

Oponentský posudek na doktorskou disertační práci:

„*Významné sirné metabolity v rostlinách čeledi Alliaceae (česnekovitě)*“

kterou předložila

**Ing. Petra Krejčová**

Práce byla vypracována na Katedře aplikované chemie, ZF Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

K obhajobě je předkládána disertační práce zabývající se problematikou aktivních sirných sloučenin v méně známých rostlinách čeledi Alliaceae. Práce se zabývá zejména identifikací sirných biologicky aktivních látek a způsobem jejich vzniku z příslušných prekurzorů. Podobně významnou část práce představuje stanovení širokého spektra biologických aktivit identifikovaných sirných látek. Výsledky získané v těchto studiích jsou velkým přínosem, neboť přesnému popisu struktury a vzniku sirných látek česnekovitých rostlin ani jejich biologickým účinkům není v literatuře věnována dostatečná pozornost. Navíc jsou výsledky těchto nečetných studií nezdědka kontroverzní.

Práce je věcně členěna a popisuje identifikaci aktivních sirných látek a testování biologické aktivity v česneku stopečkatém a následně v zástupcích rostlin rodu *Tulbaghia*. V souladu se širším spektrem zajímavých produktů i jejich prekurzorů je podstatně více prostoru věnováno česneku stopečkatému. K určení struktury cílových látek výrazně přispěly nejen komplementární identifikační spektroskopické techniky a sofistikovaná interpretace dat, ale i zvládnuté syntézy klíčových hledaných látek, které odpovídají vysoké erudici pracoviště. Tento přístup byl využit mj. pro kritické zhodnocení a následné vyvrácení výsledků experimentů skupiny Kusterera (*N*-oxidy vs. *S*-oxidy). Získané výsledky jsou logicky uspořádány a odpovídajícím způsobem diskutovány, což kladně oceňuji.

Práce na 121 stranách je formálně členěna obvyklým způsobem do 5 kapitol. Ty doplňuje závěr, souhrn, přehledně uvedené přílohy (na CD nosiči), publikace autorky na předkládaná témata a seznam použité literatury, který zahrnuje téměř 150 odkazů na původní literární prameny. Čtivost a srozumitelnost textu je vynikající, korektura byla provedena pečlivě, práce obsahuje minimum překlepů a dalších formálních nedostatků.

Teoretická část je přiměřeného rozsahu. Je zaměřena hlavně na rozklad sirných prekurzorů na senzorycky a biologicky aktivní látky, přehled významných rostlin a sirných látek vybraných rodů této čeledi a charakteristiku objektů testování biologické aktivity. Jako laik v oblasti testování biologické aktivity bych navíc ocenil detailnější informace o metodice a vyhodnocování těchto testů. Předpokládám však zároveň, že tato data jsou uvedena v citované literatuře.

Zvolené analytické metody a metodické postupy zcela odpovídají řešenému tématu práce. Na práci je patrné, že vznikla na pracovišti s dlouhodobým úspěšným výzkumem v oblasti sirných látek rostlin čeledi česnekovitě. Předkládanou disertační práci považuji za kvalitní a nemám k ní zásadní připomínky, až na jednu výjimku. A to, že v kapitole *Závěr* jsou zásadní výsledky, které tvoří cenné jádro práce, komentovány jen okrajově nebo nejsou zmíněny vůbec. *Závěr* je příliš nekonkrétní a také čtenáři neposkytuje náměty pro další práci, které vyplývají z dosažené úrovně poznání.

