

Bio

Ročník 32 • Číslo 1-2/2022

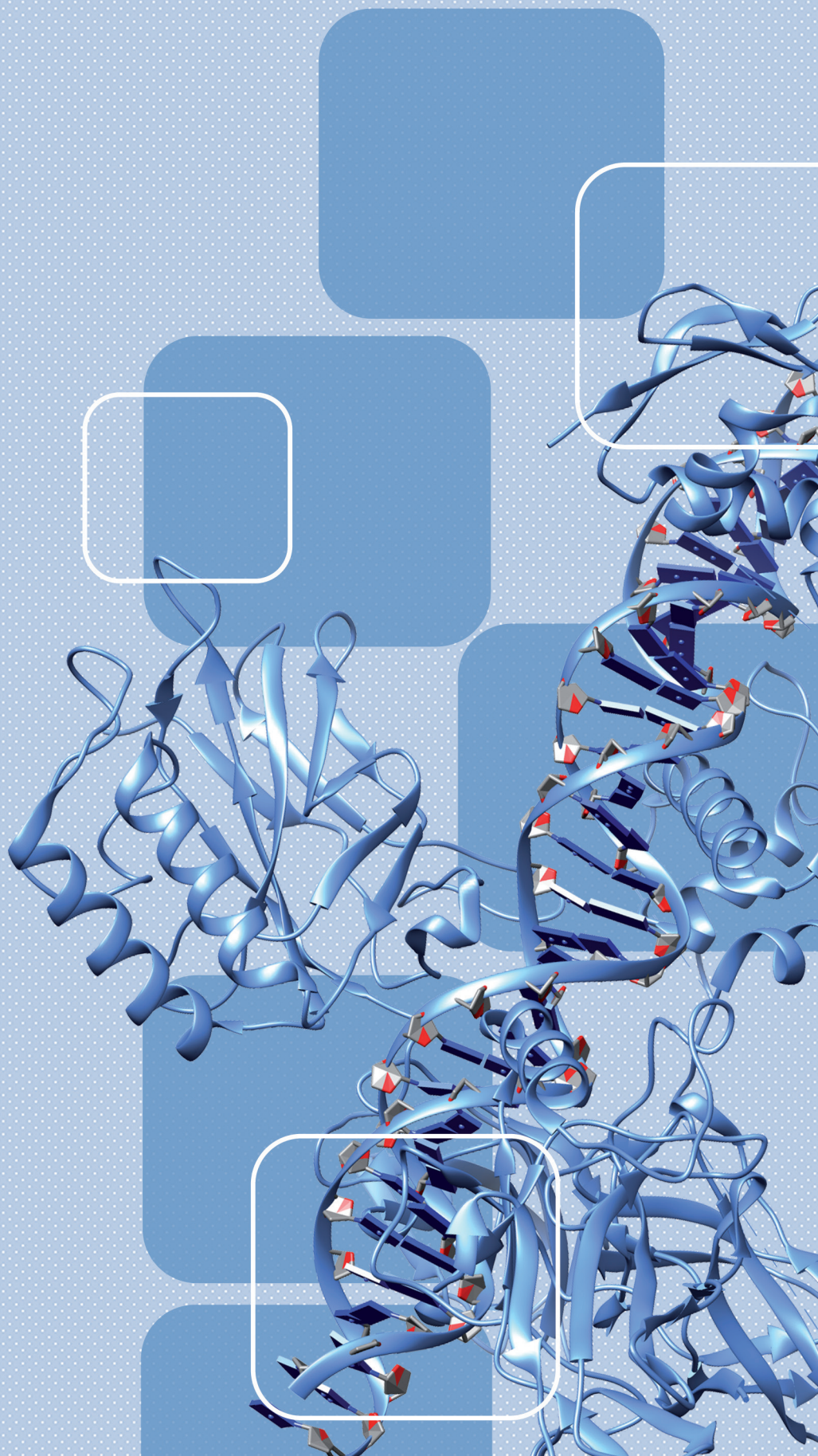
prospect

**BULLETIN
BIOTECHNOLOGICKÉ
SPOLEČNOSTI**

zakládajícího člena
Českého svazu
vědeckotechnických
společností (ČSVTS)

a

člena „European
Federation
of Biotechnology“
(EFB)



Bio prospect

Society address: University of Chemistry and 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.efbiotechnology.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)
UCT, Technická 3
166 10 Prague 6, Czech Republic
Phone +420 220 443 028
e-mail: petra.lipovova@vscht.cz

ÚVODEM

Vážení přátelé,

prvním letošním číslem našeho Bioprospectu již vstupujeme do jeho 32. ročníku a pevně věříme, že tento náš časopis zůstane médiem, které bude spojovat všechny členy a příznivce biotechnologické problematiky navzdory současné explozi nejrůznějších mediálních platforem.

V prosincovém čísle našeho Bioprospectu jsme Vás, mimo jiné, podrobně informovali, jak jsme zvládli odložené mezinárodní symposium Biotech 2020 a o přípravě dalšího speciálního čísla Biotechnology Advances. Pro toto číslo jsme opět vybrali přehledové články navazující na nejzajímavější témata ústně prezentovaná v průběhu symposia. Výběr článků je komentován editory speciálního čísla (Káš a Chisti) v úvodníku (editorialu) tohoto speciálního čísla, které je dostupné na webových stránkách Biotechnology Advances: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.107945>

Editorial, mimo jiné, stručně komentuje obsah vybraných 15 přehledných článků zahrnujících perspektivy „3D bioprinting“ v náhradě tkání a orgánů, studium možností využití glykokonjugátů v lidské terapii, antimikrobiální vlastností kovových nanočástic, široké spektrum aplikací mikrořas, glykopeptidová antibiotika umožňující léčbu chorob způsobených rezistentními G⁺ bakteriemi, možnosti produkce širokého spektra bílkovin v rostlinách („molecular farming“), využití anaerobních bakterií ve výrobě butanolu a dalších zajímavých chemikálií, biologickou přeměnu syngasu (směs CO, CO₂ a H₂) na metan, přehled širokého využití bakterií octového kvašení, léčbu rakoviny pomocí chimerického antigenního receptoru (CAR T-cell therapy), metody ke zvýšení biologické stability piva, biodegradabilní plasty.

V přehledných člancích tohoto čísla jsme pro Vás vybrali informace o zajímavém výzkumu na Ústavu biochemie a mikrobiologie a na Ústavu biotechnologie Fakulty potravinářské a biochemické technologie VŠCHT v Praze. VŠCHT v Praze si letos v září připomene 70 let od svého založení, a proto se pokusíme získat podobné články, které by demonstrovaly alespoň některá témata širokého spektra výzkumu s biotechnologickou tematikou na jednotlivých ústavech VŠCHT.

V našem časopise se také snažíme seznámit naše čtenáře s aktuálním názvoslovím, které se v současné době značně rozrůstá, neboť je snaha výzkumníků naznačit, že pracují v nové problematice, aby získali podporu svého výzkumu přidělením grantu. Jednou z těchto oblastí jsou „omic sciences“. Přípona „-omics“ má blíže naznačit oblast výzkumu v biologických vědách týkajících se např. genomu (genomics), proteomu (proteomics), transkriptomu (transcriptomics) či metabolomu (metabolomics). Genomika je věda, která studuje strukturu, funkci, vývoj a charakterizaci genomu včetně způsobu tvorby bílkovin za pomoci enzymů a dalších molekul. Transkriptom reprezentuje soubor všech mediátorových molekul RNA v buňce, tkáni nebo organismu. Proteom zahrnuje soubor všech bílkovin v buňce, tkáni nebo organismu. Metabolom charakterizuje soubor všech metabolitů v buňce, tkáni, orgánu či organismu, které představují finální produkty buněčných procesů. Přípona -omics je používána téměř ve všech odvětvích např. v potravinářství (foodomics, oxidomics in food analysis), v klinickém výzkumu (clinical proteomics), atd. Bohužel, nějaké systematické utřídění „omics“ přístupů je velmi obtížné a proto doporučujeme literární rešerši podle oboru nebo technik, které používáme, např. Multiomics technology approaches in blue foods – viz Current Opinion in Food Science 2022 nebo NMR-based foodomics of common tubers and roots, viz Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2022.

Jako členové Českého svazu vědeckotechnických společností z.s. bychom Vás rádi pozvali k účasti na 7. světovém kongresu inženýrských společností (7th World engineers convention), který se bude konat příští rok 11 – 13. října v Praze (www.wec2023.com) a požádali Vás o pozvání Vašich zahraničních přátel do Prahy.

Doufáme, že po odeznění dlouhodobé covidové epidemie se budeme moci zase více setkávat. Přejeme Vám pevné zdraví a úspěšné překonání překážek, které nám současná situace připravuje.

