Τετραπόλου-Χρόνου Πτήσης Ιονισμού Ηλεκτροψεκασμού

HRMS: Φασματομετρία Μάζας Υψηλής Ανάλυσης

HSCCC: Χρωματογραφία Αντίστροφης Ροής Υψηλής Ταχύτητας

HT: Υψηλή Θερμοκρασία

IPC: Χρωματογραφία Ζεύγους Ιόντων Αντίστροφης Φάσης

IPM-DH: Ισοπροπυλματική αφυδρογονάση

IPMI: Ισοπροπυλματική ισομεράση

ITCs: Ισοθειοκυανικά

K: Κάλιο

K: Φυλλοκινόνη

LC: Υγρή Χρωματογραφία

LC- DAD-Q-TOF-ESI-MS: Υγρή Χρωματογραφία με Ανιχνευτή Συστοιχίας Διόδων σε συνδυασμό με Φασματομετρία Μάζας Τετραπόλου-Χρόνου Πτήσης Ιονισμού Ηλεκτροψεκασμού

LC-ESI-MS: Υγρή Χρωματογραφία σε συνδυασμό με Φασματομετρία Μάζας Ιονισμού Ηλεκτροψεκασμού

LC-ESI-MS / MS: Υγρή Χρωματογραφία σε συνδυασμό με Φασματομετρία Μάζας Ιονισμού Ηλεκτροψεκασμού

LC-MS: Υγρή Χρωματογραφία σε συνδυασμό με Φασματομετρία Μάζας

LC-UV-DAD / ESI-MS: Υγρή Χρωματογραφία με Ανιχνευτή Συστοιχίας Διόδων Υπεριώδους Ακτινοβολίας σε συνδυασμό με Φασματομετρία Μάζας Ιονισμού Ηλεκτροψεκασμού

MAE: Εκχύλιση με Μικροκύματα

MAM: Μεθυλοθειοαλκυλομηλική συνθάση

MECC: Μικροκυτταρική Ηλεκτροκινητική Τριχοειδής Χρωματογραφία

Mg: Μαγνήσιο

MS: Φασματομετρία Μάζας

MS/MS: Φασματομετρία Μαζικής Μάζας

MTBE: Μέθυλο τ-βουτυλαιθέρας

NIRS: Φασματοσκοπία Εγγύς Υπέρυθρης Ακτινοβολίας

NSP: Πρωτεΐνη Προσδιορισμού Νιτριλίου

P: Φωσφόρος

PC: Χρωματογραφία Χάρτου

PEF: Υποβοηθούμενο Παλμικό Ηλεκτρικό Πεδίο

Q-TOF MS: Φασματομετρία Μάζας Τετραπόλου Χρόνου Πτήσης

RP: Αντίστροφη Φάση

RP-HPLC: Υψηλής Απόδοσης Υγρή Χρωματογραφία Αντίστροφης Φάσης

SCE: Υπερκρίσιμη Εκχύλιση

SFC: Υπερκρίσιμη Ρευστή Χρωματογραφία

SFE-CO₂: Υπερκρίσιμη Εκχύλιση με Διοξείδιο του Άνθρακα

SFN: Σουλφοραφάνη

SPE: Εκχύλιση Στερεάς Φάσης

TFP: Πρωτεΐνη που σχηματίζει θείο

TLC: Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας

UAE: Εκχύλιση Υποβοηθούμενη από Υπερήχους

UDPG: Γλυκοζυλοτρανσφεράση θειοϋδροξυμικού διφωσφορικού ουριδίνης

UHPLC: Υγρή Χρωματογραφία Εξαιρετικά Υψηλής Απόδοσης

UHPLC-ESI – MS / MS: Υγρή Χρωματογραφία Εξαιρετικά Υψηλής Απόδοσης σε συνδυασμό με Φασματομετρία Μαζικής Μάζας Ιονισμού Ηλεκτροψεκασμού

UHPLC-Q-Orbitrap-MS: Υγρή Χρωματογραφία Εξαιρετικά Υψηλής Απόδοσης με Αναλυτή Q-Orbitrap σε συνδυασμό με Φασματομετρία Μάζας

UHPLC-Q-TOF- ESI –MS: Υγρή Χρωματογραφία Εξαιρετικά Υψηλής Απόδοσης σε συνδυασμό με Φασματομετρία Μάζας Τετραπόλου-Χρόνου Πτήσης Ιονισμού Ηλεκτροψεκασμού

UPLC-DAD-ESI-MS / MS: Υγρή Χρωματογραφία Υπερ-Απόδοσης με Ανιχνευτή Συστοιχίας Διόδων σε συνδυασμό με Φασματομετρία Μάζας Ιονισμού Ηλεκτροψεκασμού

UPLC-MS / MS: Υγρή Χρωματογραφία Υπερ-Απόδοσης σε συνδυασμό με Φασματομετρία Μαζικής Μάζας

UPLC-MS: Υγρή Χρωματογραφία Υπερ-Απόδοσης σε συνδυασμό με Φασματομετρία Μάζας

UV: Υπεριώδης Ακτινοβολία

Vis: Ορατό

Zn: Ψευδάργυρος

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα σταυρανθή λαχανικά ανήκουν στην τάξη *Brassicales* στην οικογένεια των *Brassicaceae*, η οποία περιέχει περισσότερα από 3250 είδη, τα οποία ανήκουν σε περίπου 365 γένη. Ωστόσο, παρά την μεγάλη ποικιλία ειδών που υπάρχουν στην οικογένεια των *Brassicaceae*, λίγα είναι τα είδη που είναι εδώδιμα και ανήκουν κυρίως στο γένος *Brassica*, με χαρακτηριστικά παραδείγματα το μπρόκολο, το κουνουπίδι, το λάχανο, τα λαχανάκια Βρυξελλών κ.α.

Στα λαχανικά αυτά συναντώνται δευτερογενείς μεταβολίτες που περιέχουν θείο, οι οποίοι είναι γνωστοί ως γλυκοζινολίτες και έχουν μια βασική χημική δομή που περιέχει ένα τμήμα οξίμης συνδεδεμένο μεθειογλυκόζη, έναθειώδες ανιόν συνδεδεμένο στο άτομο του οξυγόνου και μια πλευρική αλυσίδα που προέρχεται από αμινοξύ διακλαδισμένης αλυσίδας, μεθειονίνη, αλανίνη, φαινυλαλανίνη, τυροσίνη ή τρυπτοφάνη. Ανάλογα με τη δομή τους, μπορούν να ταξινομηθούν σε αλειφατικούς, αρωματικούς και ινδολικούς.

Μετατρέπονται σε μια σειρά δραστικών ενώσεων ύστερα από την υδρόλυσή τους από το ένζυμο μυροσινάση, μετά από την πρόκληση κάποιας διαταραχής στα κύτταρα είτε από κάποιον παθογόνο μικροοργανισμό ή έντομα είτε κατά τη διάρκεια της μάσησης, το τεμαχισμό ή το άλεσμα του φαγητού. Ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν, όπως το pH, η θερμοκρασία, η παρουσία ιόντων Fe^{2+} και επιπρόσθετων πρωτεϊνικών παραγόντων παράγονται διαφορετικές κατηγορίες προϊόντων αποδόμησης όπως ισοθειοκυανικά,θειοκυανικά, νιτρίλια, επιθειονιτρίλια, υδροξυνιτρίλια, οξαζολιδινο-2-θειόνες ή ινδόλια. Τα πιο μελετημένα προϊόντα υδρόλυσης είναι τα ισοθειοκυανικά και τα ινδόλια, τα οποία παρουσιάζουν και πολλαπλά οφέλη.

Έχει αποδειχθεί ότι παρουσιάζουν έντονη δράση κατά βακτηρίων, μυκήτων, εντόμων, αλλά υπάρχουν και αναφορές για τη χρήση τους στην αντιμετώπιση διαφόρων τύπων καρκίνου, όπως ο καρκίνος του μαστού, του προστάτη, του παχέος εντέρου, του τραχήλου της μήτρας κ.α. Εξαιτίας των πολυάριθμων βιολογικών ιδιοτήτων των γλυκοζινολιτών και των προϊόντων υδρόλυσής τους εξαιρετικά χρήσιμη είναι η παραλαβή τους. Έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες μέθοδοι ψυχρής, αλλά και θερμής εκχύλισης, με την πιο γνωστή να περιγράφεται στο *ISO 9167-1* και να χρησιμοποιείται μέχρι σήμερα. Ωστόσο, εξαιτίας των χρονοβόρων διαδικασιών

προετοιμασίας των δειγμάτων, των μεγάλων ποσοτήτων διαλυτών, αλλά και των μεγάλων χρόνων εκχύλισης που απαιτούνται, απαραίτητη ήταν και η εύρεση νέων μεθόδων εκχύλισης. Μη συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι με υπέρηχους, με μικροκύματα, με υψηλή υδροστατική πίεση αλλά και με την χρήση παλμικών ηλεκτρικών πεδίων.

Τέλος, μετά την παραλαβή τους, ακολουθούν οι μέθοδοι ανάλυσής τους, οι οποίες μπορούν να χωριστούν σε στοχευμένες μεθόδους για τον ποσοτικό προσδιορισμό είτε του συνόλου των γλυκοζινολιτών, είτε μεμονωμένων γλυκοζινολιτών, είτε των προϊόντων υδρόλυσής τους συμπεριλαμβανομένων των μεταβολιτών τους. Για τον προσδιορισμό της ταυτότητας των επιπέδων των γλυκοζινολιτών και των προϊόντων διάσπασής τους στα σταυρανθή λαχανικά έχουν εφαρμοστεί αρκετές αναλυτικές μέθοδοι, όπως η υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία (HPLC), η αέρια χρωματογραφία (GC), η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (CE) και η υπερκρίσιμη ρευστή χρωματογραφία (SFC). Οι μέθοδοι αυτές για καλύτερα αποτελέσματα συνδυάζονται τις περισσότερες φορές και με φασματομετρία μάζας (MS). Ακόμα, και φασματοσκοπικές μέθοδοι, όπως η φασματοφωτομετρική μέθοδος UV-Vis, η φασματοσκοπία εγγύς υπέρυθρης ακτινοβολίας (NIRS) και η φασματοσκοπία υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier με αποσβένουσα ολική ανάκλαση (ATR-FTIR) έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση των γλυκοζινολιτών και των προϊόντων διάσπασής τους.

Στο πρώτο κεφάλαιο δίνονται γενικές πληροφορίες για τα σταυρανθή λαχανικά. Συγκεκριμένα δίνεται η βοτανική προέλευση και μια σύντομη βοτανική περιγραφή, δίνοντας έμφαση στα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των σημαντικότερων καλλιεργούμενων φυτών της οικογένειας των σταυρανθών. Τέλος, επισημαίνεται η διατροφική τους αξία.

Το δεύτερο κεφάλαιο ασχολείται με τους γλυκοζινολίτες. Παρέχονται βασικές πληροφορίες για τα 3 στάδια της βιοσύνθεσής τους, καθώς και για την ενζυμική τους υδρόλυση. Ακόμα, παρατίθενται η περιεκτικότητα των γλυκοζινολιτών και των προϊόντων υδρόλυσής τους ορισμένων ευρέως χρησιμοποιούμενων σταυρανθών λαχανικών. Αναφορά γίνεται στην αντιμυκητιασική, βακτηριοκτόνο και εντομοκτόνο δράση τους, ενώ έμφαση δίνεται και στην αντικαρκινική τους δράση.

Στο τρίτο κεφάλαιο περιγράφονται οι μέθοδοι εκχύλισης των γλυκοζινολιτών και των προϊόντων υδρόλυσής τους, μέσω του διαχωρισμού τους σε συμβατικές και μη συμβατικές.

Στο τέταρτο κεφάλαιο προβάλλονται οι μέθοδοι ανάλυσης των γλυκοζινολιτών και των προϊόντων διάσπασής τους. Το κεφάλαιο διακρίνεται σε 3 ενότητες, οι οποίες συνοψίζουν τις αναλυτικές τεχνικές που έχουν χρησιμοποιηθεί για τον ποσοτικό προσδιορισμό 1) του συνόλου των γλυκοζινολιτών 2) των μεμονωμένων γλυκοζινολιτών και 3) των προϊόντων υδρόλυσής τους συμπεριλαμβανομένων των μεταβολιτών τους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΣΤΑΥΡΑΝΘΗ ΛΑΧΑΝΙΚΑ

1.1 ΒΟΤΑΝΙΚΗ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ

1.1.1 Τάξη *Brassicales*

Τα σταυρανθή λαχανικά είναι λαχανικά που ανήκουν στην τάξη *Brassicales*, με κοινό χαρακτηριστικό της τάξης να είναι οι δευτερογενείς μεταβολίτες, οι θείο-γλυκοζίτες, που περιέχονται στους αντιπροσώπους της. Οι ενώσεις αυτές δρουν ως αντιπαρασιτικές και εμποδίζουν τη βόσκηση των φυτών από τα φυτοφάγα, αλλά και ως αρωματικές ουσίες στα εμπορικά χρήσιμα είδη της οικογένειας *Brassicaceae*, όπως τα μπρόκολα, τα κουνουπίδια τα λάχανα τα σινάπια και άλλα (Ιατρού, 2016).

Η τάξη *Brassicales* περιλαμβάνει 17 οικογένειες, που παρατίθενται στον πίνακα I, περίπου 400 γένη και περισσότερα από 4600 είδη (Lysak, 2018).

Πίνακας I Οικογένειες που ανήκουν στην τάξη *Brassicales*.

1	<i>Akaniaceae</i>
2	<i>Bataceae</i>
3	<i>Brassicaceae</i>
4	<i>Capparaceae</i>
5	<i>Caricaceae</i>
6	<i>Cleomaceae</i>
7	<i>Emblingiaceae</i>
8	<i>Gyrostemonaceae</i>
9	<i>Koeberliniaceae</i>
10	<i>Limnanthaceae</i>
11	<i>Moringaceae</i>
12	<i>Pentadiplandraceae</i>
13	<i>Resedaceae</i>
14	<i>Salvadoraceae</i>
15	<i>Setchellanthaceae</i>
16	<i>Tovariaceae</i>
17	<i>Tropaeolaceae</i>

Πηγή (Simpson, 2019)

1.1.2 Οικογένεια *Brassicaceae* (ή *Cruciferae*)

Η οικογένεια των *Brassicaceae* περιέχει περισσότερα από 3250 είδη, τα οποία ανήκουν σε περίπου 365 γένη (π.χ. *Brassica*, *Raphanus*, *A Armoracia*, *Nasturtium*, *Wasabia*, *Alyssum*, *Arabidopsis* κ.α.) (Ιατρού, 2016). Η οικογένεια *Brassicaceae* είναι γνωστή στους βοτανολόγους και ως *Cruciferae* και παίρνει το εναλλακτικό της όνομα (*Cruciferae*) από το σχήμα των λουλουδιών τους, των οποίων τα τέσσερα πέταλα μοιάζουν με σταυρό. Παρά την μεγάλη ποικιλία ειδών που υπάρχουν στην οικογένεια

των *Brassicaceae*, λίγα είναι τα είδη που είναι εδώδιμα. Τα πιο κοινά σταυρανθή λαχανικά που είναι βρώσιμα ανήκουν στο γένος *Brassica* και σε συγκεκριμένες ποικιλίες του είδους *B.oleracea*, όπως είναι το λάχανο, το κουνουπίδι, τα λαχανάκια Βρυξελλών, το μπρόκολο, το λάχανο Savoy, τη λαχανίδα κ.α. Άλλα εδώδιμα είδη του γένους *Brassica*, είναι το *B.rapa* που περιλαμβάνει το κινέζικο λάχανο, τη ρέβα και το *B.napus* που περιλαμβάνει την κανόλα. Τέλος, άλλα σταυρανθή λαχανικά που συμπεριλαμβάνονται στην διατροφή του ανθρώπου, όπως είναι η ρόκα, το ρεπάνι, το αγριοράπανο, το Wasabi, ανήκουν σε άλλα γένη (Šamec & Salopek-Sondi, 2019).

Πίνακας II Εδώδιμα σταυρανθή λαχανικά.

Κοινή ονομασία	Γένος	Είδος & Ποικιλία
Κουνουπίδι	Brassica	<i>B.oleracea</i> var. <i>botrytis</i>
Λάχανο		<i>B.oleracea</i> var. <i>capitata</i>
Λαχανάκια Βρυξελλών		<i>B.oleracea</i> var. <i>gemmifera</i>
Μπρόκολο		<i>B.oleracea</i> var. <i>italica</i>
Λάχανο Savoy		<i>B.oleracea</i> var. <i>sabauda</i>
Λαχανίδα		<i>B.oleracea</i> var. <i>acephala</i>
Κινέζικο Λάχανο		<i>B.rapa</i> var. <i>chinensis</i>
Ρέβα		<i>B.rapa</i> var. <i>rapa</i>
Κανόλα		<i>B.napus</i> var. <i>oleifera</i>
Λευκή Μουστάρδα		<i>B.alba</i>
Ινδική Μουστάρδα		<i>B.juncea</i>
Ρεπάνι		Raphanus
Αγριοράπανο	Armoracia	<i>A.rusticana</i>
Νεροκάρδαμο	Nasturtium	<i>N.officinale</i>
Κάρδαμο	Lepidium	<i>L.sativum</i>
Ρόκα	Eruca	<i>E.sativa</i>
Wasabi	Wasabia	<i>W.japonica</i>

Πηγή (Šamec & Salopek-Sondi, 2019)

1.2 ΒΟΤΑΝΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

1.2.1 Γενικά μορφολογικά γνωρίσματα

Η οικογένεια *Brassicaceae* περιλαμβάνει κυρίως φυτά δικοτυλήδωνα, ποώδη, πολυετή ή που, ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες, αναπτύσσονται ακόμα και ετήσια κατά τη διάρκεια της καλλιέργειάς τους. Περιλαμβάνει σπάνια μικρούς θάμνους (π.χ. *Allysum spinosum*) και πολύ σπάνια μεγάλους θάμνους που μπορούν να φθάσουν τα 2 μέτρα ύψος (π.χ. *Heliophila glauca*). Τα διάφορα είδη των σταυρανθών λαχανικών είναι δύσκολο να διακριθούν κατά το στάδιο του φυτρώματος, αλλά όταν αναπτυχθούν αρκετά μπορούν να αναγνωριστούν, καθώς εμφανίζουν τα χαρακτηριστικά του είδους

τους. Ειδικότερα, διαθέτουν σχετικά επιφανειακό ριζικό σύστημα, το οποίο σχηματίζει κεντρική ρίζα και πολλές λεπτές πλευρικές ρίζες στα επιφανειακά 30-35 εκ. στρώματα του εδάφους. Επιπλέον, τα φύλλα έχουν μίσχο, εμφανίζονται συνήθως κατ' εναλλαγή, είναι επιμήκη και απλά, ενώ μερικά μπορεί να φέρουν βαθιές εγκοιλώσεις. Το κάθε είδος έχει χαρακτηριστικά φύλλα που μπορεί να είναι λεία, χονδρά, δερματώδη, κυματοειδή κ.α. Η τυπική ταξιανθία στην πλήρη ανάπτυξή της είναι επιμήκης με πολλά μικρά άνθη. Τα άνθη των σταυρανθών είναι τέλεια, φέρουν 4 πέταλα σε σχήμα σταυρού, 6 στήμονες και δίχωρη ωοθήκη. Τα πέταλα των περισσότερων σταυρανθών έχουν κίτρινο ή υποκίτρινο χρώμα καθώς επίσης μπορεί να είναι και λευκά. Επίσης, η ωοθήκη σχηματίζει επιμήκη λοβό, γνωστό ως κέρασ, πλάτους 3-5 χιλ. και μήκους 5-10 εκ., ενώ τα σπέρματα είναι μικρά, σφαιρικά και έχουν σκούρο καφέ χρώμα (Ιατρού, 2016).

1.2.2 Ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των σημαντικότερων από τα καλλιεργούμενα φυτά της οικογένειας των σταυρανθών

1.2.2.1 Λάχανο (*Brassica oleracea* var. *capitata*)

Το λάχανο, *Brassica oleracea* var. *Capitata* είναι φυτό γρήγορης ανάπτυξης, ποώδες και διετές (δηλαδή σχηματίζει άνθη τη δεύτερη χρονιά από τη σπορά), ενώ διαθέτει επιφανειακό ριζικό σύστημα 12,5-30 εκ.. Έχει μεγάλα, πλατιά και λεία φύλλα, πράσινα ή κοκκινωπά (το χρώμα εξαρτάται από την ποικιλία), με το ένα διαδέχεται το άλλο σχηματίζοντας ένα είδος κλειστού χωνιού.



Εικόνα 1 Λάχανα στην αρχή της καλλιέργειας



Εικόνα 2 Λάχανα στο τέλος της καλλιέργειας

Επιπλέον διαθέτει κεφαλή συνεκτική, μεγάλου μεγέθους και σφαιροειδή, η οποία έχει χρώμα από ανοιχτό πράσινο μέχρι ερυθρωπό. Όταν αυτή παραμένει στο έδαφος και δε συγκομιστεί, ανοίγει και από το κέντρο της εμφανίζεται το ανθικό στέλεχος πάνω στο οποίο βρίσκονται και οι ταξιανθίες (Θανόπουλος, 2008).

Η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης για το λάχανο είναι 15-18 °C, καθώς θέλει δροσερό κλίμα και θεωρείται ανθεκτικό φυτό στις χαμηλές θερμοκρασίες. Όσον αφορά το έδαφος πρέπει να είναι μέσης σύστασης, να στραγγίζει καλά, να διαθέτει υγρασία καθώς και να είναι εύφορο και πλούσιο σε οργανική ουσία. Επιπλέον, μπορεί να αποθηκευτεί στους -1 έως 2 °C με υγρασία 90-100%, και οι συνθήκες αυτές θα οδηγήσουν σε έως και έξι μήνες μακροζωίας. Όταν αποθηκεύεται σε λιγότερο ιδανικές συνθήκες, η διάρκεια ζωής του φτάνει έως τέσσερις μήνες.

Υπάρχουν πολλοί τύποι λάχανου. Ως προς τη διάρκεια του βιολογικού κύκλου διακρίνουμε τα υπερπρώιμα που είναι κατάλληλα για ανοιξιιάτικη καλλιέργεια, τα πρώιμα για καλοκαιρινή καλλιέργεια, τα μεσοπρώιμα και μεσόψιμα για φθινοπωρινή και τα όψιμα ή χειμωνιάτικα για χειμερινή.

Ως προς το σχήμα και το χρώμα της κεφαλής τα λάχανα διακρίνονται σε άσπρα, κόκκινα και τύπου Σαβοΐας (Savoy) λάχανα. Ειδικότερα, τα άσπρα λάχανα έχουν συμπαγή ή αφράτη κεφαλή χρώματος ανοιχτού πράσινου και σχήματος κωνικού ή σφαιρικού και τα τύπου Σαβοΐας (Savoy) έχουν γκριζοπράσινο χρώμα και σγουρά φύλλα (Salunkhe & Kadam, 1998).



Άσπρο λάχανο

Κόκκινο λάχανο

Τύπου Σαβοΐας (Savoy)

Εικόνα 3 Διάφοροι τύποι λάχανου

1.2.2.2 Κουνουπίδι (*Brassica oleracea* var. *botrytis*)

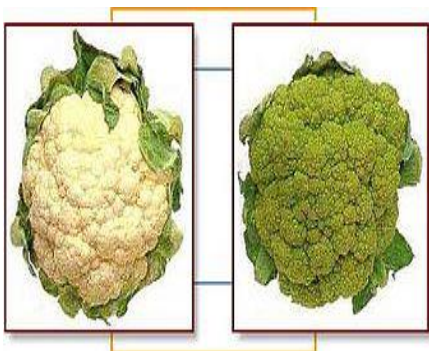
Το Κουνουπίδι (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) είναι ένα φυτό δικοτυλήδοιο, ποώδες, διετές (σπόρος), ενώ καλλιεργείται και ως μονοετές (ανθοκεφαλή). Το ύψος φτάνει τα 40-80 εκ. ανάλογα των συνθηκών που επικρατούν και της ποικιλίας. Ο βλαστός είναι μικρός, χονδρός, βάση των φύλλων και της ανθοκεφαλής, ενώ τα φύλλα είναι σαρκώδη, επιμήκη και πιο στενά και μακριά από του λάχανου. Επίσης, η ανθοκεφαλή έχει χρώμα κυρίως λευκό, αλλά μπορεί να έχει και υποκίτρινο, λευκοπράσινο και ιώδες. Το σχήμα της είναι κυρίως σφαιρικό με κυρτή επιφάνεια ή μυτερό σε σχήμα πυραμίδας.



Εικόνα 4 Καλλιέργεια κουνουπιδιού

Το κουνουπίδι είναι αυστηρά φυτό ψυχρής εποχής, με άριστη θερμοκρασία για την παραγωγή καλής ποιότητας τους 17 °C. Επιπλέον, εμφανίζει καλή απόδοση σε γόνιμα εδάφη και γενικότερα οι εδαφικές του απαιτήσεις μοιάζουν με αυτές του λάχανου και του μπρόκολου. Όσον αφορά την αποθήκευσή του, δε διατηρείται πολύ λόγω υψηλού ρυθμού αναπνοής. Μια ενδεδειγμένη αποθήκευση στους 0 °C με σχετική υγρασία 95-98% έχει διάρκεια ζωής 3-4 εβδομάδες.

Ως προς το σχήμα των φύλλων και το χρώμα της ανθοκεφαλής τα κουνουπίδια διακρίνονται σε διάφορες ποικιλίες που χρησιμοποιούνται στο εμπόριο (Εικόνα 5) (Salunkhe & Kadam, 1998).



Λευκό-πράσινο κουνουπίδι



Πορτοκαλί κουνουπίδι



Μωβ κουνουπίδι

Εικόνα 5 Διάφοροι τύποι κουνουπιδιού

1.2.2.3 Μπρόκολο (*Brassica oleracea* var. *Italica*)

Το μπρόκολο (*Brassica oleracea* var. *Italica*) είναι φυτό δικοτυλίδιο, ποώδες, καλλιεργούμενο ως μονοετές ή διετές από σπόρο σε σπόρο. Το ύψος του εξαρτάται από την χρησιμοποιούμενη ποικιλία και κυμαίνεται από 45 έως 60 εκ. Διαθέτει σχετικά επιφανειακό ριζικό σύστημα, ενώ τα φύλλα του είναι πλατιά, μεγάλα και σαρκώδη (Ολύμπιος, 2015).



Εικόνα 6 Καλλιέργεια μπρόκολου

Το μπρόκολο εκτός από την κεντρική ανθοκεφαλή, η οποία έχει διάμετρο από 7,5 – 20 εκ. και χρώμα γκριζωπό, πρασινομπλέ ή ιώδες, σχηματίζει και δευτερεύουσες ανθοκεφαλές, ακανόνιστου σχήματος και μικρότερων διαστάσεων, στις μασχάλες των φύλλων, σε αντίθεση με το κουνουπίδι που διαθέτει μόνο κεντρική ανθοκεφαλή μικρότερων διαστάσεων. Εάν μετά τη συγκομιδή η ανθοκεφαλή παραμείνει στο έδαφος, τότε τα ανθικά στελέχη επιμηκύνονται για να δώσουν τα άνθη (Σάββας, 2016).

Θεωρείται φυτό ψυχρής εποχής και λιγότερο ευαίσθητο σε χαμηλές και υψηλές θερμοκρασίες από το κουνουπίδι, με επιθυμητή μέση μηνιαία θερμοκρασία τους 16 °C ή ακόμα και χαμηλότερα. Για να αναπτυχθεί σωστά θα πρέπει το έδαφος να έχει τα ίδια χαρακτηριστικά με το έδαφος που καλλιεργούνται και τα υπόλοιπα σταυρανθή λαχανικά. Για την αποθήκευσή του, επειδή παρατηρείται υψηλός ρυθμός αναπνοής, συνεπώς και γρήγορη υποβάθμιση ποιότητας, μια ενδεδειγμένη αποθήκευση στους 0-2 °C και 95% σχετική υγρασία έχει διάρκεια ζωής 1-2 εβδομάδες. Το σχήμα των φύλλων και το χρώμα της ανθοκεφαλής μπορεί να διαφέρει στις διάφορες ποικιλίες, που χρησιμοποιούνται στο εμπόριο (Εικόνα 7) (Salunkhe & Kadam, 1998).



Τύπου Romanesco



Τύπου calabrese



Τύπου sprouting

Εικόνα 7 Διάφοροι τύποι μπρόκολου

1.2.2.4 Ρέβα (*Brassica rapa* var. *rapa*)

Η ρέβα (*Brassica rapa* var. *rapa*) είναι ένα διετεές φυτό χαμηλής και γρήγορης ανάπτυξης. Σχηματίζει έναν στρογγυλό, ελαφρώς πεπλατυσμένο ή ωσειδή ριζοκόνδυλο στην περιοχή του λαιμού του φυτού, από τον οποίο εκπτύσσονται τα φύλλα σε μορφή ροζέτας. Υπάρχουν όμως και ποικιλίες που εμφανίζουν έναν επιμήκη ριζοκόνδυλο και άλλες που δεν σχηματίζουν καθόλου. Τόσο ο ριζοκόνδυλος, αλλά και τα φύλλα της ρέβας, συμπεριλαμβανομένων των μίσχων, είναι βρώσιμα. Το ανθικό στέλεχος ξετυλίγεται από το κέντρο της κορυφής του ριζοκόνδυλου και φτάνει σε ύψος 1μ.



Εικόνα 8 Καλλιέργεια ρέβας

Εσωτερικά ο ριζοκόνδυλος είναι λευκός ή λευκοκίτρινος, ενώ εξωτερικά είναι λευκός, πράσινος, ερυθροιώδης ή εν μέρει ιώδες ή εν μέρει λευκός, ανάλογα με την ποικιλία. Ακόμα, η ρέβα σχηματίζει ανοιχτοπράσινα χνουδωτά φύλλα (Σάββας, 2016).

Η διάρκεια της καλλιέργειας, από τη σπορά έως τη συγκομιδή, κυμαίνεται από 2-3 μήνες, ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη ποικιλία. Σε γενικές γραμμές οι καλλιεργητικές φροντίδες, η άρδευση και η λίπανση πραγματοποιούνται όπως και στα υπόλοιπα σταυρανθή, ενώ όσον αφορά την αποθήκευσή της, σε θάλαμο με θερμοκρασία 0-1.5 °C και σχετική υγρασία 95% μπορεί να συντηρηθεί για χρονικό διάστημα 1-2 μηνών (Salunkhe & Kadam, 1998).

1.2.2.5 Ρόκα (*Eruca sativa*)

Η ρόκα είναι ένα μονοετές, ποώδες φυτό, μικρού μεγέθους με ύψος που φτάνει τα 20-100 εκ. και με διακλαδιζόμενους βλαστούς, που έχει εισαχθεί στην καλλιέργεια τις τελευταίες δυο-τρεις δεκαετίες. Συχνά αναφέρεται ως ήρεμη ρόκα για να διακριθεί από την άγρια ρόκα (*Diplotaxis tuniifolia* L.) και είναι χειμωνιάτικο φυτό, ενώ ανθίζει από τον Μάρτιο έως τον Ιούνιο (Σάββας, 2016).



