

Posudek oponenta disertační práce

Disertační práce:

Zastoupení biologicky účinných mastných kyselin v lipidech vybraných druhů sladkovodních ryb

Autor: Mgr. Daniela Chvalová

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta

Práce Mgr. Daniely Chvalové je zaměřena na studium složení mastných kyselin ve svalovině, mlíči a jikrách kapra obecného (*Cyprinus carpio* L., *Cyprinidae*) a jejich distribuci do jednotlivých lipidových frakcí. Druhá část práce je zaměřena na identifikaci a kvantifikaci méně známých furankarboxylových mastných kyselin. Práce naznačuje vysokou vědeckou erudici Mgr. Daniely Chvalové a její schopnost samostatně vědecky pracovat. Toto asi nejlépe dokládá skutečnost, že výsledky, které jsou tématem disertační práce byly na počátku letošního roku publikovány ve velmi prestižním impaktovaném časopise Food Chemistry.

Souhrn práce plně odpovídá jejímu obsahu. Úvod stručně a jednoznačně uvádí čtenáře do řešené problematiky. Rozsáhlá 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. V tomto místě bych vytknul až příliš velký důraz na metodickou část, kde se často (např. v kapitole o kolonách pro GC) opakují fakta, která jsou již dobře známá. Cíle práce jsou formulovány přesně dle požadavků stručně a jasně.

V teoretické části mi naopak chybí poněkud podrobnější zmínka o biosyntéze (která je popsána velmi stručně a poněkud chaoticky) furanových kyselin a o jejich metabolitech (hlavně CMPFP; 3-karboxy-4-methyl-5-propyl-furyl-2-propanová kyselina), které jsou spojovány s rozvojem některých degenerativních onemocnění, hlavně s insulínouresistencí a ledvinovými obtížemi. Chtěl bych požádat disertantku o doplnění tohoto při obhajobě.

Praktická část práce je zpracována velmi precizně. Zabývá se distribucí skupin mastných kyselin, včetně furanových, do lipidových frakcí ve svalovině, jikrách a mlíči kapra. 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. Diskuse výsledků je na vynikající úrovni. Velmi oceňuji i použití

moderní statistické PCA analýzy při hodnocení výsledků. Rovněž mimořádně oceňuji již zmíněnou publikaci článku ve velmi prestižním 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:

- Pokud jsem dobře pochopil, vysoký obsah furanových kyselin v triacylglycerolové frakci mlíčí je poněkud v rozporu s tím, co zatím bylo publikováno (např. s citovanou prací Spiteller; Lipids 40(8), 755-771, 2005, kde se u mlíčí uvádí určitý obsah ve fosfolipidech a nulový v triacylglycerolech). Lze najít nějaké vysvětlení? A existuje nějaká hypotéza, proč je vysoký obsah právě v mlíčí? V literatuře jsem nic nenašel.

K práci mám ještě několik víceméně formálních připomínek:

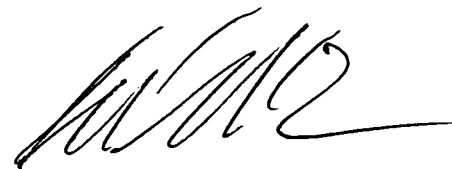
- Str. 13, 2. odst.: U konverze ALA na EPA (DHA) bych konkrétní údaje neuváděl. Zabývá se tím řada prací a výsledky jsou velmi kontroverzní. Podobně kontroverzní bývají i údaje o kontaminantech (str. 14)
- Str. 15: Neumím si představit použití trans-nenasycených mastných kyselin jako aditiva do potravin? Jsou v citovaném článku nějaké podrobnosti?
- Str. 17: Kromě cholesterolu se v rybách (asi s výjimkou dravých ryb) zcela jistě najde i významné množství fytosterolů.

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. Daniely Chvalové k obhajobě.



V Praze dne 13.9.2016

doc. Ing. Jan Pánek, CSc.

oponent



Oponentský posudek na disertační práci v oboru Zemědělská chemie

Mgr. Daniely Chvalové

„Zastoupení biologicky účinných mastných kyselin v lipidech vybraných druhů sladkovodních ryb“.

