

Oponentský posudek disertační práce

Název práce: Analýza biologicky aktivních látek s využitím moderních analytických metod

Autorka: Ing. Miroslava Juričová

Oponent: prof. Ing. Josef Čáslavský, CSc.
Ústav výzkumu globální změny AV ČR
Bělidla 986/4a, 603 00 Brno

Předložená disertační práce sestává ze tří částí. První je zaměřena na otázku izolace hydrofobinu SC3 a jeho identifikace pomocí moderních instrumentálních technik, druhá se zabývá charakterizací azaphilonových pigmentů jako potenciálních potravinářských barviv přírodního původu a třetí řeší analýzu fenolických látek v medovinách s cílem nalezení markerů, které by mohly sloužit k posouzení jejich kvality. Práce v rozsahu 90 stran textu doplněných seznamem citované literatury čítajícím 306 položek a přehledem publikačních aktivit autorky má standardní strukturu. Jazyková úroveň je velmi dobrá, prohrěšků proti gramatice jazyka českého je poměrně málo, nejčastějším je špatné kladní čárek ve větách. Autorka rovněž občas bojovala se skloňováním cizokrajných jmen a příjmení, se stupňováním přídavných jmen (str. 60: namísto „více běžné“ zavánějící anglicismem je lepší české „běžnější“); termín „oktadecylsilikagel“ se v češtině píše jako jedno slovo, spojka souřadící „neboli“ se píše bez spojovníku. Rovněž u některých chemických názvů je zřetelný vliv angličtiny (např. str. 24: „iodoacetamid“). Grafická úroveň je rovněž velmi slušná, práce působí úpravným dojmem, jen některé obrázky (např. Obr. 5, Obr. 6) ve mně vyvolávaly potřebu navštívit oftalmologa. Autorka se rovněž dopustila některých drobných nepřesností v terminologii – např. v seznamu zkratk a dále v textu popisuje PDA jako detektor diodového pole, upřednostnil bych výstižnější termín „detektor s diodovým polem“. Na str. 17 je uvedeno, že hydrofobiny snižují povrchovou aktivitu vody. Spíše bych řekl, že jakožto povrchově aktivní látky snižují povrchové napětí vody a tím umožňují překonávání mezifázového rozhraní. Na str. 19 autorka provzdušňuje kultivační médium oxidem uhličitým, což dost dobře nejde. Dále pak CO₂ označuje jako rozprašovací plyn – vhodnější by byl třeba termín „vynášecí“. Na str. 43 (a dále v textu) je nesprávné použití termínů „Mobilní fáze A“ a „Mobilní fáze B“ – jedná se o složky mobilní fáze, v chromatografickém systému je mobilní fáze pouze jedna. Na téže straně autorka použila termín „průtok plynu pro rozprašení eluátu“, obvykle se používá formulace „průtok zmlžovacího plynu“. Krom toho 1,5 l/min je podle mne docela málo. Na téže straně jsem byl poněkud ztracen v popisu nastavení parametrů hmotnostního spektrometru – matou mě v tomto kontextu pojmy „převodník“, „DL“ a „Heat Block“. Na str. 50 autorka uvádí, že „před 20-40 tisíci let panovaly v Africe podobné klimatické podmínky jako v současnosti. Střídání období extrémního sucha a příválových dešťů bylo běžné.“ – zde pravděpodobně autorce vypadlo upřesnění „jako v současnosti u nás“. „Pomocná organická rozpouštědla“ při SFE (str. 63) se zpravidla označují jako modifikátory. Výše uvedené detaily však nikterak nesnižují kvalitu disertační práce.

První část disertační práce je věnována problematice hydrofobinu SC3. Přehledně shrnuje vlastnosti hydrofobinů s důrazem na sledovaný hydrofobin SC3, dále diskutuje současné metody analýzy těchto látek. V experimentální části je pak ověřena možnost různých způsobů úpravy vzorku pro následnou izolaci hydrofobinu SC3 pomocí extrakce tuhými fázemi s využitím PTFE mikročástic. K finální analýze bylo využito elektromigračních a hmotnostně spektrometrických technik. Výsledky byly publikovány v časopis Journal of Separation Science.

