

**Oponentský posudek
doktorské disertační práce Ing. Ivety Marešové
„Biomasa jako zdroj lignanů a studium jejich distribuce“**

Práce je zaměřena na studium distribuce lignanů v biomase dřevin (smrku ztepilém) a vybraných druhů obilovin a pseudocereálií – v prosu, pohance, amarantu a v odpadních zemědělských produktech. Výsledky práce přináší nové informace o identifikovaných lignanech v suchém smrkového dřeva a přírodních vodách a o distribuci lignanů v biomase obilovin a pseudocereálií. Podstatnou součástí práce je rovněž vývoj a optimalizace metod pro zpracování vzorků, identifikaci a kvantifikaci majoritních lignanů – hydroxymatairesinolu (HMR), sekoisolariciresinolu (SEC), matairesinolu, lariciresinolu (LAR) a cyklolariciresinolu (CLAR). Dalším cílem práce byla identifikace minoritních lignanů a lignanů ve vodním ekosystému. Z testovaných extrakčních technik byla nejúčinnější metoda zrychlené extrakce rozpouštědlem ASE za použití metanolu nebo směsi acetonu s vodou (70:30 nebo 95:5 V/V) po odstranění lipofilních látek n-hexanem a následující analýzou kapalinovou chromatografií s hmotnostní detekcí (LC-MS) za využití chemické ionizace za atmosférického tlaku (APCI) v negativním modu. V suku smrku ztepilého byly metodou GC-MS identifikovány lignany 7S-todolaktol A a 7R-todolaktol A, 7-hydroxylariciresinol, stereoisomery 9'-hydroxylariciresinolu a 7S a 7R-isoliovily. Ve vzorcích pohanky seté, tatarské, prosa setého a amarantu bylo pomocí LC-MS kvantifikováno 10 lignanů. Ve stoncích, kořenech, slupkách a nažkách pohanky byly zaznamenány statisticky významné rozdíly v obsahu lignanů, přičemž v obalových vrstvách nažek tvořily pouze 3 % celkového obsahu. Profily zastoupení lignanů pro odrůdy pohanky resp. odrůdy prosa byly podobné. Značně nerovnoměrné zastoupení bylo nalezeno v jednotlivých orgánech pohanky, prosa, amarantu s korelacemi pro kořeny, stonky i slupky a roky 2011 a 2012. Zajímavé je stanovení lignanů v matolinách a semenech hroznů révy vinné (CLAR, SEC a LAR). Významné je zjištění, že přítomnost lignanů ve vodě by mohla být biomarkerem lužního lesa.

Práce je napsána a členěna klasickým způsobem, zahrnuje 130 stran a s přílohami 163 stran a s počtem 95 světových odkazů. V práci je uvedeno 48 obrázků, 34 tabulek a 8 příloh. Podstatnou součástí práce jsou rovněž vědecké publikace v impaktovaných časopisech, např. Wood Research (IF=0.275), Food Chemistry (IF=3,334). Práce je doplněna seznamem publikační činnosti autorky.

K vlastní práci mám několik připomínek a dotazů do diskuze:

- Koniferylalkohol je prekursorem ligninů a lignanů jehličnatých stromů (koniferii), zatímco sinapylalkohol je prekursorem ligninu a lignanů listnatých stromů. Dají se tyto prekurzory vystopovat v zastoupení lignanů ve smrku ztepilém, pseudocereáliích a matolinách a semenech révy vinné? Souvisí jejich zastoupení ve vodách se stromy v lužních lesích (biomarkery)?
- Je známo, že protolignin je velice obtížně izolovatelný, proto existují různé modely ligninu (Freudenbergerův, Nimzův, Klasonův atd.). Je zde možnost změny struktury lignanů během jejich izolace různými postupy jako je tomu u ligninu?
- Zaujal mě staročeský název dvouzrnky okříž, vznik českému pojmenování dal osinatý klas, který se rozpadá na dvouzrné klásky. A tak jsem zjistil, že existují i další synonyma dvouzrnky – polopolba nebo tekél.

