

MIKROBIOMNOVINY

Informační servis

České mikrobiomové společnosti ČLS JEP, z.s.

Motto měsíce:

Whatever concerns health
is of real public interest
([Élie Metchnikoff](#))

Upozornění na akce:

1.11. 2023 17:00 Městská knihovna, Praha.

Mikrobiom a roztroušená skleróza, přednáší prof. Eva Kubala-Havrdová, Městská knihovna Praha
[ZDE](#)

7.11.2023 (13:30-17:00) Praha

Novinky v Lékařské mikrobiologii s přednáškou prof. Cinka: „Jaké jsou současné možnosti analýzy mikrobiomu a jaké informace nám mohou poskytnout“. Lékařský dům, Sokolská 490/31, 12000
[ZDE](#)

12. - 14.3. 2024 Pharmabiotics Lille, France

[ZDE](#)

18. - 20.6. 2024 Praha

17th International Scientific Conference on Probiotics, Prebiotics, Gut Microbiota and Health - IPC2024
[ZDE](#)



Editorial

Vážené a milé kolegyně a kolegové,

Těsně před redakční uzávěrkou se rozezněly redakční tamtamy skvělou zprávou – prezident Petr Pavel vyznamenal prof. Helenu Tlaskalovou Hogenovou medailí Za zásluhy I. stupně za zásluhy o stát v oblasti vědy. První předsedkyni ČMS jistě není třeba zvlášť představovat, všichni známe a oceňujeme její průkopnické úsilí v oblasti studia mikrobiomu u nás. Kromě vědecké erudice si prof. Tlaskalová zasluhuje náš obdiv pro svou neuvěřitelnou pracovitost, vytrvalost, vědeckou poctivost a lidskou laskavost. Heleno, gratulujeme!

A co dalšího přináší podzimní číslo Mikrobio(m)novin? Podzim je období sklizně a naši předci stáli před problémem, jak všemožné plodiny uskladnit na zimu, což v dobách před masivním rozšířením konzervárenství a mrazáků byl docela oříšek. Jednou z nejstarších technik konzervace potravin je fermentování. V hlavním článku nazvaném příznačně **Jak kvasinky určily vývoj lidstva** zabrousíme do prehistorie a dozvíme se, kdy a jak se vyráběly první kvašené nápoje a že to možná byla právě láska k pivu, které ze sběračů a lovců udělala usdlé zemědělce.

Navážeme rozhovorem s Mgr. Štěpánem Hodačem, majitelem firmy I love Hummus, který už sedm let zásobuje náš trh pravým českým kimchi značky Beavia a má lví podíl na tom, že se tato korejská dobrota dostala i na naše stoly a z nich do našich střev.

Nebude chybět ani Metodické okénko kolegyně Petry Vídeňské, Aktualita a rubrika Mikrobi v kuchyni, kde se Jakub podělí o zdary a nezdary při snaze vyrobit doma v kuchyni sýr chudých.

Celá redakční rada přeje klid a mír v duši, pohodu ve střevech a radost ze života kolem.

Společenská rubrika

Gratulujeme našemu kolegovi **Martinovi Schwarzerovi** k velkému úspěchu. Stal se Laureátem ceny Neuron 2023 pro nadějně vědce v oboru biologie za důležitý objev, který přispívá k pochopení vlivu mikrobiomu na růst savců a který může zásadním způsobem přispět k řešení podvýživy u dětí. Martin Schwarzer zkoumá vliv bakterií na růst mláďat a se svým vědeckým týmem jako první ukázali, že střevní bakterie jsou nezbytné pro optimální růst v raném věku. Výsledky tohoto výzkumu byly publikovány v časopise Science.

zdroj: [NF Neuron](#)



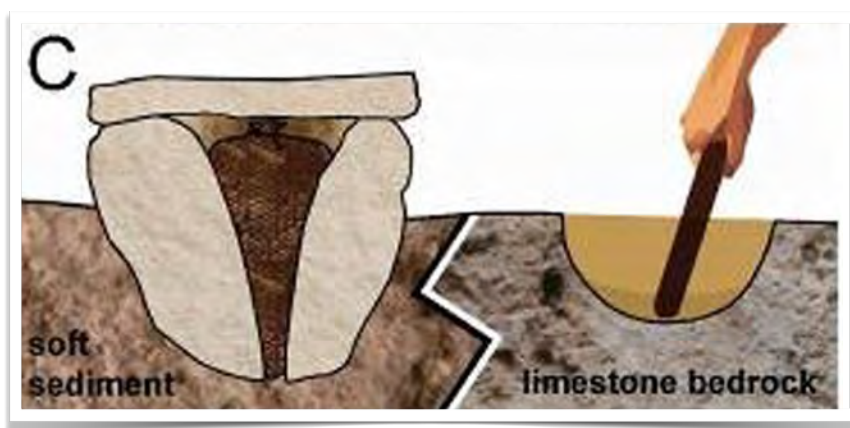
Téma měsíce:

Jak kvasinky určily vývoj lidstva

Fermentace provází lidstvo od doby, kdy naši předci opustili nomádský život sběračů a lovců, usadili se a začali se živit zemědělstvím. Ve zpětném pohledu není úplně jisté, jestli to byl dobrý nápad, ale stalo se a nezbyvá než se s touto skutečností smířit (Yuval Noah Harari, Sapiens: Od zvířete k božskému jedinci). Archeologické nálezy naznačují, že princip kvašení člověk objevil téměř současně s pěstováním plodin a chovem dobytka.

Je více než pravděpodobné, že se tak stalo náhodou – nadojené mléko do druhého dne zkyslo, z ovoce nasypaného do nádoby vznikla šťáva, která měla téměř zázračné účinky (alespoň dočasně). Úžasné ovšem bylo, že v této podobě se potraviny daly uchovávat mnohem delší dobu – a kvašení se začalo široce využívat ke **konzervaci** potravin. Bonusem pak byla i **nová chuť** a někdy i **vyšší energetická hodnota**.

