

Studium metabolických drah biosyntézy biogenních aminů

Bc. Tomáš Valenta, DiS.

Diplomová práce
2012



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav chemie

akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Tomáš VALENTA, DiS.**

Osobní číslo: **T10440**

Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**

Studijní obor: **Chemie potravin a bioaktivních látek**

Téma práce: **Studium metabolických drah biosyntézy biogenních aminů**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Prostudujte dostupnou literaturu vztahující se k zadanému tématu.
2. Vypracujte literární rešerši o biosyntéze polyaminů a metodách sledování metabolických drah vedoucích k jejich biosyntéze.

II. Praktická část

1. Otestujte dostupné PCR primery pro detekci důležitých genů zahrnutých v biosyntéze putrescinu a ověřte možnosti jejich použití ve sledování biosyntézy putrescinu u gramnegativních bakterií.
2. Navrhněte nové univerzální degenerované primery vhodné pro studium biosyntézy putrescinu metodou PCR a otestujte je na gramnegativních bakteriích produkujících putrescin.
3. Navrhněte a optimalizujte PCR metodu pro možnosti studia metabolických drah biosyntézy putrescinu u gramnegativních bakterií.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

Odborné publikace v databázových zdrojích na internetu

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Leona Wunderlichová

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

10. února 2012

Termín odevzdání diplomové práce:

7. května 2012

Ve Zlíně dne 10. února 2012



doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan



prof. Ing. Antonín Klásek, DrSc.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: VALENTA TOMÁŠ

Obor: CHTP

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 8.5.2012



¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Metody zabývající se detekcí a výzkumem vzniku biogenních aminů v potravinách nabývají v posledních letech na důležitosti, jak kvůli jejich negativním toxikologickým účinkům, tak kvůli jejich podílu na snížení kvality potravin.

Tato práce se zabývá studiem metabolických drah biosyntézy biogenních aminů. V teoretické části je popsána charakterizace, význam i toxikologie aminů. Teoretická část obsahuje také přehledný popis metabolických drah tvorby polyaminů.

Praktická část pojednává o návrhu vhodné sady PCR primerů určených pro detekci vybraných genů kódujících dekarboxylasy zodpovědné za produkci biogenního aminu putrescinu a rovněž optimalizaci této metody. Dále je zde prezentována optimalizace PCR metody pro použití nově navržených primerů a výsledky touchdown PCR. Správnost navržených primerů byla prokázána sekvenací.

Klíčová slova: biogenní aminy, PCR, touchdown PCR, putrescin

ABSTRACT

Methods dealing with the detection and research of emergence of biogenic amines in foods become more important in recent years, both because of their negative toxicological effects, and because of their contribution to the reduction of the food quality.

This work deals with the study of metabolic pathways in biosynthesis of biogenic amines. The theoretical part describes the characterization, importance and toxicology of amines. The theoretical part also provides a clear description of the metabolic pathways of polyamines formation.

The practical part deals with the design of a suitable set of PCR primers designed for detection of selected genes coding decarboxylases responsible for the production of biogenic amine putrescine and also for optimizing PCR method for the usage of newly designed primers and touchdown PCR results. The accuracy of the proposed primers has been proved via sequencing.

Keywords: biogenic amines, PCR, touchdown PCR, putrescine

Poděkování

Největší díky patří vedoucí mé diplomové práce, Mgr. Leoně Wunderlichové za věnovaný čas, úsilí a ochotu, kterou vynaložila při odborném vedení mé práce. Dále bych chtěl poděkovat mé rodině za psychickou a finanční podporu. Nemalé díky patří také Ing. Luce Husárové a Ing. Hance Miklíkové za pomoc v laboratoři a příjemné pracovní prostředí.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 BIOGENNÍ AMINY.....	12
1.1 VÝSKYT A PRODUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ	12
1.1.1 Mechanismus dekarboxylace	15
1.2 BIOLOGICKÝ VÝZNAM A TOXIKOLOGIE BIOGENNÍCH AMINŮ	15
1.2.1 Fyziologické funkce biogenních aminů	16
1.2.2 Toxikologie biogenních aminů.....	16
1.2.2.1 Histamin	16
1.2.2.2 Tyramin, tryptamin a 2-fenylethylamin.....	17
1.2.3 Detoxifikační systém	18
2 POLYAMINY	20
2.1 BIOLOGICKÝ VÝZNAM A TOXIKOLOGIE POLYAMINŮ.....	20
2.1.1 Fyziologické funkce	20
2.1.2 Toxikologie polyaminů.....	21
2.1.3 Biologická aktivita polyaminů u člověka	22
2.1.4 Biologická aktivita polyaminů u rostlin.....	23
2.1.5 Biologická aktivita polyaminů u bakterií.....	23
2.2 BIOSYNTÉZA POLYAMINŮ	23
2.2.1 Biosyntéza a regulace u savců.....	24
2.2.2 Biosyntéza u rostlin	26
2.2.3 Biosyntéza u bakterií	27
3 STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ	30
3.1 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE	30
3.1.1 Návrh primeru	32
II PRAKTICKÁ ČÁST	33
4 CÍL PRÁCE.....	34
5 MATERIÁLY A METODY.....	35
5.1 POUŽITÉ MIKROORGANISMY	35
5.2 NÁVRH PRIMERŮ	36
5.3 IZOLACE DNA	39
5.4 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE	39
5.5 PURIFIKACE A SEKVENACE.....	40
6 VÝSLEDKY A DISKUZE	41
6.1 ARGININ DEKARBOXYLÁSA.....	41
6.1.1 Sekvenace.....	45
6.2 ORNITHIN DEKARBOXYLÁSA.....	45
6.2.1 Sekvenace.....	49

6.3	SOUHRNÁ DISKUZE.....	49
ZÁVĚR		51
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY		52
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK		58
SEZNAM OBRÁZKŮ		59
SEZNAM TABULEK		61
SEZNAM PŘÍLOH		62

ÚVOD

Biogenní aminy jsou nízkomolekulární dusíkaté organické báze mající významnou biologickou aktivitu. Běžně se vyskytují v potravinách rostlinného a živočišného původu. Mají důležité fyziologické funkce, ale také jsou významné z hlediska toxikologie. Pro člověka jsou v nízkých koncentracích nepostradatelné, jsou-li však potravou přijímány ve zvýšeném množství, mohou vyvolat závažné toxikologické reakce. Navíc polyaminy, zejména pak putrescin, mohou velmi snadno podléhat nitrosačním reakcím za vzniku karcinogenních nitrosaminů a mají značný podíl na kažení potravin. Z těchto důvodů je velmi důležité sledovat množství a vznik těchto aminů v potravinách. V podstatě se pro jejich stanovení využívají klasické analytické metody a nověji metody molekulární biologie, které nabízejí možnost stanovit potenciální riziko tvorby biogenních aminů dříve, než jsou vytvořeny.

