

Oponentský posudek na doktorskou disertační práci:

„Senzoricky a biologicky aktivní sirné sloučeniny cibule kuchyňské (*Allium cepa* L.)“

kterou předložila

**Mgr. Iveta Štefanová**

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

Předkládaná disertační práce se zabývá zejména izolací a identifikací sirných látek hořké chuti, které vznikají z příslušných sirných prekurzorů při zpracování cibule kuchyňské. Téma, způsob a zpracování práce hodnotím jednoznačně kladně, neboť takto přesný a věrohodný popis struktury a vzniku hořkých látek při zpracování česnekovitých zelenin zatím neexistuje. Na práci je patrné, že vznikla na pracovišti školitele, který již od raných badatelských let úspěšně vyplňuje bílá místa v oblasti sirných látek česnekovitých rostlin.

K určení struktury cílových látek výrazně přispěly nejen komplementární identifikační spektroskopické techniky a sofistikovaná interpretace dat, ale i zvládnuté izolace klíčových produktů. Takto postavené experimenty odpovídají vysoké erudici pracoviště. Cenné je i to, že např. dříve publikované návrhy struktur onioninů jinými badateli (Nohara *et al.*) Iveta Štefanová kriticky zhodnotila, vyvrátila a uvedla na pravou míru. Kladně oceňuji i to, že získané výsledky jsou logicky uspořádány a odpovídajícím způsobem diskutovány.

Přes nepochybnou vysokou odbornou i jazykovou úroveň práce si dovoluji v dalším textu přidat kromě pochvalných též několik spíše potenciálně inspirativních než kritických poznámek, otázek do diskuse a připomínek.

Uvedení biologicky aktivních sirných sloučenin v názvu práce se jeví poněkud zavádějící, neboť v experimentální práci se tyto látky popisují pouze v kategoriích hořké/nehořké/ostatní látky, bez ohledu na to, že mnohé ze zmiňovaných látek biologickou aktivitu jistě mají.

Práce je formálně členěna do devíti kapitol. Pro mě poněkud překvapivě se pod kapitolou „Úvod“ skrývá rešeršní část práce, které by asi lépe slušela např. hlavička „Současný stav řešené problematiky“. V „Úvodu“ by měla být vysvětlena zejména motivace k provedené experimentální práci. Předpokládám ale, že doktorandka postupovala v souladu s pravidly danými univerzitou. Na druhou stranu oceňuji, že význam a unikum práce je v Přílohách výstižně presentováno kladnými odezvami z médií odborného i zcela laického charakteru.

Korektura textu byla provedena velmi pečlivě, práce prakticky neobsahuje překlepy a je v ní jen málo formálních nedostatků. Z lingvistického hlediska je přece jen vhodnější užívat termín *fenolový* než *fenolický*, *enzymový* než *enzymatický*, *frakcionace metodou HPLC* než *HPLC frakcionace*, *data získaná metodou ESI-HRMS* než *ESI-HRMS data*, spíše *antithrombotický* než *antitrombotický* účinek. Vyjádření koncentrace v jednotkách typu *ppb* je v českém odborném jazyce nevhodné.

Literární část představuje prakticky vyčerpávající a přehledně uspořádanou informaci o známých nebo navržených strukturách sirných látek v cibuli i dalších česnekovitých, včetně reakčních kaskád a souvislostí. V takto komplexní práci bych ale ještě očekával jednak alespoň základní informace o vnímání hořké chuti – známá je např. různá citlivost populace pro vnímání hořké chuti, jednak informace o nutných podmínkách při technologických a kulinárních úpravách cibule, kdy lze vznik hořké chuti očekávat, i o četnosti výskytu tohoto jevu. Rovněž informace o hořkých produktech vznikajících při zpracování česneku, byť za asistence cukrů, z *S*-allyl-L-cysteinu by v kontextu práce byla jistě zajímavá (Wakamatsu J., *et al.*, J.Agric.Food Chem., 2016).