Dotazy k této části:

- 1. Na obr. 10 uvádíte MALDI-TOF/TOF spektrum hydrofobinu SC3 a na obr. 14 v panelu A MALDI-TOF spektrum téže substance. Spektra se mi jeví prakticky totožná, až na rozdíly hmotnostech píků (m/z 14264.0–14265; 14101.3–14103). Čím si tyto rozdíly vysvětlujete?*
- 2. Uvádíte, že spektra před a po čištění (obr. 14A a 14C) mají podobný profil. Při porovnání obrázků s tímto tvrzením zcela nesouhlasím – maximum v panelu A je m/z 14265, v panelu C 14305. Intenzita spektra v panelu C je (pokud jsem se správně orientoval) o řád menší než v panelu A – takovýto vliv čištění bych neočekával. Jak byste vysvětlila píky s m/z 7130, 8752 a malý kopec na pravém okraji hmotnostních spekter?*
- 3. Na str. 30 se zmiňujete, že příčinou pouze několika píků peptidů s nízkou intenzitou po působení kyseliny permravnčí byla nemožnost registrace pravděpodobně vzniklých negativních iontů v pozitivním módu. Zkusila jste měření v negativním módu?*

Druhá část disertační práce je zaměřena na aktuální problematiku hledání barviv přírodního původu využitelných ve výživě lidstva namísto syntetických produktů. Předmětem studia byla barviva skupiny azaphilonů produkovaných mořskými houbami rostoucími na vnější straně korálového útesu u ostrova Réunion v Indickém oceánu. Barviva izolovaná ze získaného biologického materiálu byla identifikována pomocí HPLC-PDA-ESI/MS, UV-VIS a NMR (^1H , ^{13}C a několik 2D technik). Připomínku bych měl k titulku obr. 19 „Strukturální analýza identifikované sloučeniny č. 4“, který je podle mne dosti nadsazený, neboť je zde prezentováno UV-VIS spektrum ethylacetátového extraktu (očekával bych spíše spektrum studované sloučeniny) a ESI-MS spektra s nízkým rozlišením v kladném a záporném módu; co se měřilo není jasné, specifikace v titulku „ESI/MS spektrum změřené při snímání kladným iontů“ je poněkud nejasná. Nicméně ze zde prezentovaných dat se strukturální informace nezíská. Nesporným přínosem je, že v této práci byl nalezen a identifikován dosud nepopsaný pigment a získané výsledky byly publikovány v časopise *Journal of Food Composition and Analysis*.

Dotaz k této části: Co soudíte o praktickém významu výsledků této vaší práce pro naše podmínky?

Třetí část disertační práce se zaměřila na problematiku kvality medovin dostupných na tuzemském trhu, ať již přímo od producentů nebo v obchodní síti. Poměrně podrobně je popisován původ medu, technologie výroby medoviny, historie medu a medoviny, chemické složení medu a jeho příznivé účinky na lidský organismus. Poté jsou přehledně popsány metody extrakce fenolických látek z různých materiálů a analytické metody používané při stanovení skupinových charakteristik (celkové množství fenolických látek, antioxidační aktivita). Dále jsou charakterizovány chromatografické metody. V rámci experimentální části pak byla optimalizována technika extrakce a stanovení pro 10 fenolických látek a 14 fenolických kyselin v 38 vzorcích medovin získaných jak přímo od včelařů, tak i z obchodní sítě. Výsledky byly podrobeny rozsáhlé statistické analýze s cílem nalezení ukazatelů jakosti medovin a odhalení falšovaných vzorků.