I. TEORETICKÁ ČÁST

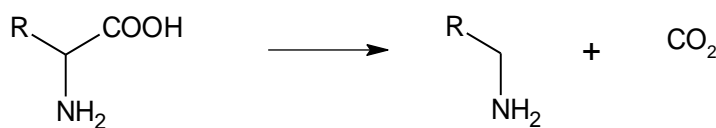
1 BIOGENNÍ AMINY

Biogenní aminy (BA) jsou nízkomolekulární organické dusíkaté sloučeniny vznikající hlavně dekarboxylací aminokyselin (Obr. 1), případně aminací či transaminací aldehydů a ketonů [1, 2]. Všechny mají jeden nebo více pozitivních nábojů a hydrofobní řetězec [3]. V malém množství jsou syntetizovány v rostlinných a živočišných buňkách. Také se vyskytují v různých druzích potravin, kde jsou produkovány mikrobiální dekarboxylací volných aminokyselin (AK) [4]. Bývají rozděleny na polyaminy a biogenní aminy. Polyaminy byly dříve zahrnuty mezi biogenní aminy, nicméně na základě jejich specifické úlohy v buňkách eukaryot byly zařazeny do zvláštní skupiny [7, 8].

Podle chemické struktury dělíme BA na alifatické (putrescin, kadaverin, spermin a spermidin), aromatické (tyramin a fenylethylamin) a heterocyklické (histamin a tryptamin) aminy [1].

Biogenní aminy jsou významnými bioaktivními látkami, které vykazují biologickou aktivitu v živých systémech, kde jsou přirozeně přítomny [2, 5]. Na druhou stranu vykazují i závažné negativní vlastnosti pokud jsou přijímány v potravě ve zvýšeném množství.

Biogenní aminy jsou antinutriční látky, konzumace potravin se zvýšeným obsahem těchto aminů bývá spojována se širokou škálou otrav z potravin. Biogenní aminy jsou schopny iniciovat různé farmakologické reakce [6, 5]. Některé bývají také považovány za potenciální karcinogeny vzhledem k jejich schopnosti reagovat s dusitany za vzniku karcinogenních nitrosaminů [6].

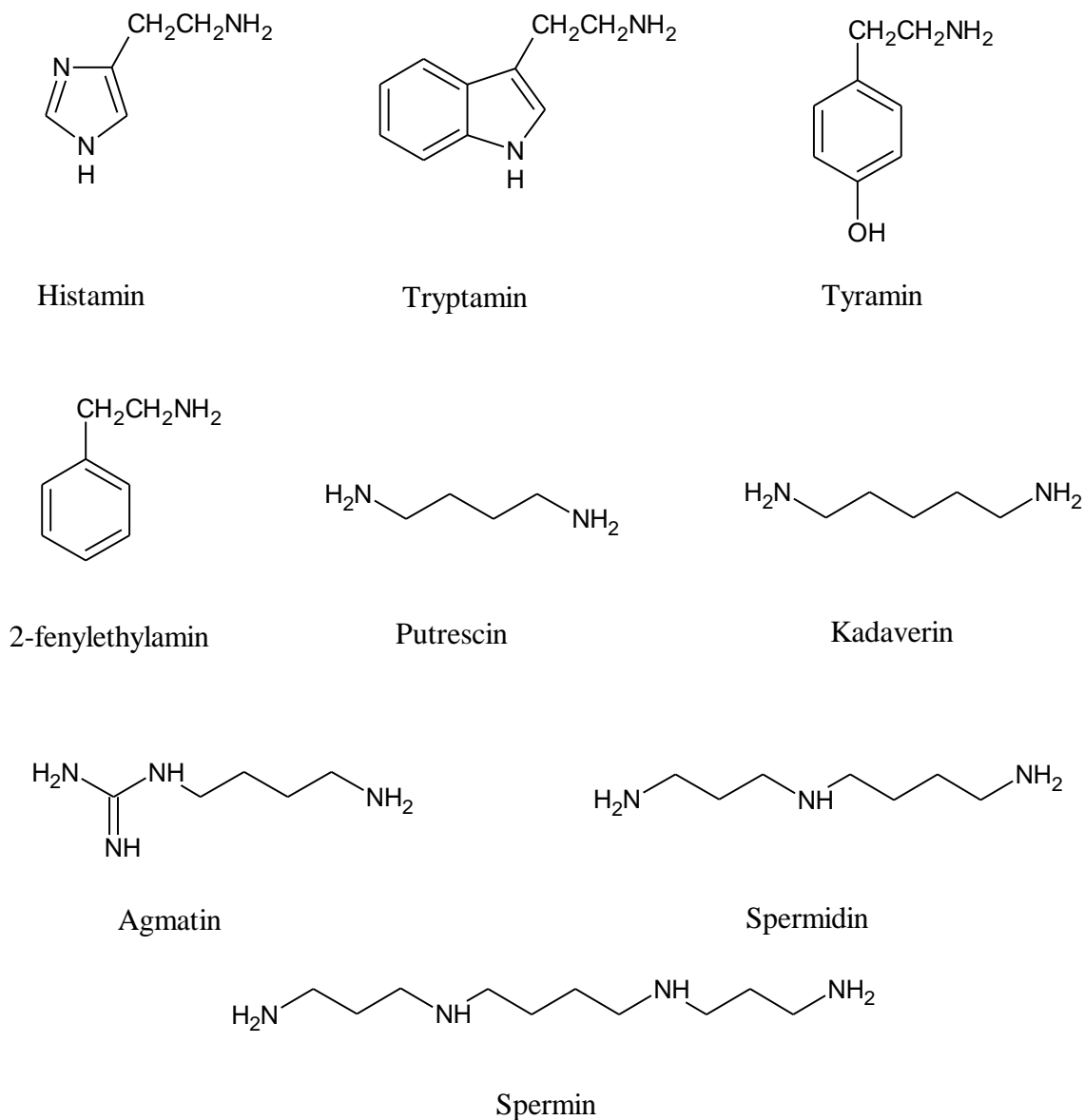


Obrázek 1: Dekarboxylace [1]