Εικόνα 9 Καλλιέργεια ήρεμης ρόκας

Τα φύλλα είναι πτεροειδή, βαθιά λοβωτά με τέσσερις έως δέκα μικρούς πλαϊνούς λοβούς και έναν μεγάλο κορυφαίο λοβό. Έχει λευκόχρωμα άνθη με πορφυρές φλέβες και κίτρινους στήμονες, ενώ τα πέταλα είναι μπεζ, με μωβ πορφυρές νευρώσεις και κίτρινους στήμονες. Τέλος, ο καρπός έχει σχήμα κωνικό και ραμφοειδές, μέγεθος 12-35 χιλ. και περιέχει αρκετά σπέρματα κίτρινου χρώματος, τα οποία είναι εδώδιμα, ενώ η ρίζα του είναι πασσαλώδης.



Εικόνα 11 Σπόρος ρόκας



Εικόνα 10 Άνθος ρόκας

Η ρόκα καλλιεργείται για τα φύλλα της, τα οποία έχουν μια χαρακτηριστική δριμεία, αλλά επιθυμητή από τους καταναλωτές, γεύση και οσμή. Χρησιμοποιείται, κυρίως, ωμή σε σαλάτες καθώς και για παρασκευή έτοιμων προτεμαχισμένων σαλατών. Στην περίπτωση αυτή, η συγκομιδή πραγματοποιείται περίπου δεκαοχτώ ημέρες από την σπορά. Τα ώριμα φυτά συγκομίζονται τριάντα με πενήντα ημέρες από την σπορά και πωλούνται σε ματσάκια. Ευδοκίμει στα περισσότερα εδάφη με pH γύρω στο 6-7 (Ολύμπιος, 2015).

1.2.2.6 Ρεπάνι (*Raphanus sativus*)

Το ρεπάνι είναι ένα μονοετές ή διετές φυτό. Το βρώσιμο τμήμα του φυτού είναι ο ριζοκόνδυλος που σχηματίζεται υπόγεια σε μικρό βάθος. Υπάρχουν δυο βοτανικές ποικιλίες ραπανιού, η *Raphanus sativus* L. var. *Niger*, η οποία περιλαμβάνει τα μεγάλα μεγέθους ραπάνια και η *Raphanus sativus* L. var. *sativus*, η οποία σχηματίζει μικρού μεγέθους ραπάνια, γνωστά ως ραπανάκια.



Εικόνα 13 *Raphanus sativus L.var.sativus*



Εικόνα 12 *Raphanus sativus L.var.niger*

Στην πρώτη ποικιλία, *Raphanus sativus L. var. Niger*, το μήκος και η διάμετρος των ραπανιών ποικίλει, με το μήκος να κυμαίνεται μεταξύ 10 και 25 εκ. και το σχήμα να είναι επίμηκες κυλινδρικό ή επίμηκες με αιχμηρή απόληξη. Όσον αφορά το χρώμα στην βόρεια Ευρώπη προτιμώνται ποικιλίες με λευκή εξωτερική επιφάνεια, υπάρχουν όμως και ποικιλίες με χρώμα μαύρο, καφέ, κόκκινο, ιώδες, ρόδινο, γκρι, καθώς επίσης και κόκκινο με λευκή κορυφή. Το ραπανάκι, *Raphanus sativus L. var. sativus*, από την άλλη πλευρά, έχει σχήμα στρογγυλό ή ωοειδές, με μια τάση να σχηματίζει απόφυση στην κορυφή του που σε πολλές ποικιλίες του δίνουν σχήμα σβούρας. Το χρώμα του ριζοκόνδυλου μπορεί να είναι λευκό, ροδοκόκκινο έως κόκκινο, αλλά και διάφορες ακόμα ποικιλίες υπάρχουν με χρώμα βιολετί, γκρίζο και κόκκινο με λευκή κορυφή (Σάββας, 2016).

Σε γενικές γραμμές, τα ρεπάνια είναι ανθεκτικά στις χαμηλές θερμοκρασίες, με ρίζες καλύτερης ποιότητας να επιτυγχάνονται από 10 έως 18 °C. Τα ρεπάνια στους 0 °C και 90-95% σχετική υγρασία μπορούν να διατηρηθούν και να αποθηκευτούν για 2 μήνες.

Ακόμα, υπό μέσες συνθήκες, οι ανοιξιάτικες ποικιλίες δίνουν ριζοκόνδυλους για λίγο χρόνο σε περίπου 3-4 εβδομάδες μετά την σπορά, ενώ η γεύση τους είναι ήπια και καυστική. Οι καλοκαιρινές ποικιλίες δίνουν ριζοκόνδυλους για αρκετό χρονικό διάστημα έως και 40-50 μέρες μετά τη σπορά και τέλος οι χειμωνιάτικες ποικιλίες αναπτύσσονται αργά και έχουν πιο καυτερή γεύση (Salunkhe & Kadam, 1998).



Μαύρο, λευκό και κόκκινο



Λευκό και κόκκινο

Εικόνα 14 Διάφοροι τύποι ρεπανιών

1.3 ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗ ΑΞΙΑ

Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι ο υγιεινός χαρακτήρας της διατροφής που είναι πλούσιος σε σταυρανθή λαχανικά, οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στη χαμηλή περιεκτικότητά τους σε θερμίδες, υδατάνθρακες και λιπαρές ουσίες και ιδιαίτερα σε κορεσμένα λιπαρά οξέα, που αποδεδειγμένα είναι βλαπτικά για την ανθρώπινη υγεία. Είναι καλή, όμως, πηγή πρωτεϊνών με υψηλή βιολογική αξία και περιέχουν όλα τα απαραίτητα αμινοξέα και ιδιαίτερα αυτά που περιέχουν θείο (Σάββας, 2016).

Όπως φαίνεται και από τον Πίνακα III παρουσιάζουν υψηλή περιεκτικότητα σε νερό, είναι φτωχά σε υδατάνθρακες, (με εξαίρεση το λάχανο Βρυξελλών που αγγίζει το 10% κ.β.) και λίπη με περιεκτικότητα κάτω από 0,5%. Αξιόλογη πηγή πρωτεΐνης είναι το μπρόκολο και το λάχανο Βρυξελλών, με περιεκτικότητα μεγαλύτερη από 3%.

Πίνακας III Εκατοστιαία περιεκτικότητα (g ανά 100g νωπού βρώσιμου προϊόντος) ορισμένων σταυρανθών λαχανικών σε νερό, ενέργεια, υδατάνθρακες και λίπη.

Κηπευτικό	Νερό % κ.β	Θερμίδες kcal ανά 100g	Υδατάνθρακες % κ.β	Πρωτεΐνες % κ.β	Λίπη % κ.β
Κουνουπίδι	92	25	5,0	1,9	0,3
Λάχανο Βρυξελλών	86	43	9,0	3,4	0,3
Λάχανο κεφαλωτό	92	25	5,6	1,3	0,1
Μπρόκολο	89	34	6,6	2,8	0,4
Ραπάνι	95	16	3,4	0,7	0,1
Ρέβα	91	27	6,2	1,7	0,1

Πηγή (Σάββας, 2016)

Ο ρόλος των σταυρανθών λαχανικών στη διατροφή του ανθρώπου είναι ιδιαίτερα σημαντικός καθώς τροφοδοτούν τον οργανισμό με βιταμίνες A και βιταμίνες του συμπλέγματος B, C και K, ινώδεις ουσίες που βοηθούν στην καλή λειτουργία του εντέρου, καθώς και άλλες ουσίες που με τη σειρά τους δρουν θεραπευτικά υποβοηθώντας διάφορες λειτουργίες του ανθρώπινου οργανισμού.

Εκτός από την βιταμίνη C, τα διάφορα είδη της οικογένειας *Brassicaceae* έχουν επίσης σημαντικές ποσότητες πολλών βιταμινών του συμπλέγματος B, καθώς και βιταμίνη A με τη μορφή καροτενοειδών. Τα σταυρανθή λαχανικά περιέχουν επίσης και μικρές ποσότητες βιταμίνης E, ενώ είναι πολύ φτωχές πηγές ή δεν περιέχουν καθόλου βιταμίνες B7 (βιοτίνη) και B12 (κοβολαμίνη), ενώ δεν περιέχουν βιταμίνη D (Σάββας, 2016).

Όπως φαίνεται και στον πίνακα IV, το λάχανο Βρυξελλών είναι πλουσιότερο σε φολικό οξύ, ριβοφλαβίνη, βιταμίνη B₆ και βιταμίνη C, ενώ το μπρόκολο περιέχει τη μεγαλύτερη ποσότητα καροτενίου και νιασίνης.

Πίνακας IV Περιεκτικότητα ορισμένων σταυρανθών λαχανικών σε βιταμίνες.

(A: ρετινόλη, B1: θειαμίνη, B2: ριβοφλαβίνη, B3: νιασίνη, B6: πυριδοξίνη, B9: φυλλικό ή φολικό οξύ, C: ασκορβικό οξύ, E: τοκοφερόλη, K: φυλλοκινόνη)

Κηπευτικό	Βιταμίνη								
	A (IU)	B1 (mg)	B2 (mg)	B3 (mg)	B6 (mg)	B9 (mg)	C (mg)	E (mg)	K (μg)
Κουνουπίδι	13	0,06	0,06	0,53	0,22	57	46,4	0,08	15,5
Λάχανο Βρυξελλών	754	0,41	0,09	0,75	0,22	61	85,0	0,38	1,6
Λάχανο κεφαλωτό	171	0,05	0,04	0,30	0,10	43	32,2	0,15	76,0
Μπρόκολο	660	0,07	0,12	0,64	0,18	63	89,2	0,78	101,6
Ραπάνι	7	0,01	0,04	0,25	0,07	25	14,8	-	1,3
Ρέπα	36	0,05	0,02	0,04	0,15	16	62,0	0,48	0,1

Πηγή (Σάββας, 2016)

Τέλος, τροφοδοτούν του ανθρώπινο οργανισμό με ορισμένα ανόργανα θρεπτικά στοιχεία. Το βασικότερο από αυτά είναι το κάλιο, με σημαντική πηγή πρόσληψης το λάχανο Βρυξελλών. Τέλος, το μπρόκολο είναι πολύ καλή πηγή ασβεστίου, φωσφόρου και μαγνησίου.

Πίνακας V Περιεκτικότητα ορισμένων σταυρανθών λαχανικών σε ανόργανα στοιχεία.

Σε mg(K: Κάλιο, Ca:Ασβέστιο, Mg:Μαγνήσιο, P:Φωσφόρος, Fe:Σίδηρος, Zn:Ψευδάργυρος)
ανά 100g νωπού βρώσιμου προϊόντος.

Κηπευτικό	K	Ca	Mg	P	Fe	Zn
Κουνουπίδι	300	22	20	44	0,4	0,64
Λάχανο Βρυξελλών	389	42	23	69	1,4	0,42
Λάχανο κεφαλωτό	246	47	15	23	0,6	0,4
Μπρόκολο	316	47	21	66	0,7	0,41
Ραπάνι	233	25	10	20	0,3	0,28
Ρέπα	350	24	19	46	0,4	0,03

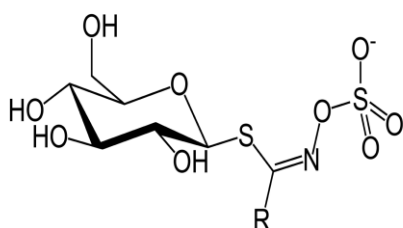
Πηγή (Σάββας, 2016)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΕΣ

2.1 ΓΕΝΙΚΑ

Τα ευεργετικά αποτελέσματα των λαχανικών της οικογένειας των σταυρανθών, είναι γνωστό σήμερα πως οφείλονται σε δευτερογενείς μεταβολίτες που περιέχουν θείο, οι οποίοι είναι γνωστοί ως γλυκοζινολίτες (Rollin & Tatibouët, 2011). Είναι σκόπιμο να γίνει αναφορά στην έννοια των δευτερογενών μεταβολιτών στα φυτά, αφού σε αντίθεση με τους πρωτογενείς μεταβολίτες είναι ουσίες που δεν έχουν άμεση συμμετοχή σε ζωτικής σημασίας λειτουργίες του φυτού όπως η φωτοσύνθεση, η αναπνοή, η αφομοίωση και η μετακίνηση θρεπτικών ουσιών, η σύνθεση σακχάρων, πρωτεϊνών, λιπιδίων και η διαφοροποίηση. Έχουν θεωρηθεί ότι αποτελούν απόβλητα ή παραπροϊόντα του πρωτογενούς μεταβολισμού, καθώς δεν είναι αναγκαία στη διεξαγωγή των βασικών φυσιολογικών λειτουργιών που είναι κοινές για όλα τα φυτά, (Κατσαρού, 2014). Υπάρχουν 3 μεγάλες κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών, τα τερπενοειδή, οι φαινολικές ενώσεις και οι αζωτούχες ενώσεις, στις οποίες ανήκει και η κατηγορία των γλυκοζινολιτών που μελετάμε.

Σήμερα, φαίνεται πως ο αριθμός των αναφερόμενων γλυκοζινολιτών πλησιάζει τους 200 (Clarke, 2010). Όλοι οι γλυκοζινολίτες μοιράζονται μια βασική χημική δομή που περιέχει ένα τμήμα οξίμης συνδεδεμένο με θειογλυκόζη, ένα θειώδες ανιόν συνδεδεμένο στο άτομο του οξυγόνου και μια πλευρική αλυσίδα που προέρχεται από αμινοξύ διακλαδισμένης αλυσίδας, μεθειονίνη, αλανίνη, φαινυλαλανίνη, τυροσίνη ή τρυπτοφάνη. Ανάλογα με τη δομή τους, μπορούν να ταξινομηθούν σε αλειφατικούς, που προέρχονται από μεθειονίνη, αλανίνη, λευκίνη, ισολευκίνη και βαλίνη, αρωματικούς, που προέρχονται από φαινυλαλανίνη ή τυροσίνη και ινδολικούς, που προέρχονται από τρυπτοφάνη (Esteve, 2020).

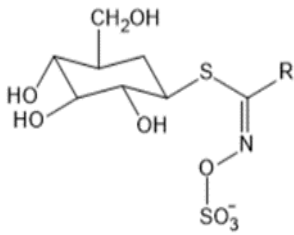
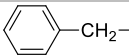
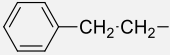






Σχήμα 1 Δομή γλυκοζινολίτη

Οι γλυκοζινολίτες είναι υδατοδιαλυτά ανιόντα που έχουν ένα κεντρικό άτομο C το οποίο συνδέεται μέσω ενός ατόμου S με μια ομάδα γλυκόζης και μέσω ενός ατόμου N με μια ομάδα οξίμης, η οποία φέρει επίσης μια πλευρική ομάδα. Η ομάδα της πλευρικής αλυσίδας και του θειικού άλατος έχει αντι-στεreoχημική διαμόρφωση κατά μήκος του διπλού δεσμού C = N.

Στον πίνακα VI, δίνονται οι ονομασίες και οι δομές των πιο γνωστών αλειφατικών, αρωματικών και ινδολικών γλυκοζινολιτών.

Πίνακας VI Ονόματα και δομές κύριων γλυκοζινολιτών σε σταυρανθή λαχανικά.

<i>Βασική δομή γλυκοζινολίτη</i>	
	
<i>Για Δομή R- ομάδας/ Ημισυστηματική ονομασία R- ομάδων</i>	<i>Κοινή ονομασία γλυκοζινολίτη</i>
A. ΑΛΕΙΦΑΤΙΚΟΙ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΕΣ	
CH ₂ =CH—CH ₂ — Αλλυλο (Allyl)	Σινιγκρίνη (Sinigrin)
CH ₂ =CH—CH ₂ —CH ₂ — Βουτ-3-ένυλο (But-3-enyl)	Γλυκοναπίνη (Gluconapin)
CH ₂ =CH—CH ₂ —CH ₂ ·CH ₂ — Πεντ-4-ένυλο (Pent-4-enyl)	Γλυκομπρασικαναπίνη (Glucobrassicaparin)
CH ₃ —S—CH ₂ —CH ₂ —CH ₂ — 3-Μεθυλθειοπρόπυλο (3-Methylthiopropyl)	Γλυκοϊμπερβερίνη (Glucoibervirin)
CH ₃ —S—CH ₂ —CH ₂ —CH ₂ ·CH ₂ — 4-Μεθυλθειοβούτυλο (4-Methylthiobutyl)	Γλυκοερουκίνη (Glucoerucin)
CH ₃ —SO—CH ₂ —CH ₂ —CH ₂ — 3-Μεθυλοσουλφινυλοπρόπυλο (3-Methylsulphinylpropyl)	Γλυκοϊμπερίνη (Glucoiberin)
CH ₃ —SO—CH ₂ —CH ₂ —CH ₂ ·CH ₂ — 4-Μεθυλοσουλφινυλοβούτυλο (4-Methylsulphinylbutyl)	Γλυκοραφανίνη (Glucoraphanin)
CH ₃ —SO ₂ —CH ₂ —CH ₂ —CH ₂ ·CH ₂ — 4-Μεθυλοσουλφονυλοβούτυλο (4-Methylsulphonylbutyl)	Γλυκοερυσολίνη (Glucoerysolin)
B. ΑΡΩΜΑΤΙΚΟΙ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΕΣ	
 Βένζυλο (Benzyl)	Γλυκοτροπαεολίνη (Glucotropeolin)
 Φαιναιθύλο (Phenethyl)	Γλυκοναστουρτιίνη (Gluconasturtiin)
Γ. ΙΝΔΟΛΙΚΟΙ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΕΣ	
 Ινδολο-3-υλομέθυλο (Indol-3-ylmethyl)	Γλυκομπρασικίνη (Glucobrassicin)
 N-Μεθοξυινδολο-3-υλομέθυλο (N-Methoxyindol-3-ylmethyl)	Νεογλυκομπρασικίνη (Neoglucobrassicin)
 4-Υδροξυινδολο-3-υλομέθυλο (4-Hydroxyindol-3-ylmethyl)	4-Υδροξυγλυκομπρασικίνη (4-Hydroxyglucobrassicin)
 4-Μεθοξυινδολο-3-υλομέθυλο (4-Methoxyindol-3-ylmethyl)	4-Μεθοξυγλυκομπρασικίνη (4-Methoxyglucobrassicin)

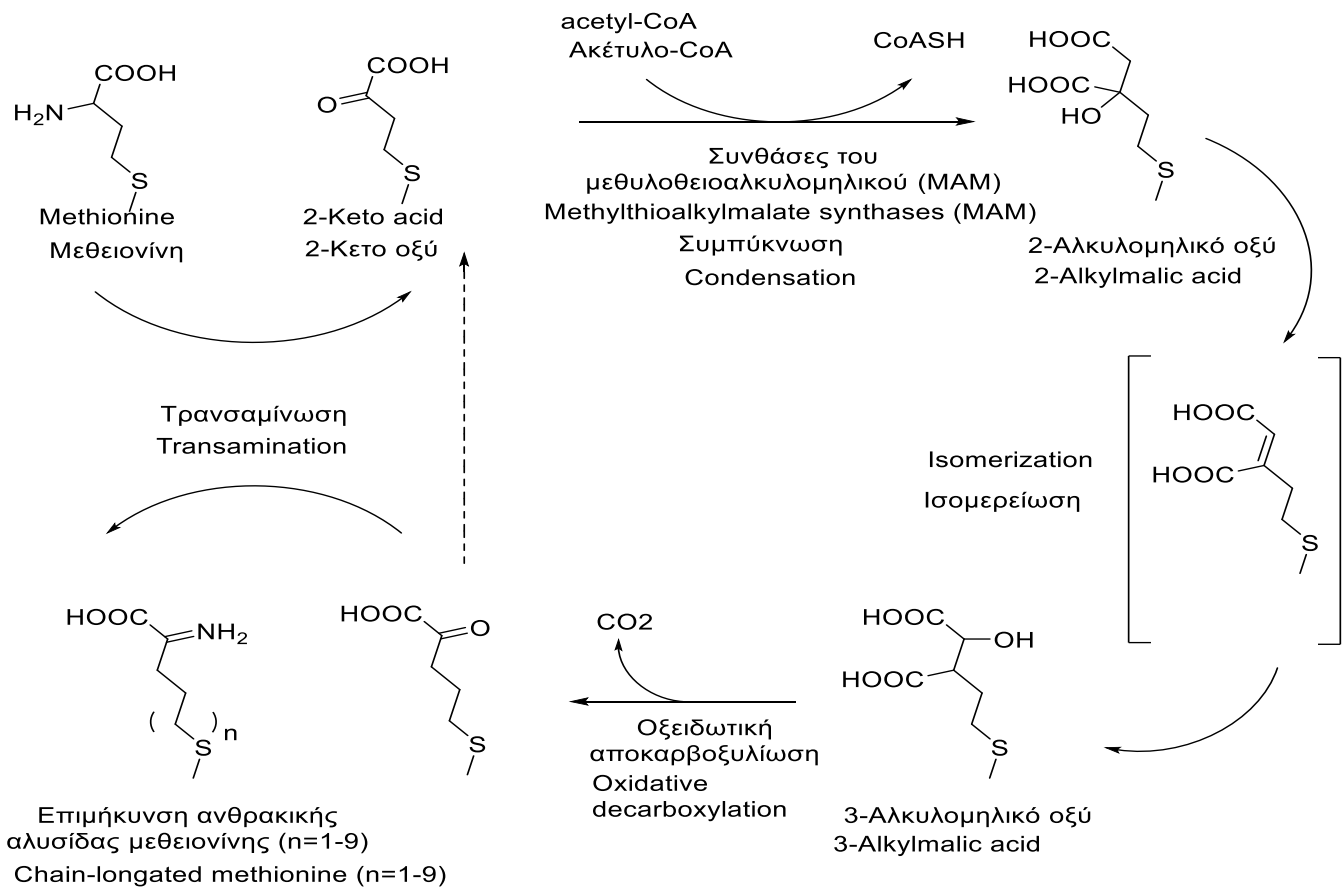
Πηγή (Delonga, Dragović-Uzelac, Mrkić & Vorkarić-Furač, 2007 ; Beekwilder et al., 2008 ; Ρεβέλου, 2018)

2.2 ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ

Η βιοσύνθεση των γλυκοζινολιτών περιλαμβάνει τρία στάδια. Το πρώτο στάδιο είναι η επιμήκυνση της αλυσίδας των αμινοξέων, το δεύτερο στάδιο είναι σύνθεση του γλυκοζινολικού άλατος από το αμινοξύ και το τρίτο στάδιο περιλαμβάνει τις τροποποιήσεις της αλυσίδας (Mithen, Dekker, Verkerk & Johnson, 2000).

1. Επιμήκυνση της αλυσίδας των αμινοξέων

Πολλοί γλυκοζινολίτες συντίθενται από επιμήκεις αλυσίδες βαλίνης, φαινυλαανίνης και μεθειονίνης. Στο *Arabidopsis Thaliana*, όπως και σε πολλά άλλα είδη της οικογένειας των *Brassicaceae*, οι περισσότεροι γλυκοζινολίτες σχηματίζονται από μεθειονίνη, η οποία τροποποιείται με την προσθήκη 1-9 επιπρόσθετων μεθυλενομάδων στην πλευρική ανθρακική αλυσίδα. Πολλές βιομηχανικές μελέτες έχουν δείξει ότι η αλυσίδα της μεθειονίνης επιμηκύνεται σε μια διαδικασία παρόμοια με τη σύνθεση λευκίνης από βαλίνη. Η διαδικασία ξεκινά με αποαμίνωση του αμινοξέος από την τρανσαμινάση αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας (BCAT), η οποία δημιουργεί ένα 2-οξο οξύ. Ακολούθως, το 2-οξο οξύ εισέρχεται σε έναν κύκλο τριών διαδοχικών μετασχηματισμών, όπου περιλαμβάνεται η συμπύκνωση με ακετυλο-CoA από την μεθυλοθειοαλκυλομηλική συνθάση (MAM), ακολουθεί ο ισομερισμός από την ισοπροπυλματική ισομεράση (IPMI) και τέλος η οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση από την ισοπροπυλματική αφυδρογονάση (IPM-DH). Το προϊόν των τριών αυτών διαδοχικών μετασχηματισμών που αναφέρθηκαν παραπάνω είναι ένα 2-οξο οξύ που έχει επιμηκυνθεί από μία μόνο ομάδα μεθυλενίου (CH₂). Έτσι, το μόριο αυτό μπορεί είτε να δώσει ομομεθειονίνη (homoMet) μέσω της τρανσαμινάσης αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας (BCAT) και να εισέλθει στον πυρήνα της οδού της δομής του γλυκοζινολικού άλατος ή να προχωρήσει σε έναν άλλο κύκλο επιμήκυνσης της αλυσίδας. Έτσι, η συνολική διαδικασία αποδίδει όχι μόνο ομομεθειονίνη (homoMet), αλλά για μια σειρά παραγώγων επιμήκυνσης της αλυσίδας της μεθειονίνης (Σχήμα 2) (Sønderby, Geu-Flores & Halkier, 2010).

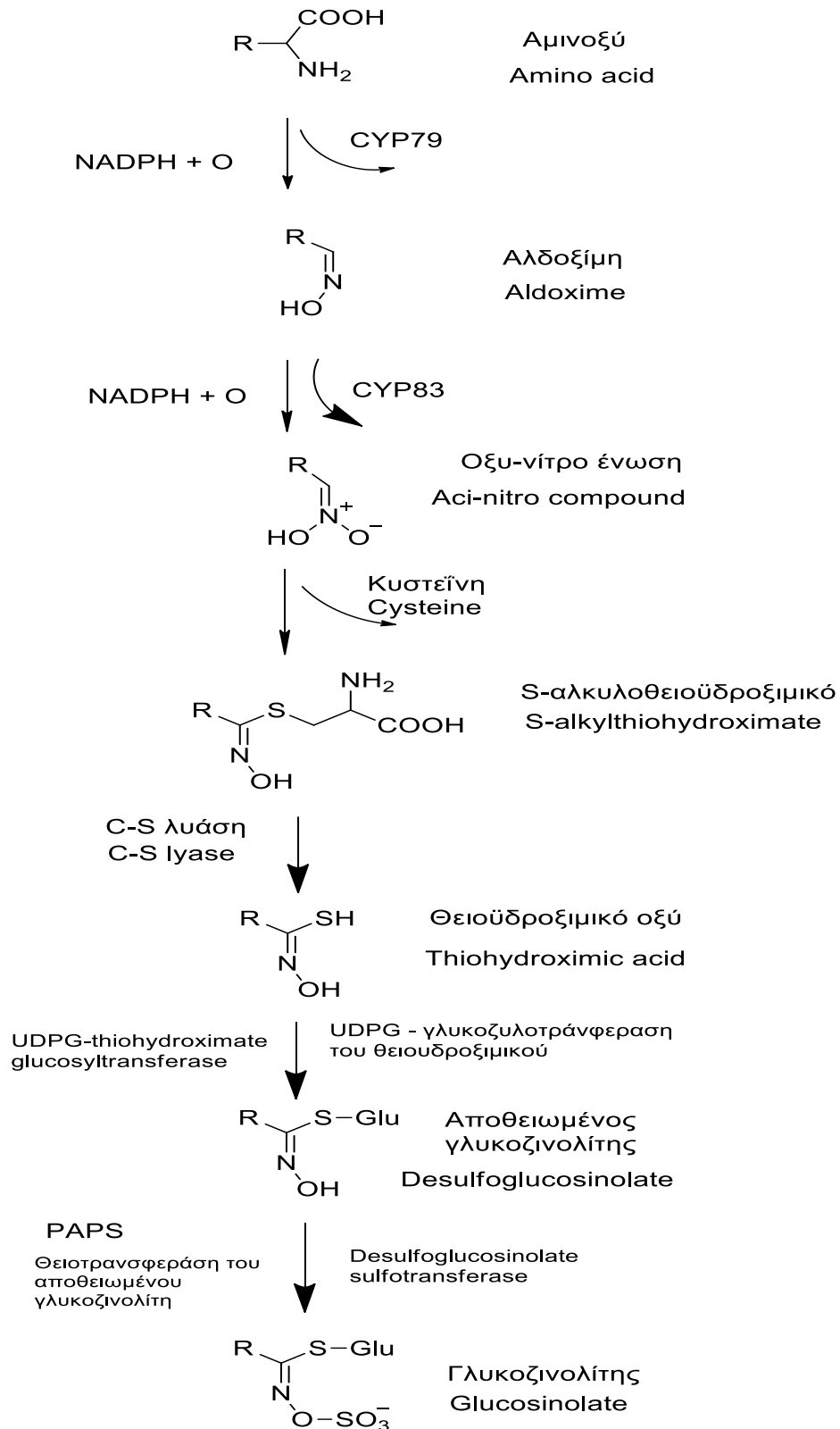


Σχήμα 2 Επιμήκυνση ανθρακικής αλυσίδας μεθειονίνης για την βιοσύνθεση γλυκοζινολιτών. Πηγή (Redovniković, Glivetić, Delonga & Furač, 2008 ; Ρεβέλου, 2018)

2.Σύνθεση βασικού πυρήνα του γλυκοζινολίτη από το αμινοξύ

Το πρώτο βήμα για τη σύνθεση του βασικού πυρήνα του γλυκοζινολίτη είναι η μετατροπή του αμινοξέος σε οξίμη, η οποία πραγματοποιείται με τη βοήθεια ενζύμων του κυτοχρώματος P450 της οικογένειας *CYP79*. Στην συνέχεια, ακολουθεί η οξείδωση της οξίμης προς μια ασταθή οξύ-νίτρο ένωση με την βοήθεια ενζύμων του κυτοχρώματος P450 της οικογένειας *CYP83* αυτή τη φορά. Η ασταθής αυτή ένωση, συζευγνύεται μετέπειτα με κυστεΐνη (δότης θειόλης) και προκύπτει S-αλκυλοθειοϋδροξιμικό (S-alkylthiohydroximate) που διασπάται με CS-λύση και προκύπτει θειοϋδροξιμικό οξύ (thiohydroximic acid). Το θειοϋδροξιμικό οξύ μετατρέπεται σε αποθειωμένο γλυκοζινολίτη μέσω του ενζύμου γλυκοζυλοτρανσφεράση θειοϋδροξιμικού διφωσφορικού ουριδίνης (UDPG: uridine diphosphate thiohydroximate glucosyltransferase). Έτσι, ο αποθειωμένος γλυκοζινολίτης θειίζεται με διαλυτή 3'-φωσφοαδενοσίνη 5'-φωσφοθειικού θειοτρανσφεράση του αποθειωμένου γλυκοζινολίτη (3'-phosphoadenosine 5'-

phosphosulfate: desulfoglucosinolate sulfotransferase) και παίρνει την τελική μορφή ο γλυκοζινολίτης (Σχήμα 3) (Mithen et al., 2000).

