

Bio

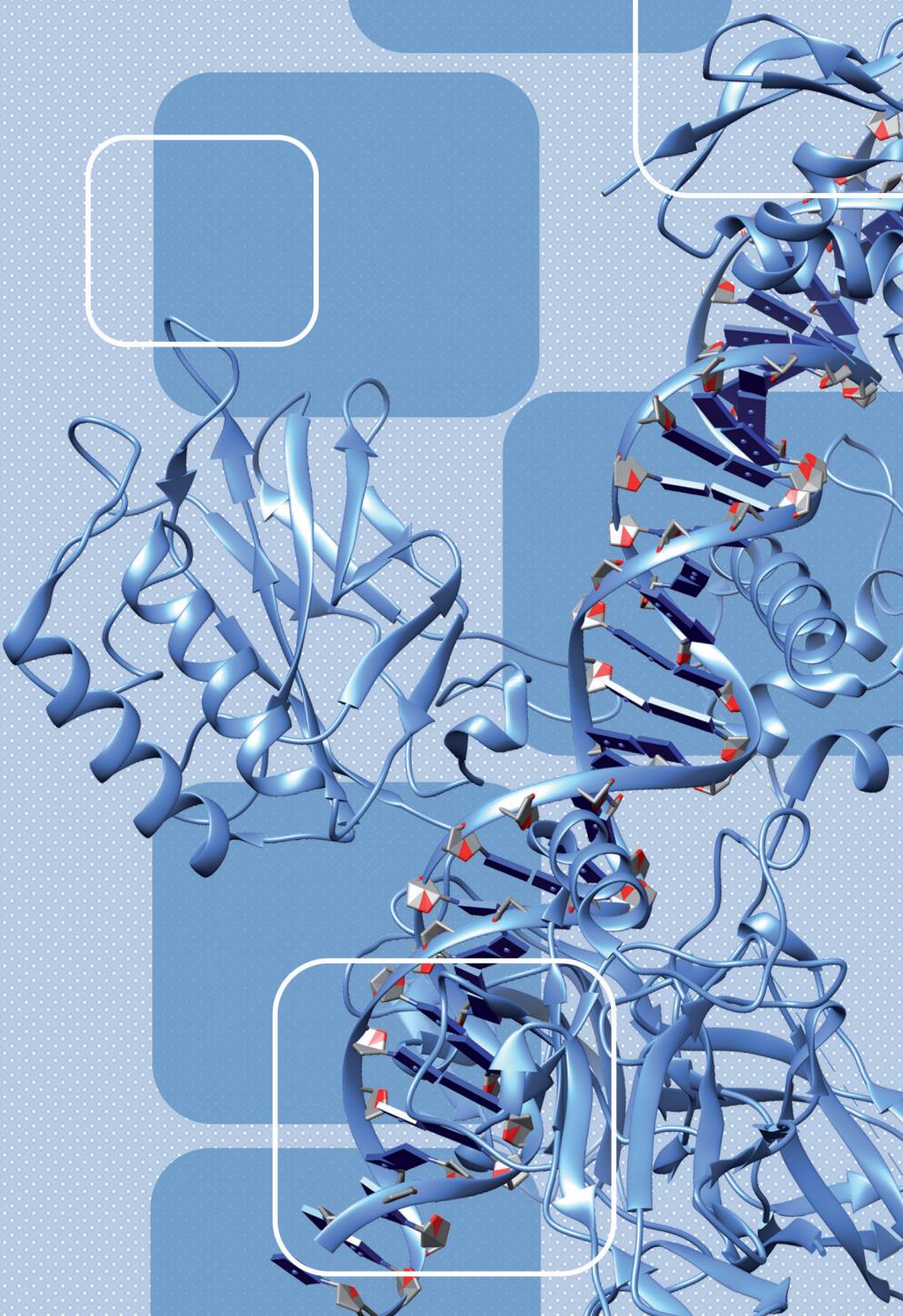
Ročník 28 • Číslo 1/2018

**BULLETIN
BIOTECHNOLOGICKÉ
SPOLEČNOSTI**

**zakladajíciho člena
Českého svazu
vedeckotechnických
společností (ČSVTS)**

a
**člena „European
Federation
of Biotechnology“
(EFB)**

prospect



Bio prospect

Society address: Institute of Chemical Technology, Technická 3, 166 28 Prague 6, Czech Republic.
Tel.: 420-220 443 151, fax: 420-233 334 769, e-mail: danka.pokorna@vscht.cz, IČO 00570397,
account No.: 19534-061/0100 Komerční banka Praha 6, Dejvická 52, SWIFT CODE: COMBCZTPP

Czech Republic Regional Branch Office as a bridge between European Federation of Biotechnology and Czech Biotechnology Society is located in the Centre of the Region Hana for Biotechnological and Agricultural Research, Šlechtitelů 21, 783 71 Olomouc, Czech Republic

BULLETIN OF CZECH BIOTECHNOLOGY SOCIETY

**founding member of the Czech Association of Scientific
and Technical Societies – <http://en.csvts.cz>
and
member of European Federation of Biotechnology
<http://www.efb-central.org>**

Bioprospect, the bulletin of the Biotechnology Society is a journal intended to inform the society members about the most recent developments in this field. The bulletin should supply the vitally important knowledge directly to those who need it and to those who are able to use it properly. In accordance with the rules of the Society, the Bulletin also deals with both theoretical and practical questions of biotechnology. Articles will be published informing about the newest theoretical findings, but many planned papers are devoted to fully practical topics. In Czech Republic there is a growing gap between basic research and production. It is extremely important to reverse as soon as possible the process of further opening of the scissors, and we hope the Bulletin will help in this struggle by promoting both research and practice in our biotechnology. The Bulletin should facilitate the exchange and targeted delivery of information. The editorial board welcome advertisements of products such as chemicals, diagnostics, equipment and apparatus, which have already appeared

on the Czech market, or are projected, enter it. Services, free R&D or production facilities can also be advertised. The editorial board, together with the executive committee of the Biotechnology Society, hope that maybe some information published in the Bulletin, or some new contacts based on it, will give birth to new cooperation with domestic or foreign research teams, to collaborations, joint ventures or strategic alliances providing access to expertise and financing in international markets.

The editorial board invites all of You, who are involved in the field called biotechnology, and who are seeking contacts in Czech Republic, to advertise in the Bulletin BIOPROSPECT, which is mailed directly to more than one and a half thousand Czech biotechnologists.

For more information contacts the editorial board or directly:

Petra Lipovová, Ph.D. (editor in chief)
ICT, Technická 3
166 10 Prague 6, Czech Republic
Phone +420 220 443 028
e-mail: petra.lipovova@vscht.cz

ÚVODEM

Vážení přátelé,

vítáme Vás v novém roce 2018 a také již ve 28. ročníku našeho Bioprospectu, který, jak doufáme, bude i nadále sloužit k pravidelnému kontaktu se všemi našimi členy a příznivci. Úspěšný mezinárodní kongres Biotech 2017, spojený již se 7. česko-švýcarským sympoziem, bude v podstatě zakončen až v polovině letošního března, kdy vyjde již třetí speciální číslo prestižního biotechnologického časopisu *Biotechnology Advances* (předchozí dvě čísla byla spojená s našimi mezinárodními akcemi Biotech 2014 a Biotech 2011). V tomto posledním speciálním čísle *Biotechnology Advances*, nazvaném „Prospects in Biotechnology“, je publikováno 18 pečlivě vybraných a tvrdým recenzním řízením prošlých přehledných článků na velmi zajímavá a velice aktuální téma současných biotechnologií.

Biotech 2017 si zde připomeneme i tím, že jsme do našeho prvního letošního čísla zařadili příspěvek předsedy švýcarské biotechnologické společnosti Dr. Grawundera, který přednesl na zahájení naší společné akce. Velmi úspěšná, a EFB velice kladně hodnocená, byla konference Green for Good IV pořádaná olovouckými kolegy a věnovaná rostlinné a zemědělské biotechnologii. Česká pobočka EFB při Centru regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum dobře reprezentovala české biotechnologie v EFB a profesor Frébort úspěšně zastupuje naši společnost ve vedení EFB. Jednou z významných činností EFB je vydávání časopisu *New Biotechnology*. V r. 2017 dosáhl časopis na impact factor 3,813, což představuje 20 % nárůst proti r. 2016 a stává se stále zajímavějším pro publikaci původních prací.

Jak jsme Vás již informovali, „European Federation on Biotechnology“ (www.efbiotechnology.org) pořádá 18th European Congress on Biotechnology ve dnech 1. – 4. července 2018 ve švýcarské Ženevě (www.ecb-2018.com). Doporučujeme účastnit se a prezentovat tam výsledky českého biotechnologického výzkumu.

Z tuzemských akcí, které by mohly naše členy a příznivce zajímat, jsou v tomto roce:

- The 43rd FEBS Congress, který se uskuteční v Praze ve dnech 7. – 12. července 2018 (<https://2018febs-congress.com>)
- XXVIIIth Genetic Days se uskuteční 18. – 20. září 2018 v Českých Budějovicích (informace: Tereza Kavová (kavova.terezka@gmail.com)

9. ledna 2018 uplynulo 150 let od narození významného dánského chemika Sórena Sørensena, který pracoval v „Carlsberg Laboratory“ založené světoznámým pivovarníkem J. C. Jacobsenem v r. 1876. Tuto laboratoř vedl jako nástupce dalšího všeobecně známého dánského chemika Johana Kjeldahla. Sørensen pracoval v laboratoři se svou ženou Margreth na problematice vlivu koncentrace iontů na proteiny, která ho vedla ke konceptu pH stupnice. Sørensen vyvinul metody stanovení pH roztoků, zavedl formolovou titraci aminokyselin a stal se i expertem v oblasti fermentací.

(http://www.chemistryviews.org/details/ezine/10724372/150th_Birthday_Sren_Srensen.html).

Shodou okolností si v letošním roce (25. 6. 2018) připomeneme 150 let od narození dalšího významného dánského chemika Alfreda Wöhlka. Wöhlk v r. 1904 objevil barevnou reakci, kterou je možno odlišit reakci laktosy od jiných redukujících cukrů, především glukosy. Wöhlkův test byl používán zejména v lékařské diagnostice k průkazu laktosy v moči a to zhruba až do r. 1960, kdy byl nahrazen modernějšími metodami. Test umožňoval rozlišení nebezpečného diabetu od relativně méně nebezpečné laktosurie. Dodnes však Wöhlkův test představuje velmi zajímavý pokus pro studentské laboratoře, kde může názorně ukázat ve kterých mléčných výrobcích je laktosa zachována, ve kterých byla fermentována (zakysané mléčné výrobky) nebo odstraněna (bezlaktosové mléko). (Více informací na http://www.chemistryviews.org/details/education/10821368/.html?elq_mid=25605&elq_cid=893387)

Redakce Bioprospectu Vám přeje příjemné počtení článků publikovaných v tomto čísle a těší se na vaše příspěvky a náměty.

Srdečně Vás zdraví

Vaši

Jan Káš a Petra Lipovová

Dear distinguished guests, colleagues, and friends from Industry and Academia,

As the Vice-President of the Swiss Biotech Association, one of the supporters of this conference, it is my pleasure to also welcome you to the 7th Czech-Swiss Biotech Symposium. The Swiss Biotech Association is an Association that represents small and medium-sized Biotech companies in Switzerland and has about 200 member companies. My Biotech company, NBE-Therapeutics, in Basel, is actually one of them.

The Swiss Biotech Report for the year 2016 altogether lists 281 Biotech companies. Therefore, the Swiss Biotech Association represents the majority of small and medium-sized Biotech companies in Switzerland. These Biotech SMEs are indeed an important driver for innovation and applied research leading to new therapies and other high-valued products in Switzerland. Indeed in many cases, this innovation in applied research is deeply rooted in Swiss academic research or performed in collaboration with academic experts. For this, Switzerland has created a unique funding instrument managed by the so-called Swiss Commission for Technology and Innovation, in short: CTI.

In this funding scheme, for which the Swiss government has set aside about € 220 millions for 2017, Swiss Biotech companies and academic research groups can jointly apply for CTI funding supporting an applied research project with the objective of commercial translation. The cash funding only goes to the academic partner, and this cash funding is matched by in-kind contributions of the industry partner. Eventually, innovations coming out of such a CTI-project shall exclusively be exploited by the industry partner. This strategy has the advantage that Biotech companies can leverage the outstanding know-how and also the excellent infrastructure of academic partners for their translational development projects. At the same time, the academic partners liaise with industry research groups and benefit from the direct funding, to keep their teams funded. I consider this model as one of the success stories of Swiss research conducted by Swiss Biotech SMEs.

Due to the focus on applied research and its commercial translatability, particularly the technical Universities in Switzerland benefit from this CTI funding scheme. The Swiss Biotech SMEs contribute significantly to the economic prosperity of the country. Just to give you some numbers: The 281 Biotech SMEs in 2016 employed about 15'000 employees - 7'300 of these in privately owned companies, and 8'000 in publically traded companies. The indirect effects on the Swiss labour market are of course not considered in these numbers. According to the recently published Swiss Biotech report, the Swiss Biotech industry generated € 5.3 billion in revenues in 2016, creating € about 415 million profits during the last year.

Although the number for profits appears small, it is yet a positive number, considering that the majority of

privately held, Venture Capital-financed Biotech companies are loss-making companies until an exit occurs. As you know, exits in the Biotech sector often come at valuations of hundreds of millions € or more, which is not recorded in the profit & loss calculation for Swiss Biotech SMEs in the Swiss Biotech report. In 2016 Swiss Biotech SMEs are reported to have ca. € 2.5 billion in liquidity on their balance sheets which allowed them to re-invest ca. € 1.5 billion in R & D activities in 2016. These impressive numbers have been quite robust over the last 3 year period and have slightly increased in 2016.

The Swiss Biotech Association has the motto "1 Nation 1 Cluster" and, as such, has the objective to improve the framework for all Biotech and Life Science Companies in Switzerland, allowing them to thrive and to become successful.

In a small country with a 8.3 million population, just short of the 10.5 millions of the Czech Republic, but with a strong federal structure (called Cantons in Switzerland), and three main language regions, we, at the Swiss Biotech Association, believe it is important to equally foster Biotech in all regions of the country, rather than to cultivate regional competition.

Personally, I believe that this theme could be extended to Europe as a whole, because we, in Europe, are in a global competition in all areas of Biotech – a field, that is still dominated by U.S. companies – and Asian companies are quickly catching up in volume and most recently also in quality.

Therefore, we are very pleased that Switzerland, although not being a member of the European Union, is again a fully associated member of the Horizon2020 funding scheme of the EU, because outstanding research and innovation performed across Europe do not stop at the Swiss-EU border.

It is my wish that this will foster many interactions, existing and new ones, between academic and industry research groups in the Czech Republic and Switzerland – two countries of similar population, which critically depend on research and innovation to maintain the prosperity of the society in the future

All participants, delegates, and speakers of the Czech-Swiss Biotech Symposium I do wish an enjoyable symposium with many fruitful interactions that may be the focus of great future innovations and business opportunities between Czech and Swiss academic groups and businesses in Biotech.

Ulf Grawunder, PhD
Chief Executive Officer
NBE- Therapeutics AG
Technology Park Basel
Switzerland

UTILIZATION OF HYDROLYSED WASTE MATERIALS TO REDUCE COSTS IN MICROBIAL PRODUCTION OF LACTIC ACID

Marek Drahokoupil

Department of Biotechnology, University of Chemistry and Technology, Prague, Czech Republic;
drahokoupil.marek@vscht.cz

Introduction

Lactic acid has been used for a wide range of applications. It is mainly used in the food industry as a pH regulator and food preservative. Thanks to its antimicrobial activity and hydration effect, it has also found its use in cosmetics. Due to the presence of reactive groups in the lactic acid structure, it is able to form a polymer that can be used in medicine, e.g. as biodegradable prostheses or fibers designed to suture wounds and blood vessels. It is also used in the pharmaceutical and textile industries¹. The new field of application of lactic acid includes its use as a precursor for the synthesis of propylene glycol and acrylic polymers or also as environmentally friendly solvents. Last but not least, the lactic acid polymer is a suitable material for replacing traditional plastics whose main precursor is petroleum.¹ Beside their relatively easy degradability, the possibility to use renewable resources as substrates represents a great advantage.

In most industries where lactic acid is used, its optical L-isomer is preferred. From the health point of view, the D-isomer can cause hyperacidity of the body of children up to one year of life, or in patients with short bowel syndrome². When used for the production of polymers, L-lactic acid makes it possible to achieve higher yields and better technological properties of the resulting polymer.

Since the chemical production of a particular isomer of lactic acid is not chemically achievable, microbial production with a properly chosen production strain or genetically modified organisms could be a way for the production of L-isomer³. Today, microbial production of lactic acid represents more than two-thirds of its total global production⁴.

The most widespread microorganisms capable of producing lactic acid are lactic acid bacteria. These bacteria belong to an artificially formed group of microorganisms that was created on the basis of metabolic similarity; the final product of their metabolism is at least 50 % of lactic acid⁵. *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus* and *Bifidobacterium* are included in this group. Common features of these families are facultative anaerobic to anaerobic lifestyle, Gram-positive cell wall construction and, in most cases, inability to form a spore⁶. Lactic acid bacteria are ubiquitous in nature except in extreme conditions. The main place of their occurrence is the gastrointestinal tract of animals and humans, their oral cavity, and the urovaginal tract. In our project, the strain *Lactobacillus casei* 198 belonging to

the genus *Lactobacillus* was used for the production of lactic acid. This representative was selected from screening tests of a large number of strains in the Laboratory of Microbial Processes at the Institute of Biotechnology⁷. For this producer, the highest yield of L-lactic acid was achieved in fermentation tests.

Although the high concentrations of lactic acid can be achieved in many processes, the cost of the substrate is often crucial for reasonable production. Normally, waste products from the agro-food industry are most commonly used as substrates. However, most of the raw materials are based on starch (edible substrate for human) or in case of non-food substrates (e.g., plant biomass based on cellulose) need to be pretreated by hydrolysis to achieve the cleavage of complex sugars, into simple carbohydrates that are used as a source of carbon and energy by the production strains. It should also be supplemented by further nutrients, including nitrogen sources (yeast extract, peptone, meat extract) or vitamins that are often expensive⁸.