Se srdečnými pozdravy
Vaši
Jan Káš a Petra Lipovová

Informace o současných aktivitách společnosti SOTIO

SOTIO prezentovalo průběžné výsledky studie AURELIO-03 s protinádorovým přípravkem SOT101 na konferenci AACR 2022

SOTIO Biotech, biotechnologická společnost vlastněná skupinou PPF oznámila průběžné výsledky probíhající klinické studie AURELIO-03 fáze 1/1 b, zaměřené na bezpečnost a účinnost přípravku SOT101 na bázi interleukinu 15 v kombinaci s pembrolizumabem u pacientů s pokročilými nádory. Na výročním zasedání Americké asociace pro výzkum rakoviny (American Association for Cancer Research, AACR 2022) je prezentoval Dr. Stephane Champiat z pařížského Ústavu onkologie Gustava Roussyho. SOTIO na konferenci také prezentovalo výsledky preklinických studií svého přípravku SOT201 a buněčné terapie BOXR1030.

SOT101 je přípravek, který stimuluje imunitní systém tak, že aktivuje bílé krvinky, hlavně T-lymfocyty a NK buňky, aby zabíjely nádorové buňky. V imuno-onkologii

jde o nadějnou terapeutickou látku, která se navíc dobře kombinuje se zavedenými onkologickými léky.

Klinická studie AURELIO-03 hodnotí vedle podávání přípravku SOT101 jako monoterapie také jeho kombinaci s pembrolizumabem. Klinický přínos této kombinace byl pozorován u 12 z 16 pacientů, a to i u nádorů, u nichž neměla efekt předchozí léčba checkpoint inhibitory (CPI). Zkoušející lékaři u pacientů zaznamenali částečný ústup nádoru, dlouhodobou stabilizaci onemocnění či úplné vymizení ložisek nádoru. SOTIO na AACR 2022 prezentovalo rovněž výsledky preklinických testů přípravku SOT201 (imunocytokin) a přípravku BOXR1030 (platforma buněčné terapie CAR-T).

SOTIO zahájilo klinickou studii CLAUDIO-01 hodnotící protinádorový přípravek SOT102 u pacientů s karcinomem žaludku a slinivky břišní

Společnost SOTIO Biotech oznámila zařazení prvního pacienta do klinické studie CLAUDIO-01 fáze 1/2, hodnotící přípravek SOT102 u pacientů s karcinomem žaludku a slinivky břišní. SOT102 je hlavním projektem SOTIO v oblasti ADC (konjugát protilátky a léku (ADC, antibody-drug conjugate). První pacient byl do studie zařazen v Masarykově onkologickém ústavu v Brně.

Přípravek SOT102 je protinádorový přípravek na platformě ADC, který vyvíjí SOTIO ve spolupráci se švýcarskou společností NBE-Therapeutics. ADC jsou nosiče cytostatik (např. chemoterapie) se schopností cíleně vybrat nádorovou buňku, navázat se na její povrch a po průniku do ní uvolnit vysoce účinné léčivo bez toho, aby došlo k poškození zdravých buněk. SOT102 je zaměřený na nádorové buňky nesoucí na svém povrchu molekulu CLDN18. 2.

Klinická studie CLAUDIO-01 fáze 1/2 (EudraCT: 2021-005873-25) posuzuje bezpečnost a předběžnou účinnost přípravku SOT102 jako monoterapie a v kombinaci

se zavedenými onkologickými léky. Do studie bude zařazeno až 109 pacientů s karcinomem žaludku a slinivky břišní z léčebných center v Belgii, České republice, Francii, Španělsku a USA. První dávku přípravku SOT101 dostal v rámci klinické studie pacient v Masarykově onkologickém ústavu v Brně pod dohledem zkoušející lékařky MUDr. Radky Obermannové, Ph.D.



ÚSPĚCHY PROJEKTU ALPHAFOLD V OBLASTI PREDIKCE PROSTOROVÝCH STRUKTUR PROTEINŮ

Vojtěch Spiwok, Dalibor Trapl

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha; vojtech.spiwok@vscht.cz

Před nedávnem se v denním tisku objevily informace o úspěších projektu Alphafold z dílny společnosti DeepMind, která je dceřinou společností společnosti Google. Úspěch tohoto projektu v soutěži Critical Assessment of Structure Prediction (CASP) vedl organizátory této soutěže k prohlášení, že problém předpovídání prostorových struktur proteinů byl vyřešen. Tento článek má za cíl vysvětlit použité algoritmy a představit možnosti a limity Alphafoldu.

Snaha předpovídat prostorové struktury proteinů je stejně stará jako experimentální studie v této oblasti. Nejstarší a stále používané postupy jsou založené na myšlence, že proteiny s podobnou sekvencí mají podobnou prostorovou strukturu. Tyto metody jsou vhodné pro předpovídání prostorových struktur proteinu, které jsou sekvencně velmi podobné těm, u kterých byla prostorová experimentálně změřena. Tento postup je v praxi používán například farmaceutickými společnostmi snažícími se vyřešit strukturu nějakého lidského proteinu, který těmto snahám odolává. Pro vyřešení struktury rentgenovou strukturní krystalografií je nutné mít krystal proteinu. Řada farmakologicky zajímavých proteinů, například membránové receptory, je známa pro svou neochotu krystalizovat. Farmaceutické společnosti nebo akademické laboratoře na to často jdou tak, že se kromě lidského proteinu pokouší vykristalizovat a strukturně charakterizovat podobné proteiny z různých živočišných druhů s nadějí, že se to alespoň pro jeden povede. Pokud se jim povede změřit prostorovou strukturu například krocaniho proteinu, mohou predikčními metodami velmi přesně předpovědět strukturu lidského proteinu. Tyto metody jsou přesné a výpočetně nenáročné, ale omezené sekvencí podobností mezi vzorem a modelem.

Daleko méně přesné je předpovídat struktury proteinů, které nemají žádný podobný vzorový protein s vyřešenou strukturou, nebo u kterých je takovýto protein jen velmi málo podobný. Určité zpřesnění v této oblasti přineslo zavedení konceptu koevoluce (Obr. 1). Pojem koevoluce se v různých disciplínách používá v různém významu. Abychom vysvětlili pojem koevoluce tak, jak je chápán v bioinformatice, je nutné si představit prostorovou strukturu nějakého proteinu. Obvyklý protein má ve svém jádře převážně hydrofobní aminokyselinové zbytky. Nyní si představte, že v průběhu evoluce dojde k záměně nějakého hydrofobního aminokyselinového zbytku s větším postranním řetězcem, například leucinu, za nějakou menší aminokyselinu, například alanin. Takováto záměna by ve struktuře proteinu vytvořila jakousi dutinu. Hydrofobní dutina uvnitř proteinu může způsobit jeho destabilizaci nebo může jinak narušit jeho funkci. V průběhu evoluce může dojít k vyplnění dutiny tak, že se jiný blízký aminokyselinový zby-

tek změní z malé aminokyseliny na velkou hydrofobní aminokyselinu, například z alaninu na isoleucin.

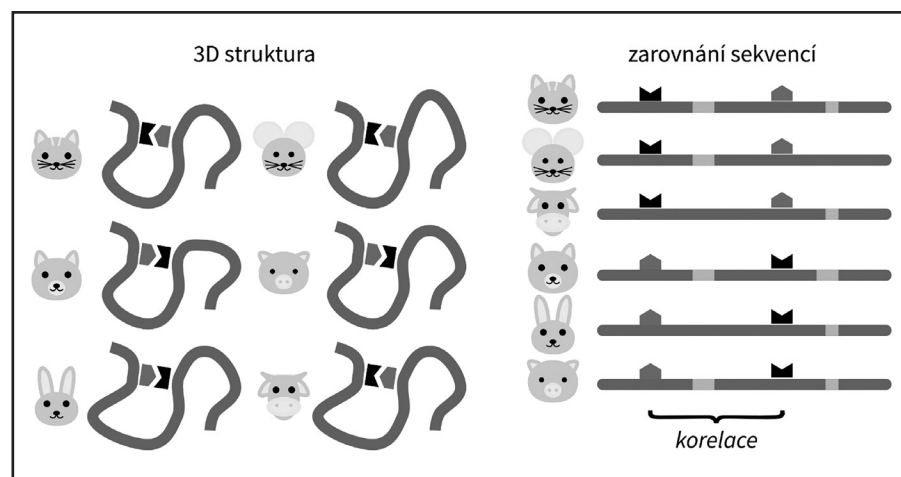
Pokud bychom si pod sebe zarovnali sekvence tohoto a jemu podobných proteinů, pak bychom mohli díky výše popsanému jevu vidět v zarovnání jistou korelaci mezi residu v pozicích, které odpovídají prostorově blízkým reziduí. Když je v první pozici velká aminokyselina, v druhé pozici bude malá aminokyselina, a naopak. Podobný vztah může existovat nejen pro velké a malé hydrofobní aminokyselinové zbytky, ale také pro donory respektive akceptory vodíkové vazby, opačně nabitě aminokyseliny a podobně.