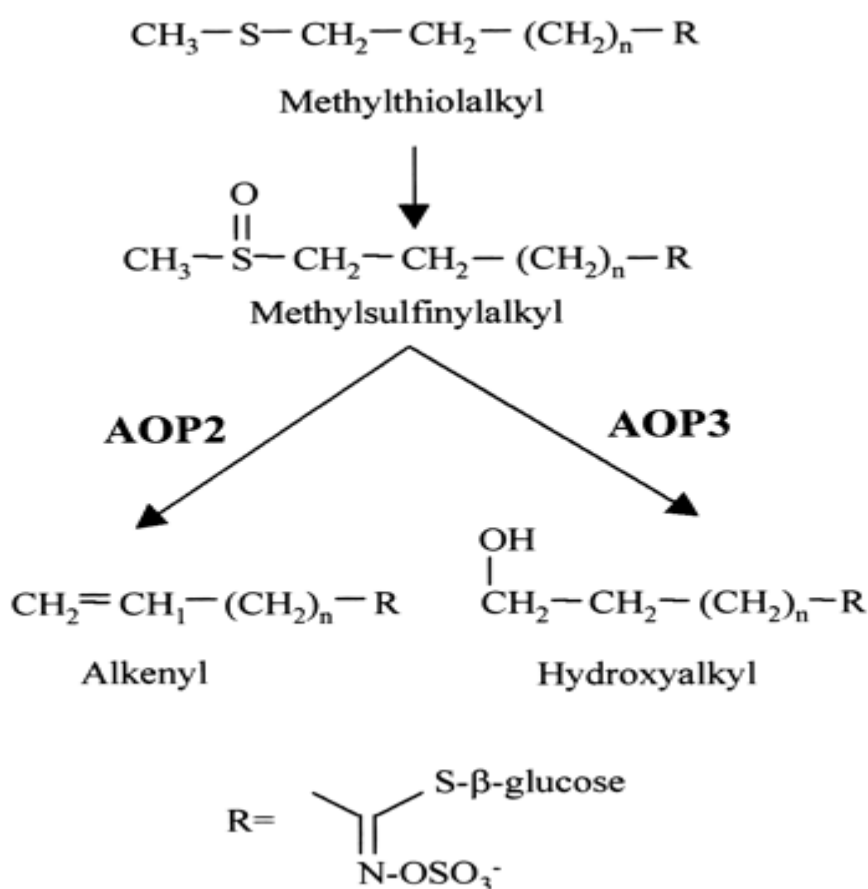


Σχήμα 3 Μετατροπή του τμήματος του αμινοξέος στο βασικό πυρήνα του γλυκοζινολίτη.

Πηγή (Mithen et al., 2000)

3. Δευτερεύουσες τροποποιήσεις της πλευρικής αλυσίδας

Είναι γνωστό πως η βιολογική δραστηριότητα των γλυκοζινολιτών καθορίζεται σε σημαντικό βαθμό από τη δομή της πλευρικής αλυσίδας, η οποία υφίσταται τις δευτερεύουσες τροποποιήσεις. Για αλειφατικούς γλυκοζινολίτες, οι δευτερεύουσες τροποποιήσεις της πλευρικής αλυσίδας συνήθως μπορεί να περιλαμβάνουν οξυγόνωση, υδροξυλίωση, αλκενυλίωση και βενζοϋλίωση. Οι αλειφατικοί γλυκοζινολίτες με τη βοήθεια του ενζύμου μονοξυγενάση της φλαβίνης (Flavin monooxygenases) μετατρέπονται σε σουλφινυλο-γλυκοζινολίτες (sulfinyl glucosinolates) με S-οξυγόνωση (S-oxygenation). Πιο αναλυτικά οι σουλφινυλο-γλυκοζινολίτες (sulfinyl glucosinolates) είτε μετατρέπονται από τις AOP2 διοξυγενάσες (AOP2 dioxygenases) και τις AOP3 διοξυγενάσες (AOP3 dioxygenases) σε αλκενυλο-γλυκοζινολίτες (alkenyl glucosinolates) και σε υδροξυαλκυλο-γλυκοζινολίτες (hydroxyalkyl glucosinolates) αντίστοιχα (Σχήμα 4).



Σχήμα 4 Τροποποιήσεις πλευρικής αλυσίδας σε αλειφατικούς γλυκοζινολίτες.

Πηγή (Kliebenstein, Lambrix, Reichelt, Gershenzon & Mitchell-Olds, 2001)

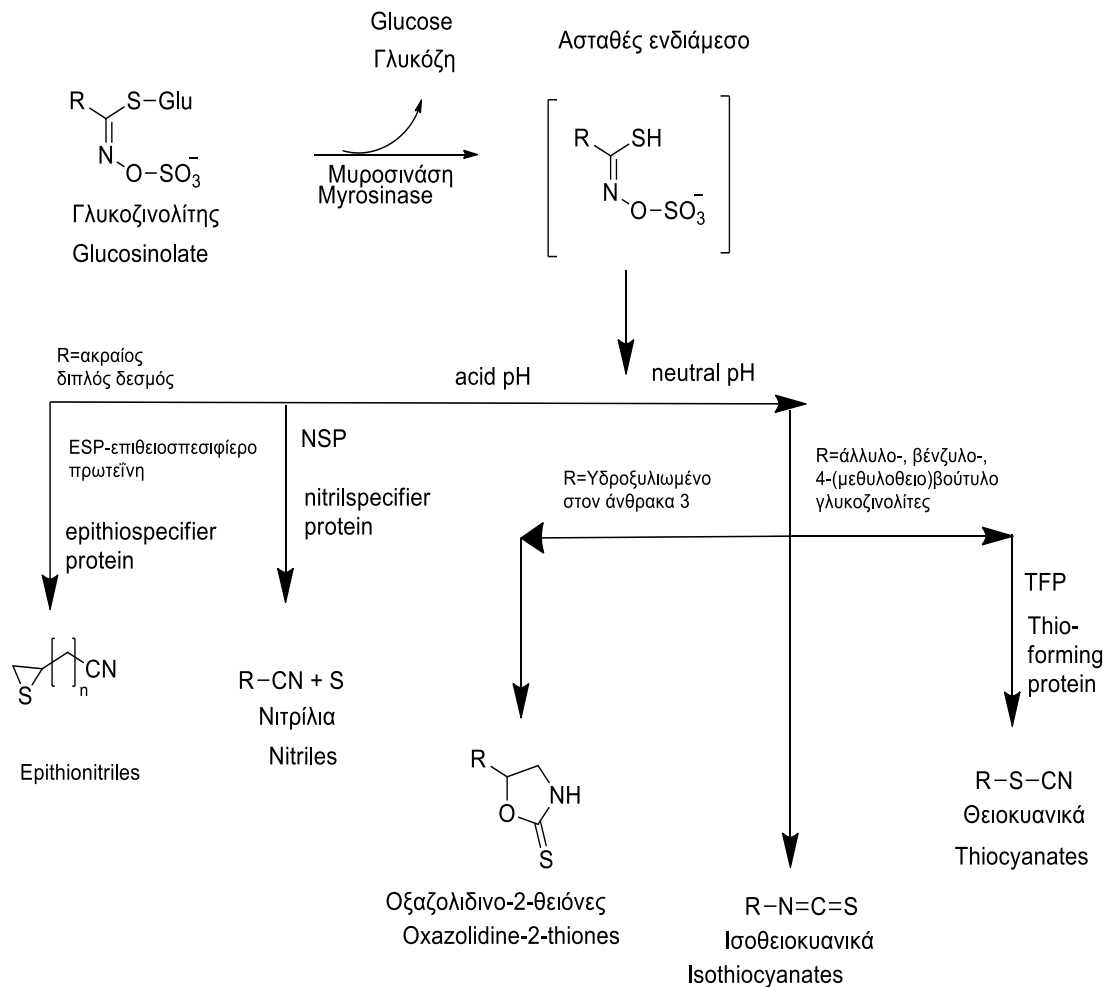
Οι πλευρικές αλυσίδες γλυκοζινολιτών που προέρχονται από αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας και φαινυλαλανίνη μπορούν να υδροξυλιωθούν, ενώ σε αυτές της τρυπτοφάνης συχνά προστίθενται μεθοξομάδες. Στους ινδολικούς γλυκοζινολίτες, οι υδροξυλιώσεις καταλύονται από τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450 της υποοικογένειας CYP81F και οι μεθυλιώσεις από μεθυλοτρανσφεράσες IGMT1 και IGMT2 στο *A. Thaliana* (Petersen, Wang, Crocoll & Halkier, 2018).

2.3 ENZYMIKH ΥΔΡΟΛΥΣΗ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ

Για την υδρόλυση των γλυκοζινολιτών το ένζυμο που είναι υπεύθυνο είναι η β-θειογλυκοσιδάση, ευρέως γνωστό ως μυροσινάση (EC 3.2.1.147). Στον φυτικό ιστό, η μυροσινάση και οι γλυκοζινολίτες βρίσκονται σε ξεχωριστά κυτταρικά διαμερίσματα, όμως ύστερα από την πρόκληση κάποιας διαταραχής στα κύτταρα, είτε εξαιτίας της προσβολής από παθογόνο μικροοργανισμό ή έντομα, είτε κατά τη μάσηση, τον τεμαχισμό ή το άλεσμα κατά τη προετοιμασία του φαγητού, η μυροσινάση έρχεται σε επαφή με τους γλυκοζινολίτες και καταλύει την υδρόλυση του θειογλυκοσιδικού δεσμού στη δομή του γλυκοζινολίτη. Έτσι, αποκόπτεται η γλυκόζη και απελευθερώνεται ένα ασταθές ενδιάμεσο (aglucon-thiohydroximate-O-sulfate). Στη συνέχεια, το ασταθές αυτό ενδιάμεσο μετατρέπεται σε διάφορα προϊόντα υδρόλυσης ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν, όπως το pH, η θερμοκρασία, η παρουσία ιόντων Fe^{2+} και επιπρόσθετων πρωτεϊνικών παραγόντων. Οι διαφορετικές κατηγορίες προϊόντων αποδόμησης περιλαμβάνουν ισοθειοκυανικά, θειοκυανικά, νιτρίλια, επιθειονιτρίλια, υδροξυνιτρίλια, οξαζολιδινο-2-θειόνες ή ινδόλια (Σχήμα 5) (Parchem, Piekarska & Bartoszek, 2020).

Πιο αναλυτικά το ασταθές ενδιάμεσο τις περισσότερες φορές σε ουδέτερο pH υποβάλλεται σε αναδιάταξη για την παραγωγή ισοθειοκυανικών ενώσεων, οι οποίες αποτελούν και την πιο κοινή κατηγορία προϊόντων υδρόλυσης των γλυκοζινολιτών (Agerbirk & Olsen, 2015). Οι θειοκυανικές ενώσεις σχηματίζονται αποκλειστικά από βένζυλο-, άλυλο- και 4-μεθυλοσουλφινυλοβούτυλο γλυκοζινολίτες. Σε αυτή την περίπτωση που το ασταθές ενδιάμεσο προκύπτει από τα παραπάνω είδη γλυκοζινολιτών, μετατρέπεται σε θειοκυανική ένωση με την παρουσία πρωτεϊνικών παραγόντων και συγκεκριμένα της πρωτεΐνης που σχηματίζει θείο (TFP : thio-forming protein) (Higdon, Delage, Williams & Dashwood, 2007). Το ασταθές ενδιάμεσο από γλυκοζινολίτες που περιέχουν β-υδροξυλιωμένες πλευρικές αλυσίδες, κυκλώνεται

αυθόρμητα ώστε τελικά να σχηματιστούν οι οξαζολιδινο-2-θειόνες (Σχήμα 5) (Agerbirk & Olsen, 2015).

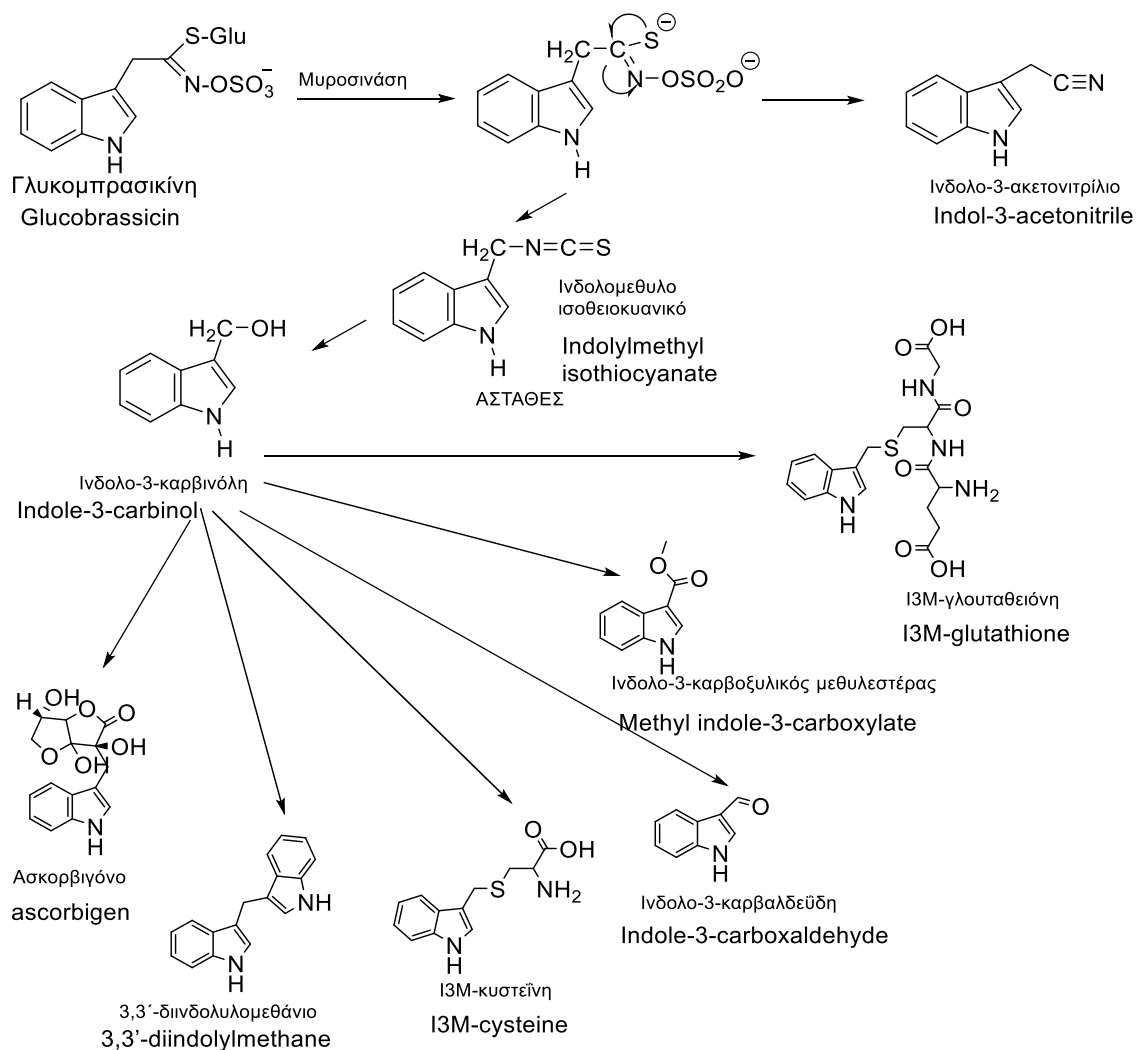


Σχήμα 5 Κύρια προϊόντα ενζυμικής υδρόλυσης γλυκοζινολιτών. Πηγή (Esteve, 2020)

Τα προϊόντα υδρόλυσης των ινδολικών γλυκοζινολιτών σχηματίζουν ασταθή ισοθειοκυανικά σε ουδέτερο pH, τα οποία στην συνέχεια μετατρέπονται σε ινδολομεθανόλες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η υδρόλυση της γλυκομπρασικίνης, όπου τα ασταθή αρχικά προϊόντα μετατρέπονται γρήγορα προς το σχηματισμό ινδολο-3-καρβινόλης και σε περισσότερο όξινο pH ινδολο-3' ακετονιτρίλιο και στοιχειακό θείο. Η ινδολο-3-καρβινόλη είναι χημικά λιγότερο σταθερή από το ινδολο-3-ακετονιτρίλιο και σχηματίζει προϊόντα όπως το 3,3' δινδολυλομεθάνιο, την ινδολο-3-καρβαλδεΰδη και τον ινδολο-3-καρβοξυλικό μεθυλεστέρα. Επίσης μπορεί να αντιδράσει με άλλους μεταβολίτες του φυτού και να

παραχθούν προϊόντα όπως το ασκορβιγόνο, η I3M-κυστεΐνη και η I3M-γλουταθειόνη (Σχήμα 6) (Kim, Lee, Schroeder & Jander, 2008).

Σε χαμηλότερο pH (όξινο), το ασταθές ενδιάμεσο μπορεί να μετατραπεί απευθείας σε νιτρίλιο με την απώλεια θείου. Η μετατροπή αυτή ενισχύεται με την παρουσία ιόντων σιδήρου αλλά και από την παρουσία πρωτεϊνικών παραγόντων, όπως η πρωτεΐνη προσδιορισμού νιτρίλιου (NSP: nitril specifier protein.) Εάν έχουμε γλυκοζινολίτες με έναν ακραίο διπλό δεσμό στην πλευρική αλυσίδα, σε όξινο πάλι pH και παρουσία πρωτεϊνικών παραγόντων και συγκεκριμένα της επιθειοσπεσιφίερο πρωτεΐνης (erithiospecifier protein - ESP), υδρολύονται προς επιθειονιτρίλια (Σχήμα 5) (Mithen et al., 2000 ; Ouassouab, Mukhaimarc, AmranibJuergen, Kroymanna & Chauveaua, 2019).



Σχήμα 6 Ενζυμική υδρόλυση γλυκομπρασικίνης. Πηγή (Kim et al., 2006 ; Ρεβέλου, 2018)

2.4 ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΤΟΥΣ ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ ΣΤΑ ΣΤΑΥΡΑΝΘΗ ΛΑΧΑΝΙΚΑ

2.4.1 Περιεκτικότητα των γλυκοζινολιτών σε σταυρανθή λαχανικά

Τα σταυρανθή λαχανικά, που αναφέρονται στο πίνακα VII, αν και ανήκουν όλα στο γένος *Brassica*, το κάθε είδος (πχ. *B.oleracea* - *B.rapa* - *B.napus*) παρουσιάζει ένα προφίλ γλυκοζινολιτών που διαφέρει σημαντικά από είδος σε είδος. Ακόμα, σημαντικές διαφοροποιήσεις στη δομή και την ποσότητα των γλυκοζινολιτών συναντάμε και στις διάφορες ποικιλίες του κάθε είδους.

Όλα τα λαχανικά που ανήκουν στο είδος *B.oleracea* περιέχουν γλυκομπρασικίνη και γλυκοϊμπερίνη, ενώ τα περισσότερα περιέχουν και σημαντικές ποσότητες σινιγκρίνης. Για παράδειγμα η γλυκομπρασικίνη, η γλυκοϊμπερίνη και η σινιγκρίνη έχουν αναγνωριστεί ως η κύρια πηγή γλυκοζινολιτών στα λάχανα. Στο μπρόκολο, οι πιο κοινοί γλυκοζινολίτες είναι η γλυκοραφανίνη, η προγκοϊτρίνη, η γλυκοναπίνη και από τους ινδολικούς γλυκοζινολίτες συναντάτε η γλυκομπρασικίνη και η νεογλυκομπρασικίνη. Κυρίαρχος γλυκοζινολίτης είναι η γλυκοραφανίνη, η οποία καταλαμβάνει και το 50% των συνολικών γλυκοζινολιτών στο μπρόκολο. Στα λαχανάκια των Βρυξελλών, τις λαχανίδες και το κουνουπίδι, οι κυριότεροι γλυκοζινολίτες είναι η σινιγκρίνη, η προγκοϊτρίνη και η γλυκομπρασικίνη. Σε αντίθεση με τις διάφορες διακυμάνσεις στις ποσότητες και την δομή των γλυκοζινολιτών, σε κάθε ποικιλία εντός του είδους *B. Oleracea*, στο *B. rapa*. φαίνεται πως υπάρχει μια σχετικά μικρή διακύμανση στη δομή και τις ποσότητες των γλυκοζινολιτών. Στο κινέζικο λάχανο συναντώνται η γλυκοναστουρτίνη η γλυκομπρασικίνη, η 4-μεθοξυγλυκομπρασικίνη. Τέλος, στις ρίζες του γογγυλιού κυρίαρχοι γλυκοζινολίτες είναι η προγκοϊτρίνη και η γλυκοναστουρτίνη, ενώ στα βρώσιμα μέρη σε αφθονία βρίσκεται η γλυκοναπίνη και η γλυκομπρασικαπίνη. Παράδειγμα λαχανικού που ανήκει στο *Brassica napus* είναι το γούλι (*Swede*), στο οποίο συναντώνται σημαντικές ποσότητες από γλυκοναστουρτίνη, προγκοϊτρίνη γλυκομπρασικίνη, 4-μεθοξυγλυκομπρασικίνη και νεογλυκομπρασικίνη. Ενώ σημαντικό είναι να τονιστεί ότι στα παραπάνω λαχανικά μπορεί και να συναντώνται σε μικρότερες ποσότητες και άλλοι γλυκοζινολίτες (Cartea & Velasco, 2007).

Πίνακας VII Επίπεδα γλυκοζινολιτών λυοφιλιωμένων λαχανικών Brassica ($\mu\text{mol g}^{-1}$ ξηρού βάρους)

Με 1 = Γλυκοϊμπερίνη, 2 = Προγοϊτρίνη, 3 = Σινιγκρίνη, 4 = Γλυκοαλυσίνη, 5 = Γλυκοραφανίνη, 6 = Γλυκοναπίνη, 7 = Γλυκοναστουρτίνη, 8 = Γλυκοερουκίνη, 9 = Άλλοι γλυκοζινολίτες, 10 = 4-Υδροξυγλυκομπρασικίνη, 11 = Γλυκομπρασικίνη, 12 = 4-Μεθοξυγλυκομπρασικίνη, 13 = Νεογλυκομπρασικίνη.

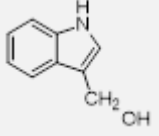
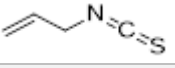
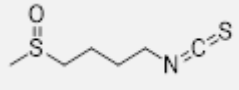
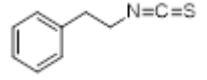
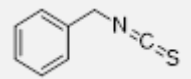
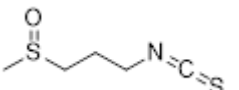

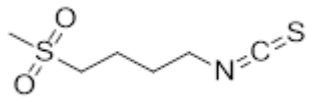
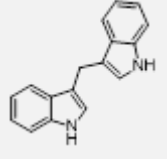
Λαχανικό	Αλειφατικοί / αρωματικοί γλυκοζινολίτες										Ινδολικοί γλυκοζινολίτες					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Σύνολο 1-9	10	11	12	13	Σύνολο 10-13	Σύνολο 1-13
A. Brassica oleracea																
Κουνουπίδι	0,2	-	0,2	-	0,3	-	-	-	-	0,7	0,1	0,7	0,2	0,1	1,1	1,8
Λαχανάκια Βρυξελλών	3,1	7,6	8,2	2,1	0,3	7,0	0,3	-	-	28,3	1,2	4,5	0,9	-	6,6	34,9
Λάχανο Savoy	4,3	0,3	4,3	0,4	0,3	0,4	-	-	-	10,0	0,4	2,4	1,8	0,1	4,7	14,7
Μπρόκολο	0,5	6,2	-	5,9	0,3	0,6	-	-	-	13,5	-	2,1	0,2	0,9	3,2	16,7
Κόκκινο λάχανο	1,6	1,2	2,7	0,3	0,1	0,4	-	-	-	6,2	0,1	3,8	0,3	-	4,2	10,4
Πράσινο λάχανο	7,3	0,2	10,2	-	0,2	-	-	-	-	17,9	-	6,8	1,3	-	8,1	26,0
Λάχανο Oxheart	0,7	0,3	0,1	0,9	0,3	-	-	-	-	2,3	0,1	1,1	0,1	-	1,3	3,6
Λευκό λάχανο	6,8	0,2	4,2	0,1	0,2	-	-	-	-	11,5	-	3,4	0,4	0,1	3,9	15,4
Γερμανική Γογγύλι /Kohlrabi	0,2	-	-	0,2	0,1	-	-	-	-	0,5	0,1	1,3	0,1	0,5	2,0	2,5
B. Brassica rapa																
Κινέζικο λάχανο	-	-	-	-	-	-	0,5	-	-	0,5	-	1,3	1,5	0,1	2,9	3,4
Γ. Brassica napus																
Γούλι/Swede	-	2,3	-	-	0,7	-	2,9	-	0,5	6,4	0,2	0,9	0,3	0,9	2,3	8,7

Πηγή (Mithen et al., 2000).

2.4.2 Περιεκτικότητα προϊόντων υδρόλυσης γλυκοζινολιτών σε σταυρανθή λαχανικά

Στον πίνακα VIII παρουσιάζονται τα προϊόντα ενζυμικής υδρόλυσης μερικών αρκετά μελετημένων γλυκοζινολιτών.

Πίνακας VIII Δομή βασικών προϊόντων υδρόλυσης γλυκοζινολιτών.

Γλυκοζινολίτης	Προϊόν υδρόλυσης γλυκοζινολίτη	Δομή προϊόντος υδρόλυσης
Γλυκομπρασικήνη	Ίνδολο-3-καρβινόλη (Indole-3-carbinol)	
Σινιγκρίνη	2-Προπένυλο ισοθειοκυανικό (2-Propenyl isothiocyanate)	
Γλυκοραφανίνη	Σουλφοραφάνη 4(Μεθυλοσουλφινυλο)βούτυλο ισοθειοκυανικό (4-(Methylsulfinyl)butyl isothiocyanate)	
Γλυκοναστουρτίνη	Φαιναίθυλο-ισοθειοκυανικό (Phenethyl isothiocyanate)	
Γλυκοτραπεολίνη	Βένζυλο-ισοθειοκυανικό (Benzyl isothiocyanate)	
Γλυκοϊμπερίνη	Ιμπερίνη 3(Μεθυλοσουλφινυλο)πρόπυλο ισοθειοκυανικό (3-(Methylsulfinyl)propyl isothiocyanate-iberin)	
Γλυκοερουκίνη	Ερουκίνη 4-(Μεθυλοθειο)βούτυλο ισοθειοκυανικό (4-(Methylthio)butyl isothiocyanate-erucin)	
Γλυκοερυσολίνη	Ερυσολίνη 4(Μεθανοσουλφονυλο)βούτυλο ισοθειοκυανικό (4-(Methanesulfonyl)butyl isothiocyanate-erysolin)	
Γλυκομπρασικήνη	3,3'-Δινδολυλομεθάνιο (3,3'-Diindolylmethane)	

Πηγή (Ρεβέλου, 2018)

Η περιεκτικότητα των προϊόντων υδρόλυσης των γλυκοζινολιτών στα σταυρανθή λαχανικά εμφανίζει διακυμάνσεις. Αυτό οφείλεται σε διάφορους παράγοντες, όπως η ποικιλία, η περίοδος συγκομιδής, ο τόπος ανάπτυξης, αφού η γονιμότητα του εδάφους, η παρουσία θρεπτικών συστατικών, όπως το αλάτι και η σακχαρόζη, αλλά και η παρουσία φυτοορμονών ή η προσβολή από παθογόνους μικροοργανισμούς επηρεάζουν την ποσότητα των προϊόντων υδρόλυσης των γλυκοζινολιτών στα λαχανικά. Ακόμα, περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, το φως, η σχετική υγρασία κ.α. επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την συσσώρευση των προϊόντων υδρόλυσης των γλυκοζινολιτών στα λαχανικά (Miao et al., 2017).

Σημαντικό είναι να τονιστεί ότι και οι συνθήκες εκχύλισης επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την περιεκτικότητα των προϊόντων ενζυμικής υδρόλυσης των γλυκοζινολιτών. Επομένως, η εκχύλιση θα πρέπει να γίνει κάτω από κατάλληλες συνθήκες, οι οποίες ευνοούν την παραγωγή ισοθειοκυανικών έναντι των αντίστοιχων νιτριλίων (Ρεβέλου, 2018).

Στον πίνακα IX παρουσιάζονται μερικά από τα πιο γνωστά προϊόντα υδρόλυσης των γλυκοζινολιτών, καθώς και οι κύριες πηγές των λαχανικών που τα συναντάμε.

Πίνακας IX Κύριες πηγές λαχανικών που περιέχουν προϊόντα ενζυμικής υδρόλυσης γλυκοζινολιτών

Προϊόν υδρόλυσης	Λαχανικά που συναντάται
Ίνδολο-2-καρβινόλη	Μπρόκολο
	Λάχανο
	Κουνουπίδι
Σουλφοραφάνη	Μπρόκολο
	Ρόκα
	Λαχανάκια Βρυξελλών
	Λάχανο
Φαιναίθυλο-ισοθειοκυανικό	Λάχανο
	Κινέζικο λάχανο
	Νεροκάρδαμο
	Ρεπάνι
Βένζυλο-ισοθειοκυανικό	Κάρδαμο
	Χρένο
	Λευκή μουστάρδα
2-προπένυλο ισοθειοκυανικό	Μπρόκολο
	Κουνουπίδι
	Λάχανο

Πηγή (Esteve, 2020 ; Higdon, Delage, Williams & Dashwood, 2007)

Στην βιβλιογραφία, λόγω των διάφορων και περίπλοκων παραγόντων που επηρεάζουν την ποσότητα των προϊόντων υδρόλυσης των γλυκοζινολιτών, που αναφέρθηκαν παραπάνω, είναι αναμενόμενο να εμφανίζονται και διακυμάνσεις στην περιεκτικότητα των προϊόντων αυτών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα, αποτελεί η σουλφοραφάνη στο μπρόκολο, η περιεκτικότητά της οποίας μελέτες δείχνουν ότι κυμαίνεται από 29,2 έως 88,3 $\mu\text{mol } 100 \text{ g}^{-1}$ φρέσκο βάρος (FW) και 0,8 έως 21,7 $\mu\text{mol } \text{g}^{-1}$ ξηρού βάρους (DW). Άλλες έρευνες, όμως, έχουν δείξει ότι η περιεκτικότητά της σουλφοραφάνης στο μπρόκολο κυμαίνεται από 0,04 έως 2,94 $\mu\text{mol } \text{g}^{-1}$ FW (Miao et al., 2017). Η σουλφοραφάνη περιέχεται σε μεγάλες ποσότητες στο μπρόκολο, όμως συναντάται σε μικρότερες ποσότητες και στα περισσότερα σταυρανθή λαχανικά, όπως το λάχανο, η ρόκα, τα λαχανάκια Βρυξελλών, το κουνουπίδι κ.α.