Komentáře k této části:

- 1. Charakteristiku mikrovlnného záření jako paprsek nacházející se v elektromagnetickém spektru mezi rentgenovým a infračerveným paprskem (str. 64) nepovažuji za příliš šťastnou.*
- 2. V kap. 3.6.2 Parametry pro kvantifikaci se uvádí, že pro kvantifikaci byla zvolena metoda kalibrační křivky. Regresní charakteristiky prezentované v Tab. 7 (str. 78) však nápadně připomínají parametry přímky.*

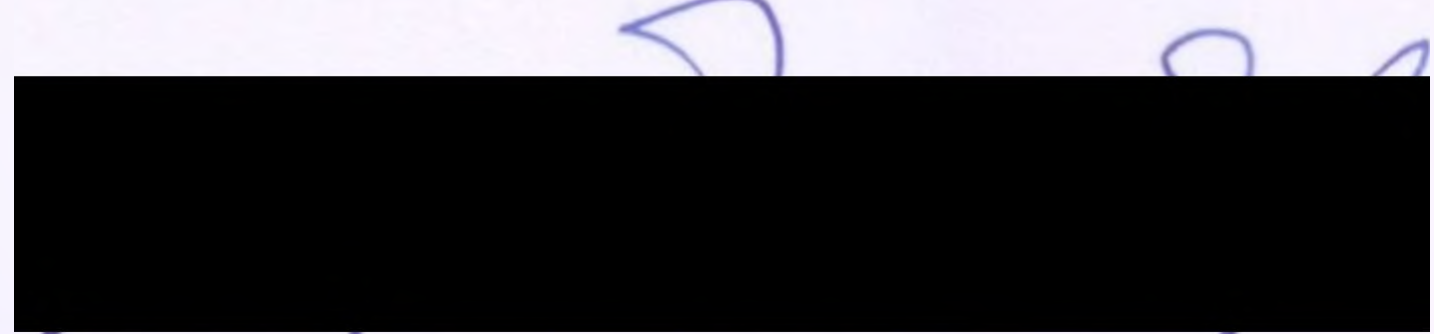
3. *Jsem mírně zmaten z údajů o počtu sledovaných látek. V seznamu standardů (kap. 3.5.2) je vyjmenováno 24 sloučenin, v popisu chromatogramu na str. 75 (Obr. 27) je jich 25 (oproti seznamu standardů je tam navíc hesperetin), v diskusi (kap. 3.6.1 Optimalizace HPLC/MS separace) je opět zmíněno 24 sloučenin, ale v Tab. 7 (str. 78) jsou uvedeny regresní parametry pro 23 sloučenin (chybí kyselina o-kumarová) a v Závěru (kap. 4, str. 90) je zmíněno rovněž 23 sledovaných látek.*
4. *Jako nedostatek se mi jeví neuvedení souboru s výsledky analýz. Pokud je dat velký počet a jejich zařazení do textu by působilo potíže, lze je uvést v příloze.*

Dotazy a náměty do diskuse k této části:

1. *K Tab. 7 (str. 78): Jak si vysvětľujete statisticky významné záporné hodnoty absolutních členů u kyseliny gentisové a u kvercetinu, případně i u dalších sloučenin?*
2. *Jak jste určovala hodnotu šumu u MS/MS detekce v režimu MRM?*
3. *Na str. 77 uvádíte, že LOD a LOQ byly určeny jako trojnásobek a desetinásobek odstupů signálu od šumu. Z tohoto pohledu překvapují hodnoty LOD a LOQ u kyseliny gallové, které jsou 0,714 a 5,714 ng/ml (str. 78).*
4. *Cílem této části disertace mělo být vytvoření rychlé a jednoduché metody pro ověření kvality medoviny. Mohla byste z tohoto pohledu zhodnotit vámi vyvinutý postup? Co byste uvedla jako markery kvalitní medoviny?*

Při celkovém zhodnocení předložené disertační práce po jejím zevrubném prostudování konstatuji, že její autorka Ing. Miroslava Juričová prokázala svoji schopnost řešit komplikované vědecké problémy i způsobilost k samostatné vědecké tvůrčí činnosti. Disertační práce splňuje všechny požadavky kladené na práce tohoto typu, prezentuje nové poznatky, které byly úspěšně publikovány v kvalitních odborných časopisech. Proto tuto disertační práci **doporučuji k obhajobě**.

