

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: Ing. Robert KALA
Narozen(a): 22. 2. 1989, Podbořany
Studijní program: Zootechnika
Studijní obor: Zoohygiena a prevence chorob hosp. zvířat
Forma studia: Prezenční
Školící pracoviště: KKZP ZF JU v Č. Budějovicích
Datum a místo konání zkoušky: 10. 1. 2019, ZF JU v Č. Budějovicích
Zkušební termín č.: 1.

Název disertační práce:

Vliv biologických faktorů na zastoupení mastných kyselin mléčného tuku

Výsledek obhajoby:

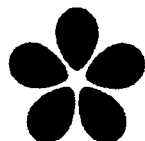
Prospěl (a)

Neprospěl (a)

Zkušební komise:

Podpis:

Předseda:	prof. Dr. Ing. Oto Hanuš; VÚM Praha	
Členové:	doc. Ing. Eva Dadáková, Ph.D.; ZF JU v Č. Budějovicích	
	doc. RNDr. Marcela Klimešová, Ph.D.; VÚM Praha	
	doc. Ing. Lenka Kouřimská, Ph.D.; ČZU v Praze (oponent)	
	prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.; ZF JU v Č. Budějovicích	
	doc. Ing. Jiří Mlček, Ph.D.; UTB Zlín (oponent)	
	prof. Ing. Jan Trávníček, CSc.; ZF JU v Č. Budějovicích	
	prof. MVDr. Lenka Vorlová, Ph.D.; VFU Brno (oponent)	
Školitel:	doc. Ing. Eva Samková, Ph.D.; ZF JU v Č. Budějovicích	
Specialista:	prof. Ing. Jindřich Čítek, CSc.; ZF JU v Č. Budějovicích	



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. Robert KALA
Narozen(a): 22. 2. 1989 PODBOŘANY

Studijní program: Zootechnika
Studijní obor: Zoohygiena a prevence chorob hospodářských zvířat
Forma studia: Prezenční

Výsledek hlasování:

Počet členů komise: 8

počet platných hlasů: 8

počet neplatných hlasů: 0

počet přítomných členů komise: 8

kladných: 8

záporných: 0

Zkušební komise:

Podpis:

Předseda:	prof. Dr. Ing. Oto Hanuš; VÚM Praha	
Členové:	doc. Ing. Eva Dadáková, Ph.D.; ZF JU v Č. Budějovicích	
	doc. RNDr. Marcela Klimešová, Ph.D.; VÚM Praha	
	doc. Ing. Lenka Kouřimská, Ph.D.; ČZU v Praze (oponent)	
	prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.; ZF JU v Č. Budějovicích	
	doc. Ing. Jiří Mlček, Ph.D.; UTB Zlín (oponent)	
	prof. Ing. Jan Trávníček, CSc.; ZF JU v Č. Budějovicích	
	prof. MVDr. Lenka Vorlová, Ph.D.; VFU Brno (oponent)	

Odpovědi na posudek disertační práce

Oponent: doc. Ing. Jiří Mlček, Ph.D.

Neúplný seznam zkratek.

- Do seznamu byly uvedeny pouze zkratky, které se v disertační práci opakují vícekrát. Seznam zkratek je dále koncipován způsobem, aby se vešel na jednu stránku.

OTÁZKY:

Můžete blíže konkretizovat tvrzení ze str. 19, že „nejvýznamnější z hlediska změn v zastoupení mastných kyselin je považována první třetina laktace“?

- Změny v zastoupení mastných kyselin na počátku laktace jsou způsobeny změnami fyziologií dojnic. Dojnice často trpí negativní energetickou bilancí (během prvních 30 dnů až do 70 či 84 dne po otelení). Nadměrné využití energetických zásob v tomto období se pak odráží v obsahu mléčného tuku, v zastoupení mastných kyselin a vzájemných poměrech jednotlivých skupin mastných kyselin. Z tohoto důvodu je zastoupení SFA (např. C16:0) nejnižší v 1. týdnu, přičemž roste do 12. týdne (se zlepšováním energetické bilance). MUFA (např. C18:1n9c) naopak klesají do 12. týdne.