Η ινδολο-3-καρβινόλη, βρίσκεται κυρίως στο μπρόκολο, στα λαχανάκια βρυξελλών, στο κουνουπίδι και στη λαχανίδα. Το βένζυλο ισοθειοκυανικό κυρίως στο κάρδαμο, αλλά και στη λευκή μουστάρδα και το χρένο. Το 2-προπένυλο ισοθειοκυανικό υπάρχει στη μουστάρδα, στο λάχανο και στα λαχανάκια Βρυξελλών, ενώ η ιμπερίνη έχει προσδιοριστεί στο μπρόκολο, στο λάχανο, στα λαχανάκια βρυξελλών και στη ρόκα. Το φαιναίθυλο ισοθειοκυανικό βρίσκεται κυρίως στο νεροκάρδαμο, ενώ υπάρχει σε μικρότερες ποσότητες στο ρεπάνι και το κινέζικο λάχανο (Higdon et al., 2007).

2.5 ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ ΤΟΥΣ

Οι γλυκοζινολίτες και τα προϊόντα της ενζυμικής τους υδρόλυσης, εκτός από το ότι είναι υπεύθυνοι για τη χαρακτηριστική πικάντικη γεύση που προσφέρουν στα λαχανικά που βρίσκονται, έρευνες έχουν δείξει πως παρουσιάζουν αντιμυκητιασικές και αντιβακτηριακές δραστηριότητες. Τα προϊόντα αποδόμησης των γλυκοζινολιτών εμφανίζουν βιοκτόνο δράση έναντι διαφόρων παθογόνων μικροοργανισμών όπως μύκητες, βακτήρια, διάφορα άλλα έντομα και παράσιτα (Vig, Rampal, Singh, & Arora, 2009).

2.5.1 Αντιμυκητιασική δράση προϊόντων ενζυμικής υδρόλυσης γλυκοζινολιτών

Στον πίνακα X παρουσιάζεται η μυκητοκτόνος δράση κάποιων προϊόντων υδρόλυσης γλυκοζινολιτών έναντι φυτοπαθογόνων μυκήτων.

Πίνακας X Προϊόντα ενζυμικής υδρόλυσης γλυκοζινολιτών με αντιμυκητιστακή δράση.

Προϊόντα ενζυμικής υδρόλυσης γλυκοζινολιτών	Μύκητες	
Άλλο-ισοθειοκυανικό	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Helminthosporium solani</i>
	<i>Aspergillus alliaceas</i>	<i>Verticillium dahliae</i>
	<i>Colletotrichum circinans</i>	<i>Sclerotium cepivorum</i>
	<i>Giberella sanbinetti</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> var. <i>radicis</i>
	<i>Paronospora parasitica</i>	<i>Phytophthora capsici</i>
	<i>Fusarium sambucinum</i>	<i>Pythium aphanidermatum</i>
	<i>Paronospora parasitica</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>
	<i>Sclerotium cepivorum</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	<i>Sclerotium rolfsii</i>
	<i>Fusarium graminearum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>
Άλκενυλο-αλειφατικά ισοθειοκυανικά (μεθυλ-, προπενυλ-, βουτενυλ-, πεντενυλ-, προπενυλ-, αιθυλ-ισοθειοκυανικά)	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>
	<i>Fusarium graminearum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
	<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>Triticis</i>	
Βένζυλο-ισοθειοκυανικό	<i>Alternaria tenuis</i>	<i>Monilinia laxa</i>
	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Piriformis monogen</i>
	<i>Cladosporium herbarum</i>	<i>Alternaria alternata</i>
	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Fusarium oxysporum</i> var. <i>radicis</i>
	<i>Rhizopus oryzae</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
Βουτενυλο-ισοθειοκυανικά	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Phytophthora capsici</i>
	<i>Aspergillus alliaceas</i>	<i>Pythium aphanidermatum</i>
	<i>Colletotrichum circinans</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>
	<i>Giberella sanbinetti</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
Ερουκίνη	<i>Pythium irregulare</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>
Ιμπερίνη	<i>Fusarium culmorum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>
	<i>Pythium irregulare</i>	
Σουλφοραφάνη	<i>Piriformis</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
	<i>Monilinia laxa</i>	
Ινδολο-3-ακετονιτρίλιο	<i>Penicillium chrysogenum</i>	
Προπενυλο-ισοθειοκυανικό	<i>Colletotrichum circinans</i>	<i>Ehaniches Aphanomyces</i>
	<i>Aspergillus alliaceas</i>	<i>Leptosphaeria maculans</i>
	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Cladosporium cucumerinum</i>
	<i>Giberella sanbinetti</i>	<i>Glomus etunicatum</i>
Φαιναίθυλο-ισοθειοκυανικό	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
	<i>Gaeumannomyces graminis</i>	
2-Προπένυλο ισοθειοκυανικό	<i>Sclerotinia minor</i>	

Πηγή (Vig et al., 2009)

Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι τα διάφορα προϊόντα υδρόλυσης των γλυκοζινολιτών ανταποκρίνονται και διαφορετικά στον μικροβιακό πληθυσμό. Τα

ισοθειοκυανικά είναι οι κύριοι αναστολείς της μικροβιακής δραστηριότητας. Τα βιομυκητοκτόνα δρουν είτε ενεργοποιώντας τον αμυντικό μηχανισμό του φυτού παράγοντας ένα φράγμα γύρω από τις ρίζες του φυτού, εμποδίζοντας έτσι επιβλαβείς μύκητες να εισέλθουν στον ξενιστή και τελικά προστατεύοντάς το από βλαβερές επιδράσεις των μυκήτων, είτε παράγοντας τοξίνες που σκοτώνουν τον οργανισμό-στόχο.

Μερικά χαρακτηριστικά παραδείγματα προϊόντων ενζυμικής υδρόλυσης γλυκοζινολιτών είναι η ερουκίνη (προϊόν υδρόλυσης της γλυκοερουκίνης), η οποία παρουσιάζει αντιμυκητιασική δράση έναντι δύο πολύ σημαντικών φυτοπαθογόνων, του *Pythium irregulare* και του *Rhizoctonia solani*. Το φαιναίθυλο ισοθειοκυανικό (προϊόν υδρόλυσης της γλυκοναστουρτίνης) που έχει ανασταλτική δράση ενάντια στους φυτοποθαγόνους μύκητες *Gaeumannomyces graminis* και *Fusarium oxysporum*. Το βένζυλο ισοθειοκυανικό, το οποίο προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης μυκήτων, όπως οι *Alternaria tenuis*, *Aspergillus oryzae*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium spp.* και *Rhizopus oryzae*, καθώς και πολλά άλλα προϊόντα ενζυμικής υδρόλυσης που παρουσιάζονται στον Πίνακα X (Vig et al., 2009).

2.5.2 Βακτηριοκτόνος δράση προϊόντων ενζυμικής υδρόλυσης γλυκοζινολιτών

Σχετικά με την αντιμικροβιακή δραστηριότητα των γλυκοζινολιτών υπάρχει πληθώρα βιβλιογραφίας. Ο μηχανισμός της αντιμικροβιακής δράσης των προϊόντων της ενζυμικής υδρόλυσης των γλυκοζινολιτών στηρίζεται στην ικανότητά τους να δρουν απενεργοποιώντας διάφορα ενδοκυτταρικά ένζυμα του παθογόνου, συνήθως με οξειδωτική διάσπαση γεφυρών που υπάρχουν στα ένζυμα (Vig et al., 2009).

Ο πίνακας XI παρουσιάζει τη βακτηριοκτόνο δράση ορισμένων προϊόντων ενζυμικής υδρόλυσης των γλυκοζινολιτών. Για παράδειγμα, η σουλφοραφάνη παρεμποδίζει την ανάπτυξη και μπορεί να καταπολεμήσει πολλά στελέχη του ελικοβακτηριδίου (*Helicobacter pylori*), ακόμα και αυτά που εμφανίζουν αντίσταση στα αντιβιοτικά, αλλά και να αναστείλει την ανάπτυξη διαφόρων στελεχών παθογόνων μικροοργανισμών όπως *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* και *Enterococcus faecalis* σε ελάχιστη συγκέντρωση αναστολής. Το 2-προπένυλο ισοθειοκυανικό παρουσιάζει ανασταλτική δράση σε πολλά στελέχη παθογόνων μικροοργανισμών, όπως *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*,

Escherichia coli, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* και *Vibrio parahaemolyticus*. Το φαιναίθυλο-ισοθειοκυανικό παρουσιάζει αντιμικροβιακή δράση έναντι των *Nitrifying bacteria* και *Propionic bacteria*.

Πίνακας XI Βακτηριοκτόνος δράση προϊόντων ενζυμικής υδρόλυσης γλυκοζινολιτών

Προϊόντα ενζυμικής υδρόλυσης γλυκοζινολιτών	Βακτήρια
Άλλο-ισοθειοκυανικά	<i>Bacillus cereus</i>
	<i>Bacillus subtilis</i>
	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Salmonella enteritidis</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i>
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
	<i>Pseudomonas corrugate</i>
	<i>Listeria monocytogenes</i>
4-υδροξυβενζυλο-ισοθειοκυανικό	<i>Gluconobacter spp.</i>
Μέθυλο-ισοθειοκυανικά	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Listeria monocytogenes</i>
Σουλφοραφάνη 4-(Μεθανοσουλφονυλο)βούτυλο ισοθειοκυανικό	<i>Helicobacter pylori</i>
	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	<i>Salmonella typhimurium</i>
	<i>Enterococcus faecalis</i>
	<i>Bacillus cereus</i>
Φαιναίθυλο-ισοθειοκυανικό	<i>Nitrifying bacteria</i>
Οξαζολιδινο-2-θειόνες	<i>Propionic bacteria</i>
	<i>Phoma lingam</i>

Πηγή (Vig et al., 2009)

2.5.3 Εντομοκτόνος δράση των προϊόντων ενζυμικής υδρόλυσης των γλυκοζινολιτών

Τα προϊόντα υδρόλυσης των γλυκοζινολιτών είναι βιοδραστικά και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φυσικά φυτοφάρμακα έναντι διαφόρων εντόμων. Ο μηχανισμός στηρίζεται είτε στην απενεργοποίηση της ομάδα θειόλης των βασικών ενζύμων του παρασίτου, είτε στην αλκυλίωση των πυρηνόφιλων ομάδων των βιοπολυμερών, όπως το DNA, είτε ως αποσυνδέτες που επηρεάζουν την αναπνοή του παρασίτου και τελικά οδηγούν στο θάνατό του. Όπως φαίνεται και από τον πίνακα XII έχει αποδειχθεί η εντομοκτόνος δράση αρκετών προϊόντων ενζυμικής υδρόλυσης γλυκοζινολιτών. Πολλά ισοθειοκυανικά και ειδικότερα αρωματικά φαίνεται να είναι τοξικά έναντι των

αυγών του σκαθαριού της μαύρης αμπέλου (*Otiorhynchus sulcatus*), το μεθυλο-ισοθειοκυανικό έναντι των προνυμφών των λευκοκροσσωτών σκαθαριών (*Naupactus leucoloma*). Τα θειοκυανικά, από την μεριά τους έχουν χρησιμοποιηθεί ως εντομοκτόνα για τον έλεγχο των κουρκουλιονοειδών σκαθαριών στα σιτηρά καθώς και για την ταχεία εξάλειψη των ιπτάμενων εντόμων, όπως οι μύγες. Τέλος, τα νιτρίλια έχουν επίσης εντομοκτόνο δράση, όπως το ίνδολο-3-ακετονιτρίλιο, το οποίο αναστέλλει την ανάπτυξη διαφόρων εντόμων (Vig et al., 2009).

Πίνακας XII Εντομοκτόνος δράση κάποιων προϊόντων ενζυμικής υδρόλυσης γλυκοζινολιτών.

Προϊόντα ενζυμικής υδρόλυσης γλυκοζινολιτών	Έντομα
Άλυλο-ισοθειοκυανικό	<i>Cyclocephala spp.</i>
	<i>Musca domestica</i>
	<i>Rhyzopertha dominica</i>
Άλυλο-ισοκυανικό	<i>Musca domestica</i>
	<i>Rhyzopertha dominica</i>
Άλυλο-θειοκυανικό	<i>Musca domestica</i>
	<i>Rhyzopertha dominica</i>
Βένζυλο ισοθειοκυανικό	<i>Otiorhynchus sulcatus</i>
Μέθυλο-ισοθειοκυανικό	<i>Limonium spp.</i>
	<i>Naupactus leucoloma</i>
Φαίνυλο-ισοθειοκυανικό	<i>Otiorhynchus sulcatus</i>
Φαιναίθυλο-ισοθειοκυανικό	<i>Drosophila melanogaster</i>
	<i>Musa domestica</i>
	<i>Otiorhynchus sulcatus</i>
Προπενυλο-ισοθειοκυανικό	<i>Diabrotica undecimpunctata</i>
	<i>Limonium californicus</i>
	<i>Limonium canus</i>
	<i>Limonium californicus</i>
Θειοκυανικό	<i>Limonium spp.</i>

Πηγή (Vig et al., 2009).

2.5.4 Αντικαρκινική δράση προϊόντων ενζυμικής υδρόλυσης γλυκοζινολιτών

Τα τελευταία χρόνια τα σταυρανθή λαχανικά έχουν μελετηθεί ευρέως για την πιθανή χρήση τους στη χημειοπροληπτική αντιμετώπιση του καρκίνου. Τα αποτελέσματα πολλών κλινικών μελετών και επιδημιολογικών ερευνών έδειξαν με συνέπεια ότι τα λαχανικά της οικογένειας *Brassicaceae* επηρεάζουν την

καρκινογένεση κατά τη διάρκεια της φάσης έναρξης και προώθησης της ανάπτυξης του καρκίνου. Τα ισοθειοκυανικά και οι ινδόλες είναι δυο μεγάλες κατηγορίες ενζυμικής υδρόλυσης γλυκοζινολιτών, οι οποίες εμφανίζουν προστατευτικές ιδιότητες έναντι πολλών τύπων καρκίνου. In vitro και in vivo μελέτες δείχνουν πως οι παραπάνω ενώσεις επηρεάζουν πολλά στάδια ανάπτυξης του καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων αυτών της επαγωγής των ενζύμων αποτοξίνωσης (detoxification enzymes) (ένζυμα φάσης II) και της αναστολής των ενζύμων ενεργοποίησης (activation enzymes) (ένζυμα φάσης I).

Συγκεκριμένα τα ένζυμα της φάσης II, όπως οι γλουταθειόνες S-τρανσφεράσες (glutathione-S-transferase), η 5'-διφωσφο-γλυκουρονυλοτρανσφεράση της ουριδίνης (UDP-glucuronyl transferase), η αναγωγάση της αιμοπρωτεΐνης (NADPH reductase) και η αναγωγάση της κινόνης (NADPH) έχουν την ικανότητα να συζευχθούν με ενεργοποιημένες καρκινογόνες ουσίες και στην συνέχεια να τις μετατρέψουν σε ανενεργές υδατοδιαλυτές ενώσεις. Οι υδατοδιαλυτές αυτές ουσίες μπορούν να απεκκριθούν μέσω των ούρων οδηγώντας έτσι στην εξουδετέρωση καρκινογόνων ουσιών από κύτταρα τα θηλαστικών. Τα γονίδια για τα κυτταρικά ένζυμα της φάσης II περιέχουν μια συγκεκριμένη αλληλουχία DNA που ονομάζεται αντιοξειδωτικό στοιχείο απόκρισης (ARE: antioxidant responsive element). Έχει αποδειχθεί ότι τα προϊόντα ενζυμικής υδρόλυσης της γλυκοραφινίνης, της γλυκοϊμπερίνης και της γλυκοερουκίνης, τα οποία είναι η σουλφοραφάνη, η ιμπερίνη και η ερουκίνη, αντίστοιχα, αυξάνουν τη δραστηριότητα των ενζύμων της φάσης II μέσω της αύξησης της μεταγραφής γονιδίων που περιέχουν ARE. Η δράση αυτή ρυθμίζεται από τον μεταγραφικό παράγοντα, Nrf2 (nuclear factor erythroid 2) (Cartea & Velasco, 2007).

Όσον αφορά, τα ένζυμα της φάσης I (ένζυμα του κυτοχρώματος P450) φαίνεται γενικά πως αυξάνουν την αντιδραστικότητα λιποδιαλυτών ενώσεων με αποτέλεσμα να παράγονται μερικές ενώσεις, οι οποίες μπορεί να είναι πιο τοξικές από το μητρικό μόριο, όπως οι νιτροζαμίνες και οι αφλατοξίνες. Έχει αποδειχθεί λοιπόν ότι τα ένζυμα της φάσης I είναι υπεύθυνα για τη μεταβολική ενεργοποίηση in vivo και in vitro των περισσότερων καρκινογενέσεων σε ανθρώπους και ζώα, για αυτό και η αναστολή των ενζύμων της φάσης I είναι απαραίτητη για την προστασία των κυττάρων έναντι βλάβης του DNA από καρκινογόνα και αντιδραστικά είδη οξυγόνου (Vig et al., 2009).

Εκτός από την αναστολή των ενζύμων ενεργοποίησης (Φάσης I) και της επαγωγής των ενζύμων αποτοξίνωσης (ένζυμα φάσης II), κάποιος ακόμη χημειοπροληπτικοί μηχανισμοί έναντι καρκινικών κυττάρων φαίνεται να είναι η απόπτωση και η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Έρευνες έχουν δείξει πως τα προϊόντα διάσπασης των γλυκοζινολιτών έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων και της μετάστασης όγκων μέσα από το μπλοκάρισμα του κυττάρου κύκλου και της προώθησης της απόπτωσης, δηλαδή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου ενός ενεργού κυττάρου (Cartea & Velasco, 2007).

Στον πίνακα XIII γίνεται αναφορά στη δράση ορισμένων προϊόντων υδρόλυσης γλυκοζινολιτών έναντι διαφόρων τύπων καρκίνου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η σουλφοραφάνη, το προϊόν υδρόλυσης της γλυκοραφάνης. Η αντικαρκινική της δράση οφείλεται τόσο στην ικανότητά της να προκαλεί επαγωγή των ενζύμων της φάσης II, αναστολή των ενζύμων του κυτοχρώματος P450 (ένζυμα φάσης I), αλλά και γιατί βοηθά στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, όπου μετά συνήθως ακολουθεί και η απόπτωση (Cartea & Velasco, 2007). Πολλά πειράματα *in vitro* έχουν διερευνήσει τις θετικές επιδράσεις της σουλφοραφάνης στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου σε μια μεγάλη ποικιλία καρκινικών κυττάρων της ουροδόχου κύστης, του προστάτη, του πνεύμονα, του οστεοσαρκώματος, του αδενοκαρκινώματος και του παχέος εντέρου (Esteve, 2020). Αρκετές είναι και οι μελέτες που έχουν παρουσιάσει την ικανότητα της σουλφοραφάνης να προκαλεί απόπτωση σε μια σειρά κυτταρικών σειρών συμπεριλαμβανομένου του προστάτη, των λεμφοκυττάρων και του μαστού (Cartea & Velasco, 2007). Τέλος, η σουλφοραφάνη φαίνεται πως έχει και αντιβακτηριακές ιδιότητες έναντι του *Helicobacter pylori*, το οποίο προκαλεί καρκίνο του στομάχου (Fahey et al., 2002).

Η ινδολο-3-καρβινόλη, η οποία είναι το προϊόν ενζυμικής υδρόλυσης της γλυκομπρασικίνης παρουσιάζει σημαντική δράση κατά του καρκίνου του προστάτη, του μαστού, του τραχήλου της μήτρας (Higdon et al., 2007) κυρίως λόγω της ικανότητάς της να αυξάνει τη δραστηριότητα των ενζύμων της φάσης II και πιο συγκεκριμένα των γλουταθειονών S-τρανσφερασών (Cartea & Velasco, 2007). Τέλος, η ινδολο-3-καρβινόλη μπορεί να καταστείλει το μελάνωμα που δημιουργείται από την UVB ακτινοβολία (Kim et al., 2006).

Το **φαιναίθυλο ισοθειοκυανικό** είναι το προϊόν ενζυμικής υδρόλυσης της γλυκοναστουρτινης και φαίνεται πως αναστέλλει τα ένζυμα της Φάσης I που σχετίζονται με την ενεργοποίηση καρκινογόνων ουσιών (Cartea & Velasco, 2007), δημιουργώντας έτσι ενδείξεις για την ανασταλτική δράση έναντι του καρκίνου του πνεύμονα, του οισοφάγου, του παχέος εντέρου και της λευχαιμίας (Vig et al., 2009).

Όσον αφορά το **βένζυλο ισοθειοκυανικό**, το οποίο είναι προϊόν υδρόλυσης της γλυκοτροπαεολίνης, υπάρχουν ενδείξεις για την αντικαρκινική του δράση έναντι του καρκίνου του παγκρέατος (Srivastava & Singh, 2004) και του παχέος εντέρου (Bonnesen, Eggleston & Hayes, 2001).

Το **2-προπένυλο ισοθειοκυανικό**, το οποίο είναι προϊόν υδρόλυσης της σινιγκρίνης, η **ιμπερίνη**, η οποία είναι προϊόν υδρόλυσης της γλυκοϊμπερίνης αναγνωρίζονται επίσης ως κατασταλτικοί παράγοντες, προστατεύοντας τον άνθρωπο και τα ζωικά κύτταρα από την καρκινογένεση. Τα παραπάνω προϊόντα υδρόλυσης είτε μέσω αναστολής των ενζύμων της φάσης I είτε μέσω της επαγωγής των ενζύμων της φάσης II εμφανίζουν βιολογική δράση συγκρίσιμη με αυτή της σουλφοραφάνης (Cartea & Velasco, 2007). Φαίνεται πως υπάρχουν ενδείξεις για την αντικαρκινική δράση του 2-προπένυλο ισοθειοκυανικού έναντι της λευχαιμίας (Xu & Thornalley, 2000) και του καρκίνου του προστάτη (Srivastava et al., 2003) και της ιμπερίνης έναντι του νευροβλαστώματος (Jadhav, Ezhilarasan, Vaughn, Berhow & Mohanam, 2007).

Ακόμα, η **ερουκίνη**, το προϊόν υδρόλυσης της γλυκοερουκίνης φαίνεται να παρουσιάζει αντικαρκινική δράση έναντι της λευχαιμίας (Fimognari, Nüsse, Iori, Cantelli-Forti & Hrelia, 2004) και του καρκίνου του πνεύμονα (Azarenko, Jordan & Wilson, 2014), ενώ το **3,3'-διυδρολολομεθάνιο** έναντι του καρκίνου του μαστού (Chang et al., 2005), του τραχήλου της μήτρας (Chen, Qi, Auburn & Carter, 2001), του προστάτη (Nachshon-Kedmi, Yannai, Haj & Fares, 2003) και του ήπατος (Jiang et al., 2019).

Πίνακας XIII Αντικαρκινική δράση προϊόντων ενζυμικής υδρόλυσης γλυκοζινολιτών.

Προϊόντα ενζυμικής υδρόλυσης γλυκοζινολιτών	Αντιπολλαπλασιαστική δραστηριότητα	Πηγές
2-προπένυλο ισοθειοκυανικό	Λευχαιμίας	Xu & Thornalley, 2000
	Καρκίνου του προστάτη	Srivastava et al., 2003
Βένζυλο-ισοθειοκυανικό	Καρκίνου του παγκρέατος	Srivastava & Singh, 2004
	Καρκίνου του παχέος εντέρου	Bonnesen et al., 2001
Ινδολο-3-καρβινόλη	Καρκίνου του μαστού	Higdon et al., 2007
	Καρκίνου του προστάτη	
	Καρκίνου του τραχήλου της μήτρας	
	Μελανώματος	Kim et al., 2006
Ιμπερίνη	Νευροβλαστώματος	Jadhav et al., 2007
Ερουκίνη	Λευχαιμίας	Fimognari et al., 2004
	Καρκίνου του πνεύμονα	Azarenko et al., 2014
3,3'-Δινδολυλομεθάνιο	Καρκίνου του μαστού	Chang et al., 2005
	Καρκίνου του προστάτη	Nachshon-Kedmi et al., 2003
	Καρκίνου του τραχήλου της μήτρας	Chen et al., 2001
	Καρκίνου του ήπατος	Jiang et al., 2019
Σουλφοραφάνη	Καρκίνου του μαστού	Rosea, Huangb, Ongb & Whitmana, 2005
	Καρκίνου του παχέος εντέρου	Esteve, 2020
	Λευχαιμίας	Misiewicz, Skupinska & Kasprzycka-Guttman, 2003
	Καρκίνου του στομάχου	Fahey et al., 2002
	Καρκίνου του ήπατος	Kim et al., 2003
	Καρκίνου του προστάτη	Esteve, 2020
Φαιναίθυλο-ισοθειοκυανικό	Καρκίνου του προστάτη	Chiao et al., 2000
	Καρκίνου του παχέος εντέρου	Jeong, Kim, Hu & Kong, 2004
	Λευχαιμίας	Pullar et al., 2004
	Καρκινώματος της ουροδόχου κύστης	
Φαινυλοβένζυλο-ισοθειοκυανικό	Καρκίνου του τραχήλου της μήτρας	Yu, Mandlekar, Harvey, Ucker & Kong, 1998
Φαινυλομέθυλο-ισοθειοκυανικό	Καρκίνου του τραχήλου της μήτρας	

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΤΟΥΣ ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ

3.1 ΣΥΜΒΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ

Μέθοδοι εκχύλισης που έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανάκτηση βιοδραστικών ενώσεων από φυτικά τρόφιμα είναι η συμβατική εκχύλιση με την χρήση οργανικού διαλύτη, η διαβροχή (εμβάπτιση), η διήθηση, η εκχύλιση αντίθετου ρεύματος, η εκχύλιση υπό πίεση υγρού και η εκχύλιση με την μέθοδο Soxhlet (Deng et al., 2015).

Μια από τις πιο παλιά χρησιμοποιούμενες μεθόδους εκχύλισης γλυκοζινολιτών από φυτικό ιστό βασίζεται στη μέθοδο του Διεθνή Οργανισμού Τυποποίησης 1992, ISO 9167-1, η οποία είχε σχεδιαστεί αρχικά για την εκχύλιση γλυκοζινολιτών από σπόρους του *B. Napus* και στην συνέχεια προσαρμόστηκε ώστε τελικά να ανταποκρίνεται και στα προφίλ γλυκοζινολιτών από άλλα φυτικά είδη και τύπους ιστών (Doheny-Adams, Redeker, Kittipol, Bancroft & Hartley, 2017). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται ένα δείγμα φυτικού ιστού, το οποίο έχει κονιοποιηθεί μετά από ξήρανση με κατάψυξη (Ishida, Hara, Fukino, Kakizaki & Morimitsu, 2014). Αν και η ξήρανση με κατάψυξη δεν είναι απαραίτητο βήμα που περιγράφεται στη μέθοδο ISO 9167-1, είναι πολύ χρήσιμο να πραγματοποιηθεί, προκειμένου να αποφευχθεί η υδρόλυση των γλυκοζινολιτών από την μυροσινάση κατά τη διάρκεια διαταραχής των ιστών φύλλων, βλαστών ή ριζών. Όταν παρασκευαστεί ο φυτικός ιστός, η εκχύλιση πραγματοποιείται στους 75 °C σε 70% μεθανόλη για 10 λεπτά. Απαραίτητη προϋπόθεση για την αποφυγή της ενζυμικής υδρόλυσης των γλυκοζινολιτών είναι η θέρμανση του δείγματος προκειμένου να επιτευχθεί η αδρανοποίηση της μυροσινάσης (Doheny-Adams et al., 2017).

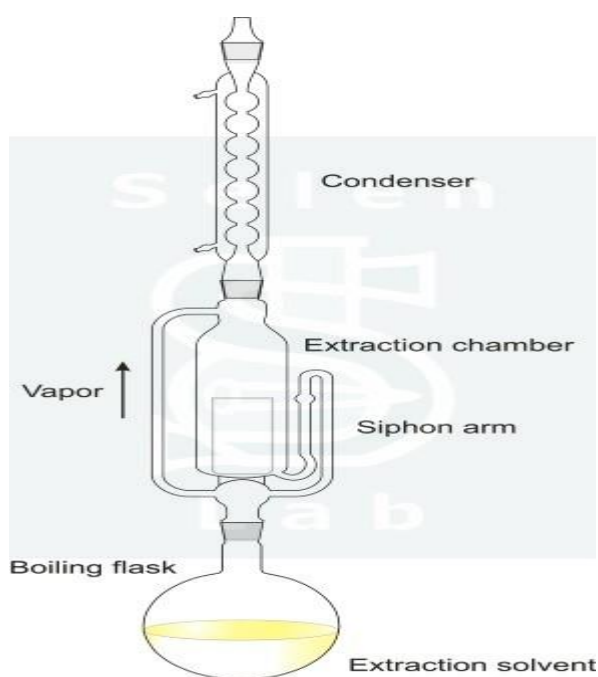
Οι κίνδυνοι που σχετίζονται με τη βρασμένη μεθανόλη οδήγησαν στην αντικατάσταση της θερμαινόμενης μεθανόλης με βραστό νερό (Deng et al., 2015). Η εκχύλιση που χρησιμοποιείται μόνο ένας διαλύτης, το αποσταγμένο νερό, είναι γνωστή ως υδροαπόσταξη (Agora, Bhushan & Agora, 2017). Αναλυτικότερα, η μέθοδος περιλαμβάνει μια φιάλη στρογγυλού πυθμένα, εξοπλισμένη με συσκευή Clevenger, όπου προστίθεται το θρυμματισμένο φυτικό υλικό και το απεσταγμένο νερό (Εικόνα 15). Το μείγμα θερμαίνεται χρησιμοποιώντας μανδύα θέρμανσης μέχρι να βράσει. Στην συνέχεια, η θερμοκρασία μειώνεται στους 60 °C για να συνεχιστεί η διαδικασία

βρασμού για 2-3 ώρες. Το εκχύλισμα συλλέγεται στον εξωτερικό σωλήνα και τα προϊόντα ενζυμικής υδρόλυσης λαμβάνονται χρησιμοποιώντας μεθυλενοχλωρίδιο ή διαιθυλαιθέρα ως διαλύτη (Aroga et al., 2017). Η μέθοδος της υδροαπόσταξης αναφέρεται ότι είναι συγκρίσιμη και σε ορισμένες περιπτώσεις αποτελεί καλύτερη και αποτελεσματικότερη μέθοδο εκχύλισης (Doheny-Adams et al., 2017).

Ακόμα, έχει αναφερθεί στην βιβλιογραφία η χρήση ψυχρής μεθανόλης για την εκχύλιση γλυκοζινολιτών λόγω της αυξημένης ασφάλειας που προσφέρει, του μειωμένου αριθμού βημάτων που απαιτεί, καθώς και της βελτιωμένης τελικής συγκέντρωσης των γλυκοζινολιτών. Ωστόσο, αν και η διαδικασία είναι απλούστερη, ενδέχεται σε αρκετές περιπτώσεις να μην παρέχει επαρκείς ποσότητες γλυκοζινολιτών λόγω της ελλιπούς απενεργοποίησης της μυροσινάσης, αφού έχουν παρατηρηθεί ασυνεπή αποτελέσματα όταν δεν υπήρχε θέρμανση (Almushayti, Brandt, Carroll & Scotter, 2021).