**Přes jednoznačně kladné hodnocení práce bych se rád zeptal na některé detaily a uvedl drobné připomínky:**

**Připomínky k formálnímu zpracování práce a názvosloví:**

- Marasmin je označován v textu jako 2,4,5,7-tetrathiaoktan-S<sub>4</sub>-oxid. Přípona 4 u síry v dolním indexu však evokuje např. tetrasulfid. Doporučuji raději uvádět název 2,4,5,7-tetrathiaoktan-4-oxid.
- Molární koncentrace uvádíme raději v mmol/l - jednotku ve tvaru mM můžeme uvést jen v adjektivu (např. 1mM roztok).
- Z lingvistického hlediska je vhodnější užívat termín *oxidační* než *oxidativní*, *enzymový* než *enzymatický*.
- Str. 76, ř.14 – správně je zde *effluent* místo *eluent*.
- Obr. 40 – chybí -NH- skupina ve vzorci modifikovaného glutathionu.
- Tab. 6 – zkratka *n.a.* znamená obvykle - alespoň pro analytika – neanalyzováno. Zde znamená *není aktivní*, což může být trochu matoucí. Neanalyzované vzorky jsou v tabulce proškrtnuty.
- Vyjádření koncentrace v jednotkách *ppb* apod. je nevhodné.
- Literatura – vyskytuje se chybné číslování – např. klíčová práce Kusterera a kol. je v textu (str. 85) označena (10), zatímco v Seznamu literatury je pod (23).

**Věcné připomínky, dotazy a náměty do diskuse:**

- Není zřejmé, zda zkoušené rostlinné vzorky byly pěstované pod kontrolou pracovišť, které vzorky poskytly, nebo byly získány např. sběrem v původních regionech. I když v práci jde primárně o identifikaci klíčových složek, ne jejich kvantifikaci, jaká je variabilita koncentrací sirných aktivních látek a jejich prekurzorů v česnekovitých rostlinách?
- Rod *Tulbaghia* obsahuje podle získaných výsledků pouze aminokyselinu marasmin, příp. stopy methiinu. Znamená to, že na rozdíl od česneku stopečkatého se zde nevyskytují zásobní  $\gamma$ -glutamoylpeptidy?
- Byla sledována stabilita testovaných aktivních látek? Např. změna chuťového projevu marasminu během ředění evokuje možnost vzniku rozkladného produktu.
- V Experimentální části jsem nenašel podmínky derivatizace aminokyselin před stanovením, ani metodiku senzorického hodnocení marasminu. Byla při senzorickém testování použita metoda *Taste Dilution Analysis*?
- V Experimentální části je u metody HPLC č. 1 v popisu gradientu během 15.-25. min uveden pokles z 60% na 3% MeCN – byl pro nastavení těch dlouhých 10 min nějaký záměr nebo důvod (obvykle totiž stačí 2-3 min na převedení do výchozího stavu mobilní fáze)?
- V práci je demonstrováno využití moderních identifikačních technik, které umožňují měření složení vzorku v reálném čase (technika DART-MS), což je významné mj. i pro případný kinetický popis a sledování nestabilních metabolitů. V této práci jde zejména o studium vzniku nestabilních sulfenových kyselin, resp. isomerního N-oxidu. Můžete uvést, jaké jsou případné limity techniky DART?
- Výsledky testování biologické aktivity v některých případech neobsahují vyjádření nejistoty. Pokud jsou nejistoty uváděné, jde o směrodatné odchylky nebo intervaly spolehlivosti?

- Z textu není vždy úplně jasné, zda jednotlivé látky testované na biologickou aktivitu jsou ty izolované nebo syntetizované (mohou být odlišné čistoty). Práci by slušelo i zjištění celkové biologické aktivity pro typické nebo předpokládané komerčně využitelné extrakty ze studovaných rostlin. Mohou se v nich totiž uplatnit i jiné aktivní složky zkoumaných rostlin, a také např. synergický efekt. Studium celých extraktů ale zřejmě nebylo definováno v zadání této práce.
- Jak významná je biologická aktivita nesírných složek česnekovitých rostlin, např. fenolových látek? Jaký podíl na popisovaných biologických aktivitách mají popisované sírné látky a jaké ostatní aktivní složky česnekovitých?
- Pro hodnocení biologické aktivity, zvláště pokud je tak široce pojatá jako zde, by bylo přínosné aplikovat přístup zahrnující „benefit“ i „risk“. Proč nebyly látky testovány pro určení alespoň některých forem toxicity?
- Existuje nějaká referenční látka, ke které je obvykle stanovována biologická aktivita typu inhibice cyklooxygenasy a dalších testů – kap. 5.2.3, str. 91, např. ve formě vyjádření ekvivalentu koncentrace té referenční látky? Pro srovnání účinku jednotlivých látek by to bylo výhodné.
- V práci mi chybí informace o účasti sledovaných sírných aktivních látek v redoxních reakcích nebo při zhášení radikálů. Existují nějaké relevantní údaje v literatuře?
- K textu kapitoly *Závěr* musím uvést, že pokud nebyly analyzovány na biologickou aktivitu celkové extrakty, ale jen jednotlivé látky, nelze s určitostí tvrdit, že jsou za účinky rostlin zodpovědné právě a jen sledované sírné látky, jakkoli je to pravděpodobné. Má, podle Vašeho názoru, větší potenciál stát se komerčně využívaným zdrojem sírných biologicky aktivních látek česnek stopečkatý nebo některý ze zástupců rodu *Tulbaghia*?

