



Zemědělská  
fakulta  
Faculty  
of Agriculture

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

## OBHAJOBA DISERTAČNÍ PRÁCE DSP PROTOKOL O HLASOVÁNÍ

**JMÉNO STUDENTA:** Ing. Petra KUČEROVÁ

**NAROZEN(A):** 27. 3. 1985

**STUDIJNÍ PROGRAM:** Chemie

**STUDIJNÍ OBOR:** Zemědělská chemie

**FORMA STUDIA:** Prezenční

### Výsledek hlasování:

počet členů komise: 7

počet přítomných členů komise: 7

počet platných hlasů: 7

kladných: 7

záporných: 0

počet neplatných hlasů: 0

### ZKUŠEBNÍ KOMISE:

### Podpis:

<b>Předseda:</b> prof. RNDr. Vlastimil Kubáň, DrSc., UTB Zlín	
<b>Členové:</b> <del>prof.</del> doc. Ing. Jan Tříška, CSc., CVGZ AV ČR České Budějovice (oponent)	
prof. Ing. Martin Křížek, CSc., ZF JU v Českých Budějovicích	
prof. Ing. Pavel Kalač, CSc., ZF JU v Č. Budějovicích	
prof. Ing. Jaromír Lachman, CSc., ČZU v Praze (oponent)	
doc. Ing. Dr. Karel Cejpek, VŠCHT v Praze (oponent)	
doc. Ing. Jan Pánek, CSc., VŠCHT v Praze	
<b>Náhradníci:</b> prof. Ing. Ladislav Kolář, DrSc., ZF JU v Českých Budějovicích	
doc. Ing. Eva Dadáková, Ph.D., ZF JU v Českých Budějovicích	



Zemědělská  
fakulta  
Faculty  
of Agriculture

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

## PROTOKOL O OBHAJOBĚ DISERTAČNÍ PRÁCE DSP

**JMÉNO STUDENTA DSP:** Ing. Petra KUČEROVÁ

**NAROZEN(A):** 27. 3. 1985 v Dačicích

**STUDIJNÍ PROGRAM:** Chemie

**STUDIJNÍ OBOR:** Zemědělská chemie

**FORMA STUDIA:** Prezenční

**ŠKOLICÍ PRACOVISTĚ:** KCH, ZF JU v Českých Budějovicích

**DATUM A MÍSTO KONÁNÍ ZKOUŠKY:** 23. 9. 2013, ZF JU v Č. Budějovicích

**ZKUŠEBNÍ TERMÍN Č.:** první

**NÁZEV DISERTAČNÍ PRÁCE:**

**Barevné sloučeniny vznikající během zpracování česnekovitých rostlin**



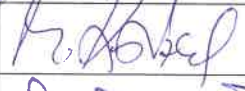




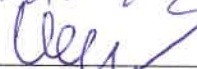

**VÝSLEDEK OBHAJOBY:**

Prospěl(a)

~~Neprospěl(a)~~

**ZKUŠEBNÍ KOMISE:**

**Podpis:**

<b>Předseda:</b> prof. RNDr. Vlastimil Kubáň, DrSc., UTB Zlín	
<b>Členové:</b> doc. Ing. Jan Tříška, CSc., CVGZ AV ČR České Budějovice (oponent)	
prof. Ing. Martin Křížek, CSc., ZF JU v Českých Budějovicích	
prof. Ing. Pavel Kalač, CSc., ZF JU v Č. Budějovicích	
prof. Ing. Jaromír Lachman, CSc., ČZU v Praze (oponent)	
doc. Ing. Dr. Karel Cejpek, VŠCHT v Praze (oponent)	
doc. Ing. Jan Pánek, CSc., VŠCHT v Praze	
<b>Náhradníci:</b> prof. Ing. Ladislav Kolář, DrSc., ZF JU v Českých Budějovicích	
doc. Ing. Eva Dadáková, Ph.D., ZF JU v Českých Budějovicích	

## Odovědi na připomínky oponentského posudku prof. Ing. Jaromíra Lachmana, CSc. při obhajobě 23. 9. 2013

Nomenklatura organických sloučenin není někdy přesná např. by správně mělo být *S*-allylprop-2-enthiosulfínát, (*E*)-*S*-but-2-en-1-yl- apod. V některých případech jsou názvy uvedeny dobře. V kapitole Výsledky a diskuze je nomenklatura zcela perfektní.