Oponovaná práce byla předložena formou rukopisu, který včetně všech příloh dosahuje 106 stran. Sestává z úvodu, literárního přehledu, části, která popisuje vývoj a validaci metod a diskuze získaných výsledků. Po formální stránce je práce velmi dobře zpracována, přehledně členěna a napsána korektním vědeckým jazykem s minimálním množstvím překlepů. Jediná věc, která by této práci šla po formální stránce vytknout je prezentace velkého množství výsledků formou tabulek, které jsou méně názorné a přehledné než grafy.

Literární přehled (spojený s úvodem do problematiky) je zpracován v odpovídajícím rozsahu, a dokumentuje schopnost autorky pracovat s původní vědeckou literaturou. Logicky se zaměřuje hlavně na „state of art“ GC/FID a GC/MS technik, které byly později použity pro analýzy složení lipidových frakcí, popisuje ale také soudobé trendy směřující k lipidomice založené na spojení kapalinové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí. Ze současných metod zde chybí pouze superkritická kapalinová chromatografie spojená s FID nebo MS, která v sobě spojuje výhody GC i LC. Dále jsou zde krátce uvedeny furanové mastné kyseliny, jejich úloha a výskyt v organismech a úskalí v jejich analýze.

V metodické části jsou podrobně popsány postupy extrakce a separace lipidů, reesterifikace lipidů na metylestery mastných kyselin a jejich GC analýzy ve dvou druzích komerčně významných ryb. Z uvedených postupů a výsledků validace metody je zřejmé, že autorka si osvojila metody analytické chemie na vysoké úrovni. Za zajímavé a přínosné informace lze považovat údaje o stabilitě extraktů a možnosti používat zjednodušené extrakce pro některé typy vzorků při zachování stejné informace o složení lipidů.

Vědecky nejzajímavější část práce začíná identifikací neznámých píků v chromatogramech esterů mastných kyselin mličky kapra. Tato část práce dokládá vědeckou intuici autorky práce, která identifikovala tyto neznámé signály jako estery furanových kyselin pomocí GC/MS s kombinací několika technik ionizace a následně je zařadila do kvantitativní metody s použitím GC/FID. Svým dílem šťastná náhoda (jak ostatně konstatuje i autorka) tak vedla k umožnění studia většího počtu mastných kyselin včetně málo obvyklých a dosud neprozkoumaných. Identifikace esterů furanových kyselin v kapřích tkáních pak byla publikovaná v časopise *Food chemistry*, který patří do desátého percentilu v oboru a jde tedy o prestižní vědecké periodikum.

Vyvinutá metoda pak byla aplikována pro stanovení složení celkových lipidů v různých tkáních kapra obecného. Výsledky byly vyhodnoceny pomocí pokročilých statistických metod, jako je PCA, které jsou nezbytně nutné pro identifikaci rozdílů a trendů ve studovaných vzorcích a umožňují definovat následné experimenty pro objasnění funkce esterů furanových kyselin v rybím organismu. Tato část práce je originální i přesto, že studium mastných kyselin v rybích tkáních je evergreenem potravinářské chemie již několik desítek let. Autorka práce takto demonstrovala svou schopnost analýzy dat, která umožňuje vytěžit mnohem více informací i z relativně rutinních analýz.



Komentáře a dotazy k předložené disertační práci:

Drobná připomínka k větě „*Měkké ionizační techniky umožnily spojení HPLC s MS*“ - toto spojení umožnila ionizace za atmosférického tlaku, jejíž techniky (termosprej, elektrosprej, APCI, APPI) jsou měkké v porovnání s EI za vysokého vakua.

1. Jaký byl důvod používat GC/FID pro kvantitativní stanovení esterů mastných kyselin místo GC/MS, která je selektivnější a také citlivější?
2. Proč nebyla vyzkoušena metoda tandemové hmotnostní spektrometrie pro chemickou ionizaci? Pravděpodobně by bylo možné určit strukturu i z těchto spekter.
3. Uvažujete o experimentech, které by objasnily roli furanových kyselin v rybím organismu, speciálně pak s ohledem na jejich vysoký výskyt v mliči?
4. Jsou k dispozici detailnější informace o studovaných rybách – věk, jak intenzivní a jaké bylo krmení během posledního roku a jak dlouhá doba uběhla od výlovu k zakoupení ryb?