In our work, chicken feather hydrolysate has been used as an alternative and cheap source of nitrogen to lower the price of the cultivation medium. Feathers are mainly composed of keratin proteins and after its individual amino acids and peptides that can be used by lactic acid bacteria are released. There are several possibilities how to carry out the hydrolysis processes, including hydrolysis using suitable microorganisms with keratinolytic activity (*Pseudomonas* sp.) or enzymatic hydrolysis using the suitable enzymes. These methods, however, are expensive due to the high cost of enzymes and the need for feather pre-treatment before hydrolysis. Another disadvantage is the low bioavailability of the resulting peptides and free amino acids. In this respect, the use of alkaline hydrolysis under slightly alkaline and mild conditions, which does not require any pretreatment of feathers, is more suitable. This method also provides sufficient yield of hydrolysis of feathers and resulting products are bioavailable for bacteria. Such product can be used to replace expensive, industrially produced peptone and yeast extract that are part of normally used MRS medium⁹.

Materials and Methods

Alkaline hydrolysis of chicken feather

Chicken feather was hydrolysed with sodium hydroxide at a concentration of 2, 5, 10, 15 and 20 % by weight and used as a neutralizing agent. 2 g of milled feather was placed into 250 mL Erlenmeyer flasks and

poured by 100 mL of 2, 5, 10, 15 or 20% NaOH and incubated for 24 h at 70 °C and 130 rpm on a rotary shaker. The hydrolysis time was dependent on the concentration of the hydroxide used (with increasing hydroxide concentration reaction time was shortened)⁷.

Fermentation in bioreactor

Chicken feather (solution hydrolyzed with 20% NaOH) was used not only as nitrogen supplement but in one parallel also as a neutralizing agent for pH control in the lactic acid production process. Cultivations were carried out in two stirred LabFors laboratory reactors at 37° C, mixing 200 rpm, without bubbling CO₂. Batch cultivation was carried out with 450 ml of complete MRS medium inoculated with 50 ml of inoculum. In the first bioreactor the pH was controlled using 20% NaOH solution, and in the second bioreactor, the feather hydrolysate was used for keeping constant pH. After 17 hours of culturing, 20 g of 500 g /L sterile glucose solution was fed to each bioreactor, to replenish the source of carbon. In another 4 hours, the carbon source in the form of a sterile glucose solution was fed continuously into the reactors by using peristaltic pumps. The dilution rate was calculated to be 27 mL of glucose per hour. Samples were regularly withdrawn for HPLC and cell growth (optical density) measurement. After 36 hours of cultivation, the glucose stock solution was depleted, and the entire experiment was terminated.

In the second experiment, the chicken feather was used not only as a neutralizing agent (feather in 20% NaOH solution) but also a replacement of all nitrogen

sources in the MRS medium (feather in 2% NaOH solution). The experimental setting was the same as in previously described.

Results and discussion

Results for fermentation in bioreactor

Firstly, the possibility to replace traditionally used NaOH as a neutralizing agent by the alkali hydrolysate of the chicken feather was investigated. As seen in Table I, after 16 h of batch, the final concentration of lactic acid was almost the same and glucose was completely consumed in both cases. After glucose depletion (signalized by a plateau in on-line measured hydroxide addition) fed-batch cultivation was initiated by feeding concentrated glucose solution (500 g/L). Since the glucose and neutralizing agent contribute to volumetric changes in the reactor, the total mass balance has to be performed to evaluate lactic acid production. After x h of fed-batch 29.5 g and 40.7 g of lactic acid has been produced in bioreactors with sodium hydroxide and hydrolysate of chicken feather, respectively. Also, the yield and productivity were higher when the feather hydrolysate was used as seen in Table II. The results show that feather hydrolysate is a suitable neutralizing agent for the production of lactic acid.

Secondly, feather hydrolysate (2%) was used as a replacement of the nitrogen sources normally used in MRS medium. The batch culture was first run. The cultivation with MRS has been used as a reference. Firstly, the batch culture with x g/l of glucose has been carried out followed by the repeated pulses of concent-

Table I: Results obtained with 20% NaOH as a neutralizing agent

20 % NaOH			Chicken feather hydrolysate	
Time (hours)	Glucose concentration (g/L)	Lactic acid concentration (g/L)	Glucose concentration (g/L)	Lactic acid concentration (g/L)
0	20.03	3.25	19.67	2.71
3	16.36	7.20	12.88	5.29
16	0	22.57	0	23.01

Table II: Summarizing results of yield and productivity of lactic acid by fermentation in bioreactors

	20 % NaOH	Chicken feather hydrolysate
Y _{KM/GLC} in batch fermentation (g/g)	0.96	1.03
Y _{KM/GLC} in fed-batch fermentation (g/g)	1.77	1.80
Productivity of fermentation (g/l/h)	1.69	2.20

Y_{KM/GLC} = yield of lactic acid to consumed glucose

Table III: Comparison between the two fermentations yield

Fermentation	Amount of glucose (g)	Amount of lactic acid production (g)	Yield (%)
Complete MRS medium	164.24	100.96	61.50
Incomplete MRS medium	74.86	41.18	55.00

rated glucose solution (500 g/L) fed into the bioreactor after the carbon and energy sources have been depleted (see Figure 1 and Figure 2). In this case, 70 g of lactic acid was obtained with MRS, while with the incomplete MRS medium whereby all nitrogenous constituents were replaced with 2% chicken feather hydrolyzate, only 26 g of lactic acid was obtained.

The results show that in both cases glucose was not completely consumed, but accumulated gradually; in case of incomplete MRS medium, the rate of glucose consumption was significantly slower throughout the cultivation cycle compared to the reference fermentation, resulting in much lower lactic acid production. All results from both cultivations are shown in Figures 1 and 2 and Table III.

Conclusion

Cultivation was carried out to find the cheapest alternative of a source of nitrogen for the cultivation of lactic bacteria to reduce the cost of microbial production of lactic acid and at the same time to test a possibility to use this solution for pH regulation. 20% of the chicken feather hydrolysate has proved to be a suitable neutralizing agent also adding a sufficient amount of nitrogen for the growth of lactic acid bacteria and production of lactic acid in batch culture. On the other hand, if a chicken feather hydrolysate (2%) was used as a replacement all nitrogenous components (incomplete MRS medium) in fed-batch cultivation, considerably lower concentration of lactic acid was produced compared the reference fermentation (MRS medium). This may be due to the inappropriate composition of hydrolysate for lactic acid bacteria.

References

- Datta R, Henry M: *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 81, 1119 (2006).
- Lunt J: *Polym. Degrad. Stab.* 59, 145 (1998).
- Abdel-Rahman MA, Tashiro Y, Sonomoto K: *Biotechnol. Adv.* 31, 877 (2013).
- Papagianni M: 1.09 – Organic Acids A2 – Moo-Young, Murray (Comprehensive Biotechnology, Academic Press, Burlington, 109 (2011).
- Robinson RK: Encyclopedia of Food Microbiology. Academic Press, New York 2000.
- Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey F A, Schleifer KH, Whitman W: Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology. Springer-Verlag, New York 2009.
- Chmelík J: Thesis. UCT, Prague 2016.
- Hofvendahl K, Hahn-Hägerdal B: *Enzyme Microb. Technol.* 26, 87 (2000).
- Stiborova H, Branska B, Vesela T, et al.: *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 96, 1629 (2016).

Summary

Drahokoupil M.: Utilization of hydrolyzed waste materials to reduce costs in the microbial production of lactic acid

The main objective of this project was to design and optimize the process of microbial production of lactic acid on a model MRS medium using an inexpensive keratin hydrolysate with the goal to achieve high yield and concentration of lactic acid produced by the strain

Acknowledgment

This work was performed thanks to financial support of the project LTACH-17006 of the Inter-Action Inter-Excellence program of Ministry of Education, Youth, and Sport of the Czech Republic.

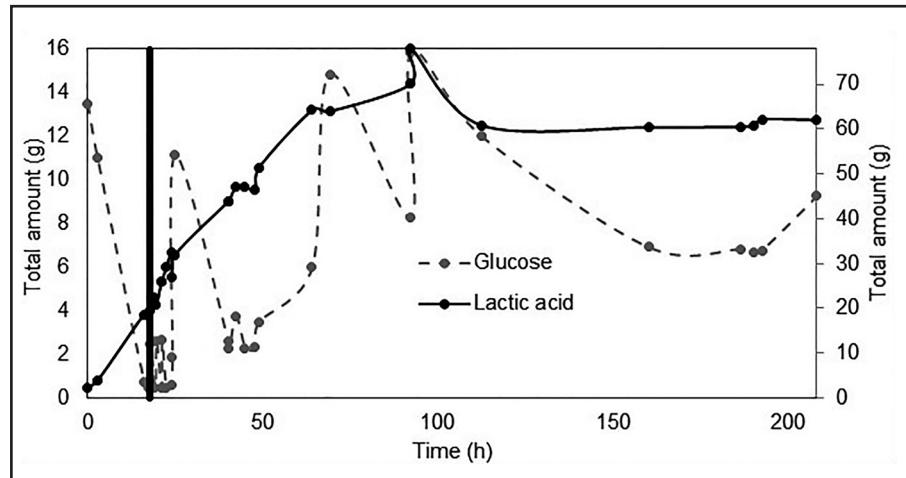


Fig. 1: The amount of glucose consumed and the lactic acid produced during reference fermentation on complete MRS medium. The right axis y is the amount of lactic acid produced, the left axis of the amount of (ingested) glucose.

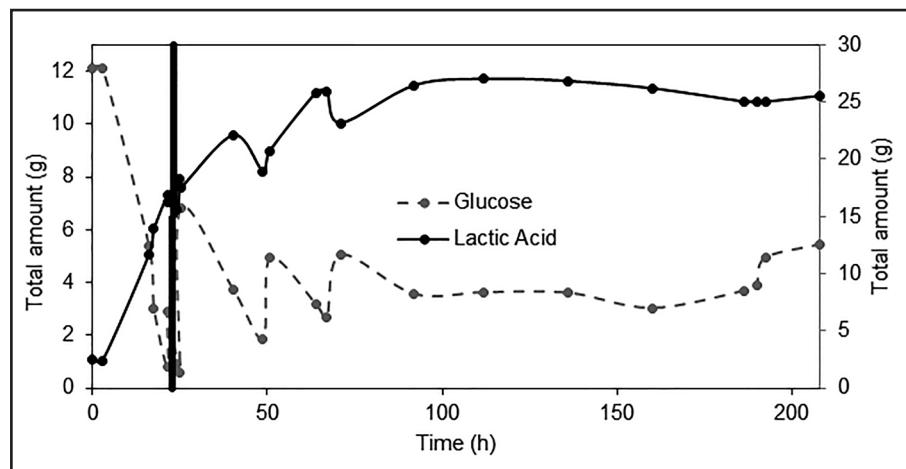


Fig. 2: The amount of glucose consumed and the lactic acid produced during reference fermentation on incomplete MRS medium whereby all the nitrogenous components of the medium were replaced by 2% chicken feather hydrolysate. The right axis y is the amount of lactic acid produced, the left axis of the amount of (ingested) glucose.

Lactobacillus casei 198. Firstly, the chicken feather was investigated as a low-cost source of nitrogen. Taking the growth of biomass and the final concentration of lactic acid as the main criteria, 20 % hydrolysate of chicken feather was chosen for the next experiments. Using this hydrolysate caused minimal dilution of the total volume of the culture medium in the bioreactor. The final achieved concentration of lactic acid in the medium in batch culture was 48 g/L Unfortunately, although the feather hydrolysate showed promising result as a neutralizing agent in a batch culture, it was not suitable as a source of nitrogen in a fed-batch culture, where only 35 % concentration of lactic acid was achieved compared to the MRS medium.

Keywords: Lactic acid, chicken feather hydrolysate, neutralizing agent, fermentation in bioreactor, source of nitrogen.

Souhrn

Drahokoupil M.: Využití hydrolyzovaných odpadních materiálů ke snížení nákladů na mikrobiální produkci kyseliny mléčné
Hlavním cílem tohoto projektu bylo navrhnut a optimalizovat proces mikrobiální produkce kyseliny mléčné na modelovém MRS médiu za použití levného keratinového hydrolyzátu s cílem dosáhnout vysokého výtěžku a koncentrace kyseliny mléčné, produkováné kmenem *Lactobacillus casei* 198. Nejprve bylo kuřecí peří zkoumáno jako levný zdroj dusíku. S ohledem na růst biomasy a konečnou koncentraci kyseliny mléčné, jako hlavního kritéria, byl pro další experimenty vybrán 20 % hydrolyzát kuřecího peří. Použití tohoto hydrolyzátu způsobilo minimální zředění celkového objemu kultivačního média v bioreaktoru. Konečná dosažená koncentrace kyseliny mléčné v médiu ze vsádkové kultivace byla 48 g/l. Bohužel, i když hydrolyzát peří vykazoval slabý výsledek jako neutralizační činidlo ve vsádkové kultivaci, tak se neprokázal jako vhodný zdroj dusíku v přítokované kultivaci, kde bylo dosaženo pouze 35 % koncentrace kyseliny mléčné ve srovnání s MRS médiem.

Klíčová slova: Kyselina mléčná, hydrolyzát kuřecího peří, neutralizační činidlo, fermentace v bioreaktoru, zdroj dusíku.

INFLUENCING FATTY ACID COMPOSITION OF YEASTS BY ODD N-ALKANES

Lucia Gharwalova¹, Michal Zimola¹, Tomas Rezanka², Jan Masak¹, Irena Kolouchova¹

¹Department of Biotechnology, University of Chemistry and Technology, Prague, ²Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic; *gharwall@vscht.cz*

Introduction

At the present time, plant oil production faces a backlash due to environmental pollution, which also brings many economic problems¹⁻³. This opens up the possibility of finding a new way to produce quality and affordable oils. Plants producing oil occupy areas of agricultural land. Operations associated with their cultivation are increasingly devastating and polluting the environment, especially from fertilizer soil contamination. A more efficient and natural way to produce lipids could be the use of some microorganisms that are also capable of producing lipids on cheap or waste substrates. Cultivation of lipid-producing microorganisms does not require farmland since cultivation reactors have a relatively smaller area. Another advantage is the possibility of production irrespective of the climate or the season. The disadvantage is the relatively high price of the obtained product⁴.

Research has focused on yeasts that have the ability to use alkanes as a source of energy and carbon. These types of organisms have developed an enzymatic apparatus that gives them the ability to use alkanes as a carbon source⁵. Yeasts, but also other microorganisms, are able to harness different sources of carbon for their growth, from simplest compounds to complex and at different concentrations⁶. Already in the 1970 s, the studies dealt with the degradation of pollutants in the environment. Most often, water or soil pollution was caused by various oil fractions, which were mainly related to the development of the oil industry. It has been found that n-alkanes have an effect on the synthesis and composition of fatty acids in the cells of microorganisms, especially yeast⁷. These substances

can be added in pure form or in the form of a mixture of different alkanes which naturally occur in crude oil. The alkanes are also supplied to the culture medium in a liquid form or are dispensed into different filling reactors where they are vaporized and subsequently transported by humidified air to mixed bacteria, yeast, and mold cultures.

This work explores the influence of non-traditional carbon sources, the growth of microorganisms, the production, and composition of intracellular lipids. The produced fatty acids could be used to produce biofuels⁸ or for various dietetic preparations⁹.

Materials and Methods

Microorganisms

The yeast strain used *Yarrowia lipolytica* CCY 29-26-36 was provided by Culture Collection of Yeast, Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Bratislava. The stock culture was stored in 20 % glycerol at -70 °C.

Cultivation

The pre-cultures of yeast strains were cultivated in 100 ml of complex YPD medium (20 g/l peptone, 10 g/l yeast extract, 20 g/l glucose, initial pH 7, sterilized at 121 °C for 20 min) in Erlenmeyer flasks on a rotary shaker at 150 rpm and 28 °C to the late exponential growth phase. For the lipid production in Erlenmeyer flasks, 200 ml of TCM medium (KH_2PO_4 , 1.7 g/l; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.75 g/l; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4.00 g/l; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.34 g/l; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.34 g/l; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.26 g/l; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.84 g/l; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.34 g/l, sterilized at 121 °C for 20 min) was inoculated with a 5 % inoculum of the pre-culture to a final concent-

ration of OD₆₀₀ 0.2 and incubated on a rotary shaker (150 rpm and 28 °C) to the stationary phase. In experiments with media containing glucose, a concentration of 20 g/l was employed. All experiments were performed in triplicates. The media contained different n-alkanes in concentrations 1 g/l, 3 g/l and 5 g/l (n-pentadecane (\geq 99 %, Sigma-Aldrich) and n-heptadecane (\geq 99 %, Sigma-Aldrich) and with or without the supplement of rhamnolipids. Purified rhamnolipid mixtures were obtained from *Pseudomonas aeruginosa* DBM 3775¹⁰. Rhamnolipids were added in a critical micellar concentration of 56 mg/l.

The cultivation in bioreactor took place in an assembled oxygen and pH probe bioreactor filled with 1 l of sterile TCM medium with 5 g/l of C15 and 10 % yeast inoculum and optionally rhamnolipid was added. The cultivation conditions were as follows, mixing at 500 rpm, thermostat was set at 28 °C and aeration at 1.1 VVM¹¹. The inoculum was cultured in a YPD medium. Cultivation took place to the late stationary phase of growth. Growth curves were measured spectrophotometrically (OD 600 nm).

Upon reaching the stationary phase of cell growth, the cultured cells were separated by centrifugation on a Sorvall instrument (7200 rpm, 15 min, 5 °C). The centrifuged cells were frozen and lyophilized.

Lipid extraction

After lyophilization, the biomass was mixed with 2 ml of 0.1 mol/l Na₂CO₃ and the mixture was ground with ballotini glass beads (diameter 0.2 mm) in a mortar, overlaid with liquid nitrogen. After the third reiteration of this process, 50 ml of 0.1 mol/l Na₂CO₃ was added. The lipids were extracted with the chloroform-methanol mixture according to Bligh and Dyer¹². The determination of dry weight followed the centrifugation and subsequent lower phase was evaporation.

Analysis of fatty acid methyl esters

The total lipids were saponified overnight in 10 % KOH-MeOH (at room temperature). To remove basic

and neutral components, the fatty acid fraction from saponification was partitioned between an alkali solution (pH 9) and diethyl ether. The aqueous phase containing fatty acids was acidified to pH 2 and later extracted with hexane. Methylation of the fatty acid fraction was performed by a 17 % solution of BF₃/MeOH (Sigma-Aldrich).