- Práce je pečlivě napsána, objevují se jenom drobné překlepy, např. na str. 15 smrku ztepilého, fytoestrogeny na str. 26, plocha vnitřního standardu na str. 47, identifikace s. 63, spektry s. 69.
- Mohla byste stručně popsat potenciál využití lignanů (HMR, SEC, LAR, NTG) jako vedlejších produktů při průmyslovém zpracování dřeva?
- Jaký je princip metody zrychlené extrakce rozpouštědlem ASE a jak vypadá porovnání s klasickými extrakčními metodami?
- Za přínos pokládám projekci vzorků pohanky seté a prosa do komponentní roviny pro zhodnocení distribuce lignanů v jednotlivých částech rostlin, která odhalila rozdíly v zastoupení lignanů ve slupkách, nažkách a kořenech jednotlivých odrůd.
- Jak lze vysvětlit vyšší obsah lignanů ve vzorcích červených vín ve srovnání s víny bílými? Zajímavý je poznatek, že v matolinách byl vyšší obsah SYR ($5,6 \text{ mg.kg}^{-1}$), který však nebyl detekován v semenech.
- Vyšší obsah lignanů v přírodních vodách je dán trvale zamokřenými plochami se stojící vodou a různými druhy dřevin (vrby, olše). Bylo by zajímavé analyzovat lignany ve vztahu k různým druhům dřevin s různým kvalitativním a kvantitativním zastoupením lignanů a ligninu.

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. Ivety M a r e š o v é k obhajobě a po úspěšné obhajobě udělení titulu Ph.D.

V Praze dne 12. června 2014



.....
 Prof. Ing. Jaromír Lachman, CSc.,
 Katedra chemie,
 Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů,
 Česká zemědělská univerzita,
 Kamýcká 129,
 165 21 Praha 6 – Suchdol

Oponentský posudek doktorské disertační práce Ing. Ivety Marešové
„Biomasa jako zdroj lignanů a studium jejich distribuce“

Dosažení stanovených cílů

Předložená práce si vytyčila tyto cíle:

- a) Studium distribuce lignanů v biomase dřevin, zejména smrku ztepilém, v biomase vybraných druhů obilovin a pseudocereálií, v prosu, pohance a amarantu a v odpadních zemědělských produktech.
- b) Vývoj a optimalizace metod pro přípravu a zpracování vzorků a jejich analýzu. Identifikovat a kvantifikovat hlavní lignany zejména HMR, SEC, MR, LAR, CLAR. Identifikovat i minoritní lignany pomocí moderních instrumentálních metod.
- c) Identifikovat lignany ve vodním ekosystému.

Všechny tyto cíle byly v předložené práci úspěšně splněny.

Úroveň rozboru současného stavu řešené problematiky v disertaci

Práce obsahuje detailní rozbor řešené problematiky: obsahuje přehled chemické struktury lignanů, výskyt a potenciální roli lignanů v rostlinách, přehled výskytu lignanů v dřevinách (smrku, borovici, jedli), dále přehled výskytu lignanů v potravinových surovinách a potravinách a v přírodních vodách. Práce dále dává přehled o výskytu lignanů u savců a člověka. Rovněž je podán podrobný přehled biologických účinků lignanů u vyšších organismů včetně člověka. Jsou rozebrány účinky jako antioxidační aktivita, estrogení aktivita, protinádorová aktivita, antivirová aktivita, interakce rostlin a hmyzu. Je podán stručný přehled dosud používaných analytických metod ke stanovení obsahu lignanů. str. 11-29.

Rozbor je podán vynikající formou s přímým vztahem k řešené problematice.

Teoretický přínos disertační práce

Práce obsahuje řadu řešení na vysoké analytické úrovni. Jde zejména o aplikaci netradičních analytických metod, stanovení lignanů dosud běžně nestanovovaných v netradičních částech biologických materiálů (zejména v kořenové části rostlin).

Předložená teoretická řešení přinášejí nové poznatky a umožňují kvantitativní stanovení obsahu lignanů ve studovaných materiálech.

Praktický přínos disertační práce

Předložená disertace má nesporný praktický přínos pro další práci, zejména při budoucím využití získaných znalostí o obsahu lignanů v různých částech studovaných rostlin a materiálů.

Konstatuji, že praktické poznatky předložené práce jsou vysoce užitečné.