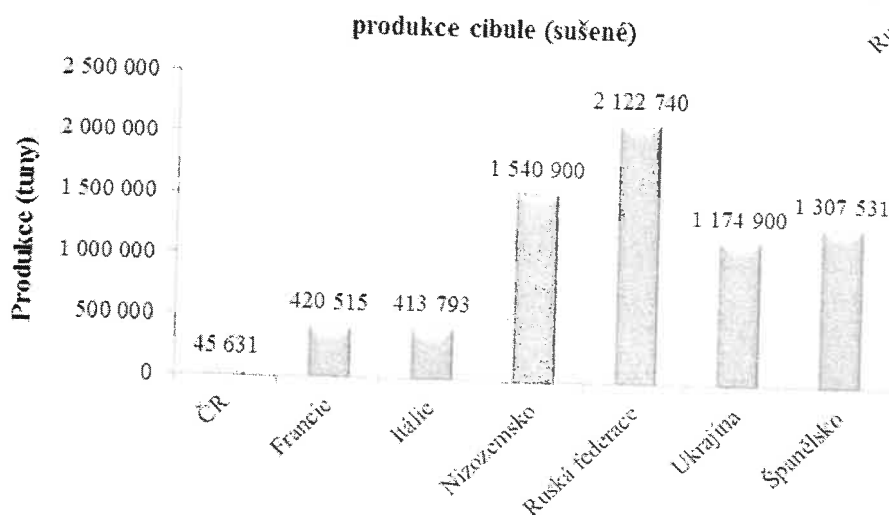
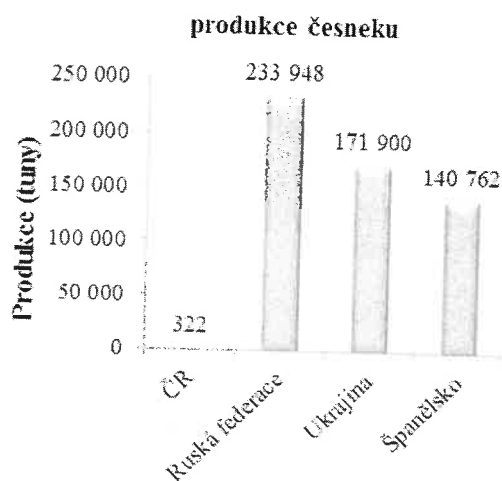
U jednodušších molekul jsem se rozhodla zvolit tento „starší“ způsob pojmenování zejména kvůli přehlednosti. Tento způsob nomenklatury se zároveň běžně ve světové vědecké literatuře dodnes používá. Např. (*E*)-*S*-1-propenyl- mi přijde stejně výstižný a zároveň přehlednější než (*E*)-*S*-prop-1-en-1-yl-. U složitějších sloučenin jsem pak zejména kvůli jednoznačnosti přešla na nomenklaturu dle pravidel IUPAC.

**Enzymatická oxidace fenolických kyselin v cibuli a póru – můžete popsat, které fenolické sloučeniny se tohoto mechanismu účastní a jaké produkty touto reakcí vznikají?**

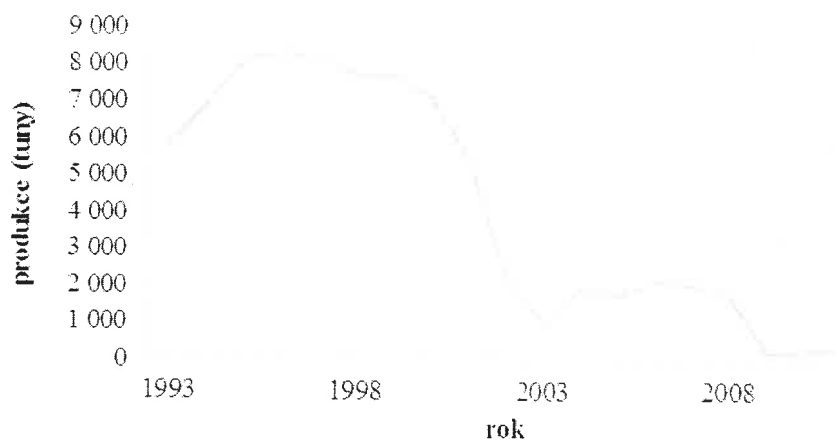
Jednalo se o návrh mechanismu tvorby barevných sloučenin, který byl předložen v 60. letech 20. století. Vědci detekovali v cibuli a póru aktivitu peroxidasy, katalasy a fenolasy. Zároveň testovali diethyletherový extrakt pomocí  $\text{FeCl}_3$  na přítomnost fenolických sloučenin. Tento test vyšel pozitivní, proto předpokládali, že během procesu vzniká chinon, který následně reaguje s aminokyselinami za vzniku barevných látek. Později byla tato hypotéza vyvrácena.