V Brně dne 7. 5. 2021


Josef Čáslavský

Oponentský posudek na disertační práci

Autor: Ing. Miroslava Juričová

Název práce: Analýza biologicky aktivních látek s využitím moderních analytických metod

Školitel: Doc. Ing. Lenka Česlová, Ph. D.

Oponent: Ing. Karolína Benešová, Ph. D.

Předložená disertační práce Ing. Miroslavy Juričové se zahrnuje tři odlišné tematické okruhy. Je proto členěná do tří samostatných a ucelených kapitol, z nichž každá obsahuje teoretickou a experimentální část, získané výsledky a jejich diskusi a závěr, který stručně a přehledně shrnuje dosažené poznatky a jejich přínos a případné využití do budoucna. Pro každou kapitolu si autorka vytkla dva až tři cíle, které beze zbytku splnila.

Práce je napsaná velmi čtivou formou (zejména část o medu a medovinách), s minimem překlepů a chyb, má velmi dobrou stylistickou i grafickou úroveň a je vhodně doplněna tabulkami a obrázky. Práce obsahuje seznam těchto obrázků, tabulek a použitých zkratk, což usnadňuje orientaci a zvyšuje její přehlednost. Cituje více než 300 převážně cizojazyčných zdrojů.

První kapitola se zabývá izolací a charakteristikou hydrofobinu SC3 jako zástupce hydrofobinů 1. třídy z proteinové směsi. Metoda izolace tohoto hydrofobinu se jeví jako spolehlivá a selektivní a mohla by v budoucnu sloužit k získání dalších informací o vlastnostech hydrofobinů izolovaných z reálných vzorků.

Druhá kapitola je zaměřena na charakterizaci azaphilonových pigmentů, produkovaných vláknitými houbami, a jejich potenciálního využití jako potravinářských barviv. Vlákňité houby mohou však současně produkovat toxické metabolity, mykotoxiny, proto probíhá celosvětový výzkum ve snaze nalézt a identifikovat netoxické producenty přírodních pigmentů pro potravinářské aplikace. Konkrétně se autorka zabývala studiem mořské vláknité houby kmene 30548 *Talaromyces albobiverticillius*, izolované z korálového útesu ostrova Réunion. Bylo prokázáno, že některé druhy *Talaromyces* jsou schopné produkovat pigmenty bez současné produkce mykotoxinů a přináší tak možnost širokého budoucího využití. Přínosem této kapitoly je zejména identifikace nové molekuly monascového pigmentu, pojmenované zjednodušeně jako N-GABA-PP-V, která nebyla doposud popsána. Na základě dat z detektoru diodového pole a hmotnostní spektrometrie a potvrzením pomocí detailní NMR byla navržena a potvrzena struktura této sloučeniny (str. 46).

Třetí kapitola se zabývá analýzou fenolických látek v medovinách. Byla optimalizována metoda extrakce, identifikace a kvantifikace 23 fenolických látek (fenolických kyselin a flavonoidů), které se nejčastěji vyskytují v medu a tedy i v medovinách. Metoda byla použita k analýze 38 vzorků medovin. Získané výsledky

byly statisticky vyhodnoceny pomocí analýzy hlavních komponent (PCA) s cílem najít společné a rozdílné znaky a odhalit případně falšované vzorky. Součástí byla i analýza celkového množství fenolických látek pomocí Folin-Ciocalteuova činidla a stanovení celkové antioxidační aktivity pomocí ABTS a DPPH radikálů.

