

Oponentský posudek na doktorskou disertační práci:

„Barevné sloučeniny vznikající během zpracování česnekovitých rostlin“

kterou předložila

Ing. Petra Kučerová

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

Předkládaná disertační práce se zabývá zejména identifikací barevných, síru neobsahujících látek a způsobem jejich vzniku z příslušných sirných prekurzorů při zpracování česnekovitých rostlin. Menší část práce představuje stanovení některých biologických aktivit identifikovaných barevných látek, které se však jeví nevýznamné ve srovnání s paralelně vznikajícími sirnými produkty. Výsledky získané v těchto studiích je třeba hodnotit jednoznačně kladně, neboť přesnému popisu struktury a vzniku barevných látek při zpracování česnekovitých zelenin není v literatuře věnována dostatečná pozornost. Navíc jsou výsledky těchto nečetných studií často nespolehlivé. Pochopení mechanismu tvorby těchto látek může nalézt využití v technologické praxi i při kulinární přípravě těchto zelenin, kde je obvykle žádoucí minimální diskolorace.

Uvedené diskolorace jsou zvláštním případem reakcí neenzymového hnědnutí, neboť se jedná o reakce specifické aminokyseliny (isoaliinu nebo homoisoaliinu), resp. z ní vznikajících produktů s karbonylovými sloučeninami. Jedná se tedy o malý, ale významný a dobře zřetelný příspěvek (a to nejen svým výjimečným barevným projevem) do mozaiky Maillardovy reakce. Úspěšné identifikaci klíčových barevných látek v extraktech zkoumaných rostlin napomohly také sofistikovaně sestavené modelové systémy. Z výsledků práce je zřejmé, že barevné látky vznikající při zpracování cibule a póru jsou si strukturně velmi podobné. Společný základ zřejmě tvoří dvě molekuly 2-(3,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-1-yl)propanové kyseliny. Cenný je podrobný návrh pravděpodobného mechanismu vzniku barevných sloučenin, ve kterých jsou pyrrolová jádra spojena jak jednouhlíkovým, tak tříuhlíkovým můstkem. Analogickou strukturu mají také červené látky česneku sicilského s prekursorem homoisoalliinem. Také nositelé modrého (zeleného) zbarvení česneku kuchyňského vznikají podobně jako v cibuli nebo póru, dva z hlavních produktů jsou dokonce totožné. Některé barevné látky česneku však obsahují jen jednu aminokyselinu ve svém skeletu. Zelená barva česneku je důsledkem přítomnosti jak žlutých, tak modrých až purpurových látek. Zajímavým zjištěním je i to, že dominantní barevná látka, která vzniká při zpracování cibule obří, sice také obsahuje dvě pyrrolová jádra (je to 2,2'-epidithio-3,3'-dipyrrol), ale vzniká mechanismem odlišným.

K určení struktury cílových látek výrazně přispěly nejen komplementární identifikační spektroskopické techniky a sofistikovaná interpretace dat, ale i zvládnuté syntézy klíčových meziproductů, včetně isotopově značených látek. Takto postavené experimenty odpovídají vysoké erudici pracoviště. To, že přesná struktura některých barevných látek česneku nebyla navzdory řadě získaných spektrálních dat doktorandkou ani navržena, svědčí spíše o soudnosti a neukvapenosti, než o neúspěchu. Naopak, některé dříve publikované návrhy struktur jinými badateli (Jedelska a kol) Petra Kučerová kriticky zhodnotila, vyvrátila a uvedla na pravou míru. Kladně oceňuji pochopitelně i to, že získané výsledky jsou logicky uspořádány a odpovídajícím způsobem diskutovány.

Práce na 120 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 přes 100 odkazů na původní literární prameny. Korektura textu byla provedena velmi pečlivě, práce prakticky neobsahuje překlepy a je v ní jen málo formálních nedokonalostí.

Zvolené analytické metody a metodické postupy zcela odpovídají řešenému tématu práce. Na práci je patrné, že vznikla na pracovišti školitele, který se již od časného mládí úspěšně potýká s výzkumem v oblasti barevných látek česnekovitých rostlin. Předkládanou disertační práci považuji za kvalitní a nemám k ní zásadní připomínky.