Gas chromatography-mass spectrometry of FAME (fatty acid methyl ester) was done on a GC-MS system consisting of Varian 450 GC (Varian BVm Middleburg, The Netherlands), Varian 240-MS ion trap detector with electron ionization (EI), and CombiPal autosampler (CTC, USA) equipped with split/splitless injector. The separation took place on an SP-2380 column (Supelco) (100 m, 0.25 mm ID, 0.20 µm film thickness). The temperature during analysis started at 60 °C and was held for 1 min in a splitless mode. After the splitter was opened, the oven heated to 160 °C at the rate of 25 °C min⁻¹. The second temperature inclined at 220 °C at a rate of 1 °C min⁻¹ for 10 min. The solvent delay time was set to 8 min. The transfer line temperature was 280 °C. FAMEs were identified according to their mass spectra and chemical standards (Sigma-Aldrich).

Results and discussion

Cultivation in Erlenmeyer flasks

Yarrowia lipolytica was capable of utilizing hydrophobic carbon sources in the form of medium-length alkanes (n-pentadecane and n-heptadecane) (Fig. 1). Cultivation of this yeast in a mineral medium with 3 g/l of n-pentadecane yielded in 2.73 g/l of biomass. The addition of rhamnolipids to the growth medium increased lipid content. The addition of rhamnolipids in media with 3 g/l of C17 increased the lipid content to almost 140 % rel. A similar result was obtained in cultivations with 1 g/l of C17, where the lipid content increased to 135 % rel.

Yarrowia lipolytica is capable of producing its own biosurfactants¹³, thus being able to utilize the hydro-

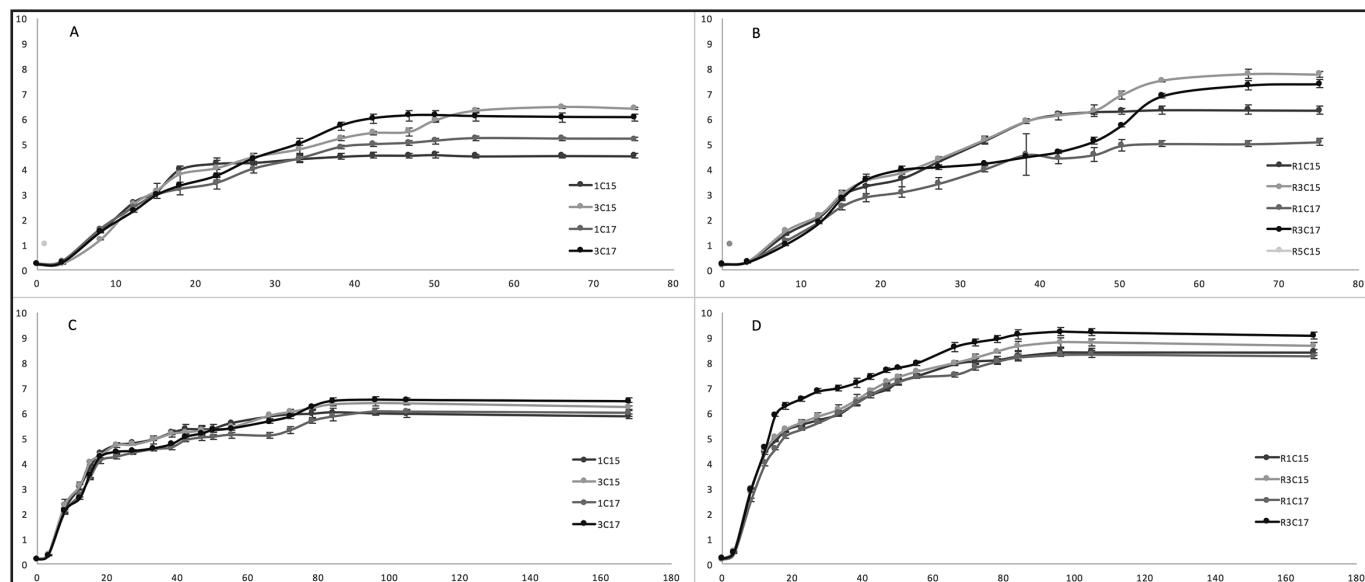


Fig. 1: Growth curves of *Yarrowia lipolytica* on YPD media without the addition of rhamnolipid (A) and with rhamnolipid (B) and on TCM media without the addition of rhamnolipid (C) and with rhamnolipid (D) (1C15 = 1 g/L pentadecane, 3C15 = 1 g/L pentadecane; 1C17 = 1 g/L heptadecane, 3C17 = 1 g/L heptadecane; R = addition of rhamnolipid)

phobic substrate to such an extent that the addition of another natural surfactant in the form of rhamnolipid did not lead to an increase in biomass.

The addition of rhamnolipids increased the content of odd-chained fatty acids (see Tab. I and II). The pentadecenoic acid content was increased by 280 % rel. when the yeast cells were cultivated in TCM medium with 3 g/l of n-pentadecane and addition of rhamnolipid. The synthesis of heptadecanoic acid in mineral media containing 3 g/l of n-heptadecane with rhamnolipid reached 12.4 % of the total amount of fatty acids. *Y. lipolytica* grown in TCM medium with an addition of rhamnolipids was proved to contain more than twice less linoleic and oleic acids compared to cultivations without rhamnolipid.

Cultivation in bioreactor

The pilot reactor cultivation of *Yarrowia lipolytica* showed lower biomass yields compared to cultivations in Erlenmeyer flasks. The reactor cultivation of *Y. lipolytica* with 5 g/l of C15 resulted in almost the same percentual composition of fatty acids as in the cultivation in Erlenmeyer flasks with 3 g/l of C15 (Tab. I and II).

Due to intensive aeration, significant foaming of the media occurred and the carbon source, n-pentadecane, was partly removed from the reactor in the foam which resulted in a deteriorated growth. The growth of *Yarrowia lipolytica* was considerably weakened after the addition of rhamnolipid to the culture medium. Rhamnolipid reduced the dissolved oxygen con-

tent in the medium by up to 50 %. Therefore, the production of fatty acids with an odd number of carbons was reduced¹⁴. To increase the growth of biomass and yield of fatty acids, it would be necessary to adjust the cultivation parameters, especially the oxygen flow in the reactor.

Conclusions

Yarrowia lipolytica seems to be a promising strain for industrial use due to high ratios of nutritionally important FAs (over 85 % of oleic acid, palmitoleic acid, linoleic acid of the total lipid content). This strain did not react to the addition of rhamnolipids by an increased amount of biomass since this strain is known to produce its own biosurfactants. We proved that the addition of rhamnolipids triggered increased production of nutritionally important odd-chain fatty acids. Thus, the application of rhamnolipids might be a means to the modulation of the proportion of odd- and even-numbered fatty acids. The production of lipids in bioreactors still has a lot of technological drawbacks and needs to be improved in order to achieve the same results as in pilot cultivations in Erlenmeyer flasks.

Acknowledgments

This work was supported by the Czech Science Foundation (GACR) project 17-00027S.

Tab. I The proportion of unsaturated fatty acids in *Yarrowia lipolytica* cultivated on different alkanes (pentadecane C15, heptadecane C17) in concentrations 1 g/l (1), 3 g/l (3) and 5 g/l (5) with or without the addition of rhamnolipid (R); characteristic: rhamnolipid, concentration of alkane, type of alkane

Cultivation	Substrate	Charac-teristic	L/X (% w/w)	15:1 (%)	16:1 (%)	17:1 (%)	18:1 (%)	18:2 (%)
Erlenmeyer flasks	YPD	1C15	22.8	0.2	13.2	0.2	55.6	17.6
	YPD	3C15	21.9	0.2	11.9	0.2	54.7	17.9
	YPD	1C17	21.6	0.3	12.7	0.1	54.9	17.8
	YPD	3C17	20.1	0.4	13.5	0.3	54.5	17.3
	YPD	R1C15	25.6	0.2	12.9	0.2	55.6	16.8
	YPD	R3C15	24.8	0.3	13.7	0.1	56.8	15.2
	YPD	R1C17	24.1	0.0	14.1	0.3	53.1	17.3
	YPD	R3C17	23.3	0.1	14.0	0.2	56.4	14.8
	TCM	1C15	13.4	0.4	15.7	0.1	56.1	15.8
	TCM	3C15	13.5	0.7	14.9	0.1	52.7	19.4
	TCM	5C15	19.4	0.1	13.5	0.3	51.2	21.0
	TCM	1C17	12.8	0.1	10.8	0.2	60.0	15.9
	TCM	3C17	12.4	0.2	12.3	0.3	57.5	16.8
	TCM	5C17	18.4	0.4	13.8	0.5	54.0	17.1
	TCM	R1C15	17.5	14.5	14.2	3.9	28.4	8.5
	TCM	R3C15	17.2	19.8	10.8	4.5	24.7	7.6
	TCM	R1C17	17.2	0.2	13.0	14.2	40.9	7.2
	TCM	R3C17	17.0	0.5	12.5	17.9	34.5	7.9
Bioreactor	TCM	5C15	7.5	0.7	14.9	0.1	52.7	19.4
	TCM	R5C15	8.5	6.2	14.8	0.5	44.8	17.8

Tab. II The proportion of saturated fatty acids in *Yarrowia lipolytica* cultivated on different substrates (pentadecane C15, heptadecane C17) in concentrations 1 g/l (1), 3 g/l (3) and 5 g/l (5) with or without the addition of rhamnolipid (R); characteristic: rhamnolipid, concentration of alkane, type of alkane

Cultivation	Substrate	Characteristic	L/X (% w/w)	15:0 (%)	16:0 (%)	17:0 (%)	18:0 (%)
Erlenmeyer flasks	YPD	1C15	22.8	12.3	12.3	0.1	0.7
	YPD	3C15	21.9	13.8	13.8	0.0	1.2
	YPD	1C17	21.6	13.0	13.0	0.1	1.0
	YPD	3C17	20.1	12.6	12.6	0.1	1.1
	YPD	R1C15	25.6	13.2	13.2	0.1	1.0
	YPD	R3C15	24.8	12.6	12.6	0.0	1.2
	YPD	R1C17	24.1	14.0	14.0	0.2	1.0
	YPD	R3C17	23.3	13.3	13.3	0.1	1.1
	TCM	1C15	13.4	0.2	10.6	0.0	1.1
	TCM	3C15	13.5	0.4	10.8	0.1	0.9
	TCM	5C15	19.4	0.1	12.0	0.1	1.7
	TCM	1C17	12.8	0.0	12.1	0.1	0.8
	TCM	3C17	12.4	0.1	11.7	0.1	1.0
	TCM	5C17	18.4	0.2	12.4	0.3	1.3
	TCM	R1C15	17.5	11.3	14.2	4.1	0.9
	TCM	R3C15	17.2	15.6	11.7	4.6	0.7
Bioreactor	TCM	R1C17	17.2	0.4	12.9	10.4	0.8
	TCM	R3C17	17.0	0.5	13.7	12.4	0.1
Bioreactor	TCM	5C15	7.5	0.4	10.8	0.1	0.9
	TCM	R5C15	8.5	3.8	11.6	0.3	0.2

References

- Boswell A: *Trees*. 67, 13 (2007).
- Crutzen PJ, Mosier AR, Smith KA, et al.: *Atmos Chem Phys*. 8, 389 (2008).
- Pimentel D, Marklein A, Toth M, et al.: *Energies*. 1, 41 (2008).
- Papanikolaou S, Aggelis G: *European Journal of Lipid Science and Technology*. 113, 1052 (2011).
- van Beilen JB, Funhoff EG: *Appl. Microbiol Biotechnol*. 74, 13 (2007).
- Chen XF, Huang C, Yang XY, et al.: *Bioresour Technol*. 143, 18 (2013).
- Dunlap K, Perry J: *J. Bacteriol*. 94, 1919 (1967).
- Leiva-Candia DE, Pinzi S, Redel-Macías MD, et al.: *Fuel*. 123, 33 (2014).
- Jenkins BJ, Seyssel K, Chiu S, et al.: *Sci. Reports*. 7, 44845 (2017).
- Hoskova M, Ježdik R, Schreiberová O, et al.: *J. Biotechnol*. 193, 45 (2015).
- Braga A, Mesquita DP, Amaral AL, et al.: *Biochem Engineering J*. 93, 55 (2015).
- Bligh EG, Dyer WJ: *Can J. Biochem. Physiol*. 37, 911 (1959).
- Amaral PFF, da Silva JM, Lehocký M, et al.: *Process Biochem*. 41, 1894 (2006).
- Zapotocký L, Paca J: *Výzkum, vývoj a technologické uplatnění kombinovaného biologického dekontaminace systému a vliv biosurfaktantu na odstraňování směsi hydrofobních a hydrofilních par polutantů*. Technologická agentura České republiky, TAČR-TA03020395 (2016).

Summary

Gharwalova L., Zimola M., Rezanka T., Masak J., Kolouchova I.: Influencing fatty acid composition of yeasts by odd n-alkanes
The growth of microorganisms is influenced by cultivation conditions such as the type and concentration of carbon source. A large number of biotechnological studies are concerned with the possibility of increasing the production of biomass or lipids and examining the possibilities of affecting the composition of fatty acids in the cells and membranes of the individual microorganisms. Another important factor is to reduce the cost of cultivation by using cheap or waste substrates that are the source of usable carbon. One option is the use of medium-long n-alkanes, which are the waste products of the petroleum industry in the production of diesel fuel. N-alkanes can significantly affect the composition of microbial lipids, and in combination with the addition of natural biosurfactants, high utilization of this carbon source can be achieved while producing sufficient biomass and interesting fatty acids.

Keywords: *Yarrowia lipolytica*; fatty acids; microbial lipids; n-alkanes; rhamnolipids

Souhrn

Gharwalova L., Zimola M., Rezanka T., Masak J., Kolouchova I.: Vliv alkanů s lichým počtem uhlíku na zastoupení mastných kyselin kvasinek

Růst mikroorganismů je ovlivněn kultivačními podmínkami, např. typem a koncentrací zdroje uhlíku. Velké množství biotechnologických studií se zabývá možností zvýšení produkce biomasy nebo např. lipidů a zkoumá možnosti ovlivnění složení mastných kyselin v buňkách a membránách jednotlivých mikroorganismů. Dalším důležitým faktorem je snížení nákladů na kultivaci pomocí využití levných nebo odpadních substrátů, které jsou zdrojem využitelného uhlíku. Jednou z možností je využití středně dlouhých n-alkanů, které jsou odpadním produktem ropného průmyslu při výrobě motorové nafty. N-alkany mohou významně ovlivňovat složení mikrobiálních lipidů a v kombinaci s přídavkem přírodních biosurfaktantů lze docílit vysokého využití tohoto uhlíkatého zdroje za současné produkce dostatečného množství biomasy a zajímavého složení mastných kyselin.

Klíčové slova: *Yarrowia lipolytica*; masné kyseliny; mikrobiální lipidy; n-alkany; rhamnolipidy

THERMOPHILIC BIOFILTRATION OF COMPLEX VOC MIXTURE IN BUBBLE COLUMN REACTOR

Chalupa Jan, Halecký Martin

University of Chemistry and Technology, Prague, Department of Biotechnology, Prague, Czech Republic;
chalupaj@vscht.cz

Introduction

Biodegradation of VOCs produces heat and can lead to a rise in temperature in a bioreactor treating waste air. Rising temperature in the bioreactor leads to the selection of thermophilic or thermotolerant strains or the need of inoculation the reactor with such microorganisms. In recent years considerable effort was expanded to investigate a possibility of treating hot waste air streams using thermophilic and thermotolerant strains. The performance of conventional types and configurations of bioreactors is currently being investigated under thermophilic conditions^{1,2}.

Successful removal of pollutants from waste air depends on and therefore can be limited by, mass transfer and biodegradation kinetics. Pollutant biodegradation is an aerobic process, therefore mass transfer limitation can be related either to oxygen or pollutants. Oxygen mass transfer is characterized by volumetric mass transfer coefficient ($k_L a$) and oxygen solubility (C^*). Pollutant mass transfer is linked to Henry law constants, pollutant solubility in liquid media and vapor pressure. Based on these characteristics individual pollutant can be categorized as mass-transfer-limited or kinetic-limited with regard to biodegradation. Typically mass transfer limited pollutants have poor pollutant solubility (< 500 g·m⁻³ at 25 °C and 1 atm), high dimensionless Henry law constant (> 0.1 at 25 °C and 1 atm) or high vapor pressure (> 5000 g·m⁻³ at 25 °C).³ On the

other hand, pollutants with less mass transfer limitations can be limited by biodegradation kinetics. In that case, the limitation can be caused by pollutant accumulation resulting in inhibitory or toxic concentrations, preferential removal of more biodegradable pollutants or biomass overgrowth³. The last issue is less significant in case of using bubble column reactor, as opposed to biofilter, a packed bed column, where it can cause pressure drop⁴⁻⁶.

The VOC mixture composition was based on typical moieties contained in compostation waste air. Individual compounds (Tab. I) varied significantly in terms of Henry law constants, water solubilities and biodegradability.

Temperature affects physical-chemical parameters and processes, e.g. solubility of oxygen and pollutants and their mass transfer as well as fluid dynamics. The elevated temperatures have conflicting influence of the oxygen mass transfer. The oxygen solubility in water drops with rising temperature and with it drops the driving force behind the process. Conversely, the liquid mass transfer coefficient k_L rises, because of a decrease in water viscosity leads to increase in diffusion coefficient⁷. The effect of temperature on the interfacial area is not yet clear, some author reported an increase in interfacial area with temperature⁸, while others reported decrease⁹. Leonard et al. suggested that viscosity of the liquid plays an important role in the relationship between interfacial area and temperature⁷.

Table I: Mass transfer relevant physical properties of used pollutants

Pollutant	K_H at 25 °C [mol·m ⁻³ ·Pa ⁻¹]	Vapor pressure at 25 °C [kPa]	Solubility in water at 25 °C [g·L ⁻¹]
acetone	$2.66 \cdot 10^{-2}$	30.6	miscible
DMS	$4.74 \cdot 10^{-3}$	53.7	22
Ethyl acetate	$1.34 \cdot 10^{-4}$	12.43	64
propionic acid	$4.45 \cdot 10^{-7}$	0.44	$1 \cdot 10^3$
Triethylamine	$1.49 \cdot 10^{-4}$	7.61	88.6
α-pinene	$1.07 \cdot 10^{-1}$	0.63	$2.49 \cdot 10^{-3}$

Materials and methods

Chemicals

During the operation of the reactor basic salt medium (BSM) with following composition was used as growth medium ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$): K_2HPO_4 4.3; KH_2PO_4 3.4; NH_4SO_4 1.5; KNO_3 0.5; MgCl_2 0.3; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $6 \cdot 10^{-5}$; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ $2 \cdot 10^{-5}$; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ $2 \cdot 10^{-5}$; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $3.2 \cdot 10^{-5}$; $\text{CaSO}_4 \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$ $3 \cdot 10^{-5}$; $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $2 \cdot 10^{-5}$; $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ $2 \cdot 10^{-5}$. Acetone ($\leq 99.5\%$), dimethyl sulfide (DMS) ($\leq 99.0\%$), propionic acid ($\leq 99.5\%$), ethyl acetate ($\leq 99.5\%$), triethylamine ($\leq 99\%$) and α -pinene ($\leq 99.0\%$) from Sigma-Aldrich were used as pollutants in the biofiltration system and as standards for GC-FID calibration.