1.1 Výskyt a produkce biogenních aminů

Biogenní aminy jsou přirozenými složkami mnoha fermentovaných i nefermentovaných potravin a nápojů rostlinného i živočišného původu [9, 10]. Jejich koncentrace se však značně liší. Dá se říci, že biogenní aminy lze nalézt prakticky ve všech potravinách, které obsahují proteiny nebo volné aminokyseliny a jsou vystaveny podmínkám, které umožňují mikrobiální aktivitu [1, 7]. Mezi potraviny obsahující vysoká množství těchto sloučenin

patří mlékařenské produkty, ryby a výrobky z ryb, maso a masné výrobky, fermentovaná zelenina a sójové produkty, také alkoholické nápoje jako víno a pivo [9]. Nejčastěji se vyskytující aminy v potravinách jsou histamin, tyramin, kadaverin, 2-fenylethylamin, spermin, spermidin, putrescin, tryptamin a agmatin (Obr. 2) [11].



Obrázek 2: Nejvýznamnější biogenní aminy [12]

BA jsou tvořeny buďto jako výsledek endogenní dekarboxylasové aktivity v syrových potravinách nebo růstem bakterií s dekarboxylasovou aktivitou, s výjimkou fyziologických

polyaminů [10, 12]. Obsah volných aminokyselin bývá zvýšen mikrobiální proteolytickou aktivitou během přípravy, zrání a skladování potravin, ale také během rozkladných nebo kazících se procesů [6, 12, 13, 14].

Vznik aminů souvisí s řadou faktorů, nejvýznamnější jsou: [6, 8, 11, 15]

- pH
 - dekarboxylasová aktivita bývá vyšší v kyselém prostředí a je často součástí mechanismu rezistence bakterií vůči kyselému prostředí
- koncentrace NaCl
 - obsah NaCl snižuje, respektive minimalizuje, tvorbu biogenních aminů
 - přítomnost NaCl aktivuje tyrosindekarboxylasu a inhibuje histidindekarboxylasu
- teplota
 - teplota mezi 20-37 °C je optimální pro růst většiny bakterií obsahující dekarboxylasy
- přítomnost zkvasitelných sacharidů
 - sacharidy, např. glukosa, zlepšují podmínky pro růst mikroorganismů a jejich dekarboxylasovou aktivitu
 - byla zjištěna optimální koncentrace glukosy (0,5 – 2,0 %), zatímco koncentrace přesahující 3 % inhibovala tvorbu dekarboxylas
- přítomnost kofaktorů

Dekarboxylasová aktivita byla zjištěna u řady mikroorganismů. Mezi nejvýznamnější producenty BA patří zástupci rodu *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Photobacterium*, *Pediococcus*, a další [1,6]. Vzhledem k mikrobiálnímu původu mohou být BA formovány kontaminující mikroflórou a tak jejich přítomnost může být považována za indikátor kvality nebo hygienického stavu syrového materiálu [9, 13].

1.1.1 Mechanismus dekarboxylace

Biogenní aminy vznikají dekarboxylací volných aminokyselin odstraněním α -karboxylové skupiny za vzniku příslušného biogenního aminu (Obr. 1) [6]. Jedná se tedy o enzymově katalyzované reakce, přičemž kofaktorem těchto enzymů bývá nejčastěji pyridoxal-5'-fosfát (PLP) [8]. PLP je forma vitamínu B₆. Jeho struktura mu umožňuje katalyzovat celou řadu reakcí, krom α -dekarboxylace také transaminaci, racemizaci, aldolové štěpení a β - a γ -eliminaci. Takováto univerzálnost není příliš běžná u organických sloučenin využívaných jako kofaktory enzymů. Pro katalýzu je důležitá aldehydová skupina PLP, zatímco pyridinový kruh usnadňuje průběh reakcí díky aromatickému charakteru a schopnosti odtahovat elektrony z C _{α} uhlíku substrátu a stabilizovat tak Shiffovu bázi. Ta vzniká po navázání substrátu [60].

1.2 Biologický význam a toxikologie biogenních aminů

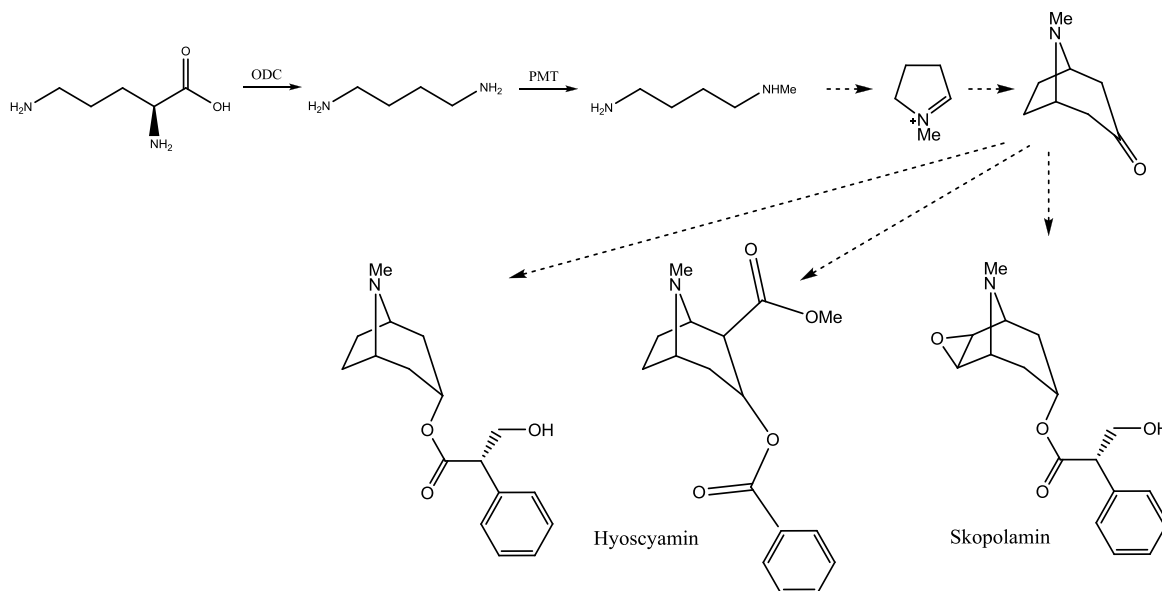
Výskyt biogenních aminů v potravinách představuje potencionální riziko vzniku řady zdravotních komplikací. Mezi nejvýznamnější patří bolesti hlavy, hypotenze, břišní křeče, průjem zvracení, kopřivka, zvýšení krevního tlaku, jehož následkem může dojít k srdečnímu selhání nebo krvácení z mozku. Byly popsány i případy úmrtí [11, 12, 14, 15, 17].