**Jaká je produkce česneku a cibule dle FAO v ČR ve srovnání s evropskými a světovými producenty?**

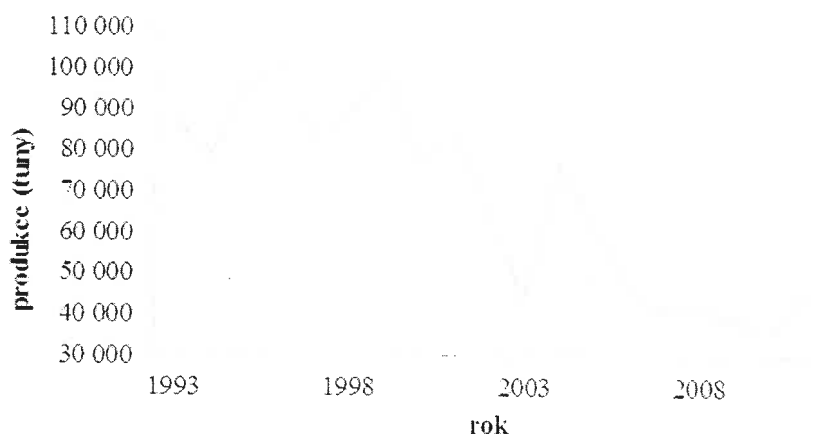
Produkce česneku a cibule v ČR klesá. Největší propad zaznamenává FAO v roce 2003. V posledních dvou letech však dochází k mírnému nárůstu. V roce 2011 byla produkce česneku v ČR 322 tun a sušené cibule 45 tisíc tun. V porovnání s evropskými producenty je produkce česneku v ČR zhruba o tři řády nižší, v případě cibule je produkce nižší přibližně o dva řády. V porovnání s největšími světovými producenty je produkce česneku a cibule v ČR zanedbatelná. Největším producentem česneku i cibule je Čína, jejíž produkce česneku v roce 2011 byla téměř 20 milionů tun a produkce sušené cibule byla necelých 25 milionů tun.



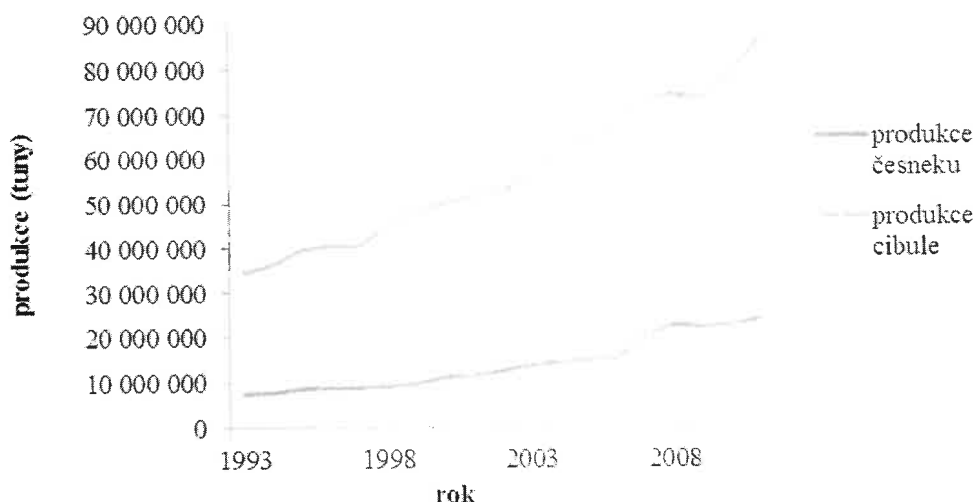
vývoj produkce česneku v ČR



vývoj produkce cibule v ČR



vývoj světové produkce česneku  
a cibule



**Jaký je Váš názor na využití  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR analýz pro identifikaci přírodních látek obsažených v zelenině resp. ovoci, např. barviv, antioxidantů aj.?**