Reactor setup

The reactor (Fig. 1) consisted of glass and metal (stainless steel) parts with internal diameter of 11 cm. Total reactor height was 52 cm and working volume of 2.5 l. Working temperature was 55 °C, and the reactor was heated by coursing warm water from the thermostat through hollow metal parts. A glass frit with porosity 40 – 100 µm and diameter 6.5 cm was used as a gas distributor. A dual syringe pump was used for loading the pollutants to the inlet air stream through a T-shaped glass tube filled with glass cotton for efficient evaporation. Dissolved oxygen concentration was measured by polarographic sensor In Pro 6050 (Mettler Toledo) and pH was maintained at 7 ± 0.5 by automatic pH stat (Insa, Czech Rep.) using 0.5 NaOH solution. Water evaporation was compensated by providing a periodic supply of water. Reactor performance in terms of removal efficiency and elimination capacity was evaluated by measuring pollutant concentration in the inlet and outlet gas stream by GC-FID (6890N).

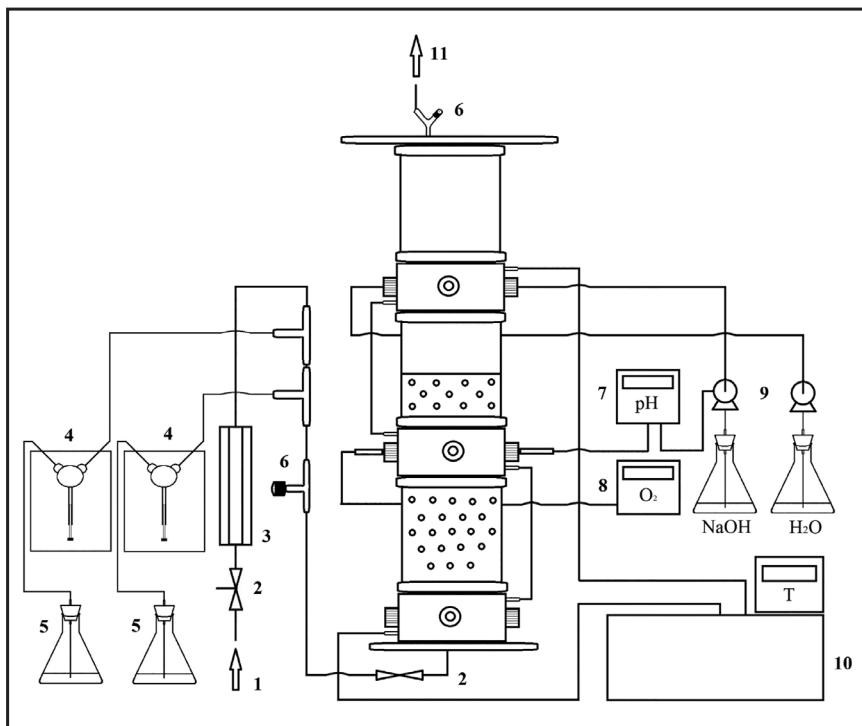


Fig. 1: Reactor setup: 1 – air inlet, 2 – regulation valve, 3 – flow meter, 4 – syringe pump, 5 – pollutant reservoir, 6 – sampling port, 7 – pH regulation, 8 – DO measurement, 9 – pump, 10 – thermostat, 11 – air outlet

Inoculum composition and bioreactor inoculation

In the first step, a mixed thermophilic culture from our Bioengineering lab Collection of microorganisms (UCT Prague, Department of Biotechnology) underwent a 10 days long enrichment cultivation phase in shake flasks (250 ml) containing BSM medium and pollutant mixture as the only energy and carbon source. Resulting population was used as inoculum in the start-up of the bubble column reactor.

Determination of oxygen volumetric mass transfer coefficient

The volumetric mass transfer coefficient of oxygen was determined by "gassing out" method using polarographic sensor In Pro 6050 (Mettler Toledo). Experiments were focused the effect of temperature (20 – 60 °C), air flow rate ($5 - 10 \text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$) and media composition (distilled water, BSM, and cultivation medium from the reactor without microbial cells).

Evaluation parameters

Elimination capacity (EC):

$$EC = (C_{in} - C_{out}) \cdot \frac{Q}{V_b} [\text{g}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}]$$

Organic load (OL):

$$OL = C_{g\ in} \cdot \frac{Q}{V_n} [\text{g}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}]$$

Empty bed retention time (EBRT):

$$EBRT = 3.6 \cdot 10^3 \frac{V_b}{Q} [\text{s}]$$

Removal efficiency (RE):

$$RE = \frac{C_{in} - C_{out}}{C_{in}} \cdot 100 [\%]$$

Mass transfer rate (J_{O_2})

$$J_{O_2} = \frac{dC}{dt} = k_L a \cdot (C^* - C_L) [\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}]$$

$$J_{O_2\ max} = k_L a \cdot C^* [\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}]$$

Volumetric mass transfer coefficient ($k_L a$):

$$k_L a = \frac{-\ln(C^* - C_L)}{t} [\text{s}^{-1}]$$

where C_{in} and C_{out} are inlet and outlet pollutant concentration [$\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$], respectively, V_b is operating bioreactor volume [m^{-3}], Q is the air flow rate [$\text{m}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$]. C^* and C_L are oxygen solubility and dissolved oxygen concentration (DOC) in media [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$], respectively and t is time [s].

Results and discussion

In contrast with conventional biofilter, bubble column reactor design allows relatively simple measurement of several key process parameters ($k_L a$, DOC), that help to elucidate and better predict the biofiltration process. Dissolved oxygen concentration was found to be possible limiting step during me-

sophilic biofiltration of acetone/styrene mixture, particularly during high ECs⁶. This and the fact, that oxygen solubility decrease with temperature¹⁰ led us to investigate oxygen mass transfer dependency on the temperature in bubble column reactor under desired air flow rate. Moreover, the effect of media composition was investigated.

The k_{La} values raised with temperature and air flow rate in all tested media (Fig. 2) which correlates with the data found in literature^{11, 12}. Although the effect of air flow rate was more pronounced at higher temperatures. In distilled water, the k_{La} values were significantly lower, than in salt-containing media (BSM, cultivation medium without cells). The effect can be explained by inorganic salts decreasing bubble coalescence and therefore increasing interfacial area¹³. Organic compounds (biomacromolecules and their fragments as well as dissolved pollutants or accumulated intermediates) contained in cultivation medium did not have a significant effect on the k_{La} values. Besides inorganic salts and organic compounds, the real cultivation media contain microbial cells and they can affect k_{La} as well since k_{La} can be affected by solid particles in media¹¹, but this effect was not investigated in this work. The oxygen solubility was not affected significantly by the media composition (results are not shown).

In the reactor used in this work and under experimental conditions, the rise in k_{La} values with temperature compensated for the decrease of oxygen solubility, so

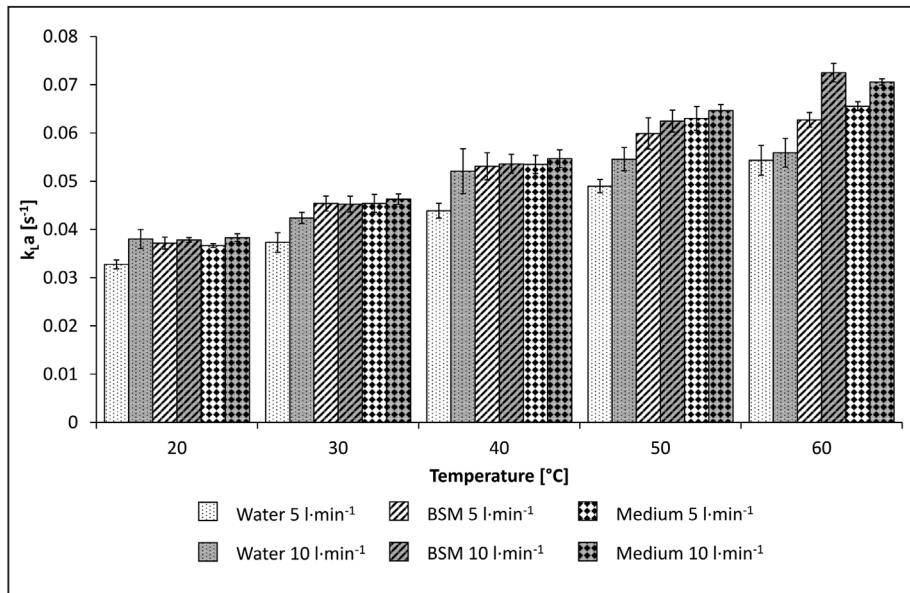


Fig. 2: Effect of temperature, air flow rate and media composition (distilled water, BSM, and cultivation medium without cells) on k_{La} values in bubble column reactor

Table II: Comparison of maximal oxygen mass transfer rate with varying temperature and air flow rate in cultivation media without cells

T [°C]	20	30	40	50	60
k_{La} (5 l·min ⁻¹) [s ⁻¹]	0.037	0.045	0.053	0.063	0.066
k_{La} (10 l·min ⁻¹) [s ⁻¹]	0.038	0.046	0.055	0.065	0.071
C^* [mg·l ⁻¹]	9.2	7.5	6.1	5.4	4.5
$J_{O_2 max}$ (5 l·min ⁻¹) [mg·l ⁻¹ ·s ⁻¹]	0.34	0.34	0.33	0.34	0.29
$J_{O_2 max}$ (10 l·min ⁻¹) [mg·l ⁻¹ ·s ⁻¹]	0.35	0.35	0.33	0.35	0.32

that the maximum oxygen mass transfer rate remained constant in cultivation media without cells (Table II). The results for distilled water and BSM (not included here) show the same trends. Therefore, based on this observation, the biofiltration process should not be limited by oxygen under thermophilic conditions more, than under mesophilic conditions, given the same OL.

The reactor was loaded with relatively diverse (Table I) hydrophobic/hydrophilic pollutant mixture with OL ranging from 61.5 g·m⁻³·h⁻¹ to 292.6 g·m⁻³·h⁻¹. Such pollutant mixtures are, according to literature, quite difficult to degrade completely, especially in a single reactor or at high OL^{14, 15}. In our case, the majority of pollutants contained in the waste air stream was not degraded (Fig. 3), this clearly was not caused by dissolved oxygen limitation as was suggested by k_{La} results. Also, the dissolved oxygen concentration was measured continually during degradation experiments and was 3.3, 4.1 and 4.3 mg·l⁻¹ for air flow rates 2.5, 5 and 10 l·min⁻¹, respectively. The incomplete removal of the pollutants must have been caused by some other effect, most likely either by mass transfer limitation, biodegradation kinetics limitation, substrate competition, or absence of suitable degrading microorganism³.

Despite overall low removal efficiency, two of the compounds (ethyl acetate and propionic acid) were removed almost completely from the waste air stream for all air flow rates (Fig. 4). Although at air flow rate 10 l·min⁻¹, a slight decrease of RE was observed, which was more pronounced for ethyl acetate. This decrease is likely connected with mass transfer limitation at high air flow rate (low EBRT = 15 s), see the difference in K_H for ethyl acetate and propionic acid (Table I).

It is the other four pollutants (acetone, DMS, triethylamine, and α -pinene), whose biodegradation was hindered rather severely. In case of triethylamine and DMS, it is likely, that their removal was limited by biodegradation kinetics, this assumption is based on similarity of their Henry law constants with ethyl acetate (Table I), which was degraded. Moreover successful DMS removal requires specific microbial degraders, which might not have been present in the mixed

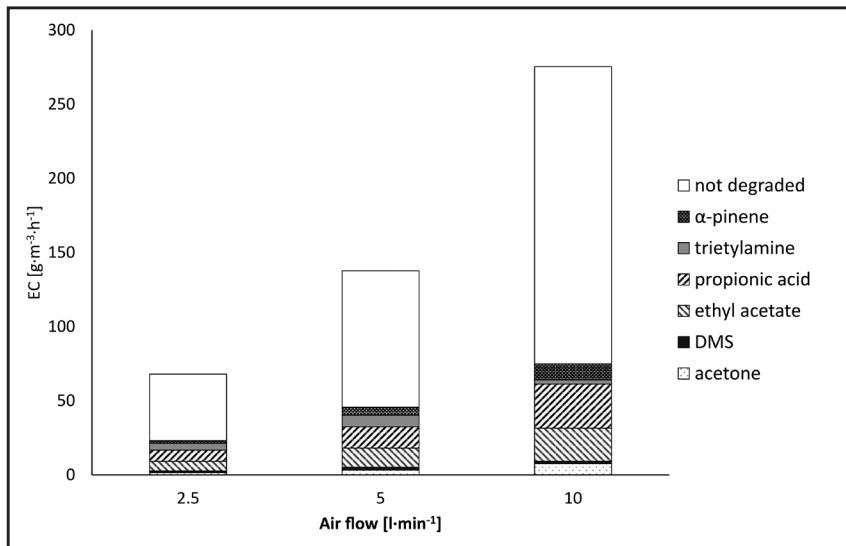


Fig. 3: Reactor performance in terms of elimination capacity for an inlet concentration of $1100 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$ and at three different air flow rates.

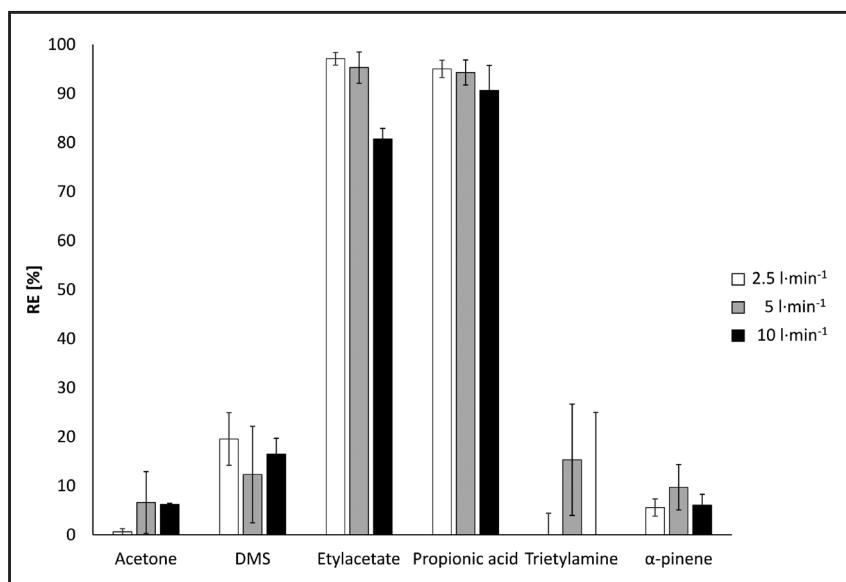


Fig. 4: Removal efficiency of individual pollutants for three different air flow rates at constant inlet concentration of $1100 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$.

culture, or their growth might have been suppressed by faster growing propionic acid and ethyl acetate degrading bacteria. A similar claim can be made about acetone. While its Henry constant is rather high, it is hydrophilic compound and miscible with water, so we can assume, that acetone was available in liquid media for biodegradation. Therefore it must have been limited by biodegradation kinetics. Literature shows, that biodegradation of α -pinene can be limited by simultaneous degradation of hydrophilic compound (methanol)¹⁵ in compost and wood chips packed biofilter, which is more suited (from mass transfer point of view) for removal of hydrophobic compounds. Based on our results,

we cannot determine the cause for low RE of α -pinene with certainty, but considering, that in our case the biodegradation took place in BCR, which is more suitable for treatment of hydrophilic compounds, we can say, that mass transfer limitation likely played some part.

These inhibitive effects became more pronounced at higher OLs. In another study¹⁴, biofiltration of pollutant mixture with similar properties (acetone, methanol, butanone, toluene, α -pinene, and naphthalene) was conducted in a combined reactor consisting from bubble column reactor and biofilter, although under mesophilic conditions, with OL ranging from $0.9 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ to $58.2 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$. At the initial OL ($0.9 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$), the RE of all the compounds except for α -pinene (84 %) was close to 100 %, but when the OL was raised to the final value ($58.2 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$), only methanol was degraded completely in the bubble column reactor. These findings correlate with our results, considering, that OL used in our study was even higher.

Conclusion

Our data show that the reactor was able to remove propionic acid and ethyl acetate from the air stream almost completely, regardless of current operational conditions (air flow, inlet pollutant concentration). The removal efficiency of the other compounds was limited and typically ranged from 5 to 20 % during experiments. This limitation was not caused by oxygen starvation, but rather by the mutual inhibitory relationship between individual compounds

during their simultaneous biodegradation. Mass transfer limitation may also have played some part, especially in case of more hydrophobic compounds like α -pinene, but considering the similarity in Henry law constant between ethyl acetate and triethylamine, we believe, that the mutual inhibition was the main cause for the limitation. Although the bubble column reactor was not sufficient for treatment of air with used pollutant composition, the fact, that it was able to practically remove two compounds from the complex mixture, gives it a potential to be used as a first step of a combined reactor, where two or more reactors can be connected in series for complete removal of VOCs.

References

- Montes M, Rene ER, Veiga MC and Kennes C: *Chemosphere* 93, 2914 (2013).
- Montes M, Veiga MC and Kennes C: *Environ. Technol.* 35, 2466 (2014).
- Ferdowski M, Ramirez AA, Jones JP and Heitz M: *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 119, 336 (2017).
- Halecky M, Rousova J, Paca J, Kozliak E, Seames W and Jones K: *J. Air Waste Manage. Assoc.* 65, 133 (2015).
- Halecky M, Paca J, Kozliak E and Jones K: *J. Environ. Sci. Health Part A-Toxic/Hazard. Subst. Environ. Eng.* 51, 669 (2016).