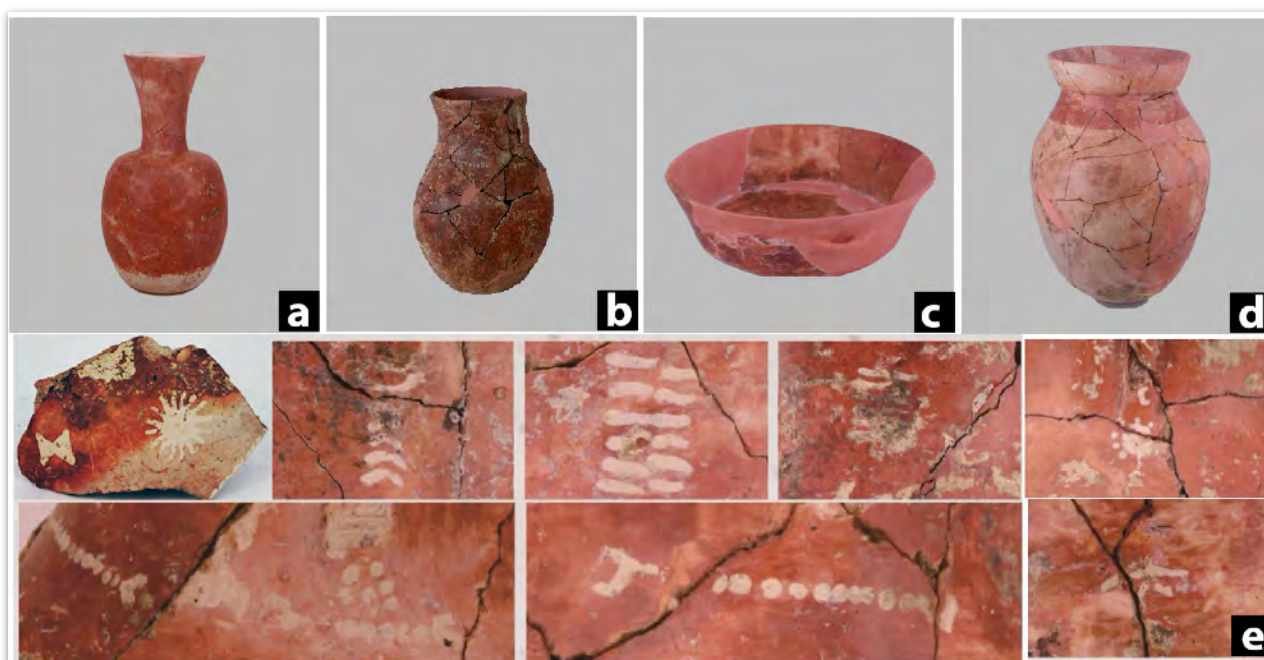
Existuje však i mnohem více revoluční hypotéza, která předpokládá, že **kvašení bylo přímo jedním z podnětů, které naše předky k zemědělskému způsobu života přivedly**. Přišel s ní Robert Braidwood v roce 1953 v článku nazvaném [Did Man Once Live by Beer Alone?](#) a od té doby získala řadu přívrženců i některé podpůrné důkazy. Znamky přítomnosti piva byly nalezeny na Blízkém východě na nalezišti jeskyně Raqefet (13 700 až 11 700 př.n.l.) (obr 1) nebo Turecku v lokalitě Gobekli Tepe, monumentální svatyni, která byla postavena kulturou sběračů a lovců. Získat dostatek divoké rýže na výrobu piva však představovalo mnoho hodin námahy, zatímco sběr jiných zdrojů potravy (např. měkkýšů, jedlých hlíz nebo bambusových kořenů) vyžadoval méně času a práce.



Obr. 1

Logickým řešením bylo nedostatkovou plodinu domestikovat a pěstovat. Proč však naši předkové vynakládali tolik úsilí, aby si zajistili těžko dostupnou plodinu k produkci nutričně tak málo významných potravin, jako jsou alkoholické nápoje? Odpověď zní – pití alkoholu bylo výrazným stmelujícím prvkem, který podporoval soudržnost skupiny. A podle moderních hypotéz byla právě soudržnost skupiny a schopnost spolupráce tím evolučním trumfem, který z nahé opice udělal dominantní druh na Zemi. Nálezy indikující přítomnost alkoholických nápojů jsou spojeny s důležitými rituály, zejména pohřby. První společenství, která znala alkohol, byla pravděpodobně egalitářská a alkohol sloužil k upevnění vzájemných pout, postupně se však tato ceněná potravina stala znakem moci a postavení. Vládnoucí elity kontrolovaly přístup jak k surovinám, tak i k technologii vaření piva, což přispívalo k jejich legitimizaci. Doklady tohoto uspořádání byly prokázány např. v předincké kultuře obývající oblast kolem jezera Tihuanaka (lokality Cerros Beúl, [Peru](#)). Pokud jsou tyto úvahy správné, za evolučním úspěchem lidstva stojí malá kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* a pár dalších mikroorganismů. Lidskou civilizaci pak formovala náchyllost k alkoholu, což by koneckonců vysvětlovalo mnoho z jinak nepochopitelných dějinných událostí.

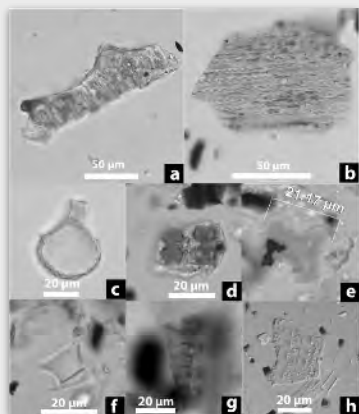
Nicméně, opusťme tenký led prehistorické politologie, sociologie a psychologie a vraťme se ke snáze uchopitelným tématům. Jeden z nejstarších doložených případů výroby piva je datován do doby 9 000 let př.n.l. ve vykopávkách z lokality Qiaotou ve střední Číně v blízkosti řeky [Jang-c'-tiang](#). V keramických střepech (obr 2) byly nalezeny mikrofosilie poukazující na přítomnost kvašeného piva.



Obr. 2 Reprezentativní typy keramiky nalezené v Qiaotou. (a) a (b) nádoba s dlouhým hrdlem hu; (c) mísa; (d) džbán; (e) Výběr malovaných vzorů z keramiky Qiaotou. Převzato z Wang J. et al., 2021.

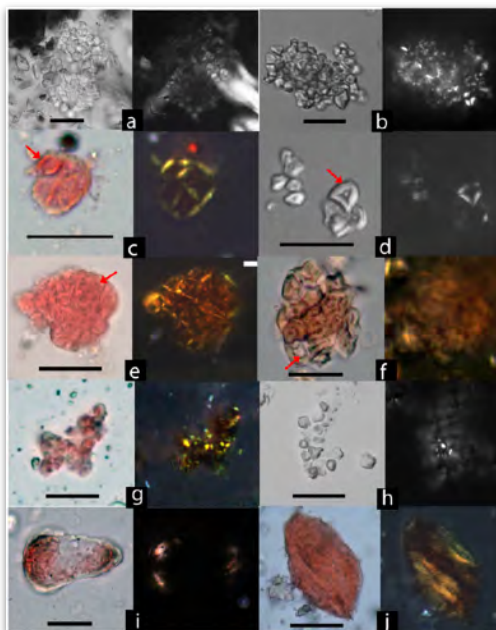


Slzovka obecná (*Coix lacryma-jobi*), též Slzovka porcelánová neboli Jobovy slzy, je jednoletá tropická obilnina z čeledi lipnicovitých.