Μέθοδοι εκχύλισης εν ψυχρώ έχουν αναφερθεί επίσης και για την εκχύλιση προϊόντων υδρόλυσης γλυκοζινολιτών. Στη μέθοδο αυτή το φυτικό υλικό πλένεται για να απομακρυνθεί, αν υπάρχει, οποιοδήποτε σωματίδιο σκόνης, συνθλίβεται και προστίθεται αμέσως σε διαλύτη για να αποφευχθούν τυχόν απώλειες λόγω εξάτμισης. Ο διαλύτης που θα χρησιμοποιηθεί εξαρτάται από τα προϊόντα υδρόλυσης των γλυκοζινολιτών, αφού μπορούν να βρεθούν τόσο στην πολική όσο και στη μη πολική φάση των διαλυτών. Γενικά, το θρυμματισμένο φυτικό υλικό προστίθεται πρώτα σε εξάνιο για απολίπανση του υλικού, συνήθως επώαση 4-24 ωρών σε διαλύτη αρκούν για το σκοπό αυτό. Ωστόσο για την εξασφάλιση της σωστής διαδικασίας απολίπανσης, μετά την αρχική επώαση, ο διαλύτης αντικαθίσταται με φρέσκο εξάνιο και ο ίδιος διατηρείται για 24 ώρες. Μετά την επώαση, και οι δύο διαλύτες συνδυάζονται, διηθούνται μέσω φίλτρου 0,22 μm και εξατμίζονται στους 30 °C υπό κενό χρησιμοποιώντας περιστροφικό εξατμιστή. Ο απολιπανθείς διαλύτης συχνά περιέχει έναν αριθμό προϊόντων υδρόλυσης για αυτό και αποθηκεύεται για περαιτέρω ανάλυση. Μετά την αρχική απολίπανση, χρησιμοποιούνται άλλοι διαλύτες συνήθως, το μεθυλενοχλωρίδιο (DCM) για την εκχύλιση των προϊόντων υδρόλυσης των γλυκοζινολιτών. Τα συμπυκνωμένα εκχυλίσματα αποθηκεύονται σε φιαλίδιο στους -40 °C μέχρι περαιτέρω χρήση.

Πέρα από την εκχύλιση γλυκοζινολιτών με θερμαινόμενη μεθανόλη, ψυχρή μεθανόλη και θερμαινόμενο νερό, στην βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί και η εκχύλιση με θερμαινόμενο μείγμα αιθανόλης-νερού (95: 5 v/v) και θερμαινόμενο μείγμα μεθανόλης-νερού (70: 30 v/v), ώστε να αποφευχθεί η αποσύνθεση των γλυκοζινολιτών από την μυροσινάση. Ακόμα, η προσθήκη μυρμηκικού οξέος 0,1% σε νερό και μεθανόλη (20:80 v/v), έχει χρησιμοποιηθεί για την αύξηση της διαλυτότητας και της σταθερότητας των πολικών ενώσεων και τη βελτίωση της εκχύλισης. Επίσης έχουν δοκιμαστεί διάφορες τροποποιήσεις αυτών των μεθόδων εκχύλισης, συμπεριλαμβανομένων επαναλαμβανόμενων κύκλων αντί ενός κύκλου εκχύλισης με μεθανόλη, αλλά και συνδυασμός εκχύλισης με διαλύτη και εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE), προκειμένου να ληφθούν καθαρότερα και πιο συμπυκνωμένα δείγματα (Deng et al., 2015).



Εικόνα 15 Συσκευή εκχύλισης Soxhlet



Εικόνα 16 Συσκευή Clevenger που χρησιμοποιείται στη μέθοδο υδροπόσταξης

Πίνακας XIV Συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης γλυκοζινολιτών.

Υλικό	Χημική ένωση	Επεξεργασία δείγματος	Απόδοση παραγωγής	Βιβλιογραφικές αναφορές
Φύλλα μπρόκολου (6 διαφορετικές ποικιλίες)	Γλυκοραφανίνη	Εκχύλιση θερμοκρασίας δωματίου (0,1% μυρμηκικό οξύ σε 80% v/v μεθανόλη) ακολουθούμενη από SPE ανταλλαγής ιόντων	12,2–119,4 (mg/100g φρέσκα φύλλα)	Sasaki, Neyazaki, Shindo, Ogawa & Momose, 2012
	Νεογλυκομπρασικίνη		3,1–31,1 (mg/100g φρέσκα φύλλα)	
Φύλλα λάχανου (32 διαφορετικές ποικιλίες)	Γλυκοϊμπερίνη		10,0–116,0 (mg/100g φρέσκα φύλλα)	
	Γλυκοραφανίνη		0,6–153,9 (mg/100g φρέσκα φύλλα)	
Λαχανίδα (24 διαφορετικές ποικιλίες)	Γλυκομπρασικίνη		0,4–145,4 (mg/100g φρέσκα φύλλα)	
	Γλυκοϊμπερίνη		0–119,8 (mg/100g φρέσκα φύλλα)	
Σπόροι Canola (5 διαφορετικές ποικιλίες)	Προγοϊτρίνη	Εκχύλιση με μεμβράνη ανταλλαγής ανιόντων μετά από θέρμανση σε βραστό νερό για 5 λεπτά	2,06–10,16 (μmol / g σπόρου)	Szmigielska & Schoenau, 2000
	Ναπολοφερίνη		0,04–1,32 (μmol / g σπόρου)	
	Γλυκοναπίνη		1,15–7,23 (μmol / g σπόρος)	
	4-Υδροξυγλυκομπρασικίνη		3,95–5,20 (μmol / g σπόρου)	
	Γλυκομπρασικίνη		0,08–4,90 (μmol / g σπόρου)	
	Σύνολο		7,88–28,82 (μmol / g σπόρου)	
Μπρόκολο	Γλυκοραφανίνη	Επεξεργασία με μικροκύματα ακολουθούμενη από πολυφασική εκχύλιση (15 επαναλήψεις) πυριτίας με βάση το ιοντικό υγρό αμμωνίου ως προσροφητικό και νερό με 1% οξικό οξύ για την έκλουση.	0,038 (mg / g λυοφιλωμένο μπρόκολο)	Tian, Bi & Row, 2013

Πηγή (Deng et al., 2015)

Όσον αφορά τις μεθόδους εκχύλισης προϊόντων υδρόλυσης γλυκοζινολιτών, είναι διαθέσιμες περιορισμένες έρευνες σχετικά με την εξαγωγή άλλων τύπων ισοθειοκυανικών, διαφορετικών από το αλυλο-ισοθειοκυανικό και τη σουλφοραφάνη (Deng et al., 2015). Έχει αναφερθεί, όμως, πως τα προϊόντα ενζυμικής υδρόλυσης των γλυκοζινολιτών μπορούν να εξαχθούν με έμμεσο τρόπο με μια αρχική εξαγωγή ανέπαφων γλυκοζινολιτών. Συγκεκριμένα, η μέθοδος περιλαμβάνει την κονιοποίηση του φυτικού υλικού και την απενεργοποίηση του ενζύμου μυροσινάσης χρησιμοποιώντας υγρό άζωτο ή βραστό νερό. Οι άθικτοι γλυκοζινολίτες που λαμβάνονται έτσι εκχylίζονται χρησιμοποιώντας διάφορους διαλύτες, όπως μεθανόλη, οξικό αιθυλεστέρα και διχλωρομεθάνιο. Στη συνέχεια, αποθείονται σε στήλη DEAE sephadex χρησιμοποιώντας μια εξωτερική παροχή, είτε τεχνητού, είτε φυσικού ενζύμου μυροσινάσης. Το βασικότερο πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι οι συνθήκες της στήλης, όπως το pH (όξινο, βασικό ή ουδέτερο) και η θερμοκρασία (χαμηλή, θερμοκρασία δωματίου ή υψηλή), μπορούν να ρυθμιστούν ανάλογα με τον τύπο προϊόντων υδρόλυσης γλυκοζινολιτών που επιθυμούμε να λάβουμε (Aroga et al., 2017). Για τη σουλφοραφάνη, η οποία είναι προϊόν υδρόλυσης της γλυκοραφανίνης, έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία μερικές μέθοδοι εκχύλισης. Η βελτιστοποίηση της εκχύλισης της γλυκοραφανίνης αποτελεί απαραίτητο βήμα για να εκχυλιστεί η σουλφοραφάνη. Η υδρόλυση της γλυκοραφανίνης σε σουλφοραφάνη και ο καθαρισμός της, περιλαμβάνει την εφαρμογή διαλυτών, όπως διχλωρομεθάνιο, αιθυλική αλκοόλη, μέθυλο τ-βουτυλαιθέρα, νερό κ.α και εκχύλιση της στερεάς φάσης, για παράδειγμα με στήλη πυριτίας, όπως παρουσιάζεται και στον πίνακα XV (Deng et al., 2015).



Εικόνα 17 Έμμεση εκχύλιση προϊόντων ενζυμικής υδρόλυσης γλυκοζινολιτών με χρήση στήλης DEAE sephadex

Πίνακας XV Συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης προϊόντων υδρόλυσης γλυκοζινολιτών.

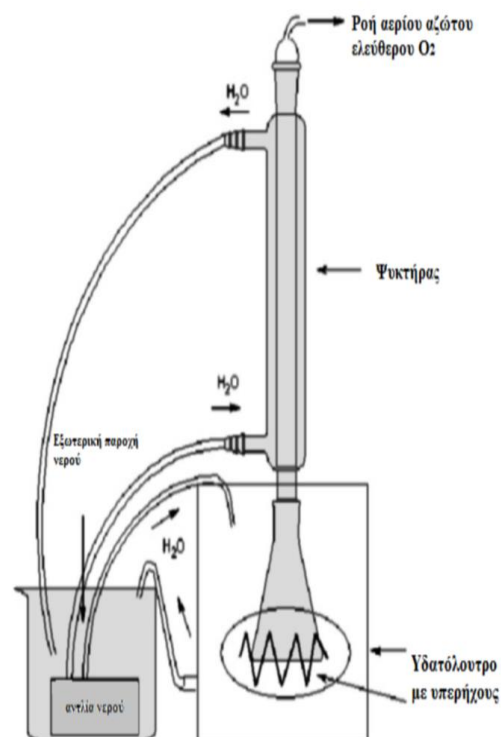
Υλικό	Χημική ένωση	Επεξεργασία δείγματος	Απόδοση παραγωγής	Βιβλιογραφικές αναφορές
Μουστάρδα	Άλυλο-ισοθειοκυανικό	Αλεσμένοι και απολιπανθέντες σπόροι εκχυλίστηκαν σε pH 4,5, 9% υδατικό διάλυμα αιθυλικής αλκοόλης στους 60 ° C για 120 λεπτά (Δείγμα/Διαλύτη = 1/55 w/v)	396,60 mg αλυλο-ισοθειοκυανικού /100 mL	Sharma, Ingle, Singh, Sarkar & Upadhyay, 2012
Άνθη μπρόκολου	Σουλφοραφάνη	Μετατροπή γλυκοραφάνης σε σουλφοραφάνη ακολουθούμενη από εκχύλιση με διαλύτη με μεθυλο τ -βουτυλαιθέρα και SPE με σωματίδια SI-1	556 (mg / kg ξηρού βάρους)	Ares, Nozal, Bernal & Bernal J.,2014
Μίσχοι μπρόκολου			446 (mg / kg ξηρού βάρους)	
Φύλλα μπρόκολου			30 (mg / kg ξηρού βάρους)	
Φρέσκο λάχανο	Σουλφοραφάνη	Συμβατική εκχύλιση (30 λεπτά) χρησιμοποιώντας διχλωρομεθάνιο ως διαλύτη	1,2 (mg/100g ξηρής μάζας)	Tanongkankit, Sablani, Chiewchan & Devahastin,2013
		Συμβατική εκχύλιση (30 λεπτά) χρησιμοποιώντας νερό ως διαλύτη	1,1 (mg/100g ξηρής μάζας)	
Μπρόκολο	Σουλφοραφάνη	Εκχύλιση SPE χρησιμοποιώντας φυσίγγιο πυριτίας, διχλωρομεθάνιο ως διαλύτη έκλουσης και οξικό αιθυλεστέρα ως διαλύτη πλύσης	0,36 (mg / g δείγμα)	Tian, Bi & Row,2013
Χρένο	Ισοθειοκυανικά	Υδροαπόσταξη χρησιμοποιώντας διχλωρομεθάνιο ως διαλύτη	8,03 (% του δείγματος σε σκόνη)	Wu, Zhang, Zeng & Lin, 2009
	Άλυλο-ισοθειοκυανικό		6,10 (% του δείγματος σε σκόνη)	
	Ισοθειοκυανικά	Εκχύλιση νερού για 24 ώρες στους 20-40 ° C, μερίδα σκόνης χρένου σε νερό: 1/12	4,52 (% του δείγματος σε σκόνη)	
	Άλυλο-ισοθειοκυανικό	3,39 (% του δείγματος σε σκόνη)		

Πηγή (Deng et al.,2015)

Η εκχύλιση με διαλύτη από ξηρό υλικό περιλαμβάνει δύο στάδια, αυτό της διαβροχής του φυτικού υλικού στον κατάλληλο διαλύτη, ώστε να διευκολυνθεί η διάγνωση του, και αυτό της ενυδάτωσης και της μεταφοράς των διαλυτών συστατικών από το φυτικό υλικό στον διαλύτη με οσμωτικές δυνάμεις και δυνάμεις διάχυσης. Αν και η διαδικασία εκχύλισης είναι απλή, εξαιτίας της απαίτησης μεγάλων ποσοτήτων από τους διαλύτες καθώς και των μεγάλων χρόνων εκχύλισης που απαιτούνται, η εφαρμογή των συμβατικών μεθόδων εκχύλισης με διαλύτες έχει αντικατασταθεί σε μεγάλο βαθμό από μη συμβατικές μεθόδους εκχύλισης, όπως η μέθοδος εκχύλισης με υπέρηχους, με μικροκύματα, με υψηλή υδροστατική πίεση αλλά και με την χρήση παλμικών ηλεκτρικών πεδίων. Οι μέθοδοι αυτές, λοιπόν, καταφέρνουν να μειώσουν τη θερμοκρασία και τον χρόνο εκχύλισης, συνεπώς και την κατανάλωση του διαλύτη, αλλά ταυτόχρονα επιτυγχάνουν και υψηλότερη απόδοση και βελτίωση της ποιότητας των εκχυλισμένων ενώσεων σε σύγκριση με τις συμβατικές μεθόδους.

3.2 ΜΗ ΣΥΜΒΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ

Η εκχύλιση με υπέρηχους (UAE: ultrasound-assisted extraction), που έχει εφαρμογή στη βιομηχανία επεξεργασίας τροφίμων, χρησιμοποιεί υπέρηχους ισχύος με συχνότητα που κυμαίνονται από 20 kHz έως 1 MHz. Η τεχνολογία των υπέρηχων ενισχύει την εξαγωγή ενώσεων από φυτικούς ιστούς λόγω των φαινομένων ακουστικής σπηλαίωσης (δημιουργία φυσαλίδων), που προκαλούνται από τη δημιουργία κυμάτων πίεσης των υπέρηχων στους διαλύτες εκχύλισης. Η σπηλαίωση είναι ένα φαινόμενο το οποίο ενθαρρύνει τη διάχυση της βιομάζας, τη διάσπαση των κυττάρων και τη διείσδυση του διαλύτη, με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται η διάρρηξη του κυτταρικού τοιχώματος και η διαλυτοποίηση των ανακτώμενων συστατικών από τον διαλύτη.



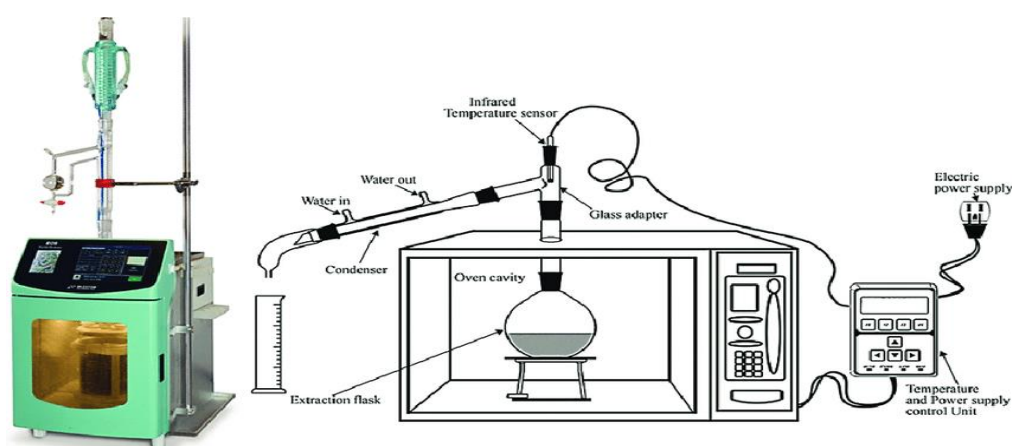
Εικόνα 18 Συσκευή εκχύλισης με υπέρηχους

Η τεχνολογία υπερήχων φαίνεται να είναι πιο ευνοϊκή τόσο σε σύγκριση με νέες τεχνικές εξαγωγής, όπως η εκχύλιση με μικροκύματα (MAE: microwave-assisted extraction), αλλά και με συμβατικές μεθόδους εκχύλισης, αφού απαιτεί χαμηλότερη θερμοκρασία εξαγωγής και έχει και φθηνότερο κόστος λειτουργίας. Βασικό μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι απαιτείται προσεκτικός σχεδιασμός της συσκευής υπερήχων για να αποφευχθούν τα «τυφλά σημεία», όπου τα κύματα υπερήχων δε μπορούν να φτάσουν. Αυτό συμβαίνει γιατί η κατανομή της ενέργειας των υπερήχων δεν είναι ομοιόμορφη και το ενεργό μέρος περιορίζεται σε μια περιοχή που βρίσκεται κοντά στον πομπό υπερήχων, για αυτό και υπάρχουν ορισμένες περιοχές εντός του δείγματος όπου τα κύματα υπερήχων δε μπορούν να φτάσουν. Είναι ένα πρόβλημα όμως που αποφεύγεται με την επιλογή σωστού μεγέθους υπερηχητικού καθετήρα (Deng et al., 2015).

Στον πίνακα XVI, όπου παρουσιάζονται μη-συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης γλυκοζινολιτών από διάφορες πηγές λαχανικών, παρατηρήθηκε αύξηση κατά 70,67% στην απόδοση της σινιγκρίνης από σπόρους ινδικής μουστάρδας, όταν εφαρμόστηκε εκχύλιση με υπερήχους (20 kHz και 400 W), σε σύγκριση με την συμβατική εκχύλιση που χρησιμοποιήθηκε διαλύτης νερό και αιθανόλη (Wang & Weller, 2006).

Έχει αξιολογηθεί και η επίδραση της εκχύλισης γλυκοζινολιτών και σουλφοραφάνης από φύλλα λάχανου υποβοηθούμενης από υπερήχους καθώς και ο συνδυασμός της εκχύλισης υποβοηθούμενης από υπερήχους με μικροκύματα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι απαιτήθηκαν 40 λεπτά επεξεργασίας με υπερήχους και χρήση αιθανόλης ως διαλύτη για την επίτευξη ίδιας ποσότητας γλυκοζινολιτών, έναντι της εκχύλισης με μικροκύματα, η οποία απαιτούσε 3 λεπτά μόνο. Ωστόσο, όταν οι 2 αυτές μέθοδοι συνδυάστηκαν, εκχυλίστηκαν μεγαλύτερες ποσότητες γλυκοζινολιτών από ό,τι εκχυλίστηκαν με την κάθε μέθοδο ξεχωριστά. Τέλος, έγινε και σύγκριση των μεθόδων αυτών με την συμβατική μέθοδο εκχύλισης Soxhlet, η οποία αν και είχε υψηλότερες αποδόσεις γλυκοζινολιτών, απαίτησε περισσότερο χρόνο εκχύλισης (180 λεπτά) και εμφάνισε και υψηλή ενεργειακή κατανάλωση (15 και 28 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με την εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους και μικροκύματα, αντίστοιχα) (Pongmalai, Devahastin, Chiewchan & Soponronnarit, 2013).

Η εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα (MAE: microwave-assisted extraction) βασίζεται στην ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία που μεταδίδεται με τη μορφή κυμάτων. Όταν τα μικροκύματα διέρχονται μέσω ενός υλικού, η ενέργειά τους απορροφάται από το υλικό και μετατρέπεται σε θερμική. Λόγω της θερμότητας που παράγεται από τα μικροκύματα η εσωτερική υγρασία των κυττάρων εξατμίζεται και αναπτύσσεται υψηλή πίεση στο κυτταρικό τοίχωμα που τελικά οδηγεί στη διάρρηξή του, συνεπώς και στην ευκολότερη διείσδυση του διαλύτη εκχύλισης, αυξάνοντας έτσι την ανάκτηση πολύτιμων συστατικών (Στρατή, 2014).



Εικόνα 19 Συσκευή εκχύλισης με μικροκύματα

Η χρήση της τεχνολογίας μικροκυμάτων στη διαδικασία εκχύλισης γλυκοζινολιτών και προϊόντων ενζυμικής τους προέλευσης έδειξε βελτιωμένα αποτελέσματα από την άποψη του χρόνου, της απλότητας και της μείωσης του κινδύνου διαλύτη συγκριτικά τις συμβατικές μεθόδους εκχύλισης (Almushayti et al., 2021). Χαρακτηριστικό παράδειγμα, αποτελεί η εκχύλιση της σουλφοραφάνης από λάχανα με χρήση διαλύτη διχλωρομεθανίου υποβοηθούμενη από μικροκύματα και η εκχύλιση με χρήση διαλύτη νερού υποβοηθούμενη πάλι από μικροκύματα (Πίνακας XVII). Οι εκχυλίσεις αυτές φάνηκαν πως αύξησαν την απόδοση της περιεκτικότητας σε σουλφοραφάνη έναντι των συμβατικών μεθόδων εκχύλισης με διχλωρομεθάνιο και νερό αντίστοιχα (Vilkhu, Mawson, Simons & Bates, 2008).

Πίνακας XVI Μη-συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης γλυκοζινολιτών από διάφορες πηγές λαχανικών.

Λαχανικά	Ενώσεις	Τεχνολογία	Αποτέλεσμα	Βιβλιογραφικές αναφορές
Άνθη, πουρές και χυμός από μπρόκολο	Αλειφατικοί γλυκοζινολίτες (γλυκομπερίνη, γλυκοραφανίνη) Ινδολικοί γλυκοζινολίτες (4-υδροξυγλυκομπρασικίνη, γλυκομπρασικίνη, 4-μεθοξυγλυκομπρασικίνη και νεογλυκομπρασικίνη)	Υψηλή πίεση (HP) / Υψηλή θερμοκρασία (HT), Υποβοηθούμενο παλμικό ηλεκτρικό πεδίο (PEF)	700 MPa στους 20 °C οδήγησαν στην εκχύλιση υψηλής ποσότητας συνολικών γλυκοζινολιτών από άνθη μπρόκολου εξαιτίας της αποτελεσματικής απενεργοποίησης της μυροσινάσης. Στην επεξεργασία με PEF του πουρέ και του χυμού μπρόκολου, παρατηρήθηκαν σχεδόν ολικοί μετασχηματισμοί γλυκοζινολιτών, εξαιτίας της ενεργοποίησης της μυροσινάσης κατά τον καθαρισμό και την παρασκευή χυμού πριν από την επεξεργασία του.	Reverchon, 1997
Σουηδικές ρίζες (συσκευασμένες σε σακούλες φραγής οξυγόνου)	Αλειφατικοί γλυκοζινολίτες (γλυκοραφανίνη, προγκοϊτρίνη και γλυκομπρασικαναπίνη) Ινδολικοί γλυκοζινολίτες (γλυκομπρασικίνη)	Υψηλή πίεση (HP) έναντι λεύκανσης	Γλυκοραφανίνη: δεν έδειξε διαφορά μεταξύ των θεραπειών. Με την HP (400 και 600 MPa) εκχυλίστηκε περισσότερη προγκοϊτρίνη (αύξηση μέχρι 84,8%) Γλυκομπρασικαναπίνη και γλυκομπρασικίνη: μειώθηκαν σε όλες τις επεξεργασίες σε σύγκριση με τον μάρτυρα.	Alvarez-Jubete, Valverde, Patras, Mullen, & Marcos, 2014
Νιφάδες Κανόλας και σπόροι κανόλας (για ζωοτροφές)	Σύνολο γλυκοζινολιτών	Υπερκρίσιμη εκχύλιση (SCE) / Υψηλή θερμοκρασία (HT) / Υψηλή πίεση (HP)	Υπερκρίσιμη εκχύλιση με CO ₂ , HT (75 °C), 62,1 MPa και 20% κ.β. περιεκτικότητα υγρασίας οδήγησε σε 90% ενζυμική απενεργοποίηση της μυροσινάσης στις νιφάδες και 44% στους ολόκληρους σπόρους. Μόνο λίγη ποσότητα γλυκοζινολιτών υποβαθμίστηκε. Χαμηλή περιεκτικότητα υγρασίας στους σπόρους (8,5%) εμπόδισε αποτελεσματικά την απενεργοποίηση της μυροσινάσης.	Halkier & Du, 1997
Σπόροι Κανόλα	Σύνολο γλυκοζινολιτών	Εκχύλιση με μικροκύματα (MAE) (800 W)	Ο σπόρος Κανόλα που υποβλήθηκε σε μεγαλύτερο χρόνο ακτινοβολήσης (6 λεπτά) είχε τουλάχιστον συνολική περιεκτικότητα σε GLS (59% αποικοδόμηση)	Ebrahimi, Nikkiah & Sadeghi, 2010

Λαχανικά	Ενώσεις	Τεχνολογία	Αποτέλεσμα	Βιβλιογραφικές αναφορές
Ινδικός σπόρος μουστάρδας	Σινιγκρίνη	Εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους (UAE) έναντι συμβατικής εκχύλισης με νερό	Σε βέλτιστη κατάσταση εκχύλισης (57% διαλύτης αιθανόλης, 80 °C και 60 λεπτά) η απόδοση της σινιγκρίνης ήταν 3,84% (70,67% περισσότερο από αυτή της συμβατικής εκχύλισης)	Wang & Weller, 2006
Σπόροι και χόμα ρόκας	Σινιγκρίνη, γλυκοερουκίνη, γλυκοραφανίνη	Εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους (UAE) , Εκχύλιση με μικροκύματα (MAE) έναντι ISO 9167-1 (καυτή εκχύλιση αιθανόλης 70%)	Οι βέλτιστες συνθήκες για τους σπόρους ήταν μεθανόλη, 250 W MAE και 80°C για 10 λεπτά. Και οι δύο μέθοδοι ISO και MAE έδειξαν καλύτερα αποτελέσματα από τα UAE για τους σπόρους. Στο έδαφος, η MAE ανέκτησε το 100% των γλυκοζινολιτών μετά την 1η εκχύλιση.	Wang, Liang, & Yuan, 2011

Πηγή (Deng et al., 2015)

Η επεξεργασία με υψηλή πίεση (HP: High-pressure) και η επεξεργασία υψηλής πίεσης και υψηλής θερμοκρασίας (HT: High-temperature) (HP/HT) αποτελούν κάποιες ακόμα μεθόδους που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία για την εκχύλιση γλυκοζινολιτών και ισοθειοκυανικών από φυτικούς ιστούς. Η εκχύλιση με υπερυψηλή πίεση πραγματοποιείται συνήθως από 100-600 MPa. Η πίεση θεωρείται ως ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες στην εκχύλιση με υψηλή πίεση, αφού είναι εκείνη που ευνοεί τα φαινόμενα μεταφοράς μάζας των βιοδραστικών συστατικών από την πρώτη ύλη προς τον διαλύτη (Στρατή, 2014).

Για παράδειγμα, όπως φαίνεται και στον πίνακα XVII, έχει διαπιστωθεί ότι η συνολική ποσότητα ισοθειοκυανικών σε δείγματα λάχανου που είχαν υποστεί ζεμάτισμα ήταν πολύ μικρή, πιθανόν εξαιτίας της θερμικής αδρανοποίησης της μυροσινάσης, η οποία δεν επέτρεψε την μετατροπή των γλυκοζινολιτών. Σε αντίθεση με την εφαρμογή υψηλής πίεσης (400 και 600 MPa), η οποία όταν εφαρμόστηκε σε δείγματα λάχανου παρουσίασε αύξηση ισοθειοκυανικών κατά επτά φορές έναντι των δειγμάτων που είχαν υποστεί ζεμάτισμα. Σε γενικές γραμμές, η εκχύλιση με υψηλή πίεση μπορεί να οδηγήσει σε απενεργοποίηση της μυροσινάσης καθώς και στη βελτίωση της σύνθεσης ισοθειοκυανικών, εφόσον η μυροσινάση δεν απενεργοποιηθεί από τη θερμοκρασία (υψηλότερη από 35-40 °C) (Butz et al., 2002).

Ακόμα, έχει μελετηθεί η επίδραση της υψηλής πίεσης στο ένζυμο μυροσινάση σε μπρόκολο και βρέθηκε ότι είναι ανθεκτικό. Σημαντικό είναι να τονιστεί πως η δραστικότητα του ενζύμου βρέθηκε να είναι υψηλότερη μετά από επεξεργασία υψηλής πίεσης (200-400 MPa) στους 50–60 °C σε σύγκριση με την επεξεργασία στην ίδια θερμοκρασία αλλά με ατμοσφαιρική πίεση (Van Eylen, Oey, Hendrick & Van Loey, 2008). Ακόμα, αποδείχθηκε ότι η επεξεργασία με υψηλή πίεση σε κεφαλές από μπρόκολο (200-500 MPa) στους 40 °C για 15 λεπτά προκαλεί υδρόλυση των γλυκοζινολιτών, προωθώντας έτσι το σχηματισμό ισοθειοκυανικών, σε σύγκριση με την επεξεργασία σε ατμοσφαιρική πίεση (Van Eylen et al., 2009).

Μια ακόμα μέθοδος που χρησιμοποιείται για την εκχύλιση γλυκοζινολιτών και προϊόντων ενζυμικής τους υδρόλυσης είναι η εκχύλιση με υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα. Το CO₂ ως διαλύτης έχει πολλά πλεονεκτήματα, αφού είναι άφλεκτος, σχετικά φθηνός, υψηλής καθαρότητας, με ρυθμιζόμενη επιλεκτικότητα έναντι διαφορετικών συστατικών, δεν αντιδρά με τις ενώσεις-στόχους, μη-τοξικός, ενώ μπορεί να ανακτηθεί σαν αέριο και να επαναχρησιμοποιηθεί. Το υπερκρίσιμο CO₂ υπό συνθήκες ήπιας θέρμανσης (θερμοκρασία > 31.1 °C) και υψηλής πίεση (> 73.8 bar), γίνεται ένα υγρό με πυκνότητα 0,47 g / cm³ που συμπεριφέρεται ως λιπόφιλο υγρό και αέριο. Επομένως, μπορούμε να πούμε πως το υπερκρίσιμο CO₂ διαθέτει ένα μίγμα ιδιοτήτων που του επιτρέπουν να κινείται σαν αέριο και να διαλύει σαν υγρό. (Deng et al., 2015). Σημαντικό ρόλο στην εκχύλιση υπερκρίσιμων υγρών παίζει η θερμοκρασία, η οποία επηρεάζει την πυκνότητα των αερίων, συνεπώς και τη διαλυτότητα των προς εξαγωγή ενώσεων. Οι χαμηλότερες θερμοκρασίες, οδηγούν σε υψηλότερες πυκνότητες και αυξάνουν την ικανότητα εκχύλισης των ενώσεων, ενώ οι υψηλότερες θερμοκρασίες λειτουργίας, κάτω από την ίδια πίεση, ενδέχεται να μην έχουν υψηλές αποδόσεις εξαγωγής (Galanakis, 2019).