Pro identifikaci čistých látek je to určitě velmi vhodná metoda. Ve směsích by se NMR analýza dala využít k velmi hrubé kvantifikaci některých látek. V dané směsi nesmí docházet k interferencím. Např. byla provedena analýza allylových sloučenin v extraktu z česneku (Hile a kol., *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 2192–2196). Osobně si myslím, že pro analýzu směsí jsou vhodnější jiné metody, např. spojení LC-NMR případně IČ spektroskopie.

**Daly by se nalezené rozdíly ve struktuře a zastoupení barevných látek v cibuli, česneku kuchyňském a sicilském a rovněž v cibuli obří využít pro určení jednotlivých genotypů? Daly by se rovněž najít podobné rozdíly pro genotypy odrůd?**

Zastoupení barevných látek je velmi proměnlivé, navíc na tvorbu těchto barevných sloučenin má vliv mnoho faktorů (teplota, pH, skladovací podmínky, aktivita enzymů...). Případná analýza by byla časově náročná, proto je vhodnější použít kvantifikaci prekurzorů těchto barevných látek.

**Co soudíte o možnosti vyšlechtění kultivarů cibule a póru s vysokou aktivitou LF-synthasy? Vyšší hladina isoalliinu v cibuli a póru je žádána z potravinářského i farmaceutického hlediska – vznikají thiosulfináty, ale také slzotvorný propanthialsulfoxid. Jaká by potom byla preference. Bud' omezené červeného zbarvení nebo vyšší koncentrace slzotvorného propanthialsulfoxidu?**

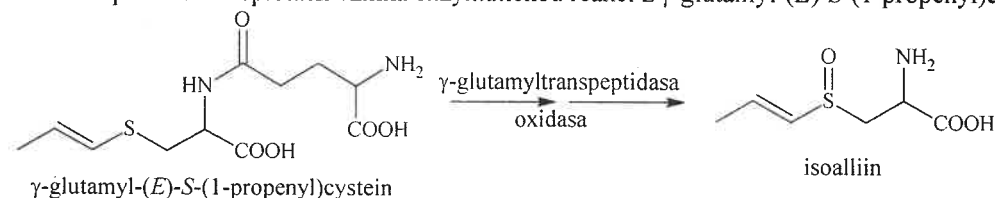
V nedávné době byla vyšlechtěna tzv. „tearless onion“ (Eady a kol., *Plant Phys.* 2008, 147, 2096–2106). Jedná se o geneticky modifikovanou rostlinu, která je však náchylnější k červenání. Pro zpracování ve velkém množství je tedy nevyhovující. Obecně lze říci, že pro průmyslové zpracování by byl vhodnější kultivar s vyšší aktivitou LF-synthasy a pro kulinářské účely by byl naopak vhodnější kultivar, který má nižší aktivitu tohoto enzymu. Při běžném kuchyňském zpracování není vznik barevných látek v cibuli pozorován a zároveň je vyšší hladina isoalliinu požadována kvůli vzniku typické chuti a aroma.

**Podobně šlechtění česneku s minimálním obsahem isoalliinu a maximálním zastoupením alliinu a jeho konverzi na allicin by mohlo být významné pro praktické účely?**

V tomto případě by vyšlechtění takového kultivaru bylo vhodné jak pro kulinařské účely, tak i pro průmyslové zpracování, neboť na požadovanou chuť a aroma v česneku nemá isoalliin vliv.

**Můžete popsat rozdíl v mechanismu vzniku barevných sloučenin v česneku při skladování při vyšší teplotě (20 °C) a nižší teplotě skladování (4 – 5 °C)?**


Mechanismus je stále stejný, při různých skladovacích podmínkách je pouze rozdíl v obsahu isoalliinu v česneku. Isoalliin při nižších teplotách vzniká enzymatickou reakcí z  $\gamma$ -glutamyl-(*E*)-*S*-(1-propenyl)cysteinu.



