

Bio

Ročník 32 • Číslo 3/2022

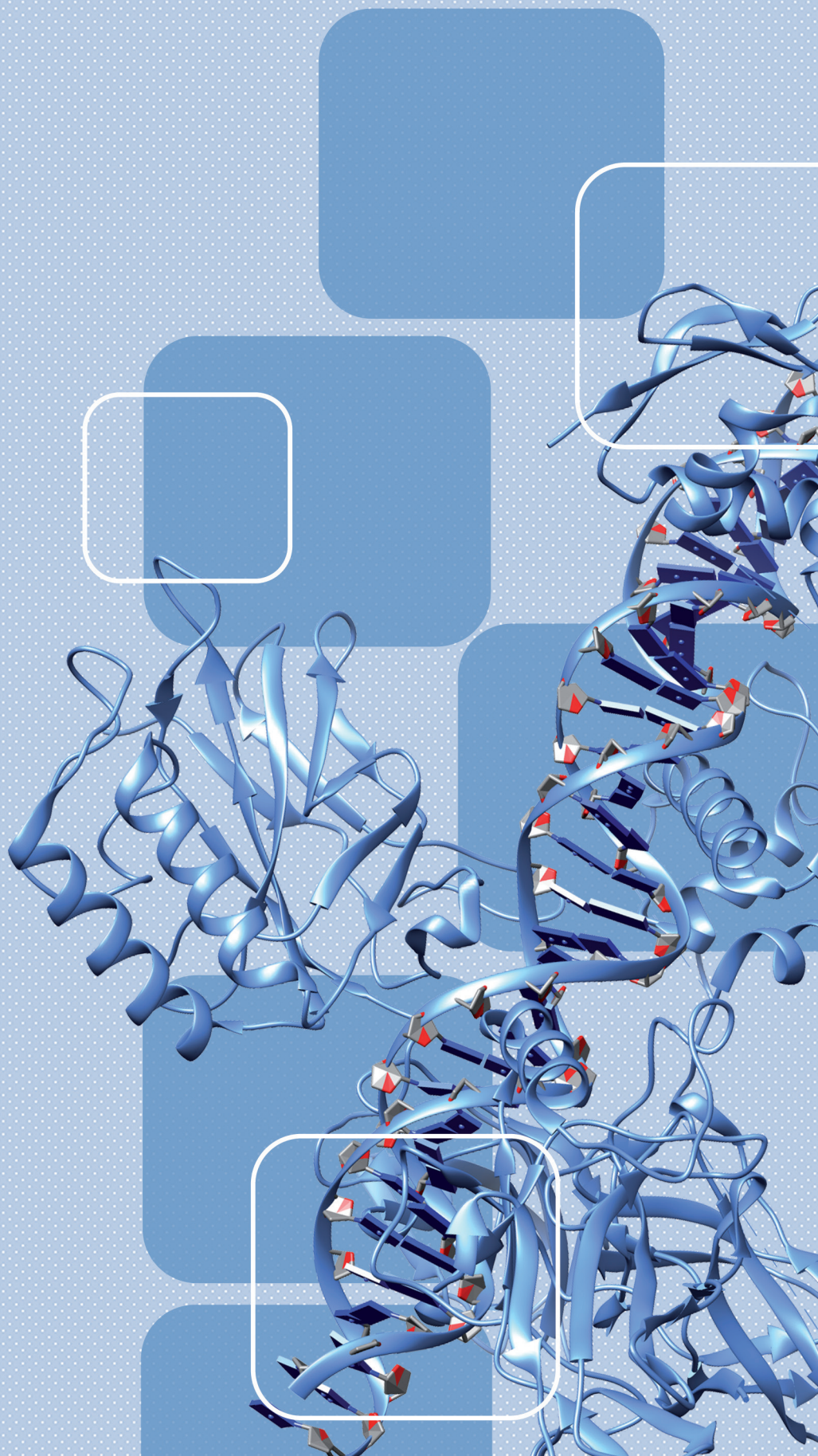
prospect

**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,

ve 3. čísle letošních Bioprospectu bychom Vás rádi seznámili s informací o konání konference „Nové techniky šlechtění“ pořádané spolupracující organizací Biotrin z.s. a zaměřené na geneticky modifikované a geneticky editované potraviny, jejichž vývoj a praktické uplatnění by mělo řešit potravinové problémy na naší planetě.

Další 4 publikované články přináší přehled zajímavých témat řešených na 3 ústavech fakulty FPBT, VŠCHT Praha. V příštích číslech Bioprospectu počítáme s prezentací dalších zajímavých biotechnologických témat řešených i na ostatních ústavech, která jsou prezentována na pravidelných seminářích konaných na VŠCHT.

V tomto čísle našeho Bioprospectu nemůžeme opomenout připomenutí významného výročí zakladatele genetiky. Johan Gregor Mendel se narodil 20. července 1822 v obci Vražné, která je součástí obce Hynčice. Proto se běžně uvádí, že byl hynčický rodák. V jeho rodném domě se připravuje muzeum, které návštěvníky seznámí se šíří jeho zájmů. V r. 1856 zahájil experimenty s křížením rostlin a v r. 1866 formuloval základní zákony dědičnosti. Jeho současníci však neměli ponětí o teorii pravděpodobnosti, a proto Mendelovu práci ignorovali. Teprve v roce 1900 bylo potvrzeno že Mendelova práce vysvětluje dědičnost u rostlin a zvířat. Jeho práce upoutala pozornost až po jeho smrti. Celou tuto smutnou historii připomíná brněnská expozice Mendelianum. V Brně je také řada dalších objektů, které připomínají tuto výjimečnou osobnost.

Mendelovo výročí bylo připomenuto řadou významných událostí. Tou nejvýznamnější byla mezinárodní Mendelova genetická konference podporovaná organizací UNESCO (20. 7. 2020 – 23. 7. 2020) za účasti 3 nobelistů a kolem 4000 účastníků zabývajících se širokým spektrem genetické problematiky. Genetická společnost Gregora Mendela pořádá na zámku Slavkov u Brna ve dnech 5. – 7. 10. 2022 slavnostní konferenci s bohatým vědeckým a společenským programem. Akcí spojených s oslavou zrodu genetiky zásluhou J. G. Mendela proběhlo a probíhá bezpočet nejen v Brně, ale i v jiných lokalitách v Čechách a na Slovensku. Numismatika Ostrava vydala 20. července 2022 následující plaketu:



Naše biotechnologická společnost je vděčná Vysoké škole chemicko-technologické v Praze za trvalou podporu a poskytování možnosti mít zde své sídlo. Vzájemná spolupráce při organizování mnoha mezinárodních akcí a spolupracích se zahraničními institucemi jsou všeobecně známy. U příležitosti 70. výročí samostatné VŠCHT bychom chtěli naše členy i ostatní čtenáře Bioprospectu upozornit na aktivity konané v rámci tohoto výročí, které jsou uvedeny na webových stránkách VŠCHT <http://www.vscht.cz> a dále na nejrůznějších publikacích vzniklých k připomenutí tohoto výročí. VŠCHT vydala ve spolupráci s Národním technickým muzeem obsáhlou publikaci „Zaostřeno na chemii“ (Kapitoly z historie Vysoké školy chemicko-technologické). Autorky publikace Věra Dvořáčková a Ivana Lorencová doplnily zajímavý text bohatým ilustračním materiálem. Výročí VŠCHT bylo připomenuto i v řadě chemických a potravinářských časopisů. Tyto příspěvky se snaží přinést historický pohled na různé události spojené s velmi pestrým spektrem chemických disciplín a událostmi, které jejich rozvoj doprovázely. Např. <http://www.chemicke-listy.cz>, (Chem. Listy 116, 589 – 591 (2022)), <http://www.agral.cz>, Potravinářská revue 2022/5, str. 96.

Připomínáme, že naše střešní organizace ČSVTS organizuje v příštím roce velmi významnou událost „7. světový inženýrský kongres“ (7th World Engineering Convention). Bližší informace jsou k dispozici na adrese <https://www.wec2023.com>.

V současnosti je možné již podávat přihlášky a abstrakta sdělení.



WEC 2023

7TH WORLD ENGINEERS
CONVENTION

PRAGUE, CZECH REPUBLIC

11 – 13 OCTOBER, 2023

Milí čtenáři Bioprospectu,

věříme, že jste během letních dovolených nabrali dostatek sil a jste připraveni se bránit opětovném riziku onemocnění covidem a ekonomickým problémům, které nás čekají. Těšíme se na Vaše příspěvky a pokračující spolupráci.

Se srdečnými pozdravy

Vaši

Jan Káš a Petra Lipovová

NOVÉ TECHNIKY ŠLECHTĚNÍ (NBT) – NADĚJE V BOJI S KLIMATICKOU ZMĚNOU

Kamila Zdeňková, Simona Lencová a Kateřina Demnerová

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha, Kamila.Zdenkova@vscht.cz

Sdružení Biotrin z.s. pořádalo společně s VŠCHT Praha již druhý ročník konference zaměřené na téma nových technik šlechtění rostlin (angl. New breeding techniques, NBT), jejichž cílem je seznámit účastníky s možným využitím NBT při šlechtění zemědělských plodin s žádanými vlastnostmi. Letošní ročník byl zaměřen na možnosti využití potenciálu NBT v boji s klimatickou změnou a byl podpořen CropLife Europe a Českou biotechnologickou platformou pro potraviny při Potravinářské komoře ČR.

Klimatická změna má výrazné dopady na zemědělství a kvalitu života lidí žijících zejména v rozvojových zemích. Stále častější extrémní počasí, zejména extrémní teploty, záplavy, či sucho a ztráty způsobené škůdci a chorobami, výrazně zvyšují již tak alarmující nedostatek potravin ve světě. Ten je dále prohlubován konflikty, aktuálně např. válkou na Ukrajině, které ohrožují zemědělskou produkci a světové zásobování potravinami a krmivy. Kombinace dopadů obou zmíněných faktorů vede k potravinovému protekcionismu, jehož příkladem je zákaz vývozu v Indii vypěstované pšenice. Ačkoli Indie nepatří k největším světovým exportérům pšenice, zákaz by mohl zvednout globální ceny na nové vrcholy vzhledem k již tak omezené nabídce, což by obzvláště tvrdě zasáhlo nejchudší vrstvu obyvatel v Asii a Africe. Zákaz byl okamžitě odsouzen ministry zemědělství z průmyslových zemí G7. Pokud by všichni producenti začali uplatňovat vývozní omezení nebo uzavírat trhy, počet hladovějících by to pravděpodobně ještě zvýšilo. Geneticky modifikované (GM) nebo geneticky editované (GE) plodiny by mohly výrazně přispět k řešení nedostatku/kvality potravin. Na konferenci o této problematice přednášelo a diskutovalo pět kvalifikovaných řečníků.

Úvodní prezentace byla přednesena Dr. Alešem Pečinkou z Ústavu experimentální botaniky Akademie věd ČR v Olomouci a shrnovala novinky ze světa GMO. Zmíněny byly recentní informace ze Světového ekonomického fóra z Davosu, kde byly diskutovány i možnosti řešení klimatických změn. Podle informací OSN se, mimo jiné, kvůli změnám klimatu, konfliktům a pandemii COVID-19 za posledních pět let zvýšil počet hladovějících po celém světě z 80 milionů na 325 milionů lidí, přičemž je odhadováno, že navýšení hladovějících o jedno procento zvyšuje migraci o dvě procenta. Dr. Pečinka vyzdvihl potenciál GM a GE plodin pro řešení světového nedostatku potravin a zmínil několik zajímavých příkladů, např. GE pšenici odolnou vůči padlí či s úpravou zabraňující porůstání obilí semen v klasech, biofortifikované GE rajče s vitamínem D či Bt lilek. Uvedl také celosvětové přehledy regulace GM plodin před pandemií COVID-19 a z roku 2022, který je již nyní považován za přelomový z hlediska legislativy

GM organismů (GMO) – změny se již dějí v Číně, Indii i Velké Británii.

Jediným zahraničním řečníkem letošní konference byl Dr. Frédéric Debode z belgického Walloon Agricultural Research Center (CRA-W) v Gembloux. Ve své prezentaci zaměřené na databáze a detekci GE organismů Dr. Debode srovnal informace o GE plodinách dostupné v různých databázích, jako jsou EUGenius (EUropean GMO INitiative for a Unified Database System), ISAAA (International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications) či databázi vznikající v rámci řešení jejich projektu GENEDIT (RF20/6342). Database GENEDIT je teprve v přípravě, ale od podzimu tohoto roku by měla být veřejně přístupná a informace v ní obsažené budou užitečné nejen pro přehled o GE organismech, ale i pro plánování strategií detekce a kvantifikace GMO, včetně GE rostlin. Právě na aktualizaci dostupných metod detekce GE rostlin byla zaměřena druhá část prezentace. Byly vybrány hlavně metody analýzy DNA, protože je lze snadno implementovat v kontrolních laboratořích. Diskutovány byly přínosy a limity polymerázové řetězové reakce s restričním štěpením amplikonů (PCR RFLP), PCR s fluorescenční detekcí v reálném čase, analýza křivek tání PCR amplikonů pomocí softwarů umožňujících HRM vyhodnocení (High Resolution Melting), digitální PCR, analytické pyrosequenování, vysokovýkonné sekvenování (HTS) s použitím různých metod obohacení. Nebyly opomenuty ani metody detegující proteiny a metabolity (chromatografie LC-HRMS, LC-MS/MS a hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF-MS). Zmíněné metody by měly poskytnout jasný přehled o možnostech odhalování organismů upravených pomocí NBT a poskytnout informovaný názor tvůrcům politik a kontrolním orgánům.