V dnešní době máme díky genomickým a metagenomickým projektům a výkonným sekvenčním metodám k dispozici mimořádnou nadílku aminokyselinových sekvencí proteinů získaných přeložením nukleotidových sekvencí. Díky tomu můžeme pro vybraný protein najít sekvence několika tisíc podobných proteinů z příbuzných organismů. Tyto sekvence můžeme zarovnat a v zarovnání sekvencí můžeme hledat korelace mezi residu (Obrázek 1). Skutečnost, že jsou dvě residua takto korelovaná implikuje, že jsou odpovídající aminokyselinové zbytky v nativní struktuře proteinu blízko u sebe. Tuto skutečnost je možné použít při hodnocení různých modelů (ve smyslu, jak odpovídají předpokládaným vzdálenostem) nebo mohou být hnací silou optimalizace modelu struktury proteinu.

Problémem metod studia koevoluce je skutečnost, že jich existuje celá řada, každá má své klady a zápory a každá poskytuje trochu jiné výsledky, i když jsou aplikovány na stejnou rodinu proteinů. Projekt Alphafold se pokusil tento problém vyřešit přístupem deep learning, který je založen na umělých neuronových sítích. Pomocí přístupu deep learning je možné například naučit autonomní automobil (automobil bez řidiče) rozpoznávat dopravní značky. Neuronová síť je v tomto případě nějaký matematický model, do kterého na jedné straně vstupuje obrázek dopravní značky a na druhé straně vystupuje její identifikace. Aby toto fungovalo, je nutné neuronovou síť tzv. naučit. Pro proces učení potřebujeme obrovský počet obrázků dopravních značek; každou doprovázenou informací o jakou značku se jedná. Během procesu učení jsou parametry matematického modelu optimalizovány tak, aby byly identifikace dopravních značek co nejpřesnější.

Obdobný postup byl použit v první verzi programu Alphafold,¹ pouze s tím rozdílem, že místo obrázků dopravních značek byly použity data ze zarovnání sekvencí proteinů a místo identit dopravních značek prostorové vzdálenosti residu. Autoři studie vzali několik desítek tisíc proteinů se známou prostorovou strukturou. Pro každou strukturu našli sekvence podobných proteinů a provedli jejich zarovnání. Ze zarovnání vyextraho-

vali vhodné deskriptory (features) popisující koevoluci. Dále z každé prostorové struktury vypočetli vzájemné vzdálenosti dvojic aminokyselinových zbytků. Následně trénovali neuronovou síť tak, aby dokázala co nejlépe předpovědět vzdálenosti residuí podle deskriptorů popisujících koevoluci podobně, jako se trénuje autonomní auto poznávat dopravní značky. Takto mohli pro nové proteiny předpovědět vzdálenosti mezi residuí a tuto informaci použít pro predikci struktury proteinu.



Obr. 1.: Princip koevoluce.

První představení Alphafoldu proběhlo v roce 2018 v soutěži CASP13. Soutěž CASP probíhá každé dva roky a účastní se jí přední laboratoře zabývající se predikcí struktur proteinů. Organizátoři soutěže nejprve vyberou sekvence proteinů, jejichž prostorová struktura není známá. Na experimentálním vyřešení struktur těchto proteinů paralelně pracují strukturální biologové, nejčastěji pomocí strukturální krystalografie. Své výsledky ale zveřejní až po uzavírcce soutěže, kdy všichni účastníci zašlou organizátorům své predikce. Následuje vyhodnocení předpovězených modelů struktur. Pro tento účel bylo vyvinuto několik deskriptorů kvality předpovědí.

V roce 2018 vyhrál Alphafold o prsa před svými konkurenty. Detaily postupů použitých v této soutěži byly popsány v článku v časopise *Nature*.¹ V roce 2020 vyhrála v soutěži CASP14 nová verze Alphafoldu² rozdílem několika koňských délek. Výsledky vedly organizátory k výše zmíněnému prohlášení o vyřešení problému predikce struktury proteinů. Tvůrci v druhé verzi Alphafold již opustili dříve zmíněný koevoluční mechanismus. Místo toho používají neuronové sítě, kterým se říká transformers, které zahrnují princip koevoluce spíše implicitně. Transformerové neuronové sítě se v poslední době intenzivně využívají pro zpracování přirozeného jazyka.³ Alphafold 2 přistupuje k problému určení struktury podobně. Při zpracování přirozeného jazyka

se snaží neuronová síť určit význam jednotlivých slov. Při určování struktury proteinů se snaží neuronová síť určit prostorové uspořádání jednotlivých aminokyselin pouze na základě jejich primární struktury. Dalším vylepšením nové verze Alphafold je také to, že se jedná o tzv. "end-to-end" predikci, kdy neuronová síť určuje prostorové uspořádání proteinu přímo na základě primární struktury. Ve své předešlé verzi Alphafold probíhala predikce dvoukrokově; nejprve byly předpovězeny vzdálenosti aminokyselinových residuí, pak byla na základě nich předpovězena struktura. To již v Alphafold 2 odpadá.

Je skutečně vyřešen problém předpovídání struktur proteinů? Částečně možná ano. Zdá se, že bude možné velmi přesně předpovídat strukturu monomerních proteinů. Rovněž struktury jednotlivých podjednotek homo- a heterooligomerů bývají Alphafoldem předpovězeny často s překvapivou přesností, i když informace o oligomerním uspořádání ve výstupu chybí. Alphafold nedokáže (a znalí uživatelé to ani neočekávají) předpovědět vliv bodové mutace na strukturu

proteinu, vliv posttranslačních modifikací, či komplexy s jinými sloučeninami, než jsou proteiny.

Molekula proteinu také nemá statickou strukturu, ale podléhá dynamickým změnám, které jsou důležité pro správnou funkci proteinu. Toto dynamické chování Alphafold 2 zachytit neumí a nepřišel také na proces, jakým se dané proteiny skládají.

Zájemci o předpověď struktury pomocí Alphafoldu mohou využít Alphafold database,^{4,5} která v současnosti obsahuje předpovědi pro proteomy 21 druhů, včetně člověka a běžných modelových organismů. V nejbližší době jsou plánována podstatná rozšíření počtu popsaných proteinů. Další možností je využití dedikovaného Jupyter notebooku.⁶ V českém akademickém prostředí je možné použít instalaci Alphafoldu 2 v Metacentru. Tato instalace byla zajištěna společným úsilím infrastruktury E-infra a ELIXIR CZ. Zájemci mohou kontaktovat autory článku.

Veškeré informace ale ukazují, že Alphafold a zvláště Alphafold 2 je velkým průlomem v předpovídání struktur proteinů. Na rozdíl od jiných aplikací umělé inteligence, které v budoucnu mohou připravit celou řadu lidí o práci, nebude dle našeho názoru Alphafold brát strukturálním biologům jejich práci, ale způsobí, že se budou moci soustředit na to, jak proteiny fungují, a ne na to, jak vypadají.

Literatura

1. Senior AW, Evans R, et al.: *Nature* 577, 706 (2020).
2. Jumper J, Evans R, et al.: *Nature* 596, 583 (2021).
3. <https://www.aclweb.org/anthology/2020.emnlp-demos.6/>

4. Tunyasuvunakool K, Adler J, et al.: *Nature* 596, 590 (2021).
5. <https://alphafold.ebi.ac.uk/>
6. <https://colab.research.google.com>

PROTEOMICKÉ POVÍDÁNÍ NEJEN O TOM, JAKÉ OBZORY OTEVÍRÁ TECHNIKA „IN-SAMPLE DIGESTION“ VYVINUTÁ V NAŠÍ LABORATOŘI

Štěpánka Kučková, Tatiana Smirnova, Alena Meledina, David Straka, Jiří Šantrůček, Radovan Hynek
Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha; radovan.hynek@vscht.cz, stepanka.kuckova@vscht.cz

Když se řekne proteomika, pak si většina čtenářů Bioprospektu patrně představí, že se jedná o analýzu proteinů využívanou pro studium živých organismů. To je v podstatě pravda, ale zdaleka ne celá. Málokoho totiž možná napadne, v jak rozdílných oblastech mohou být proteomické analýzy využity. Hlavním smyslem tohoto článku je ukázat si v jak rozdílných oblastech mohou být proteomické analýzy užitečné. Nejprve si připomeňme, že každý protein je kódován informací zapsanou v příslušném úseku DNA. Platí tedy, že není proteomu bez genomu. Přesto existuje mezi genomem a proteomem zásadní rozdíl. Zatímco genom je statický v tom smyslu, že je ve všech buňkách organismu stejný a navíc se nemění v čase, je proteom v různých tkáních daného organismu rozdílný a též se mění v různých fyziologických i patologických stavech. Hezkou ilustrací rozdílu mezi genomem a proteomem je pulec, ze kterého se stane časem dospělá žába. Zatímco jejich genomy jsou na vlas stejné, je na první pohled jasné, že jejich proteomy se budou od sebe značně lišit. Při úvahách o různých oblastech aplikace proteomiky je též dobré vzít v úvahu, že ačkoliv všechny proteiny byly nutně syntetizovány na ribozomech v živých organismech, může být jejich následný osud značně rozdílný a může je zavát daleko od organismu, kde byly vytvořeny.