**Lze na základě výsledků řadit *A. sicutum* spíše k cibuli a póru?**

Chováním ano, ale z genetického a morfologického hlediska ne, protože se *A. sicutum* od cibule liší počtem chromozomů, tvarem listů apod. Česnek sicilský se taxonomicky řadí do specifického podrodu *Nectaroscordum*.

V Českých Budějovicích dne 23. 9. 2013

  
.....  
Petra Kučerová

## Odovědi na připomínky oponentského posudku doc. Dr. Ing. Karla Cejпка při obhajobě 23. 9. 2013

**Byl alanin pouze modelovou aminokyselinou nebo se jiné aminokyseliny na diskoloraci neuplatňují? Chybí rešeršní informace o základním složení studovaných rostlin, zejména obsah volných aminokyselin a karbonylů, včetně cukrů.**

Alanin byl použit pouze jako modelová aminokyselina. Je komerčně dobře dostupná a její velkou výhodou je i dostupnost jeho izotopově substituovaných forem. Například glycin je až příliš reaktivní a nebyl proto vhodný. Cílem práce bylo pochopit základní procesy, které vedou ke vzniku zbarvení, proto byla zvolena jedna modelová aminokyselina, aby byly vzniklé barevné směsi pokud možno co nejjednodušší. V samotných rostlinách se s největší pravděpodobností na diskoloraci podílejí úplně jiné aminokyseliny (např. Gln, Glu, Asn, Asp, Arg, Lys), dipeptidy nebo oligopeptidy.

Z dosavadní rešerše vyplývá, že cukry se tohoto procesu neúčastní a tvorba zbarvení probíhá za účasti karbonylových sloučenin, které vznikají až rozkladem prekurzorů, proto jejich složení ve zkoumaných rostlinách nebylo studováno.

**V některých česnekových přípravcích dochází k rozvoji neenzymového hnědnutí. Mají tyto reakce nějakou souvislost s Vámi popsaným zelenáním česneku a růžovění cibule?**

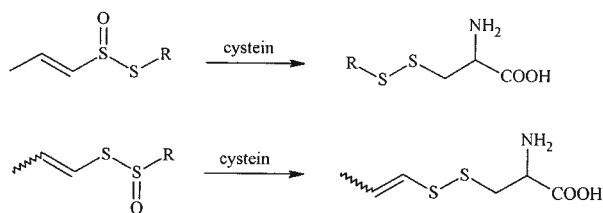
Tato hypotéza se nedá ani potvrdit ani vyloučit. K prokázání, zda dané sloučeniny vznikají dalšími reakcemi při diskoloraci, by byly potřeba další analýzy a měření.

**V poslední době jsou snahy odlišit český česnek od importovaného. Je náchylnost k diskoloraci otázkou odrůdy, případně některého jejího znaku?**

Obsah klíčových prekurzorů byl porovnáván a jejich hladiny jsou velmi podobné. Na diskoloraci česneku mají vliv také transportní a skladovací podmínky. Pokud je česnek skladován při nižších teplotách, dochází ke zvýšení množství isoalliinu a je tedy následně náchylnější k modráním. Nezanedbatelný vliv na tvorbu barevných látek má také aktivita aliinasy. Tato aktivita však také může být spojena se skladovacími a transportními podmínkami.

**Jak zasahuje kyselina askorbová a cystein do reakcí, které vedou k diskoloraci?**

Kyselina askorbová společně s kyselinou citronovou ovlivňuje červenání cibule a póru. Zřejmě dochází ke snížení pH, při kterém tvorba barevných látek není tak intenzivní. Aminokyselina, která se reakce účastní, nesmí být v protonizované formě. Cystein reaguje s thiosulfináty obsahujícími 1-propenylovou skupinu za vzniku substituovaného disulfanylaninu.




**Jak se liší minimální množství látek nutná pro spolehlivou detekci v LC-NMR ve srovnání s NMR?**

Tato množství se liší v závislosti na tom, jaké analýzy potřebujeme. Při použití LC-NMR je požadované minimální množství samotné látky pro měření  $^1\text{H}$  spekter  $1\ \mu\text{g}$ , pro určení struktury je však potřeba  $100\ \mu\text{g}$ . Reálná množství ovšem mohou být o mnoho vyšší. V našem případě jsme z  $250\ \mu\text{g}$  extraktu získali  $^1\text{H}$  spektrum. Pro klasické NMR experimenty je reálné množství vzorku  $1\text{-}50\ \mu\text{g}$  pro  $^1\text{H}$  spektra a  $10\text{-}100\ \mu\text{g}$  pro  $^{13}\text{C}$  experimenty.