Biogenní aminy mají nejen závažné toxikologické vlastnosti, ale navíc výrazně snižují kvalitu potravin. Proto byl zaveden index kvality pro hodnocení čerstvosti a stupně kažení masa. Tento index bývá označován jako index biogenních aminů (BAI) a je součtem koncentrací histaminu, putrescinu a kadaverinu vztažených na koncentraci sperminu a spermidinu [34].

$$BAI = \frac{\text{histamin [mg/kg]} + \text{putrescin [mg/kg]} + \text{kadaverin [mg/kg]}}{1 + \text{spermin [mg/kg]} + \text{spermidin [mg/kg]}}$$

1.2.1 Fyziologické funkce biogenních aminů

Biogenní aminy mohou být u živých organismů zdrojem dusíku, anebo prekurzory pro syntézu hormonů, alkaloidů (např. tropanové alkaloidy rostlin) (Obr. 3), nukleových kyselin a proteinů. V organismech ovlivňují procesy jako je např. regulace tělesné teploty, příjem živin, zvýšení nebo snížení krevního tlaku a např. tyramin vykazuje i antioxidační aktivitu [15]. Ovlivňují také aroma potravin [1]. U živočichů jsou biogenní aminy využívány k výstavbě koenzymů, vitaminů, hormonů apod. [16]. Některé aminy, katecholaminy, indolaminy a histamin jsou u člověka součástí různých metabolických funkcí, zejména v nervovém systému a při kontrole krevního tlaku [1].



Obrázek 3: Biosyntéza tropanových alkaloidů. (ODC: ornithin dekarboxylasa, PMT: putrescin N-methyltransferasa) [63]

1.2.2 Toxikologie biogenních aminů

Biogenní aminy jsou pro člověka nepostradatelné, nicméně ve vysokých koncentracích se mohou projevit jako látky vasoaktivní a psychoaktivní [17]. Vasoaktivní aminy působí na vaskulární systém a psychoaktivní aminy na nervový systém [6].

1.2.2.1 Histamin

Histamin má nejzávažnější toxikologické účinky z aminů vyskytujících se v potravinách [1]. Vzniká dekarboxylací histidinu enzymem histidindekarboxylasou [18]. Otrava tímto

aminem má krátkou inkubační dobu v řádu několika minut až hodin a je spojována hlavně s konzumací ryb [4].

Histamin uplatňuje svůj účinek zejména vazbou na receptory buněčných membrán, které se nacházejí v kardiovaskulárním systému a na různých sekrečních žlázách. Může stimulovat srdce a výsledkem této stimulace je uvolňování adrenalinu a noradrenalinu z nadledvinek, dále dráždí svalstvo dělohy, střev a dýchacího traktu, stimuluje senzorické a motorické nervové buňky a řídí sekreci žaludeční kyseliny [6, 15]. Vyskytuje se v žírných buňkách a bazofilech, jeho biologické funkce jsou patrné, jakmile je histamin uvolněn ve vyšším množství v průběhu alergické reakce [15].

V organismu existují tři typy receptorů pro histamin označované jako H_1 , H_2 , H_3 [1, 15, 18]. H_1 receptory se nacházejí v hladkém svalstvu, H_2 především v žaludeční sliznici a srdci a H_3 v některých strukturách centrálního nervového systému [18].

Příznaky otravy histaminem jsou výsledkem působení na kardiovaskulární systém. Histamin způsobuje dilataci periferních krevních kapilár a cév, což vede k hypotenzi, zarudnutí a bolestem hlavy. Histaminem indukovaná kontrakce hladké střevní svaloviny, zprostředkovaná H_1 receptory, může vyvolat břišní křeče, průjem a zvracení. Sekrece žaludeční kyseliny je regulovaná pomocí H_2 receptorů umístěných na parentálních buňkách. Bolest a svědění spojené s kopřivkou mohou být způsobeny drážděním senzorických a motorických neuronů prostřednictvím stimulace H_1 receptorů [15].

1.2.2.2 Tyramin, tryptamin a 2-fenylethylamin

Tyto tři aminy patří do skupiny vasoaktivních aminů [6]. Tyramin vzniká dekarboxylací tyrosinu, tryptamin dekarboxylací tryptofanu a 2-fenylethylamin dekarboxylací fenylalaninu [1, 12].

Zvýšený obsah přijímaného tyraminu a 2-fenylethylaminu způsobuje hypertenzní krizi a migrény [11, 12]. Je to dáno tím, že tyramin není deaminován a je přeměněn na oktopamin, který vytěsňuje norepinefrin v sympatických nervových zakončeních [54]. Zvyšují krevní tlak, což může vést k srdečnímu selhání nebo krvácení do mozku [11]. Tryptamin způsobuje zvýšení krevního tlaku, je tedy příčinou hypertenze [12]. Otravy tyraminem jsou známy jako „sýrová reakce – cheese reaction“, která má podobné symptomy jako otrava histaminem [4, 11]. Tyramin působí nepřímo uvolňováním

noradrenalinu ze sympatického nervového systému, který způsobuje zvýšení krevního tlaku periferním zúžením a zvýšením srdečního výdeje. Také způsobuje rozšíření zornic, oční tkáně, slzení a slinění, zvyšuje dýchání a zvyšuje koncentraci krevního cukru [6]. Tyramin, tryptamin a 2-fenylethylamin mohou vyvolat nevolnost, bolest hlavy, vyrážku, závratě, bušení srdce, zvracení a dokonce intercerebrální krvácení, anafylaktický šok a ve velmi vážných případech i smrt [14, 17]. Tyramin má nízkou akutní orální toxicitu, byla stanovena u krys Wistar, a její hodnota je více než 2000 mg/kg tělesné váhy (NOAEL) [55].