Nebudeme se zde zabývat zdoluhavým a popisem technik, které se v moderní proteomice využívají. Nicméně je vhodné alespoň zmínit, že jedním ze základních pilířů moderní proteomiky je technika peptidového mapování. Ta je založena na specifickém enzymovém štěpení proteinů na přesně definované peptidové fragmenty, které jsou následně analyzovány například pomocí hmotnostní spektrometrie. A nyní je snad na místě pochlubit se a zmínit čím se naše vědecká skupina aplikované proteomiky liší od jiných podobných skupin. Pravděpodobně jako první na světě jsme si v naší laboratoři již v roce 2004 uvědomili, že na to, aby se peptidovým mapováním daly dané vzorky studovat, není třeba z nich proteiny izolovat. Zejména nerozpustnými porézními materiály může totiž trypsin pohodlně difundovat až k uvězněným proteinům. Specifické enzymové štěpení tak probíhá přímo ve vzorku – „in-sample digestion“ a analyzovány jsou až peptidové fragmenty uvolněné do roztoku.

Námi vyvinutá technika štěpení proteinů přímo ve vzorku (in-sample digestion) otevřela aplikaci proteomiky dveře do nejrůznějších oblastí. Z posledních úspěchů naší laboratoře na tomto poli stojí za zmínku aplikace zmíněného přístupu na studium čelistních kostí, které skýtá možnost získat rutinně vzhled na molekulární úrovni například v oblasti stomatologické či maxillofaciální chirurgie¹.

Ale nyní již zpět do dávné historie. Píše se rok 2004 a ve skupině aplikované proteomiky je poprvé otestován přístup „in sample-digestion“. Výsledek je pro všechny příjemným šokem!!! **Tento přístup totiž fun-**

guje!!! A to znamená, že proteomice byl dán další mocný nástroj!!! Tato nová technika byla poprvé aplikována pro štěpení proteinů obsažených ve fragmentech odebraných z uměleckých děl pro identifikaci proteinových pojiv². V této době bylo možné identifikovat proteinová pojiva pouze pomocí knihoven referenčních materiálů (vejce, mléko, živočišné kůže, krev atd.). Dnes je pro proteinové analýzy častěji používán jiný typ hmotnostní spektrometrie, a to LC-MS/MS.

V dalších letech se v naší laboratoři štěpení proteinů v nerozpustných matricích podařilo úspěšně aplikovat na velmi různorodé typy materiálů. Můžeme například jmenovat umělecká díla³, historické malty⁴, archeologické nálezy⁵, zvířecí kosti⁶, pergameny, srst⁷, rybí maso⁸, sýry⁹, fosfáty srdečních chlopní¹⁰, již výše zmíněné čelistní kosti¹, atd.

Protože se intenzivně zabýváme určováním proteinových materiálů v uměleckých dílech, jakými jsou obrazy nebo polychromované sochy, řekněme si nejdříve, jaké typy proteinových materiálů v nich bývají obsaženy a proč je tak důležité je analyzovat.

Mezi nejčastěji používanými proteinovými pojivy se řadí kůže a želatina (kolagenové materiály), vejce, ať již celé nebo jenom žloutek či nejjednodušší jen bílek, mléčné materiály (kasein, mléko, syrovátka, tvaroh) nebo i krev (ta se spíše používala jako konzervační nátěrový materiál na trámy a dřevní konstrukce, ale její použití v uměleckých objektech je rovněž doloženo, např. v asijských lácích na nábytku¹¹). Správné určení proteinového materiálu v objektu je důležité pro doplnění celkového přehledu použitých materiálů v díle, které nám dále může umožnit určení techniky malby (celovaječná tempera, žloutková tempera, kaseinová tempera, atd.) a pomůže tak restaurátorům se zvolením vhodného technologického postupu při opravě díla. Volba správného postupu opravy vede k prodloužení životnosti a tedy i k dlouhodobějšímu uchování kulturního dědictví.

Nejen, že jsme jako první na světě aplikovali trypsin přímo na pevné nerozpustné vzorky, ale také se nám podařilo posunout vývoj metodiky a být stále na čelních světových pozicích. Jedním z příkladů rozvoje, který ocenil opět hlavně restaurátoři a kunsthistorici, je možnost rozlišení celovaječné a žloutkové tempery¹². Již podle jejich názvu je zřejmé, čím se tato pojiva od sebe odlišují; jedna obsahuje celé vejce a druhá pouze žloutek. Jenže zkoušeli jste někdy v kuchyni od sebe oddělit žloutek a bílek? Bylo to možné udělat bez zbytku bílku na povrchu žloutku? Prakticky nikoliv, i když jste se dlouho snažili. Hmotnostní spektrometrie, kterou používáme pro identifikaci proteinů je ale natolik citlivá metoda, že zachytí jak proteiny obsažené ve žloutku, tak i v bílku. A protože kvantifikace proteinů není u této techniky jednoduchá, není proto možné jen na základě nalezených proteinů rozlišit oba druhy pojiv od sebe. Je ale možné se zaměřit na počty peptidů, kterými jsou proteiny pocházející ze žloutku a bílku

identifikovány, a ty dát do poměru. Čím více je bílku v pojivu, tím více peptidů z jeho proteinů ve vzorku nalezneme a naopak. Takto byly získané charakteristické poměry těchto materiálů pro každé z pojmů na vzorcích připravených před cca 20 lety restaurátorkou v Německu. Navržený postup byl nejprve otestován na obrazech od A. Čalkovského z 80. let minulého století, kde určení pojiv bylo možné ověřit, protože A. Čalkovský psal materiálové složení svých obrazů na jejich rubovou stranu. Teprve v dalším kroku byla metodika použita na umělecká díla florentinské malby ze 14. a 15. století. V obou dílech renesančních umělců byl zjištěn žloutek, prakticky bez přítomnosti bílku. Podle dobové literatury je ale doloženo, že velcí Mistři velmi úzkostlivě dbali na kvalitu svých používaných materiálů, a proto i použitý žloutek byl takřka dokonale očištěn od stop bílku. Přínosem této techniky, kdy je možné zjistit, o jaký typ vaječného pojiva se jedná, je zejména ten, že pomocí něj můžeme vystopovat, kdy ve středověku došlo k posunu od celovaječné ke žloutkové tempeře, od které se pak plynule přešlo k olejomalbě.

V naší laboratoři byl také vyvinut veřejně dostupný software PCA (analýza hlavních komponent, principal component analysis) pro MALDI-TOF, který poskytuje snadný a efektivní způsob pro analýzu hmotnostního spektra [13], díky čemuž je MALDI-TOF výkonnějším analytickým nástrojem. V současné době byl (také v naší laboratoři, spoluautorka Š. Kučková) vyvinut ještě i jiný typ vyhodnocování dat z MALDI-TOF a LC-MS/MS, ve kterém využíváme databázový systém PostgreSQL a jazyk SQL k analýze dat. Tento způsob vyhodnocování umožňuje jednoznačnou identifikaci proteinových materiálů nebo určení původu živočišných druhů pomocí charakteristických hodnot m/z a aminokyselinových sekvencí. Může být aplikován na určování např. živočišného původu archeologických kostí, živočišného půvo-

du masa/roślin nalezonych jako zbytky stravy v archeologických lokalitách, při hledání potenciálních proteomických biomarkerů u nejrůznějších typů nemocí atd.

Hmotnostně spektrometrické techniky u nás ale využíváme i pro identifikaci dalších materiálů, a to bez nutnosti štěpení proteinů enzymem (trypsinem). Například metodu MALDI-TOF MS používáme pro identifikaci mikroorganismů. A to tak, že naměřená hmotnostní spektra jednotlivých stěrů/izolátů se porovnají s referenčními spektry mikrobiálních druhů v databázi a tímto způsobem určíme rod, případně druh příslušného mikroorganismu. Na rozdíl od genotypizačních metod se jedná o rychlou a citlivou metodu, kterou lze snadno implementovat do rutinní analýzy pro identifikaci a typizaci kmenů, detekci biologických bojových látek, patogenů přenášených vodou a potravinami, studium antibiotické rezistence a také pro detekci patogenů krve a močových cest¹⁴.

Dalšími tématy, která v naší Laboratoři aplikované proteomiky řešíme (ve spolupráci s kolegy z jiných ústavů VŠCHT a dalších externích pracovišť), jsou i klasické proteomické analýzy zahrnující hledání biomarkerů obsažených v lidské krevní plasmě u lidí postižených kolorektálním karcinomem, rakovinou slinivky, Alzheimerovou chorobou a juvenilní artritidou.

Poděkování

Protože se článek zabývá též historií, je vhodné na tomto místě poděkovat zejména prof. Milanu Kodíčkovi a prof. Janu Kášovi, kteří stáli u zrodu naší laboratoře. Za zrod naší skupiny lze totiž považovat rok 2001, kdy byl zakoupen a uveden do provozu náš první hmotnostní spektrometr na principu MALDI-TOF.

Tento výstup vznikl v rámci projektů Specifického výzkumu – projekty č. A1_FPBT_2022_001, A2_FPBT_2022_041, A2_FPBT_2022_042.