Vhodnost použitých metod řešení

Disertantka použila vhodné metody řešení dílčích analytických problémů. Ve většině řešených problémů postupovala vhodně zvoleným experimentem. Její výsledky mají přímou aplikovatelnost v praxi.

Použité metody řešení problematiky byly vhodné a přinesly nové poznatky.

Způsob aplikace použitých metod

Způsob aplikace použitých analytických a statistických metod odpovídal účelu a zejména cíli řešení.

Ke způsobu aplikace nemám výhrady.

Prokázání znalostí disertantky v daném oboru

Disertantka prokázala hluboké znalosti v oboru analýzy lignanů ve všech studovaných materiálech. Je dobře obeznámena s výhodami jejich aplikace přispěla svojí prací k odhalení některých dosud nenalezených lignanů v materiálech.

Disertantka prokázala hluboké znalosti v řešené problematice.

Formální úroveň práce

Práce přináší řešení tří cílových problematik a je vhodně členěna tak, že nejprve popisuje použité materiály a metody a dále prezentuje dosažené výsledky analýz vhodně statisticky zpracované. Práce se opírá o 95 hodnotných literárních odkazů a prezentuje 3 vlastní publikace, 1 užitný vzor, 1 patent a 6 prací presentovaných ve sbornících konferencí. Žádné formální nedostatky jsem při podrobném čtení práce nezjistil (drobné překlepy jsem vyznačil přímo v práci, nemají žádný negativní význam na kvalitu práce).

Formální úroveň předložené disertace je vysoká.

Závěrečné doporučení

Vzhledem k vynikajícím získaným poznatkům bych se rád dotázal, která rostlina dává největší potenciál pro praktické těžení lignanů s cílem obohatit lidskou výživu.

Vzhledem ke kvalitě dosažených výsledků a celkové úrovni práce **d o p o r u ě j i** tuto disertační práci k obhajobě.

V Praze dne 16. 6. 2014



Ing. Milan Houška, CSc
Výzkumný ústav potravinářský Praha, v.v.i.
Radiová 7
102 31 Praha 10

Oponentský posudek

**na doktorskou disertační práci
Ing. Ivety Českové-Marešové**

„Biomasa jako zdroj lignanů a studium jejich distribuce“

Doktorský studijní program: Chemie
Obor: Zemědělská chemie
Zemědělská fakulta JU v Českých Budějovicích
Datum obhajoby: 23. 6. 2014

Oponent:
Prof. Ing. Ladislav Kolář, DrSc.
Katedra aplikovaných rostlinných biotechnologií
ZF JU v Českých Budějovicích

České Budějovice, 5. 6. 2014

Už v úvodu mého posudku disertační práce Ing. Ivety Marešové bych chtěl zdůraznit významnou osobní vlastnost autorky, která je rozhodující pro každou úspěšnou vědeckou práci. Doktorandka při volbě tématu nehledala cesty, které by jí práci usnadnily, ani pro ni nebyla rozhodující doba, kterou měla na svoji disertaci vynaložit. Rozhodující pro ni bylo, aby to bylo téma nové, aby to byla cesta, kterou se před ní ubíral někdo spíš snad výjimečně a aby její práce přinesla nikoli jen publikovatelné, ale opravdu zcela nové výsledky. V podstatě tím naplnila představy nás všech, kteří v oblasti vědecké výchovy pracujeme, jak by měla doktorská práce vypadat. Snad se může někomu zdát, že to zde zdůrazňuji zbytečně, ale dlouholetá zkušenost mi dokazuje, že nesmyslná honba za podílem vysokoškolsky vzdělaného obyvatelstva u nás vede k logickému snížení úrovně, a to se projevuje nejen u absolventů vysokých škol, ale často i u doktorandů některých fakult a některých oborů, v jejichž doktorských disertacích je požadavek vědecky nového poznatku splněn dosti problematicky. Proto volbu náplně doktorské disertační práce Ing. Marešové hodnotím jako významnou přednost. Opravdu zcela nových poznatků přinesla tato disertace mnoho, a to i těch, které mohou mít v budoucnosti po technologickém využití velmi významný ekonomický efekt. Jde nejen o zcela nové výsledky při sledování distribuce lignanů v biomase obilovin a pseudocereálií, které jsou zcela nové, ale i o pokračování ve výzkumné práci jejich finských kolegů při studiu lignanů v extraktech suků smrku ztepilého, při kterém se jí podařilo identifikovat pět dosud neznámých lignanů. V průmyslové technologii hrají velké role nejen vlastnosti suroviny, ale také celá ekonomická stránka její výroby a z tohoto hlediska je zjištění, že pohanka tatarka má v kořenech kolem 2500 mg/kg těchto fytoestrogenních látek, velmi slibné. Známy vysoký obsah lignanů v lněném semenu je mnohem hůře využitelný, zvláště dnes, kdy střídání plodin je velmi omezené, existence půdní únavy lnu vyžaduje až 8-leté intervaly setí lnu na totéž místo, také výnos kolem 600 kg/ha není pro průmyslové využití dostatečný. Rostliny pohanky sice nemají mohutný kořenový systém, a proto by bylo nutno způsob sklizně kořenů řešit, ale při současném stavu techniky pro zpracování půdy by to byl snadnější způsob získání suroviny pro izolaci lignanů, než shromažďování suků jehličnanů, i když 6 – 24 hm.% lignanů se 70-80 % 7-hydroxymatairesinolu je téměř šokující.