Přesto bych se rád zeptal na některé detaily a uvedl drobné připomínky:

Připomínky k formálnímu zpracování práce:

- Str. 1 – hodnota potraviny není organoleptická, ale senzorická (smyslová). Organoleptické jsou vlastnosti.
- Anglické označení „*color developer*“ je možné snad vhodněji nahradit např. výrazem *pre-chromogen*, bezprostřední *prekurzor pigmentu* pak je *chromogen*.
- Z lingvistického hlediska je vhodnější užívat termín *fenolový* než *fenolický*, *enzymový* než *enzymatický*, *isotopově* než *isotopicky*.
- Str. 35, Metoda C – v tabulce gradientové metody je omylem podruhé uveden čas 20 min.
- Str. 64-65 – skutečnost, že se v případě neodseparovaných sloučenin LO-358 a LO-402 jedná o dvě různé látky, není zřejmá z uvedených chromatogramů, jak se v textu tvrdí, ale zřejmě až z rozboru hmotových spekter.
- Str. 73, ř. 4 – odkaz má být na *Obrázek 51*, ne 52.

Věcné připomínky, dotazy a náměty do diskuse:

- Z výsledků vyplývá, že na vzniku barevných látek se kromě sulfoxyaminokyselin podílí snad pouze alanin. Jde zde pouze o volbu modelové aminokyseliny nebo se jiné volné aminokyseliny při diskoloraci opravdu neuplatňují? V této souvislosti trochu postrádám alespoň rešeršní informace o základním složení studovaných rostlin, zejména obsahu volných aminokyselin a karbonylů, včetně cukrů.
- V některých česnekových přípravcích, např. stařených vyluzích z česneku (*aged garlic*), dochází k intenzivnímu rozvoji neenzymového hnědnutí. Také třeba nakládané cibulky v některých případech výrazně žloutnou. Mají tyto reakce nějakou spojitost s Vámi popsanými zelenáním česneku a růžováním cibule?
- V poslední době jsou patrné snahy odlišit česnek „český“ od importovaného (čínského, španělského apod.). Je náchylnost k diskoloraci též otázkou odrůdy, případně některého jejího znaku?
- V *Rešerši* na str. 28 se píše o prevenci růžování cibule a póru mj. přidávkem L-askorbové kyseliny a cysteinem. Jakým způsobem zasahují tyto látky do reakcí, které vedou k diskoloraci?

- Výhodné bylo využití LC-¹H-NMR pro analýzu nestabilních nebo špatně separovatelných látek. Jak se liší minimální množství látek nutná pro spolehlivou detekci v tomto systému ve srovnání se standardními NMR spektroskopy?
- V *Cílech práce* je jako jeden z bodů uvedeno, že na základě zjištěných informací budou navržena opatření, která by mohla zamezit vzniku barevných látek během technologického zpracování česnekovitých rostlin. V kapitole *Výsledky a diskuse* jsem ovšem tyto informace nenašel. Smysluplná zmínka je uvedena až v *Závěru* (kap. 6.2).
- Přes věcnost a srozumitelnost textu je *Závěr* příliš obsáhlý, neboť obsahuje i některé méně podstatné vývody a konstatování.

Přes uvedené připomínky mohu konstatovat, že předložená DDP a výsledky v ní obsažené jsou velmi cenné. 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 10. září 2013
doc. Dr. Ing. Karel Cejpek
Ústav analýzy potravin a výživy
VŠCHT v Praze