Prezentace Dr. Tomáše Moravce (Ústav experimentální botaniky Akademie věd ČR v Praze) byla zaměřena na příklady editací genomu pomocí rostlinných geminivirů, zejména viru kadeřavosti tabáku (Tobacco rattle virus, TRV), který lze do rostlin dopravit infekcí *Agrobacterium tumefaciens* či PVX vektory připravenými z viru X bramboru. Geminiviry jsou rozmanitou rodinou rostlinných virů s cirkulární jednořetězovou DNA. Infikují rozsáhlou řadu rostlin, především plevely, plodiny a okrasné rostliny, čímž způsobují ztráty v zemědělství a zahradnictví po celém světě. Mimo použití upravených rostlinných virových vektorů byla vysvětlena i zajímavá GE metoda indukce transgenních výhonků na rostlinách pěstovaných v půdě (tzv. *de novo* induction of meristems), která nezahrnuje *in vitro* regeneraci editovaných rostlin. Vektory připravené z rostlinných virů jsou výkonné, rychlé a efektivní nástroje použitelné pro editaci rostlin, které nejsou závislé na kultivaru modifikované rostliny. Jejich aplikace byly zatím popsány

u modelových rostlin (tabák, huseníček apod.), dosud však nebyla prokázána užitečnost použití při modifikaci plodin. Jejich použití navíc zatím stále vyžaduje buď transgenní rostlinu (např. s Cas9) nebo krok zahrnující tkáňové kultury. Vývoj těchto vektorů pro použití k úpravě genomu zemědělských plodin je zaměřen na platformu, která by nevyžadovala kultivaci *in vitro* a/nebo transgenní rostliny.

Dr. Roman Hobza z Biofyzikálního ústavu AV ČR v Brně se své prezentaci zamýšlel nad genetickými modifikacemi z pohledu základního i aplikovaného výzkumu, a to jak v medicíně, tak i v zemědělství. Ve výzkumných laboratořích je v posledních letech pro editace nejčastěji používána metoda CRISPR, ve firemních laboratořích jsou výsledky zaváděné do aplikační praxe často získávány editací prováděnou i pomocí nukleas naváděných zinkovými prsty (ZFN) či TALE sekvencemi, protože jsou schopné dosáhnout vysoce účinného specifického zásahu. Ve vývoji jsou i CRISPR terapeutické nástroje pro léčbu např. dystrofií (Duchennova muskulární dystrofie, DMD) či cystické fibrózy. Pokud jde o editace rostlin, v minulosti byli hlavními hráči v jejich vývoji i aplikaci zástupci šesti firem: Monsanto, DUPont, Dow TDC, Syngenta, BASF a Bayer (GMOs: The Big Six). V současné době je známo více než 100 společností vyvíjejících editované rostliny, živočichy, léčivé přípravky i aplikujících genové terapie. Nejčastěji jsou prováděny modifikace rostlinného genetického materiálu vedoucí ke zvýšené odolnosti vůči hmyzům škůdcům, herbicidům a rostlinným virům. Vyvíjeny jsou však i rostliny/plodiny odolné k suchu nebo určené k vyššímu zachytu a uchovávání uhlíku (ovlivnění fotosyntézy). Velmi zajímavá je aktivita firmy Celectis, jejíž dceřiná společnost Calyxt od roku 2010 pomocí GE metod vyvíjí a poté pěstuje zdravější rostlinné složky potravin. V jejich portfoliu GE rostlin je sója s knockautem genů *FAD2-1 A* a *FAD2-1 B* vedoucích ke zvýšení obsahu mononenasyčených mastných kyselin v oleji. Ve třetí fázi vývoje je lépe stravitelná modifikovaná vojtěška a pšenice s vysokým obsahem vlákniny. Na základě dohody mezi Minnesotskou univerzitou a firmou Celectis jsou využívány patenty vlastněné Minnesotskou univerzitou. Calyxt zvolil hlavně TALEN® pro vývoj svých potravinářských produktů, společnost dále testuje nové technologie úpravy genů a vyvíjí nové metody a přístupy k úpravě rostlinných genů. V roce 2021 svou nabídku modifikovaných rostlin rozšířila i o bioreaktor nazvaný BioFactory, což je produkční systém schopný nepřetržitě výroby chemických látek produkovaných rostlinnými buňkami. Výzkumníci z Calyxt věří, že jejich produkční systém je schopen ulehčit a urychlit výrobu sloučenin, které jsou obtížně získatelné udržitelným způsobem nebo které nelze vyrobit pomocí jiných technologií, jako je třeba kultivace izolovaných rostlinných buněk.

Na konci prezentace Dr. Hobza informoval o otevření brněnské Aplikační laboratoře pro zemědělské biotechnologie (spadá pod Biofyzikální ústav), jejíž je koordinátorem (více info na <https://laba.ibp.cz/>).

Konferenci zakončil RNDr. Slavomír Rakouský s prezentací o NBT v širších souvislostech, která přehledně shrnovala současný stav regulací GE/GMO ve světě. Jak je již všeobecně známé, v USA probíhají regula-

ce nových GMO/NBT organismů podle znaku, nikoliv podle metody použité při jejich vývoji. Kritéria pro regulace GE rostlin v USA zahrnují i rostliny připravené GE technikami s opravou cílového zlomu dsDNA bez přítomnosti externě dodaného templátu (nehomologní spojení konců, NHEJ), (ii) náhradu konkrétní báze genomu rostliny, (iii) zavedení genu, o němž je známo, že se vyskytuje v genovém poolu rostliny nebo změna v cílové sekvenci, která koresponduje se známou alelou daného genu nebo známé strukturální variantě přítomné v genovém poolu a (vi) rostliny obsahující kombinaci rostlina-znak-mechanismus účinku již posouzený APHIS a uznaná za neregulovanou ("I am regulated" process).

V EU podle rozhodnutí Soudního dvora z července 2018 spadají i organismy získané novými technikami mutagenese pod předpisy o GMO. S tím nesouhlasí mnoho členských států, zainteresovaných subjektů (průmysl, zemědělství, šlechtitelé, vědci, atd.), naopak jej uvítali zástupci ekologického zemědělství a aktivisté. V lednu 2022 oznámila Velká Británie zjednodušení pravidel pro výzkum a vývoj GE rostlin, které umožní odpoutat se v dané oblasti od EU legislativy a tím by mělo dojít k urychlení výzkumu, šlechtění a zavádění nových GE odrůd. Velká Británie si od tohoto kroku slibuje, že by se do roku 2030 měla dostat do pozice velmoci v udržitelnosti zemědělství přátelskému ke klimatu a současně v uchování biodiverzity.

EK publikovala v roce 2021 výsledky studie o postavení nových genomických technik podle práva Unie (https://ec.europa.eu/food/system/files/2021-04/gmo_mod-bio_ngt_eu-study.pdf). Pro tuto studii jsou „nové genomové techniky“ (NGT) definovány jako techniky, které jsou schopny změnit genetický materiál organismu a byly vyvinuty po roce 2001, kdy byla definována současně platná EU legislativa o GMO. V závěrech zprávy se mimo jiné konstatuje, že vývoj biotechnologií v kombinaci s nedostatkem definic klíčových termínů mohou vést k regulační nejistotě. Některé z NGT rostlinných produktů mají potenciál přispět k cílům EU Green Deal a zejména 'Farm to Fork' a strategiím biodiverzity a cílům udržitelného rozvoje. Někteří zúčastnění namítají, že tyto benefity jsou hypotetické a dostupné jinak než prostřednictvím biotechnologií. Konkrétně organický a tržní sektory preferující výrobky bez GMO. Prezentace byla zakončena úvahou, zda se EU vyrovná s druhou (poslední?) biotechnologickou šancí, celá konference pak příjemnou diskusí.

Cíl konference, seznámit účastníky s potenciálem NBT pro zemědělství a potravinový řetězec a s jejich využitelností v boji s klimatickou změnou, byl beze zbytku splněn. Prezentace jsou uveřejněny na stránkách: <https://www.biotrin.cz/komentar-ke-konferenci-nbt-nadeje-v-boji-s-klimatickou-zmenou-aneb-zabrani-nbt-hladomoru/>. Prezentace z prvního ročníku konference konané v roce 2018, na které byly představeny mj. projekty v oblasti výzkumu NBT v ČR a praktické zkušenosti s NBT ze zahraničí, jsou dostupné na: <https://www.biotrin.cz/nbt-conference/>.

PŘEHLED METOD POUŽÍVANÝCH PRO ZJIŠTĚNÍ ŽIVOČIŠNÉHO PŮVODU KREVNÍCH STOP

David Straka¹, Alena Meledina¹, Tatiana Anatolievna Smirnova^{1,2}, Štěpánka Kučková^{1,2}¹VŠCHT Praha, Ústav biochemie a mikrobiologie, ²PedF UK, Katedra chemie a didaktiky chemie; kuckovas@vscht.cz

Úvod

Důležitou součástí forenzních biologických věd je identifikace původu podezřelého krevního vzorku. V současné době je velký zájem nejen o schopnost rozlišit lidskou a zvířecí krev, ale i identifikovat živočišný druh, z něhož krevní skvrna pochází. Identifikace živočišného druhu z krevního vzorku se využívá u automobilových nehod, u nelegálního lovu zvířat, při kontrole krve v dovozních a vývozních přístavech a u archeologických nálezů.

Metody identifikace krevních vzorků

V prvním kroku při nálezů podezřelé skvrny je zapotřebí identifikovat, zda-li se jedná o krevní stopu či nikoli. K tomuto účelu se nejčastěji používají katalytické barevné testy, které využívají pseudoperoxidasové aktivity hemové skupiny hemoglobinu. Pseudoperoxidasová aktivita urychluje rozklad peroxidu vodíku, čímž dochází k oxidaci činidla, které se změnou svého oxidačního stavu mění i svoji barvu. Jako chromogenní činidla se v rámci těchto testů používá značné množství látek (Tab. I).

Výhodou katalytických testů je jednoduché použití, velká citlivost (detekce v řádech ng) a možnost použití přímo na místě činu. Testy jsou ovšem náchylné na výskyt falešně pozitivních výsledků, proto se používají jen jako předběžné indikátory přítomnosti krve, která musí být následně potvrzena¹⁻³.

Jako potvrzovací testy se používají mikrokrytalické testy, kdy se pod mikroskopem sleduje tvorba specifických krystalů derivátů hemoglobinu, např. heminu, hemochromogenu či hematinu. Mikrokrytalické testy ovšem nejsou schopny rozlišit, zda se jedná o lidskou či zvířecí krev⁴.

Většina metod, které jsou používány pro identifikaci původu krevního vzorku, vycházejí z rozpoznání druhu

živočichů na základě rozdílů v aminokyselinovém složení jejich hemoglobinů. Jedná se především o metody kapalinové chromatografie, Ramanovu nebo infračervenou spektroskopii či metody hmotnostní spektrometrie⁵⁻⁷.

Využití hemoglobinu jako identifikační marker je výhodné především proto, že proteiny vykazují značnou stabilitu. Sensabaugh *et al.*⁸ prokázal biologickou aktivitu proteinů ve 20 let starých lyofilizovaných vzorcích krve, 40 let starých vzorcích plné krve a v až 2000 let starých rostlinných semenech. Dále tvrdí, že agregací bílkovin vznikají vysokomolekulární proteiny, čímž se bílkoviny stávají méně rozpustné a méně náchylné na odstranění vodou. Loy⁹ dále předpokládá existenci elektrostatických interakcí mezi částicemi půdního jílu a krevními proteiny. Tím dochází k částečné izolaci krve, půda na krevní skvrně ochraňuje proteiny před napadením mikroorganismy či odstranění krevní skvrny podzemní vodou.

Mezi metody, které pro identifikaci krevního vzorku nevyužívají hemoglobin, patří např. DNA analýza či imunochemické metody. V současné době je DNA profilování a následné porovnávání výsledků s databází nejhojněji využívaná metoda identifikace původu krevního vzorku. Tato metoda je ovšem dost časově i finančně náročná, proto jsou velké snahy o objevení novějších, levnějších a rychlejších metod¹⁰.

Stručný přehled jednotlivých metod používaných pro identifikaci krevních vzorků a jejich výhody a nevýhody jsou uvedeny dále.

Imunochemické metody

Imunochemické testování je oblíbenou metodou pro identifikaci zvířecího druhu z krevní skvrny. Principem této rychlé a citlivé metody je reakce antigenu se specifickou protilátkou, nejčastěji imunoglobulinem IgG. Nicméně, pro správný průběh reakce je podmíněna

Tabulka I. Přehled katalytických barevných testů používaných ke zjištění přítomnosti krve³.

Název testu	Činidlo	Barvená změna
Benzidinový test	Benzidin	Bez barvy → modrá
o-tolidinový test	o-tolidin	Žlutá → modrá/zelená
Kastleho-Meyerův test	Redukovaný fenoltalein	Bez barvy → růžová
Leukomalachitová zeleň	Redukovaná leukomalachitová zeleň	Bez barvy → modro-zelená
Hemastix®	3,3',5,5'-tetramethylbenzidin	Oranžová → modrá/zelená
Luminolový test	Luminol	Bez barvy → modrá chemiluminiscence

znalost a dostupnost specifické protilátky pro každý zvířecí druh. Dalším limitujícím faktorem této metody je, že tyto protilátky mají omezenou stabilitu¹¹.