Literatura

1. Hynek R, Michalus I, et al.: *Electrophoresis* 42, 2552 (2021).
2. Hynek R, Kuckova S, et al.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18(17), 1896 (2004).
3. Kuckova S, Hynek R, et al.: *Anal. Bioanal. Chem.* 388(1), 201 (2007).
4. Kuckova S, Hynek R, et al.: *J. Cult. Herit.* 10(2), 244 (2009).
5. Pavelka J, Smejda L, et al.: *J. Archaeol. Sci.* 73, 25 (2016).
6. Buckley M, Collins M, et al.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23(23), 3843 (2009).
7. Zubová A, Humpoláková K, et al.: *Fórum pro konzervátory-restaurátory* 10(2), 10 (2020).
8. Zubová A, Novotný O, et al.: *Bioprospekt* 30(3), 41 (2020).
9. Kuckova S, Zitkova K, et al.: *J. Sep. Sci.* 42, 3487 (2019).
10. Coufalova L, Kuckova S, et al.: *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 8781 (2013).
11. Miklin-Kniefacz S, Pitthard Vet al.: *Stud. Conserv.* 61(3), 45 (2016).
12. Kuckova S, Cejnar P, et al.: *Phys. Sci. Rev.* 4, 20180011 (2019).
13. Kuckova S, Rambouskova G, et al.: *J. Mass Spectrom.* 50(11), 1270 (2015).
14. Croxatto A, Prod'hom G, et al.: *FEMS Microbiol. Rev.* 36(2), 380 (2012).

PROBIOTICKÉ MIKROORGANISMY A NOVÉ TRENDY V JEJICH APLIKACI

Šárka Horáčková, Blanka Vrchotová

Ústav mléka, tuků a kosmetiky, VŠCHT Praha; sarka.horackova@vscht.cz

Úvod

Zástupci bakterií mléčného kvašení (BMK) spolu se zástupci rodu *Bifidobacterium* tvoří hlavní skupiny mikroorganismů používaných jako probiotika. Koncept probiotických aplikací vychází z dlouhodobých historických

empirických pozorování, která po staletí potvrzovala prospěšnost konzumace fermentovaných výrobků. Ale teprve s rozvojem mikrobiologie a znalostí o jednotlivých druzích mikroorganismů byl na počátku 20. stol. položen základ konceptu tzv. probiotik v práci ruského

vědce, ředitele Pasteurova institutu v Paříži a nositele Nobelovy ceny za imunologii, Ilji Mečnikova (Prolongation of life: Optimistic Studies, 1907). Přibližně ve stejnou dobu došlo ve stejném institutu k dalšímu důležitému objevu Henry Tissiera, který izoloval bifidobakterie (původně nazvané *Bacillus bifidum*) ze střevní flóry kojených dětí, které zmírňovaly průběh průjemového onemocnění.

Definice probiotik a další termíny

Vlastní termín „probiotikum“ byl však poprvé použit ve vědecké literatuře až v roce 1964 německým bakteriologem Wernerem Kollathem.¹ Psal o probiotikách jako o protikladu ke škodlivým antibiotikům a definoval je jako účinné látky, které jsou nezbytné pro zdravý vývoj života. O rok později, v roce 1965, Lilley a Stillwell vydali publikaci Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms, kde jsou probiotika definována jako látky, které jsou vylučovány jedním mikroorganismem a které stimulují růst jiného organismu. V 70. letech 20. stol. byl termín používán pro doplňky stravy pro zvířata, které měly příznivý účinek na hostitelské zvíře ovlivněním jeho střevní flóry.² Teprve v roce 1989 byla probiotika předdefinována na živé mikroorganismy, které příznivě ovlivňují hostitele zlepšením jeho střevní mikrobiální rovnováhy.³ Požadavek na viabilitu je zakotven rovněž v oficiální definici WHO/FAO z roku 2002 – „probiotika jsou živé mikroorganismy, které při podávání v dostatečném množství poskytují hostiteli zdravotní přínos.“⁴ Tato definice byla později upřesněna s tím, že probiotika (probiotické preparáty a potraviny) musí mít definovány obsažené mikroorganismy a požadovaný počet životaschopných buněk na konci doby expirace, musí být vhodně ověřeny jejich zdravotní benefity na konzumenta a musí být bezpečná pro zamýšlené použití.⁵ Tyto body ve svém prohlášení pak v roce 2018 zopakovala i Mezinárodní vědecká asociace pro probiotika a prebiotika (International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics), kde byly shrnuty následovně⁶:

- charakteristika mikroorganismu dostatečná k identifikaci probiotika na úrovni rodu, druhu a kmene;
- zařazení a pojmenování probiotika podle vědecky platné nomenklatury;
- probiotický název obsahuje označení kmene;
- bezpečnost probiotika je prokázána pro zamýšlené použití;
- probiotický kmen je uložen v mezinárodní sbírce kultur;
- probiotikum má zdravotní přínos prokázaný alespoň v jedné studii na lidech;
- výrobky s probiotiky obsahují až do konce doby použitelnosti dostatečné množství mikroorganismů, které poskytují zdravotní přínos.

S postupujícími znalostmi o mikrobiotě lidského těla se v současné době objevují další termíny související s pozitivními zdravotními účinky mikroorganismů. Kromě označení probiotický mikroorganismus se lze setkat nejčastěji s těmito upřesňujícími definicemi:

- postbiotika (probiocuticals) – metabolické produkty probiotik, bioaktivní sloučeniny se zdravotními benefity produkované během fermentace; mohou zahrnovat krátké mastné kyseliny, exopolysacharidy, enzymy, bílkoviny a peptidy, vitaminy, biosurfaktan-

- ty^{7,8}. Do této kategorie mohou být zařazeny i látky, ovlivňující nervovou soustavu, jako jsou serotonin, dopamin, γ -aminomáselná kyselina, histamin apod.;
- paraprobiotika (parabiotika, ghost probiotics) – inaktivované mikrobiální buňky probiotik neporušené nebo lyzované obsahující buněčné složky, jako jsou peptidoglykany, kyselina teichoová či povrchové proteiny⁷;
- psychobiotika – živé organismy, které při požití v dostatečném množství vytváří zdravotní přínos pro pacienty trpící psychiatrickým onemocněním⁹; ovlivňují funkce a chování související s centrálním nervovým systémem zprostředkované osou střevo-mozek prostřednictvím imunitních, humorálních, nervových a metabolických cest.¹⁰

Mikroorganismy používané jako probiotika

Původně byly probiotické mikroorganismy vybírány převážně z rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, u kterých se jednalo ve většině případů o izoláty z trávicího traktu. Přehled nejběžnějších probiotik je uveden v Tab. 1. Pro úplnost jsou zmíněny i druhy, které nepatří mezi BMK. Výhodou aplikace BMK je, že mají doloženou dlouhou historii použití v lidské výživě, a tudíž jsou považovány za zcela bezpečné. Z hlediska nomenklaturního zařazení došlo v roce 2020 k podstatné změně u rodu *Lactobacillus*, jehož zástupci jsou hojně používány jako čisté mikrobiální kultury v potravinářském průmyslu a zároveň jsou nejčastějšími aplikovanými probiotiky do mléčných výrobků a doplňků stravy. Rod *Lactobacillus* byl poprvé popsán již na začátku 20. století. Doposud u něj bylo identifikováno 261 druhů a již dříve byly z důvodu velké odlišnosti přearovány někteří zástupci do jiných rodů (*Carnobacterium* spp., *Oenococcus* spp. nebo *Weissella* spp.). Nyní však proběhla rozsáhlá změna v reklasifikaci čeledi *Lactobacillaceae*, rodů *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* a *Pediococcus*. V publikaci Zheng et al.¹¹ bylo u těchto bakterií definováno a vytvořeno 25 rodů – 2 pozmeněné rody *Lactobacillus* a *Paralactobacillus* a 23 nových rodů (*Acelactobacillus*, *Agrilactobacillus*, *Amylolactobacillus*, *Apilactobacillus*, *Bombilactobacillus*, *Companilactobacillus*, *Dellaglioia*, *Fructilactobacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Holzapfelia*, *Lacticaseibacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Latilactobacillus*, *Lentilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Liquorilactobacillus*, *Loigolactobacillus*, *Paucilactobacillus*, *Schleiferilactobacillus* a *Secundilactobacillus*). V původním rodu *Lactobacillus* bylo ponecháno pouze 38 druhů ze skupiny *Lactobacillus delbrueckii* (např. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus helveticus*). (Rychlou orientaci mezi starými a novými názvy jednotlivých druhů nabízejí webové stránky <http://lactobacillus.ualberta.ca>). Snahou autorů reklasifikace bylo lépe zařadit a zdokumentovat jednotlivé druhy tak, aby se heterogenita genomu projevila v taxonomii a bylo možno odlišit jednotlivé zástupce z hlediska ekologických a funkčních vlastností a adaptace na hostitele.