Je možné definovat některé analytické metody použitelné přímo v potravinářských provozech z hlediska rychlosti a přesnosti?

- Acidobutyrometrická metoda: obsah tuku v mléce je podíl tuku, který se oddělí v butyrometru po rozpuštění fosfolipidového obalu tukových kuliček působením kyseliny sírové.
- Turbidimetrická analýza: měření intenzity světla procházející vzorkem v přímém směru. Analýza může být provedena na přístroji LactoStar.
- Ultrazvuková analýza: měření vysokofrekvenčního ultrazvukového záření procházejícího vzorkem. Analýza může být provedena na přístroji LactiCheck.

- NIR-FT: infračervená spektroskopie v blízké oblasti spektra s využitím Fourierových transformací. Analýza může být provedena na přístroji BUCHI FT-NIR.
- NIR (RTA): průtoková kroková infračervená spektroskopie v blízké oblasti spektra. Analýza může být provedena na přístroji AfiLab.

Na straně 29 uvádíte výhody infračervené spektroskopie. Jaká je její přesnost oproti klasickým metodám pro stanovení mastných kyselin v mléce?

- V porovnání s referenční metodou plynové chromatografie je infračervená spektroskopie méně přesná. Nicméně u některých mastných kyselin, resp. jejich skupin lze metodu pro stanovení využít s vysokou mírou věrohodnosti.

Na straně 50 (2. bod) je uvedeno, že „Na základě studia problematiky lze usuzovat, že další vědecká práce v této oblasti má do budoucna potenciál, který by mohl vést ke zlepšení profilu mastných kyselin“. O kolik % se může zlepšit složení mléka z hlediska mastných kyselin, tedy jejich příznivějšího složení ve prospěch UFA, s ohledem na biologické faktory?

- Předpoklad byl směřován především ke genu *SCD1*, který kóduje enzym SCD1 katalyzující přeměnu SFA na MUFA. Gen je rovněž spojován s individuálními mastnými kyselinami (C14:1n9c, C18:2n9c11t, C18:1n9c). Procentuální zlepšení bude v porovnání s vlivem výživy nižší, neboť UFA mléčného tuku jsou ovlivnitelné především krmnou dávkou.

Které faktory nejvýznamněji ovlivňují nutriční složení mléka a bylo by vhodné se na ně do budoucna zaměřit? Do jaké míry je možné tyto faktory regulovat, aby bylo dosaženo „vhodnějšího“ složení mléka?

- Nejvýznamnějším faktorem ovlivňujícím složení mléka je výživa. Z biologických faktorů jsou významné genetické založení a stadium laktace. Vliv výživy lze regulovat. Znalosti z oblasti genetického založení lze využít ve šlechtitelských programech pro selekci jedinců, znalosti ohledně vlivu stadia laktace pak především k vhodnému managementu chovu. Nicméně biologické faktory lze v porovnání s vlivem výživy regulovat obtížněji.

Odpovědi na posudek disertační práce

Oponent: prof. MVDr. Lenka Vorlová, Ph.D.

Některé pasáže jsou zatíženy nepřesnostmi, které zbytečně vnáší do textu nesrozumitelnost. To se týká zejména stati o biosyntéze mléčného tuku, např. tvrzení, že butyrát je meziproduktem metabolismu kyseliny β -hydroxymáselné! (str. 20). Celkově je tato stať ne zcela úplná (zjednodušená), absentuje např. problematika elongace řetězce MK.

- Formulace je chybná. Mělo být uvedeno: „... v mléčné žláze přežvýkavců je téměř 50 % mastných kyselin mléčného tuku syntetizováno z acetátu (kyselina octová) a β -hydroxybutyrátu (kyselina β -hydroxymáselná).“ β -hydroxybutyrát je ester kyseliny β -hydroxymáselné.