Nejvíce používanými imunochemickými metodami pro identifikaci zvířecích druhů z krevních vzorků jsou metody ELISA (enzymová imunoanalýza) a RIA (radioimunoanalýza).

Použití metody ELISA vykazuje vysokou specifitu, citlivost a nízký detekční limit (v řádech nanogramů až pikogramů)¹². Navíc použití této metody je poměrně levné a dá se použít přímo na místě činu. Je ovšem nutné podotknout, že úspěšná detekce a identifikace krevních antigenů závisí na biologické aktivitě vzorku, citlivosti antiséra a citlivosti testovaného zvířecího druhu^{12,13}.

Mezi výhody při použití RIA metod patří vysoká specifita, citlivost a nízký detekční limit¹². Lowenstein *et al.* se zabýval identifikací zvířat z krevních skvrn pomocí radioimunoanalýzy¹⁴. Studie byla provedena celkem na 43 vzorcích, mezi které byly zahrnuty i kontrolní slepé vzorky či směsi krve dvou různých zvířat. Tři vzorky vykazovaly falešně pozitivní výsledek, u šesti vzorků binární směsi krve byl identifikován pouze jeden druh zvířete ze směsi. Zbýlých 34 vzorků bylo identifikováno správně.

Tato metoda je ovšem poměrně finančně náročná, nese s sebou zdravotní rizika spojené s prací s radioaktivními nuklidy a nutnost likvidace radioaktivního odpadu¹².

V dnešní době jsou imunochemické testy používány především pro rozlišení mezi lidskou a zvířecí krví^{15,16}. Hojně jsou také využívány v potravinářství k odhalování padělání masa a masných výrobků a pro kontrolu kvality výrobků¹⁷⁻¹⁹.

DNA analýza

K identifikaci je používána analýza mitochondriální DNA, jelikož je ve vzorku obsažena ve větším množství než DNA nukleární²⁰. Výsledky DNA analýzy jsou následně porovnány s referenčním vzorkem či s daty v databázích (GenBank).

Nevýhodou této metody je ovšem omezené použití v případě archeologických nálezů. U molekuly DNA starší než 10 000 let hovoříme o tzv. ancientDNA (aDNA)²¹, u níž velmi často dochází k degradaci molekul nukleové kyseliny. Míra poškození vzorku závisí na geografickém umístění vzorku, intenzitě UV záření, teplotě prostředí a aktivitě hmyzu a masožravců^{22,23}. Vlivem těchto podmínek dochází k dvouřetězcovým zlomům v molekule DNA či oxidativním modifikacím nukleotidů. Postupem času dochází ke zničení většiny molekul DNA²⁴⁻²⁶. Dissing *et al.*²⁶ se zabýval studií stability DNA molekul v krevních skvrnách v různých podmínkách skladování. Při uchovávání vzorku při teplotě do 45 °C a relativní vlhkosti do 93 % uvádí amplifikovatelnost DNA pouze v řádech měsíců.

Dalším možným rizikem je kontaminace endogenní aDNA exogenní DNA. Tato kontaminující DNA může pocházet z bakterií, hub a z populace živých lidí či zvířat (tzv. moderní DNA)^{21,27}. V tomto případě je důležité dodržování kontroly kontaminace, aby došlo k minimalizování toho vlivu či dokonce k jeho zabránění²⁸.

Ramanova a infračervená spektroskopie

Nespornou výhodou těchto metod je možnost rychlé, nedestruktivní analýzy, což je výhodné, zejména pokud je k dispozici jen stopové množství vzorku^{29,30}. Další výhodou je možnost analýzy přímo na místě činu pomocí přenosných Ramanových a infračervených spektroskopů³¹.

Nevýhodou obou metod je ovšem silná interference signálu substrátu se signálem vzorku, přičemž signál substrátu, na kterém je krevní skvrna vytvořena, může být i vyšší, než je samotný signál biologického vzorku. Pro eliminaci interference je doporučováno provádět korekci „baseline“ spektra, úpravu vlnové délky laseru či odečtení signálu homogenního substrátu. Použití těchto úprav je ale o poznání náročnější, pokud je substrát heterogenní či vykazuje fluorescenční aktivitu.^{6,31,32}

Kapalinová chromatografie a metody hmotnostní spektrometrie

V současnosti jsou pro identifikaci krevních skvrn používány metody kapalinové chromatografie (LC) na reverzní fázi, metody hmotnostní spektrometrie a kombinace obou přístupů.

Studii rozlišení zvířecího druhu z krevních skvrn a krevních směsí na LC s reverzní fází provedl například Espinoza *et al.*¹³. Tato studie byla provedena s krevními vzorky asi 50 druhů zvířat ze 14 čeledí. Podle výsledků je zřejmé, že asi 50 % aminokyselinových sekvencí α a β řetězců hemoglobinu je stálých, kdežto zbylých asi 50 % sekvencí prochází neutrálními substitucemi, což umožňuje rozdílnou retenci na koloně a tím i rozdílné retenční časy. Studie dokazuje možnost rozlišení jednotlivých zvířecích druhů použitím dané metody, kromě jedinců čeledi medvědovití, kde nelze rozlišit jednotlivé druhy v rámci čeledi.

Van Steendam *et al.* se zabývala rozlišením původu různých krevních vzorků na přístroji typu LC-ESI-Q-TOF (kapalinová chromatografie – ionizace elektro-sprejem – kvadrupólový analyzátor – analyzátor doby letu)³³. Jako identifikační marker krevních skvrn byla opět používána rozdílnost α a β řetězců hemoglobinu jednotlivých živočišných druhů. Tato studie dokázala rozlišit hovězí, lidskou a psí krev.

V diplomové práci³⁴ se podařilo rozlišit krev člověka, husy, kočky, kura, psa, prasete a tura pomocí LC-ESI-Q-TOF a MALDI-TOF (matricí asistovanou laserovou desorpce a ionizací spojenou s analyzátozem doby letu). Byly nalezeny charakteristické hodnoty m/z (pro MALDI-TOF MS) a aminokyselinové sekvence (pro LC-ESI-Q-TOF). V práci se také testovaly různé podmínky štěpení neupravované a delipidované krve enzymem trypsinem, a to přítomnost organického rozpouštědla isopropanolu o různých koncentracích. Tento způsob identifikace živočišného původu krve má řadu výhod, např. je možné mezi laboratořemi sdílet zjištěné charakteristické hodnoty a celá analýza a vyhodnocení je relativně rychlé a snadné.

Závěr

V současné době existuje bohatá nabídka různých bioanalytických metod, kterými lze určit živočišný původ krve. Většina z těchto metod vykazuje řadu nedostatků,

které ale dokáží překonat pokročilé techniky hmotnostní spektrometrie. Například pomocí MALDI-TOF MS a LC-ESI-Q-TOF lze rozlišit jednotlivé zvířecí druhy na základě rozdílného proteinového složení krve. Uvedené metody hmotnostní spektrometrie využívají charakteristické hodnoty m/z nebo aminokyselinové sekvence krevních proteinů, které umožňují snadnou a rychlou identifikaci živočišného původu krevních vzorků a jsou přenosné mezi laboratořemi.

Literatura

1. Quickenden TI, Cooper PD: *Luminescence*. 16(3), 251 (2001).
2. Butler J, Chaseling J, et al.: *J Forensic Sci*. 64(6), 1838 (2019).
3. Webb JL, Creamer JI, et al.: *Luminescence*. 21(4), 214-220 (2006).
4. De Wael K, Lepot L, et al.: *Forensic Sci Int*. 180(1), 37 (2008).
5. Bai P, Wang J, et al.: *Anal Lett*. 50(2), 379 (2017).
6. Dong J, Hong M, et al.: *J Chemom*. 33(11), 3184 (2019).
7. Zhang L, Zhang S, et al.: *Infrared Phys Technol*. 81, 210 (2017).
8. Sensabaugh GF, Wilson AC, et al.: *Int J Biochem*. 2(11), 545 (1971).
9. Loy TH: *Science*. 220(4603), 1269 (1983).
10. Doty KC, Lednev IK: *Forensic Sci Int*. 282, 204 (2018).
11. Parson W, Pegoraro K, et al.: *Int J Legal Med*. 114(1), 23 (2000).
12. Hyland D, Tersak J, et al.: *Am Antiq*. 55, 104 (1990).
13. Espinoza EO, Kirms MA, et al.: *J Forensic Sci*. 41(5), 804 (1996).
14. Lowenstein JM, Reuther JD, et al.: *Forensic Sci Int*. 159(2), 182 (2006).
15. Hurley I, Cook R, et al.: *Forensic Sci Int*. 190, 91 (2009).
16. Tomar S, Mishra M, et al.: *Int J Soc Relev Concern*. 3, 48 (2015).
17. Giovannacci I, Guizard C, et al.: *Int J Food Sci Technol*. 39(8), 863 (2004).
18. Asensio L, González I, et al.: *Food Control*. 19(1), 1 (2008).
19. Mandlí J, El Fatimi I, et al.: *Food Chem*. 255, 380 (2018).
20. Greenwood AD, Capelli C, et al.: *Mol Biol Evol*. 16(11), 1466 (1999).
21. Mai LL, Owl MY, et al. (2005): *The Cambridge Dictionary of Human Biology and Evolution*. Cambridge University Press.
22. Hunter JF (2001): Foreward, a pilgrim in forensic archaeology: a personal view. In: *Advances in Forensic Taphonomy, Method, Theory, and Archaeological Perspectives*. (Haglund WD, Sorg MH, eds.), CRC Press, Londýn.
23. Capelli C, Tschentscher F, et al.: *Forensic Sci Int*. 131, 59 (2003).
24. Lindahl T: *Nature*. 362(6422), 709 (1993).
25. Höss M, Jaruga P, et al.: *Nucleic Acids Res*. 24(7), 1304 (1996).
26. Dissing J, Søndervang A, et al.: *J Forensic Leg Med*. 17(7), 392 (2010).
27. Handt O, Höss M, et al.: *Experientia*. 50(6), 524 (1994).
28. Yang DY, Watt K: *J Archaeol Sci*. 32(3), 331 (2005).
29. McLaughlin G, Doty KC, et al.: *Anal Chem*. 86(23), 11628 (2014).
30. Mistek E, Lednev IK: *Anal Bioanal Chem*. 407(24), 7435 (2015).
31. McLaughlin G, Lednev IK: *J Forensic Sci*. 60(3), 595 (2015).
32. McLaughlin G, Sikirzhyski V, et al.: *Forensic Sci Int*. 231(1), 157 (2013).
33. Van Steendam K, De Ceuleneer M, et al.: *Int J Legal Med*. 127(2), 287 (2013).
34. Loukotová A: Diplomová práce. VŠCHT Praha 2021.

Souhrn

Straka D., Meledina A., Smirnova T. A., Kučková Š.: Přehled metod používaných pro zjištění živočišného původu krevních stop
Zatímco zjištění, jestli podezřelá skvrna může být krevní stopa je dnes jednoduše vyřešeno pomocí katalytických barevných testů, otázka určení živočišného původu krve stále není uspokojivě vyřešena, ačkoliv se jí pokouší zodpovědět celá řada analytických metod. V současné patří mezi nejpobulárnější metody hmotnostně spektrometrické techniky, které v sobě skrývají značný potenciál.

Klíčová slova

Krev, živočišné druhy, analytické metody, identifikace, proteomika

Summary

Straka D., Meledina A., Smirnova T.A., Kučková Š.: Overview of methods used to determine the animal origin of blood traces
While determining whether a suspected stain may be a trace of blood is now easily solved using catalytic colour tests, the question of determining the animal origin of blood is still not satisfactorily resolved, although a number of analytical methods attempt to answer it. Currently, one of the most popular methods are mass spectrometric techniques, which show considerable potential.

Keywords

Blood, animal species, analytical methods, identification, proteomics

Poděkování

Autoři především děkují Adélce Loukotové, z jejíž diplomové práce tento článek vychází. Tento výstup vznikl v rámci projektu Specifického vysokoškolského výzkumu – projektů č. A1_FPBT_2022_001, A2_FPBT_2022_041, A2_FPBT_2022_042.

HOUBA *Monascus* A JEJÍ METABOLITY

Husáková Markéta¹ a Patáková Petra¹

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha; petra.patakova@vscht.cz

Vláknitá houba *Monascus* patří mezi mikromycety a je známá především v některých zemích jihovýchodní Asie, například v Číně, Taiwanu, Japonsku a na Filipínách. Po staletí se zde využívá v potravinářství k barvení potravin, výrobě rýžového vína a octa a také v lidové medicíně (nyní jako doplněk stravy). Nejčastěji je houba *Monascus* pěstována na rýžových zrnech, kdy výsledkem kultivace je tzv. červená fermentovaná rýže. V Evropské unii, potažmo i v České republice je povoleno prodávat doplněk stravy, obsahující tuto rýži a používat zdravotní tvrzení „Monakolin K z červené fermentované rýže přispívá k udržení normální hladiny cholesterolu v krvi“¹. Podmínkou však je vyhovění limitu pro maximální koncentraci mykotoxinu, citrininu, v tomto výrobku 100 µg/kg². Citrinin totiž může být některými kmeny houby *Monascus* za vybraných podmínek také vytvářen. V Asii se prášek z červené rýže nebo extrakt z mycelia této houby přidává jako barvící prostředek do různých potravin jako jsou masné výrobky nebo cukrovinky. Speciálně připravená červená fermentovaná rýže se také používá jako inokulum a zdroj enzymů (tzv. koji nebo qu) k produkci rýžového vína, pálenky nebo octa.