Je nutno zdůraznit, že u každého druhu probiotika se vždy jedná o konkrétní kmeny, neboť probiotické vlastnosti jsou výhradně kmenově specifické. V současné

době se ale již upouští od striktního požadavku na humánní původ probiotických kmenů, či v případě tzv. parabiotik od jejich životaschopnosti v gastrointestinálním traktu (GIT).^{12,13}

K doplnění přehledu mikroorganismů se zdravotním účinkem je nutné zmínit, že v důsledku stále se rozvíjejících znalostí o lidské střevní mikrobiotě a důsledcích střevní dysbiosy je pozornost upřena také na použití komenzálních bakterií GIT, které nespádají do skupiny BMK, ani bifidobakterií. Tyto mikroorganismy se označují jako „probiotika nové generace“. Byly většinou identifikovány na základě srovnávací analýzy složení mikrobioty mezi zdravými a nezdravými jedinci a patří do různých rodů. Nemají dlouhou historii bezpečného používání a jejich bezpečnost proto není považována za prokázanou (Martín & Langella, 2019). Z těchto komenzálních izolátů jsou nejčastěji zmiňovány druhy *Akkermansia muciniphila*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides ovatus* a zástupci rodu *Clostridium*, klasty IV, XIVa, XVIII.^{14,15,16}

Závěr

Mikrobiota trávicího traktu hraje velmi důležitou úlohu při rozvoji a správném fungování imunitního systému, má významnou metabolickou funkci, její správné složení zabraňuje rozvoji nežádoucích či patogenních mikroorganismů v těle a v neposlední řadě ovlivňuje kognitivní funkce, fungování nervové soustavy. Naopak dysbiosis může být pak příčinou či následkem řady onemocnění. Je proto důležité správným stravovacím režimem, dostatečným příjmem vlákniny, konzumací fermentovaných potravin i příjmem potravin s probiotickými mikroorganismy s prokázaným zdravotním účinkem dlouhodobě podporovat příznivé složení tohoto důležitého orgánu našeho těla. S rostoucími poznatky o fungování probiotik a jejich metabolitů na molekulární úrovni rostou také možnosti použití těchto mikroorganismů jako léčiv.

Tab. 1.: Nejběžnější druhy probiotických bakterií (vždy konkrétní kmeny)

Původní rod <i>Lactobacillus</i>	Ostatní druhy BMK	Rod <i>Bifidobacterium</i>	Ostatní druhy
<i>L. acidophilus</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>B. breve</i>	<i>Bacillus coagulans</i>
<i>L. delbrueckii</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Bacillus clausii</i>
<i>L. helveticus</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>		<i>Clostridium butyricum</i>
<i>L. casei/paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i>
<i>L. rhamnosus</i>			<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>L. reuteri</i>			<i>Propionibacterium jensenii</i>

Literatura

- Korhonen HJ (2009): Bioactive Components in Bovine Milk. In: Park Y. W.: *Bioactive Components in Milk and Dairy Products* (Park YW ed.), John Wiley and Sons, London, 29.
- Parker RB: *Animal Nutr. Health* 29, 4 (1974).
- Fuller R: *J. Appl. Bacteriol.* 66, 365 (1989).
- WHO/FAO: Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, London, Ontario, Canada, 2002.
- Hill C, Guarner F, Reid G, et al.: *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 11, 506 (2014).
- ISAPP 2018: Minimum criteria for probiotics. <https://isappscience.org/minimum-criteria-probiotics/>, staženo 16. května 2022.
- Nataraj BH, Ali SA, Behare PV, et al.: *Microb. Cell Fact.* 19, 168 (2020).
- Wegh C, Geerlings SY, Knol J, et al.: *Int. J. Mol. Sci.* 20 (19), 4673 (2019).
- Dinan TG, Stanton C, Cryan JF: *Biol. Psychiatry* 74, 720 (2013).
- Cheng LH, Liu YW, Wu CC, et al.: *J. Food Drug Anal.* 27 (3), 632 (2019).
- Zheng J, Wittouck S, Salvetti E, et al.: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 70 (4), 2782 (2020).
- Zendeboodi F, Khorshidian N, Mortazavian AM, et al.: *Curr. Opin. Food Sci.* 32, 103 (2020).
- Kesen MA, Aiyegoro OA: *Int. J. Food Biosci.* 1 (1), 19 (2018).
- Zhang T, Li Q, Cheng L, et al.: *Microb. Biotechnol.* 12 (6), 1109 (2019).
- El Hage R, Hernandez-Sanabria E, Van de Wiele T: *Front. Microbiol.* 8, 1889 (2019).
- O'Toole P, Marchesi J, Hill C: *Nat. Microbiol.* 2, 17057 (2017).

Souhrn

Horáčková Š., Vrchotová B.: Probiotické mikroorganismy a nové trendy v jejich aplikaci

Probiotické mikroorganismy jsou živé buňky, které při podávání v dostatečném množství, přinášejí konzumentům zdravotní benefity. Nejčastějšími zástupci probiotik jsou bakterie mléčného kvašení a bifidobakterie, ale také zástupci sporulujících druhů rodu *Bacillus* a *Clostridium*, *E. coli* či kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. Článek shrnuje vývoj koncepce probiotik, jejich současné definice a zařazení a definici nových termínů v této oblasti, jako jsou postbiotika, parabiotika a psychobiotika a rovněž pojednává o nové nomenklatuře původního rodu *Lactobacillus*.

Klíčová slova: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, postbiotika, parabiotika

Summary

Horáčková Š., Vrchotová B.: Probiotic microorganisms and new trends in their application

Probiotic microorganisms are living cells which, when administered in sufficient quantities, bring health benefits to consumers. The most common representatives of probiotics are lactic acid bacteria and bifidobacteria, but also representatives of sporulating species of the genera *Bacillus* and *Clostridium*, *E. coli* or the yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. The article summarizes the development of the concept of probiotics, their current definitions and classification, and the definition of new terms in this field, such as postbiotics, parabiotics and psychobiotics. The new nomenclature of the original genus *Lactobacillus* is also discussed.

Keywords: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, postbiotics, parabiotics

KULTIVOVATELNOST BAKTERIÁLNÍCH KOMUNIT ASOCIOVANÝCH S ROSTLINAMI

Eliška Suchopárová

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha; suchopae@vscht.cz

Úvod

Rostliny jsou v průběhu svého života kolonizovány celou řadou mikroorganismů, mezi něž patří široké spektrum bakterií mající pro rostliny prospěšné funkce. Tyto bakterie podporují růst svého rostlinného hostitele a poskytují mu pomoc v přežití stresových podmínek. Díky těmto vlastnostem mají široký potenciál pro praktické využití, například v oblasti zemědělství, farmaceutickém průmyslu, či v bioremediačních technologiích. Pro naplnění potenciálu bakterií asociovaných s rostlinami a jejich využití v průmyslových odvětvích je však nevyhnutelný zisk čisté kultury. Více než 90 % rostlinné mikrobioty však zůstává doposud nekultivovatelných, a za účelem zvýšení efektivity kultivovatelnosti mikroorganismů asociovaných s rostlinami je nutná modifikace doposud používaných standardních kultivačních technik.

Bakterie asociované s rostlinami

Rostliny jsou habitatem obývaným diverzními bakteriálními společenstvy. Složení těchto společenstev závisí na řadě abiotických faktorů (typ půdy, pH, salinita, množství živin přítomných v půdě, vlhkost, teplota, intenzita slunečního záření či přítomnost polutantů vzniklých antropogenní činností), na faktorech biotických (druh či odrůda rostliny, rhizodepozice, přítomnost rostlinných patogenů a herbivorů¹⁻³), a v neposlední řadě také na interakcích mezi jednotlivými mikrobiálními populacemi, jež spolu spolupracují či naopak kompetují o živiny^{2,4,5}.

Řada bakterií s rostlinami asociovaných má pro svou hostitelskou rostlinu prospěšné funkce a podporuje její růst a fitness¹. V průběhu evoluce se bakterie adaptovaly na celou řadu rostlinných habitatů, které dokáží kolonizovat: rhizosféru, endosféru, či fylosféru². Rhizosféra je vrstva půdy v těsné blízkosti kořenů, která je přímo ovlivněna metabolickou aktivitou rostliny. Vlivem depozice rostlinných metabolitů (rhizodepozice) zde dochází, oproti půdě mimo kořenový systém, k nabohacení specifických bakteriálních populací, které tyto látky využívají jako zdroje energie či uhlíku^{1,4,5}. Mikroorganismy označovány jako endofyty kolonizují vnitřní prostředí rostliny, neboli endosféru². Primárním zdrojem endofy-

tů je rhizosféra^{1,6,7}, z níž mikroorganismy do endosféry pronikají skrze trhliny v kořenech⁸. Na utváření endofytních komunit má dále vliv také průnik bakterií kolonizující fylosféru, které do endosféry pronikají skrze průduchy, hydatody, lenticely, či různá poranění nadzemních částí rostlin^{1,2}. Fylosféru tvoří veškerý povrch nadzemních rostlinných pletiv⁹ a k její kolonizaci bakteriemi dochází například prostřednictvím deště, větru nebo pomocí opylovačů, které přenášejí mikroorganismy na svém povrchu z rostliny na rostlinu¹⁰. Interakce mezi fylosférou a mikroorganismy je analogicky jako v případě rhizosféry zprostředkována díky sekreci specifických látek rostlinou na její povrch, kde jsou tyto látky využívány jako růstové substráty⁹.