1.2.3 Detoxifikační systém

Detoxifikační systém zahrnuje specifické enzymy [4]. Jedná se o aminooxidas [9]. Tyto aminooxidas katalyzují oxidativní deaminaci aminů (Obr. 4) [10]. Kofaktorem těchto aminooxidas je Cu, proto se označují Cu-oxidasy. Katalyzují oxidační deaminaci biogenních aminů na odpovídající aldehydy a amoniak spojenou s dvouelektrodovou redukcí molekulárního kyslíku na peroxid vodíku. Enzymová reakce probíhá bi-ter ping-pongovým mechanismem za účasti chinonového kofaktoru a iontů Cu^{2+} vázaných v aktivním místě. Původně se rozlišovali monoamino-, diamino-, a polyaminooxidas. Nicméně toto dělení není ideální z důvodu široké substrátové specifity [59].

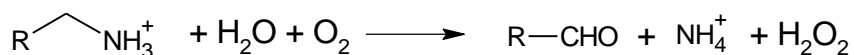
Nově zavedený způsob klasifikace vychází z původu a substrátové specifity a zahrnuje čtyři skupiny [59]:

1. savčí plasmové aminooxidas
 - mají vysokou schopnost oxidovat polyaminy spermin a spermidin, z monoaminů pak benzylamin
2. savčí diaminooxidasy
 - přednostně oxidují diaminy putrescin a kadaverin, dobrým substrátem je také histamin
3. rostlinné diaminooxidasy
 - mají vysokou afinitu k putrescinu a kadaverinu, významně však oxidují i spermin

4. mikrobiální aminoroxidasy

- nejlépe katalyzují přeměnu arylalkylaminů jako jsou benzylamin, fenethylamin, tyramin a histamin

Je-li přijímáno větší množství BA, detoxifikační systém není schopen dostatečné eliminace [4]. Biogenní aminy jsou složkami mnoha potravin a mohou reprezentovat riziko otravy z potravin, hlavně ve spojení s podpůrnými faktory jako jsou inhibitory mono a diaminooxidas nebo alkohol [9, 10]. Dalšími faktory snižující detoxifikaci jsou genetické predispozice nebo gastrointestinální onemocnění [12]. Toxicita těchto sloučenin závisí silně na schopnosti detoxikace. Během konzumace potraviny je v lidských střevech metabolizováno malé množství aminů na fyziologicky méně aktivní degradační produkty.



Obrázek 4: Oxidativní deaminace [10, 59]

2 POLYAMINY

Polyaminy jsou všudypřítomné nízkomolekulární alifatické molekuly uhlovodíků s kvartérní dusíkatou skupinou, která má pozitivní náboj při fyziologickém pH [19, 20]. První polyamin byl objeven v roce 1678 v lidském spermatu francouzským vědcem Antonie van Leeuwenhokem a byl pojmenován spermin. Jeho struktura byla objasněna až o 250 let později [21, 56, 62]. Polyaminy jsou esenciální pro životaschopnost a růst eukaryotních buněk [22]. Putrescin (butan-1,4-diamin), spermidin (N-(3-aminopropyl)-1,4-diaminobutan) a spermin (N,N'-bis-(3-aminopropyl)-1,4-diaminobutan) jsou běžně se vyskytující polyaminy, spolu s kadaverinem (pentan-1,5-diamin), v buňkách živých organismů, kde plní řadu fyziologických funkcí [23]. Původně byly polyaminy řazeny mezi biogenní aminy, vzhledem k jejich specifické biologické roli u eukaryot jsou od roku 1990 řazeny do zvláštní skupiny [7, 23]. Putrescin, ačkoliv se jedná o diamin, je také řazen mezi polyaminy, protože je prekurzorem pro vznik spermidinu a sperminu. Informace o obsahu polyaminů v potravinách jsou velmi důležité pro dietetiku a lékaře, zejména z důvodu ovlivnění vzniku rakoviny, jak je popsána v kapitole 2.1.2 [7].

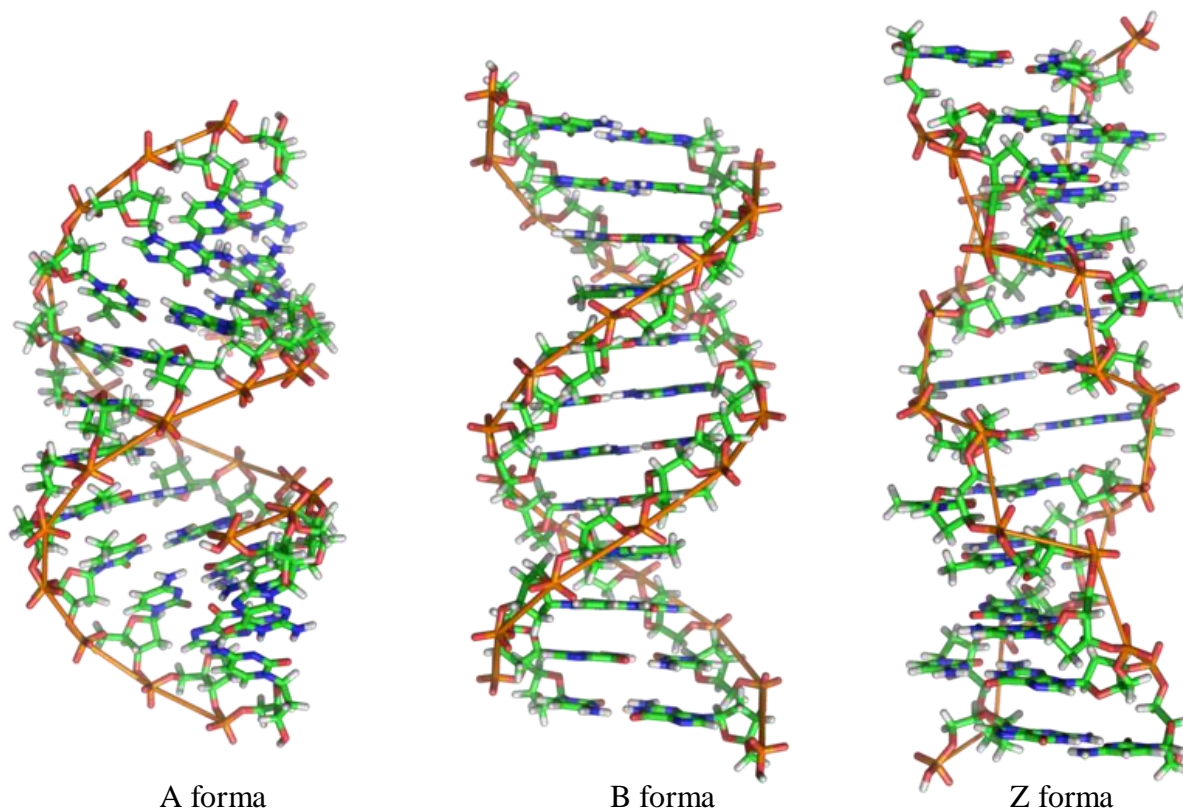
Putrescin je produkován převážně u gramnegativních bakterií, zejména z čeledi *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* a *Shewanellaceae* [46].