Na závěr mohu jen konstatovat, že autorka práce splňuje všechny předpoklady pro úspěšnou vědeckou činnost v oboru jako je práce s literaturou, experimentální a laboratorní erudice a v neposlední řadě i schopnost srozumitelně formulovat a prezentovat výsledky v odborné literatuře, a proto **doporučuji přijmout** disertační práci Mgr. Daniely Chvalové **k obhajobě**.

Ve Vodňanech 14. 9. 2016

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

OPONENTSKÝ POSUDEK

na disertační práci předloženou Mgr. Danielou Chvalovou, zpracovanou na téma

„Zastoupení biologicky účinných mastných kyselin v lipidech vybraných druhů
sladkovodních ryb“

Předložená disertační práce je zpracována v rozsahu téměř 100 stran a několika příloh.

Vlastní práce je členěna ve struktuře standardní vědecké práce. V úvodní části jsou stručně charakterizovány mastné kyseliny, jejich význam pro lidský organismus a jejich zdroj – mořské a sladkovodní ryby. Stručně jsou uvedeny faktory ovlivňující zastoupení mastných kyselin v jednotlivých tkáních ryb. Přestaveny jsou i mastné kyseliny furanové.

Literární přehled zpracovaný na více než třiceti stranách je logicky sestaven, od obecných pojmů přes obsah mastných kyselin v lipidech ryb a faktory ovlivňujících jejich spektrum až po přehled metod analýzy lipidů. Zvláštní podkapitola je věnována furanovým mastným kyselinám. Je zde uvedena jejich struktura, výskyt a biosyntéza i jejich význam v organismu jejich producentů i možný efekt pro lidské zdraví. Podrobně je popsán postup stanovení furanových mastných kyselin. Na literární přehled navazuje stanovení cílů práce. Cíl je na první pohled stanoven poměrně obecně – studium mastných kyselin v lipidech vybraných druhů ryb. Tento cíl byl však rozpracován a rozdělen na několik kroků, jasně a přesně definovaných, zahrnujících zpracování metodiky extrakce, rozdělení lipidů do jednotlivých frakcí a stanovení spektra FA v těchto frakcích. Kromě svaloviny kapra obecného a pstruha duhového, byly analyzovány i další tkáně, a to jikry a mlíčí kapra obecného. Takto stanovené cíle v logicky navazující řadě považuji za velmi korektní přístup k řešení disertační práce. Seznam použité literatury obsahující více než 160 zdrojů dává předpoklad velmi solidního přehledu doktorandky v dané problematice.

V kapitole Materiál a metody je charakterizován analyzovaný materiál, zde bych ocenil údaj o době od zabíjení ryb do jejich zpracování, včetně teploty při přepravě materiálu a přechovávání. Případně i způsobu přechovávání ryb od výlovu do zpracování. Nicméně pro zaměření práce se jedná jen o údaje doplňující. Škoda, že nebyla provedena analýza svaloviny kapra ve stejném období (listopad) jako jiker a mlíčí (září). Případně porovnání gonád a svaloviny identické ryby. V další části této kapitoly jsou popsány metodické postupy separace lipidů a analýzy mastných kyselin. I zde oceňuji preciznost při optimalizaci postupů, včetně testování stability vzorků. V závěru kap. 4 je uveden postup statistického zpracování získaných výsledků.

Kapitola Výsledky a diskuse podrobně popisuje výsledky disertační práce včetně porovnání s literárními údaji a vlastním komentářem. V první části, věnované vývoji metodiky extrakce a zpracování lipidů, jsou popsány hodnoty množství lipidů získaných z tkání při použití různých extrakčních činidel, zastoupení FA v lipidových frakcích lipidů získaných různými extrakčními činidly, resp. zastoupení mastných kyselin svaloviny kapra a pstruha v TAG frakcích. Samostatně jsou uvedeny výsledky furanových mastných kyselin,

kde bylo zjištěno jejich nejvyšší zastoupení v mlíči kapra. Získané výsledky jsou prezentovány v tabulkách a diskutovány v textu, případně doplněny obrázky chromatogramu. Další tři podkapitoly již shrnují výsledky analýz spektra mastných kyselin svaloviny kapra obecného a jeho jiker a mlíči. Získané výsledky FA jsou uvedeny souhrnně podle frakcí v tabulkách v textu a podrobně v přílohách práce. Prezentované výsledky jsou diskutovány s tuzemskými i zahraničními autory. Součástí je statistické vyhodnocení s použitím metody analýzy hlavních komponent doplněné komentářem.