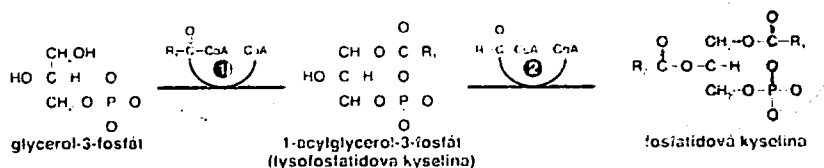
U souhrnu chybí klíčová slova.

- Klíčová slova: mléčný tuk, mastné kyseliny, český strakatý skot, holštýnský skot, biologické faktory, polymorfismus.
- Keywords: milk fat, fatty acids, Czech Fleckvieh, Holstein, animal factors, polymorphism.

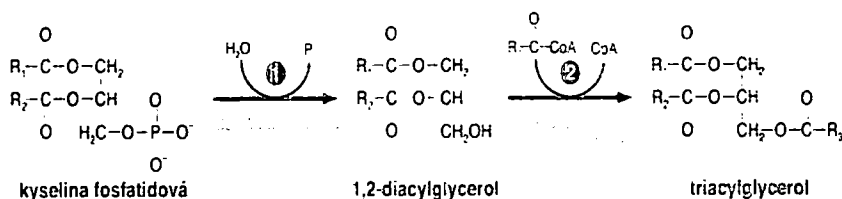
Schéma „Hlavní dráhy biosyntézy triacylglycerolů“ není kompletní.

- Schéma s doplněním navázání dvou acylů mastných kyselin. [Prezentace z webu VŠCHT, Ústav biochemie a mikrobiologie].

Syntéza triacylglycerolů



Biosyntéza kyseliny fosfatidové přenosem acylů na aktivovaný glycerol



Biosyntéza triacylglycerolů z kyseliny fosfatidové

Autor se nezmiňuje o zdroji glycerolu pro syntézu triacylglycerolů.

- Glycerol je syntetizován přímo v sekrečním epitelu mléčné žlázy z glukózy a kyseliny octové. Rovněž může pocházet z krve (VLDL). VLDL jsou hydrolyzovány LPL na volné mastné kyseliny, monoacylglyceroly, diacylglyceroly a glycerol.

U tabulky 5 na str. 26 není uveden zdroj.

- Upraveno dle Brondze (2002).

OTÁZKY:

Mohl by autor v rámci obhajoby osvětlit nutriční význam nasycených mastných kyselin pro dětskou populaci?

- Příjem SFA u dětí je významný především z metabolického hlediska pro správný vývoj a růst organismu. Doporučený příjem SFA u dětí ve věku 6-11 měsíců by měl být 20 % energie, u dětí od 1-3 let 15 % energie a u starších dětí méně než 10 % energie. Omezení příjmu SFA ve vyšším věku je pak spojováno se sníženým celkovým cholesterolem, LDL a krevním tlakem u dětí i dospívajících. Omezení vede ke snížení rizika vzniku koronárního srdečního onemocnění, které má kořeny v dětství. Rovněž má vliv na redukci nadváhy a obezity. [EFSA Journal, 2010; Nutrition Research and Practice, Baek et al., 2018; Nutrition, O'Neil et al., 2018].

Mohl by autor blíže pohovořit o syntéze a heritabilitě mastných kyselin C16, vzhledem ke skutečnosti rozdílných literárních údajů o kvantitativním zastoupení mastných kyselin C16 v mléčném tuku?

- Mastné kyseliny C16 jsou částečně syntetizovány *de novo* v epiteliálních buňkách mléčné žlázy (20-30 %), částečně pocházejí z krevních lipidů (70-80 %). Vzhledem k této skutečnosti (dvěma způsobům syntézy) jsou v literárních zdrojích uvedeny různé kvantitativní hodnoty C16. *De novo* syntetizované mastné kyseliny jsou ovlivňovány především biologickými faktory (plemeno, pořadí a stadium laktace), zatímco „pre formed“ mastné kyseliny jsou ovlivněny výživou. Hodnoty heritability C16 jsou dle většiny autorů nízké, nicméně někteří autoři uvádějí hodnoty vysoké (0,67; Bastin et al., 2011). Odchyly v odhadu heritability mohou být vysvětleny jednotkami používanými k vyjádření koncentrace mastných kyselin

(g·100 g⁻¹ v mléce – vyšší hodnoty heritability vs. g·100 g⁻¹ mastných kyselin vs. g·100 g⁻¹ tuku), metodou analýzy mastných kyselin (GC vs MIR-FT), modelem použitým pro odhad heritability (genomová vs. rodokmenová) nebo strukturou databáze (zahrnutí plemene, otce, matky).