References (continuation)

6. Vanek T, Silva A, Halecky M, Paca J, Ruzickova I, Kozliak E and Jones K: *J. Environ. Sci. Health Part A-Toxic/Hazard. Subst. Environ. Eng.* 52, 905 (2017).
7. Leonard C, Ferrasse JH, Boutin O, Lefevre S and Viand A: *Chem. Eng. Res. Des.* 100, 391 (2015).
8. Jin HB, Yang SH, He GX, Liu DL, Tong ZM and Zhu JH: *Chin. J. Chem. Eng.* 22, 955 (2014).
9. Yang WG, Wang JF and Jin Y: *Chem. Eng. Technol.* 24, 651 (2001).
10. Garde S, Garcia AE, Pratt LR and Hummer G: *Bioophys. Chem.* 78, 21 (1999).
11. Jin HB, Liu DL, Yang SH, He GX, Guo ZW and Tong ZM: *Chem. Eng. Technol.* 27, 1267 (2004).
12. Hashemi S, Macchi A and Servio P: *Chem. Eng. Sci.* 64, 3709 (2009).
13. Hofmeier U, Yaminsky VV and Christenson HK: *J. Colloid Interface Sci.* 174, 199 (1995).
14. Manninen MR, Niemi BA and Kleinheinz GT: *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 45, 1 (2003).
15. Mohseni M and Allen DG: *Chem. Eng. Sci.* 55, 1545 (2000).

Summary

Chalupa J., Halecký M.: Thermophilic biofiltration of complex VOC mixture in bubble column reactor

Although thermophilic biofiltration is thought to have potential technological advantages over the mesophilic process for hot waste air treatment, little has been reported on the thermophilic biofiltration of complex hydrophilic/hydrophobic VOC mixtures using a bubble column reactor. Therefore, we investigated the biodegradation of a complex VOC mixture in a reactor inoculated with a mixed thermophilic culture at 55 °C. The mixture, based on the compostation waste air composition, contained acetone, dimethyl sulfide (DMS), ethyl acetate, propionic acid, triethylamine, and α-pinene. Initial experiments focused on the effect of elevated temperature and air flow rate on the oxygen mass transfer from polluted air to liquid media. While the oxygen solubility in the media decreased with rising temperature, volumetric mass transfer coefficient increased. Within the range of tested air flow rates, the overall oxygen mass transfer rate was not affected by the temperature change. Subsequently, the reactor was inoculated with mixed thermophilic culture, after successful start-up period the organic load of the pollutant mixture ranged from 61.5 to 292.3 g·m⁻³·h⁻¹. During reactor operation, only propionic acid and ethyl acetate were degraded completely, but the degradation of the other components was limited. We show that this limitation was not related to the dissolved oxygen concentration. Our results suggest that a thermophilic bubble column reactor has some potential for use in the treatment of waste air with this composition.

Keywords: Thermophilic biofiltration, VOC mixture, Bubble column reactor, Mass transfer

Souhrn

Chalupa J., Halecký M.: Termofilní biofiltrace komplexní směsi VOC v probublávaném reaktoru

Ačkoli termofilní biofiltrace má potenciální technologické výhody oproti mesofilnímu procesu pro čištění horkých odpadních plynů, relativně málo publikací bylo zaměřeno na termofilní biofiltrace komplexních směsí hydrofilních/hydrofobních polutantů v probublávaném reaktoru. Z toho důvodu jsme se zaměřili na biofiltrace komplexní směsi VOC v reaktoru inkulovaném směsnou termofilní kulturou při 55 °C. Směs polutantů, založená na složení odpadních plynů z kompostování, obsahovala aceton, dimetyl sulfid, etylacetát, propionovou kyselinu, triethylamin a α-pinenu. Počáteční experimenty byly zaměřeny na vliv teploty a průtoku plynu na přestup kyslíku ze znečištěného vzduchu do kapalného média. Zatímco rozpustnost kyslíku v médiu klesala a objemový koeficient přestupu hmoty vzrůstal, celkový tok kyslíku do média nebyl v rozmezí studovaných podmínek zvýšením teploty ovlivněn. Následně byl reaktor inkulován směsnou termofilní kulturou. Po úspěšné startovní periodě se organická zátěž v průběhu experimentu pohybovala v rozmezí 61,5–292,3 g·m⁻³·h⁻¹. Během provozu reaktoru byly kompletně degradovány pouze kyselina propionová a etylacetát. Degradace ostatních polutantů probíhala pouze omezeně, nicméně bylo zjištěno, že tato omezená degradace nesouvisejí s limitací kyslíkem. Naše výsledky naznačují, že využití termofilního probublávaného reaktoru má jistý potenciál pro čištění odpadního plynu tohoto složení.

Klíčová slova: Termofilní biofiltrace, Směs VOC, Probublávaný reaktor, Přestup hmoty

NON-THERMAL PLASMA IN COMBINATION WITH ANTIBIOTICS INTERFERING WITH *Pseudomonas aeruginosa* QUORUM SENSING SYSTEM

Martina Paldrychová¹, Vladimír Scholtz², Eva Vaňková¹, Jan Masák¹

¹Department of Biotechnology, UCT Prague, ²Department of Physics and Measurements, UCT Prague;
paldrycm@vscht.cz

Introduction

Biofilm-growing bacterial cells might develop an antibiotics-resistant phenotype and express properties different from their planktonic counterparts. The biofilm architecture and structure of exopolysaccharides in the matrix could support this resistance¹. Strains of *Pseudomonas aeruginosa* also have other defense mechanisms, such as a lowly permeable outer membrane, expression of membrane efflux pumps or the inducible β-lactamase^{2,3}. Therefore, the therapeutic options are very limited. The development of new antibiotics may not be able to effectively combat this resistance. Antibiotic resistance may better be solved by innovative combinations of biologically inspired molecules

(e.g. quorum sensing inhibitors)⁴. Quorum sensing inhibitors are substances that interfere with the cell to cell communication in a certain way, consequently, their application leads to the suppression of virulence, which is manifested, e.g. as the reduced ability of microorganisms to form biofilm⁵. *P. aeruginosa* biofilms are easily eradicated by antibiotic tobramycin when they are pre-treated with quorum sensing inhibitors such as garlic extract, patulin or penicillic acid⁶. Cell to cell communication of *P. aeruginosa*, which is mainly mediated by N-acyl-homoserine lactones (AHL), can also be disrupted by non-thermal plasma (NTP) treatment. UPLC-MS analysis confirmed the degradation of AHL molecules and their conversion into inactive intermediates by NTP conducted using the plasma

source operating with the flow of a mixture of helium and oxygen⁷. (NTP is defined as partially ionized gas composed of active particles, e.g. photons, electrons, ions, free radicals or molecules⁸). Matthers et al. demonstrated that NTP treatment of *P. aeruginosa* biofilms was at least as effective as the treatment with chlorhexidine or even better depending on the bacterial strain and the exposure time⁹. The potential of NTP to reduce the virulence of *P. aeruginosa* was also described by Ziužana et al. study¹⁰. Using a combinatorial strategy – NTP together with antibiotics treatment, better anti-virulence effects are expected.

The aim of our study was to evaluate the ability of NTP generated by cometary corona with a metallic grid to interfere with the (AHL)-dependent QS system of three *P. aeruginosa* strains (ATCC 10145, DBM 3777 and ATCC 15442). *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4) biosensor was applied to detect AHL signals in *P. aeruginosa* spent culture supernatants, after the NTP treatment. Subsequent biofilm formation was evaluated by crystal violet staining. Our second aim was to determine the mutual combination of NTP with polymyxin B to enhance their anti-biofilm effect. The inhibitory effects of mutual combinations on *P. aeruginosa* QS system and its biofilm formation were investigated by the same methods.

Material and methods

Bacteria strains and culture condition

Strains of *P. aeruginosa* ATCC 10145, ATCC 15442 and biosensor strain *Agrobacterium tumefaciens* (*Rhizobium radiobacter*) NTL4 (pZLR4) ATCC BAA – 2240 were obtained from the American Type Culture Collection. *Pseudomonas aeruginosa* strain DBM 3777 was kindly provided by Department of Biochemistry and Microbiology UCT Prague. Biosensor strain was grown in AB minimal medium (before use 100 µl of 20% w/v sterile glucose solution per 100 ml and 5 mg/l of gentamicin were added to the AB medium) at 30 °C with shaking. Stock cultures were stored at -70 °C in 50 % glycerol solution. *P. aeruginosa* (strains ATCC 10145 and ATCC 15442) were grown in Luria-Bertani (LB) liquid medium at 37 °C, *P. aeruginosa* DBM 3777 at 30 °C with shaking.

Polymyxin B solution and composition of lysis buffer

Polymyxin B solution (1 g/l) was purchased from Sigma-Aldrich and was diluted by sterile LB medium before use. Lysis buffer for the release of the enzyme from the biosensor cells is composed of 4.351 g/l MgCl₂·6H₂O, 200 mg/l cetyltrimethylammonium bromide and 800 mg/l NaN₃ (all components were dissolved in sterile phosphate-buffered saline, pH 7.4).

Biofilm cultivation on carriers made from titanium alloy (Ti6-Al4-V) and treatment with mutual combinations of NTP and polymyxin B

For the *P. aeruginosa* biofilm cultivation (24 h), we used carriers made from titanium alloy (Ti6-Al4-V). After the removal of non-adherent cells, biofilm-growing cells on carriers were exposed to NTP treatment generated by cometary corona with a metallic grid for 30 minutes and then cultivated in fresh LB media with or

without different concentrations of polymyxin B for 24 h. *P. aeruginosa* spent culture supernatants were collected after this treatment and stored at -20 °C for a biosensor assay. To quantify the total biofilm biomass, formed on the surface of a titanium alloy (Ti6-Al4-V), crystal violet (CV) staining was applied.

Biosensor assay

We used *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4) biosensor for determination of AHLs levels in the supernatants derived from the suspension formed in the surroundings of *P. aeruginosa* biofilm during the cultivation. *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) doesn't produce its own AHLs but contains an inserted plasmid that is responsible for the expression of β-galactosidase in the presence of exogenous AHLs. This intracellular enzyme has to be, after 16 h cultivation, released from the cells by addition of lysis buffer, to cleave added X-Gal to a blue product. The amount of blue product formed according to the amount of AHLs present in the supernatants can be measured spectrophotometrically by a microtiter plate reader. The great advantage of this biosensor is its high sensitivity to a wide range of AHLs and only very small sample volumes which are required for this analysis^{11,12}. After cultivation 50 µl aliquots of standard biosensor suspension (OD_{400 nm} = 0.50 ± 0.02) in AB medium in presence of *P. aeruginosa* spent culture supernatants in polystyrene 96-well microtiter plate for 16 – 18 h, 50 µl of lysis buffer was added into each well. X-Gal (5 mg dissolved in 1 ml of DMSO mixed with 4 ml of lysis buffer) solution (50 µl) was added into each well after shaking for 90 minutes. After 60 minutes from the start of the reaction, absorbance (660 nm) was measured.

Crystal violet staining

A simple method for the detection biofilm biomass formed on carriers made from titanium alloy (Ti6-Al4-V) is the staining with crystal violet (CV) dye which was applied for this purpose. CV is a dye, which binds to negatively charged surface molecules and polysaccharides in the extracellular matrix¹³. To all carriers, crystal violet (2 ml of 0.1 % solution) was added. Carriers were, after 20 minutes of incubation at room temperature, washed three times again with sterile phosphate-buffered saline to remove unbound dye. CV was then solubilized in 96 % ethanol (2 ml), and after 10 minutes the absorbance was determined at 580 nm.

Results and discussion

The emergence of multiple-antibiotic-resistant gram-negative bacteria, frequently susceptible only to the polymyxins, caused a renewed interest in these antibiotics¹⁴. However, polymyxins are capable of inducing the putative LPS modification operon, thus increasing the resistance of *Pseudomonas* to these agents too¹⁵. Their use is also limited by nephrotoxicity¹⁴. The possibilities to improve the effect of these antibiotics are constantly being investigated. From a clinical perspective, regulation of virulence through QS-dependent mechanism provides a strategy to make pathogenic microorganisms less resistant to the host immune

system and more susceptible to antibiotics^{7,16}. In this study, we evaluated the ability of NTP to interfere with the (AHL)-dependent QS system of *P. aeruginosa* by biosensor assay. A corresponding decrease in AHL production by *P. aeruginosa* (ATCC 10145, DBM 3777 and ATCC 15442) and total biofilm biomass were observed after NTP exposure for 30 minutes compared to control (Tab. I).

Mutual combination of NTP (30 minutes) and polymyxin B (8.5 mg/l) was more effective (by 25 %) in *P. aeruginosa* ATCC 10145 QS attenuation than the use of polymyxin (8.5 mg/l) alone (Fig. 1).

However, we did not notice any significant decrease in total biofilm biomass after application of this combination (data not shown). To obtain greater inhibitory effect on the biofilm formation, longer exposure time would probably have to be used. Using NTP alone

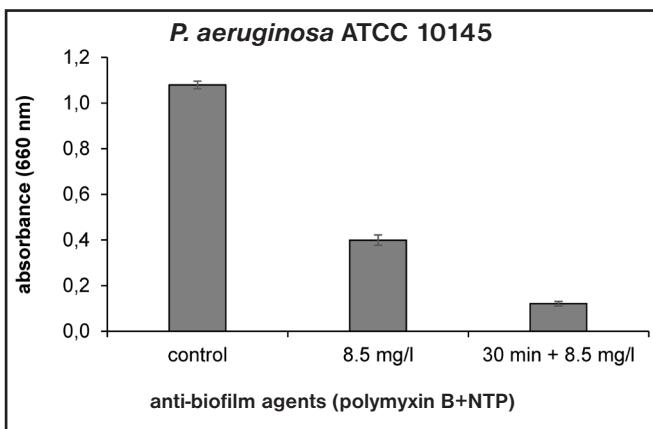


Fig. 1: Additive effect of anti-biofilm agent polymyxin B (8.5 mg/l), and the mutual combination of NTP (30 minutes) and polymyxin B (8.5 mg/l) on *P. aeruginosa* ATCC 10145 AHL levels expressed as β -galactosidase activity (660 nm).

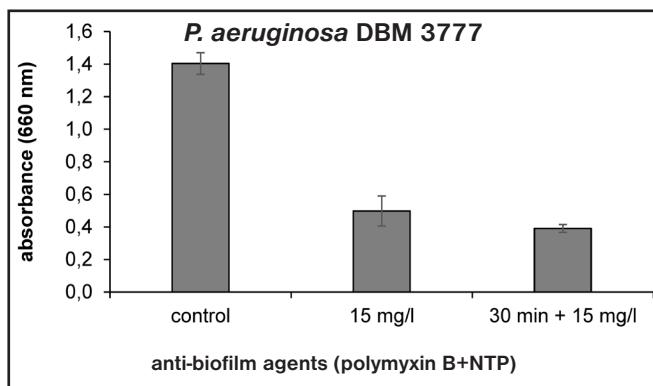


Fig. 2: Additive effect of anti-biofilm agent polymyxin B (15 mg/l), and the mutual combination of NTP (30 minutes) and polymyxin B (15 mg/l) on *P. aeruginosa* DBM 3777 AHL levels expressed as β -galactosidase activity (660 nm).

Tab. I: Change in the AHLs levels in *P. aeruginosa* (ATCC 10145, DBM 3777, ATCC 15442), expressed as the reduced production of β -galactosidase by the biosensor and inhibition of total biofilm biomass (stained with CV) after NTP treatment (30 min.) compared to control (100 %)

strains	AHL level decrease (%)	inhibition of total biofilm biomass (%)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145	8.79 \pm 4.72	56.79 \pm 4.30
<i>P. aeruginosa</i> DBM 3777	12.65 \pm 4.66	38.47 \pm 9.46
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	23.53 \pm 7.62	61.42 \pm 6.63

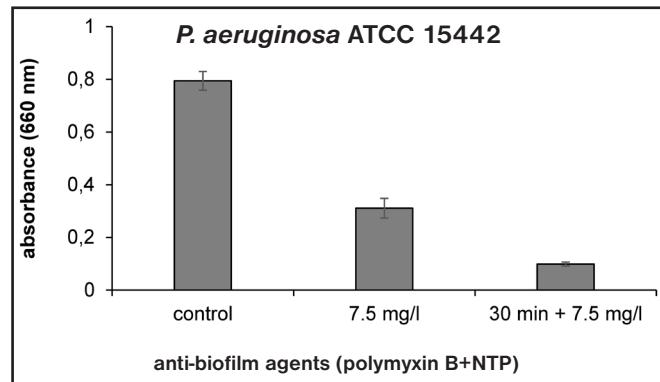


Fig. 3: Additive effect of anti-biofilm agent polymyxin B (7.5 mg/l), and the mutual combination of NTP (30 minutes) and polymyxin B (7.5 mg/l) on *P. aeruginosa* ATCC 15442 AHL levels expressed as β -galactosidase activity (660 nm).

(for 30 minutes) reduced the amount of AHL insignificantly (Tab. I).

Additive effects of NTP (30 min) and polymyxin were also observed in *P. aeruginosa* DBM 3777 and ATCC 15442 (Fig. 2 and 3).

Total biofilm biomass was decreased in *P. aeruginosa* DBM 3777 and ATCC 15442 by a combination of NTP (30 min) and polymyxin (15 mg/l or 7.5 mg/l) by more than 30 % compared to the use of polymyxin B in these concentrations alone (data not shown). Loss of AHL-dependent signaling in *P. aeruginosa* strains after NTP application enhances the anti-biofilm effect of polymyxin B. In the future, this approach could help us to reduce polymyxin dosing and this antibiotic that is problematic to use could be applied for treatment of infections more widely.

Conclusions

Diseases caused by *P. aeruginosa* are connected with the expression of several virulence factors¹⁷. We proved that NTP significantly affected (AHL)-QS systems, which control the biofilm formation of *P. aeruginosa* strains used in this study. The mutual combination of NTP with polymyxin B is more effective than the use of these anti-biofilm agents alone. The use of effective combination therapies is necessary to eradicate biofilm-growing bacteria. Alternative therapeutic strategies, such as quorum-sensing inhibitors or "biofilm disruptors" should help to fight biofilm-related infections in combination with antibiotics.

Acknowledgment

Financial support from specific university research (MSMT No 20-SVV/2017).