Rod *Monascus* je příbuzný rodu *Aspergillus* i *Penicillium*, nejznámější jsou jeho druhy, tvořící pigmenty, řazené do sekce Rubri, konkrétně *Monascus purpureus*, *Monascus pilosus* a *Monascus ruber*³. Tyto druhy patří mezi homothalické, saprofytní houby, které se rozmnožují nepohlavně konidiemi a pohlavně pomocí askospor. Aský, ve kterých jsou askospory uloženy, jsou sdružené po několika do kulových plodnic, kleistothecií⁴ (Obr. 1). Houbu můžeme zařadit mezi saprofytní organismy, schopné využívat jak respirační tak fermenta-

tativní katabolické dráhy a vytvářet etanol, organické kyseliny a sekundární metabolity podle typu kultivace a použitého kmene. Pro pěstování houby *Monascus* je možné využít různé mono-, di- a polysacharidové substráty jako je glukosa, sacharosa nebo škrob a kultivaci je možné provádět v širokém rozmezí pH (2 až 8)⁵. Využívá se nejen tradiční kultivace na pevném substrátu, ale i kultivace v kapalném médiu.

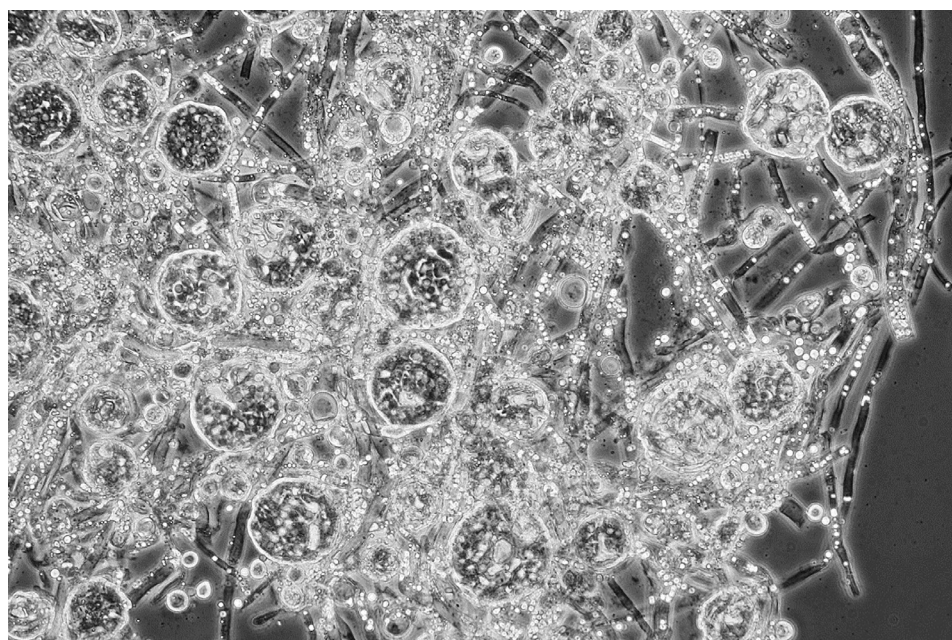
Mycelium houby *Monascus* bývá nápadně červeně zbarvené, což je dáno produkcí sekundárních metabolitů, oligoketidových pigmentů. Tyto pigmenty se rozlišují podle zbarvení na žluté, oranžové a červené a jsou tvořeny při polyketidové biosyntéze. Základní část struktury pigmentů je výsledkem enzymové syntézy, katalyzované polyketid synthasou typu I, při které se jako základní stavební jednotky využívají acetyl-CoA, malonyl-CoA a S-adenosylmethionin. Tato základní struktura je dotvářena dalšími enzymy a je k ní přidáván postranní řetězec mastné kyseliny⁶. Takto jsou syntetizovány žluté pigmenty (ankaflavin a monascin) a oranžové pigmenty (rubropunktatin a monascorubrin), zatímco červené pigmenty vznikají neenzymově, chemickou reakcí oranžových pigmentů a látek s primární aminoskupinou (např. aminokyselin) za vhodného pH. Barevných látek, vznikajících jak biosynteticky tak chemickými reakcemi, bylo z různých kmenů houby *Monascus*, kultivovaných za různých podmínek, izolováno více než 100⁷.

Kromě pigmentů mohou být tvořeny za určitých podmínek vybranými kmeny i další sekundární metabolity. Jedním z nich je monakolin K, látka se statinovou aktivitou, která je kompetitivním inhibitorem *de novo* syntézy cholesterolu. Další takovou látkou je mykotoxin citrinin. Jak monakolin K, tak citrinin také patří mezi

polyketidy^{8,9}. Produkci nežádoucího mykotoxinu, citrininu, lze eliminovat nebo alespoň snížit výběrem kmene a také vhodných kultivačních podmínek.

U pigmentů tvořených houbou *Monascus* byly popsány různé biologické aktivity jako je antimikrobní, protizánětlivá, antikancerogenní, antidiabetická a další⁵. Tyto aktivity, popsané různými autory, je dosti obtížné srovnávat mezi sebou vzhledem k různým podmínkám použitých testů a také vzhledem k využití komplexních, nedostatečně charakterizovaných extraktů k těmto testům. Zdá se však nesporné, že určitou biologickou aktivitu tyto sekundární metabolity mají.

Jedním z možných využití pigmentů z houby *Monascus*



Obr. 1: Plodnice (kleistothecia) houby *Monascus* sp. pod mikroskopem (zvětšení 400x)

je barvení masných výrobků, kde by mohly nahradit dusitanové soli (kombinace $\text{NaNO}_2/\text{NaNO}_3$ a NaCl), podezřelé z kancerogenní aktivity. Důvodem přidavku dusitanových solí do masných výrobků je potlačení klíčení spor *Clostridium botulinum* a také dosažení atraktivní barvy výrobku při vzniku růžového komplexu nitroso myoglobinu. Pigmenty z houby *Monascus* v podobě extraktu z červené fermentované rýže byly proto testovány v modelové studii zaměřené na potlačení klíčení bakteriálních spor, přičemž bylo prokázáno, že podobně jako dusitany a dusičnany, mají v kombinaci s kuchyňskou solí (NaCl) schopnost zabránit klíčení jak sporám *Clostridium beijerinckii* tak *Bacillus subtilis*¹⁰.

Literatura:

1. Commission Regulation (EU) No 432/2012 of 16 May 2012 establishing a list of permitted health claims made on foods, other than those referring to the reduction of disease risk and to children's development and health.
2. Commission Regulation (EU) 2019/1901 of 7 November 2019 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of citrinin in food supplements based on rice fermented with red yeast *Monascus purpureus*.
3. Yang Y, Liu B, et al.: *Sci Rep* 5(1), 8331 (2015).
4. Husáková M: *Chem listy* 115(6), 295 (2021).
5. Pataková P: *J Ind Microbiol Biotechnol* 40(2), 169 (2013).
6. Chen W, Chen R, et al.: *Chem Sci* 8(7), 4917 (2017).
7. Chen W, Feng Y, et al.: *Nat Prod Rep* 36(4), 561 (2019).
8. Wen Q, Cao X, et al.: *Open Chem J* 18(1), 10 (2020).
9. Zhang H, Ahima J, et al.: *Food Res Int* 141 (110075 (2021).
10. Husakova M, Plechata M, et al.: *Front Microbiol* 12(1254), (2021).

Souhrn

Husáková M., Patáková P.: Houba *Monascus* a její metabolity

Rod vláknitých hub, *Monascus*, se využívá v asijských zemích v potravinářském průmyslu, zatímco v Evropě je málo známý. Cílem publikace je stručné seznámení s houbami tohoto rodu, jejich rozmnožováním, využitím, produkcí sekundárních metabolitů a s vybranými biologickými aktivitami těchto metabolitů.

Klíčová slova: *Monascus*, červená fermentovaná rýže, polyketidy

Summary

Husáková M., Patáková P.: *Monascus* and its metabolites

The genus of filamentous fungi, *Monascus*, is used in Asian countries in the food industry, while it is little known in Europe. The aim of this publication is to provide a brief introduction to the fungi of this genus, their reproduction, utilization, production of secondary metabolites and selected biological activities of these metabolites.

Keywords: *Monascus*, Red Yeast Rice, Polyketides

INTERAKCE *Campylobacter jejuni* S *Acanthamoeba* spp.

Ekaterina Shagieva^{1,2}, Katerina Demnerova¹, Hana Michova¹

¹Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT, Praha, ²Fyzikální ústav Akademie věd ČR; shagievaeo@gmail.com

Campylobacter spp.

Bakterie rodu *Campylobacter* jsou gramnegativní tenké spirálovité mikroaerobní bakterie žijící v podobě komenzálních mikroorganismů v prostředí gastrointestinálního traktu teplokrevných živočichů, především domácí drůbeže, divokého ptactva a různých druhů savců^{1,2,3}. U lidí může vstoupit do střevní epitelální vrstvy, což má za následek akutní gastrointestinální onemocnění známé jako kampylobakteriáza. Nejčastějším původcem kampylobakteriázy je *C. jejuni*, patogenní jsou však i další termofilní druhy *Campylobacter* spp., a to *C. coli*, *C. lari*, *C. hyointestinalis*, *C. fetus* a *C. upsaliensis*¹. Ve většině symptomatických případů se kampy-

lobakteriáza projevuje v podobě lehké gastroenteritidy, která se vyznačuje horečkou, zvracením a bolestmi hlavy, po nichž dochází k bolestem břicha doprovázených vodnatým průjmem, který může obsahovat krev⁴. Nejvýznamnější komplikací prodělané infekce je Guillain-Barrého syndrom⁵, což je zánětlivé autoimunitní onemocnění postihující periferní nervovou soustavu, nebo Miller-Fischerův syndrom a reaktivní artritida^{6,7}.

Kampylobakteriáza je celosvětově nejrozšířenějším alimentárním onemocněním člověka⁸. Podle EFSA bylo v EU v roce 2020 potvrzeno celkem 120946 případů kampylobakteriázy. Mezi země s nejvyšším výskytem patří, stejně jako v předchozích letech, Česká republika s 163,8 případů na 100 000 obyvatel. V uplynulých le-

tech 2016 – 2019 bylo však evidováno případů téměř dvakrát více, což lze částečně vysvětlit zaváděním opatření proti pandemii COVID-19⁹.

Přes vysokou celosvětovou prevalenci *C. jejuni* je tato bakterie považována za křehký a náročný organismus. Laboratorní experimenty ukázaly, že je relativně citlivý na vlivy okolního prostředí, jakými jsou nízká teplota (*C. jejuni* se není schopen rozmnožovat v teplotách pod 30 °C), zvýšená koncentrace kyslíku (*C. jejuni* se nejlépe rozmnožuje v atmosféře obsahující 5 % kyslíku, 10 % oxidu uhličitého a 85 % dusíku), osmotický stres a použití dezinfekčních prostředků^{10,11,12,13}. Navzdory tomu prokázaná přítomnost *C. jejuni* v různých vodních systémech (vodovodní i mořská voda, soukromé studny, řeky, atd.) naznačuje, že *C. jejuni* může přežívat v celé řadě zdánlivě nepříznivých podmínek prostředí^{14,15}.

Z toho vyplývá, že bakterie vyvinula strategie, jak se vyhnout nebo odolávat těmto nepříznivým podmínkám mimo hostitele. Jednou z možností je využití potenciálního rezervoáru v životním prostředí. Vzhledem k tomu, že jsou améby přirozeně odolné vůči různým vnějším podmínkám, které jsou pro *Campylobacter* spp. smrtící, mohou být vhodným hostitelem zvyšujícím životaschopnost této jinak citlivé bakterie. Oba tyto organismy navíc působí ve shodném ekologickém prostředí^{16,18}.

Acanthamoeba spp.

Acanthamoeba spp. patří mezi nejčastěji se vyskytující prvky v životním prostředí^{16,17}. Jsou v podstatě všudypřítomné, vyskytují se jak v půdě, tak ve vodním prostředí, kde se živí především mikroorganismy^{18,19}. Byly izolovány z široké škály zdrojů, jako jsou veřejné vodovody, bazény, balená voda, ventilační kanály, půda, ale také z chirurgických nástrojů a kontaktních čoček^{20,21,22,23,24}. Doposud bylo identifikováno více než 24 různých druhů *Acanthamoeba* spp., z nichž většina byla spojena s lidskými infekcemi²⁵. Akantaméby byly izolovány z různých částí těla, včetně lézí lidské kůže, rohovky a plicní tkáně^{26,27}. Nejčastěji izolovanými druhy způsobujícími lidské infekce jsou *Acanthamoeba castellanii* a *Acanthamoeba polyphaga*. Je známo, že u lidí způsobují dvě různá onemocnění: granulomatózní amébovou encefalitidu nejčastěji diagnostikovanou u imunokompromitovaných jedinců, a amébovou keratitidu^{28,29}.

Améby mají ve svém životním cyklu dvě stádia: aktivní trofozoitové stádium, ve kterém projevují vegetativní růst, a dormantní stádium cysty s minimální metabolickou aktivitou, do kterého přecházejí, když jsou v nepříznivém prostředí³⁰. Cysta s dvojitou stěnou je vysoce odolná vůči chloru, antimikrobiálním a dezinfekčním prostředkům, změnám pH a osmolaritě.