Přes uvedené připomínky mohu konstatovat, že předložená DDP a výsledky v ní obsažené mne velmi zaujaly. Z hlediska věcného a odborného uchazečka vypracovala kvalitní disertační práci.

### **Závěr**

Byly splněny cíle disertační práce, k jejichž dosažení byly zvoleny adekvátní postupy a odpovídající moderní analytické metody. Uchazečka získala cenné původní výsledky z oblasti chemie potravin a prokázala schopnost samostatné vědecké práce. Práce splňuje podmínky stanovené v § 47, odst. 4 zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách, a proto

**doporučuji práci přijmout k obhajobě.**

V Praze dne 9. září 2013

doc. Dr. Ing. Karel Cejpek.

Ústav analýzy potravin a výživy

VŠCHT v Praze

## Posudek oponenta disertační práce

Disertační práce:

Významné sirné metabolity v rostlinách čeledi Alliaceae (česnekovitě)

Autor: Ing. Petra Krejčová

Práce Ing. Petry Krejčové je zaměřena na studium sirných sloučenin a jejich rozkladných produktů v, u nás dosud málo známých rostlinách čeledi Alliaceae. Z rodu *Allium* byl takto sledován druh *A. stipitatum* Regel, z rodu *Tulbaghia* potom nejvýznamnější druh *T. violaceae* Harv. Práce naznačuje vysokou vědeckou erudici Ing. Petry Krejčové a její schopnost samostatně vědecky pracovat.

Souhrn práce plně odpovídá jejímu obsahu. Úvod stručně a jednoznačně uvádí čtenáře do řešené problematiky. Rozsáhlá teoretická část ukazuje, že uchazečka umí velmi dobře pracovat s vědeckou literaturou. Seznam citací je zpracován s velkou pečlivostí a neobsahuje naprosto žádné nedokonalosti. Využití velkého množství publikovaných dat dává této části vynikající kvalitu. Cíl práce formulován přesně dle požadavků stručně a jasně.

Praktická část práce je složena z několika víceméně nezávislých experimentů, které sloužily k izolaci a identifikaci významných sirných sloučenin v rostlinách a k ověření jejich biologických účinků. Tato část je přehledná a srozumitelná, pracovní postupy jsou popsány velmi přesně a logická stavba experimentu je naprosto zřejmá. Výsledky jsou velmi přehledně uspořádány v tabelární nebo grafické formě. Diskuse výsledků je na vynikající úrovni. Velmi oceňuji práci na identifikaci S-(2-pyridyl)cystein-N-oxidu, kdy se autorka a její školitel nenechali zviklat ani odlišnou identifikací této látky publikovanou ve velmi prestižním časopise. Rovněž velmi oceňuji dvou (plus jednoho v procesu) článků v prestižních impaktovaných časopisech.

Závěry práce jsou formulovány stručně, přehledně a srozumitelně a korespondují s vytyčenými cíli. Jazykové, grafické a formální zpracování práce je vynikající.

K práci mám dva doplňující dotazy:

- Pyrithion (resp. extrakty rostlin, které jej ve větší míře obsahují) se docela široce využívá v lidovém léčitelství, např. při léčbě malárie. Kromě toho se údajně tyto extrakty komerčně využívají do šampónů proti lupům. Genotoxické působení je zřejmě prokázáno.

Je ale něco známo o jeho vstřebávání při perorální aplikaci a o potenciálním vstřebávání kůží?