OPONENTSKÝ POSUDEK DISERTAČNÍ PRÁCE ING. PETRY KUČEROVÉ

vypracované na téma

**„BAREVNÉ SLOUČENINY VZNIKAJÍCÍ BĚHEM ZPRACOVÁNÍ
ČESNEKOVITÝCH ROSTLIN“**

Disertační práce Ing. Petry Kučerové je včetně literatury, obrázků, tabulek, grafů a seznamu zkratk prezentována na 123 stranách. V disertační práci je vloženo CD s dalšími přílohami. Výše uvedené téma práce je velmi zajímavé a aktuální vzhledem ke změnám organoleptických vlastností česnekovitých rostlin při jejich zpracování, zejména průmyslovém a následným negativním reakcím konzumentů. Disertační práce je logickým pokračováním dlouhodobě řešené problematiky v Laboratoři pana Doc. Kubce, a sice studia sirných sloučenin v česneku, póru a cibuli a jejich změn, zejména barevných, a hledáním látek a mechanismů přeměn, které jsou za to odpovědné. Po krátkém úvodu na str. 1 následuje velmi pěkně zpracovaný literární přehled (28 stránek), který shrnuje přehledným způsobem reakce *S*-substituovaných derivátů cysteinu a další aspekty dané problematiky. Je vidět, že uchazečka věnovala této části velkou pozornost a že se v této problematice dobře orientuje. V Tab. 1 na str. 9 je uveden přehled zastoupení *S*-alk(en)ylcysteinsulfoxidů v česnekovitých rostlinách. Je zajímavé, že substituce na atomu síry je buď pouze jedním uhlíkem, nebo třemi a čtyřmi uhlíky. Pouze dotaz, sloučenina se substitucí dvěma uhlíky nebyla ještě nalezena? Problém růžovění cibule je předmětem zajímavého výzkumu, mechanismy byly navrženy jak Kubcem a kol., tak např. Katem (Food Chem., 2013), který využívá reakce formaldehydu s látkami přítomnými v cibuli. Dokonce byla tato reakce růžovění (červenání) cibule publikována v roce 2013 pro stanovení formaldehydu, kde chromogenním substrátem byl právě homogenát cibule. Součástí literárního přehledu jsou také technologická opatření zamezující vzniku nežádoucího zbarvení. Cíle práce jsou přehledně uvedeny na str. 30. Následuje velmi dobře zpracovaná experimentální část, kde jsou popsány přípravy sloučenin potřebných pro studium reakcí uvedených v disertační práci. Některé sloučeniny, náročnější na přípravu, byly syntetizovány školitelem, panem Doc. Kubcem.

V přehledu přístrojů na str. 33 je u GC-MS analýz uvedeno, že vzorky byly vstříkovány s použitím děliče toku 1:10 na HP-5MS křemennou kapilární kolonu.....Jedná se o techniku nástřiku „on column“, anebo je to spíše formulační závada, protože dále se uvádí teplota nástřiku 180 °C? Kapitola „Výsledky a diskuse“ je prezentována od str. 50 a velmi podrobně se zabývá postupem identifikace jednotlivých sloučenin v konfrontaci s literaturou. Studované sloučeniny byly označeny G (garlic), L (leek) a O (onion). Pro jejich identifikaci byla použita kombinace nejmodernějších dostupných technik, od kapalinové analytické a preparativní chromatografie do spojení kapalinové chromatografie s hmotností detekcí. Pro vyřešení mechanismu a výsledných struktur byly použity izotopicky značené thiosulfináty a izotopicky značený alanin a jejich použitím se uchazečka dostává ke konečným produktům, často však je získaná struktura pouze spekulativní. Předpokládám, že v této oblasti bude nutno udělat ještě velký kus práce na definitivním potvrzení, či vyvrácení struktur studovaných látek. V souvislosti s výpočty molekulových hmotností bych se rád uchazečky dotázal, jakým způsobem byly získány v práci uvedené hodnoty. Nejsem si jist, zda uchazečce je jasný rozdíl mezi monoizotopickou molekulovou hmotností udanou sumárním vzorcem a monoizotopickou molekulovou hmotností opravenou o hmotnost elektronu. Nelze spoléhat na softwarové vybavení přístrojů, ale je nutno vědět, jak se k výsledkům dospělo. Měl by tedy být všude jednoznačně uveden sumární vzorec s nábojem.

Po formální stránce je předložená disertační práce v pořádku, je velmi dobře sepsána a v práci jsem nenašel žádné závažné chyby. Snad pouze v grafu na str. 6 a 7 by mohly být na ose y uvedeny hodnoty v mil. tun a výsledné číslo by bylo kratší. K uchazečce mám dva drobné dotazy. Co znamená katalytická dehydratace infračerveným zářením (str.7) a čím je způsobena E,Z izomerace mono- α , β -nenasycených thiosulfinátů (str. 13)?

www.czechglobe.cz

T: +420 511 192 211

E: centrum@czechglobe.cz

IČO: 67179843

Závěrem konstatuji, že předložená disertační práce Ing. Petry Kučerové vypracovaná na téma „Barevné sloučeniny vznikající během zpracování česnekovitých rostlin“ dokládá odbornou úroveň jmenované s tím, že prokázala tvůrčí schopnosti a ovládá vědecké metody. Práce splňuje požadavky kladené na disertační práci v oboru a může být podkladem pro obhajobu disertační práce ve smyslu §47 Sbírký zákonů č. 111/1998.