V kapitole Závěr jsou přehledně prezentovány závěry získané z celého řešení disertační práce se souhrnnou analýzou hlavních komponent pro všechny vzorky. Autorka sama uvádí v předposledním odstavci přínosy své práce pro oblast zastoupení mastných kyselin nejen ve svalovině, ale i v jikrách a mlíči kapra, včetně furanových mastných kyselin. Nicméně jako oponent s tímto závěrem souhlasím a oceňuji i významný příspěvek pro optimalizaci extrakčních postupů pro získávání celkových lipidů a separaci jednotlivých frakcí.

K vlastní práci nemám žádné připomínky. Oceňuji kromě odborného přínosu i čtivost psaného textu a minimum, resp. téměř absenci chyb. Drobné nepřesnosti se objevily v citaci použitých literárních zdrojů.

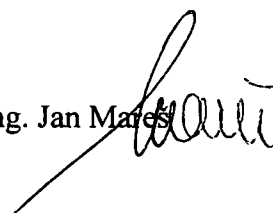
Na dotazy na doktorandku, které mne napadly při studiu její práce, jsem v dalším textu našel odpovědi, nebo je sama stanovila jako témata pro další výzkum. Do diskuze mám, kromě otázek z metodické části, následující podněty nebo dotazy:

1. Lze cíleně ovlivňovat v rybích tkání obsah furanových mastných kyselin?
2. Domníváte se, že složení mastných kyselin v jikrách a mlíči je ovlivňováno výživou ryb stejně jako spektrum FA jejich svaloviny?
3. Může dojít k rozdílům ve spektru mastných kyselin ve svalovině kaprů chovaných v jednom rybníce?

Závěr: celkově hodnotím předloženou práci Mgr. D. Chvalové jako velmi zdařilou, přinášející velké množství originálních poznatků, a to jak pro metodické postupy extrakce lipidů z analyzovaných vzorů tkání a separace na jednotlivé lipidové frakce, tak i zastoupení mastných kyselin vybraných tkání ryb. Samotný závěr obsahuje i návrh téma pro další výzkum v této problematice. Práci jednoznačně doporučuji přijmout k obhajobě. Po úspěšném obhájení práce doporučuji udělit titul Ph.D.

V Brně 12.9.2016

prof. Dr. Ing. Jan Mareš



OPONENTSKÝ POSUDEK

na disertační práci předloženou Mgr. Danielou Chvalovou, zpracovanou na téma

„Zastoupení biologicky účinných mastných kyselin v lipidech vybraných druhů
sladkovodních ryb“

Předložená disertační práce je zpracována v rozsahu téměř 100 stran a několika příloh.

Vlastní práce je členěna ve struktuře standardní vědecké práce. V úvodní části jsou stručně charakterizovány mastné kyseliny, jejich význam pro lidský organismus a jejich zdroj – mořské a sladkovodní ryby. Stručně jsou uvedeny faktory ovlivňující zastoupení mastných kyselin v jednotlivých tkáních ryb. Přestaveny jsou i mastné kyseliny furanové.

Literární přehled zpracovaný na více než třiceti stranách je logicky sestaven, od obecných pojmů přes obsah mastných kyselin v lipidech ryb a faktory ovlivňujících jejich spektrum až po přehled metod analýzy lipidů. Zvláštní podkapitola je věnována furanovým mastným kyselinám. Je zde uvedena jejich struktura, výskyt a biosyntéza i jejich význam v organismu jejich producentů i možný efekt pro lidské zdraví. Podrobně je popsán postup stanovení furanových mastných kyselin. Na literární přehled navazuje stanovení cílů práce. Cíl je na první pohled stanoven poměrně obecně – studium mastných kyselin v lipidech vybraných druhů ryb. Tento cíl byl však rozpracován a rozdělen na několik kroků, jasně a přesně definovaných, zahrnujících zpracování metodiky extrakce, rozdělení lipidů do jednotlivých frakcí a stanovení spektra FA v těchto frakcích. Kromě svaloviny kapra obecného a pstruha duhového, byly analyzovány i další tkáně, a to jikry a mlíčí kapra obecného. Takto stanovené cíle v logicky navazující řadě považuji za velmi korektní přístup k řešení disertační práce. Seznam použité literatury obsahující více než 160 zdrojů dává předpoklad velmi solidního přehledu doktorandky v dané problematice.