Fytolity jsou mikroskopické částice oxidu křemičitého, které se tvoří v rostlinných tkáních. Vznikají, když rostliny přijímají hydratovaný oxid křemičitý z půdy prostřednictvím kořenů. Hydratovaný oxid křemičitý se pak může ukládat v jakémkoli rostlinném pletivu (kořenech, listech, dřevě, květech, plodech a semenech) uvnitř buněk nebo v mimobuněčných prostorech, kde pak tuhne.

Jsou to jednak škrobová zrna (obr 3) nesoucí zřejmě známky poškození v důsledku enzymatické hydrolýzy a zahřívání, zbytky hub a kvasinek, a konečně fytolity charakteristické pro rýži nebo rostlinu s poetickým názvem Jobovy slzy.



Obr. 3 Zrnka škrobu z hrnců Qiaotou ve srovnání se vzorky z pokusů s vařením rýže. Převzato z Wang J. et al., 2021.

Rané důkazy o pití piva v 9000 let staré ploštinové mohyle v jižní Číně: (a) Škrob typ I z Quiatou (rýže), v porovnání s (b); (c) a (e) složená zrna rýžového škrobu vykazující centrální důlky (označené červenými šipkami) a želatinizaci (poškození škrobu typu 1), v porovnání s (d) a (f); (g) mírně želatinizovaná rýžová zrna bez důlků (typ poškození škrobu 2), v porovnání s (h); (i) želatinizovaný škrob z Qiaotou, pravděpodobně z USO (typ poškození škrobu 2); (j) želatinizovaná granule škrobu z Qiaotou (typ poškození škrobu 2).

Vzorky z fermentačních pokusů s rýží: (b) shluk nemodifikovaných granulí rýžového škrobu (*Oryza sativa*); (c) a (f) složené granule rýžového škrobu vykazující středové důlky (označené červenými šipkami) a želatinizaci, což je výsledek kombinovaného působení zahřívání a enzymatické hydrolýzy během fermentac; (h) mírně želatinizovaná zrnka rýžového škrobu, která vykazují slabé extinkční kříže v polarizovaném světle.

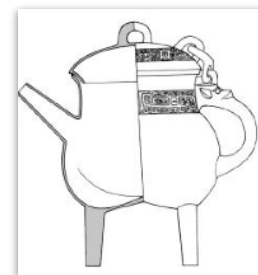
Přítomnost hub, konkrétně *Aspergillus*, *Rhizopus* a *Mucor*, je velmi zajímavá, protože ukazuje na ovládnutí technologie sacharifikace (zucukrování) rýže. Polysacharidy obsažené v rýži nemohou být mikroorganismy přímo fermentovány, je nutné je nejprve rozložit na jednoduché cukry, ze kterých pak kvasinky vytvoří alkohol.

V pivovarnictví je tento proces známý jako příprava sladu. Současné technologie využívají procesu klíčení, kdy dochází přirozeně k odbourávání polysacharidů na jednoduché cukry, které rostlince slouží jako zdroj energie. Při výrobě sladu se po několika dnech proces klíčení přerušuje zahřátím na vysokou teplotu. Ve starověku se však využívala jiná technologie, a to právě pomocí plísní. Používá se ostatně i v současnosti – jen už nikoli k výrobě piva, ale např. rýže na miso a amazaké („plesnivá“ neboli [koji rýže](#)).

Materiál určený k fermentaci se nejprve nechá prorůst kulturou vhodných hub, které složité polysacharidy natráví. Vzniká pevný „koláč“ (*qu*) obsahující houby, směs enzymů i kvasinky, který slouží jako „starter“ při výrobě piva. Jako většina objevů v historii lidstva i tento poznatek pravděpodobně spatřil světlo světa v důsledku náhody a trochy lenosti – stačilo, aby se někde v teple a vlhku zůstala válet hromádka rýže a první *qu* byl na světě. Pak už jen někdo nevábnou hmotu hodil do nádoby (možná i jenom díry) s vodou, a za pár dní vznikl první rýžový ležák (znalci a milovníci piva prominou). (Science and Civilisation in China: Volume 6, Biology and Biological Technology, Part 5, Fermentations and Food Science ISBN: 978-0521652704)

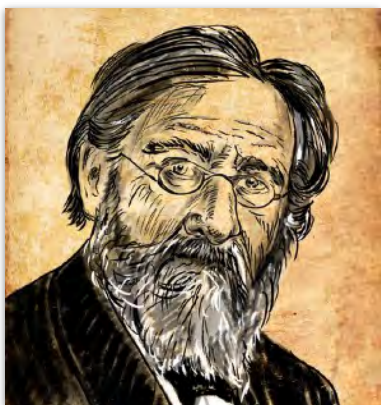
Odlišná technologie výroby alkoholu byla prokázána při vykopávkách v ranně neolitické lokalitě Jiahu v provincii Chenan ve střední Číně (článek [zde](#)). I zde byly objeveny střepy keramických nádob, do kterých se vsádky zbytky tekutiny. Pomocí radiokarbonové metody a dendrochronologie byly nálezy datovány do období 7 000- 6 600 př.n.l. Zbytky tekutin se podařilo extrahovat a podrobit nejmodernějším analytickým metodám. Byly identifikovány látky, které ukazují na přítomnost rýže, medu a hroznů. Alkohol se prokázat nepodařilo, ale to už bychom vzhledem k vysoce těkavému charakteru této látky chtěli moc. „Vinné kvasinky“ (*Saccharomyces cerevisiae*) se běžně vyskytují a pravděpodobně i vyskytovaly na povrchu sladkého ovoce. Zkvašení směsi ovoce a medu se nebylo možné vyhnout – buď skončilo alkoholickým nápojem, nebo octem, jak kdy.

Vítězné tažení alkoholu dějinami lidstva pokračovalo. Vinařství je doloženo v Gruzii už kolem 6 000 př.n.l., kolem roku 3 000 př.n.l. v Mezopotámii a v Egyptě, v období kolem roku 2 000 př.n.l. v Mexiku. Nejstarší písemné zmínky pochází z Číny z období pozdní dynastie Chang (1200 – 1046 př.n.l.), ve kterých se zmiňují tři druhy alkoholických nápojů, *chang* (bylinné víno), *li* (pravděpodobně sladký nápoj z rýže nebo prosa s nízkým obsahem alkoholu) a *jiu* (plně fermentovaný a filtrovaný nápoj z rýže nebo prosa s 10-15% alkoholu). Z tohoto období máme nálezy, kde už se nemusíme spoléhat jen na zbytky vsáknuté do střepů – alkohol z této epochy bychom mohli i ochutnat. Dochovaly se téměř hermeticky uzavřené bronzové nádoby někdy ještě zpola naplněné tekutinou, které byly součástí pohřebních rituálů (obr 4). Napadá mě, že zde lze opravdu hovořit o **archivním vínu** ...