Několik otázek vyvolává popis senzoričkého hodnocení, podle kterého byly metodou TDA určeny klíčové hořké frakce – např. byl brán v úvahu vliv ethanolu na vnímání hořké chuti? Jaká byla míra shody v hodnotách TDA mezi 4 hodnotiteli (jsou uváděny jako zprůměrované hodnoty)? Kolikrát se hodnocení dělalo? Jak byly prakticky hodnoceny velmi malé (1ml) objemy vzorků?

Bylo identifikováno devět skupin allithiolanů, přičemž u A, B, D, E, F a I byl navržen také pravděpodobný mechanismus. Navržené struktury jsou podpořeny i nalezenými analogy, resp. oprávněně odlišným relativním zastoupením allithiolanů v česneku a póru. U skupin C, G, H nebyl vhodný mechanismus vzniku nalezen, což jistotu správnosti navržených struktur přece jenom poněkud snižuje. Nemohly některé z těchto allithiolanů vzniknout jako artefakty? Lze v některých případech připustit i možnost jiné struktury než té navržené? Např. struktura allithiolanu C, který nese propylovou skupinu – a který byl nalezen i v modelech, které neobsahovaly propiin – byla navržena pouze na základě MS dat; nemůže tomu rozdílu hmot (fragmentu) odpovídajícímu eliminaci propylu odpovídat třeba i nějaký produkt přesmyku? Naopak věrohodné mechanismy vzniku byly navrženy u cepadithiolaktonu a cepathiolanů.

Zajímavé by bylo zjistit vliv kyslíku na vývoj hořké chuti – např. allithiolan I zřejmě přítomnost kyslíku nebo jiného oxidačního činidla vyžaduje. Jakou roli v redoxních reakcích hraje sulfenové kyseliny?

Kinetický popis klíčových reakcí by byl vzhledem k značné komplexnosti dotyčných reakcí a nízkým koncentracím cílových látek jistě velmi obtížný. Přesto – nelze na základě zkušeností nebo analytických dat odhadnout, jaké faktory jsou významné pro případné nasměrování reakčního systému ke vzniku látek s hořkou nebo naopak nehořkou (pozitivně vnímanou) chutí? Nebo např. k potlačení chromogenních reakčních cest (červenání) na úkor těch „gustagenních“? Mohou k degradaci hořké chuti přispět postupy typu fermentace nebo vaření?

Sirné látky jsou také rozhodujícími nositeli senzoričkových vlastností zelenin a pochutin z čeledi *Brassicaceae* (brukvovitých). Některé aromatické sirné látky, jako např. diallydisulfid, dokonce vznikají při zpracování jak česnekovitých (česnek) tak brukvovitých zelenin (křen). Řada brukvovitých zelenin při zpracování nebo skladování také hořkne. Jsou látky, které stojí za hořkou chutí těchto zelenin podobného charakteru jako ty z cibule?

Přes uvedené drobné připomínky není sebemenších pochyb o tom, že předložená práce a výsledky v ní obsažené jsou vysoce kvalitní. Práci považuji za mimořádně zdařilou jak z hlediska získání a validity dat, tak důležitosti pro potravinářskou a kulinární praxi.

#### 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 příslušnými platnými ustanoveními zákona o vysokých školách, a proto

**doporučuji práci přijmout k obhajobě.**

V Praze dne 12. prosince 2018

doc. Dr. Ing. Karel Cejpek

Ústav analýzy potravin a výživy

VŠCHT v Praze



Oponentský posudek na disertační práci v oboru Zemědělská chemie

Mgr. Ivety Štefanové

**„Senzoricky a biologicky aktivní sírné sloučeniny cibule kuchyňské  
(*Allium cepa* L.)“**

Oponovaná práce byla předložena formou rukopisu, který bez všech příloh dosahuje 116 stran. Vlastní práce je přehledně a logicky rozčleněna podle obvyklého formátu vědeckých publikací. Po formální stránce je práce velmi dobře zpracována a napsána korektním vědeckým jazykem s minimálním množstvím překlepů. Čtenář ocení vhodně zvolenou grafiku, která umožňuje pochopení velmi komplexních výsledků, stejně jako přesunutí podpůrných materiálů do příloh.