Získané výsledky byly publikovány v impaktovaných časopisech, kde prošly náročným recenzním řízením, a formou ústních či plakátových sdělení na mezinárodních konferencích.

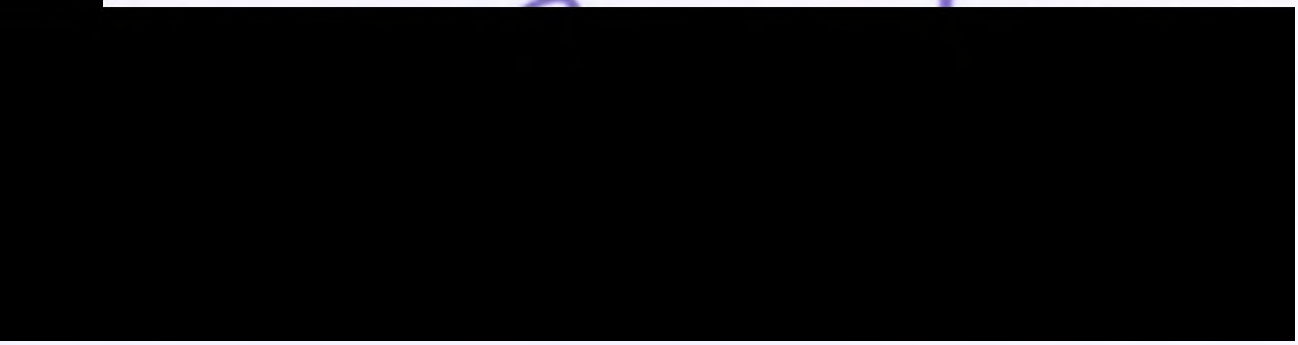
Závěr:

Předložená dizertační práce Ing. Miroslavy Juričové splňuje po stránce obsahové i formální požadavky stanovené příslušnými vyhláškami pro získání vědecko-akademické hodnosti. S přihlédnutím k výše uvedenému práci DOPORUČUJI K OBHAJOBĚ A NAVRHUJI, aby Ing. Miroslavě Juričové byl po úspěšné obhajobě udělen akademický titul Ph. D.

K práci mám následující připomínky dotazy:

- 1) Ocenila bych přidání časopiseckých publikací do disertační práce ve formě příloh, včetně práce, která je citována jen v literárních zdrojích a obsahuje podrobné informace o odběru, kultivaci, identifikaci použité mikroskopické houby a přípravě extraktů (cit. 122).
- 2) Byl popsán postup izolace hydrofobinu SC3 zkoušen na reálném vzorku?
- 3) Na str. 38 se uvádí (cit. 67), že při produkci pigmentů r. *Monascus* „může být společně s pigmenty produkován mykotoxin citrinin“. Je z literatury známo, které další mykotoxiny mohou být takto produkovány?
- 4) Na str. 85 autorka identifikovala dva vzorky medoviny, zakoupené v obchodní síti, které podle výsledků jejich analýz obsahovaly syntetický vanilin, nízké množství fenolických látek a které „nebyly vyrobeny z dostatečného množství medu, které je dáno vyhláškou“. Prosím o uvedení tohoto limitu (dostatečné množství medu), včetně zdroje.
- 5) Podle jakého klíče byly vybrány vzorky medovin k optimalizaci extrakce fenolických látek (medoviny č. 1, 3, 4)?
- 6) Na str. 72 je popsána SPE extrakce pomocí kolonky vlastnoručně vyrobené z 10 ml stříkačky a plněné sorbentem Amberlite XAD-2. Tato extrakce poskytla „mírně lepší“ výsledky než komerčně dostupná SPE kolonka s oktadecyl silikagelovou fází. Bylo množství sorbentu Amberlite XAD-2 nějak optimalizováno?

V Brně 13. 6. 2021


Výzkumný ústav pivovarský a sladařský
Mostecká 7, 614 00 Brno