Obr. 4 "Konvička" s víčkem z Anyangu (hrobka Liu Jiazhuang, č. M1046:2, asi 1250-1000 př. n.l.). Převzato z McGovern P.E. et al., 2003.

Zatímco alkoholové kvašení k sobě přitahovalo pozornost starověkých elit a jeho historie zajímá i soudobou vědu, poněkud v pozadí zájmu zůstávaly další fermentující mikroorganismy a jejich produkty. Výjimkou je snad ocet, který se používal jako univerzální konzervační látka a čile se s ním obchodovalo, jak dokládají už obchodní záznamy z dob antického Řecka. Ocet si našel cestu i do Bible, kdy římský voják podává ukřižovanému Kristu na kopí houbovou namočenou ve víně s octem. Nešlo o rafinovaný způsob týrání, ale o běžnou realitu – ocet se do vína (nebo vody) přidával z hygienických důvodů. O jiných fermentačních produktech toho víme ještě mnohem méně. Kefír pravděpodobně nebyl součástí pohřebních rituálů a proces nakládání zelí se nezachoval v podobě vyobrazení. Lze ale předpokládat, že i tyto technologie se hojně využívaly a přispívaly k výživě množícího se lidstva.



Obr. 5 Ilya Mechnikov

Novou éru kvašení odstartoval roku 1856 Louis Pasteur, který prokázal, že za kvasné procesy jsou zodpovědné mikroorganismy. Na přelomu 19. a 20. století se vlivem fermentovaných potravin na zdraví zabýval vynikající ruský biolog a nositel Nobelovy ceny Ilja Mečnikov (obr 5), zakladatel moderní imunologie, který přišel s originální teorií o příčinách stárnutí. Předpokládal, že stárnutí je způsobeno otravou člověka střevní flórou, dnešními slovy mikrobiotou. Proti přebujení této flóry a tím proti stárnutí doporučoval Mečnikov zvyšovat střevní kysání, což se podle jeho pozorování prý osvědčilo u bulharských venkovanů požívajících hojně jogurty.

Co do mechanismu působení se současná věda s Mečnikovovými názory neztotožňuje, ale prospěšnost kysaných výrobků byla opakovaně prokázána. Když do vyhledávače PubMed (NIH) zadáte klíčová slova „fermented food and gut microbiome and human“, vypadne vám 515 výsledků. Rozhodně nechci tvrdit, že jsem poctivě prošla všechny, ale při povšechném pohledu na názvy prací se vesměs jednalo o potvrzení pozitivních účinků fermentovaných potravin – a to včetně [piva](#) 😊

Toto téma jsme nezařadili do říjnového čísla náhodou. Podzim byl vždycky obdobím nakládání zelí. Fermentovat lze ale nepřeberně dalších surovin – dobrodružnější povahy se mohou inspirovat např. na webu [zkvaseno.cz](#) a pustit se do toho sami, ti opatrnější nebo bez studeného sklepa si mohou dopřát kvašené produkty např. od firmy Beavia, s jejichž zástupci přinášíme v tomto čísle rozhovor.

Rozhovor s mgr. Štěpánem Hodačem, zakladatelem firmy Beavia



Vystudoval práva, pracoval jako koncipient a poté založil svoji realitní kancelář. Práce ho však zcela nenaplňovala a při jednom z meditačních pobytů v Izraeli narazil na hummus, který se rozhodl vyrábět pod značkou I love Hummus. V roce 2017 přidal i kimchi a k 10.letému výročí firmy představil značku Beavia ([www.beavia.com](#)), která umožňuje rozvoj produktových řad a expanzi na evropských trh. Volný čas věnuje rodině a zejména malému synkovi Josífkovi a sportu.

Štěpáne, co tě přivedlo na myšlenku prodávat v Čechách kimchi?

Kimchi jsem objevil díky žebříčku nejzdravějších potravin, kde se kimchi pravidelně vyskytuje a protože to byla jediná položka, kterou jsem z tohoto žebříčku neznal, tak jsem byl zvědavý jaké to je a jak to chutná. V té době (2013-2015) nebylo v ČR žádné kimchi k dispozici na trhu, takže jsem si ho musel objednat z USA Amazonu. Protože z Amazonu to šlo do ČR 3 měsíce, našel jsem na netu video jak si kimchi vyrobit a v mezích jsem ho začal vyrábět. Hned na první pokus mi zachutnalo a pak už jsem ladil chut' a hrál si s ingrediencemi. A protože na trhu nebylo a měli jsme již distribuční síť na hummus, bylo jednoduché začít kimchi v ČR prodávat.

O fermentaci čtu řadu článků a studií a je to rozhodně jeden z budoucích směrů v potravinářství, nicméně budoucí trendy z pohledu „big picture“ jsou tak trochu alchymistická laboratoř s velkými investicemi do výzkumu. Fermentaci jako způsob konzervace znali naši předci a díky ní přežívali zimu na nutričně bohatém jídle. Kvašení patří mezi ekologickou výrobu, stačí mikrobům připravit to správné prostředí a oni už udělají většinu práce sami. To mě baví.

Jaké byly začátky Tvé firmy?

Se zápallem jsem se v roce 2011 pustil do plnění vlastního snu. Začalo to (pořádným) hummusem. Po předešlých několika návštěvách blízkého orientu se mi začala v hlavě rodit myšlenka I love Hummus.

Projekt uzrval díky stáží v izraelských restauracích. O pár měsíců později se mi podařilo v Čechách založit malou rodinnou firmu. Po krátkém čase již u hrnců vařené cizrny nestačila pouze má 84letá babička (která nad cizrnu bděla od začátku), tým se postupně začal rozšiřovat, dnes je nás 15. Můj týden začínal v neděli, kdy jsem musel uvařit čerstvý hummus, v pondělí ho dopoledne rozvezl, odpoledne dělal ochutnávky, ve středu opětovně vyrobil, čtvrtek rozvoz a až do pátku ochutnávky, a takto stále dokola. A poté přišlo kimchi, nová značka Beavia, jejíž posláním je, aby se lidé vrátili k sobě a přírodě prostřednictvím zdravého a chutného jídla a našli tak svoji šťastnou cestu (Beavia pochází z latiny a znamená Šťastná cesta).

Jak si stojí firma teď?