2.1 Biologický význam a toxikologie polyaminů

2.1.1 Fyziologické funkce

Biologická aktivita polyaminů je připisována polykationické povaze [24]. Polyaminy jsou při fyziologickém pH plně protonovány a jsou vázány silnými interakcemi s polyanionickými makromolekulami jako jsou DNA a RNA, což souvisí s regulací funkce stabilizace struktury nukleových kyselin a syntézou proteinů [1, 25]. Jsou schopny narušovat konformaci DNA (Obr. 5) produkcí A a Z formy z běžné B formy DNA [10]. Podílejí se také na biosyntéze těchto nukleových kyselin a uzavření DNA u bakteriofága. Polyaminy inhibují určité enzymy a to včetně proteinkinás. [45]. Také jsou vázány na membránové struktury, jako jsou fosfolipidy, hlavně u erytrocytů, což může vést ke snížení fluidity membrány, ale také ke zvýšení stability [25, 50, 55]. Mimo jiné byly nalezeny v cytosolu a jádře buněk, kde se zapojují do transkripce DNA a translace RNA [25]. Ovlivňují neurofyziologické (γ -aminomáselná kyselina) funkce a mohou plnit úlohu

intracelulárních posílů [56]. Bylo zjištěno, že funkce polyaminů závisí na jejich náboji, který je důležitý pro elektrostatické interakce s negativně nabitými molekulami (DNA, RNA, proteiny a další). Z analýz vyplynulo, že spermin se váže na velký žlábek DNA, zatímco spermidin a putrescin na malý žlábek, čímž ovlivňují její stabilitu [3, 26]. Bylo také zjištěno, že mimo stabilizace membrán a ovlivnění syntézy nukleových kyselin a proteinů se podílí polyaminy na odstraňování volných radikálů [24].



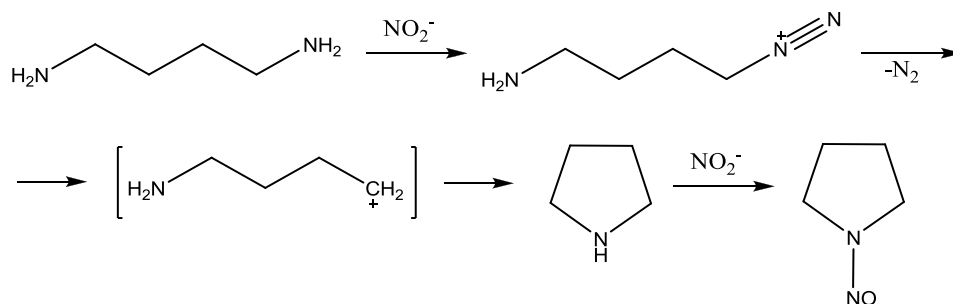
Obrázek 5: Konformace DNA [51]

2.1.2 Toxikologie polyaminů

Jednoduše řečeno se polyaminy podílejí na proliferaci a růstu buněk [7]. Tato skutečnost je velmi zajímavá, protože polyaminy ať už endogenní nebo exogenní jsou spojovány s růstem nádorových buněk [7, 23, 46, 53]. Z tohoto důvodu byly prováděny výzkumy, v nichž bylo testováno potlačení růstu nádorových buněk tím, že byla potlačována aktivita ornithindekarboxylasy, enzymu odpovědného za vznik polyaminu putrescinu. Jedním z nejčastějších inhibitorů ODC používaných v terapii rakoviny byl difluormethylornithin (DFMO) [49]. Nicméně tumorové buňky mají schopnost absorbovat extracelulární aminy

z potravy, nebo aminy produkované gastrointestinálními bakteriemi, a proto nebyla tato terapie účinná [22, 23].

Mimo jiné, polyaminy, zejména pak putrescin a kadaverin, brání detoxifikaci histaminu a tyraminu, čímž zesilují jejich toxikologické účinky, i když putrescin sám o sobě má menší farmakologickou aktivitu. Hlavní nebezpečí přítomnosti polyaminů putrescinu a kadaverinu v potravinách spočívá v jednoduchosti, s jakou mohou reagovat s dusitany nebo oxidy dusíku v průběhu skladování nebo vaření potravin za vzniku karcinogenních cyklických nitrosaminů (obr. 6). Toto je jeden z hlavních důvodů (vedle vlivu na snižování kvality potravin) proč je nutné bránit akumulaci putrescinu v potravinách. [2, 9, 46, 47]. Mimoto farmakologické dávky polyaminů mají hypotermický a hypotenzní účinek [45].



Obrázek 6: Nitrosace putrescinu [47]

2.1.3 Biologická aktivita polyaminů u člověka

U člověka se polyaminy (přítomné ve fyziologických koncentracích) podílejí na růstu a vývoji trávicího systému novorozenců a pravděpodobně jsou nezbytné pro podporu normálního růstu a hlavních vlastností trávicího traktu [25, 27]. Účinek na buněčné proliferaci je spojován se stabilizací struktury chromatinu a DNA [25]. Zdá se, že zvýšený příjem polyaminů potravou má příznivý vliv na pacienty po operaci nebo během hojení ran. Nedostatečný příjem těchto aminů může hrát roli ve vyvolání přecitlivělosti na potravinové alergy, jak bylo pozorováno u dětí [23]. Je to dáno tím, že polyaminy se podílejí mimo jiné také na diferenciaci imunitních buněk při regulaci zánětlivé odpovědi. [25]. Nedostatek polyaminů je spojován se Snyder-Robinsonovým syndromem, jedná se o sníženou aktivitu enzymu spermin syntetasy. Postižení muži trpí mírnou až středně těžkou mentální retardací, hypotonií, dysfunkcí cerebrálního systému, obličejovou asymetrií, osteoporosou a další [25, 28].