Funkce bakterií v rostlinách

Rhizosféra, endofytní i fylosféra bakterie mohou mít pozitivní vliv na své hostitele z hlediska podpory růstu a ochrany vůči biotickým a abiotickým stresům^{1,4,11}. Jedny z mechanismů podpory rostlinného růstu prostřednictvím bakteriální aktivity je fixace atmosférického dusíku, solubilizace biologicky nedostupného fosforu, či produkce sideroforů, čímž bakterie zvyšují dostupnost minerálů pro rostlinu. Bakteriální aktivita dále často vede k produkci rostlinných hormonů, čímž dochází k modulaci rostlinného růstu, například zvýšené tvorbě kořenů či nadzemní biomasy, a také k produkci enzymů klíčových pro regulaci biochemických a fyziologických dějů odehrávajících se v rámci rostlinného hostitele, například senescenci^{1,4}.

V boji proti biotickým stresovým faktorům přispívá rostlinná mikrobiota kompetitivní kolonizací rostlinných pletiv, čímž nepřímě brání pomnožení mikrobiálních patogenů; tvorbou látek toxických pro patogeny či herbivory; nebo produkcí organických kyselin a lytických enzymů, jež narušují jejich vnější schránky^{1,2,7}; či indukci imunitní odpovědi rostlin^{2,4,6}. Řada bakteriálních metabolitů též stimuluje odpověď rostlin na abiotický stres. Tyto metabolity mohou působit jako antioxidanty, indukovat syntézu stresových proteinů (proteiny tepelného a chladového šoku), či tvorbu osmoregulačních sloučenin^{1,2,12}. Mikroorganismy asociované s rostlinami záro-

veň dokáží produkovat enzymy zapojené v degradaci antropogenních polutantů či detoxikovat těžké kovy, čímž napomáhají rostlinám přežít i ve znečištěném prostředí^{4,6, 13–15}.

Praktické využití mikroorganismů asociovaných s rostlinami

Prospěšné funkce mikroorganismů asociovaných s rostlinami zmíněné výše mají obrovský potenciál pro praktické využití v průmyslu. Řada rhizosférických i endofytních bakterií se již úspěšně využívá v bioremediačních technologiích, zemědělství, či jako zdroj nových antibiotik^{2,4,5,7}.

Bioremediace je biologický způsob odstranění kontaminantů z prostředí a představuje úspornější a šetrnější alternativu oproti chemicko-fyzikálním metodám remediace¹⁵. Metabolity obsažené v rostlinných exsudátech často obsahují látky, které mohou aktivovat transkripci bakteriálních genů kódujících enzymy pro degradaci specifických kontaminantů^{13, 15–18}. Takto například studie autorů Toussaint et al. (2012) potvrdila u bakterie *Rhodococcus erythropolis* přímou indukci genů kódujících enzymy degradující polychlorované bifenylly kořenovými exsudáty *Arabidopsis thaliana*¹⁹.

Během zemědělské produkce může dojít příčinou fytopatogenních organismů, herbivorů a různých abiotických faktorů k obrovským ztrátám. Vzhledem ke stále rostoucí spotřebě lidské populace je potřeba tento problém řešit a zemědělskou produkci zefektivnit. Aplikace často používaných chemických pesticidů má často za následek ztrátu biodiverzity, zvýšený výskyt rezistentních patogenů a zároveň představuje riziko pro lidské zdraví^{20,21}. Oproti tomu využití mikroorganismů asociovaných s rostlinami představuje udržitelný způsob řešení s pozitivními ekonomickými, sociálními a environmentálními dopady²². Některé bakteriální izoláty, zejména rody *Pseudomonas* a *Bacillus*, jsou již v současnosti využívány jako biohnojiva či biokontrolní agensy²⁰. Tyto bakterie fungují tedy jednak jako podpora růstu rostlin i za nepříznivých podmínek tím, že zvyšují množství dostupných živin pro rostlinu, ale zároveň i jako ochrana před patogeny a hmyzími škůdci^{20, 23–25}.

Endofytní a rhizosférické bakterie představují slibný zdroj nových antimikrobiálních látek, a tedy možné řešení stále rostoucí rezistence lidských patogenních mikroorganismů vůči zavedeným antibiotikům²⁶. Např. endofytní bakterie *Streptomyces* NRRL 30562 je schopna produkovat antibakteriální látky efektivní jak vůči MRSA, tak i proti multi-rezistentním kmenům *Mycobacterium tuberculosis*²⁷. Jiné bakterie asociované s rostlinami produkují lipopeptidy účinné proti dalším lidským patogenům, či látky, jež mohou fungovat jako chemoterapeutika, antioxidanty či imunosupresiva^{2,7}.

Jak již bylo nastíněno, zmíněný potenciál bakterií asociovaných s rostlinami v průmyslu je více než dostatečným důvodem pro modifikaci současných kultivačních postupů a následnou charakterizaci doposud nekultivovatelných bakterií.

Modifikace technik pro kultivaci rostlinné mikrobioty

Přestože v poslední dekádě byla do praxe zavedena celá řada nových metod molekulární analýzy mikrobiomu, například metataxonomická analýza pomocí

sekvenace genu pro 16S rRNA, metagenomika, metatranskriptomika, metaproteomika či metabolomika, kultivační analýza stále zůstává zlatým standardem mikrobiologie. Kromě toho, že pro výše uvedené aplikace je nezbytné izolovat mikroorganismus v čisté kultuře, sekvenace kompletních genomů izolovaných mikroorganismů nám též umožňuje objevovat nové geny či dokonce celé biosyntetické dráhy látek s biotechnologickým potenciálem^{11,26}.

Více než 90 % rostlinné mikrobioty však zůstává doposud nekultivovatelných, což víme díky studiím založeným na kultivačně nezávislých přístupech^{28,29}. Pro snížení tohoto procenta je důležité optimalizovat izolaci endofytních a fylosférických mikroorganismů z rostlinných pletiv a přípravu médií, která by oproti komerčně využívaným laboratorním médiím lépe simulovala přirozené prostředí uvnitř či na povrchu hostitelské rostliny^{2,26}. Možnost simulace přirozeného prostředí a pokrytí nutričních požadavků rostlinné mikrobioty představuje je přidávek rostlinných extraktů do kultivačních médií¹¹. Například autoři Murphy et al. (2015), Eevers et al. (2015), Sarhan et al. (2016, 2019) a Youssef et al. (2016) ukázali vyšší počet kolonie tvořících jednotek (KTJ), vyšší diverzitu kultivovaných endofytních bakterií a rozdíly mezi složením kultivovatelných bakteriálních populací při použití médií založených na rostlinných extraktech oproti komerčním médiím^{30–34}. Výsledky autorů zároveň poukazují na fakt, že v rostlinných pletivech se nacházejí neidentifikované sloučeniny jež pravděpodobně slouží jako růstové faktory pro různé endofytní taxony¹¹. Další možností pro zvýšení kultivovatelnosti bakterií asociovaných s rostlinami představují přidávky signálních molekul hrající klíčovou roli v buněčném cyklu bakterií^{2,26}. Tento přístup může napomoci probouzení doposud nekultivovatelných bakterií z jejich dormantních stavů^{11,35}. Potenciál signálních molekul pro zvýšení kultivovatelnosti byl již demonstrován v případě mořských mikrobiálních komunit autory Bruns & Cypionka (2002)²⁸, doposud však nebyl testován pro mikroorganismy asociované s rostlinami^{11,35}.

Závěr

Bakterie asociované s rostlinami mají široký aplikační potenciál, například v oblasti bioremediace, zemědělství, či ve farmaceutickém průmyslu. Drtivá většina těchto bakterií však stále zůstává nekultivovatelná a jejich potenciál je tudíž nevyužit³⁶. Z tohoto důvodu je žádoucí zaměřit se v budoucích studiích na modifikaci stávajících kultivačních technik pro rhizosférické a endofytní bakterie. Možnou modifikací je například aplikace kultivačních médií založených na extraktech z hostitelské rostliny. Tento přístup byl již použit v několika studiích, přičemž bylo dosaženo zvýšení bakteriální diverzity a nabohacení odlišných bakteriálních taxonů při použití médií z extraktů, oproti kultivaci na komerčních médiích^{29–34}. Signální molekuly fungující jako regulátory genové exprese a řídící fyziologické procesy v bakteriálních buňkách mohou probouzet bakterie z dormantních stavů nebo indukovat katabolické děje³⁷. Přidávek těchto molekul do médií může tedy vést ke zvýšení kultivovatelnosti bakterií, jak bylo již ukázáno ve studii autorů Bruns & Cypionka (2002)²⁸. Zatím však bylo provedeno relativně malé množství studií snažících se ovlivnit kultivovatelnost bakterií asociovaných s rostlinami.