Firma prodělala velkou změnu. Minulý rok přestala vyrábět hummus a teď nám ho vyrábí náš partner Ponnath a my se jako Beavia soustředíme pouze na fermentované produkty. Součástí toho je snaha vyrábět co nejvíce ekologicky a s co nejmenším množstvím odpadu, takže třeba odpad z naší zeleniny vozíme do bioplynky u Benešova (Bioplynka APBB), kde z toho vzniká elektřina a teplo. Z výroby kimchi nemáme žádný jiný odpad než odpadní vodu a její množství se snažíme zredukovat na minimum. Příští rok chceme stavět hydroponický hybridní skleník, takže budeme schopni část zeleniny, kterou potřebujeme vypěstovat sami. Skleník bude vyhříván odpadním teplem z kotelny a kuchyně abychom dokázali prodloužit vegetační období – čas pěstování zeleniny (doutáme v únor až listopad). U zeleniny je pro nás velmi důležité odkud pochází a aby byla řádně vypěstovaná, tedy to znamená, aby byly dodrženy všechny postupy. Naši partneři nám dodávají laboratorní testy, kde vidíme kolik má herbicidů a pesticidů. Bohužel se na trhu objevuje zelenina, která tyto limity překračuje a to my neakceptujeme. Naše zelenina, ze které vyrábíme kimchi má tedy kvalitu, jako kdyby jste si ji vypěstovali doma.



Je o Vaše produkty zájem?

Jasně. Lidé si podle mne díky Covidu uvědomili, že mají zdraví ve svých rukou a že bez zdravé stravy je těžké dosáhnout dobrého zdravotního stavu. Z tohoto pohledu je kimchi zázrak. Jednak je to nejzdravější potravina, která obsahuje všechny vitamíny, minerály, makro i mikro nutrienty, vlákninu a navíc má ty naše laktobacily. A ještě k tomu chutná skvěle! Můžete mrknout na www.beavia.com



Odkud berete zeleninu? Máte své dodavatele v Čechách? Vnímáte ve výrobě rozdíly mezi zeleninou z různých zdrojů?

Zrovna teď bereme zelí z Troubek, kde pěstují nejlepší zelí v Čechách. Když dojde české zelí, jsme odkázáni na dovoz z Evropy. U zeleniny, kterou nakupujeme jsou strašně důležité laboratorní testy na výskyt pesticidů, herbicidů a hnojiv. Zelenina může na pohled vypadat krásně, ale ve skutečnosti může být „jedovatá“. Když pak zjistíte, že sledované limity byly několikrát překročeny, usoudíte, že toto není zelenina, kterou by jste chtěli konzumovat. Rozdíl mezi zeleninou z jiného prostředí samozřejmě je kvůli klimatu, všude jinak prší a svítí slunce, takže rozdíly tu jsou. My třeba sledujeme nejvíce cukernatost, protože ta má největší vliv na samotné kvašení kimchi, tam ty rozdíly dle prostředí, kde zelenina rostla, jsou.

Plánujete nějaké novinky? Kimchi není až tak neobvyklé, ale kvašená řepa už ano, co dál?

Zrovna v těchto dnech připravujeme spuštění naší pálivé Yumchi omáčky, se speciálním recepturou vytvořenou našim kreativním manažerem, Pavlom Pavlíkem, který se pohyboval posledních 20 let ve

fine dining restauracích. Propojuje světy - lze ji používat podle fantazie na českou nebo exotickou kuchyni - na maso, saláty, do tortil či omáčku na těstoviny. Já to mám rád na vajíčka a zkusil jsem s tím guláš. Byl výborný! Samozřejmě připravujeme další projekty v rámci nových produktů, které si zatím necháme pro sebe. Ale jedno překvapení sdělit můžu, určitě to bude fermentované, haha 😊

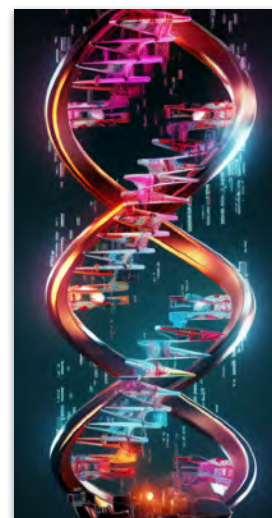
Máte nějaký oblíbený recept z kimchi/řepy?

Já si rád dělám kimchi palačinku, moc mi chutná! Japonci tomu říkají okonomiyaki, takže na tento způsob. Nasekám si zelí na drobno a to zaliju těstem na palačinky, přidám teriyaki omáčku, majonézu, slaninku a k tomu hodím kimchi. Nejoblíbenější způsob našich zákazníků, jak jíst kimchi je prostě lžičkou ze sklenice nebo jako malý salátek ke každému jídlu. Mňam. Jinak spousta receptů lidé najdou na www.beavia.com

Jaký byl nejzajímavější dotaz na noci vědců?

Paní se mne ptala, jak má fermentovat kimchi, jelikož se jí to nedaří. Vesměs vše dělala dobře a pak jsme se dostali k tématu, čím zeleninu před krouháním umývá. Sdělila mi, že používá silnou dezinfekci ve vodě. Takže jsem jí sdělil, že tím se naruší proces fermentace. Nejlepší očista zeleniny je pouze vodou.

Děkujeme za rozhovor a doufáme, že budeme vaše výrobky potkávat v obchodech stále častěji.



Metodické okénko aneb proč o střevním mikrobiomu stále h...o, pardon, STOLICI víme

Dnes nás čeká pro jednou něco pozitivního. Ano, nemusíte si čistit brýle, ani chodit na oční, vidíte dobře. Jsem pozitivní a pro jednou nebudu ty naše báječné kamarádké bakterie pomlouvat, jak vědcům ničí život. Protože dnes si budeme povídat (psát, číst, ech, dejte mi pokoj, mám dvě malé děti a neděláme nic jiného, než že si povídáme pohádky) o celometagenomovém sekvenování (WMGS), taktéž známém pod pojmem shotgun sekvenování. A budeme pozitivní, dokud se budeme držet práce v laboratoři. A stolice. Pokud tu budeme rozebírat cokoli jiného, míra optimismu bude klesat. Protože to NEJSOU báječné kamarádké bakterie, ale nepublikovatelné nepublikovatelné mrchy (ale samozřejmě je máme rádi, asi jako děti po dvou týdnech, kdy nebyly kvůli nemoci ve školce). Tak ale pusťme se do toho.

Základní popis WMGS a jeho výhody a nevýhody vůči sekvenaci genu pro 16S rRNA již máme za sebou, níže kopíruji tabulku, která je těmto rozdílům věnovaná. Nyní se zaměříme na tu praktickou část. V případě, že tedy máte k WMGS vhodný vzorek, což je jakýkoliv vzorek, kde převládá mikrobiální DNA (zde tak již nebazírujeme na bakteriích, klidně tam může být cokoli, co vás zajímá a jako hlavní nukleovou kyselinu má DNA), práce v laboratoři je téměř pohoda. Oproti přípravě genu pro 16S rRNA, kde musíte dobře promyslet jakou strategii se vydáte a skrývá mnoho již dříve popsáných úskalí, které byly popsány v bambilionech článků, zde vás čeká jen výběr vhodného kitu pro přípravu knihoven a řekněme, že ať koupíte ten či onen, pravděpodobně bude bez problému fungovat. A pak už pojedete podle návodu. Pokud se vám podařila izolace jakž takž intaktní DNA, v podstatě nemusíte dělat žádné velké úpravy a za jeden den si můžete nadělat při troše praxe 96 knihoven jen to fikne. Klidně můžete sáhnout i po automatizaci a knihoven dělat stovky. Jenom pak samozřejmě narazíte na to, že nemáte peníze na to knihovny osekvenovat.