Kromě toho se ukázalo, že cysty mohou přežít zahřátí až na 95 °C a teploty pod 10 °C. Když jsou podmínky prostředí příznivé, může se améba z cystické formy vrátit do svého trofozoitového stádia. Améby obsahují jednu nebo více kontraktilních vakuol, živin vakuoly, lysozomy a vakuoly obsahující glykogen^{31,32,33,34,35}. Součástí jejich buněčné membrány jsou výběžky zvané akantopodie, které améba používá k pohybu, k zachy-

cení kořisti a také k uchycení k povrchu. Kořist je pak pohlcena endocytózou a směřována do potravních vakuol, kde améba uvolňuje trávicí enzymy²⁹.

Některé bakterie jsou však schopny zabránit své degradaci v amébách a navázat s ní symbiotický vztah. Význam interakcí mezi amébou a bakteriemi byl poprvé podrobně popsán T. J. Rowbothamem na začátku 80. let. Ten zjistil, že *Legionella pneumophila* (původce legionářské nemoci) může využít amébu k ochraně, čímž zajišťuje své přežití za nepříznivých podmínek^{36,37}. Jiné bakterie, které mohou s amébou podobně interagovat, zahrnují druhy *Listeria monocytogenes*³⁸, *Mycobacterium* spp.⁴⁰ a mnoho gastrointestinálních patogenů, jakými jsou např. *Vibrio cholerae*^{39,41}, *Salmonella* spp.⁴², *Shigella* spp.⁴³ a *Campylobacter* spp.⁴⁴.

Interakce mezi *Acanthamoeba* spp. a *Campylobacter jejuni*

Na téma interakcí améb s kampylobaktery bylo publikováno několik článků s poněkud rozpornými výsledky. Obecně platí, že schopnost přežívání *Campylobacter jejuni* se v přítomnosti *Acanthamoeba* spp. zvyšuje. Není však jasné, jakým mechanismem k tomuto posílení životaschopnosti dochází.

I když většina výzkumů uvádí, že *C. jejuni* je schopen přežívat uvnitř améb^{44,45,46,47,48,49,50}, některé udávají, že bakterie přežívá jako asociovaná k buněčnému povrchu, tedy mimo samotnou buňku^{52,53,54,55}.

Tyto rozporné výsledky lze vysvětlit použitím různých izolátů *Campylobacter jejuni* a různých druhů *Acanthamoeba* spp., případně odlišnými metodologiemi výzkumu.

V roce 2005 bylo poprvé uveřejněno, že bakterie *C. jejuni* je schopná infikovat *A. polyphaga* *in vitro* a může se množit uvnitř tohoto hostitele⁵⁶. Autoři publikace se zaměřili na přežívání různých kmenů *C. jejuni* uvnitř buněk améb při teplotách od 4 °C do 30 °C a na jejich rozmnožování při 37 °C během kultivace společně s *A. polyphaga*. Interakce mezi organismy pak byla sledována pomocí mikroskopu s fázovým kontrastem. Čtyři různé kmeny *C. jejuni* byly schopny agregovat na určitých místech buněčné stěny *A. polyphaga*, což potvrdilo schopnost bakterií přilnout k tomuto hostiteli. Kromě toho po inokulaci byly nalezeny živé a pohyblivé bakterie uvnitř vakuol ve všech testovaných teplotách. Autoři vyvodili závěr, že si buňky *C. jejuni* zachovaly životaschopnost během podstatně delšího období, když se nacházely uvnitř vakuol améby, než když byly samotné v kultivačním médiu. Obecně z výsledků vyplývá, že při nízké teplotě (typické pro přírodní vodní zdroje) je *C. jejuni* schopen pronikat do améb a zachovávat si v nich životaschopnost.

Následně byla popsána metoda společné ko-kultivace *Acanthamoeba-Campylobacter*⁴⁶. Cílem tohoto výzkumu bylo zjištění kinetiky růstu různých druhů *Campylobacter* spp. při jejich společné kultivaci s *A. polyphaga*. Podle autorů byly veškeré kmeny *Campylobacter* spp. schopny dostat se dovnitř buněk protozoí během 24 hodin, kde se dále množily.

Stejná skupina vědců provedla další experiment, ve kterém společně kultivovali *A. polyphaga* a *C. jejuni*.

ni v mléce a v džusu⁴⁵. Společná kultivace prodloužila dobu přežívání bakterií v obou médiích, přičemž nejvýraznější účinek byl pozorován u šťávy uchovávané při pokojové teplotě.

Ve dvou publikacích z roku 2010 byly uveřejněny údaje o vlivu přirozeného stresu na vzájemné působení mezi *C. jejuni* a *A. polyphaga*. Axelsson-Olsson a další zkoumali, zda má internalizace *C. jejuni* do *A. polyphaga* vliv na schopnost bakterií přežít v nízkém pH. Výsledky ukázaly, že když se buňky *C. jejuni* kombinovaly s *A. polyphaga* v kyselém prostředí, bakterie přežívaly neobvykle dlouho i ve velmi nízkém pH (20 hodin v prostředí s pH 4 a 5 hodin při pH 2). Inkubace *C. jejuni* spolu s *A. polyphaga* tedy zvyšuje jeho životaschopnost oproti kultivaci v samotném kultivačním médiu^{47,48}.

Baré a další se ve svém výzkumu zaměřili na vliv teploty a kyslíku na vzájemné působení různých kmenů *C. jejuni* a jiného zástupce *Acanthamoeba* spp., a to *A. castellanii*. Pro testování schopnosti několika kmenů *C. jejuni* přežít a replikovat se v tomto hostiteli byly ko-kultury inkubovány za aerobních a mikroaerobních podmínek při 25 a 37 °C po dobu 2 týdnů. Výsledky ukázaly, že ko-kultivace nezvyšovala populaci *C. jejuni*, ale vedla pouze k pomalejšímu poklesu životaschopnosti. U kampylobakterů došlo také ke zlepšení dlouhodobého přežívání (až o 6 dní), zejména za mikroaerobních podmínek. Při pokusech na kulturách získaných při teplotě 25 °C v aerobních podmínkách byly pomocí konfokální laserové skenovací mikroskopie pozorovány buňky *C. jejuni* spojené s buňkami améb již po 30 minutách inkubace⁵¹.

Experimenty s lidskými epitelálními buňkami a *C. jejuni* prokázaly, že bakteriální životaschopnost je důležitá pro proniknutí do buňky hostitele, což vedlo Olofsson a další ke zkoumání, zda bakterie musí být životaschopné také pro internalizaci do améby. Bakteriální suspenze s živými a tepelně inaktivovanými kmeny *C. jejuni* 81-176 byly přidány do kultury *A. polyphaga* a byly inkubovány při pokojové teplotě po dobu 1 až 96 hodin. Pro kvantifikaci adheze a internalizovaných buněk *C. jejuni* byl použit kit pro detekci bakteriální životaschopnosti. Pro stanovení intracelulární lokalizace *C. jejuni* v *A. polyphaga* byly bakterie a amébové lysozomy obarveny roztokem CTC (5-kyano-2,3-ditolyl tetrazolium chlorid) a dextranu. Výsledky ukázaly, že během společné inkubace s *A. polyphaga* byly internalizovány životaschopné i tepelně usmrčené bakterie, ale že kinetika internalizace a celkový počet internalizovaných bakterií byly vyšší u právě bakterií životaschopných. Co se týče jejich lokalizace, zpočátku byly bakterie přítomny jak v netravicích, tak v trávicích vakuolách, ale s postupem času se životaschopné bakterie nacházely ve vyšších množstvích v netravicích vakuolách. Inaktivované bakterie byly většinou shromažďovány v jedné velké trávicí vakuole uvnitř améby, často umístěné poblíž membrány, zatímco životaschopné bakterie byly převážně lokalizovány v malých vakuolách distribuovaných po celé amébě, kde byly bakterie pevně zabaleny. Autoři dospěli k závěru, že životaschopné i tepelně usmrčené bakterie byly zpracovány pro degradaci v kyselých vakuolách, ale životaschopné bakterie jsou schopny se této degradaci vyhnout⁴⁴.

Opakem výše uvedených názorů je, že bakterie jsou schopny přežít ve společné kultuře jen extracelulárně, a nikoli uvnitř améby. Téměř všechny související experimenty však byly provedeny výhradně s *A. castellanii*, což mohlo způsobit rozdíl ve výsledcích. Jeden z výzkumů byl proveden Buím a dalšími v roce 2011 a byl zaměřen na zachování životaschopnosti *C. jejuni* uvnitř buněk *A. castellanii* při teplotě 25 °C a 37 °C v aerobních podmínkách. Pokus byl prováděn s přidávkou gentamicinu, který inhiboval veškeré extracelulární bakterie. Buňky byly následně pozorovány konfokálním mikroskopem, který umožňuje zobrazení intracelulárního prostoru améb. Ihned po ošetření gentamicinem (0 hodin) bylo při 25 °C významné procento pohyblivých bakterií internalizováno uvnitř vakuoly. Avšak po 5 a 24 hodinách po ošetření gentamicinem se počet internalizovaných bakterií významně snížil. Vypadá to, že ačkoli bakterie zůstávají intracelulárně životaschopné po dobu 5 hodin, nakonec se ve vakuolách rozpadnou. Stejný experiment byl proveden při 37 °C, kdy však po 24 hodinách od ošetření gentamicinem nebyly pozorovány žádné internalizované buňky *C. jejuni*⁵⁴.

Měření koncentrace rozpuštěného kyslíku v kultivačním médiu ukázalo, že v průběhu kultivace *A. castellanii* dochází k poklesu hladiny kyslíku, a to nezávisle na přítomnosti *C. jejuni*. Tato modifikace patrně následně podporuje přežívání a reprodukci *C. jejuni*.

Další výzkum Buiho a spol. byl zaměřen na zkoumání účinku různých environmentálních stresů na absorpci a intracelulární přežívání *C. jejuni* v *A. castellanii*⁵³. Testovány byly vlivy teploty, nízkého obsahu živin a oxidačního a osmotického stresu. *A. castellanii* byla kultivována společně s buňkami *C. jejuni*, které byly nejprve vystaveny různým stresovým podmínkám. Společné kultury byly poté inkubovány po dobu 3 hodin při 25 °C za aerobních podmínek a intracelulární přežití bylo sledováno lyzí améb v čase 0, 5 a 24 hodin po ošetření gentamicinem. Počet vnitrobuněčných bakterií získaných po 5 hodinách od ošetření byl nižší u hladovějících, tepelně ošetřených a osmoticky stresovaných bakterií než u kontrolního vzorku, zatímco oxidační stres neměl žádný vliv. Přestože obě studie naznačují, že *C. jejuni* nemůže přežít uvnitř améby déle než 5 hodin, i krátká doba, kdy si *C. jejuni* může zachovat životaschopnost uvnitř tohoto hostitele, může stále zvyšovat riziko infekce člověka.

Mimobuněčné přežívání *C. jejuni* v přítomnosti *A. castellanii* bylo také potvrzeno studií Dirkse a Quinlanové⁵⁵. Buňky *A. castellanii* byly smíchány s buňkami *C. jejuni* NCTC 11168, poté byly inkubovány po dobu 2 hodin při pokojové teplotě a ošetřeny gentamicinem. Integrita améb byla potvrzena trypanovou modří. Výsledky prokázaly, že v některých kokultuřích s *A. castellanii* byly naměřeny vyšší bakteriální počty (56 % společných inkubací), což naznačuje internalizaci bakterií a ochranný účinek améby, zatímco u některých kokultivací nebyly detekovány žádné životaschopné bakterie, a tudíž žádný ochranný účinek améby (39 % společných inkubací). Tyto výsledky se tedy liší od výsledků několika předchozích studií, které předpokládaly, že internalizace je konstantní jev. Protože však ve velkém počtu experimentů autoři skutečně proká-

zali obnovení *C. jejuni* po ošetření gentamicinem, tato studie podle našeho názoru potvrzuje možnost intracelulárního přežití *C. jejuni* v *Acanthamoeba*, a nikoli pouze extracelulární přežití.

Závěr

Z výše uvedeného vyplývá, že přežívání kampylobakterů se v přítomnosti améb zvyšuje, i když zatím není jasné, zda k ochranné interakci dochází intracelulárně nebo extracelulárně. I kdyby *Campylobacter* spp. zůstával v amébě životaschopný pouze po omezenou dobu, stále se jedná o epidemiologicky významné riziko,

ziko, které by nemělo být opomíjeno. Améby nesoucí životaschopné buňky kampylobakterů mohou být zdrojem kampylobakterií, která navíc může být odolnější vůči antibiotické léčbě. Vzhledem k nedostatečnému pochopení mechanismů interakcí mezi amébami a *Campylobacter* spp. je však zapotřebí další hloubkové studium tohoto tématu.

Poděkování

Tato práce vznikla za podpory Grantové agentury České republiky (No. GA18-16549S).