To, jak zmíněné přístupy ovlivňují diverzitu a strukturu kultivovatelných mikrobiálních populací z rostlin a do jaké míry je vhodná kombinace těchto přístupů pro

dosažení co nejvyšší kultivovatelnosti je mimo jiného předmětem zkoumání v Laboratoři Mikrobiální Ekologie na VŠCHT.

Literatura:

1. Compant S, Samad A, Faist H, et al.: *J. Adv. Res.* 19; 29 (2019).
2. Hardoim PR, van Overbeek LS, Berg G, et al.: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 79; 293 (2015).
3. Philippot L, Raaijmakers JM, Lemanceau P, et al.: *Nat. Rev. Microbiol.* 11; 789 (2013).
4. Ahemad M, Kibret M: *J. King Saud Univ. – Sci.* 26; 1 (2014).
5. Datta A, Singh RK, Kumar S, et al.: *Ann. Plant Sci.* 933 (2014).
6. Khare E, Mishra J, Arora NK: *Front. Microbiol.* 9; 1 (2018).
7. Ryan RP, Germaine K, Franks A, et al.: *FEMS Microbiol. Lett.* 278; 1 (2008).
8. Frank A, Saldierna Guzmán J, Shay J: *Microorganisms* 5; 70 (2017).
9. Vacher C, Hampe A, Porté AJ, et al.: *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 47; 1 (2016).
10. Copeland JK, Yuan L, Layeghifard M, et al.: *Mol. Plant-Microbe Interact.* 28; 274 (2015).
11. Papik J, Folkmanova M, Polivkova-Majorova M, et al.: *Biotechnol. Adv.* 44; 107614 (2020).
12. Lu T, Ke M, Lavoie M, et al.: *Microbiome* 6; 1 (2018).
13. Aken B Van, Correa PA, Schnoor JL: *Environ. Sci. Technol.* 44; 2767 (2010).
14. Suman J, Uhlik O, Viktorova J, et al.: *Front. Plant Sci.* 871 (2018).
15. Sylvestre M, Macek T, Mackova M: *Curr. Opin. Biotechnol.* 20; 242 (2009).
16. McGuinness M, Dowling D: *Int. J. Environ. Res. Public Health* 6; 2226 (2009).
17. Mroziak A, Piotrowska-Seget Z, Łabuzek S: *Polish J. Environ. Stud.* 12; 15 (2003).
18. Ojuederie OB, Babalola OO: *Int. J. Environ. Res. Public Health* 14 (2017).
19. Toussaint JP, Pham TTM, Barriault D, et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95; 1589 (2012).
20. Compant S, Duffy B, Nowak J, et al.: *Appl. Environ. Microbiol.* 71; 1 (2005).
21. Timmusk S, Behers L, Muthoni J, et al.: *Front. Plant Sci.* 8; 1 (2017).
22. Trivedi P, Schenk PM, Wallenstein MD, et al.: *Microb. Biotechnol.* 10; 999 (2017).
23. Kumar A, Verma JP: *Microbiol. Res.* 207; 41 (2018).
24. Bano N, Musarrat J: *Curr. Microbiol.* 46; 324 (2003).
25. Özkan Çakici F, Sevim A, Demirbağ Z, et al.: *Turkish J. Agric. For.* 38; 99 (2014).
26. Qin S, Xing K, Jiang JH, et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89; 457 (2011).
27. Ambrose C, Varghese C, Subhash JB: *Pharmacogn. Rev.* 7 (13); 15 (2013).
28. Bruns A, Cypionka H: *Appl. Environ. Microbiol.* 68; 1 (2002).
29. Sarhan MS, Mourad EF, Nemr RA, et al.: *J. Antibiot. (Tokyo)*. 73; 66 (2020).
30. Murphy BR, Batke SP, Doohan FM, et al.: *Int. J. Biol.* 7 (2015).
31. Eevers N, Gielen M, Sánchez-López A, et al.: *Microb. Biotechnol.* 8; 707 (2015).
32. Sarhan MS, Hamza MA, Youssef HH, et al.: *J. Adv. Res.* 19; 15 (2019).
33. Youssef HH, Hamza MA, Fayed M, et al.: *J. Adv. Res.* 7; 305 (2016).
34. Sarhan MS, Mourad EF, Hamza MA, et al.: *Physiol. Plant.* 157; 403 (2016).
35. Gehring C, Turek IS: *Front. Plant Sci.* 8; 1 (2017).
36. Steen AD, Crits-Christoph A, Carini P, et al.: *ISME J.* 13; 3126 (2019).
37. McDonough KA, Rodriguez A: *Nat. Rev. Microbiol.* 23; 1 (2008).

Souhrn

Suchopárová E.: Kultivovatelnost rostlinných bakteriálních komunit

Mikroorganismy asociované s rostlinami mají široký aplikační potenciál například v oblasti bioremediačních technologií, zemědělství, či ve farmaceutickém průmyslu. Pro využití tohoto potenciálu a studium těchto mikroorganismů je však nezbytná jejich kultivace a izolace v čisté kultuře. Problémem ovšem zůstává velmi nízká kultivovatelnost rostlinné mikrobioty a je tedy nutné přistoupit k modifikacím standardních kultivačních technik. Pro zefektivnění kultivace je možno použít média založená na rostlinných extraktech, která by lépe simulovala přirozené životní podmínky pro rostlinnou mikrobiotu, či přidávky signálních molekul, které hrají roli v regulaci buněčného cyklu a v bakteriální komunikaci, do kultivačních médií. I přes vysoký aplikační potenciál rostlinné mikrobioty doposud existuje malé množství studií zaměřujících se na modifikaci stávajících kultivačních přístupů, a je tudíž relevantní se tímto tématem v budoucnu nadále více zabývat.

Klíčová slova: Mikroorganismy asociované s rostlinami, rostlinná mikrobiota, endosféra, rhizosféra, fylosféra, bakteriální komunity, kultivovatelnost, modifikace kultivačních technik, bioremediace, zemědělství, farmaceutický průmysl.

Summary

Suchopárová E.: Culturability of plant bacterial communities

Plant-associated microorganisms have a wide application potential, for example, in bioremediation technologies, in agriculture, or in the pharmaceutical industry. However, to fully exploit this potential and to study these microorganisms, their cultivation and isolation in pure culture is essential. However, the very low cultivability of plant microbiota remains a problem and modifications of standard cultivation techniques are therefore necessary. To improve the efficiency of cultivation, media based on plant extracts could be used, since they can better simulate the natural living conditions of plant microbiota. Another approach for improving the cultivability could be the addition of signalling molecules, which play a role in cell cycle regulation and bacterial communication, into the cultivation media. Despite the high application potential of plant microbiota, there have been only a few studies focusing on the modification of existing culture approaches and thus, it is relevant to further address this topic in the future.

Keywords: Plant-associated microorganisms, plant microbiota, endosphere, rhizosphere, phyllosphere, bacterial community, culturability, modification of cultivation techniques, bioremediation, agriculture, pharmaceutical industry.

OBSAH

Úvodem	1
Informace o současných aktivitách společnosti SOTIO	2
Spiwok V., Trapl D.: Úspěchy projektu alphafold v oblasti predikce prostorových struktur proteinů	3
Kučková Š., Smirnova T., Meledina A., Straka D., Šantrůček J., Hynek R.: Proteomické povídání nejen o tom, jaké obzory otevírá technika „in-sample digestion“ vyvinutá v naší laboratoři	5
Horáčková Š., Vrchotová B.: Probiotické mikroorganismy a nové trendy v jejich aplikaci	6
Suchopárová E.: Kultivovatelnost bakteriálních komunit asociovaných s rostlinami	9

CONTENT

Editorial	1
Information on current activities of SOTIO	2
Spiwok V., Trapl D.: Successes of the alphafold project in the field of protein structure prediction	3
Kučková Š., Smirnova T., Meledina A., Straka D., Šantrůček J., Hynek R.: Proteomic talk not only about the horizons of the “in-sample digestion” technique developed in our laboratory	5
Horáčková Š., Vrchotová B.: Probiotic mikroorganisms and new trends in their application Andreides	6
Suchopárová E.: Culturability of plant bacterial communities	9

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 Skládal, CSc., Ústav biochemie, PřF MU v Brně, Kamenice 753/5, Bohunice, 601 77 Brno (redaktor)
doc. RNDr. Marek Petřivalský, Ph.D., 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, Albertrtov 6, 128 43 Praha 2
RNDr. Milan Fránek, DrSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno
prof. Ing. Ladislav Fukal, CSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
Ing. Jan Kopečný, DrSc., Ústav živočišné fyziologie a genetiky, AV ČR, v.v.i., Videňská 1083, Praha 4
prof. RNDr. Pavel Peč, CSc., Katedra biochemie, Univerzita Palackého v Olomouci, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc
doc. RNDr. Jana Pěkníková, 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 publikační praxe omezen.

Článek má tyto části: Název práce, jména autorů a pracoviště, e-mailová adresa autora, úvod, vlastní text členěný 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 přicházejí 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 nekládejte 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
vydáváných 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>

Neprodejné – jen pro členy Biotechnologických společností.

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