<i>Analýza genu pro 16S rRNA</i>	<i>WMGS</i>
<p>Výhody</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cena – sekvenuje se pouze malá část vzorku • Lze sekvenovat i vzorky s minimálním množstvím bakteriální DNA (ale problém jsou kontaminace a chyby při amplifikaci) • Relativně dobře zavedená metodika a bioinformatická analýza dat <p>Nevýhody</p> <ul style="list-style-type: none"> • Žádný primer nezachycuje všechny bakterie • Krátký úsek variabilní oblasti nezajišťuje dobré rozlišení ani na úrovni rodu (rozlišitelnost se liší u různých bakterií) • Bakterie mají různý počet kopií genu pro 16S rRNA, proto se musí semikvantitativní výsledky analýz brát s určitým nadhledem • Analýzou se zachytávají pouze bakterie, někdy mohou primery nasedat i na Archea 	<p>Výhody</p> <ul style="list-style-type: none"> • Získá se informace nejenom o bakteriálním složení ve vzorku, ale i o ostatních genech, např. lze najít nejbundantnější geny metabolických drah, geny pro antibiotickou rezistenci, geny pro různé enzymy zájmu apod. • Pomocí vybraných markerových genů lze některé bakterie určit až do druhu • Lze zároveň identifikovat i další mikroorganismy (DNA viry, plísň..) <p>Nevýhody</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cena cca 10-30x vyšší, než u analýzy genu pro 16S rRNA • U vzorků s malým množstvím bakteriální DNA problém s tvorbou knihovny, u některých vzorků téměř nemožné • Nejednotná shoda v bioinformatické analýze dat • Nemusí být dostatečně hluboké, aby detekovalo vzácné druhy

Abychom si řekli, v jakých číslech se cca pohybujeme. Pro analýzu genu pro 16S rRNA většinou toužíte po 50 K readů na vzorek. Obvykle se nespokojíte se vzorky, které mají méně než 20 K readů na vzorek a naopak nechcete, aby vám ukrajovaly ze sekvenační kapacity vzorky s vyšší prosekvenovaností, než je 200 K sekvencí na vzorek. U WMGS se dostáváme k prosekvenovanosti minimálně 500 K až 5 milionů readů na vzorek, tedy cena je více než desetkrát, spíše stokrát vyšší, než u 16S rRNA. Cenu za přípravu knihoven do kalkulace nepromítám, protože oproti sekvenaci je zanedbatelná. Možná si ještě vzpomenete, na „shallow“ metagenomic sequencing, kde se připraví knihovna stejně jako pro WMGS, ale prosekvenuje se s nižší prosekvenovostí (kolem 500 K readů na vzorek), což je stále 10x více než u 16S rRNA, ale je to snesitelnější než 100x a získáte tak často lepší rozlišení na nižších taxonomických celcích a také se dozvíte nejčastěji přítomné metabolické dráhy apod.

K přípravě knihovny jsme si již leccos pověděli u okénka zaměřeného na NGS. Základní principy všech kitů jsou takové, že vezmete DNA, tu nafragmentujete na vhodnou délku, přidáte adaptory, změříte koncentraci a sekvenujete. Na trhu je mnoho kitů, mezi kterými si můžete vybrat, a různí uživatelé jsou spokojeni s různými kity, takže přímou radu ode mne nečekejte (a ani nevím, zda nemám zakázáno úřadem pro nekalou soutěž veřejně jmenovat konkrétní výrobce). V dnešní době se povětšinou fragmentuje enzymaticky a kity se právě nejvíce liší v kvalitě tohoto enzymu (kvalitní enzym produkuje fragmenty s co nejvíce minimálním rozdílem délky, je stabilní, takže se po druhém rozmrazení se chová stále stejně slušně, nezačne stávkovat a umí se vypořádat i s takovou zálužností, jako jsou oblasti bohaté na GC páry) a následně v strategii připojování adaptorů. Doporučuji před zakoupením jakéhokoliv kitu si pořádně

přečíst jeho protokol, zjistit, zda jsou všechny kroky blbovzdorně popsány a hlavně zda rozumíte přesně jak kit aspoň teoreticky funguje (připojují se adaptory natupo? Nebo přes nějakou extenzi? Kolik PCR kroků kde a proč je? Chceme jich totiž co nejméně... atd.).

Zkusme si alespoň naznačit nějaké základní typy, ačkoliv výběr na trhu je opravdu velmi rozmanitý. Budeme se držet enzymatického štěpení, protože je nejčastější a jeho výhody jsme si již popsali. Můžeme sáhnout po enzymech, které pouze štěpí, nebo po takových, které štěpí a zároveň přidávají sekvenci (tzv. tagmentázy), díky které se nepřipojují adaptéry na tupo, ale právě přes tuto sekvenci, což činí celou reakci více [efektivní](#).

Základní typ je pro vzorky s dostatečným množstvím DNA, kterou naředíte na přesnou koncentraci dle manuálu (doporučuji ředit na dvakrát, tedy chci-li jako výslednou koncentraci 10ng/ul, prvně naředím na 20ng/ul, proměřím, upravím dle skutečné koncentrace ředění a doředím na těch 10ng/ul), přidáte enzym, inkubujete, zastavíte štěpení a upravíte konce sekvencí (zbavíte se posunů), zkontrolujete délky fragmentů pomocí nějaké kapilární elektroforézy (popsáno v minulém okénku), naligujete často natupo adaptéry a pro pomnožení finálního produktu, který má hezky slušně adaptory z obou stran, uděláte PCR. Kontrolní kroky knihoven jsou obdobné jako u genu pro 16S rRNA, tedy zase kapilární elektroforéza, u které si dejte pozor zejména zda byly dobře odmyty dimery adapterů a fluorometrické a qPCR měření koncentrace.

Pokud máte rádi dobrodružství, můžete zvolit kit PCR free. Postup je velmi podobný, jen nedochází k amplifikaci výsledných fragmentů, proto je logické, že se tento způsob nehodí zejména pro vzorky, kde bojujeme s nekvalitní a málo koncentrovanou DNA. Zároveň ale tím, že krok amplifikace vynecháte, nedochází k amplifikačním chybám. Závěrečné měření koncentrace bývá často možné pouze pomocí qPCR, protože knihovny je na fluorometrické měření příliš málo.