Literatura

1. Man SM: *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 8(12), 669 (2011).
2. Silva J, Leite D, et al.: *Front Microbiol*. 2(200), (2011).
3. Altekruse SF, Stern NJ, et al.: *Emerg Infect, DiS*. 5(1), 28 (1999).
4. World Health Organization: Fact Sheets: *Campylobacter*, (2020). Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/campylobacter>
5. Facciola A, Riso R, et al.: *J Prev Med Hyg*. 58(2), E79-E92 (2017).
6. Salloway S, Mermel LA, et al.: *Infect Immun*. 64(8), 2945 (1996).
7. Pope JE, Krizova A, et al.: *Semin Arthritis Rheum*. 37(1), 48 (2007).
8. Kaakoush NO, Castaño-Rodríguez N, et al.: *Clin Microbiol Rev*. 28(3), 687 (2015).
9. EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2021. The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. *EFSA Journal* 2021;19(12):6971, 324 pp
10. Park SF: *Int J Food Microbiol*. 74(3), 177 (2002).
11. Blaser MJ, Hardesty HL, et al.: *J Clin Microbiol*. 11(4), 309 (1980).
12. Doyle MP and Roman DJ: *Appl Environ Microbiol*. 43(3), 561 (1982).
13. Trachoo N and Frank JF: *J Food Prot*. 65(7), 1117 (2002).
14. Jones K: *Symp Ser Soc Appl Microbiol*. 90 (s6), 68S (2001).
15. Stanley K, Cunningham R, et al.: *J Appl Microbiol*. 85(1), 187 (1998).
16. Mergeryan H: *Rev Infect, DiS*. 13 Suppl 5, S390 (1991).
17. Rodríguez-Zaragoza S: *Crit Rev Microbiol*. 20(3), 225 (1994).
18. Sandström G, Saeed A, et al.: *Curr Drug Targets*. 12(7), 936 (2011).
19. Greub G and Raoult D: *Clin Microbiol Rev* 17(2), 413 (2004).
20. Casemore DP: *Lancet* 2(8047), 1078 (1977).
21. Szénási Z, Endo T, et al.: *J Med Microbiol*. 47(1), 5-16 (1998).
22. Rivera F, Roy-Ocotla G, et al.: *F Environ Res*. 42(1), 149 (1987).
23. Paszko-Kolva C, Yamamoto H, et al.: *Appl Environ Microbiol*. 57(1), 163 (1991).
24. Siddiqui R and Khan NA: *Exp Parasitol*. 130 (4), 311 (2012).
25. Cerva L, Serbus C, et al.: *Folia Parasitol (Praha)*. 20(1), 97 (1973).
26. Newsome AL, Curtis FT, et al.: *Diagn Cytopathol*. 8(3), 231 (1992).
27. Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of Foodborne, Waterborne, and Environmental Diseases (DFWED). Parasites- *Acanthamoeba*- Granulomatous Amebic Encephalitis (GAE); Keratitis (2017) Dostupné z: [https://www.cdc.gov/parasites/acanthamoeba/index.html#:~:text=Acanthamoeba%20%2D%20Granulomatous%20Amebic%20Encephalitis%20\(GAE\)%3B%20Keratitis,-Related%20Pages%20&text=Acanthamoeba%20is%20a%20microscopic%2C%20free,environment%20in%20water%20and%20soil](https://www.cdc.gov/parasites/acanthamoeba/index.html#:~:text=Acanthamoeba%20%2D%20Granulomatous%20Amebic%20Encephalitis%20(GAE)%3B%20Keratitis,-Related%20Pages%20&text=Acanthamoeba%20is%20a%20microscopic%2C%20free,environment%20in%20water%20and%20soil)
28. Lorenzo-Morales J, Khan NA, et al.: *Parasite*. 22, 10 (2015).
29. Siddiqui R and Khan NA: *Parasit Vectors*. 5, 6 (2012).
30. Coulon C, Collignon A, et al.: *J Clin Microbiol*. 48(8), 2689 (2010).
31. Aksozek A, McClellan K, et al.: *J Parasitol*. 88(3), 621 (2002).
32. Bowers B and Korn ED: *J Cell Biol*. 39(1), 95-111 (1968).
33. Chang C-W, Lu L-W, et al.: *Parasitol Res*. 112(11), 3687 (2013).
34. Axelsson-Olsson D, Olofsson Parasitol J, et al.: *Parasitol Res*. 104(4), 935 (2009).
35. Khunkitti W, Lloyd D, et al.: *J Infect*. 36(1), 43 (1998).
36. Rowbotham TJ: *J Clin Pathol*. 33(12), 1179 (1980).
37. Khan NA: *FEMS Microbiol Rev*. 30(4), 564 (2006).
38. Ly TM and Müller HE: *J Med Microbiol*. 33(1), 51 (1990).
39. Thom S, Warhurst D, et al.: *J Med Microbiol*. 36(5), 303 (1992).
40. Adékambi T, Ben Salah S, et al.: *Appl Environ Microbiol*. 72(9), 5974 (2006).
41. Van der Henst C, Scignari T, et al.: *ISME J*. 10(4), 897-910 (2016).
42. Tezcan-Merdol D, Ljungström M, et al.: *Appl Environ Microbiol*. 70(6), 3706 (2004).
43. Saeed A, Abd H, et al.: *Arch Microbiol*. 191(1), 83 (2009).

Literatura (pokračování)

44. Olofsson J, Axelsson-Olsson D, et al.: *PLoS One*. 8(11), e78873 (2013).
45. Olofsson J, Berglund GP, et al.: *Infect Ecol Epidemiol*. 5, 28675 (2015).
46. Axelsson-Olsson D, Ellström P, et al.: *Appl Environ Microbiol*. 73(21), 6864 (2007).
47. Axelsson-Olsson D, Olofsson J, et al.: *Exp Parasitol*. 126(1), 59 (2010).
48. Axelsson-Olsson D, Svensson L, et al.: *Appl Environ Microbiol*. 76(13), 4194 (2010).
49. Snelling WJ, Stern NJ, et al.: *Arch Microbiol*. 189(2), 175 (2008).
50. Snelling WJ, McKenna JP, et al.: *Appl Environ Microbiol*. 71(9), 5560 (2005).
51. Baré J, Sabbe K, et al.: *FEMS Microbiol Ecol*. 74(2), 371 (2010).
52. Trabelsi H, Dendana F, et al.: *Pathol Biol (Paris)*. 60(6), 399 (2012).
53. Bui XT, Winding A, et al.: *Environ Microbiol*. 14(8), 2034 (2011).
54. Bui XT, Qvortrup K, et al.: *BMC Microbiol*. 12(1), 232 (2012).
55. Dirks BP and Quinlan JJ: *Exp Parasitol*. 140, 39 (2014).
56. Axelsson-Olsson D, Waldenström J, et al.: *Appl Environ Microbiol*. 71(2), 987 (2005).

Souhrn

Shagieva E., Demnerova K., Michova H.: Interakce *Campylobacter jejuni* s *Acanthamoeba* spp.

Campylobacter jejuni je dlouhodobě označován jako nejčastější původce potravinami přenášených gastroenteritid. Nejvýznamnějšími zdroji infekce jsou nedostatečně tepelně upravené drůbeží maso a kontaminovaná voda. Tyto mikroaerobní bakterie jsou většinou citlivé vůči stresu. Nicméně v některých případech jsou schopny odolávat nepříznivým podmínkám a dlouhodobě perzistovat v okolním prostředí či v hostiteli bez ztráty životaschopnosti nebo virulence. Některé studie naznačují, že přenosu a přežívání tohoto bakteriálního patogena mohou napomáhat volně žijící protozoa rodu *Acanthamoeba*. Je zdokumentováno, že améby zastávají roli hostitele pro různé patogenní bakterie, včetně *C. jejuni*, které chrání před drsnými podmínkami prostředí. Nicméně molekulární mechanismy podílející se na interakcích mezi bakteriemi a *Acanthamoeba* spp. nejsou dobře známy. Zatímco některé studie naznačují schopnost *C. jejuni* přežít uvnitř prvoků, jiné publikace uvádějí pouze extracelulární způsob přežívání. Účelem tohoto přehledu je shrnutí aktuálních znalostí o *C. jejuni* a *Acanthamoeba* spp., a o jejich vzájemných vztazích.

Klíčová slova: *Campylobacter jejuni*, *Acanthamoeba* spp., vodní prostředí

Summary

Shagieva E., Demnerova K., Michova H.: Interaction of *Campylobacter jejuni* with *Acanthamoeba* spp.

Campylobacter jejuni is continuously ranked as the most common cause of foodborne gastroenteritis. The most important sources of infection are undercooked poultry meat and contaminated water. This microaerobic bacterium is generally sensitive to stress. However, in some cases, it is able to withstand harsh conditions and persist in the environment or in a host for a long time without the loss of viability or virulence. Some studies suggest that protozoa of the genus *Acanthamoeba* may contribute to the transmission and survival of this bacterial pathogen. It is known that this amoeba hosts various pathogenic bacteria, including *C. jejuni*, protecting them from harsh environmental conditions. However, the molecular mechanisms involved in interactions between bacteria and *Acanthamoeba* spp. are not well known. While some studies suggest *C. jejuni* can survive within the protozoa, other publications report only extracellular survival. The purpose of this review is to summarize current knowledge about the relationship of *C. jejuni* and *Acanthamoeba* spp.

Keywords: *Campylobacter jejuni*, *Acanthamoeba* spp., aquatic environment

VYUŽITÍ PLYNOVÉ CHROMATOGRRAFIE S OLFAKTOMETRICKÝM DETEKTOREM PRO ANALÝZU VONNÝCH LÁTEK V POTRAVINÁCH

Iveta Šístková, Martina Málková, Helena Čížková

Ústav konzervace potravin, Fakulta potravinářské a biochemické technologie,

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze; iveta.sistkova@vscht.cz

Úvod

Prvním krokem pro celkové hodnocení jakékoliv potraviny, ať už její vizuální, chuťové či čichové přijatelnosti; zjištění sensorického defektu potraviny; nebo porovnání, zda je potravina sensoricky shodná se standardem (kvalitativně i kvantitativně) je sensorická analýza. Výsledky sensorické analýzy, jako je popis a intenzita vnímání vůně, chuť či pachu, hrají klíčovou roli v následné cílené instrumentální analýze. V dnešním světě moderních technologií lze kromě klasické sensorické analýzy využít pro sensorické hodnocení vůně a chuti

i moderní analytické metody s různými typy snímačů jako je elektrický nos či jazyk nebo spojit instrumentální a sensorickou analýzu v jedno, čímž získáme metodu plynové chromatografie s olfaktometrickým detektorem (GC-O).¹⁻⁴

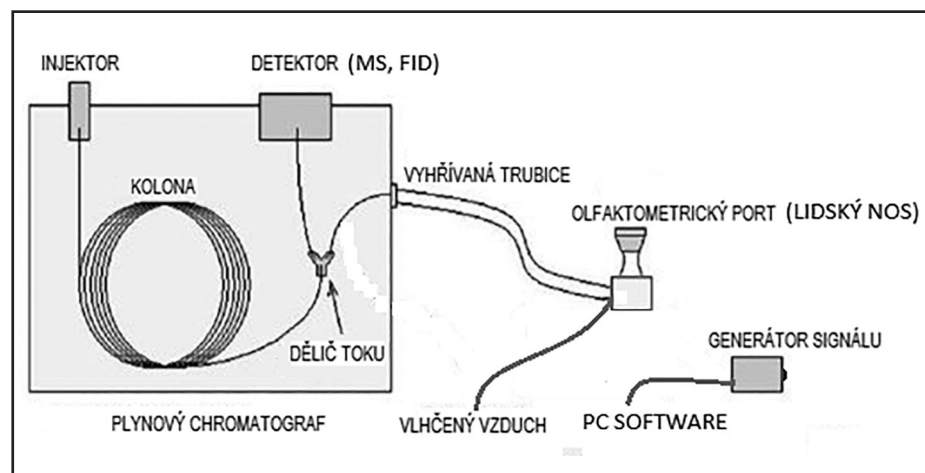
Pojmy jako olfaktometrie, olfaktometr, olfaktogram mají základ z latinského *olfacto* (čichat), *olfactus* (čich). Slovník pro sensorickou analýzu⁵ definuje olfaktometrii jako měření odezev posuzovatelů na čichový podnět a pojem olfaktometr jako přístroj používaný k předložení čichového podnětu posuzovatelům za reprodukovatelných podmínek.

Olfaktometrickou analýzou ve spojení s plynovou chromatografií je myšleno využití lidského čichu k detekci látek vycházejících z chromatografické kolony. Jednoduše řečeno, GC-O znamená použití lidského nosu jako GC detektoru.

Tento příspěvek má za cíl seznámit čtenáře s možnostmi využití metody GC-O pro analýzu vonných těkavých látek v potravinách porovnání instrumentální metody GC-O s klasickou sensorickou analýzou.