Εικόνα 20 Εξοπλισμός εκχύλισης με υπερκρίσιμα υγρά

Όπως φαίνεται από τον πίνακα XVI, η υπερκρίσιμη εκχύλιση με CO₂ σε νιφάδες και ολόκληρους σπόρους κανόλας έδειξε πως σε συνδυασμό με υψηλή θερμοκρασία (75 °C), πίεση (62,1 MPa) και υγρασία (20% w/w) επιτεύχθηκε αδρανοποίηση 90% και 44% της μυροσινάσης, αντίστοιχα. Σε ολόκληρους σπόρους κανόλα με χαμηλή περιεκτικότητα σε υγρασία (8,5% w/w) μετά από 5 ώρες εκχύλισης παρατηρήθηκε σημαντική αποικοδόμηση γλυκοζινολιτών, ενώ αμελητέα ήταν η υποβάθμιση των γλυκοζινολιτών σε νιφάδες κανόλα σε όλα τα επίπεδα υγρασίας που μελετήθηκαν (Halkier & Du, 1997). Επίσης, υπερκρίσιμη εκχύλιση με CO₂ έχει χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση άλυτο-ισοθειοκυανικού από ρίζα, στέλεχος και φύλλα Wasabi, με υψηλότερη απόδοση να παρατηρείται με αύξηση της πίεσης και μείωση της θερμοκρασίας (25 MPa στους 35 °C) (Johnson, 2002).

Έχει αναφερθεί στην βιβλιογραφία και η εκχύλιση γλυκοζινολιτών από φύλλα ρόκας, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο υπερκρίσιμης εκχύλισης διοξειδίου του άνθρακα (scCO₂) με τη χρήση συνδιαλυτών, όπως η μεθανόλη, η αιθανόλη και το νερό. Η υπερκρίσιμη εκχύλιση διοξειδίου του άνθρακα (scCO₂) με τη χρήση συνδιαλύτη νερό έδωσε χαμηλότερες αποδόσεις γλυκοζινολιτών σε σύγκριση με τη συμβατική εκχύλιση, στην οποία χρησιμοποιήθηκε βραστό νερό, κάτι που μπορεί να οφειλόταν στην ατελή αδρανοποίηση της μυροσινάσης. Όμως, σε σχέση με τη μεθανόλη και την αιθανόλη ως συν-διαλύτες, η υπερκρίσιμη εκχύλιση με συνδιαλύτη το νερό είχε καλύτερα αποτελέσματα, αφού εκείνες (μεθανόλη-αιθανόλη) μείωσαν δραματικά την

εκχύλιση των γλυκοζινολιτών (Sut, Boschiero, Solana, Malagoli, Bertucco & Dall'Acqua, 2018).

Τέλος, η υποβοηθούμενη επεξεργασία παλμικών ηλεκτρικών πεδίων έχει χρησιμοποιηθεί ως μέθοδος εκχύλισης γλυκοζινολιτών. Η υποβοηθούμενη επεξεργασία παλμικών ηλεκτρικών πεδίων στηρίζεται στην εφαρμογή εξωτερικού ηλεκτρικού πεδίου στο προς ανάλυση δείγμα, ώστε τελικά να μαλακώσει και να διαταραχθεί η κυτταρική μεμβράνη του. Αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι η απελευθέρωση περισσότερων βιοδραστικών ενώσεων και η αύξηση του ρυθμού εκχύλισης (Galanakis, 2019). Έρευνες έχουν δείξει ότι η υποβοηθούμενη επεξεργασία παλμικών ηλεκτρικών πεδίων δεν είναι η κατάλληλη τεχνολογία για την ανάκτηση γλυκοζινολιτών υπό εφαρμοσμένες συνθήκες, αφού αύξησε την αποικοδόμηση των γλυκοζινολιτών, αντί να επιτύχει την υψηλότερη απόδοση εκχύλισης αυτών των ενώσεων. Στον πίνακα XVI, παρουσιάζεται η εκχύλιση με χρήση υψηλής θερμοκρασίας (HT) και υψηλής πίεσης (HP) σε άνθη μπρόκολου, η οποία διατήρησε σε υψηλό επίπεδο άθικτους τους γλυκοζινολίτες. Τόσο στα 700 MPa και στους 20 °C για 10 λεπτά βρέθηκε ότι απενεργοποιήθηκε η δραστηριότητα της μυροσινάσης, αλλά και στα 300 MPa και στους 20 °C διατηρήθηκαν πάλι σε υψηλό επίπεδο ακέραιοι οι γλυκοζινολίτες. Σε αντίθεση, με την υποβοηθούμενη επεξεργασία παλμικών ηλεκτρικών πεδίων σε πουρέ και σε χυμό από μπρόκολο, η οποία είχε ως αποτέλεσμα σχεδόν ολικούς μετασηματισμούς γλυκοζινολιτών, εξαιτίας της ενεργοποίησης της μυροσινάσης κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας του χυμού, πριν από την επεξεργασία του με παλμικό ηλεκτρικό πεδίο (Reverchon, 1997).

Πίνακας XVII Μη-συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης ισοθειοκυανικών από διάφορες πηγές λαχανικών.

Λαχανικά	Ενώσεις	Τεχνολογία	Αποτέλεσμα	Βιβλιογραφικές αναφορές
Χυμοί από λευκό κόκκινο λάχανο, μπρόκολο, κουνουπίδι και λαχανάκια Βρυξελλών	Σύνολο ισοθειοκυανικών	Υψηλή πίεση (HP)	Ο χυμός μπρόκολου επεξεργασμένος με HP (600 MPa) διατήρησε συγκρίσιμη ποσότητα ισοθειοκυανικών, ενώ τα ισοθειοκυανικά στους άλλους χυμούς μειώθηκαν μετά την επεξεργασία HP.	Ghawi, Methven & Niranjana, 2013

Λαχανικά	Ενώσεις	Τεχνολογία	Αποτέλεσμα	Βιβλιογραφικές αναφορές
Τεμαχισμένα λευκά λάχανα (συσκευασμένα σε σακούλα κενού)	Σύνολο ισοθειοκυανικών	Υψηλή πίεση (HP) έναντι λεύκανσης	Οι υψηλότερες πιέσεις (400 και 600 MPa) στους 20 και 40 °C αύξησαν σημαντικά τα συνολικά ισοθειοκυανικά (επτά φορές) σε σύγκριση με τη λεύκανση.	Butz, Edenharter, Fernandez Garcia, Fister, Merkel et al, 2002
Χυμός μπρόκολου	Ενδογενής μυροσινάση μπρόκολου, σουλφοραφάνη και φαιναίθυλο ισοθειοκυανικό	Υψηλή πίεση (HP)	Η μυροσινάση ήταν ευαίσθητη στη θερμότητα, ενώ ήταν ενεργή μετά από διαφορετικές θεραπείες HP. Η ήπια θεραπεία με HP προκαλεί καταστροφή της ακεραιότητας των κυττάρων, φέρνοντας έτσι τη μυροσινάση να αντιδράσει με γλυκοζινολίτες. Η σουλφοραφάνη και το φαιναίθυλο ισοθειοκυανικό παρέμειναν σταθερά υπό συνθήκες HP αλλά ήταν ευαίσθητα στην θερμοκρασία.	Frandsen, Markedal, Martin-Belloso, 2014
Χρένο	Ισοθειοκυανικά και Άλυλο-ισοθειοκυανικό	Υπερκρίσιμη εκχύλιση (SCE) έναντι διαλύτη διχλωρομεθανίου και συμβατικής εκχύλισης νερού	Υπό συνθήκες SCE (1 ώρα, 45 °C και 25 MPa), η απόδοση των ισοθειοκυανικών αυξήθηκε κατά 68,6% και η απόδοση του άλυλο-ισοθειοκυανικού αυξήθηκε κατά 72,0% σε σύγκριση με την συμβατική εκχύλιση νερού (24 ώρες 20-40 °C). Εκχύλισμα διχλωρομεθανίου (8,03% για ισοθειοκυανικά και 6,10% για άλυλο-ισοθειοκυανικό του δείγματος σκόνης) απέδωσαν παρόμοια σε σύγκριση με την εκχύλιση SCE. (7,62% για ισοθειοκυανικά και 5,83% για άλυλο-ισοθειοκυανικό του δείγματος σκόνης)	Wu, Zhang, Zeng & Lin, 2009
Wasabi (ρίζα, στελέχος και φύλλο)	Άλυλο-ισοθειοκυανικό	Υπερκρίσιμη εκχύλιση (SCE) / Υψηλή θερμοκρασία (HT)	Η αύξηση της πίεσης (15–25 MPa) και η μείωση της θερμοκρασίας (35–55 °C) επηρέασαν θετικά την απόδοση του άλυλο-ισοθειοκυανικού (408 mg/100g). Στους 35 °C και 25 MPa, εκχυλίστηκαν 368, 39 και 11 mg άλυλο ισοθειοκυανικού/100 g λυοφιλιωμένης ρίζας, στελέχους και φύλλων αντίστοιχα.	Johnson, 2002
Φρέσκο λάχανο	Σουλφοραφάνη	Εκχύλιση με μικροκύματα (MAE) (390 W για 1,5 λεπτό)	Η MAE που χρησιμοποιεί διχλωρομεθάνιο ως διαλύτη είχε ως αποτέλεσμα αύξηση της απόδοσης κατά 133% σε σύγκριση με την απόδοση από την συμβατική εκχύλιση διχλωρομεθανίου. Η MAE που χρησιμοποιεί νερό ως διαλύτη είχε ως αποτέλεσμα αύξηση της απόδοσης κατά 118% σε σύγκριση με την συμβατική εκχύλιση νερού.	Vilkhu, Mawson, Simons & Bates, 2008

Πηγή (Deng et al.,2015)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΤΟΥΣ ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ

4.1 ΟΛΙΚΟΙ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΕΣ

Η δοκιμή της θυμόλης, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως για τον προσδιορισμό των σακχάρων, είναι μια μέθοδος η οποία προσδιορίζει και τη συνολική περιεκτικότητα γλυκοζινολιτών στο προς ανάλυση δείγμα. Η δράση ισχυρών οξέων στα σάκχαρα προκαλεί αφυδάτωση και κλείσιμο δακτυλίου που οδηγεί στο σχηματισμό φουραλδεϋδών. Η αντίδραση συμπύκνωσης μεταξύ παραγώγων φουραλδεϋδης και θυμόλης οδηγεί στη δημιουργία κόκκινου προϊόντος. Αυτή η ανάλυση δίνει θετικό αποτέλεσμα τόσο με τα ελεύθερα όσο και με τα δεσμευμένα σάκχαρα (Śmiechowska, Bartoszek & Namieśnik, 2010).

Οι γλυκοζινολίτες κατά την υδρόλυσή τους από την μυροσινάση αποδίδουν ισομοριακές ποσότητες γλυκόζης. Επομένως, η μέτρηση της ενζυμικά απελευθερωμένης γλυκόζης, αποτελεί μια εύκολη, γρήγορη και οικονομική μέθοδος για τον προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας γλυκοζινολιτών ενός δείγματος τροφίμου, αλλά είναι σημαντικό να ληφθεί υπόψιν τυχόν ενδογενής γλυκόζη. Επομένως, απαραίτητο βήμα μετά την εκχύλιση των γλυκοζινολιτών είναι ο επιλεκτικός καθαρισμός για την εξάλειψη της ελεύθερης γλυκόζης και άλλων παρεμποδιστικών ενώσεων (Moreno, Carvajal, López-Berenguer, García-Viguera, 2006).

Ακόμα έχουν περιγραφεί και αρκετές τιτλομετρικές και βαρυνμετρικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό των συνολικών γλυκοζινολιτών. Το ασταθές ενδιάμεσο (aglucon-thiohydroximate-O-sulfate), που παράγεται μετά από την υδρόλυση των γλυκοζινολιτών από την μυροσινάση, μετά από μια αναδιάταξη Lossen παράγει μια ισομοριακή ποσότητα διθειϊκού ιόντος. Επομένως, έχει αναφερθεί στην βιβλιογραφία μια μέθοδος που βασίζεται στον ποσοτικό προσδιορισμό του διθειϊκού αυτού ιόντος. Συγκεκριμένα, το διθειϊκό άλας που ελευθερώνεται μετά τη θείωση καθιζάνει με χλωριούχο βάριο και στη συνέχεια το υπολειμματικό βάριο μετριέται με φασματοσκοπία εκπομπής ακτίνων (Schnug, 1987).

Η τριγοειδής ηλεκτροφόρηση (CE) έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της συνολικής περιεκτικότητας των γλυκοζινολιτών σε εκχυλίσματα λαχανικών.

Αναλυτικότερα, η μέθοδος βασίζεται στην ενζυμική υδρόλυση των γλυκοζινολιτών με μυροσινάση που οδηγεί σε απελευθέρωση γλυκόζης, η οποία στη συνέχεια μετατρέπεται παρουσία γλυκοοξειδάσης σε γλυκουρονικό οξύ (GA). Ακολουθεί η επισήμανση του γλυκουρονικού οξέος που έχει σχηματιστεί με φθορισμό 7-αμινο ναφθαλιν-1,3-σουλφονικού οξέος (ANDSA). Τέλος, συνεχίζει η διαδικασία με την τριχοειδή ηλεκτροφόρηση του παραγώγου GA-ANDSA, λαμβάνοντας τελικά ένα ηλεκτρόγραμμα.

Μια αναλυτική μέθοδος που έχει χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό των γλυκοζινολιτών είναι η ανάλυση με μικροτσιπ, η οποία στηρίζεται στην τριχοειδή ηλεκτροφόρηση με ανιχνευτή φθορισμού. Είναι μια μη καταστρεπτική, γρήγορη και αυτοματοποιημένη μέθοδος που χρησιμοποιεί μικρή ποσότητα αντιδραστηρίων και παρακάμπτει πολλές διαδικασίες χαρακτηριστικές των συμβατικών μεθόδων. Ένα σύμπλεγμα μεταφοράς φόρτισης σχηματίζεται μεταξύ των γλυκοζινολιτών και των ξανθενών, το οποίο χρησιμοποιείται για την ποσοτική μέτρηση των συνολικών γλυκοζινολιτών. Έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της συνολικής περιεκτικότητας των γλυκοζινολιτών σε σπόρους *Arabidopsis thaliana* (Fouad et al., 2008).

Πίνακας XVIII Συγκεντρωτικός πίνακας μεθόδων ανάλυσης ολικών γλυκοζινολιτών.

Μέθοδος ανάλυσης	Βιβλιογραφία
Δοκιμή θυμόλης	Śmiechowska et al., 2010
Μέτρηση ενζυμικά απελευθερωμένης γλυκόζης	Moreno et al., 2006
Τιτλομετρικές και βαρυμετρικές μέθοδοι	Schnug, 1987
Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (CE)	Fouad et al., 2008

4.2 ΑΘΙΚΤΟΙ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΕΣ

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης είναι μια αναλυτική τεχνική που προτιμάται για την ανάλυση των γλυκοζινολιτών. Συγκεκριμένα, η μέθοδος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης έχει περιγραφεί στο ISO 9167-1, ως μια μέθοδος ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού των γλυκοζινολιτών. Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει και το στάδιο της ενζυμικής αποθείωσης, με τη χρήση

σουλφοϋδρολάσης (σουλφατάσης), ως μέρος της προετοιμασίας του δείγματος. Ωστόσο, έχουν αναφερθεί δυσκολίες στην ερμηνεία της που σχετίζονται κυρίως με τις επιδράσεις του pH, του χρόνου και της ενζυμικής δραστηριότητας των προϊόντων αποθείωσης, τα οποία ερευνώνται με σκοπό την καλύτερη εφαρμογή της μεθόδου.

Έχει αναφερθεί στην βιβλιογραφία και η χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, χωρίς όμως να είναι απαραίτητο βήμα η αποθείωση, περιορίζοντας έτσι προβλήματα ατελούς αποθείωσης και αυτοαποδόμησης που μπορούσαν να προκύψουν. Επίσης, νέες, βελτιωμένες εκδοχές της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, όπως η υγρή χρωματογραφία εξαιρετικά υψηλής απόδοσης (UHPLC), η υδρόφιλη υγρή χρωματογραφία αλληλεπίδρασης (HILIC) και χρωματογραφία αντίστροφης ροής υψηλής ταχύτητας (HSCCC), έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση άθικτων γλυκοζινολιτών και χρησιμοποιούν τα πλεονεκτήματα της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, αλλά ταυτόχρονα επιλύουν και τους περιορισμούς της (Śmiechowska et al., 2010).

Στην περίπτωση της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, οι ενώσεις προσδιορίζονται συχνότερα χρησιμοποιώντας ανιχνευτές συστοιχίας φωτοδιόδων (DAD: Diode Array Detector) και υπεριώδους (UV: Ultraviolet). Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων μεθόδων ανάλυσης παρουσιάζονται στον πίνακα XIX, όπως ο διαχωρισμός και ο ποσοτικός προσδιορισμός δώδεκα άθικτων γλυκοζινολιτών από φύλλα μπρόκολου με LC-DAD-ESI-MS (Ares, Nozal, Bernal & Bernal J., 2014) καθώς και δώδεκα άθικτων γλυκοζινολιτών από γογγύλια με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων LC – UV-DAD (Francisco et al., 2009).

Τέλος, είναι σημαντικό να γίνει αναφορά και στο **συνδυασμό της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με φασματομετρία μάζας**, ο οποίος διευκολύνει την ταυτοποίηση μιας ένωσης χωρίς την παρουσία οποιουδήποτε προτύπου ανιχνεύοντας τη μοριακή μάζα της. Πιο συγκεκριμένα, ο ιονισμός ηλεκτροψεκασμού (ESI) είναι αυτός που χρησιμοποιείται συχνότερα στην φασματομετρία μάζας, λόγω της μεγαλύτερης ευαισθησίας του στον προσδιορισμό αυτών των ενώσεων. Η χρήση της υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με ανίχνευση συστοιχίας φωτοδιόδων και φασματομετρία μάζας έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για τον προσδιορισμό 10 μεμονωμένων γλυκοζινολιτών από ωμά λαχανικά *Brassica* (μπρόκολο, κουνουπίδι, λαχανάκια Βρυξελλών και κόκκινο λάχανο) (Zabaras, Roohani, Krishnamurthy,

Cochet & Delahunty, 2013). Επίσης, για τον ποσοτικό προσδιορισμό 10 μεμονωμένων γλυκοζινολιτών σε μπρόκολο, λαχανάκια μπρόκολου, λαχανάκια Βρυξελλών και κουνουπίδι έχει χρησιμοποιηθεί υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας και ιονισμό ηλεκτροψεκασμού (Πίνακας XIX) (Tian, Rosselot & Schwartz, 2005).

Η υδρόφιλη υγρή χρωματογραφία αλληλεπίδρασης (HILIC) είναι μια βελτιωμένη μέθοδος ανάλυσης άθικτων γλυκοζινολιτών. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί στήλες με διοξείδιο του πυριτίου και πολυμερείς λειτουργικές ομάδες σουλφοαλκυλοβεταΐνης για στατική φάση, οι οποίες είναι πιο ανθεκτικές, στιβαρές και επιτυγχάνουν καλύτερους διαχωρισμούς γλυκοζινολιτών από τις στήλες πολυϋδροξυαιθυλοασπαρταμιδίου που είχαν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν. Ακόμα, η υδρόφιλη υγρή χρωματογραφία αλληλεπίδρασης έχει το πλεονέκτημα της μεγάλης ικανότητας μεταβολής της σύνθεσης της κινητής φάσης, η οποία οδηγεί στον προσαρμοσμένο διαχωρισμό γλυκοζινολιτών σε ένα ευρύ φάσμα πολικότητας (Wade, Garrard & Fahey, 2007; Troyer, Stephenson & Fahey, 2001).

Η χρωματογραφία ζεύγους ιόντων αντίστροφης φάσης (IPC) προσδιορίζει με επιτυχία μη πολικούς γλυκοζινολίτες, όπως οι ινδολικοί, ενώ η υδρόφιλη χρωματογραφία αλληλεπίδρασης είναι ανώτερη για τον διαχωρισμό πολικών γλυκοζινολιτών, όπως η γλυκοραφανίνη, γλυκοϊμπερίνη κ.α. Επομένως ο συνδυασμός των δυο αυτών μεθόδων αποτελεί μια ισχυρή μέθοδο για την ανάλυση ανέπαφων γλυκοζινολιτών. Ωστόσο, έχει αναφερθεί στην βιβλιογραφία μια νέα προσέγγιση που στηρίζεται σε διαχωρισμό αντίστροφης φάσης χρησιμοποιώντας υδρόφιλο τελικό κάλυμμα C18- συνδεδεμένο με πυρίτιο και μια κινητή φάση διαβάθμισης 50 mM οξικού αμμωνίου-μεθανόλης, η οποία προσδιορίζει τόσο τους πολικούς όσο και τους μη πολικούς γλυκοζινολίτες, χωρίς την ανάγκη χρήσης διαφορετικών στηλών (West, Tsui & Haas, 2002).

Η χρωματογραφία αντίστροφης ροής υψηλής ταχύτητας (HSCCC), σε συνδυασμό με τη χρήση φυγοκεντρικής δύναμης, έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό γλυκοζινολιτών από μια ποικιλία φυτικών πηγών (π.χ. σπόροι μπρόκολου, ρόκα και το χρένο). Η χρωματογραφία αντίστροφης ροής υψηλής ταχύτητας είναι μια απλή και σχετικά φθηνή διαδικασία, αφού χρησιμοποιεί μικρές ποσότητες δαπανηρών διαλυτών, ενώ επιτρέπει ταυτόχρονα και την ποσοτική

ανάκτηση του εφαρμοζόμενου δείγματος ανεξάρτητα από την ανάλυση των συστατικών, γεγονός που είναι πολύ χρήσιμο σε περίπτωση ενός αποτυχημένου διαχωρισμού, αφού μπορεί εύκολα και γρήγορα να επαναχρησιμοποιηθεί σε ένα κατάλληλα τροποποιημένο σύστημα διαλυτών χωρίς να υπάρξει απώλεια του πολύτιμου αρχικού υλικού (Fahey, Wad, Stephenson & Chou, 2003).

Τέλος, έχει χρησιμοποιηθεί και υγρή χρωματογραφία εξαιρετικά υψηλής απόδοσης (UHPLC) σε συνδυασμό με μια επιλεκτική φασματομετρία μάζας (QTOF-MS) για την εξαγωγή, τον διαχωρισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό δεκαπέντε άθικτων γλυκοζινολιτών σε φύλλα μπρόκολου (Ares, Bernal, Nozal, Turner & Plaza, 2015). Ακόμα, έχει αναφερθεί στην βιβλιογραφία και η υγρή χρωματογραφία εξαιρετικά υψηλής απόδοσης (UHPLC) σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (Q-Orbitrap-MS) για την ταυτόχρονη αναγνώριση και ποσοτικοποίηση 15 γλυκοζινολιτών σε οκτώ είδη Brassica (Hwang, Park, Dang, Kim & Seo, 2019).

Πίνακας XIX Εφαρμογές υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών για τον προσδιορισμό μεμονωμένων γλυκοζινολιτών σε σταυρανθή λαχανικά.

Πηγή	Αναλυτική τεχνική	Βιβλιογραφικές αναφορές
Σπόροι, ρίζες, φύλλα, άνθη κ.λπ. μιας ποικιλίας φυτών	LC-ESI-MS	Mellon, Bennett, Holst & Williamson, 2002
Μουστάρδα, κανόλα, μπρόκολο, κουνουπίδι, λάχανο και λάχανο της Σαγκάης	HPLC-QTOF-ESI-MS / MS	Cai et al., 2004
Μπρόκολο και κινέζικα λαχανικά	LC-ESI-MS / MS	Skutlarek et al., 2004
Μπρόκολο, λάχανα μπρόκολου, λάχανα Βρυξελλών και κουνουπίδι	HPLC-DAD-ESI-MS / MS	Tian et al., 2005
Κεφάλι μπρόκολου, κάρδαμο κήπου και μαύροι σπόροι μουστάρδας	LC – TOF MS	Mohn, Cutting, Ernst & Hamburger, 2007
Πράσινα γογγύλια και γογγύλια	LC-UV-DAD / ESI-MS	Francisco et al., 2009
Λευκό και πράσινο κουνουπίδι	UPLC-DAD-ESI-MS / MS	Gratacós-Cubarsí, Ribas-Agusti, García-Regueiro & Castellari, 2010

Πηγή	Αναλυτική τεχνική	Βιβλιογραφικές αναφορές
Μπρόκολο	HPLC-DAD-ESI-MS / MS	Fernández-León M., et al., 2012
Λάχανα μπρόκολου	HPLC-ESI-MS / MS	Maldini, Baima, Morelli, Scaccini & Natella, 2012
Φύλλα μπρόκολου, λάχανο και λάχανο	HPLC-ESI-MS	Sasaki, Neyazaki, Shindo, Ogawa & Momose, 2012
Κόνδυλος από γογγύλι	LC- DAD-QTOF-ESI-MS	Lee et al., 2013
Μπρόκολο, κουνουπίδι, λαχανάκια Βρυξελλών και κόκκινο λάχανο	HPLC-DAD-ESI-MS / MS	Zabaras et al., 2013
Φύλλα μπρόκολου	LC-DAD-ESI-MS	Ares et al., 2014
Σπόροι μουστάρδας	HPLC – ESI-TOF-MS	Popova & Morra, 2014
Φύλλα μπρόκολου	UHPLC-QTOF- ESI –MS	Ares et al., 2015
Λάχανο μπρόκολου και σαβοΐας	HPLC-ESI-Ion trap-MS	Fernández-León, Fernández-León F., González-Gómez, Ayuso & Bernalte, 2017
Κουνουπίδι	UHPLC-ESI – MS / MS	Capriotti et al., 2018
Pak choi, choy sum, κινέζικο λάχανο, κουνουπίδι, λάχανο, μπρόκολο, Kai Lan, λαχανάκια Βρυξελλών, ρόκα σαλάτα, ραδίκι daikon, κόκκινο ραπανάκι και κάρδαμο	HILIC- MS / MS	Liang et al., 2018
Μπρόκολο, λάχανο, κουνουπίδι, λάχανο, μουστάρδα, λάχανο kimchi, ραπανάκι, νεαρά φύλλα και ρίζα ραπανάκι	UHPLC-Q-Orbitrap-MS	Hwang et al., 2019
Λάχανο, γογγύλι, μιζούνια, μουστάρδα φύλλων και λάχανο	UPLC-MS / MS	Assefa et al., 2019

Πηγή (Almushayti et al., 2021).

Η αέρια χρωματογραφία (GC) φαίνεται πως δεν είναι κατάλληλη για την άμεση ανάλυση γλυκοζινολιτών, λόγω της ιοντικής τους φύσης. Για αυτό άλλωστε, απαιτείται και η μετατροπή των γλυκοζινολιτών σε πτητικά παράγωγα δεσουλφο-γλυκοζινολιτών (desulfo-glucosinolates) πριν από την ανάλυσή τους με αέρια χρωματογραφία. Εξαιτίας της προετοιμασίας του δείγματος που απαιτείται, λοιπόν, χαρακτηρίζεται ως μια χρονοβόρα και απαιτητική διαδικασία. Η αέρια χρωματογραφία υγρής στατικής φάσης (GLC) αποτελεί, ωστόσο, μια μέθοδο για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των μεμονωμένων γλυκοζινολιτών. Οι ανιχνευτές που συνήθως συνδυάζονται με αέρια χρωματογραφία είναι ο ανιχνευτής ιονισμού φλόγας (FID) και ο ανιχνευτής φασματομέτρου μάζας (MS) (Śmiechowska et al., 2010).

Ο ενζυμικός ανοσοπροσροφητικός προσδιορισμός (ELISA) είναι μια ακόμα μέθοδος ανάλυσης των γλυκοζινολιτών. Πριν ξεκινήσει η αναλυτική μέθοδος, οι γλυκοζινολίτες πρέπει να συζευχθούν με ανοσογονικούς φορείς υψηλότερου μοριακού βάρους λόγω του μικρότερου μεγέθους τους, με σκοπό την επίκληση της ανοσοαπόκρισης. Ο ανοσογονικός φορέας που χρησιμοποιείται είναι είτε αλβουμίνη ορού βοοειδούς είτε ωοαλβουμίνη. Τα αντισώματα που παράγονται έναντι αυτού του ζεύγους ανοσογονικού φορέα-γλυκοζινολιτών είναι πολύ χρήσιμα και οδηγούν σε αυξημένη ειδικότητα έναντι των γλυκοζινολιτών. Έχει αναφερθεί η χρήση της μεθόδου για τον προσδιορισμό σινιγκρίνης και προγκοϊτρίνης σε λαχανάκια Βρυξελλών. Ωστόσο, προφανώς δυνατό είναι να συντεθούν συζεύγματα και άλλων γλυκοζινολιτών και να δημιουργηθούν αντισώματα που θα χρησιμοποιηθούν στην ELISA στο μέλλον. Η μέθοδος που αναπτύχθηκε φάνηκε να υπερεκτιμά την περιεκτικότητα σε γλυκοζινολίτες σε σύγκριση με τις μεθόδους υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης. Ωστόσο, εμφανίζει πλεονεκτήματα ως προς το κόστος και τον χρόνο που απαιτείται για την ανάλυση (Doom, Holst, Kruk, Raaijmakers-Ruijs & Postma, 1998).

Η φασματοσκοπία εγγύς υπέρυθρης ακτινοβολίας (NIRS) είναι μια γρήγορη μη-καταστρεπτική μέθοδος ανάλυσης που δεν απαιτεί τη χρήση επικίνδυνων χημικών. Η υπέρυθρη (IR) περιοχή μήκους κύματος βρίσκεται μεταξύ του ορατού (VIS) και του μήκους κύματος μικροκυμάτων του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, δηλαδή από 0,75 – 1000 μm , με το εγγύς υπέρυθρο (NIR) να κυμαίνεται από 0,75 – 2,5 μm και 13300-4000 cm^{-1} . Η φασματοσκοπία εγγύς υπέρυθρης ακτινοβολίας (NIRS) διευκολύνει τον γρήγορο προσδιορισμό των γλυκοζινολιτών, αφού εξαλείφει το χρονοβόρο στάδιο προετοιμασίας του δείγματος. Συγκεκριμένα, η ένωση ενδιαφέροντος ακτινοβολείται

και το ανακλώμενο φως μετράται για την ανάλυση του γλυκοζινολίτη. Η ένωση ανιχνεύεται κυρίως βάσει των δεσμών που υπάρχουν σε αυτήν, συγκεκριμένα μέσω της εύρεσης τριών τύπων δεσμών, C-H, N-H και O-H. Στη συνέχεια, τα φασματικά δεδομένα που λαμβάνονται με τη μέθοδο αυτή μετατρέπονται σε χημικά συγκρίνοντάς τα με την καμπύλη βαθμονόμησης (Galanakis, 2019).

Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε γλυκοζινολίτες με φασματοσκοπία NIR έχει πραγματοποιηθεί από διάφορους ερευνητές σε διαφορετικά δείγματα ειδών *Brassica*, όπως σπόροι μπρόκολου, σπόροι ελαιοκράμβης, σπόροι ινδικής μουστάρδας και σπόροι canola καθώς και σε καλέ, λάχανο και μπρόκολο. Σε γενικές γραμμές, η μεθοδολογία NIRS δείχνει μια καλή δυνατότητα προσδιορισμού μεμονωμένων και συνολικών γλυκοζινολιτών (Sahamishirazi, Zikelia, Fleck, Claupein & Graeff-Hoenninger, 2017). Μελέτη για τον προσδιορισμό των συνολικών γλυκοζινολιτών, καθώς και άθικτων γλυκοζινολιτών σε φύλλα ελαιοκράμβης έχει πραγματοποιηθεί με την χρήση της φασματοσκοπίας εγγύς υπερύθρου (Fonta Mercedes, Celestino, Cartea & Haro-Bailóna, 2005).

Η μέθοδος της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση ανέπαφων γλυκοζινολιτών. Συγκεκριμένα, έχει αναπτυχθεί μικροκυτταρική ηλεκτροκινητική τριχοειδής χρωματογραφία (MECC) για τον προσδιορισμό της γλυκοραφανίνης σε σπόρους και φύλλα από μπρόκολο (Trenerry, Caridi, Elkins, Donkor & Jones, 2006). Ακόμα, ηλεκτροφόρηση τριχοειδών ζωνών (CZE) σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση ανέπαφων, μη αποθειωμένων γλυκοζινολιτών σε σπόρους κάρδαμου (Bringmann et al., 2005).

Μια νέα αναλυτική τεχνική για τη διάκριση μεμονωμένων γλυκοζινολιτών είναι η διάταξη χρωματομετρικών αισθητήρων (CSA) σε συνδυασμό με μεθόδους αναγνώρισης προτύπων. Αυτή η τεχνική χρησιμοποιεί πολλαπλά υλικά ανίχνευσης που είναι ευαίσθητα απέναντι στις ενώσεις στόχους. Οι αλλαγές χρώματος της συστοιχίας αισθητήρων προκαλούνται από ένα ευρύ φάσμα χημικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αισθητηριακών υλικών και των αναλυτών, δίνοντας έτσι μια ενναλακτική λύση για ταχεία διάκριση των γλυκοζινολιτών. Η μέθοδος αυτή έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των γλυκοζινολιτών σε 8 είδη σταυρανθών λαχανικών (μπρόκολο, λαχανάκια Βρυξελλών, λάχανο, κουνουπίδι, λάχανο Kimchi, λάχανο, μουστάρδα και ραπανάκια), διακρίνοντας με ακρίβεια το προφίλ 10 γλυκοζινολιτών (σινιγκρίνη,

προγκοϊτρίνη, γλυκοναπίνη, 4-μεθοξυγλυκομπρασικίνη, γλυκοραφανίνη, γλυκομπρασικίνη, γλυκοϊμπερίνη, γλυκομπρασικαναπίνη, γλυκοραφενίνη και γλυκοερουκίνη). Ακόμα, μπόρεσε να διακρίνει τα διαφορετικά είδη δειγμάτων σταυρανθών λαχανικών αναγνωρίζοντας τις διαφορές στα προφίλ γλυκοζινολιτών τους. Συνεπώς, αυτή η μέθοδος αποτελεί ένα γρήγορο μέσο για τη διάκριση των γλυκοζινολιτών αποτελώντας, ίσως, μια ιδανική εναλλακτική λύση έναντι των συμβατικών μεθόδων όπως το LC/MS, ενώ ταυτόχρονα μπορεί να είναι χρήσιμη και για τον έλεγχο ποιότητας των γλυκοζινολιτών στα λαχανικά *Brassica* (Kim, Seo & Ha, 2020).

Πίνακας XX Συγκεντρωτικός πίνακας μεθόδων ανάλυσης μεμονωμένων γλυκοζινολιτών.

Μέθοδος ανάλυσης	Βιβλιογραφία
Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης	Πίνακας XIX
Αέρια χρωματογραφία (GC)	Śmiechowska et al., 2010
Ενζυμικός ανοσοπροσροφητικός προσδιορισμός (ELISA)	Doorn et al., 1998
Φασματοσκοπία εγγύς υπέρυθρης ακτινοβολίας (NIRS)	Sahamishirazi et al., 2017 Fonta Mercedes et al., 2005
Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (CE)	Trenergy et al., 2006 Bringmann et al., 2005
Διάταξη χρωματομετρικών αισθητήρων (CSA)	Kim et al., 2020

4.3 ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ (ΙΝΔΟΛΙΚΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ & ΙΣΟΘΕΙΟΚΥΑΝΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ)

Η χρωματογραφία χάρτου (PC) είναι η παλαιότερη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στις αρχές του 1900 για την ανάλυση των προϊόντων υδρόλυσης γλυκοζινολιτών. Η θειουρία που σχηματίζεται μετά την αντίδραση ανάμεσα σε αμμωνία και ισοθειοκυανικά, ανιχνεύεται και διαχωρίζεται με χρωματογραφία χάρτου. Τα υδρόφοβα συστατικά αναλύονται χρησιμοποιώντας κορεσμένο με νερό χλωροφόρμιο, τα υδρόφιλα συστατικά από την άλλη πλευρά με μίγμα βουτανόλης, τολουολίου και νερού ως κινητή φάση. Η χαμηλή αναπαραγωγιμότητα της ανάλυσης των προϊόντων υδρόλυσης χρησιμοποιώντας αυτήν τη μέθοδο την καθιστά μια δύσκολη επιλογή για την ανάλυσή τους (Agora et al., 2017).

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) είναι πολύ αξιόπιστη και επαναλαμβανόμενη μέθοδος για την ανάλυση των προϊόντων υδρόλυσης γλυκοζινολιτών. Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιείται ως στατική φάση ένα λεπτό στρώμα απορροφητικού υλικού, συνήθως πήγμα οξειδίου του πυριτίου ή κυτταρίνης, στρωμένο σε μία πλάκα (silica gel or alumina). Η κινητή φάση είναι υγρή και χρησιμοποιείται διαφορετικός συνδυασμός διαλυτών σύμφωνα με την πολικότητα. Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας μπορεί να χρησιμοποιηθεί όχι μόνο για ποιοτική αλλά και για ποσοτική ανάλυση των προϊόντων υδρόλυσης γλυκοζινολιτών, ενώ η επαναληψιμότητα, η αναπαραγωγιμότητα και η ικανότητα ανάλυσης μεγάλου αριθμού δειγμάτων ταυτόχρονα καθιστούν αυτή τη μέθοδο αρκετά χρήσιμη για την αρχική ανάλυση τους (Agora et al., 2017). Έχει χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση μεμονωμένων γλυκοζινολιτών σε εκχυλίσματα ελαιοκράμβης (Croft, 1979), αλλά και για τον προσδιορισμό της καθαρότητας των προϊόντων υδρόλυσης του ω-μεθυλοσουλφινυλο αλκυλο (ω-methylsulfinyl alkyl) γλυκοζινολίτη σε ελαιούχους σπόρους *Lesquerella* και σε μπρόκολο (Kore, Spencer & Wallig, 1993).

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) είναι μια αναλυτική τεχνική που προτιμάται για την ανάλυση των προϊόντων ενζυμικής υδρόλυσης των γλυκοζινολιτών, αφού είναι κατάλληλη τεχνική και για τον προσδιορισμό θερμικά ασταθών ενώσεων, όπως είναι τα ινδόλια. Αναλυτικότερα, έχει χρησιμοποιηθεί υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης με ανίχνευση συστοιχίας φωτοδιόδων UV για τον προσδιορισμό της σουλφοραφάνης σε παραπροϊόντα

μπρόκολου (Campas-Baypoli, Sánchez-Machado, Bueno-Solano, Ramírez-Wong & López-Cervantes, 2010), αλλά και μέθοδος ταυτόχρονου προσδιορισμού υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή UV, της ινδολο-3-καρβινόλης, του ινδολο-3-ακετονιτριλίου, του 2-προπένυλο ισοθειοκυανικού και του 2-φαιναίθυλο ισοθειοκυανικού σε κράμβη (Matthäus & Fiebig, 1996). Επιπλέον, ο ανιχνευτής συστοιχίας διόδων (DAD) έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για τον προσδιορισμό προϊόντων υδρόλυσης γλυκοζινολιτών. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων (DAD) έχει αναπτυχθεί για τον προσδιορισμό της σουλφοραφάνης σε μπρόκολο (Ares, Bernal, Martin, Bernal L. & Nozal, 2014), σε ραπανάκι (Sangthong & Weerapreeyakul, 2016). Ακόμα, έχει χρησιμοποιηθεί υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης για τον προσδιορισμό της ινδολο-3-καρβινόλης, του ινδολο-3-ακετονιτριλίου και του 3,3'-διινδολλομεθάνιου σε λαχανικά του *Brassica oleracea* (Bradfield & Bjeldanes, 1987).

Σημαντικό είναι να γίνει αναφορά και στη χρήση της υγρής χρωματογραφίας συνδυαστικά με φασματομετρία μαζών για τον προσδιορισμό των προϊόντων υδρόλυσης των γλυκοζινολιτών.

Φαίνεται πως υπάρχει μόνο μια μέθοδος στη βιβλιογραφία ταυτόχρονου προσδιορισμού ινδολο-3-καρβινόλης, ινδολο-3-ακετονιτριλίου, ινδολο-3-οξικού οξέος, ασκορβιγόνου και ινδολο-3-καρβοξαλδεϋδης. Ο ταυτόχρονος προσδιορισμός των παραπάνω ενώσεων έχει πραγματοποιηθεί τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υπερ-υψηλής ανάλυσης σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (UHPLC-MS) σε μια ποικιλία σταυρανθών λαχανικών (κουνουπίδι, κόκκινο λάχανο, λευκό λάχανο, πράσινο μπρόκολο, μωβ μπρόκολο, ραπανάκι και γογγύλι), η οποία φαίνεται να είναι μια πολύ γρήγορη μέθοδος που χαρακτηρίζεται από εξαιρετική γραμμικότητα και χαμηλά όρια ανίχνευσης (Revelou, Kokotou & Constantinou-Kokotou, 2018).

Τέλος, έχει αναπτυχθεί και μια ταχεία, αναλυτική μέθοδος για την ταυτόχρονη ποσοτικοποίηση της σουλφοραφάνης και της ινδολο-3-καρβινόλης στο μπρόκολο χρησιμοποιώντας υγρή χρωματογραφία υπερ-υψηλής απόδοσης σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (UPLC-MS) (Kokotou, Revelou, Pappas & Constantinou-Kokotou, 2017).

Πίνακας XXI Χρήση μεθόδων υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με διάφορους ανιχνευτές για την ανάλυση προϊόντων υδρόλυσης γλυκοζινολιτών.

Προϊόν υδρόλυσης	Πηγή	Τεχνική ανάλυσης	Ανιχνευτής	Βιβλιογραφική αναφορά
Σουλφοραφάνη	Μπρόκολο	HPLC	UV	Campas-Baypoli et al., 2010
Ινδολο-3-καρβινόλη	Κράμβη	HPLC	UV	Matthäus & Fiebig, 1996
Ινδολο-3-ακτεονιτρίλιο				
2-προπέυλο ισοθειοκυανικό				
2-φαιναίθυλο ισοθειοκυανικό				
Σουλφοραφάνη	Μπρόκολο	HPLC	DAD	Ares et al., 2014
Σουλφοραφάνη	Ραπανάκι	HPLC	DAD	Sangthong & Weerapreeyakul, 2016
Ινδολο-3-καρβινόλη	Brassica oleracea	RP-HPLC		Bradfield & Bjeldanes, 1987
Ινδολο-3-ακτεονιτρίλιο				
3,3'-διινδολυλομεθάνιο				
Ινδολο-3-καρβινόλη	Κουνουπίδι Κόκκινο λάχανο Λευκό λάχανο Πράσινο μπρόκολο Μωβ μπρόκολο Ραπανάκι Γογγύλι	UHPLC	MS/MS	Revelou et al., 2018
Ινδολο-3-ακτεονιτρίλιο				
Ινδολο-3-οξικό οξύ				
Ασκορβιγόνο				
Ινδολο-3-καρβοξαλδεΰδη				
Σουλφοραφάνη	Μπρόκολο	UPLC	MS/MS	Kokotou et al., 2017
Ινδολο-3-καρβινόλη				
Σουλφοραφάνη	Μπρόκολο Λάχανο	RP-HPLC	UV/VIS	Liang, Yuan, Dong & Liu, 2006

Έχει αναφερθεί η χρήση της υπερκρίσιμης ρευστής χρωματογραφίας (SFC) για την ανάλυση προϊόντων υδρόλυσης ινδολικών γλυκοζινολιτών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο ποσοτικός προσδιορισμός των διαφόρων παραγώγων της γλυκομπρασικίνης, συμπεριλαμβανομένων των ασκορβιγόνων, που σχηματίζονται από

την ινδολο-3-καρβινόλη παρουσία ασκορβικού οξέος. (Buskov, Olsen, Sørensen, & Sørensen, 2000). Ακόμα έχει αναφερθεί στην βιβλιογραφία και η χρήση της υπερκρίσιμης ρευστής χρωματογραφίας τόσο για την προπαρασκευαστική απομόνωση, όσο και για τους ποσοτικούς προσδιορισμούς μεμονωμένων ασκορβιγόνων, όπως ασκορβιγόνο, νεοασκορβιγόνο και 4-μεθοξυ-ασκορβιγόνο σε διάφορα λαχανικά Brassica και φυτά ελαιοκράμβης (Buskov, Hansen, Olsen, Sørensen, Sørensen & Sørensen, 2000).

Η χρωματογραφία αντίστροφης ροής υψηλής ταχύτητας (HSCCC) έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των ισοθειοκυανικών σε μεγαλύτερη κλίμακα αλλά και με ταυτόχρονη απλοποίηση της διαδικασίας προετοιμασίας του δείγματος. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η παραλαβή σουλφοραφάνης από σπόρους μπρόκολου με την μέθοδο αυτή (Liang, Li, Yuan & Vriesekoop, 2008).

Η αέρια χρωματογραφία (GC) είναι μια ακόμα μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση προϊόντων υδρόλυσης γλυκοζινολιτών. Η τεχνική της αέριας χρωματογραφίας με φασματομετρία μαζών έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό μόνο ορισμένων πτητικών ενώσεων, όπως τα ισοθειοκυανικά. Ωστόσο, εμφανίζονται ορισμένες δυσκολίες όσον αφορά τον ποιοτικό και ποσοτικό τους προσδιορισμό εξαιτίας της αστάθειάς τους σε υψηλές θερμοκρασίες, για αυτό τον λόγο εφαρμόζεται και παραγοντοποίηση πριν τον προσδιορισμό τους. Έχει αναφερθεί η χρήση της αέριας χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας για τον προσδιορισμό της σουλφοραφάνης σε μπρόκολο (Chiang, Pusateri & Leitz, 1998), σε μπρόκολο, λαχανάκια, πράσινο λάχανο, κόκκινο λάχανο, κινεζικό λάχανο και γογγύλι (Farag & Abdel Motaal, 2010), αλλά και σε δείγματα μουστάρδας για τον ποσοτικό προσδιορισμό ισοθειοκυανικών (Slater & Manville, 1993).

Η φασματοφωτομετρική μέθοδος UV-Vis, αποτελεί μια ακόμα μέθοδο για τον προσδιορισμό των προϊόντων υδρόλυσης των γλυκοζινολιτών και συγκεκριμένα προσδιορίζει έμμεσα το σύνολο των ισοθειοκυανικών ενώσεων. Τα οργανικά ισοθειοκυανικά αντιδρούν ποσοτικά με την περίσσεια διθειολών και παράγουν προϊόντα συμπύκνωσης. Έχει αναφερθεί η αντίδραση οργανικών ισοθειοκυανικών με την 1,2-βενζοδιθειόλη, δεδομένου ότι η 1,3-βενζοδιθειο-2-θειόνη που παράγεται μπορεί να προσδιοριστεί φασματοφωτομετρικά στα 365 nm. Η ευαισθησία της μεθόδου είναι της τάξης του 1 nmol. Ωστόσο, θεωρείται χρονοβόρα μέθοδος ανάλυσης

εξαιτίας του σταδίου της παραγωγοποίησης που προαπαιτείται (Zhang, Cho, Posner & Talalay, 1992). Ακόμα, εξέλιξη της παραπάνω μεθόδου είναι η χρήση της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης για τον διαχωρισμό του προϊόντος κυκλοσυμπύκνωσης, με την ευαισθησία της ανίχνευσης να έχει μειωθεί σε μερικά pmoles ισοθειοκυανικού (Zhang, Wade, Prestera & Talalay, 1996).

Μια ακόμα μέθοδος που έχει αναφερθεί στην βιβλιογραφία για τον προσδιορισμό των συνολικών ισοθειοκυανικών είναι η **φασματοσκοπία υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier με αποσβένουσα ολική ανάκλαση (ATR-FTIR)**. Χρησιμοποιήθηκε η φασματική περιοχή 2150-2020 cm^{-1} για τον ποσοτικό προσδιορισμό των συνολικών ισοθειοκυανικών σε μπρόκολο και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι αποτελεί μια ισοδύναμη μέθοδο ως προς την αναπαραγωγιμότητα και την ακρίβεια με την φασματοφωτομετρική μέθοδο UV-Vis με την οποία και συγκρίθηκε. Ωστόσο, φαίνεται να είναι απλούστερη και πιο γρήγορη από τις άλλες μεθόδους που έχουν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν αποτελώντας έτσι μια εναλλακτική λύση για τον προσδιορισμό των συνολικών ισοθειοκυανικών και σε άλλα σταυρανθή λαχανικά (Revelou, Kokotou, Pappas & Constantinou-Kokotou, 2017).

Ακόμα, έχει αναφερθεί στην βιβλιογραφία η ανάπτυξη μεθόδου **τριγοειδούς ηλεκτροφόρησης (CE)** για την ταυτόχρονη ποσοτικοποίηση των γλυκοζινολιτών και ισοθειοκυανικών σε εκχυλίσματα λαχανικών (λαχανάκια Βρυξελλών, χρένο, ραπανάκι και κάρδαμο). Η μέθοδος που αναπτύχθηκε απαιτεί ελάχιστη ποσότητα δείγματος και λίγα στάδια προετοιμασίας δείγματος, ενώ μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο για τον προσδιορισμό των γλυκοζινολιτών, την μέτρηση της δραστηκότητας μυροσινάσης, αλλά και την εκτίμηση της απελευθέρωσης ισοθειοκυανικού (Sándor Gonda, Kiss-Szikszai, Szűcs, Nguyen & Vasas, 2016).

Πίνακας XXII Συγκεντρωτικός πίνακας μεθόδων ανάλυσης προϊόντων υδρόλυσης γλυκοζινολιτών.

Μέθοδος ανάλυσης	Βιβλιογραφία
Χρωματογραφία χάρτου (PC)	Arora et al., 2017
Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC)	Kore et al., 1993 Croft, 1979
Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)	Πίνακας XXI
Υπερκρίσιμη ρευστή χρωματογραφία (SFC)	Buskov, Olsen, Sørensen, Sørensen, S., 2000 Buskov, Hansen, Olsen, Sørensen, J., Sørensen, H. & Sørensen, S., 2000
Χρωματογραφία αντίστροφης ροής υψηλής ταχύτητας (HSCCC)	Liang et al., 2008
Αέρια χρωματογραφία (GC)	Slater & Manville, 1993 Chiang et al., 1998 Farang & Abdel Motaal, 2010
Φασματοσκοπία υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier με αποσβένουσα ολική ανάκλαση (ATR-FTIR)	Revelou et al., 2017
Φασματοφωτομετρική μέθοδος UV-Vis	Zhang et al., 1992
Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (CE)	Sándor Gonda et al., 2016

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι γλυκοζινολίτες αποτελούν μια σημαντική κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών που παρατηρείται σε πολλές οικογένειες φυτών, με ευρέως γνωστή αυτή των σταυρανθών. Οι μεταβολίτες αυτοί μέσω της υδρόλυσής τους από το ένζυμο μυροσινάση και ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν, όπως το pH, η θερμοκρασία, η παρουσία ιόντων Fe^{2+} και επιπρόσθετων πρωτεϊνικών παραγόντων μετατρέπονται σε μια σειρά δραστικών ενώσεων όπως ισοθειοκυανικά, θειοκυανικά, νιτρίλια, επιθειονιτρίλια, υδροξυνιτρίλια και οξαζολιδινο-2-θειόνες ή ινδόλια, τα οποία έχουν χρήση σε διάφορες βιομηχανίες λόγω του ευρέος φάσματος των βιολογικών ιδιοτήτων τους, όπως η αντιμυκητιασική, η αντιβακτηριακή, η εντομοκτόνος και η αντικαρκινική τους δραστηριότητα. Έτσι, αυτές οι ιδιότητες, που χαρακτηρίζουν τους γλυκοζινολίτες και τα προϊόντα υδρόλυσής τους, καθιστούν σημαντικές τις μεθόδους εκχύλισής τους προκειμένου να απομονωθούν και να αξιοποιηθούν στη συνέχεια. Έχουν χρησιμοποιηθεί τόσο συμβατικές μέθοδοι ψυχρής και θερμής εκχύλισης καθώς και μη συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης, όπως η εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα, με υπερήχους, με παλμικό ηλεκτρικό πεδίο, με υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα και άλλες, οι οποίες φαίνεται σε πολλές περιπτώσεις να επιτυγχάνουν μείωση του χρόνου, της θερμοκρασίας εκχύλισης καθώς και της ποσότητας των διαλυτών που απαιτούνται, αλλά ταυτόχρονα να συνδυάζουν και υψηλότερη απόδοση και βελτίωση της ποιότητας των εκχυλισμένων ενώσεων σε σύγκριση με τις συμβατικές μεθόδους. Οι εκχυλισμένες ενώσεις στη συνέχεια οδηγούνται προς ανάλυση. Έχουν αναπτυχθεί διάφορες αναλυτικές μέθοδοι στη βιβλιογραφία. Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη τεχνική για τον προσδιορισμό των γλυκοζινολιτών είναι η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή UV ή DAD, ωστόσο εξαιτίας της απαιτητικής και χρονοβόρας προετοιμασίας του δείγματος, αφού απαιτείται αποθείωση, η βιωσιμότητα της μεθόδου έχει περιοριστεί. Για αυτό και προτιμάται η χρήση της υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας εξαιτίας της βελτιωμένης ευαισθησίας που παρουσιάζει για την ταυτοποίηση των γλυκοζινολιτών. Έτσι, πολλές είναι οι νέες τεχνικές ανάλυσης που έχουν αναπτυχθεί και συνεχίζουν να αναπτύσσονται και έχουν συγκρίσιμα και ακριβή αποτελέσματα με αυτήν, όπως η υπερκρίσιμη υγρή χρωματογραφία, η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση, η φασματοσκοπία υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier με αποσβένουσα ολική ανάκλαση (ATR-FTIR), η ανάλυση με μικροτσίπ, ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός και άλλες. Ωστόσο, δεν

υπάρχει κάποια ιδανική τεχνική εκχύλισης και ανάλυσης γλυκοζινολιτών και των προϊόντων υδρόλυσής τους, αφού κάθε μια από αυτές τις τεχνικές παρουσιάζει τα δικά της μειονεκτήματα και πλεονεκτήματα που πρέπει να αξιολογούνται πριν την επιλογή της κατάλληλης μεθόδου ανάλογα με το αν επιθυμούμε να προσδιορίσουμε το σύνολο των ολικών, τους άθικτους γλυκοζινολίτες ή τα προϊόντα υδρόλυσής τους. Τέλος, σημαντικό είναι να τονιστεί πως αν και υπάρχουν πολλά πρότυπα αναφοράς δεν είναι σε ικανοποιητικό βαθμό χημικά καθαρά, ενώ η περιορισμένη διαθεσιμότητά τους και το μεγάλο κόστος αγοράς τους καθιστά ακόμα πιο δύσκολη την αγορά και τη χρησιμοποίησή τους. Επομένως, πολύ χρήσιμη θα ήταν περαιτέρω έρευνα στο μέλλον για την επικύρωση των μεθόδων και της ακρίβειας των αναλυτικών διαδικασιών τους, ώστε τελικώς να δημιουργηθούν διεθνώς εγκεκριμένα πρωτόκολλα, αλλά και να αναπτυχθούν κατάλληλα πιστοποιημένα υλικά αναφοράς με βάση τα φυτά τα οποία θα είναι διαθέσιμα για χρήση στο εμπόριο.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Α/ ΕΛΛΗΝΙΚΗ

Θανόπουλος, Χ. (2008). *Τεχνική βιολογικής καλλιέργειας λαχανικών - Λάχανο*, Αθήνα: eContentplus Project, 6-8.

Ιατρού, Α. Γ. (2016). *Συστηματική Σπερματόφυτων-Αγγειόσπερμα Μέρος Α'*- Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. 2, 204-209.

Κατσαρού, Δ. (2014). *Βιοσύνθεση και ρύθμιση μεταβολισμού των γλυκοσινολικών οξέων στο φυτό *ErUCA sativa** (Διδακτορική Διατριβή). Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. Σχολή Επιστημών Υγείας. Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας.

Ολύμπιος, Χ. (2015). *Η τεχνική της καλλιέργειας των υπαίθριων κηπευτικών*. Αθήνα: Εκδόσεις Σταμούλης ΑΕ., 291-386.

Ρεβέλου, Π-Κ. (2018). *Απομόνωση βιοδραστικών ενώσεων από σταυρανθή λαχανικά: ταυτοποίηση και ποσοτικός προσδιορισμός με συνθετικές και φασματοσκοπικές τεχνικές* (Διδακτορική Διατριβή). Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Σχολή Τροφίμων Βιοτεχνολογίας και Ανάπτυξης. Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου. Εργαστήριο Χημείας.

Σάββας, Δ. (2016). *Γενική Λαχανοκομία*. Αθήνα: Πεδίο. 6-12, 44-50

Στρατή, Ε. (2014). *Μελέτη μεθόδων παραλαβής καροτενοειδών από παραπροϊόντα τομάτας*. (Διδακτορική Διατριβή). Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο. Σχολή Χημικών Μηχανικών. Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων.

Β/ ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ

Agerbirk, N., Olsen, C-E. (2015). Glucosinolate hydrolysis products in the crucifer *Barbarea vulgaris* include a thiazolidine-2-one from a specific phenolic isomer as well as oxazolidine-2-thiones. *Phytochemistry*, 115, 143-151.

Almushayti, Y.A., Brandt, K., Carroll, A. M., Scotter J.M. (2021). Current analytical methods for determination of glucosinolates in vegetables and human tissues.

Alvarez-Jubete, L., Valverde, J., Patras, A., Mullen, A. M., Marcos, B. (2014). Assessing the impact of high-pressure processing on selected physical and biochemical attributes of white cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata alba). *Food Bioprocess Technology*, 7, 682–692.

Ares, A. M., Bernal, J., Martin, M. T., Bernal, J. L., Nozal, M. J. (2014). Optimized formation, extraction and determination of sulforaphane in broccoli by liquid chromatography with diode array detection. *Food Analytical Methods*, 7(3), 730-740.

Ares, A. M., Bernal, J., Nozal, M. J., Turner, C., Plaza, M. (2015). Fast determination of intact glucosinolates in broccoli leaf by pressurized liquid extraction and ultra high performance liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Food Research International*, 76, 498-505.

Ares, A. M., Nozal, M. J., Bernal, J. L., Bernal, J. (2014). Effect of temperature and light exposure on the detection of total intact glucosinolate content by LC–ESI–MS in broccoli leaves. *Food Analytical Methods*, 7(8), 1687–1692.

Arora, R., Bhushan, S., Arora, S. (2017). Changing Trends in the Methodologies of Extraction and Analysis of Hydrolytic Products of Glucosinolates: A Review. 383-405. In: Mérillon JM., Ramawat K. (eds) *Glucosinolates*. Reference Series in Phytochemistry. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-25462-3_13

Assefa, A. D., Choi, S., Lee, J.-E., Sung, J.-S., Hur, O.-S., Ro, N.-Y., Lee, H.-S., Noh, J., Hwang, A., Ko, H.-C. (2019). Determination of glucosinolate contents in Brassica germplasm collections and inter- & intra-leaves distribution pattern using UPLC-MS/MS Multiple Reaction Monitoring scan mode. *BioRxiv: The preprint server for biology*. doi:<https://doi.org/10.1101/569889>

Azarenko, O., Jordan, M. A., Wilson, L. (2014). Erucin, the major isothiocyanate in arugula (*Eruca sativa*), inhibits proliferation of MCF7 tumor cells by suppressing microtubule dynamics. *PLoS ONE*, 9(6): e100599. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100599>

Beekwilder, J., Bertossi, M., Grandi, V., Mizzi, L., Soloviev, M., Szabados, L., Mizzi, L., Soloviev, M., Szabados, L., Molthoff, J. W., Schipper, B., Verbocht, H., Ric de Vos, C. H., Morandini, P., Aarts, G. M., Bovy, A. (2008). The Impact of the Absence of Aliphatic Glucosinolates on Insect Herbivory in Arabidopsis. *PLoS ONE*, 3(4): e2068. doi:10.1371/journal.pone.0002068

Bonnesen, I., Eggleston, M., Hayes, J. (2001). Dietary indoles and isothiocyanates that are generated from cruciferous vegetables can both stimulate apoptosis and confer protection against DNA damage in human colon cell lines. *Cancer Research*, 61, 6120-6130

Bradfield, C. A., Bjeldanes, L. F. (1987). High-performance liquid chromatographic analysis of anticarcinogenic indoles in Brassica oleracea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35(1), 46-49.

Bringmann, G., Kajahn, I., Neusüß, C., Pelzing, M., Laug, S., Unger, M., Holzgrabe, U. (2005). Analysis of the glucosinolate pattern of seeds by capillary zone electrophoresis coupled to electrospray ionization-mass spectrometry. *ELECTROPHORESIS*, 26(7-8), 1513-1522

Buskov, S., Hansen, L.B., Olsen, C. E., Sørensen, J. C., Sørensen, H., Sørensen, S. (2000). Determination of ascorbigens in autolysates of various Brassica species using supercritical chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(7), 2693-2701.