Pokud bojujete s velmi nafragmentovanou DNA nebo nízkou koncentrací, existují i kity právě pro vás! Obsahují takové fráze, jako nano, high sensitivity, low input apod. Často se ale i základní typy kitů v návodu věnují těmto situacím, je ale potřeba věnovat čas přesným optimalizacím (nejčastěji se hýbe s časem inkubace štěpícího enzymu, počtem PCR cyklů nebo se přidávají „enhancery“, tedy takové zesilovače reakce).

Stejně jako u genu pro 16S rRNA je dobré myslet jak na pozitivní, tak negativní kontroly, protože kontaminacím se nevyhnete ani u tohoto přístupu.

A nyní se trošku odkloníme od optimismu a řekneme si, co dělat, když přijde pan Problém. Asi nejčastějším problémem jsou nevhodné délky fragmentů. Nemělo by tam být víc než 10% fragmentů, které se mohou prosekvenovat na flowcell (to si vypočítejte dle vámi zvoleného sekvenačního kitu). Taktéž by nemělo být více než 10% fragmentů delších než 2000bp. Tato přesná čísla lze zjistit pomocí kapilárních elektroforéz. Zároveň očekávejte, že kratší ready se přednostně váží na flowcell a zvažte, nakolik vám je tedy jejich přítomnost příjemná – u sekvenací kratších readů vám to patrně vadit nebude, pokud ale z nějakého dobrého důvodu chcete ready dlouhé (např. 2x250bp), už je přítomnost krátkých sekvencí na pováženu. Co s tím? Záleží na tom, jak vážný problém je. Pokud je knihovna úplně špatná, tak nezbude nic jiného, než připravit knihovnu celou znovu, ale s upravenými parametry. Pokud je délka jakž takž, jenom se potřebujete zbavit příliš krátkých, nebo příliš dlouhých fragmentů, pak je na řadě size selection. Můžete vyřezávat z gelu, můžete použít magnetické kuličky (asi nejčastější a nejjednodušší přístup) a pokud máte hodně zbytečných peněz, můžete použít [zařízení](#), které dokáže do zkumavky odvést frakci fragmentů dle vámi přesně nastavených parametrů (např. jen fragmenty dlouhé 300-500 bp).

Druhým častým problémem je přítomnost dimerů adapterů, zde stačí opětovné přečištění knihovny, nejčastěji zase pomocí magnetických kuliček. Už při počátku tvorby knihoven může být problémem vysoká přítomnost RNA – vždy používejte při izolaci RNAázu. A pokud se vám stane, že máte většinu jakž takž nedegradované DNA, ale pak na konci gelu vidíte velký šmír (anglicky smear, v realitě šmouhu) můžete to

risknout a vyříznout si z gelu jen tu kvalitní, bude se vám s tím lépe pracovat (tedy každou DNA dejte na gel, ať vidíte, s čím pracujete, minimálně aspoň z počátku, než si budete jisti, že je vždy jedna jako druhá).

Posledním problémem, který mě tak napadá, je nízká finální koncentrace. To většinou vzhledem k pikomnožstvím potřebným pro sekvenaci nemusí být velký problém, prostě jen musíte velice pečlivě měřit pomocí qPCR finální koncentraci a následně vše správně přepočítat, nemusíte tedy vždy začínat finální ředění ze 4 nM knihovny jak je v protokolu, ale vyzbrojení nabytými znalostmi třetí třídy – trojčlenkou – se můžete pustit i do koncentrací nižších. Pokud se přese všechny kontroly a výborné mezivýsledky sekvenace nepovede, pravděpodobně bude chyba v sekvenační chemii (to se blbě prokazuje) anebo v přístroji (to se naopak nejpozději dalším runem prokáže snadno a rychle).

Hned na začátku jsem říkala, že pohoda to je, dokud se držíte stolice. Pro vzorky, kde převládá nikoliv mikrobiomová, ale hostitelská DNA je tato metoda stále nepříliš vhodná. V laboratoři vám může soukromé peklíčko vytvořit zejména vysoce fragmentovaná DNA nebo DNA s přítomností inhibitorů apod. Také ač vznešeně vykládáme o tom, jak touto metodou pokryjeme i další mikroby než bakterie, tak nezapomeňte, že třeba kvasinky a plísně tvoří ve střevním mikrobiomu minoritní část a tak zase musíte setsakramentsky hluboko sekvenovat, abyste měli vůbec co vyhodnocovat a je tak na zvážení, zda jsou takto vynaložené peníze efektivní a nebylo by lepší jít jiným přístupem (sekvenace ITS1/2 nebo 18S rRNA genu, qPCR na vybrané zástupce). Já jsem zatím příznivcem přístupu sekvenovat WMGS větší skupiny a ne každého jedince, získaná data porovnat s výsledky sekvenace genu pro 16S rRNA, vyselektovat zajímavé mikroorganismy a ty pak přesně dokvantifikovat u každého jedince pomocí qPCR.

Největší boj s WMGS ale nečekejte na poli laboratorním, ani ekonomickém, ale na poli bioinformatickém. Jeden metagenom má velikost přibližně 2TB a analýza jednoho vzorku trvá tak zhruba jeden den, navíc musíte mít přístup na velmi výkonnou počítačovou platformu – domácí PC to rozhodně neutáhne. Nicméně s klesající cenou sekvenací a naopak zlepšením přístupnosti k velkokapacitním sekvenátorům se stává WMGS běžnou součástí mikrobiomových studií a s tím jde ruka v ruce se zlepšením a standardizací analýzy bioinformatické.

A jak už očekáváte, vysoká cena WMGS a jeho momentální nemožnost implementace pro rozsáhlé studie je jedním z důvodů, proč o střevním mikrobiomu stále h...o, pardon, STOLICI víme.