Představení GC-O

Pouze některé těkavé látky přispívají k vůni nápojů a jídla a vliv jednotlivých látek na celkový profil vůně je velmi rozdílný. Sloučeniny vyskytující se ve stopových koncentracích mají nezdědka větší vliv na sensorické vlastnosti výrobku než ty, vyskytující se ve vysokých koncentracích. Analýza vzorků pomocí plynové chromatografie s olfaktometrickým detektorem (GC-O) má za cíl určit mezi těkavými látkami vzorku látky sensoricky aktivní, tj. ty, které přispívají k celkové vůni vzorku, a stanovit jejich relativní příspěvek na výsledné vnímání vůně. To je umožněno díky paralelnímu zapojení analytického detektoru (hmotnostní spektrometr) a olfaktometrického portu (smyslové hodnocení) viz obrázek (Obr. 1). V děliči toku je eluát dělen tak, že analyty do-



Obr. 1: Schéma GC-olfaktometru (převzato a upraveno dle4)

putují k detektorům (MS a nos hodnotitele) zároveň, ve stejný čas, to umožňuje vzájemné porovnání záznamů z detektorů. Část eluátu, který jde do olfaktometrického portu, prochází vyhřívanou trubicí, aby nedocházelo ke kondenzaci těkavých látek na stěnách kapiláry. Na konci trubice je olfaktometrický port, tj. skleněný nástavec kónického tvaru, který pasuje na tvar nosu či celého obličeje. Hodnotitel zaznamenává čichový vjem ručně pomocí generátoru signálu, tj. tlačítka (On-Off spínač – záznam ANO/NE) či posunovače (Fingerspan, záznam intenzity a doby), který je připojen k počítači a signál je vyhodnocen pomocí softwaru. Získaný chromatogram a aromagram (olfaktogram) je porovnán a jsou identifikovány sensoricky aktivní látky, popis jejich vůně a intenzit. Jako sensoricky aktivní látku lze označit látku, která se vyskytuje ve vzorku v koncentraci vyšší, než je práh vnímání dané látky.¹⁻⁴

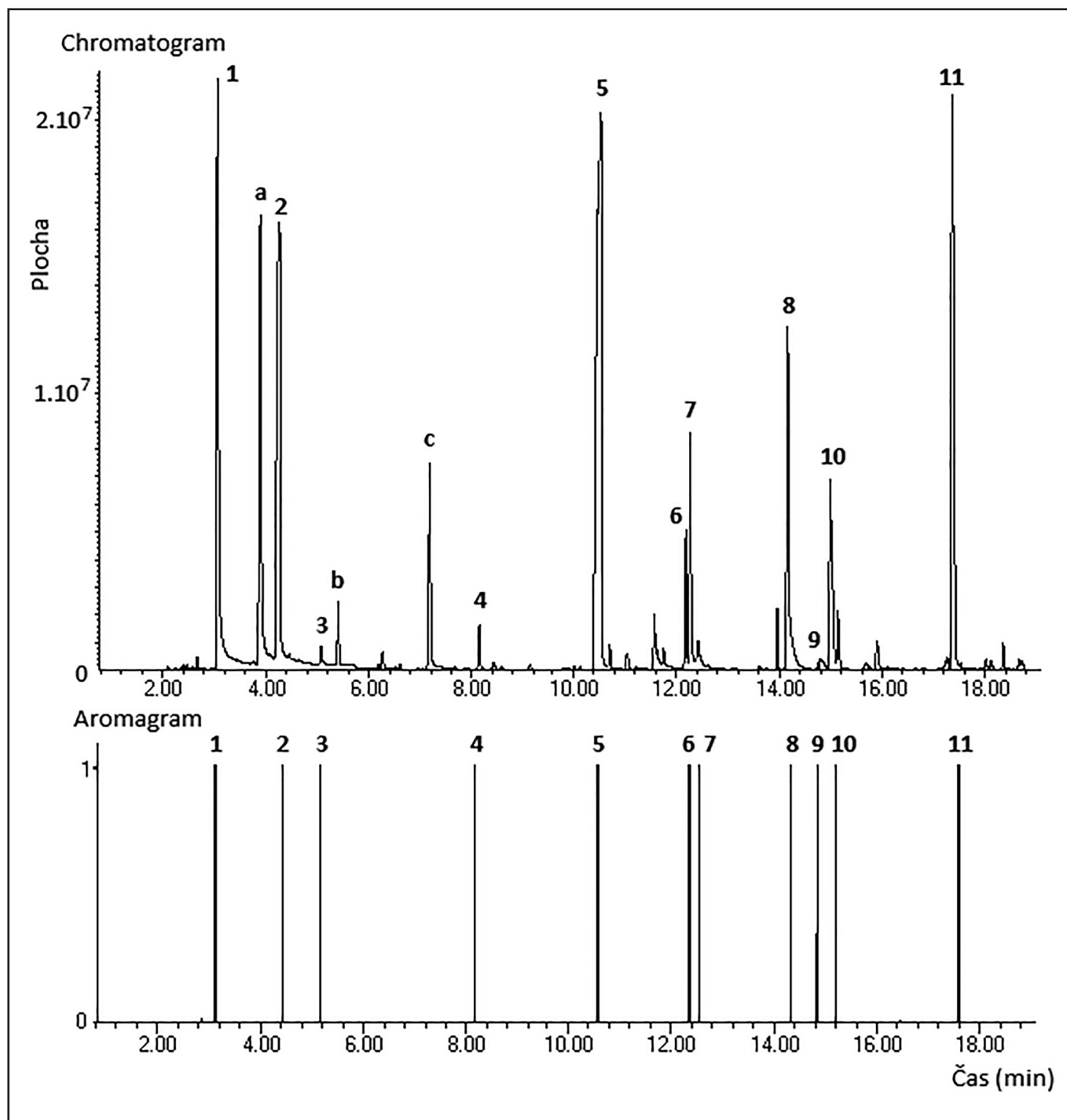
Vhodnost hodnotitelů k detekci a rozlišování vůně

Smyslové vnímání každého jedince je velmi subjektivní. Čichová schopnost je ovlivněna hodnotou prahu vnímání konkrétních pachů (někteří hodnotitelé jsou citlivější na vybrané druhy vonných látek, k ostatním látkám tak citliví nejsou (tzv. hyper- a hyposmie), zdravotním stavem, psychickým rozpoložením, dechovou frekvencí a v neposlední řadě zkušenostmi s olfaktometrickou analýzou. K některým látkám může mít jedinec specifickou anosmii, tzn. neschopnost danou látku cítit (např. fialkovou vůni sloučeniny β -Ionon není schopno cítit až 42 % lidské populace).⁶

Je nutné pamatovat, že člověk je u GC-O detektor, proto je nutné minimalizovat všechny faktory, které mohou ovlivnit hodnotitele a následně výsledky olfaktometrické analýzy. Stejně jako u klasické sensorické analýzy by hodnotitelé nejméně hodinu před provedením analýzy neměli jíst, pít, kouřit a neměli by být ten den ničím navoněni.⁷ Výběr hodnotitelů pro sensorickou analýzu, je proveden na základě jejich citlivosti, paměti a schopnosti rozpoznávat vůně, zároveň jsou však vybíráni tak, aby jejich čichové dovednosti nebyly příliš nadprůměrné, neboť tito hodnotitelé mají reprezentovat lidskou populaci.^{1,7} Požadavky pro hodnotitele

pro olfaktometrickou analýzu jsou vyšší, hodnotitelé musí dosahovat určité citlivosti na analyzované látky, musí být schopni soustředit se po celou dobu analýzy a být schopni pamatovat si a v daný moment rozpoznat a určit vnímaný pach. Hodnotitelé pro olfaktometrickou analýzu musí dále splňovat kritéria opakovatelnosti a přesnosti^{7,8}, tzn. při opakování analýzy v průběhu času vykazovat stejné výsledky, které jsou správné = správné označení a popsání vjemu. Toto se nejlépe testuje na vzorku směsného standardu vonných látek o dané koncentraci, který je opakovaně předložen hodnotiteli.

Při analýze je třeba myslet na pohodlí hodnotitele a podpořit provedení analýzy bez rozptýlení. Laboratoř, kde je umístěn GC-O, musí být prostá cizích vůní a zvuků a musí zajišťovat konstantní teplotu pro zajištění psychické a fyzické pohody hodnotitelů. Čichání horkého vzduchu vycházejícího z olfaktometrického portu způsobuje vysušování nosní sliznice hodnotitele, z tohoto důvodu je doporučeno připojit zařízení pro zvlhčování vzduchu.¹ Oproti klasické sensorické analýze se musí hodnotitel vypořádat s rozdílnými pachy objevujícími se pouze po dobu několika sekund v nepravidelných intervalech chromatografické analýzy. Z tohoto důvodu by olfaktometrická analýza neměla trvat déle než 25 – 30 minut pro snížení rizika ovlivnění získaných výsledků únavou či ztrátou soustředěnosti a ostráživosti hodnotitele.⁷ Pro minimalizaci odchylek mezi hodnotiteli je nutné zajistit konstantní podmínky analýzy pro



Obr. 2: Ukázka chromatogramu a aromagramu získaný jedním hodnotitelem při testování hodnotitelů na směsi standardů Pozn.: Čísla látek na chromatogramu odpovídají detekci látek na aromagramu. Látky označené jako a, b a c nebyly daným hodnotitelem detegovány.

všechny hodnotitele (mj. stejné pořadí vzorků, stejná škála pro hodnocení intenzity).

Na obrázku (Obr. 2) je záznam chromatogramu a aromagramu jednoho z hodnotitelů získaný při testování hodnotitelů na směsném standardu 13 látek.

Metody GC-O

Pro vyhodnocení dat získaných při olfaktometrické analýze byly vyvinuty metody, které lze rozdělit do tří skupin: metody detekce frekvence, časově-intenzitní metody a metody zředovací.^{7,9}

Metody detekce frekvence (Detection frequency methods) jsou založeny na analýze stejného vzorku skupinou hodnotitelů a zaznamenáním detekce vjemů těkavých látek.¹ Tzv. NIF (Nasal Impact Frequency) technikou se vypočítá procento hodnotitelů, kteří zaznamenají (detekují) vonnou látku v daný retenční čas. Látky, které jsou detekovány častěji než jiné, jsou považovány za důležitější, s větším vlivem na vůni daného vzorku. NIF technika nevyžaduje trénovaný panel hodnotitelů a překonává i problematiku malého počtu hodnotitelů (optimální počet hodnotitelů je >6, optimálně 8 – 12;

počet analýz jednoho vzorku: 6–24).^{9,10} Každý z n hodnotitelů přispívá $1/n$ k finálnímu výsledku, pokud NIF = 1, tj. 100 %, pak všech n hodnotitelů detekovalo danou látku.¹⁰ Varianty metody NIF je SNIF (Surface of Nasal Impact Frequency), která navíc zohledňuje dobu trvání čichového vjemu. Výhoda metody je v jednoduchosti, díky čemuž nejsou vyžadováni speciálně kvalifikovaní hodnotitelé, menší časové náročnosti a v opakovatelnosti. Výsledky odrážejí rozdíl v citlivosti jednotlivých hodnotitelů.^{1,3,7,9}

Metody detekce frekvence se často kombinují s **metodami následného odhadu intenzity** (Posterior intensity methods), které jsou založené na zaznamenání odhadu vnímané intenzity vůně hodnotitelem dle předem dohodnuté stupnice intenzity po eluci píku.¹ Toto až následné zaznamenávání intenzity vůně může způsobit značné odchylky mezi hodnotiteli.¹¹ Výsledkem je skóre intenzity, tj. průměr intenzit získaných od jednotlivých hodnotitelů. Takto dosažené výsledky obecně dobře korelují s výsledky získanými metodami detekce frekvence, avšak v menší míře s metodami zředovácími.¹¹ Propojením těchto metod je tzv. MF (Modified Frequency), metoda, která zohledňuje intenzitu vjemu na základě dohodnuté stupnice (1 = minimální – 5 = maximální) bez ohledu na jeho trvání. Výpočet MF je na základě rovnice: $MF(\%) = \sqrt{DF(\%) \times I(\%)}$, kde DF (%) je procento hodnotitelů, kteří detegovali danou látku; a I (%) je průměrná intenzita vyjádřená jako procento maximální intenzity.⁹

Časově-intenzitní metody (Time-intensity methods) jsou založené na zaznamenání intenzity a trvání vnímané vůně zaznamenávané současně s elucí chromatografického píku a její popis, tzv. metoda OSME (osme=řecky vůně, pach, zápach)^{1,11} či FSCM (Finger Span Cross-Modality matching method).⁹ Hodnotitelé pomocí posuvníku zaznamenávají intenzitu vjemu a čas posunu označuje délku trvání vjemu. Pomocí této metody lze v rámci jedné analýzy získat profil senzoryky aktivních látek, jejich intenzit a dobu trvání vjemu (v případě OSME). Velké rozdíly mezi hodnotiteli ukazují na nutnost použití panelu zkušených a trénovaných hodnotitelů (optimum 3–10 hodnotitelů; počet analýz jednoho vzorku: 6–30).^{1,3,7,9}

Metody zředovací (Dilution analysis methods) jsou založené na postupném zředování vzorku (např. 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 a tak dále) až po dosažení prahu vnímání všech látek, tzn. žádná vůně již dále není vnímána hodnotitelem.¹¹ Mezi používané metody patří AEDA metoda (Aroma Extract Dilution Analysis) a CHARM metoda (Combined Hedonic Aroma Response Measurement). Pomocí AEDA se zjišťuje nejvyšší ředění vzorku, při kterém je látka hodnotitelem detekovatelná a vyjadřuje se jako faktor ředění FD (Factor Dilution), případně jako OAV (odor activity value), tj. poměr koncentrace dané látky ve vzorku k prahu vnímání dané látky. Při použití metody CHARM se zaznamenává i doba trvání vjemu. Nevýhodou těchto metod je časová náročnost, neboť je nutné připravit řadu ředění jednoho vzorku a následně je analyzovat, a tím omezená možnost využití více hodnotitelů (běžně 1–3, počet analýz jednoho vzorku: 10–36), což může vést k méně přesným a subjektivním výsledkům.^{1,3,7,9,11} Stojí za zmínku, že při použití head-

space SPME (HS-SPME) jsou metody ředění na prahovou hodnotu ještě pracnější, protože postupné ředění vzorků vyžaduje pro dosažení přesných výsledků optimalizaci extrakčního procesu pro každé jednotlivě použité ředění.⁹

Výhody a nevýhody GC-O

Největší výhodou spojení plynové chromatografie a olfaktometrické analýzy je možnost kvalitativního i kvantitativního hodnocení senzoryky aktivních látek. Další výhodou je možnost detekce mnohem nižších koncentrací senzoryky aktivních látek než fyzikálně-chemickými detektory a v neposlední řadě snadná instalace ke všem systémům plynové chromatografie. Nevýhodou GC-O je časová náročnost a vliv lidského faktoru (psychický a fyzický stav hodnotitele). Úskalím je i interpretace výsledků u komplexních směsí, tj. správné spárování eluované těkavé látky z chromatogramu k získanému senzoryckému vjemu.