References

1. Mah TFC, O'Toole GA: *Trends Microbiol.* 9, 34 (2001).
2. Livermore DM: *Clin. Infect. DiS.* 34, 634 (2002).
3. Gellatly SL, Hancock RE: *Pathog., DiS.* 67, 159 (2013).
4. Brooks BD, Brooks AE: *Adv. Drug Delivery Rev.* 78, 14 (2014).
5. Rasmussen TB, Givskov M: *Int. J. Med. Microbiol.* 296, 149 (2006).
6. Rasmussen TB, Bjarnsholt T, Skindersoe ME, et al.: *J. Bacteriol.* 187, 1799 (2005).
7. Flynn PB, Busetti A, Wielogorska E, et al.: *Scientific reports* 6 (2016).
8. Alkawareek MY, Gorman SP, Graham WG, et al.: *Int. J. Antimicrob. Agents* 43, 154 (2014).
9. Matthes R, Koban I, Bender C, et al.: *Plasma Processes Polym.* 10, 161 (2013).
10. Ziuzina D, Boehm D, Patil S, et al.: *PloS one* 10 (2015).
11. Steindler L, Venturi V: *FEMS Microbiol. Lett.* 266, 1 (2007).
12. Singh MP, Greenstein M: *J. Microbiol. Methods* 65, 32 (2006).
13. Peeters E, Nelis HJ, Coenye T: *J. Microbiol. Methods* 72, 157 (2008).
14. Onderkirk JP, Nord JA, Turett GS, et al.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 2659 (2003).
15. McPhee JB, Lewenza S, Hancock RE: *Mol. Microbiol.* 50, 205 (2003).
16. Bjarnsholt T, Givskov M: *Philos. Trans. R. Soc., B* 362, 1213 (2007).
17. Pearson JP, Feldman M, Iglesias BH, et al.: *Infect. Immun.* 68, 4331 (2000).

Summary

Paldrychová M., Scholtz V., Kvasničková E., Masák J.: Non-thermal plasma in combination with antibiotics interfering with *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing system

During the infection process, human opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* uses quorum sensing system (QS) to coordinate the behavior of the whole microbial population. QS is mainly mediated by N-acyl-homoserine lactones (AHLs). Subsequent detection of these signal molecules by cells causes changes in virulence factors expression such as biofilm formation. Because biofilm formation plays an important role in nosocomial infection and antibiotic resistance, tools which are able to interfere with QS are required.

In the current study, we evaluated the ability of non-thermal plasma (NTP) to interfere with the QS system of *P. aeruginosa*. Our second aim was to determine the mutual combination of antibiotics to support their anti-biofilm effect. We applied *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4) biosensor to detect signal molecules, from spent bacterial culture supernatants, after the treatment. *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) does not produce its own AHLs, but the reporter gene is induced when exogenous signal molecules are present. Induction of reporter gene leads to the production of β-galactosidase, which can be measured spectrophotometrically by X-Gal usage. This method demonstrated that combined treatment with NTP and polymyxin has an additive effect in *P. aeruginosa* QS attenuation and associated biofilm formation. Mutual combination of polymyxin (7.5 mg/l) with NTP (30 minutes) was by 30 % more effective in *P. aeruginosa* ATCC 15442 QS attenuation than the use of polymyxin (7.5 mg/l) alone.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, quorum sensing, N-acyl-homoserine lactone, non-thermal plasma, combinatorial strategies

Souhrn

Paldrychová M., Scholtz V., Kvasničková E., Masák J.: Netermální plazma v kombinaci s antibiotiky interferuje s quorum sensing systémem *Pseudomonas aeruginosa*

Během infekčního procesu využívá lidský oportunní patogen *Pseudomonas aeruginosa* systémy quorum sensing (QS) ke koordinaci chování celé mikrobiální populace. Systém QS je zpravidla zprostředkován N-acyl-homoserinovými laktony (AHLs). Následná detekce těchto signálních molekul buňkami způsobuje změny v expresi genů kódujících faktory virulence, jako je např. tvorba biofilmu. Tvorba biofilmu hraje důležitou roli během vzniku nosokomiálních infekcí a při rezistenci bakterií vůči antibiotikům, proto je nutné vyvijet takové postupy a nástroje, které umožní interferenci s QS systémy.

Tato práce se zabývá schopností netermálního plazmatu (NTP) zasahovat do QS systému *P. aeruginosa*. Druhým cílem bylo stanovení takové koncentrace antibiotika, která podpoří jejich společný anti-biofilmový účinek. K detekci signálních molekul v supernatantech bakterií, po aplikaci NTP, byl použit biosenzor *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4). *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) neprodukuje vlastní AHL, ale v přítomnosti exogenních signálních molekul u něj dochází k indukci exprese reportérového genu (kódujícího enzym β-galaktosidasu). Produkce β-galaktosidasy může být měřena spektrofotometricky za použití X-Gal. Pomocí této metody jsme prokázali, že kombinace NTP a polymyxinu vykazuje aditivní účinek při QS atenuaci a eradikaci vzniklého biofilmu. Vzájemná kombinace polymyxinu (7,5 mg/l) a NTP (30 minut) byla o 30 % účinnější během atenuace QS systému bakterie *P. aeruginosa* ATCC 15442 než použití samotného polymyxinu (7,5 mg/l).

Klíčová slova: *Pseudomonas aeruginosa*, quorum sensing, N-acyl-homoserinový laktón, netermální plazma, kombinatorické strategie

ANTIMIKROBIALNÍ PEPTIDY: NADĚJNÁ ZBRAŇ V BOJI PROTI ANTIBIOTICKÉ REZISTENCI

Ondřej Nešuta, Václav Čeřovský

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v. v. i., skupina Antimikrobiální peptidy; ondrej.nesuta@uochb.cas.cz

Úvod

Celosvětově rostoucí výskyt rezistence patogenních mikroorganismů k běžně používaným antibiotikům a chemoterapeutikům vyžaduje stále naléhavěji výzkum a vývoj nových látek s antimikrobiálními účinky¹. Jednou z intenzivně studovaných skupin látek jsou právě antimikrobiální peptidy (AMP). AMP vykazují ší-

roké spektrum účinku zahrnující Gram-pozitivní, Gram-negativní baktérie i patogenní houby včetně multi-resistantních kmenů, stejně jako obalené viry, prvoky, parazity a rakovinné buňky²⁻⁵.

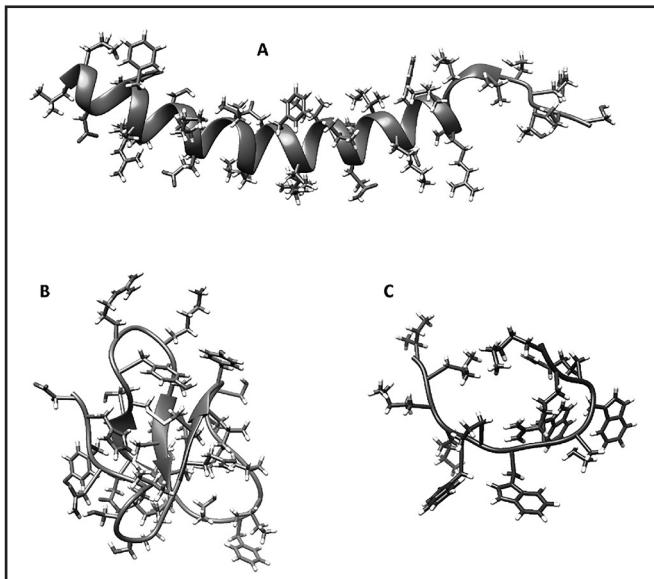
Prvními studovanými AMP byla patrně skupina cecropinů izolovaných z hemolymfy kukel hedvábné můry *Hyalophora cecropia* počátkem 80. let 20. století^{6,7}.

Od té doby byly AMP popsány téměř ve všech formách života od prokaryot přes rostliny a živočichy až k člověku^{2,8-12}. Z jejich hojného výskytu a funkčních podobností napříč širokým spektrem organismů lze usuzovat, že jde o velice starou, evolučně zachovalou, složku imunitního systému¹³.

Jejich přesný mechanismus účinku není dosud znám. Nicméně dosud navržené molekulární modely naznačují, že působí způsobem do takové míry jedinečným, že by v léčbě mikrobiálních infekcí mohly jednou nahradit současná léčiva, která již v mnoha případech svou účinnost ztratila nebo alespoň rozšířit jejich repertoár.

Struktura a fyzikálně chemické vlastnosti AMP

Kategorizace AMP byly z počátku velice různorodé a nejednotné, jako třeba dělení na základě jejich původu, nebo dělení na lineární a cyklické peptidy. Nakonec se ustálilo dělení AMP podle jejich sekundární struktury, a to do 3 základních skupin (Obr. 1)¹⁴⁻¹⁶: 1) lineární α -helikální peptidy; 2) cyklické peptidy obsahující β -struktury a intramolekulární disulfidové můstky a 3) peptidy s neusporeádanou sekundární strukturou a vyšším obsahem jedné nebo více aminokyselin, např. Arg, Gly, His, Pro nebo Trp.



Obr. 1: Dělení AMP podle sekundární struktury do tří základních skupin. A – lineární α -helikální peptidy, zde lidský kathericidin LL-37 [Protein Data Bank (PDB) ID: 2K6O]¹⁸; B – cyklické peptidy obsahující motiv β -skládaného listu a disulfidové můstky, zde lidský beta defensin HBD-1 (PDB ID: 1KJ5)²³; C – neusporeádané peptidy, zde indolicidin bohatý na Trp (PDB ID: 1QXQ)²⁸.

První skupina, která je zároveň největší a nejprostudovalenější, zahrnuje peptidy, které za určitých podmínek vytvářejí v prostoru amfipatický α -helix nezbytný pro jejich antimikrobiální účinek. Mnohé z nich jsou na C-koncovém karboxylu amidované. Mezi typické zástupce patří např. výše zmíněné cecropiny⁷, magainin z kůže žáby drápatky *Xenopus laevis*¹⁷, lidský kathericidin LL-37 produkovaný neutrofily (Obr. 1 A)¹⁸, nebo některé AMP izolované z jedu hmyzu řádu blanokřídlých (Hymenoptera)¹⁹⁻²².

Do druhé skupiny patří AMP s více cysteinami, které tvoří intramolekulární disulfidové můstky. Jejich molekuly mají ve své sekundární struktuře výrazně stabilní β -motivy, ale mohou obsahovat i α -helikální úseky. To vše je navzájem propojené ohyby a smyčkami jako dalšími strukturálními elementy. Nejvýznamnějšími zástupci této skupiny jsou defensiny.

Jak název napovídá, defensiny jsou hlavními AMP imunitního systému eukaryotních organismů včetně člověka. Jde o peptidy obsahující motivy β -listu stabilizované třemi a více disulfidovými vazbami. Na základě různého rozložení těchto můstek rozlišujeme pět typů defensinů. α -, β - a θ -defensiny produkuji obratlovci, zbyvající dva typy hmyz a rostliny. α -defensiny obsahují 29-35 aminokyselin a u lidí jsou produkovaný neutrofily (Human Neutrophile Peptides, HNP-1 – HNP-4) a Panethovými buňkami tenkého střeva (Human Defensine, HD5 a 6)¹⁴. β -defensiny jsou delší, byly nalezeny v hovězích neutrofilech a lidských epiteliaálních buňkách (Human Beta Defensines, HBD1 – HBD4) (Obr. 1 B)²³. θ -defensiny, specifické svou cyklickou strukturou vzniklou propojením N- a C-konce peptidového řetězce jedním z disulfidových můstek, jsou zatím známy jen tři pocházející z opic²⁴. Savčí defensiny obecně vykazují široké spektrum antimikrobiálních účinků zahrnující Gram-pozitivní i Gram-negativní baktérie, patogenní houby i některé obalené viry. Byly u nich popsány také chemotaktické účinky a schopnost ovlivnění zánětu pomocí regulace produkce cytokinů a adhezivních molekul¹³. Ve vyšších koncentracích pak byla také pozorována jejich cytotoxická aktivita²⁵.

Hmyzí defensiny jsou převážně aktivní vůči Gram-positivním baktériím a patogenním houbám a ve svých molekulách často mají vedle β -struktur také α -helikální úseky¹². Příkladem je třeba lucifensin, hmyzí defensin objevený v hemolymfě a slinách larev *Lucilia sericata* využívaných k tzv. larvální terapii^{12,26}. Také rostlinné defensiny obsahují kombinaci α - i β -motivů a pro vysoký obsah cysteinových zbytků (tvoří až 4 disulfidové můstky) jsou někdy nazývány thioniny²⁴.

Zástupci skupiny AMP bohatých na jednu aminokyselinu jsou často bez definované sekundární struktury. Patří mezi ně např. indolicidin, peptid s vysokým obsahem tryptofanu izolovaný z hovězích neutrofilů (Obr. 1 C)^{27,28} nebo antifungálně působící histatinu nacházející se v lidských slinách a bohaté na aminokyselinu histidin²⁹.

Výše uvedené dělení není zcela definitivní, někteří autori se přiklánějí i k jiným způsobům dělení. Např. Cézard a kol. (2011) ve svém přehledu uvádí čtyři skupiny: α -helikální peptidy, peptidy obsahující β -motiv stabilizovaný jedním nebo více disulfidovými můstky, peptidy bohaté na prolín a arginin tvořící smyčky a lineární neusporeádané peptidy s vyšším obsahem jedné nebo více aminokyselin²⁴.

AMP nejčastěji obsahují 10 – 50 aminokyselin. Jako u většiny biologicky aktívnych molekul se účinek AMP přímo odvíjí od jejich struktury. AMP primárně působí na povrchu buněk patogenů, konkrétně na membránách, jejichž základem je dvojvrstva tvořená amfipatickými fosfolipidy. Mezi nejdůležitější fyzikálně-chemické vlastnosti, které přímo ovlivňují biologické účinky AMP, patří celkový náboj, hydrofobicita a amfipaticita jejich molekul.

Celkový náboj je dán typem a zastoupením polárních nabitéch aminokyselin (Arg, Lys, His, Asp a Glu) v primární sekvenci peptidu. Podle celkového náboje můžeme AMP dělit na kationické a anionické, kdy pouze kationické AMP mají prakticky významnou antimikrobiální aktivitu. To je dáno tím, že v první kroku jejich působení hraje významnou roli elektrostatická interakce kladně nabité molekuly peptidu se záporně nabitém povrchem bakteriálních buněk (viz dále).

Celkovou (střední) hydrofobicitu (H) určuje poměr hydrofilních a hydrofobních aminokyselin v řetězci a její hodnota určuje, zda a do jaké míry bude AMP v kontaktu s vnitřní lipofilní částí buněčné membrány. Z toho vyplývá, že hydrofobicita AMP nemá vliv pouze na jejich antimikrobiální aktivitu, ale též ovlivňuje jejich toxicitu vůči eukaryotním buňkám^{4,12,13,16,30}.

Existuje také vektorová veličina zvaná hydrofobní moment (μ_H). Ta určuje vzájemné prostorové rozložení hydrofilních a hydrofobních postranních řetězců jednotlivých aminokyselin v sekvenci, a tudíž je závislá na sekundární struktuře daného peptidu¹⁶. Lze tedy říct, že hydrofobní moment (μ_H) vystihuje míru amfipaticity molekuly AMP. Amfipatická molekula má takovou konformaci, kde je možno jasně rozlišit oddělené hydrofobní a hydrofilní (polární) oblasti. Amfipaticitu můžeme pozorovat na různých úrovních. U primární amfipaticity jde o střídání segmentů polypeptidového řetězce tvořených nepolárními aminokyselinami s úseky obsahující polární aminokyseliny⁴. Sekundární amfipaticita se v případě α -helikálních peptidů projevuje uspořádáním postranní řetězců hydrofobních aminokyselin na jednu a hydrofilních aminokyselin na opačnou stranu podél dlouhé osy α -helixu (Obr. 2 A). Jiný druh sekundární amfipaticity mají některé cyklické AMP, u kterých díky propojení disulfidovými můstky dochází k přiblížení jinak vzdálených kationických aminokyselin. Výsledkem je vytvoření lokalizovaných oblastí s pozitivním nábojem na povrchu molekuly, jako např. u molekuly la-sioepsinu³¹. Amfipaticitu na terciální úrovni můžeme pozorovat u některých defensinů obsahujících β -motiv,

které se shlukují do oligomerů a vytváří tak segregované hydrofobní a hydrofilní povrhy (Obr. 2 B)^{4,13,32}.

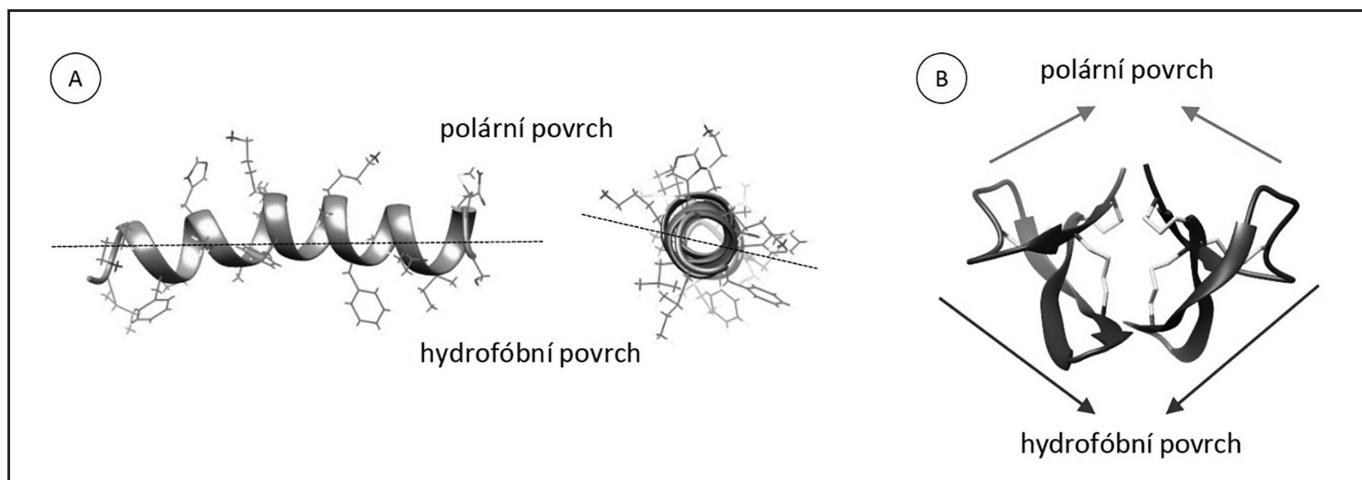
Všechny tyto vlastnosti, v kontextu s rozdílným složením povrchových struktur prokaryotních a eukaryotních buněk diskutovaným dále, mají významný vliv na aktivitu a selektivitu peptidů.