Závěrem konstatuji, že předloženou disertační práci jsem prostudoval a

doporučuji

ji k obhajobě.

České Budějovice 17. září 2013



Prof. Ing. Jan Triska, CSc.
Centrum výzkumu globální změny AV ČR, v.v.i.
Laboratoř metabolomiky a izotopových analýz
pracoviště Branišovská 31
370 05 České Budějovice
tel.: 387 775 619
fax: 385 310 347
mail: triska.j@czechglobe.cz

www.czechglobe.cz

T: +420 511 192 211

E: centrum@czechglobe.cz

IČO: 67179843

Oponentský posudek
doktorské disertační práce Ing. Petry Kučerové
„Barevné sloučeniny vznikající během zpracování česnekovitých rostlin“

Práce je zaměřena na studium barevných sloučenin vznikajících při zpracování česneku, cibule a póru, cibule obří (*Allium giganteum* Regel) a česneku sicilského (*Allium siculum* Ucria Linde). Byl sledován vznik, chemická podstata a biochemická syntéza růžových a červených pigmentů u těchto zelenin, u česneku pak navíc i tvorba zelených a modrých pigmentů, které výrazně snižují sensorickou kvalitu produktů těchto plodin. Pro identifikaci těchto látek a možností mechanismu jejich vzniku byly využity moderní metody isotopové analýzy, separace pomocí HPLC a identifikace metodami NMR a MS. Těmito metodami bylo zjištěno, že se jedná o oligomery N-substituovaných derivátů 3,4-dialkylpyrrolů s pyrrolovými cykly propojenými tří nebo jednouhlíkatým můstkem. Primárním prekurzorem je AMK isoalliin, alliin, v česneku sicilském pak homoisoalliin. Tvorby barevných sloučenin se také účastní methiin. Tyto AMK se enzymaticky rozkládají na sulfonové kyseliny s následnou tvorbou thiosulfinátů, které dále s AMK tvoří barevné sloučeniny. U obří cibule je prekurzorem červeného pigmentu S-(2-pyrrolyl)cysteinsulfoxid, který se transformuje na 2,2'-epidithio-3,3'-dipyrrol.

Práce je napsána a členěna klasickým způsobem, zahrnuje 123 stran a s přílohami 130 stran a s počtem 104 světových odkazů. V práci je uvedeno 73 obrázků, 23 tabulek a 25 příloh. Podstatnou součástí práce jsou rovněž 3 vědecké publikace v impaktovaných časopisech - Magnetic Resonance in Chemistry (IF 1.528), Journal of Agricultural and Food Chemistry (IF 2.906) a Journal of Ethnopharmacology (IF 2.755). Práce je doplněna seznamem publikační činnosti autorky.

K vlastní práci mám několik připomínek a dotazů:

- Nomenklatura organických sloučenin není někdy přesná, např. by správně mělo být (E)-S-(prop-2-en-1-yl)-; (E)-S-but-2-en-1-yl; S-allylprop-2-en-thiosulfinát (allicin); prop-2-en-1-sulfenová kyselina. V některých případech jako např. v obr. 10 jsou názvy uvedeny dobře, v kapitole Výsledky a diskuze je nomenklatura zcela perfektní.
- str. 17: lépe formulace ...ze sledu tří reakcí.
- enzymatická oxidace fenolických kyselin v cibuli a póru – můžete popsat, které fenolické sloučeniny se v tomto mechanismu účastní a jaké produkty touto reakcí vznikají?