Porovnání senzorycké a olfaktometrické analýzy pro potvrzení rozdílu ve vůni mezi vzorky nealkoholického nápoje (kontrolní vzorek vs. defektní vzorek) s následným zjištěním příčiny nežádoucího přípachu dle zkušeností získaných během měření na Ústavu konzervace potravin, VŠCHT Praha v letech 2015 – 2022 je uvedeno v tabulce (Tab. I).

Aplikace GC-O

V potravinářském průmyslu a kontrole potravin nachází GC-O využití k získání:

- 1) profilu vůně** a k zjištění vztahu mezi vůní a chemickým složením těkavé frakce potravin a nápojů;
- 2) změny vůně** v důsledku zpracovatelských technik či změn ve složení, technologii výroby;
- 3) rozdíly ve vůni** mezi podobnými nápoji či potravinami a k identifikaci případného senzoryckého defektu.⁷

Metoda GC-O má široké využití nejen v potravinářském průmyslu, ale i na poli environmentálním (např. analýza ovzduší), ve farmacii, v medicíně či chemickém průmyslu. Více o tomto pojednávají dostupná review.^{3,7,9,11,12–15}

Tabulky (Tab. II a Tab. III) níže uvádí příklady využití plynové chromatografie s olfaktometrických detektorem na Ústavu konzervace potravin, VŠCHT Praha v letech 2016 – 2022.

Závěr

Olfaktometrická analýza je účinným nástrojem pro hodnocení senzoryckých vlastností, a to nejen potravin. Má však i svá omezení, a to především v nutnosti využití proškolených a na dané látky dostatečně citlivých hodnotitelů, neboť to je největším úskalím pro získání správných, přesných a opakovatelných výsledků a jejich následné interpretace. Je vhodné kombinovat GC-O metodu s klasickou senzoryckou analýzou, neboť pouze jejich kombinací lze získat ucelené výsledky senzoryckého hodnocení – hodnocení vzorku jako celku (senzorycká analýza) a získání jednotlivých látek odpovědných za výsledné aroma (GC-O).

Tab. I: Porovnání senzorické a olfaktometrické analýzy pro potvrzení rozdílu vůně mezi vzorky nealkoholického nápoje (kontrolní vzorek vs. defektní vzorek) s následným zjištěním příčiny nežádoucího příchuti

	Senzorická analýza (trojúhelníková zkouška, 3 opakování)	Olfaktometrická analýza (SPME-GC/MS-O, NIF hodnocení)
Potřebný počet hodnotitelů	10	10
Celková délka přípravy vzorků	30 min	30 min/vzorek
Délka trvání analýzy hodnotitelem	10 min	20-30 min/vzorek
Počet vzorků hodnocených 1 hodnotitelem	3 opakování	2 (kontrolní, defektní)
Celkový čas trvání analýzy 1 hodnotitele	10 min	90 min
Čas potřebný pro vyhodnocení	30-60 min	120 min – dny
Hodnocení více hodnotiteli zároveň	ANO	NE
Možnost vrátit se ke vzorku (vjemu)	ANO	NE
Možnost pauzy mezi vzorky	ANO	NE
Pravidelný interval mezi vzorky (vjemy)	ANO	NE
Pravidelnost/ovlivnitelnost času a délky čichání vzorku	ANO	NE
Potřeba školených hodnotitelů	ANO	ANO
Vliv zkušeností hodnotitele na výsledek	NE	ANO
Možnost určení konkrétní příčiny defektu	NE	ANO
Nutnost dalších laboratorních stanovení pro odhalení defektu	ANO	NE/ANO
Shoda hodnotitelů	velká	malá-střední dle zkušeností a typu vzorku
Interpretace výsledků	snadná, srozumitelná	náročná interpretace
Hodnocení	kvalitativní	kvalitativní i kvantitativní

Tab. II: Příklady využití GC-O k získání profilu senzoricky aktivních látek na Ústavu konzervace potravin, VŠCHT Praha

Úkol	GC-MS	GC-O
Cílem bylo u souboru 5 komerčních vzorků minerálních vod s citronovou příchutí zakoupených v tržní síti identifikovat látky citronového aroma a určit, které z nich jsou senzoricky aktivní. ¹⁶	• 63 látek citronového aroma	• metoda NIF, • 7 hodnotitelů, • 20 senzoricky aktivních látek
Cílem bylo u souboru 14 komerčně dostupných jahodových sirupů zakoupených v tržní síti identifikovat látky jahodového aroma a určit, které z nich jsou senzoricky aktivní. ¹⁷	• přes 150 látek jahodového aroma	• metoda NIF, • 4 hodnotitelé, • 13 senzoricky aktivních látek • identifikovány markery pro průkaz přírodního původu aroma jahodových sirupů
Cílem bylo u souboru u 14 vzorků řepkového medu z různých oblastí České republiky identifikovat těkavé látky řepkového medu a určit, které z nich jsou senzoricky aktivní. ¹⁸	• 21 těkavých látek řepkového medu	• metoda NIF, • 6 hodnotitelů, • 8 senzoricky aktivních látek • nebyl prokázán vliv skladování na profil těkavých látek
Cílem bylo u čerstvého nezrajícího sýru ověřit vliv změny receptury (snížení obsahu soli) na profil těkavých a senzoricky aktivních látek. ¹⁹	• 22 těkavých látek čerstvého sýru	• metoda NIF, • 7 hodnotitelů, • 13 senzoricky aktivních látek • nebyl prokázán negativní vliv snížení obsahu soli na profil těkavý a senzoricky aktivních látek
Cílem bylo charakterizovat látky zodpovědná za zápach pocházející čistírny odpadních vod sýrárny. ²⁰	• typické produkty oxidace lipidů či mikrobiální degradace mléčné suroviny	• metoda NIF, AEDA • 4 hodnotitelé (2 opakování) • 20 senzoricky aktivních látek (NIF) • AEDA – pouze 6 látek detegováno v ředění 1:2, nejvyšší FD (2048): oktanol, nonanol, hexanal a okten-3-ol

Tab. III: Příklady využití GC-O k identifikaci senzorického defektu vzorku na Ústavu konzervace potravin, VŠCHT Praha

Úkol	GC-MS	GC-O
Cílem bylo u vzorku nealkoholického nápoje s jahodovou příchutí s nepříjemnou štiplavou chutí a chemickou pachutí na zadní části jazyka a patra identifikovat příčinu senzorického defektu. ²¹	defektní vzorek nápoje oproti kontrolnímu vzorku navíc obsahoval bifenyly a dva jeho deriváty: 2-methyl-l, l'-bifenyly a 4-methyl-l, l'-bifenyly	- metoda NIF, 7 hodnotitelů, 16 senzoricky aktivních látek - určen původce přípachu: 2-methyl-l, l'-bifenyly a 4-methyl-l, l'-bifenyly (NIF = 1) - identifikace původu defektu: konzervační látka benzoan sodný kontaminována bifenylem
Cílem bylo u vzorku balené pramenité vody s nepříjemným mastným zápachem identifikovat příčinu senzorického defektu. ²²	defektní vzorek nápoje oproti kontrolnímu vzorku navíc obsahoval nonanal a 2,4-dakadienal – produkty oxidace tuků	- metoda NIF, 4 hodnotitelé, - určen původce přípachu: 2,4-dakadienal - identifikace původu defektu: nevhodné skladování balené pramenité vody (kuchyně restaurace)

Literatura

- van Ruth SM, O'Connor CH: *Eur. Food Res. Technol.* 213 (1), 77 (2001).
- Högnadóttir Á, Rouseff RL: *J. Chromatogr. A* 998, 201 (2003).
- Plutowska B, Wardencki W: *Food Chem.* 107 (1), 449 (2008).
- Wardencki W, Chmiel T, Dymerski T (2013): Gas chromatography-olfactometry (GC-O), electronic noses (e-noses) and electronic tongues (e-tongues) for *in vivo* food flavour measurement. In: *Instrumental Assessment of Food Sensory Quality* 627. (Kilcast D ed.), Woodhead Publishing, 195-229.
- ČSN EN ISO 5492 Senzorická analýza – Slovník, 2009.
- Steinhaus M (2019): Gas Chromatography-Olfactometry: Principles, Practical Aspects and Applications in Food Analysis. In: *Advanced Gas Chromatography in Food Analysis* 486. (Tranchida PQ ed.), Royal Society of Chemistry, 337-392.
- Brattoli M, Cisternino E, Dambrosio PR, et al.: *Sensors* 13 (12), 16759 (2013).
- Brattoli M, de Gennaro G, de Pinto V, et al.: *Sensors* 11 (5), 5290 (2011).
- Welke JE, Hernandez KC, Nicolli KP, et al.: *J. Sep. Sci.* 44, 135 (2020).
- Pollien P, Ott A, Montigon F, et al.: *J. Agric. Food Chem.* 45, 2630 (1997).
- Zellner Bd'A, Dugo P, Dugo G, et al.: *J. Chromatogr. A* 1186, 123 (2008).
- Laor Y, Parker D, Pagé T: *Rev. Chem. Eng.* 30, 139 (2014).
- van Harreveld AP, Heeres P, Haesema H: *J. Air & Waste Manage. Assoc.* 49, 705 (1999).
- Parker JK, Kelly CE, Gane SB: *Commun Med.* 2, 58 (2022).
- Yu C, Crump D: *Build. Sci.* 33, 357 (1998).
- Šístková I, Haubeltová A, Pohůnek V, Čížková H: *Chem. Listy* 111, 343 (2017).
- Kružík V, Helísková H, Brožová E, Průchová K, Grégrová A, Čížková H: Chemická a smyslová charakteristika aroma jahodových sirupů. In: *XLVI. Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin 23.–25. 5. 2016* (Cejpek K Ed.), Sborník, 124.
- Kružík V, Vápenka L, Škorpilová T, Zíková A, Čížková H: Charakterizace majoritních vonných látek řepkových medů pomocí plynové chromatografie s olfaktometrickým detektorem. In: *XLVI. Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin 23.–25. 5. 2016* (Cejpek K Ed.), Sborník, 108.
- Hanková M, Málková M, Čížková H, Kružík V, Rajchl A (2022): Vliv reformulace sýrů na profil těkavých a senzoricky aktivních látek. In: *Nové trendy v úchově potravin 22. 2. 2022* (Škorpilová T, Rajchl A Ed.), Sborník, 124.
- Hanková M, Maturová K, Čížková H: *Water Sci. Technol.*, 82, 2482 (2020).
- Šístková I, Kružík V, Rajchl A, Čížková H: *Czech J. Food Sci.*, 36, 16 (2018).
- Hanková M, Kružík V, Čížková H: *Kvasný Prům.*, 4, 64 (2018).

Souhrn

Šístková I., Málková M., Čížková H.: Využití plynové chromatografie s olfaktometrickým detektorem pro analýzu vonných látek v potravinách

Plynová chromatografie s olfaktometrickým detektorem (GC-O) je technika založená na senzorickém hodnocení eluátu z chromatografické kolony s cílem detegovat aroma aktivní látky vyskytující se v potravinách. GC-O umožňuje určit, zda látka opouštějící chromatografickou kolonu je senzoricky aktivní v dané koncentraci, tzn. jestli se vyskytuje ve vzorku v koncentraci vyšší, než je práh vnímání dané látky; a jakou má vůni (popis vjemu), stejně tak jak dlouho vjem trvá a jakou má intenzitu. V referátovém článku jsou popsány metody, výhody a omezení kvalitativního a kvantitativního hodnocení vůně potravinářských vzorků a sdíleny zkušenosti z pracoviště autorů.

Klíčová slova: plynová chromatografie, olfaktometrická analýza, olfaktogram, analýza potravin

Summary

Šístková I., Málková M., Čížková H.: The use of gas chromatography with an olfactometric detector for the analysis of aromatic substances in food

Gas chromatography with an olfactometric detector (GC-O) is a technique based on the sensory evaluation of the eluate from a chromatographic column in order to determine the aroma of the active substances in food. GC-O enables to determine whether the substance leaving the chromatographic column is sensory active at a given concentration i.e. if it is present in the sample at a concentration higher than the odour threshold of the given substance. Moreover, at the same time determine what kind of odour it has (description of the perception), as well as how long the perception lasts and how intense it is. The review describes the methods, advantages and limitations of qualitative and quantitative evaluation of the odour of food samples and shares the experience of the authors' workplace.

Keywords: gas chromatography, olfactometric analysis, olfactogram, food analysis

OBSAH

Úvodem	13
Zpráva z konference	14
Straka D., Meledina A., Smirnova T. A., Kučková Š.: Přehled metod používaných pro zjištění živočišného původu krevních stop	16
Husáková M., Patáková P.: Houba <i>Monascus</i> a její metabolity	19
Shagieva E., Demnerova K., Michova H.: Interakce <i>Campylobacter jejuni</i> s <i>Acanthamoeba</i> spp.	20
Šístková I., Málková M., Čížková H.: Využití plynové chromatografie s olfaktometrickým detektorem pro analýzu vonných látek v potravinách	24

CONTENT

Editorial	13
Report from the conference	14
Straka D., Meledina A., Smirnova T. A., Kučková Š.: Overview of methods used to determine the animal origin of blood traces	16
Husáková M., Patáková P.: <i>Monascus</i> and its metabolites	19
Shagieva E., Demnerova K., Michova H.: Interaction of <i>Campylobacter jejuni</i> with <i>Acanthamoeba</i>	20
Šístková I., Málková M., Čížková H.: The use of gas chromatography with an olfactometric detector for the analysis of aromatic substances in food	24

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).