- Je něco známo o vlivu klimatu na syntézu sledovaných sekundárních metabolitů? Jde o podnební odlišnosti v původní domovině těchto rostlin (jižní Afrika, resp. jižní Amerika) a v oblastech mírného pásma.


Využití velkého množství naměřených a publikovaných dat a precizní zpracování dávají této práci velmi vysokou kvalitu. Veškerá data jsou podrobena kritickému posouzení a jsou z nich vyvozeny patřičné závěry.

Z výše uvedených důvodů

**doporučuji**

přijmout disertační práci Ing. Petry Krejčové k obhajobě.

V Praze dne 18.9.2013

  
doc. Ing. Jan Pánek, CSc.  
oponent

## POSUDEK OPONENTA DISERTAČNÍ PRÁCE

Ing. Petry Krejčové

### Významné sirné metabolity v rostlinách čeledi Alliaceae (česnekovitě)

Vedoucí práce:

doc. Ing. Roman Kubec, PhD.,

Předložená disertační práce Ing. Petry Krejčové sleduje problematiku významných sirných metabolitů ve dvou málo prozkoumaných rostlinách čeledi Alliaceae - česneku stopečkatém (*Allium stipitatum*) a česneku sladkém (*Tulbaghia violacea*). Disertační práce je psána velmi přehledně a srozumitelně. Obsahuje řadu výsledků jak z oblasti stanovení a identifikace sirných metabolitů řadou spektroskopických metod, jakož i popis mechanismu jejich tvorby. Dále je zde popsána jejich biologická aktivita (antimikrobiální, antiparazitická, protizánětlivá aj.). Práce představuje ucelený pohled na případné využití méně obvyklých rostlin čeledi česnekovitých pro potravinářské potřeby. Je pojata velmi komplexně a vedle stanovení sekundárních metabolitů je dobře doložena i jejich struktura na základě podrobného spektroskopického studia veškerými dostupnými technikami. Je rovněž podrobně diskutován rozdíl mezi výsledky získanými v této práci a výsledky uváděnými v literatuře.

Disertační práce je psána klasickým stylem, bez významnějších gramatických i stylistických chyb. Lze ji snad v tomto smyslu vytknout občasné použití „laboratorní hantýrky“ a pár překlepů (chybí mezery mezi hodnotami a jednotkami, u některých citací je uváděn plný název, u jiných zkácený, atd.), jakož i uvádění lineárních závislostí (viz obr. 37). V česneku stopečkatém byla identifikována a charakterizována dosud v literatuře nepopsaná sirná aminokyselina (*R*)-*S*-(2-pyridyl)cystein-*N*-oxid a celá řada jejich sekundárních metabolitů, vznikajících působením enzymu alliinasy. Výsledky jsou graficky i statisticky zpracovány na dobré úrovni. Výsledky byly publikovány ve dvou pracích v prestižním časopise *J. Agric. Food Chem.* a jedna práce je v rukopise připravena k odeslání do *J. Ethnopharmacol.* To ve značné míře usnadňuje práci oponenta. V práci bych očekával doporučení určitého postupu pro případné praktické využití obou rostlin pro potravinářské a kulinářské potřeby.

K práci mám několik dotazů a připomínek:

1. V současnosti se kromě sledování nutriční hodnoty surovin pro výrobu potravin a potravinových výrobků sleduje také jejich zdravotní „benefity“. Byly, kromě sirných analogů, sledovány některé další biologicky aktivní látky?
2. Jaká je asi prognóza uplatnění studovaných druhů česneku v obou odvětvích a jaký je přínos výsledků pro základní a aplikovaný výzkum?
3. jakým směrem se bude v nejbližší budoucnosti ubírat výzkum sekundárních metabolitů s obsahem síry (ev. selenu)?

**Závěr: Disertační práci přináší nové a publikované či publikovatelné výsledky. Disertační práci doporučuji k obhajobě před komisí a na základě jejího úspěšného ukončení doporučuji v souladu s příslušnými paragrafy Zákona o vysokých školách udělit Ing. Petře Krejčové titul Ph.D. ve studijním programu Chemie, studijním oboru „Zemědělská chemie“.**

Ve Zlíně 16. 9. 2013.



Prof. RNDr. Vlastimil Kubáň, DrSc.