Podstatné rozdíly ve složení povrchových struktur bakteriální a eukaryotní buňky

Kationické AMP jsou selektivní, tzn., že přednostně napadají prokaryotní buňky patogenních baktérií, zatímco eukaryotní buňky hostitele zůstanou nepoškozené. Jejich selektivita je dána především rozdílným složením membrán těchto dvou typů buněk. Zatímco baktérie do svých membrán často zabudovávají fosfatidylglycerol, fosfatidylserin a kardiolipin – fosfolipidy s celkovým záporným nábojem, eukaryotické membrány obsahují hlavně zwitterionický fosfatidylcholin a fosfatidyletanolamin. Eukaryotní membrány navíc obsahují také steroly, které je stabilizují. Bakteriální buňky mají na svém povrchu i další útvary, které také přispívají k jeho celkově zápornému charakteru.

Cytoplazmatická membrána (CM) Gram-positivních baktérií je z vnější strany chráněna buněčnou stěnou. Ta je tvořena peptidoglykanem – polysacharidem složeným z N-acetylglukosaminu a N-acetylmurámové kyseliny, které jsou navzájem zasíťovány pomocí peptidových můstků. Peptidoglykanová vrstva je dále bohatě protkána kyselinami teichoovou a lipoteichoovou. Kyselina lipoteichoová navíc ukotvuje peptidoglykan do vnějšího listu CM. Právě kyseliny teichoová a lipoteichoová spolu s karboxylovými skupinami aminokyselin přítomnými na povrchu peptidoglykanu obsahují negativně nabité skupiny zodpovědné za jeho celkový záporný náboj³³.

U Gram-negativních bakterií je peptidoglykanová vrstva několikanásobně tenčí a z vnější strany je kryta další fosfolipidovou dvojvrstvou – vnější membránou (VM). VM je svým složením asymetrická a její vnější list



Obr. 2: Příklady amfipaticity AMP. Příklad sekundární amfipaticity je znázorněn na molekule přírodního AMP magaininu izolovaného z kůže žab *Xenopus laevis*¹⁷. Na struktuře α -helixu je patrné rozložení postranních řetězců polárních a hydrofobních aminokyselin vytvářející tak oddělené povrhy molekuly s různými fyzikálními vlastnostmi (A). Defensin HNP-3 objevený v lidských neutrofilech obsahuje tři antiparalelní β -skládané listy stabilizované třemi disulfidickými můstky. Monometry pak spolu tvoří pomocí intermolekulárních vodíkových můstek dimer ve tvaru koše s hydrofobní základnou a polární částí vrchní částí, zahrnující oba konec monomerů³². HNP-3 je příkladem terciální amfipaticity (B).

obsahuje složitou antigenní strukturu zvanou lipopolysacharid (LPS). LPS má tři základní části: lipid A, tvořený dvěma fosforylovanými jednotkami glukosaminu, které jsou pomocí zbytků mastných kyselin uktoveny ve vnějším listu VM; „core“ oligosacharid a O-antigen – variabilní řetězec různých cukerných zbytků³⁴. Fosfátové skupiny lipidu A se významným způsobem podílejí na negativním náboji povrchu Gram-negativních bakterií a stávají se hlavními atraktanty pro kationické AMP^{11,33,35}.

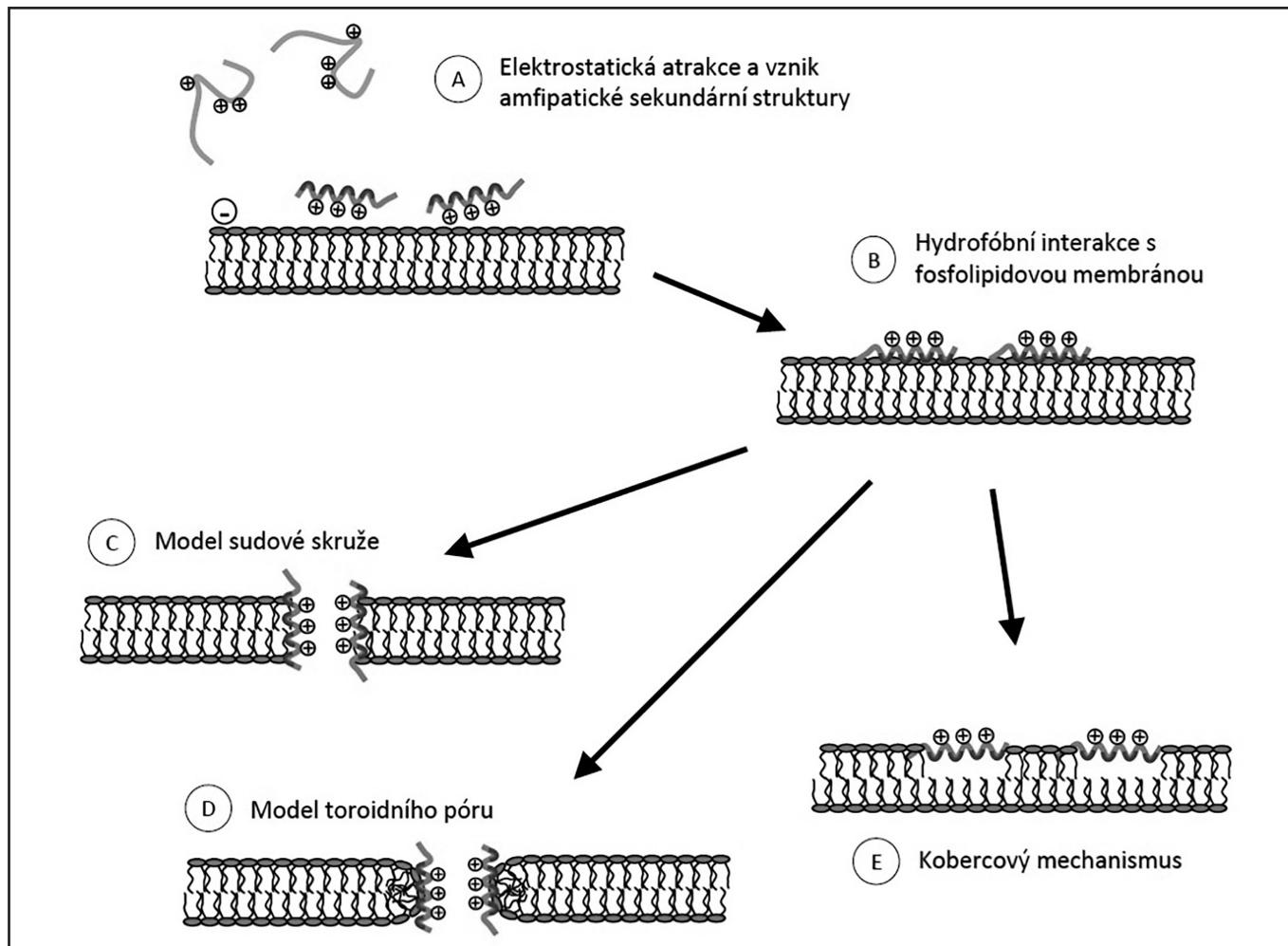
Modely mechanismu účinku kationických AMP

Jak už bylo zmíněno v úvodu, přesný a jednotný mechanismus účinku AMP není dosud znám, a vzhledem k různorodosti AMP nemůže být principiálně ani jednoznačně definován. Nicméně na základě různých studií vybraných AMP byly popsány některé jevy doprovázející celý proces jejich působení. Samotný průběh je možno rozdělit na několik fází: i) elektrostatická interakce peptidu s povrchem mikrobiální buňky; ii) kontakt

s fosfolipidovou membránou a její narušení, a iii) nevratné změny vedoucí k zániku napadené buňky²⁴.

V první fázi dochází k elektrostatickému přitahování kladně nabitého molekul AMP k záporně nabitému povrchu baktérií (Obr. 3 A)³³. Konkrétně jde o interakci s kyselinou teichoovou, kyselinou lipoteichoovou a s karboxylovými skupinami aminokyselin na povrchu peptidoglykanu Gram-pozitivních nebo s LPS Gram-negativních bakterií. To umožňuje AMP průnik přes tyto vnější vrstvy do prostoru cytoplazmatické membrány⁴.

V další fázi AMP v její přítomnosti, případně v přítomnosti LPS³⁵ nebo peptidoglykanu⁴, zaujmají svou sekundární strukturu a uplatňuje se výše zmíněná amfipaticita molekuly. Amfipatická konformace peptidů umožňuje zanoření lipofilní části molekul do hydrofobního prostoru membránové dvojvrstvy, kdežto polární postranní řetězce zůstávají v kontaktu s hydrofilními hlavičkami fosfolipidů (Obr. 3 B). Toto v důsledku vede ke tvorbě pórů nebo ztrátě integrity membrány, případně AMP prochází do cytosolu, kde interagují s intracelulárními cíli, což může vést k narušení životně důležitých pochodů v bakteriální buňce³³.



Obr. 3: Mechanismus účinku kationických AMP. Kationické peptidy s neuspořádanou sekundární strukturou v roztoku jsou elektrostaticky přitahovány k záporně nabitému povrchu bakteriální buňky. Prostředí fosfolipidové membrány u nich indukuje tvorbu sekundární amfipatické struktury (A). AMP se v povrchu membrány podélně orientují, interagují s fosfolipidovou dvojvrstvou a jejich hydrofobní postranní řetězce se zanořují do lipidové části membrány (B). Model sudové skruže („barrel stave pore model“) znázorňuje vznik vodou vyplněného póru jako důsledek agregace více AMP a jejich zanoření do membrány (C). U toroidního modelu („toroidal pore model“) AMP hydrofobními interakcemi s membránou indukuje její zakřivení, které vede ke vzniku toroidního póru (D). Principem kobercového mechanismu („carpet“, nebo také „detergent-like mechanism“) je rozestoupení fosfolipidů způsobené AMP, které tak membránu destabilizuje, což může vézt až k jejímu rozpadu na micely („micelarizace“) (E).

Za účelem detailního popisu těchto procesů bylo nařízeno několik modelů interakce AMP s membránou (Obr. 3)^{3,4,16,33}, a to především pro α -helikální peptidy.

Model sudové skruže („barrel stave pore model“ – BSPM) předpokládá, že AMP, mezi nimiž převládají hydrofobní interakce, po nasednutí na membránu vzájemně podélně interagují a agregují do větších celků. Několik peptidových řetězců pak společně prolamuji do membrány pór vyplněný vodou podobný proteinovému iontovému kanálu. Vnitřní stěny takto zformovaného póru tvoří hydrofilní části molekul peptidů (Obr. 3C).

U modelu toroidního póru („toroidal pore model“ – TPM) je princip vzniku podobný jako v případě BSPM, avšak nedochází zde k vzájemné aggregaci peptidových řetězců. Místo toho lipofilní postranní řetězce peptidů zůstanou po zanoření v úzkém kontaktu s vnitřní hydrofobní částí membrány a indukují tak její toroidní zakřivení. Stěny toroidního póru jsou tvořeny peptidovými molekulami společně s polárními hlavičkami fosfolipidů. Tímto modelem také bývá vysvětlován přestup některých AMP přes membránu, což umožní dosažení jejich intracelulárního cíle (Obr. 3D)³³.

Při uplatnění **kobercového mechanismu** („carpet mechanism“) dochází díky silným elektrostatickým interakcím s membránou k mnohonásobnému nasedání AMP na její povrch, tvorbě „koberce“ a následnému vzniku trhlin, dezintegraci až micelarizaci membrány vedoucí k rozpadu buňky. Tento mechanismus se někdy nazývá též „detergenční“ a nevznikají v jeho případě póry v pravém slova smyslu (Obr. 3E). Na kobercový model navazuje tzv. **„SHM“ model** (podle autorů Shai, Huang, Matsuzuki), který předpokládá, že utváření „koberce“ vede k rozestoupení lipidů v membráně a začlenění AMP. Následuje vznik póru s možnou desintegrací membrány a v některých případech dojde k rozpadu buňky⁴.

V literatuře bylo popsáno několik dalších modelů lišící se způsobem interakce mezi AMP a membránovými lipidy. Např. Nguyen ve své rešerši jmenuje jevy jako shlukování záporně nabitých fosfolipidů v místě působení peptidu, ztenčení nebo depolarizaci membrány aniž by byla narušena či elektroporaci membrány indukovanou přítomností peptidu¹⁵. Jak už bylo naznačeno dříve, jsou to právě typ a struktura AMP, které předurčují, jaký z mechanismů bude převládat. Např. dobře definovaná 3D konformace AMP se zdá být důležitá pro tvorbu póru BSPM mechanismem a uplatňuje se hlavně v případě toxickeho účinku AMP na eukaryotní buňky, zatímco u membrán s velkým zastoupením negativních fosfolipidů jsou dominantní elektrostatické interakce a vznikají póry toroidního typu nebo dochází ke kobercovému efektu^{16,33}. Pokud jde o α -helikální peptidy obsahující Arg a Lys v sekvenci, může dojít k jejich hlubšímu zanoření do vnitřního hydrofobního prostoru membrány, přičemž kladně nabité skupiny na koncích dlouhých postranních řetězců těchto amikyselin zůstanou v těsném kontaktu s fosfátovými skupinami polárních hlaviček fosfolipidů (tzv. „snorkelling mechanism“)⁴.

Všechny tyto modely mají ovšem jako společný předpoklad to, že primárním cílem peptidů je cytoplazma-

tická membrána jako taková a ve většině případů je konečným důsledkem narušení její integrity, ztráta intracelulárních metabolitů nebo rozvrat osmotické rovnováhy buňky což vede k jejímu zániku^{3,19,33}.

Intracelulárně působící AMP

Existuje skupina kationických AMP které sice v první řadě interagují s bakteriální membránou, nezpůsobují však její dezintegraci ani nezvyšují její propustnost, ale pouze skrze ni prochází. Samotný baktericidní efekt těchto peptidů je způsoben jejich vazbou na vnitrobuněčné funkční molekuly a/nebo narušením některé z metabolických drah³³. Konkrétně mohou ovlivňovat syntézu proteinů, buněčné stěny, aktivitu enzymů nebo interagovat s nukleovými kyselinami^{15,36}.

Např. lineární silně kationický peptid buforin II, derivát AMP buforinu I izolovaného z žaludku asijské žáby *Bufo bufo garagriozans*, prochází dovnitř buňky *E. coli* bez ovlivnění celistvosti její membrány a to i v koncentracích 5x vyšších než je minimální inhibiční koncentrace (MIC). Samotný baktericidní účinek je pravděpodobně důsledkem jeho vazby na nukleové kyseliny³⁷. Dalším takovým peptidem je výše zmíněný indolicidin, který proniká bakteriální membránou, aniž by způsobil její dezintegraci. Uvnitř buňky se díky své specifické sekvenci bohaté na tryptofan (ILPW/KWPWWPWRR-NH₂) váže na dvojvláknovou DNA, čímž ji zabraňuje účastnit se různých fyziologických dějů včetně její vlastní replikace³⁶.

Rezistence vůči AMP

Tradiční antibiotika se musí nejdříve navázat na konkrétní cílové místo – molekulu na povrchu nebo uvnitř bakteriální buňky, aby se projevil jejich účinek. Případná mutace v genech kódujících tyto cílové molekuly může pak jednoduše vést ke snížené afinitě léčiva a v důsledku pak ke zvýšené rezistenci mikroorganismu k dané látce. Na rozdíl od toho působí AMP rychle a nespecificky, spíše fyzikálním mechanismem na celém povrchu mikrobiální buňky, a proto je při jejich použití riziko vzniku rezistence nižší³. Také fakt, že až na výjimky peptidy složené z D-aminokyselin jsou stejně aktivní jako jejich all-L isomery, naznačuje, že účinek AMP nespouští v jejich stereo-selektivní interakci s receptorem³³. Ovšem i v případě AMP byly popsány mechanismy, kterými jsou mikroorganismy schopny vzdorovat jejich účinkům.

V prvé řadě je třeba zmínit, že některé bakteriální rody jako *Morganella* nebo *Serratia* jsou přirozeně méně citlivé k účinkům AMP, protože mají specifickou skladbu bakteriální membrány s nízkým obsahem záporně nabitých molekul²⁴.

Pokud jde o adaptivní rezistenci, bakterie mohou jednak modifikovat cílové struktury – peptidoglykan buněčné stěny, LPS nebo samotnou membránu, a jednak snižovat lokální koncentraci aktivního AMP. Toho mohou dosáhnout třeba účinkem efluxních pump nebo produkcí proteáz^{5,11,13,38,39}.

Kyseliny teichoová a lipoteichoová v buněčné stěně Gram-positivních baktérií mohou být modifikovány různými cukernými zbytky nebo D-alaninem, což vede

ke snížení celkového negativního náboje. V případě LPS Gram-negativních bakterií jde o sníženou fosforylací lípidu A nebo o substituci jeho fosfátových skupin molekulami kyseliny octové, 4-deoxy-4-aminoarabinosou, glicinem nebo etanolaminem, což také vede k redukci negativního náboje povrchu bakteriální buňky a tím snížené citlivosti k AMP. Ke stejnemu efektu vede změna poměru mezi záporně nabitymi a neutrálními fosfolipidy ve vnějším listu membrány⁴⁰. Stejný důsledek má též např. esterifikace fosfatidylglycerolu L-lysinem popsaná u stafylokoků³⁸. Esterifikací lipidu A kyselinou palmitovou se změní fluidita VM, která se tak stává hůře prostupnou pro AMP.

Řada patogenů produkuje proteázy, extracelulární nebo vázané na membránu, které fungují jednak jako virulentní faktor (usnadňují kolonizaci a destrukci hostitelských tkání) a prostředek pro získání živin, jednak jako mechanismus obrany proti imunitnímu systému hostitele, jehož součástí jsou právě také AMP⁴¹. Např. studium patogenních baktérií *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis* a *Streptococcus pyogenes* ukázalo, že tyto produkují proteázy schopné štěpit lidský AMP kathelicidin LL-37^{42,43}.