Doktorská disertační práce Ing. Marešové si stanovila poměrně rozsáhlé a náročné cíle, studie distribuce lignanů v biomase smrku, v obilovinách, v pseudocereáliích (v prosu, pohankách a v amarantu), v některých odpadních zemědělských produktech, dále identifikaci minoritních lignanů, identifikaci lignanů ve vodním ekosystému a k tomu další náročný cíl – vývoj a optimalizaci metod pro přípravu a zpracování vzorků a jejich analýzu se zaměřením na 5 hlavních lignanů. To je ohromný cíl, který by podle mého názoru stačil na dvě doktorské práce a s uznáním musím konstatovat, že doktorandka tento náročný cíl beze zbytku splnila.

Ve své práci autorka uvažuje o úloze lignanů v rostlinách a dospívá k názoru, že to je zřejmě úloha v obranném systému rostlin. Tato úloha může být ovšem mnohotvárná, může to být vyšší aktivita v tvorbě odolnosti k rostlinným chorobám, ale i proti živočišným škůdcům. Může to být ale také nějaká stimulace k udržení základních fyziologických procesů v organismu, který je bezprostředně ohrožen ztrátou existence v kritických životních podmínkách. Autorka cituje pramen, v němž byl nalezen vyšší obsah lignanů v sucích stromů, které rostly v drsných podmínkách na severu Finska. V minulosti jsem se zabýval izolací jiného fytoestrogenu, isoflavonu genisteinu, jehož výhodnou surovinou byl vlčí bob mnoholistý, známá modrá „lupina“ našich lesních pasek. Zcela pravidelně jsme nalézali nejvíce genisteinu na stanovištích zcela chudých, ještě více navíc extrémně suchých, u porostů poškozených pozdními mrazy. Vlčí bob pěstovaný v zahradách, a to i modré formy, genistein vůbec neobsahoval! Není tu možno hledat nějakou souvislost?

Autorka uvádí jeden finský literární pramen, kde bylo sledováno dlouhodobé N-hnojení v pětiletých intervalech smrku ztepilého a bylo konstatováno autorem, že dusíkaté hnojení nemělo vliv na obsah lignanů v sucích. Výsledky Ing. Marešové otevírají pro

pokračovatele její výzkumné práce výzvu, aby byl sledován vliv živinného režimu na obsah lignanů v surovině, který může být nejen kladný, ale jak z předešlého textu je zřejmé, i záporný. Finský pramen z roku 2008 bych nebral příliš v úvahu, protože hnojení v lesních porostech i dlouhodobé je při interpretaci výsledků velmi nespolehlivé. V lesní půdě nadložní humusové horizonty přebytkem labilních forem uhlíku mají tak obrovskou imobilizační aktivitu k dusíku, že do podpovrchových epipedonů se minerální dusík vůbec nedostane a stromy jsou nadále živeny jen mineralizovaným dusíkem organické hmoty podpovrchových horizontů.