2.1.4 Biologická aktivita polyaminů u rostlin

Putrescin, spermin a spermidin jsou nejčastěji se vyskytující aminy u rostlin a jsou zapojeny do široké škály procesů. Mezi méně známé polyaminy vyskytující se v rostlinách patří diaminopentan (často u luštěnin), 1,3-diaminopropan a homospermidin. PA rostlin se podílejí na organogenezi, embryogenezi, buněčném dělení, vývoji reprodukčních orgánů, uplatňují se jako ochrana proti stresu a infekci houbami a viry, dále se účastní růstu a vývoje rostlin a také jejich stárnutí. Také se podílí na růstu kořenů, květů a plodů, stejně tak jako i jejich zrání [23, 24, 57, 62]. Rostlinné polyaminy mají také schopnost interagovat s hormony (jako jsou auxiny a gibbereliny, cytokiny), fytochromy a podílejí se na biosyntéze ethylenu [24, 57]. V rostlinách se polyaminy nejčastěji vyskytují vázané na fenolové kyseliny [57]. Nedávné studie ukazují, že PA mohou u rostlin fungovat jako buněčné signální molekuly pro složitou komunikaci s hormonálními dráhami, zahrnující regulaci produkce kyseliny abscisové jako odpověď na abiotický stres [62]

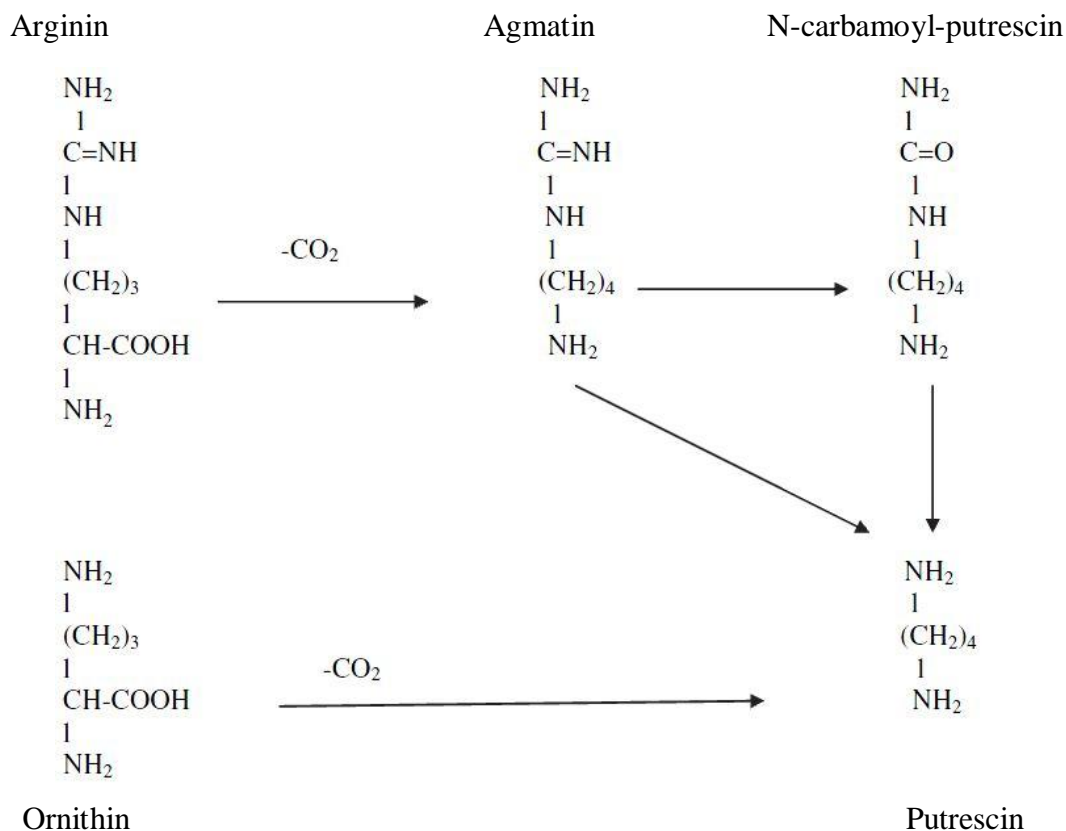
2.1.5 Biologická aktivita polyaminů u bakterií

U bakterií se vyskytují polyaminy putrescin, spermidin a kadaverin, přítomnost sperminu nebyla zjištěna. Téměř u všech bakterií je intracelulární obsah spermidinu vyšší než obsah putrescinu. U modelové bakterie *E. coli* nebývá kadaverin běžně přítomen, nicméně je syntetizován během anaerobního růstu v přítomnosti jeho prekurzorů. Intracelulární polyaminy se podílejí spolu s Mg^{2+} ionty na stabilizaci struktur RNA. Mohou se také vázat na ribozomy a zvyšovat přesnost využití kodonu při syntéze proteinů, usnadňují translační čtení přes mRNA s UAA stop kodonem. Hrají důležitou roli ve vnější membráně, především jejich účinkem na produkci a funkci porinů. Spermin a spermidin fungují jako lapače volných radikálů spolu s enzymem superoxid dismutasou a tím snižují poškození DNA kyslíkovými radikály [19]. Na ochraně DNA před poškozením reaktivními formami kyslíku se podílí také putrescin [46].

2.2 Biosyntéza polyaminů

V savčích buňkách je putrescin tvořen dekarboxylací ornithinu enzymem ornithin dekarboxylasy (ODC, EC 4.1.1.17). Eukaryotická ODC je pyridoxal-5'-fosfát dependentní enzym. U myši bylo zjištěno, že pouze dimer tohoto enzymu vykazuje katalytickou aktivitu. Aktivní místo tohoto enzymu je konstruováno z reziduí obou monomerů [49, 56].

Mnoho mikroorganismů a rostlin je schopno produkovat putrescin přes agmatin. Agmatin je produkován dekarboxylací argininu enzymem arginin dekarboxylasou (ADC, EC 4.1.1.19). Organismy jsou tak schopny syntetizovat putrescin nejméně dvěma dráhami, buď přes ornithin aktivitou ODC nebo přes arginin a agmatin aktivitou ADC nebo agmatinasy (EC 3.5.3.11) (Obr. 7) [20].