Teoretický úvod na třiceti stranách shrnuje současný stupeň poznání řešené problematiky a postuluje cíle práce. Jde o komplexní studii, která dokumentuje, jak (ne)prozkoumána je oblast propojení chemické analýzy s biochemií senzoricky aktivních sloučenin. Literární přehled má obdivuhodně široký záběr článků publikovaných v rozmezí mnoha desítek let. Na tomto místě by bylo vhodné poznamenat, že by možná stálo za to vydat tuto část jako přehledový článek.

V metodické části jsou podrobně popsány preparativní, analytické i senzorické postupy použité pro izolaci a identifikaci senzoricky aktivních sloučenin z cibule a česneku. Z této části disertace je zřejmé, že autorka si osvojila velmi širokou paletu metod preparativní chromatografie až po strukturně analytické techniky jako jsou hmotnostní spektrometrie a NMR na velmi vysoké úrovni. Kombinace preparativní chromatografie se senzorickou analýzou je analogická se současným trendem v ekotoxikologii a chemii životního prostředí při hledání tzv. effectdrivers. Následná analytická koncovka pro identifikaci biologicky (senzoricky) aktivních složek je také na „state of art“ úrovni.

Výsledky a diskuze jsou prezentovány přehledně, logicky a lze je relativně jednoduše sledovat a porozumět jim, což u takového množství prezentovaných dat není nic samozřejmého. Autorka práce a její spolupracovníci kombinací výše uvedených postupů identifikovali značné množství sloučenin odpovědných za jak negativní, tak i pozitivní chuťové vjemy. Podařilo se jim potvrdit anebo naopak vyvrátit identitu několika již známých sloučenin, a navíc izolovali a identifikovali řadu nových, i když v některých případech nebyla možná separace až na jednotlivá chemická individua. Vzhledem k velkému množství možných stereoizomerů by bylo nutné aplikovat chromatografii s použitím chirálních stacionárních fází, což je téma na novou disertační práci.

Na základě potvrzení identifikace sloučenin pomocí NMR pak navrhli schémata biosyntetických reakcí, které k těmto produktům vedou. Výsledky práce vedly k osvětlení mechanismů vzniku hořké pachuti při zpracování cibule kuchyňské. Zajímavým zjištěním je pak vztah obsahu slizotvorných látek a vzniku hořké pachuti. Objem výsledků je více než dostačující pro disertační práci a je jenom s podivem, že z tohoto množství zajímavých zjištění byl zatím publikován jenom jeden článek.





Komentáře a dotazy k předložené disertační práci:

Zde je možné zmínit po formální stránce použití jednotky Da u m/z, což je bezrozměrná jednotka. Da není SI jednotka a používá se pro vyjádření molekulární hmotnosti u vysokomolekulární sloučeniny jako jsou polypeptidy. Dalším drobným vylepšením by mohlo být použití odchylky (delta m/z) v ppm pro demonstraci odlišnosti naměřené m/z od teoretické hodnoty. Formulačně nešťastná je pak věta: "(+)ESI-HRMS data byla získána využitím systému UltiMate3000 ... vybaveného detektorem AB SCIEX TripleTOF..." Spektra jsou vždy získána hmotnostním spektrometrem po separaci v LC systému (také použití slova detektor místo hmotnostní spektrometr je výrazem, který u doyenů hmotnostní spektrometrie vyvolává silnou alergickou reakci).

1. Nezkoušeli jste stacionární fázi na bázi bifenyly v jiném módu, než byl prezentovaný gradient ACN ve vodě (metoda F)? Při použití metanolu a vody bez pufrů je chemie separace podstatně odlišná (jsou upřednostněny  $\pi$ - $\pi$  interakce) a u studovaných sloučenin by mohlo být dosaženo lepší separace.
2. Nepokoušeli jste se simulovat ESI<sup>+</sup> MS/MS spektra pomocí nějakého pokročilého softwaru jako MassFrontier? U sloučenin, které byly v práci studovány by to bylo značné ulehčení a program navrhuje i fragmentační cesty.
3. Nezkoušeli jste aplikovat chirální stacionární fáze pro separaci zmiňovaných stereoizomerů?