Dotazy do diskuze:

- Jaká je produkce česneku a cibule dle FAO v ČR a srovnání s evropskými a světovými producenty?
- Jaký je Váš názor na možnost využití ^1H a ^{13}C NMR analýz pro identifikaci přírodních látek obsažených v zelenině resp. ovoci, např. barviv, antioxidantů aj.?
- Ve výsledcích a diskuzi jsou specifikovány a navrženy mechanismy vzniku 2,2'-epidithio-3,3'-dipyrrolu z S-(2-pyrrolyl)cysteinsulfoxidu a R_S , $R_E(-)$ (2-pyrrolylsulfinyl)mléčné kyseliny v cibuli obří. Za velmi pozitivní pokládám komplexní využití metod pro stanovení struktury a jejich kombinaci, např. UHPLC s UV-Vis, ^{13}C A ^1H NMR, ESI-TOF HRMS, COSY, HMBC, DEPT, NOESY, polarimetrie, CD, HETCOR, HSQC, DART-MS, NI-DART. Zajímavé

je zjištění, že na rozdíl od allicinu neměly zbarvené produkty GIG1H a GIG24H antimikrobiální účinnost na bakterie a kvasinky.

- V cibuli a póru se na rozdíl od sirných prekurzorů thiosulfinátů ve vzniklých barevných produktech síra nevyskytuje a podílejí se na nich 2 molekuly Ala po reakci thiosulfinátů s Ala s významnou rolí vznikajících karbonylových sloučenin.
- V česneku jsou hlavně zastoupeny s-alk(en)ylcysteinsulfoxidy alliin, isoalliin a methiin. Pozoruhodný je poznatek, že vznikající žlutě a modře zbarvené sloučeniny ve vzájemné kombinaci vytvářejí zelenou barvu homogenátu česneku. Česnek sicilský vytváří růžové zbarvení z homoisoalliinu, podobně jako je tomu v cibuli a póru, a tím se liší od česneku setého (kuchyňského).
- Daly by se nalezené rozdíly ve struktuře a zastoupení barevných látek v cibuli, póru, česneku kuchyňském a sicilském a rovněž v cibuli obří využít pro určení jednotlivých genotypů? Daly by se rovněž najít podobné rozdíly pro genotypy odrůd? Produkty [3,3]-sigmatropního přesmyku v cibuli obří a cibuli kuchyňské se značně liší stejně jako dráhy jejich vzniku.
- Co soudíte o možnostech vyšlechtění kultivarů cibule a póru s vysokou aktivitou LF-synthasy? Vyšší hladina isoalliinu (S-(1-propenyl)cysteinsulfoxidu) v cibuli a póru je žádána z potravinářského i farmaceutického hlediska – vznikají thiosulfináty, ale také slzotvorný propanthialsulfoxid. Jaká by potom byla preference. Buď omezení červeného zbarvení nebo vyšší koncentrace slzotvorného propanthialsulfoxidu?
- Podobně šlechtění česneku s minimálním obsahem isoalliinu a maximálním zastoupením alliinu (S-allylcysteinsulfoxidu) a jeho konverzí na allicin mohlo by být významné pro praktické účely?
- Můžete popsat rozdíl v mechanismu vzniku barevných sloučenin česneku při skladování při vyšší teplotě (20 °C) a nižší teplotě skladování (4-5 °C)?
- Lze na základě získaných výsledků česnek sicilský (*A. siculum*) radit spíše k cibuli a póru {vznik červených pigmentů z 2,2'-[3,4-diethyl-1H-pyrrol-2,1-diy)]dipropanové kyseliny}?

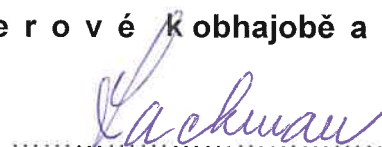
Práce je napsána na vysoké odborné úrovni a vyplývá z ní, že doktorandka se v dané problematice velmi dobře orientuje. Práce je napsána velmi pečlivě s vynikajícím grafickým vybavením.

Na základě objektivního a kritického rozboru předložené disertační práce dle § 47, odst. 4, Zákona o vysokých školách č. 111/1998 Sb.

d o p o r u č u j i

přijetí disertační práci Ing. Petry Kučerové k obhajobě a po úspěšné obhajobě udělení titulu Ph.D.

V Praze dne 30. srpna 2013



Prof. Ing. Jaromír Lachman, CSc.,

Katedra chemie,

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů,

Česká zemědělská univerzita,

Kamýcká 129,

165 21 Praha 6 – Suchbátka