Objev doktorandky, že kořeny pohanky tataruky mají až 2500 mg/kg lignanů, považuji za významnější skutečnost, než obecně zdůrazňovaný nutriční význam pseudocereálií, kterému částečně podlehla i autorka této výborné práce. Pohanka je sice zdrojem flavonoidu rutinu, ale ten je hlavně v nati, nikoli v semenu a je pravda, že má značný obsah bílkovin, vitaminů skupiny B, obsahuje katechiny, fytoosteroly – ale na druhé straně má i antinutriční složky, hlavně inhibitory trypsinu. Hlavní problém je v tom, že prevence cukrovky, obezity, vysoké hladiny cholesterolu v krvi by vyžadovalo pravidelnou a vysokou konzumaci této pseudocereálie a kdo ochutnal takové výrobky, např. pohankovou kaši, nové výrobky tzv. racionální výživy nebo ruské párky s „grečichou“, pochopí, že to není prakticky možné. Také by bylo výhodnější konzumovat zelené části této rostliny, než semena. Ani na zelené hnojení není pohanka příliš vhodná, jak se v práci na základě studia literatury uvádí. K zelenému hnojení jsou nejvhodnější rostliny, které s nejmenším výrobním nákladem jsou schopny vytvořit velké množství velmi labilní, snadno rozložitelné organické hmoty, která navíc nese s sebou dostatek dusíku, protože jinak se musí dodat v kejďě, močůvce či drahých univerzálních hnojivech. Jinak by došlo k imobilizaci půdního minerálního dusíku. Proto pohanku jen jako součást směsi, a to jen na půdách písčitých, jinak se dává přednost rostlinám, které vážou vzdušný dusík, jetelovinám, bobu, lupině, vikvi, pelušce atd.

Na str. 33 je drobný nedostatek, který samozřejmě neohrožuje mé výborné hodnocení celé doktorské práce, ale je nutno pro publikaci jej opravit. Dnes už se nepoužívá morfologický klasifikační systém půd, proto nelze použít termín hnědá půda oglejená, ale Taxonomický klasifikační systém, ve kterém neexistuje pojem půdního typu kambizem pseudo-glejová. Jde o referenční třídu kambisol, půdní typ kambizem (KA), subtyp oglejená g, varieta slabě oglejená g'. Pokud ale jde o školní pozemek, je to spíše kultizem hortická. Uvádět klimatickou charakteristiku stanoviště má význam jedině tehdy, když je popsán podrobně živinný režim a vodně-vzdušný režim stanoviště nebo alespoň základní fyzikálně-chemické vlastnosti půdy, z kterých by se dalo na uvedené režimy alespoň usuzovat. To uvádím opět jen jako informaci pro případné pokračující práce a publikace.

V práci jsem nenašel žádné nedostatky, i formální stránka je vzorná, text je logický a srozumitelně psaný, po všech stránkách mohu hodnotit tuto vzornou práci jen výborně. Je nutno ocenit nejen schopnosti a poctivou, náročnou práci Ing. Marešové, ale i účinnou a vynikající práci jejího školitele, také tvůrčí a náročné pracovní prostředí jejího pracoviště, katedry chemie, jejíž doktorandi vesměs předkládají vzorné a vynikající doktorské práce. Je v tom zajisté velký podíl poctivé učitelské práce vedoucího katedry, předsedy komise doktorského studia i ostatních členů tohoto tvůrčího pracoviště.

Prosím, aby doktorandka při obhajobě práce vyslovila svůj názor na tyto otázky:

- 1) Ing. Marešová dokonale propracovala metody extrakce. Která extrakce se jí zdá pro případnou průmyslovou extrakci nejslibnější?
- 2) Čím si vysvětluje značné rozdíly obsahu lignanů u pohanky seté, odrůda Jana, v r. 2011 a 2012, které jsou dvojnásobné. Pro využití pohanky jako suroviny by to byla nevýhoda, a proto se ptám na cestu, jak by bylo možné tyto rozdíly eliminovat?

Závěr:

Doktorskou disertační práci Ing. Ivety Marešové hodnotím jako práci po všech stránkách výbornou, oceňuji novost poznatků, které obsahuje i množství a vědeckou úroveň práce, kterou doktorandka vykonala. Doporučuji komisi doktorského studia, aby po jistě úspěšné obhajobě této disertační práce udělila Ing. Marešové titul Ph.D.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Ullé', with a long, sweeping flourish extending to the right.