Na závěr mohu jen konstatovat, že autorka práce prokázala, že má všechny předpoklady pro úspěšnou vědeckou činnost v oboru, a proto **doporučuji přijmout** disertační práci Mgr. Ivety Štefanové **obhajobě**.

Ve Vodňanech 12. 12. 2018

doc. Mgr. Roman Grabic, Ph.D.

*Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Fakulta rybnářství a ochrany vod  
Výzkumný ústav rybnářský a hydrobiologický  
Laboratoř environmentální chemie a biochemie  
Zátiší 728/II  
389 25 Vodňany  
www.frov.jcu.cz*



## Posudek oponenta disertační práce

Disertační práce:

Senzoricky a biologicky aktivní sírné sloučeniny cibule kuchyňské (*Allium cepa* L.)

Autor: Mgr. Iveta Štefanová

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta

Práce Mgr. Ivety Štefanové je složena ze dvou částí. První část je zaměřena na studium organosírných sloučenin cibule s výrazně hořkou chutí, které vznikají enzymově i neenzymově při zpracování cibule. Tyto sloučeniny byly autorským kolektivem objeveny nově a nazvány allithiolany. Prekurzorem těchto změn je isoalliin, který je hlavním S-substituovaným derivátem cysteinu, přítomným v cibuli. Významný podíl na vzniku těchto sloučenin mají také methiin a enzym alliinasa. Objev devíti dosud neznámých allithiolanů byl v letošním roce publikován ve velmi prestižním časopise *J. of Agricultural and Food Chemistry*.

Druhá část práce navázala na první část. Z extraktu cibule byly izolovány i další, zatím v odborné literatuře nepopsané sloučeniny ze skupiny onioninů a stereoizomery cepadithiolaktonu A. Kromě chemické struktury byly u těchto sloučenin popsány i organoleptické vlastnosti, což ještě umocňuje význam tohoto objevu. S potěšením konstatuji, že publikace této druhé části ve stejném časopise je v současné chvíli ve velmi pokročilém stádiu.

Práce naznačuje vysokou vědeckou erudici Mgr. Ivety Štefanové a její schopnost samostatně vědecky pracovat. Toto asi nejlépe dokládá právě skutečnost, že výsledky, které jsou tématem disertační práce, byly v letošním roce publikovány ve výše uvedeném vysoce impaktovaném časopise.

Souhrn práce plně odpovídá jejímu obsahu. Úvod stručně a jednoznačně uvádí čtenáře do řešené problematiky. Teoretická část ukazuje, že uchazečka umí 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 odpovídající kvalitu. Cíle práce jsou formulovány přesně dle požadavků stručně a jasně.

Praktická část práce je zpracována velmi precizně. Zvláště podrobně (a přitom přehledně) je zpracována metodika izolace a následné identifikace výše uvedených sloučenin.





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. Velmi oceňuji identifikaci logický postup při identifikaci jednotlivých nově objevených sloučenin a při korekci dosud uváděné struktury onioninů. Diskuse výsledků je na vynikající úrovni. Rovněž mimořádně oceňuji již zmíněnou realizovanou a připravovanou publikaci článku v dobře impaktovaném časopise.

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

K práci mám jeden doplňující dotaz:

- Má disertantka představu, jak v této nesmírně zajímavé problematice (hlavně v oblasti hořkých látek) pokračovat? Asi by bylo zajímavé pokusit se o stanovení určité časové závislosti vzniku allithiolanů, případně i o určení jejich osudu při vysoce dynamickém tepelném opracování (např. při smažení) cibule.

K práci mám ještě dvě víceméně formální připomínky:

- Domnívám se, že v obrázcích na str. 58 a 59 jsou metody B a C uvedeny opačně než je tomu v popise v experimentální části
- Na straně 41 – 43 by (pro snadnější orientaci čtenáře) mohlo být uvedeno, proč byly dále frakcionovány právě frakce 4 a 5. Je to jasné potom z popisu výsledků, ale zmínka (s odkazem na výsledky) by zde mohla být uvedena.


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 Mgr. Ivety Štefanové k obhajobě.

V Praze dne 17.12.2018

  
doc. Ing. Jan Pánek, CSc.  
oponent