Který/é výsledek/ky práce považuje autor za nejcennější z hlediska aktuální použitelnosti v chovu skotu za současných podmínek?

- Za nejcennější výsledek práce považuji: Potvrzení souvislosti polymorfismu genů *DGAT1* a *SCD1* s ukazateli mléčné užitkovosti. Zjištěné skutečnosti mohou být využity ve šlechtitelských programech zaměřených na mléčnou produkci skotu. Ověření, že metoda MIR-FT může být využita jako nepřímá metoda stanovení mastných kyselin, resp. Jejich skupin v mléčném tuku dojníc s vysokou mírou věrohodnosti.

Autor v práci zmiňuje výskyt enterolaktonu v mléce. Mohl by autor blíže pohovořit o této problematice ve vztahu k mléčnému tuku?

- Enterolakton je označován jako fytoestrogen. Vzhledem k tomu, že se ve výživě dojníc zvyšuje využívání krmiv z různých rostlinných zdrojů (jetel luční, jetel plazivý), vzrůstá zájem o odhad výskytu fytoestrogenů v kravském mléce. Antignac et al. (2004) ve své studii zjistili poměrně vysokou koncentraci enterolaktonu – 14,3-94,4 µg·l⁻¹. V rámci pokusu byl zohledněn obsah tuku v mléce (pro analýzu byly využity vzorky plnotučného – n=21 a odstředěného – n=4 mléka). V případě plnotučného mléka byla zjištěna hodnota 47,3 µg·l⁻¹, u odstředěného mléka 36,4 µg·l⁻¹. Zjištěné výsledky však nebyly statisticky významné. Mléko bylo pro pokus zvoleno, neboť představuje hlavní potravinu pro citlivou skupinu populace, kterou jsou děti.

Odpovědi na posudek disertační práce

Oponent: doc. Ing. Lenka Kouřimská, Ph.D.

Na úvodní straně chybí datum.

- 27. 11. 2018.

Neúplný seznam zkratek.

- Do seznamu byly uvedeny pouze zkratky, které se v disertační práci opakují vícekrát. Seznam zkratek je dále koncipován způsobem, aby se vešel na jednu stránku.

Klasifikace FA dle délky řetězce není v souladu s literaturou Velíška (2009).

- Klasifikace dle délky řetězce: pro nasycené i nenasycené mastné kyseliny – nižší mastné kyseliny (C4-C6), mastné kyseliny se středně dlouhým řetězcem (C8-C12), mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (C14-C18), mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem (C20-C26), mastné kyseliny s ultra dlouhým řetězcem (C28-C38).

OTÁZKY:

Můžete blíže vysvětlit větu: „Brownův pohyb a van der Waalovy síly způsobují, že tukové kuličky suspendované v kapalném tuku se shlukují do trojrozměrných (3D) sítí, které jsou spojené s kontinuální olejovou fází.“? Co se myslí „kontinuální olejovou fází“?

- Formulace je chybná. Mělo být uvedeno: „Brownův pohyb a van der Waalovy síly způsobují, že tukové kuličky suspendované v kapalném tuku se shlukují do trojrozměrných (3D) sítí.“ Pojem „kontinuální olejová fáze“ se využívá v souvislosti s pojmem emulze. Rozptýlená kapalina je označována jako diskontinuální fáze. Disperzní médium je označováno jako kontinuální fáze. Pokud je rozptýlenou kapalinou olej, vodný roztok je kontinuální fáze – typ emulze olej ve vodě (mléko). Pokud je rozptýlenou kapalinou voda, olej je kontinuální fází – emulze typu voda v oleji (máslo). [Essential 18000 Medical Words Dictionary, Nam Nguyen, 2014].