**V kapitole Výsledky a diskuze jsem nenašel návrh opatření, která zamezí vzniku zbarvení, tyto informace byly uvedeny pouze v závěru, který je příliš obsáhlý.**

Návrhy opatření, která zamezí vzniku barevných látek jsem umístila pouze do závěru, protože text není příliš obsáhlý a docházelo by k jeho opakování.

V Českých Budějovicích dne 23. 9. 2013

  
.....  
Petra Kučerová



## Odpovědi na připomínky oponentského posudku **prof. Ing. Jana Třísky, CSc.** při obhajobě 23. 9. 2013

### **Byl již nalezen *S*-ethylcysteinsulfoxid?**

Ano, tato aminokyselina byla detekována v několika druzích česnekovitých rostlin doc. Kubcem (Kubec a kol., *J. Food Agric. Chem.* 2000, 48, 428–433). Ve studovaných druzích však jeho relativní zastoupení vzhledem k ostatním *S*-alk(en)yl-cysteinsulfoxidům není obvykle vyšší než 1 %. Tato aminokyselina také není sensoricky významná, proto nebyla zařazena do přehledu sirmých aminokyselin v této práci.

**Při popisu GC-MS analýz na str. 33 bylo uvedeno, že vzorky byly nastříkány na křemennou kapilární kolonu s použitím děliče toku 1:10. Jedná se o techniku on column nebo o špatnou formulaci když se dále uvádí, že teplota nástřiku byla 180 °C?**

Jedná se zřejmě o nesprávnou formulaci. Správně by měla být uvedena teplota injektoru.

### **Jakým způsobem byly získány hodnoty molekulových hmotností v této práci?**

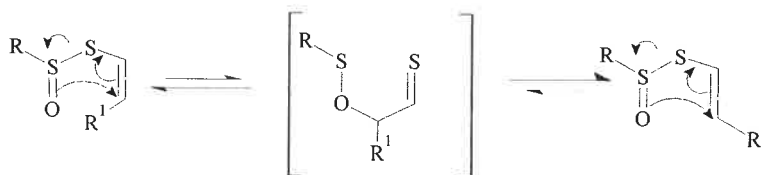
Jako vyhodnocovací software byl použit program Peakview od firmy AB SCIEX. Molekulové hmotnosti a elementární složení barevných sloučenin byly určeny vyhodnocením dat získaných jak pomocí ESI(+), tak i ESI(□). Další potvrzení správnosti poskytla měření těchto sloučenin získaných z izotopicky substituovaných prekurzorů. Ve všech případech odchylka změřených a vypočtených hodnot byla nižší než 3 ppm. V tabulkách jsou uvedeny hodnoty monoizotopických molekulových hmotností pro ionty  $[M + H]^+$  resp.  $[M - H]^+$ . Musím uznat Vaši připomínku, že uvedené sumární vzorce nejsou napsány úplně správně, protože u nich není vyznačen náboj.

### **Co znamená katalytická dehydratace IČ zářením?**

Jedná se o techniku, kdy vzduch nebo propan prochází podložkou s katalyzátorem a velmi efektivně tak dochází k produkci tepelného záření pomocí katalytické reakce. Celý proces probíhá za nižších teplot, než je zápalná teplota daného plynu. Výhoda proti klasické dehydrataci tkví v přímé přeměně plynu na tepelné záření bez použití elektřiny. Bohužel autoři článku další detaily této nové techniky nezveřejnili.

### **Čím je způsobena *E/Z* izomerizace mono- $\alpha,\beta$ -nenasycených thiosulfinátů?**

Ačkoli se prekurzor těchto thiosulfinátů, isoalliin, v česnekovitých rostlinách vyskytuje pouze v geometrické konfiguraci *E*, thiosulfináty, které vznikají jeho rozkladem, se však vyskytují v konfiguracích *E* i *Z*. Tvorba těchto *Z* izomerů je vysvětlována pomocí [2,3]-sigmatropního přesmyku. Meziprodukt této konverze pak má poločas existence přibližně jednu hodinu při 25 °C.