V kapitole Materiál a metody je charakterizován analyzovaný materiál, zde bych ocenil údaj o době od zabití ryb do jejich zpracování, včetně teploty při přepravě materiálu a přechovávání. Případně i způsobu přechovávání ryb od výlovu do zpracování. Nicméně pro zaměření práce se jedná jen o údaje doplňující. Škoda, že nebyla provedena analýza svaloviny kapra ve stejném období (listopad) jako jiker a mlíčí (září). Případně porovnání gonád a svaloviny identické ryby. V další části této kapitoly jsou popsány metodické postupy separace lipidů a analýzy mastných kyselin. I zde oceňuji preciznost při optimalizaci postupů, včetně testování stability vzorků. V závěru kap. 4 je uveden postup statistického zpracování získaných výsledků.

Kapitola Výsledky a diskuse podrobně popisuje výsledky disertační práce včetně porovnání s literárními údaji a vlastním komentářem. V první části, věnované vývoji metodiky extrakce a zpracování lipidů, jsou popsány hodnoty množství lipidů získaných z tkání při použití různých extrakčních činidel, zastoupení FA v lipidových frakcích lipidů získaných různými extrakčními činidly, resp. zastoupení mastných kyselin svaloviny kapra a pstruha v TAG frakcích. Samostatně jsou uvedeny výsledky furanových mastných kyselin,

kde bylo zjištěno jejich nejvyšší zastoupení v mlíči kapra. Získané výsledky jsou prezentovány v tabulkách a diskutovány v textu, případně doplněny obrázky chromatogramu. Další tři podkapitoly již shrnují výsledky analýz spektra mastných kyselin svaloviny kapra obecného a jeho jiker a mlíči. Získané výsledky FA jsou uvedeny souhrnně podle frakcí v tabulkách v textu a podrobně v přílohách práce. Prezentované výsledky jsou diskutovány s tuzemskými i zahraničními autory. Součástí je statistické vyhodnocení s použitím metody analýzy hlavních komponent doplněné komentářem.

V kapitole Závěr jsou přehledně prezentovány závěry získané z celého řešení disertační práce se souhrnnou analýzou hlavních komponent pro všechny vzorky. Autorka sama uvádí v předposledním odstavci přínosy své práce pro oblast zastoupení mastných kyselin nejen ve svalovině, ale i v jikrách a mlíči kapra, včetně furanových mastných kyselin. Nicméně jako oponent s tímto závěrem souhlasím a oceňuji i významný příspěvek pro optimalizaci extrakčních postupů pro získávání celkových lipidů a separaci jednotlivých frakcí.

K vlastní práci nemám žádné připomínky. Oceňuji kromě odborného přínosu i čtivost psaného textu a minimum, resp. téměř absenci chyb. Drobné nepřesnosti se objevily v citaci použitých literárních zdrojů.

Na dotazy na doktorandku, které mne napadly při studiu její práce, jsem v dalším textu našel odpovědi, nebo je sama stanovila jako témata pro další výzkum. Do diskuze mám, kromě otázky z metodické části, následující podněty nebo dotazy:

1. Lze cíleně ovlivňovat v rybích tkání obsah furanových mastných kyselin?
2. Domníváte se, že složení mastných kyselin v jikrách a mlíči je ovlivňováno výživou ryb stejně jako spektrum FA jejich svaloviny?
3. Může dojít k rozdílům ve spektru mastných kyselin ve svalovině kaprů chovaných v jednom rybníce?

Závěr: celkově hodnotím předloženou práci Mgr. D. Chvalové jako velmi zdařilou, přinášející velké množství originálních poznatků, a to jak pro metodické postupy extrakce lipidů z analyzovaných vzorů tkání a separace na jednotlivé lipidové frakce, tak i zastoupení mastných kyselin vybraných tkání ryb. Samotný závěr obsahuje i návrh téma pro další výzkum v této problematice. Práci jednoznačně doporučuji přijmout k obhajobě. Po úspěšném obhájení práce doporučuji udělit titul Ph.D.

V Brně 12.9.2016

prof., Dr. Ing. Jan Mařík