Můžete doplnit, jaká stanoviska a výživová doporučení spojená s mastnými kyselinami uvádí EFSA (EFSA Journal 2010, 8(3): 1461)?

- SFA: v rámci nutričně adekvátní stravy by měl být příjem co nejnižší, SFA jsou syntetizovány v organismu a nemusejí být dodávány ve stravě.

- *cis*-MUFA: jsou syntetizovány v organismu, nemají známé specifické úlohy při prevenci nebo podpoře chorob souvisejících s výživou, nemusejí být dodávány ve stravě.
- *cis*-PUFA: v porovnání s *trans*-MUFA a SFA snižují koncentraci LDL cholesterolu v krvi, vzhledem k rozdílným metabolickým účinkům jednotlivých FA této skupiny nejsou stanoveny referenční výživové hodnoty (DRV, dietary reference values).
- n6-PUFA: nemají nepříznivé účinky na zdraví, kyselina linolová (LA) je esenciální, nezbytná k udržení metabolické integrity, kyselina arachidonová (ARA) je syntetizována v organismu z LA, tudíž není nezbytná pro příjem ve stravě.
- n3-PUFA: alfa linolenová kyselina (ALA) je esenciální, nezbytná k udržení metabolické integrity, kyselina eikosapentaenová (EPA) a dokosaheptaenová (DHA) jsou syntetizovány z ALA, DRV u dospělých: EPA a DHA = 250 mg/den, DRV u starších kojenců (>6 měsíců), dětí mladších než 2 roky a žen v těhotenství a během kojení: DHA = 100 mg/den.
- TFA: nejsou syntetizovány v organismu, zároveň jsou ve stravě nežádoucí, jejich vyšší příjem je spojený s rizikem vzniku srdečně cévních onemocnění.
- CLA: neexistuje přesvědčivý důkaz, že některý z izomerů CLA má roli v prevenci nebo naopak podpoře nemocí souvisejících s výživou.
- Cholesterol: je syntetizován v organismu, není vyžadován ve stravě.
- Pro snížení rizika aterosklerózy je doporučeno nahradit SFA a TFA kyselinou olejovou, LA, EPA a DHA.

Proč nejsou v Tabulce 5 zmíněny žádné MS detektory, které je možné pro detekci FAMES také použít?

- MS detektory (analyzátory): jednoduchý kvadrupól, trojitý kvadrupól, analyzátor doby letu (TOF, time of flight), iontová past (IT, ion trap), iontová cyklotronová rezonance s Fourierovými transformacemi (FT-ICR, Fourier Transform ion cyclotron resonance), elektrostatická past (orbitrap).

Formulujte k Vaším cílům odpovídající hypotézy.

- Posoudit vliv genetického založení (plemene a individuality dojnice), pořadí a stadia laktace na zastoupení mastných kyselin mléčného tuku u dojnic českého strakatého a holštýnského skotu. *Předpokládá se, že největší význam na zastoupení mastných kyselin má z biologických faktorů individualita dojnice. Selektce na základě genetického založení je běžně využívána ve šlechtitelských programech.*

- Zjistit četnosti polymorfismu genů souvisejících s biosyntézou mléčného tuku a mastných kyselin u dojnic českého strakatého a holštýnského skotu. *Předpokládá se, že analýzou genetické variability bude potvrzena souvislost mezi genotypem a biosyntézou mléčného tuku.*
- Vyhodnotit vztah polymorfismu genů *DGAT1* a *SCD1* (případně dalších souvisejících se syntézou mléčného tuku) a ukazatelů mléčné užitkovosti. *Předpokládá se, že polymorfismus genů DGAT1 a SCD1 má přímou souvislost s ukazateli mléčné užitkovosti.*
- Zjistit možnosti izolace DNA ze vzorků mléka a vyhodnotit metody genotypizace vybraných genů souvisejících s kvalitou kravského mléka. *Předpokládá se, že izolace DNA z mléka bude proveditelná. PCR-RFLP je osvědčenou metodou genotypizace, kterou lze pro analýzu využít.*
- Zjistit možnosti stanovení mastných kyselin pomocí rutinní metody a porovnat je se stanovením mastných kyselin referenční metodou. *Předpokládá se, že stanovení mastných kyselin rutinní metodou umožní analýzu více vzorků bez předchozí úpravy vzorku. Referenční metoda však zřejmě bude nadále nejpřesnější metodou stanovení mastných kyselin.*