V Českých Budějovicích dne 23. 9. 2013

*Petra Kučerová*  
.....

Petra Kučerová

## ZÁPIS Z OBHAJOBY DISERTAČNÍ PRÁCE ING. PETRY KUČEROVÉ ZE DNE 23. 09. 2013

Prof. Kalač, předseda oborové rady, zahájil obhajobu a představil jednotlivé členy komise a oponenty.

Řízení obhajoby převzal prof. Kubáň. Ten seznámil přítomné s životopisem uchazečky a s její publikační činností.

Prof. Křížek, vedoucí katedry aplikované chemie ZF JU, přednesl stanovisko katedry a doporučil práci k obhajobě.

Doc. Kubec, školitel uchazečky, seznámil přítomné se svým stanoviskem, velice ocenil i zapojení uchazečky do výzkumného týmu, pomoc ostatním členům týmu a spolupráci s některými partnerskými pracovišti. Nakonec doporučil práci k obhajobě.

Prof. Kubáň vyzval uchazečku o představení své disertační práce formou prezentace s výkladem.

Po prezentaci přednesl prof. Lachman svůj obsáhlý oponentský posudek a položil uchazečce četné dotazy. Všechny byly zodpovězeny, oponent konstatoval, že je spokojen.

Další oponent, prof. Tříška, přednesl svůj posudek a položil uchazečce dotazy. Všechny byly zodpovězeny k naprosté spokojenosti oponenta.

Třetí oponent, doc. Cejpek, přednesl svůj posudek a položil uchazečce dotazy. Všechny byly zodpovězeny, oponent konstatoval, že je spokojen.

Prof. Kubáň následně otevřel diskusi:

Prof. Kalač: V prezentaci je nutné uvádět zdroj dat i u grafů. Jak byste přeložila termín „tearless onion“?

Ing. Kučerová: Bezslzná. Nevyvolávající slzení.

Prof. Kalač: Co je to fenoláza? Neměla to být spíše polyfenoloxidáza?

Ing. Kučerová: Možná ano, ale tento termín byl uváděn v jednom článku a opakoval se.

Prof. Kalač: Co je to blanšírování a proč se provádí?

Ing. Kučerová: Zelenina se chvíli ponechá v horké vodě a pak se zchladí. Zabrání to vzniku barevných sloučenin.

Prof. Kalač: Objevili jste nějaké zcela nové sloučeniny?

Ing. Kučerová: U cibule a česneku ne. Jen jsme jednu, jejíž struktura byla v literatuře špatně popsána, opravili a přejmenovali.

Doc. Dadáková: Mají nově vzniklé barevné sloučeniny i nějakou biologickou aktivitu?

Ing. Kučerová: U cibule obří ne. Jinak nebylo testováno, neboť jsme měli k dispozici pouze směs, ne izolované látky.

Prof. Křížek: Cibule, která štípe, má tedy bálo barevných sloučenin a naopak?

Ing. Kučerová: Ano, je tomu tak. Zmínila jsem to již v prezentaci.

Prof. Kolář: I když jste říkala, že barviva nejsou závislá na odrůdě, český paličák je přesto zbarven domodra.

Ing. Kučerová: Ano, ale to jsou zcela jiná barviva anthokyanové povahy, která se přirozeně vyskytují ve slupkách.

Prof. Tříška: Na trhu jsou dostupné různé léčivé přípravky a návody a recepty s obsahem česneku. Fungují?

Ing. Kučerová: Mohou být aktivní, ale aktivita se liší například u čerstvého rozetřeného česneku a u vařených produktů, past apod. Roli mohou hrát i jiné látky.

Prof. Kalač vyzdvihl celkovou úroveň práce, tématu i školitele.

Prof. Kubáň ukončil rozpravu, komise a školitel se následně odebrali k neveřejnému hodnocení a k závěrečnému hlasování. Hlasujících: 7. Přítomno: 7. Pro: 7. Proti: 0. Zdržel se: 0.

Ing. Petra Kučerová úspěšně obhájila svou disertační práci.

V Českých Budějovicích dne 23.09.2013 zapsal Martin Šeda.