MikroBioNovinky

Tématu kvašení se věnuje i práce Eriky a Justina [Sonnenburgových](#) ze Stanford University, kterou jsme zařadili do sekce „Aktuality“. Tato skupina se dlouhodobě věnuje vlivu stravy na střevní mikrobiom a zejména dopadům tzv. western-type diety. Doporučujeme jejich knihu [The Good Gut Cookbook](#), která anglicky vyšla i u nás a je možné si ji koupit. Jedním ze zásadních rozdílů ve složení naší stravy a stravy našich předků je obsah vlákniny – pravděpodobně každý čtenář MikroBioNovin byv probuzen z nehlubšího spánku odrecituje, že vláknina je alfa a omega střevního zdraví. I redakční rada se pod toto tvrzení podepíše – ale jak se potom vyrovnat s opakovanými výsledky studií, které ukazují, že podávání vlákniny se na zdravotním stavu projevuje vysoce individuálně??? Mnoha lidem prospěje, ale existuje i nemalá skupina těch, na které nemá žádný vliv a někomu může dokonce uškodit. Sonnenburgovi ve svých dřívějších studiích ukázali, že střevní mikrobiom lidí žijících v industriální společnosti a dosud přežívajících skupin udržujících „tradiční“ způsob života se liší v několika důležitých rysech. Jedním z nich je nižší zastoupení genů kódujících CAZymes, tedy enzymů nutných ke štěpení komplexních rostlinných polysacharidů. „Západní“ mikrobiota je na tyto enzymy relativně chudá a dobrodiní vlákniny můžeme využívat v omezenější míře. Řešením problému by mohly být právě zkvašené potraviny, zejména tedy zelenina nebo mléčné výrobky (nikoli alkohol!). Tyto potraviny „už před námi někdo snědl“, struktura komplexních polysacharidů je částečně narušená a tedy přístupná i dalším bakteriím a kromě toho v nich fermentující mikroorganismy zanechaly mnoho svých produktů, které jsou pro nás prospěšné. Někdo si je koupí za drahé peníze pod vznešeným názvem „postbiotika“, jiný si zobne kimchi 🍷. Tuto hypotézu podporuje i výše zmíněná randomizovaná studie, která srovnávala vliv nefermentované vlákniny (ovoce, zelenina, luštěniny atd) a fermentovaných potravin (kefír, jogurty, zelí, kimchi atd) na střevní mikrobiom, metabolom a zánětlivé parametry. V obou větvích studie lze hodnotit vliv intervence jako prospěšný, ale u „pojídačů kimchi“ byly navozené změny (snížení prozánětlivého nastavení imunitního systému) hlubší a homogenní. Zcela v souladu se vstupní hypotézou byl vliv samotné vlákniny individuálně variabilní. Důležitým výsledkem byl vliv na diverzitu střevního mikrobiomu – zatímco u skupiny s čistou vlákninou se diverzita nezměnila, u skupiny s fermentovanými potravinami se diverzita zvýšila a efekt přetrval. Zajímavé je, že na tomto zvýšení diverzity se nepodílely fermentační mikroorganismy. Pravděpodobně přítomnost fermentovaných produktů vedla ke změně prostředí střeva, což umožnilo i růst druhů, které se předtím pohybovaly pod hranou detekce.

Mikrobi v kuchyni

Sýr chudých (a soucitných)

Světlem otřásají zprávy o výbušném vývoji na Blízkém východě a tak bude blízkovýchodní i kulinařské okénko tohoto čísla MikroBionovin. Do válečné polarizace společnosti ale snad může vnést malinko smíru - pochoutka keчек al fouquara je totiž jídlo, které je (podle tzv. internetů) výrazně starší než Izrael, Palestina, Islám a možná dokonce i judaismus.

Na webu zkvašeno.cz si můžete v osm let starém článku Zuzky Ouhrabkové přečíst, že se kišk vyrábí pomocí mléčné fermentace bulguru smíšeného s jogurtem. To jsem ale zjistil dávno potom, co jsem sýr chudých doma sám vyrobil. Pamatoval jsem si totiž, že jsem kdysi na jíme jinak viděl za paywallem recept na veganské tvarůžky z bulguru, a strašně jsem si je chtěl vyrobit. Ale paywally já moc neplatím, takže jsem se samozřejmě snažil najít tentýž recept i jinde. A právě takto jsem kdesi v hlubinách anglofonního internetu našel keчек al fouquara, tedy prý v překladu sýr chudých. A tento recept byl skutečně veganský.



Foto: Jakub Caha



Toto číslo pro vás připravila redakční rada.

Hlavní téma zpracovala:
RNDr. Monika Cahová

Redakční rada
Mikro(m)novin:

Doc. RNDr. Monika Cahová, Ph.D.
Mgr. Lucie Najmanová, Ph.D.
MUDr. Jakub Hurych
Mgr. Petra Vídeňská, Ph.D.
MUDr. Jiří Vejmelka

Grafické zpracování :

Mgr. Michaela Bartoňová
www.michaelabartonova.cz
Ilustrační foto jsou generovaná na Ai

Těšíme se na vaše reakce, podněty a zajímavé příspěvky, které můžete zasílat na adresu:

cms@mikrobiom-cms.cz

Podle něj stačí umístit do dostatečně velké nádoby bulgur (dále v procesu totiž svůj objem ztrojnásobí), zalít ho lehce osolenou vodou, přikrýt prodyšnou bariérou proti nečistotám, umístit na teplé místo a čekat. Bohužel toto čekání není vůbec pasivní, směs je totiž potřeba třikrát denně míchat, aby nezplesnivěla. Ověřili jsme, že toto pravidlo není potřeba dodržovat úplně stoprocentně přesně, člověk může i jednou-dvakrát zapomenout, ale obecně je míchání v tomto procesu důležité. Kvašení kečeku totiž trvá tři týdny (minimálně) a kyselina mléčná se zde tvoří pomalu. Poměrně dlouhou dobu tedy není prostředí v nádobě dostatečně kyselé, aby bylo samo o sobě schopno udržet vetřelce (obzvláště ty plísňové) na uzdě. Musíme tedy suplovat tuto funkci mechanickým narušováním stability prostředí.

Po třech týdnech intenzivní péče o “miminko” přichází moment ochutnat. Bulgur je lehce nakyslý, ale je klidně možné jej zpracovat už v této fázi. On pak ještě dozraje. Slijeme z něj tedy většinu nálevu (část si můžeme nechat jako startér na další várku, vydrží v lednici živý cca týden) a formujeme z bulguru kuličky. Já jsem si pomohl mixérem - tím jsem si z bulguru udělal homogenní lepivou hmotu. Kuličky jsem následně obalil ve směsi koření (bylo tam určitě hodně papriky a tymiánu) a následně jsem kuličkami zaplnil dvě větší zavařovací sklenice a celé je zalil extra panenským olivovým olejem. Varuju - padne na to toho oleje vážně hodně.

Na tyto sklenice se pak ještě pár týdnů můžete koukat, sledovat jak vám na skříňce olej v nich hezky mění barvu na červenou, a pak se do lahodných kuliček můžete pustit (nebo je tzv. sníst). Dokud jsou ponořené v oleji, vydrží opravdu dlouho (v řádu měsíců). Ve sklenicích pak ještě koule dozrávají, a tím v nich získává na dominanci hlavně kyselá chuť. Veganské tvarůžky od toho tedy nečekejte - ono to vlastně vůbec nesmrdí, fakt ani trochu. Ale hledáte-li veganskou alternativu takových těch kulatých bílých kyselých čerstvých sýrů - pak s kečekem sázíte na správného koně.

Jakub Caha