Proč je u SFA velmi silná korelace mezi GC a MIR metodou a u MUFA a PUFA jsou korelace slabší (zvláště u PUFA)? Je u PUFA vhodné a možné nahradit GC metodou MIR-FT?

- Metoda MIR-FT je vhodná pro stanovení mastných kyselin, které jsou typické pro mléčný tuk (především C16:0) a jejich zastoupení v mléčném tuku je tudíž vyšší. Z tohoto důvodu je vhodné metodu využít spíše pro stanovení SFA, pak u MUFA či PUFA.

Zápis z obhajoby disertační práce

Doktorand: Ing. Robert Kala

Obhajoba byla zahájena v 11 hod.

- Předseda komise pro obhajobu, prof. Ing. Oto Hanuš, Ph.D. zahájil jednání představením studenta a jednotlivých členů komise.
- Ing. Pavel Smetana, Ph.D. přečetl stanovisko školícího pracoviště (KKZP) na studenta.
- Vedoucí školitelka, doc. Ing. Eva Samková, Ph.D. přečetla stanovisko školitele na studenta.
- Vlastní obhajoba disertační práce – 15 min.
- Přečtení oponentských posudků v pořadí – prof. MVDr. Lenka Vorlová, Ph.D., doc. Ing. Lenka Kouřimská, Ph.D. a doc. Ing. Jiří Mlček, Ph.D.
- Odpovědi doktoranda na otázky oponentů.

VOLNÁ DISKUZE:

prof. Ing. Jan Trávníček, CSc.

Mléko z 1. fáze laktace je tedy i přes probíhající negativní energetickou bilanci lepší? A byl zjištěn rozdíl mezi holštýnským plemenem a českým strakatým plemenem?

- Z nutričního hlediska je lepší, neboť má vyšší zastoupení UFA než SFA. Domnívám se, že mezi plemeny výrazný rozdíl zjištěn nebyl.

doc. Ing. Lenka Kouřimská, Ph.D.

Byly provedeny interakce faktorů ke zjištění jejich spolupůsobení, metoda ANOVA s interakcemi?

- V těchto studiích (Kala *et al.*, 2018; Samková *et al.*, 2018) ANOVA s interakcemi provedena nebyla.

Jaký je v dané oblasti výzkumu dle Vás výhled do budoucna?

- Dle mého názoru je to především další studium polymorfismu genů ovlivňujících obsah a složení mléčného tuku.

prof. Ing. Lenka Vorlová, Ph.D.

Při izolaci DNA z mléka – jak se odliší bakteriální DNA a DNA ze somatických buněk?

- Pro izolaci DNA se využívají komerčně dostupné kity, které jsou přímo určené pro izolaci bakteriální DNA či DNA ze somatických buněk.

Zaznamenal jste další informace o přítomnosti aglutininů na povrchu tukových kuliček?

- Nezaznamenal.

prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.

Pokud jsou pro děti, jak bylo zmíněno, mléko a mléčné výrobky důležité, jak je to u dětí s laktózovou intolerancí?

- V případě dětí s laktózovou intolerancí lze doporučit kysané mléčné výrobky.

Pokud nemohou trávit ani kysané mléčné výrobky?

- Doporučil bych konzumaci výrobků s označením „laktosa free“.

Zápis proveden:

V Českých Budějovicích 10. 1. 2019

MVDr. Lucie Hasoňová, Ph.D.