V neposlední řadě stojí za zmínu další virulentní faktor vyskytující se u mnoha patogenních bakterií a kvasinek, který ovlivňuje účinek antimikrobiálních látek včetně peptidů, a tím je schopnost tvorby biofilmu. Mikrobiální biofilm je struktura tvořená komunitou mikroorganismů aktivně vázaných k danému povrchu a krytých polymerní extracelulární matrix. Tato slizová vrstva poskytuje mikroorganismům ochranu proti vnějším fyzikálním, chemickým a biologickým vlivům. Hlavními složkami matrix biofilmu jsou polysacharydy, extracelulární DNA a bílkoviny a všechny tyto makromolekuly mohou za určitých podmínek vázat kationické AMP. Např. alginát, produkovaný *P. aeruginosa* při tvorbě biofilmu, zachycuje AMP a tím brání jejich

Literatura

1. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>, staženo 29. 3. 2016
2. Manzo G, Casu M, Rinaldi A, et al.: *J. Nat. Prod.* 77, 2410 (2014).
3. Wimley WC, Hirstova K: *J. Membr. Biol.* 239, 27 (2011).
4. Dennison SR, Wallace J, Harris F, et al.: *Protein Pept. Lett.* 12, 31 (2005).
5. Guilhelmelli F, Vilela N, Albuquerque P, et al.: *Front. Microbiol.* 4, 1 (2013).
6. Hultmark D, Steiner H, Ramunson T, et al.: *Eur. J. Biochem.* 106, 7 (1980).
7. Hultmark D, Engström Å, Bennich H, et al.: *Eur. J. Biochem.* 127, 207 (1982).
8. Pütstep K, Brändén C-I, Boman HG, et al.: *Nature* 398, 671 (1999).
9. Mello EO, Ribeiro FF, Carvalho AO, et al.: *Curr. Microbiol.* 62, 1209 (2011).
10. Gudmundsson GH, Agerberth B, Odeberg J, et al.: *Eur. J. Biochem.* 238, 325 (1996).
11. Devine AD: *Mol. Immunol.* 40, 431 (2003).
12. Čeřovský V, Bém R: *Pharmaceuticals* 7, 251 (2014).
13. Raj PA, Dentino AR: *FEMS Microbiol. Lett.* 206, 9 (2002).
14. Neubauerová T, Macková M, Macek T, et al.: *Chem. Listy* 103, 460 (2009).
15. Nguyen LT, Haney EF, Vogel HJ: *Trends Biotechnol.* 29, 464 (2011).
16. Toke O: *Biopolymers (Pept. Sci.)* 80, 717 (2005).
17. Gasell J, Zasloff M, Opella J: *J. Biomol. NMR* 9, 127 (1997).
18. Wang G: *J. Biol. Chem.* 283, 32637 (2008).
19. Nešuta O, Hexnerová R, Buděšínský M, et al.: *J. Nat. Prod.* (epub 21. 3. 2016).
20. Čeřovský V, Hovorka O, Cvačka J, et al.: *ChemBioChem* 9, 2815 (2008).
21. Čeřovský V, Buděšínský M, Hovorka O, et al.: *ChemBioChem* 10, 2089 (2009).
22. Monincová L, Buděšínský M, Slaninová J, et al.: *Amino Acids* 39, 763 (2010).
23. Schibli DJ, Hunter HN, Aseyev V, et al.: *J. Biol. Chem.* 277, 8279 (2002).

interakci s povrchem bakterie. Také schopnost některých patogenů tvořit extracelulární polysacharidová pouzdra může představovat jeden z mechanismů rezistence vůči působení AMP⁵.

Na druhou stranu je třeba uvést, že řada AMP je schopna zabíjet bakterie ve formě biofilmu v koncentracích srovnatelných s jejich minimální inhibiční koncentrací vůči planktonickým baktériím^{39,44,45}. To je v kontrastu s tradičními antibiotiky, které jsou mnohdy vůči bakteriálnímu biofilmu až 1000× méně účinné^{46,47}.

Závěr

Antimikrobiální peptidy tvoří strukturně různorodou skupinu biologicky aktivních látek, která má potenciál se jednou zařadit mezi použitelná léčiva. Z množství navržených modelů je možno usuzovat, že neexistuje jen jeden, ale více možných mechanismů účinků AMP, které se uplatňují v závislosti na konkrétním peptidu a daných podmínkách. Je však možné předpokládat, že v počáteční fázi dochází k interakci peptidu s membránou, kde se uplatňuje jeho kationicitu, hydrofobicitu a amfipaticitu. Hlubší porozumění procesu působení konkrétních peptidů pomocí strukturně aktivitních studií, fyzikálně-chemických měření a i výpočetní chemie může do budoucna usnadnit návrh takových látek s vyšší účinností a nízkou toxicitou, které obстоjejí v klinických testech a umožní nám tak využít tyto látky v nekonečném boji proti infekčním chorobám.

Poděkování

Tento článek vznikl za podpory grantu 16-27726 A od Agentury pro zdravotnický výzkum České republiky (AZV ČR) a výzkumného projektu RVO 61388963 Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR. Grafická úprava molekul byla provedena pomocí softwaru UCSF Chimera, vyvinutého v Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics na Kalifornské universitě, San Francisco (za podpory NIGMS P41-GM103311)⁴⁸.

Literatura (pokračování)

24. Cézard C, Silva-Pires V, Mullié C, et al. (2011): Antimicrobial peptides: A review In: *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances, Microbiology Series 3* (Méndez-Vilas A. ed.), Formatex, Badajoz 926-937
25. Ganz T: *Nat. Rev. Immunol.* 3, 710 (2003).
26. Čeřovský V, Žďárek J, Fučík V, et al.: *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 455 (2010).
27. Selsted ME, Novotny MJ, Morris WL, et al.: *J. Biol. Chem.* 267, 4292 (1992).
28. Rozek A, Powers JPS, Friedrich CL, et al.: *Biochemistry* 42, 14130 (2003).
29. Oppenheim FG, Xu T, McMillian FM, et al.: *J. Biol. Chem.* 263, 7472 (1988).
30. Chen Y, Guarneri MT, Vasil AI, et al.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 1398 (2007).
31. Monincová L, Buděšínský M, Čujová S, et al.: *Chem-BioChem* 15, 301 (2014).
32. Hill CP, Yee J, Selsted ME, et al.: *Science* 251, 1481 (1991).
33. Tossi A, Sandri L, Giangaspero A: *Biopolymers* 55, 4 (2000).
34. Kawasaki K: *Food Research International.* 45, 493 (2012).
35. Matsuzaki K, Sugishita K, Miyajima K: *FEBS Lett.* 449, 221 (1999).
36. Cho JH, Kim SC (2010): Non-membrane Targets of Antimicrobial Peptides: Novel Therapeutic Opportunities? In: *Antimicrobial Peptides: Discovery, Design and Novel Therapeutic Strategies, Advances in Molecular and Cellular Microbiology* 18. (Wang G. ed.), CABI, Chippenham, 128-140
37. Park CB, Kim HS, Kim SC: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244, 253 (1998).
38. Peschel A: *Trends Microbiol.* 10, 179 (2002).
39. Nešuta O, Buděšínský M, Hadravová R, et al.: *Pathog., DiS.* 75 (2017).
40. Maria-Neto S, de Almeida KC, Macedo MLR, et al.: *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1848, 3078 (2015).
41. Park SY, Kim KM, Lee JH, et al.: *Infect. Immun.* 75, 1861 (2007).
42. Sieprawska-Lupa M, Mydel P, Krawczyk K, et al.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 4673 (2004).
43. Schmidtchen A, Frick I-M, Andersson E, et al.: *Mol. Microbiol.* 46, 157 (2002).
44. Nangat C, Pitts B, Nazmi K, et al.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 5698 (2012).
45. de la Fuente-Núñez C, Reffuveille F, Haney EF, et al.: *PLoS Pathog.* 10 (2014).
46. Williams I, Venables WA, Lloyd D, et al.: *Microbiology* 143, 2407 (1997).
47. Ceri H, Olson ME, Stremick C, et al.: *J. Clin. Microbiol.* 37, 1771 (1999).
48. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, et al.: *J. Comput. Chem.* 25, 1605 (2004).

Souhrn

Nešuta O., Čeřovský V.: Antimikrobiální peptidy: nadějná zbraň v boji proti antibiotické rezistenci

Antimikrobiální peptidy jsou významnou složkou nespecifické imunity téměř všech forem života a významně se podílí na obraně jedince proti patogenním mikroorganismům. Během jejich dlouholetého studia byly popsány fyzikálně-chemické vlastnosti molekul peptidů, klíčové pro jejich antimikrobiální účinek (cationicity, hydrophobicity, amphipaticity), a pro mnohé byly navrženy různé mechanismy jejich působení. Počáteční fázi působení kationických peptidů je elektrostatická interakce se záporně nabitém povrchem bakteriální buňky. V přítomnosti bakteriální membrány nabývají molekuly peptidů své amfipatické sekundární struktury umožňující postranním řetězcům jejich hydrofobních aminokyselin zanoření dovnitř fosfolipidové dvojvrstvy membrány. To má za následek narušení struktury membrány a/nebo vznik pórů. Dochází k rozvratu biologických funkcí membrány, což v samotném důsledku vede k zániku celé buňky. Účinek je rychlý a natolik odlišný od účinku antibiotik používaných v současné klinické praxi, že se obecně předpokládá, že by se antimikrobiální peptidy v boji s infekčními chorobami jednou mohli stát léčivý nové generace. V tomto článku jsou shrnutы jednotlivé kroky výše zmíněného procesu a představeny některé modely vzniku membránových pórů. Dále jsou nastíněny způsoby, kterými se mikroorganismy proti působení antimikrobiálních peptidů brání.

Klíčová slova: Antimikrobiální peptidy, mechanismus působení, bakterie, biologické membrány, sekundární struktura, bakteriální rezistence

Summary

Nešuta O., Čeřovský V.: Antimicrobial peptides: promising tool against the antibiotic resistance

Antimicrobial peptides are an important part of nonspecific immunity of almost all living organisms; they contribute significantly to their defence against pathogenic microorganisms. A range of physical and chemical properties important for the effect of these compounds (cationicity, hydrophobicity, amphipathicity) have been described during decades of their study, and various models of their mechanism of action have been proposed. First stage of the action is the electrostatic interaction of cationic peptides with negatively charged surface of the bacterial cell. Peptide molecules adopt their amphipathic secondary structure in the environment of bacterial membranes, which enables hydrophobic amino acid side chains to immerse inside the phospholipid bilayer of the membrane. It leads to membrane disruption, or alternatively to transmembrane pore formation. Such a loss of biological functions of bacterial membrane results in destruction of the entire cell. The effect is quick and completely different from the effect of commonly used antibiotics. Due to this effect, it is expected that antimicrobial peptides could become the antimicrobials of new generation. In this article, the whole process as described above is discussed in detail and some membrane pore forming models are presented. In addition, modes of microbial resistance towards antimicrobial peptides are also summarised.

Keywords: Antimicrobial peptides, mechanism of action, bacteria, biological membranes, secondary structure, resistance

CONTENTS

Editorial	1
Transcript of the lecture of Dr. Grawunder, Chairman of the Swiss Biotechnology Society, at the Biotech 2017	2
Drahokoupil M.: Utilization of hydrolyzed waste materials to reduce costs in the microbial production of lactic acid	3
Gharwalova L., Zimola M., Rezanka T., Masak J., Kolouchova I.: Influencing fatty acid composition of yeasts by odd n-alkanes	6
Chalupa J., Halecký M.: Thermophilic biofiltration of complex VOC mixture in bubble column reactor	10
Paldrychová M., Scholtz V., Kvasničková E., Masák J.: Non-thermal plasma in combination with antibiotics interfering with <i>Pseudomonas aeruginosa</i> quorum sensing system	14
Nešuta O., Čeřovský V.: Antimicrobial peptides: promising tool against the antibiotic resistance	17

OBRAZ

Úvod	1
Příspěvek předsedy švýcarské biotechnologické společnosti Dr. Grawundera na konferenci Biotech 2017	2
Drahokoupil M.: Využití hydrolyzovaných odpadních materiálů ke snížení nákladů na mikrobiální produkci kyseliny mléčné	3
Gharwalova L., Zimola M., Rezanka T., Masak J., Kolouchova I.: Vliv alkanů s lichým počtem uhlíku na zastoupení mastných kyselin kvasinek	6
Chalupa J., Halecký M.: Termofilní biofiltrace komplexní směsi VOC v probublávaném reaktoru	10
Paldrychová M., Scholtz V., Kvasničková E., Masák J.: Netermální plazma v kombinaci s antibiotiky interferuje s quorum sensing systémem <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
Nešuta O., Čeřovský V.: Antimikrobiální peptidy: Nadějná zbraň v boji proti antibiotické rezistenci	17

REDAKČNÍ RADA

doc. Ing. Petra Lipovová, Ph.D., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (vedoucí redaktor)
prof. Ing. Jan Káš, DrSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (redaktor)
doc. Ing. Pavel Ulbrich, Ph.D., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (redaktor)
Ing. Michaela Marková, Ph.D., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (redaktor)
doc. RNDr. Petr Skácel, CSc., Ústav biochemie, PřF MU v Brně, Kamenice 753/5, Bohunice, 601 77 Brno (redaktor)
doc. RNDr. Marek Petřivalský, PhD., Katedra biochemie, PřF Palackého univerzity, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc (redaktor)
RNDr. Ivan Babůrek, CSc., Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i., Rozvojová 263, 165 02 Praha 6
doc. Ing. Radovan Bílek, CSc., Endokrinologický ústav, Národní 8, 116 94 Praha 1
prof. Ing. Alena Čejková, CSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
prof. RNDr. Gustav Entlicher, CSc., Katedra biochemie PřF UK, Alberrtov 6, 128 43 Praha 2
RNDr. Milan Fránek, DrSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcová 70, 621 32 Brno
prof. Ing. Ladislav Fukal, CSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
Ing. Jan Kopečný, DrSc., Ústav živočisné fyziologie a genetiky, AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, Praha 4
prof. RNDr. Pavel Peč, CSc., Katedra biochemie, Univerzita Palackého v Olomouci, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc
doc. RNDr. Jana Pěkniová, Ph.D., Biotechnologický ústav AV ČR, v.v.i., Průmyslová 59/5, Vestec, 252 42 Jesenice
RNDr. Vladimír Vala, Teva Czech Industries, s.r.o., Ostravská 29, 747 70 Opava – Komárov
doc. RNDr. Petr Zbořil, CSc., Ústav biochemie, PřF MU, Kotlářská 267/2, 611 37 Brno

POKYNY PRO AUTORY

Rukopis musí být opatřen plným jménem autorů, jejich pracovištěm a e-mailovými adresami. Text se předkládá jako soubor MS Word (doc, docx, rtf) ve formátu jednoduchého řádkování písmem fontu Arial o velikosti 11. Rozsah není při dodržení správné publikáční praxe omezen.

Článek má tyto části: Název práce, jména autorů a pracoviště, e-mailová adresa autora, úvod, vlastní text členěny do kapitol, závěr, příp. poděkování, citace literatury, český souhrn a klíčová slova a anglický souhrn a klíčová slova. Odkazy na literaturu se číslují v pořadí, v jakém přichází v textu a jsou uváděny formou exponentu (bez závorek) v příslušném místě textu (včetně tabulek a obrázků). Zkratky časopisů se používají podle zvyklosti Chemical Abstract Service Source Index.

Příklady citací: Horgan AM, Moore JD, Noble JE, et al.: *Trends Biotechnol.* 28, 485 (2010).

Lowestein KA: *Silicones. A Story of Research.* Wiley, New York 2006.

Fujiki M (2008): Helix generation, amplification, switching, and memory of chromophoric polymers.

In: *Amplification of Chirality, Topics in Current Chemistry* 248 (Soai K ed.), Springer, Berlin, 119–201.

Novák Z: *Disertační práce*, VŠCHT Praha 2008.

<http://www.fs.fed.us/research/>, staženo 3. září 2011.

Tabulky se označují římskými číslicemi. Každá tabulka je opatřena názvem a popisem umístěným nad tabulkou. Obrázky se číslují arabskými číslicemi (příklad formátu **Obr. 1:**). Každý obrázek musí být opatřen legendou, která jej činí jednoznačně srozumitelným (tj. bez nutnosti hledat nezbytné informace v textu). Obrázky nevkládejte do textu rukopisu, ale zasílejte je samostatně v některém z běžných formátů např. tif, jpg (rozlišení 300 dpi).

Rukopisy je třeba zaslat e-mailem na adresu jan.kas@vscht.cz nebo na petra.lipovova@vscht.cz. Bližší informace naleznete na <http://bts.vscht.cz>.

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

The manuscript must be provided with the full name of authors, the institutions name and with e-mail addresses. Text is presented in a MS Word (doc, docx, rtf) format, single line spacing, font Arial, font size 11. The size is not restricted.

The article contains the following sections: title, authors and institutions, e-mail address of the corresponding author, introduction, text divided into chapters, conclusions, references, summary and keywords in English, summary and keywords in Czech. References are numbered according to their appearance in the text and as an exponent (without parentheses) in the appropriate place in the text.

Examples: Horgan AM, Moore JD, Noble JE, et al.: *Trends Biotechnol.* 28, 485 (2010).

Lowestein KA: *Silicones. A Story of Research.* Wiley, New York 2006.

Fujiki M (2008): Helix generation, amplification, switching, and memory of chromophoric polymers.

In: *Amplification of Chirality, Topics in Current Chemistry* 248 (Soai K ed.), Springer, Berlin, 119–201.

Novák Z.: *Diploma thesis*, UCT Prague 2008.

<http://www.fs.fed.us/research/>, downloaded 1st September 2011.

Tables are numbered by Roman numerals. Each table is provided with a name and description placed above the table. Pictures are numbered in Arabic numerals (example format **Fig. 1:**). Each image must be provided with a legend. Pictures should be sent separately in a common format such as tif, jpg (resolution 300 dpi). Manuscripts should be sent to the e-mail address jan.kas@vscht.cz or petra.lipovova@vscht.cz. More information can be found on <http://bts.vscht.cz>.

BIOPROSPECT

Vydavatel:

BIOTECHNOLOGICKÁ SPOLEČNOST

Technická 3
166 28 Praha 6
IČ: 00570397

Zapsán do evidence periodického tisku a bylo mu přiděleno evidenční číslo:

MK ČR E 19409

Zařazen do Seznamu recenzovaných neimpaktovaných periodik
vydávaných v ČR

Tiskne:

VENICE Praha, s.r.o.
Za Hanspaulkou 13/875
160 00 Praha 6

ISSN 1210-1737 (Print)

ISSN 2570-8910 (Online) – <http://bts.vscht.cz/bioprospect.html>

Neprodejně – jen pro členy Biotechnologických společností.

Stránky biotechnologické společnosti (<http://bts.vscht.cz>)
jsou archivovány Národní knihovnou ČR (www.webarchiv.cz).