Buskov, S., Olsen C. E., Sørensen, H., Sørensen, S. (2000). Supercritical fluid chromatography as basis for identification and quantitative determination of indol-3-ylmethyl oligomers and ascorbigens. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 43(1-3), 175-195.

Butz, P., Edenharder, R., Fernandez Garcia, A., Fister, H., Merkel, C., Tauscher, B. (2002). Changes in functional properties of vegetables induced by high pressure treatment. *Food Research International*, 35(2-3), 295-300.

Cai, Z., Cheung, C.-Y., Ma, W.-T., Au, W.-M., Zhang, X.Y., Lee, A. (2004). Determination of two intact glucosinolates in vegetables and Chinese herbs. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378(3), 827-833.

Campas-Baypoli, O. N., Sánchez-Machado, D. I., Bueno-Solano, C., Ramírez-Wong, B., López-Cervantes, J. (2010). HPLC method validation for measurement of sulforaphane level in broccoli by-products. *Biomedical Chromatography*, 24(4), 387-392.

Capriotti, A. L., Cavaliere, C., La Barbera, G., Montone, C. M., Piovesana, S., Zenezini Chiozzi, R., Laganà, A. (2018). Chromatographic column evaluation for the untargeted profiling of glucosinolates in cauliflower by means of ultra-high performance liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry. *Talanta*, 179, 792-802.

Cartea, M, Velasco, P. (2007). Glucosinolates in Brassica foods: bioavailability in food and significance for human health. *Phytochemistry*, 7, 213–229.

Chang, X., Tou, J. C., Hong, C., Kim, H. A., Riby, J. E., Firestone, G. L., Bjeldanes, L. F. (2005). 3,3'-Diindolylmethane inhibits angiogenesis and the growth of transplantable human breast carcinoma in athymic mice. *Carcinogenesis*, 26(4), 771-778.

Chen, Z., Qi, M., Auburn, J., Carter, H. (2001). Indole-3-carbinol and diindolylmethane induce apoptosis of human cervical cancer cells and in murine HPV16-transgenic preneoplastic cervical epithelium. *The Journal of Nutrition*, 131(12), 3294-3302.

Chiang, W. C. K., Pusateri, D. J., Leitz, R. E. A. (1998). Gas chromatography/mass spectrometry method for the determination of sulforaphane and sulforaphane nitrile in broccoli. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(3), 1018-1021.

Chiao, J. W., Chung, F., Krzeminski, J., Amin, S., Arshad, R., Ahmed, T., Conaway, C.C. (2000). Modulation of growth of human prostate cancer cells by the N-acetylcysteine conjugate of phenethyl isothiocyanate. *International journal of oncology*, 16(6), 1215-1219.

Clarke, B. (2010). Glucosinolates, structures and analysis in food. *Royal Society of Chemistry*, 4(2), 310-325.

Croft, G. A. (1979). The determination of total glucosinolates in rapeseed meal by titration of enzyme-liberated acid and the identification of individual glucosinolates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 30(4), 417-423.

Delonga, K., Dragović-Uzelac, V., Mrkić, V., Vorkapić-Furač, J. (2007). Distribution of glucosinolates in some raw and processed Brassica vegetables grown in Croatia. *Acta Alimentaria*, 36(2), 207-216.

Deng, Q., Zinoviadou, K., Galanakis, C., Orlie, V., Grimi, N., Vorobiev, E., Lebovka, N. & Barba J.B. (2015). The Effects of Conventional and Non-conventional Processing on Glucosinolates and Its Derived Forms, Isothiocyanates: Extraction, Degradation, and Applications. *Food Engineering Reviews*, 7, 57–381.

Doheny-Adams, T., Redeker, K., Kittipol, V., Bancroft, I. & Hartley S. E (2017). Development of an efficient glucosinolate extraction method. *Plant Methods*, 13(17). DOI 10.1186/s13007-017-0164-8

Doorn, E. H., Holst, G.-J., Kruk, G.C., Raaijmakers-Ruijs, N., Postma, E. (1998). Quantitative Determination of the Glucosinolates Sinigrin and Progoitrin by Specific Antibody ELISA Assays in Brussels Sprouts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(2), 793–800.

Ebrahimi, S. R., Nikkhah, A., Sadeghi, A. A. (2010). Changes in nutritive value and digestion kinetics of canola seed due to microwave irradiation. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 23(3), 347-354.

Edger, P. P., Hall, J. C., Harkess, A., Tang, M., Coombs, J., Mohammadin, S. M Schranz, E., Xiong, Z., Leebens-Mack, J., Meyers, C. B., Sytsma, J. K., Koch, A. K., Al-Shehbaz, A. I., Pires, J. C. (2018). Brassicales phylogeny inferred from 72 plastid genes: A reanalysis of the phylogenetic localization of two paleopolyploid events and origin of novel chemical defenses. *American Journal of Botany*, 105(3), 464-465.

Esteve, M. (2020). Mechanisms Underlying Biological Effects of Cruciferous Glucosinolate-Derived Isothiocyanates/Indoles: A Focus on Metabolic Syndrome. *Frontiers Nutrition*, 7, 111.

Fahey, J. W., Haristoy, X., Dolan, P. M., Kensler, T.W., Scholtus, I., Stephenson, K. K., Talalay, P., Lozniewski, A. (2002). Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[a]pyrene-induced stomach tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(11), 7610-7615.

Fahey, W.J., Wad, L.W., Stephenson, K. K., Chou, F.E. (2003). Separation and purification of glucosinolates from crude plant homogenates by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 996(1-2), 85-93.

Farag, M. A. & Abdel Motaal, A. A. (2010). Sulforaphane composition, cytotoxic and antioxidant activity of crucifer vegetables. *Journal of Advanced Research*, 1(1), 65-70.

Fernández-León, A. M., Fernández-León, M. F., González-Gómez, D., Ayuso, M. C., Bernalte, M. J. (2017). Quantification and bioaccessibility of intact glucosinolates in broccoli 'Parthenon' and Savoy cabbage 'Dama'. *Journal of Food Composition and Analysis*, 61, 40-46.

Fernández-León, M. F., Fernández-León, A. M., Lozano, M., Ayuso, M. C., González-Gómez, D. (2012). Identification, quantification and comparison of the principal bioactive compounds and external quality parameters of two broccoli cultivars. *Journal of Functional Foods*, 4(2), 465-473.

Fimognari, C., Nüsse, M., Iori, R., Cantelli-Forti, G., Hrelia, P. (2004). The new isothiocyanate 4-(methylthio)butyl isothiocyanate selectively affects cell-cycle progression and apoptosis induction of human leukemia cells. *Investigational New Drugs*, 22(2), 119-129.

Fonta Mercedes, R., Celestino, R., Cartea, E., Haro-Bailóna, A. (2005). Quantification of glucosinolates in leaves of leaf rape (*Brassica napus* ssp. *pabularia*) by near-infrared spectroscopy. *Phytochemistry*, 66(2), 175-185.

Fouad, M., Jabasini, M., Kaji, N., Terasaka, K., Tokeshi, M., Mizukami, H., Baba, Y. (2008). Microchip analysis of plant glucosinolates. *Electrophoresis*, 29(11), 2280-2287.

Francisco, M., Moreno, D. A., Cartea, M. E. Ferreres, F., García-Viguera, C., Velasco, P. (2009). Simultaneous identification of glucosinolates and phenolic compounds in a representative collection of vegetable Brassica rapa. *Journal of Chromatography A*, 1216(38), 6611-6619.

Frandsen, H. B., Markedal, K. E., Martin-Belloso, O. (2014). Effects of novel processing techniques on glucosinolates and membrane associated myrosinases in broccoli. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 64(1), 17–25.

Galanakis M. C. (2019). Chapter 8 - Recovery techniques, stability, and applications of glucosinolates. *Glucosinolates: Properties, Recovery, and Applications*, 251-280.

Ghawi, S. K., Methven, L., Niranjana, K. (2013). The potential to intensify sulforaphane formation in cooked broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) using mustard seeds (*Sinapis alba*). *Food Chemistry*, 138(2-3), 1734–1741.

Gratacós-Cubarsí, M., Ribas-Agustí, A., García-Regueiro, J. A., Castellari, M. (2010). Simultaneous evaluation of intact glucosinolates and phenolic compounds by UPLC-DAD-MS/MS in *Brassica oleracea* L. var. *botrytis*. *Food Chemistry*, 121(1), 257-263.

Halkier, B. A., Du, L. (1997). The biosynthesis of glucosinolates. *Trends In Plant Science*, 2(11), 425–431.

Higdon, V., Delage, B., Williams, D., Dashwood, R. (2007). Cruciferous vegetables and human cancer risk: epidemiologic evidence and mechanistic basis. *Pharmacological Research*, 55(3), 224-236.

Hwang, I. M., Park, B., Dang, Y. M., Kim, S.-Y., Seo, H. Y. (2019). Simultaneous direct determination of 15 glucosinolates in eight Brassica species by UHPLC-Q-Orbitrap-MS. *Food Chemistry*, 282(1), 127-133.

Ishida, M., Hara, M., Fukino, N., Kakizaki, T. & Morimitsu, Y. (2014). Glucosinolate metabolism, functionality and breeding for the improvement of Brassicaceae vegetables. *Breeding Science*, 64,48–59.

Jadhav, U., Ezhilarasan, R., Vaughn, S., Berhow, A. Mohanam, S. (2007). Iberin induces cell cycle arrest and apoptosis in human neuroblastoma cell. *International Journal of Molecular Medicine*, 19(3), 353-361.

Jeong, W.-S., Kim, I.-W., Hu, R., Kong, A.-N. T. (2004). Modulatory properties of various natural chemopreventive agents on the activation of NF- κ B signaling pathway. *Pharmaceutical Research*, 21(4), 661-670.

Jiang, Y., Fang, Y., Ye, Y., Xinming, X., Wang, B., Gu, J., Aschner, M., Chen, J., Lu, R. (2019). Anti-Cancer Effects of 3, 3'-Diindolylmethane on Human Hepatocellular Carcinoma Cells Is Enhanced by Calcium Ionophore: The Role of Cytosolic Ca²⁺ and p38 MAPK. *Frontiers In Pharmacology*, 10, 1167. doi: 10.3389/fphar.2019.01167

Johnson, I. T. (2002). Glucosinolates: bioavailability and importance to health. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 72(1), 26–31.

Kim, B.-R., Hu, R., Keum, Y.-S., Hebbar, V., Shen, G., Nair, S. S., Kong, A.-N. T (2003). Effects of Glutathione on Antioxidant Response Element-Mediated Gene Expression and Apoptosis Elicited by Sulforaphane. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 209(2), 105-113.

Kim, D. S., Jeong, Y. M., Moon, S. I., Kim, S. Y., Kwon, S. B., Park, E. S., Youn, S. W., Park, K. C. (2006). Indole-3-carbinol enhances ultraviolet B-induced apoptosis by sensitizing human melanoma cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(22), 2661-2668.

Kim, J. H., Lee, B. W., Schroeder, F. C., Jander, G. (2008). Identification of indole glucosinolate breakdown products with antifeedant effects on *Myzus persicae* (green peach aphid). *The Plant Journal*, 54(6), 1015-1026.

Kim, S.-Y., Seo, H.-Y., Ha, J.-H. (2020). A colorimetric sensor array for the discrimination of glucosinolates. *Food Chemistry*. Volume: 328, 127149. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127149>

Kliebenstein, D., Lambrix, V., Reichelt, M., Gershenzon, J., Mitchell-Olds, T. (2001). Gene Duplication in the Diversification of Secondary Metabolism: Tandem 2-

Oxoglutarate-Dependent Dioxygenases Control Glucosinolate Biosynthesis in Arabidopsis. *The plant cell*, 13, 681–693.

Kokotou, G. M., Revelou, P.-K., Pappas, C., Constantinou-Kokotou, V. (2017). High resolution mass spectrometry studies of sulforaphane and indole-3-carbinol in broccoli. *Food Chemistry*, 237, 566-573.

Kore, A. M., Spencer, G. F., Wallig, M. A. (1993). Purification of the omega-(methylsulfinyl)alkyl glucosinolate hydrolysis products: 1-isothiocyanato-3-(methylsulfinyl)propane, 1-isothiocyanato-4-(methylsulfinyl)butane, 4-(methylsulfinyl)butanenitrile, and 5-(methylsulfinyl)pentanenitrile from broccoli and *Lesquerella fendleri*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 89–95.

Lee, J. G., Bonnema, G., Zhang, N., Kwak, J. H., De Vos, R. C. H., Beekwilder, J. (2013). Evaluation of glucosinolate variation in a collection of turnip (*Brassica rapa*) germplasm by the analysis of intact and desulfo glucosinolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(16), 3984-3993.

Liang, H., Yuan, Q. P., Dong, H. R., Liu Y. M. (2006). Determination of sulforaphane in broccoli and cabbage by high-performance liquid chromatography. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(5), 473-476.

Liang, H., Li, C., Yuan, Q., Vriesekoop, F. (2008). Application of High-Speed Countercurrent Chromatography for the Isolation of Sulforaphane from Broccoli Seed Meal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(17), 7746–7749.

Liang, X., Wen Lee, H., Li, Z., Lu, Y., Zou, L., Nam Ong, C. (2018). Simultaneous Quantification of 22 Glucosinolates in 12 Brassicaceae Vegetables by Hydrophilic Interaction Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *ACS Omega*, 3(11), 15546–15553.

Lysak M. A. (2018). Brassicales: an update on chromosomal evolution and ancient polyploidy. *Plant Systematics and Evolution*. 304(6930), 757–762.

Maldini, M., Baima, S., Morelli, G., Scaccini, C., Natella, F. (2012). A liquid chromatography-mass spectrometry approach to study "glucosinoloma" in broccoli sprouts. *Journal of Mass Spectrometry*, 47(9), 1198-1206.

Matthäus, B., Fiebig, H. J. (1996). Simultaneous determination of isothiocyanates, indoles, and oxazolidinethiones in myrosinase digests of rapeseeds and rapeseed meal by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(12), 3894-3899.

Mellon, F. A., Bennett, R. N., Holst, B., Williamson, G. (2002). Intact glucosinolate analysis in plant extracts by programmed cone voltage electrospray LC/MS: Performance and comparison with LC/MS/MS methods. *Analytical Biochemistry*, 306(1), 83-91.

Miao, H, Wang, J., CaiJiaqi, C., Chang, J., Zhao, Y. & Wang, Q. (2017). Accumulation of Glucosinolates in Broccoli Reference Series in Phytochemistry. *Glucosinolates* ,133-162.

Misiewicz, I., Skupinska, K., Kasprzycka-Guttman, T. (2003). Sulforaphane and 2-oxohexyl isothiocyanate induce cell growth arrest and apoptosis in L-1210 leukemia and ME-18 melanoma cells. *Oncology reports*, 10(6), 2045-2050.

Mithen, R. F., Dekker, M., Verkerk, R., Rabot, S., Johnson, I. T. (2000). The nutritional significance, biosynthesis and bioavailability of glucosinolates in human foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 967-984.

Mohn, T., Cutting, B., Ernst, B., Hamburger, M. (2007). Extraction and analysis of intact glucosinolates-A validated pressurized liquid extraction/liquid chromatography-mass spectrometry protocol for *Isatis tinctoria*, and qualitative analysis of other cruciferous plants. *Journal of Chromatography A*, 1166(1-2), 142-151.

Moreno, D. A., Carvajal, M., López-Berenguer, C., García-Viguera, C. (2006). Chemical and biological characterisation of nutraceutical compounds of broccoli *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(5), 1508-1522.

Nachshon-Kedmi, M., Yannai, S., Haj, A., Fares, A. (2003). Indole-3-carbinol and 3,3'-diindolylmethane induce apoptosis in human prostate cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, 41(6), 745-752.

Ouassou, M., Mukhaimar, M., Amrani E. A., Kroymanna, J., Chauveau, O. (2019). Biosynthèse des glucosinolates indoliques et rôle écologique de leurs

modifications secondaires Biosynthesis of indole glucosinolates and ecological role of secondary modification pathways. *Comptes Rendus Biologies*, 342(3-4), 58-80.

Parchem, K., Piekarska, A., Bartoszek, A. (2020). Chapter 3 - Enzymatic activities behind degradation of glucosinolates. *Academic press*, 76-106. doi: 10.1016/B978-0-12-816493-8.00003-2

Petersen, A., Wang, C., Crocoll, C., Halkier, B. (2018). Biotechnological approaches in glucosinolate production. *Journal of Integrative Plant Biology*, 60(12), 1231–1248.

Pongmalai, P., Devahastin, S., Chiewchan, N., Soponronnarit, S., (2013). Effect of ultrasonic pretreatment on extractability of glucosinolates from cabbage outer leaves. Rajamangala University of Technology Thanyaburi. *Faculty of Engineering*, 119-122.

Pullar, J. M., Thomson, S. J., King, M. J., Turnbull, C. I., Midwinter, R. G., Hampton, M. (2004). The chemopreventive agent phenethyl isothiocyanate sensitizes cells to Fas-mediated apoptosis. *Carcinogenesis*, 25(5), 765-772.

Redovniković, I. R., Glivetić, T., Delonga, K., Furač, J. V. (2008). Glucosinolates and their potential role in plant. *Periodicum Biologorum*, 110(4), 297-309.

Revelou, P. K., Kokotou, M. G., Pappas, C. S., Constantinou-Kokotou, V. (2017). Direct determination of total isothiocyanate content in broccoli using attenuated total reflectance infrared Fourier transform spectroscopy. *Journal of Food Composition and Analysis*, 61, 47-51.

Revelou, P-K., Kokotou, G. M., Constantinou-Kokotou, V. (2018). Determination of indole-type phytonutrients in cruciferous vegetables. *Natural Product Research. Formerly Natural Product Letters*, 34(17), 2554-2557

Reverchon, E. (1997). Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products. *The Journal of Supercritical Fluids*, 10(1), 1–37.

Rollin, P, Tatibouët, A. (2011). Glucosinolates: The synthetic approach. *Elsevier*, 14(2-3), 194-204.

Rosea, P., Huangb, Q., Ongb, C. N., Whitemana, M. (2005). Broccoli and watercress suppress matrix metalloproteinase-9 activity and invasiveness of human MDA-MB-231 bre. *Cancer Research*, 63(21), 7520-7525.

Sahamishirazi, S., Zikelia, S., Fleck, M., Claupein, W., Graeff-Hoenninger, S. (2017). Development of a near-infrared spectroscopy method (NIRS) for fast analysis of total, indolic, aliphatic and individual glucosinolates in new bred open pollinating genotypes of broccoli (*Brassica oleracea* convar. botrytis var. italica). *Food Chemistry*, 232, 272-277.

Salunkhe, D. K., Kadam, S. S. (1998). Handbook of vegetable science and technology: production, composition, storage, and processing, (1st ed.), 299-372. *CRC Press*.

Šamec, D. & Salopek-Sondi, B. (2019). Chapter 3.11 - Cruciferous (Brassicaceae) Vegetables, 195-202. *Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements*. In Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812491-8.00027-8>

Šamec, D., Pavlović, I. & Salopek-Sondi, B. (2017). White cabbage (*Brassica oleracea* var. capitata f. alba): botanical, phytochemical and pharmacological overview. *Phytochemistry Reviews*, 16, 117–135.

Sándor Gonda, S., Kiss-Szikszai, A., Szűcs, Z., Nguyen, M. N., Vasas, G. (2016). Myrosinase Compatible Simultaneous Determination of Glucosinolates and Allyl Isothiocyanate by Capillary Electrophoresis Micellar Electrokinetic Chromatography (CE-MEKC). *Phytochemical analysis*, 27 (3-4), 191-198.

Sangthong, S., Weerapreeyakul, N. (2016). Simultaneous quantification of sulforaphane and sulforaphane by reverse phase HPLC and their content in *Raphanus sativus* L. var. caudatus Alef extracts. *Food Chemistry*, 201, 139-144.

Sasaki, K., Neyazaki, M., Shindo, K., Ogawa, T., Momose, M. (2012). Quantitative profiling of glucosinolates by LC–MS analysis reveals several cultivars of cabbage and kale as promising sources of sulforaphane. *Journal of chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 903, 171–176.

Sasaki, K., Neyazaki, M., Shindo, K., Ogawa, T., Momose, M. (2012). Quantitative profiling of glucosinolates by LC–MS analysis reveals several cultivars of cabbage and kale as promising sources of sulforaphane. *Journal of Chromatography B*, 903, 171-176.

Schnug, E. (1987). Eine Methode zur schnellen und einfachen Bestimmung des Gesamtglucosinolatgehaltes in Grünmasse und Samen von Kruziferen durch die quantitative Analyse enzymatisch freisetzbaren Sulfates. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 89(11), 415-456.

Sharma, H. K., Ingle, S., Singh, C., Sarkar, B.C., Upadhyay, A. (2012). Effect of various process treatment conditions on the allyl isothiocyanate extraction rate from mustard meal. *Journal of Food Science Technology*, 49(3), 368–372.

Simona, I. (2012). Comparative Fingerprint of Glucosinolates from Brassica Vegetables Using HATR/FT-MIR Spectroscopy. *Agriculture*, 69(2), 430-439.

Simpson, G. M. (2019). *Plant Systematics*. In Academic Press, 8 - Diversity and Classification of Flowering Plants: Eudicots (Third Edition), 285-466. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812628-8.50008-0>

Skutlarek, D., Färber, H., Lippert, F., Ulbrich, A., Wawrzun, A., Büning-Pfaue, H.(2004) Determination of glucosinolate profiles in Chinese vegetables by precursor ion scan and multiple reaction monitoring scan mode (LC-MS/MS). *European Food Research Technology*, 219, 643-649.

Slater, G. P., Manville, J. F. (1993). Analysis of thiocyanates and isothiocyanates by ammonia chemical ionization gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Chromatography A*, 648(2), 433-443.

Śmiechowska, A., Bartoszek, A., & Namieśnik, J. (2010). Determination of Glucosinolates and Their Decomposition Products—Indoles and Isothiocyanates in Cruciferous Vegetables. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 40(3), 202-216.

Sønderby, I. E., Geu-Flores, F., Halkier, B. A. (2010). Biosynthesis of glucosinolates – gene discovery and beyond. *Trends in Plant Science*, 15(5), 283-290.

Srivastava, S., Singh, S. (2004). 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. *Carcinogenesis*, 25, 1701-1709.

Srivastava, S., Xiao, D., Lew, L., Hershberger, P., Kokkinakis, D., Johnson, M., Trump, L. D., Shivendra V Singh, V. S. (2003). Allyl isothiocyanate, a constituent of cruciferous vegetables, inhibits growth of PC-3 human prostate cancer xenografts in vivo. *Carcinogenesis*, 24(10), 1665-1670.

Sut, S., Boschiero, I., Solana, M., Malagoli, M., Bertucco, A., Dall'Acqua S. (2018). Supercritical CO₂ Extraction of *Eruca sativa* Using Cosolvents: Phytochemical Composition by LC-MS Analysis. *Phytochemical Composition by LC-MS Analysis*, 23(12), 3240.

Szmigielska, A. M., Schoenau, J. J. (2000). Use of anion-exchange membrane extraction for the high-performance liquid chromatographic analysis of mustard seed glucosinolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(11), 190–5194.

Tanongkankit, Y., Sablani, S. S., Chiewchan, N., Devahastin, S. (2013). Microwave-assisted extraction of sulforaphane from white cabbages: effects of extraction condition, solvent and sample pretreatment. *Journal of Food engineering*, 117(1), 151–157.

Tian, M., Bi, W., Row, K.H. (2013). Multi-phase extraction of glycoraphanin from broccoli using aminium ionic liquid-based silica. *Phytochemical Analysis*, 24(1), 81–86.

Tian, Q., Rosselot, R. A., Schwartz, S. J. (2005). Quantitative determination of intact glucosinolates in broccoli, broccoli sprouts, Brussels sprouts, and cauliflower by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 343(1), 93-99.

Trenerly, V. C., Caridi, D., Elkins, A., Donkor, O., Jones, R. (2006). The determination of glucoraphanin in broccoli seeds and florets by solid phase extraction and micellar electrokinetic capillary chromatography. *Food Chemistry*, 98(1), 179-187.

Troyera, K. J., Stephenson, K. K., Fahey, J. W. (2001). Analysis of glucosinolates from broccoli and other cruciferous vegetables by hydrophilic interaction liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 919(2), 299-304.

Van Eylen, D., Bellostas, N., Strobel, B. W., Oey, I., Hendrick, M., Van Loey, A., Sørensen, H., Sørensen J.C. (2009). Influence of pressure/temperature treatments on glucosinolate conversion in broccoli (*Brassica oleracea* L. cv *Italica*) heads. *Food Chemistry*, 112(3), 646-653.

Van Eylen, D., Oey, I., Hendrick, M., Van Loey, A. (2008). Effects of pressure/temperature treatments on stability and activity of endogenous broccoli (*Brassica oleracea* L. cv. *Italica*) myrosinase and on cell permeability. *Journal of Food Engineering*, 89(2), 178-186.

Vig, A., Rampal, G., Singh, T., Arora, S. (2009). Bio-protective effects of glucosinolates – A review. *LWT - Food Science and Technology*, 42(10), 1561-1572.

Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., Bates, D. (2008). Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry: a review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(2), 161–169.

WadeJan, W. K., Garrard, J. I., Fahey, W. J. (2007). Improved hydrophilic interaction chromatography method for the identification and quantification of glucosinolates. *Journal of Chromatography A*, 1154(1–2), 469-472.

Wang, L., Weller, C. L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends In Food Science Technology*, 17(6), 300–312.

Wang, T., Liang, H., Yuan, Q. (2011). Optimization of ultrasonic-stimulated solvent extraction of sinigrin from Indian mustard seed (*Brassica Juncea* L.) using response surface methodology. *Phytochemical Analysis*, 22(3), 205–213.

West, L., Tsui, I., Haas, G. (2002). Single column approach for the liquid chromatographic separation of polar and non-polar glucosinolates from broccoli sprouts and seeds. *Journal of Chromatography A*, 966(1–2), 227-232.

Wiebe, H-J., (1986). Brassicaceae (Cruciferae-Kreuzblutter). In: Gemuseproduktion. Ein Lehr und Nachschlagewerk für Studium und Praxis. Paul Parey, Berlin und Hamburg, Germany, 270-311

Wu, H., Zhang, G-A., Zeng, S., Lin, K-C. (2009). Extraction of allyl isothiocyanate from horseradish (*Armoracia rusticana*) and its fumigant insecticidal activity on four stored-product pests of paddy. *Pest Management Science*, 65(9), 1003–1008.

Xu, K., Thornalley, P. J. (2000). Studies on the mechanism of the inhibition of human leukaemia cell growth by dietary isothiocyanates and their cysteine adducts in vitro. *Biochemical Pharmacology*, 60(2), 221-231.

Yu, R., Mandlekar, S., Harvey, K.J., Ucker, D.S., Kong, A-N.T. (1998). Chemopreventive isothiocyanates induce apoptosis and caspase-3-like protease activity. *Cancer Research*, 58(3), 402-408.

Zabaras, D., Roohani, M., Krishnamurthy, R., Cochet, M., Delahunty, C.M. (2013). Characterisation of taste-active extracts from raw *Brassica oleracea* vegetables. *Food and Function*, 4(4), 592-601.

Zhang, Y., Cho, C.-G., Posner, H. G., Talalay, P. (1992). Spectroscopic quantitation of organic isothiocyanates by cyclocondensation with vicinal dithiols. *Analytical Biochemistry*, 205(1), 100-107.

Zhang, Y., Wade, L. K., Prester, T., Talalay, P. (1996). Quantitative Determination of Isothiocyanates, Dithiocarbamates, Carbon Disulfide, and Related Thiocarbonyl Compounds by Cyclocondensation with 1,2-Benzenedithiol. *Analytical Biochemistry*, 239(2), 160-167.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



analytica

an Open Access Journal by MDPI

CERTIFICATE OF ACCEPTANCE

Certificate of acceptance for the manuscript (**analytica-1361585**) titled:
Current Methods for the Extraction and Analysis of Isothiocyanates and Indoles in
Cruciferous Vegetables

Authored by:

Sofia Karanikolopoulou; Panagiota-Kyriaki Revelou; Marinos Xagoraris; Maroula G.
Kokotou; Violetta Constantinou-Kokotou

has been accepted in *Analytica* (ISSN 2673-4532) on 17 September 2021



Academic Open Access Publishing
since 1996

Basel, September 2021



analytica



Review

Current Methods for the Extraction and Analysis of Isothiocyanates and Indoles in Cruciferous Vegetables

Sofia Karanikolopoulou¹, Panagiota-Kyriaki Revelou^{1,2*}, Marinos Xagoraris², Maroula G. Kokotou² and Violetta Constantinou-Kokotou²

¹ Department of Food Science and Technology, University of West Attica, Ag. Spyridonos str, Egaleo 12243, Athens, Greece; ft17035@uniwa.gr (S.K.); p.revelou@uniwa.gr (P.K.R.)

² Laboratory of Chemistry, Department of Food Science and Human Nutrition, Agricultural University of Athens, 75 Iera Odos, Athens 11855, Greece; mxagor@aua.gr (M.X); mkokotou@aua.gr (M.G.K); vikon@aua.gr (V.C.K.)

* Correspondence: p.revelou@uniwa.gr; Tel. +30-2105294249.

Abstract: Cruciferous vegetables are characterized by the presence of sulfur-containing secondary plant metabolites known as glucosinolates (GLS). The consumption of cruciferous vegetables such as broccoli, cabbage, rocket salad, and cauliflower has been related to the prevention of non-communicable diseases. Their beneficial effects are attributed to the enzymatic degradation products of GLS, e.g., isothiocyanates and indoles. Owing to these properties, there has been a shift in the last few years towards the research of these compounds and a wide range of methods for their extraction and analytical determination have been developed. The aim of this review is to present the sample preparation and extraction procedures of isothiocyanates and indoles from cruciferous vegetables and the analytical methods for their determination. The majority of the references that have been reviewed are from the last decade. Although efforts towards the application of eco-friendly non-conventional extraction methods have been made, the use of conventional solvent extraction is mainly applied. The major analytical techniques employed for the qualitative and quantitative analysis of isothiocyanates and indoles are high-performance liquid chromatography and gas chromatography coupled with or without mass spectrometry detection. Nevertheless, the analytical determination of isothiocyanates presents several problems due to their instability and the absence of chromophores, making the simultaneous determination of isothiocyanates and indoles a challenging task.

Citation: Karanikolopoulou, S.; Revelou, P.-K.; Xagoraris, M.; Kokotou, M.G.; Constantinou-Kokotou V. A Current Methods for the Extraction and Analysis of Isothiocyanates and Indoles in Cruciferous Vegetables. *Analytica* 2021, 2, Firstpage–Lastpage.
<https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor: Firstname Last-name

Keywords: Brassicaceae; sulfuraphane; indole-3-carbinol; broccoli; extraction; HPLC; GC; glucosinolates; mass spectrometry