Obrázek 7: Biosyntéza putrescinu [21]

2.2.1 Biosyntéza a regulace u savců

Polyaminy se syntetizují endogenně z ornithinu a jsou interkonvertibilní, kromě toho se do organismu dostávají exogenní cestou potravinami a intestinální absorpcí z produktů bakteriálního metabolismu [25].

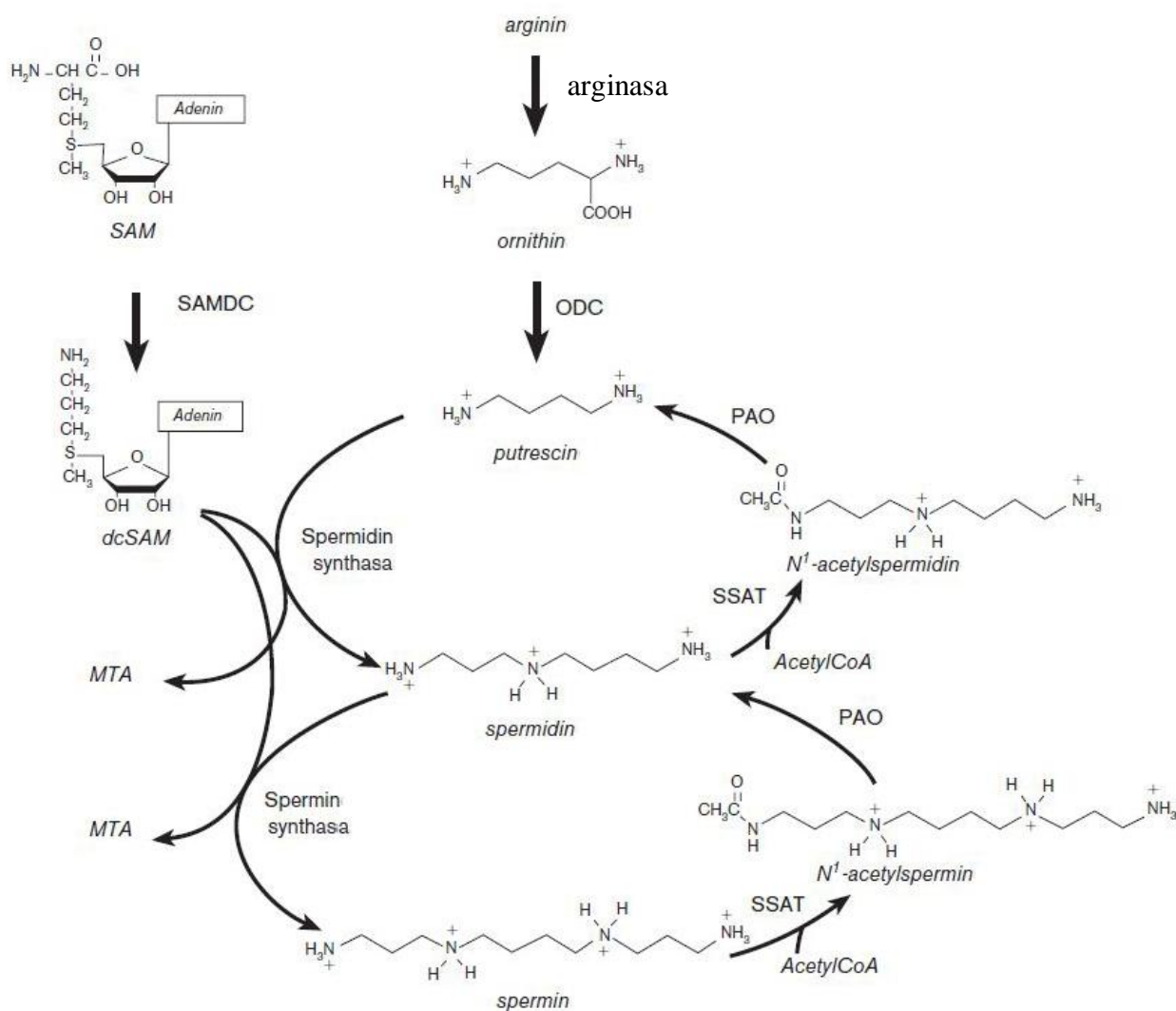
Obsah polyaminů v buňkách je regulován biosyntézou, degradací, příjmem a exkrecí [29].

Biosyntéza u savců (Obr. 8) je vysoce regulována aktivitou dvou klíčových enzymů, ornithin dekarboxylasy a S-adenosylmethionin dekarboxylasy. Polyaminy jsou tvořeny z aminokyseliny methioninu a argininu [23]. Ornithin je tvořen z argininu za katalýzy enzymu argininy v močovinovém cyklu za vzniku agmatinu, a poté je konvertován

na putrescin účinkem ornithin dekarboxylasy [25, 30, 56]. Putrescin je přeměněn na spermidin působením aminopropyltransferasy, která se označuje jako spermidin syntasa. Druhá aminopropyltransferasa, označovaná jako spermin syntasa, přidává propylaminovou skupinu na spermidin za vzniku sperminu. Zdroj těchto propylaminových skupin je dekarboxylovaný *S*-adenosylmethionin (SAM), který je produkován účinkem *S*-adenosylmethionin dekarboxylasy (SAMDC, EC 4.1.1.50). Dalším produktem reakce aminopropyltransferasy je 5'-methylthioadenosin (MTA). MTA je poté rozložen účinkem MTA fosforylasy (EC 2.4.2.28) a vzniklý adenin je vyloučen a vrácen do nukleosidového rezervoáru [3, 20, 23, 28, 30, 31, 53].

Ornithin dekarboxylasa má „krátký poločas rozpadu“ a její aktivita je silně regulována. Aktivita je indukována některými růstovými faktory a potlačována selektivními inhibitory jako je třeba α -difluoromethylornithin (DFMO) nebo mutacemi, které redukuje buněčný růst a proliferaci. Navíc, aktivita ODC je regulována samotnými polyaminy jejich zpětnovazebným mechanismem. Ten inhibuje transkripci mRNA hladiny enzymu a zvýšením úrovně inhibujících proteinů nebo pomocí antizymu, který redukuje aktivitu ODC [25].

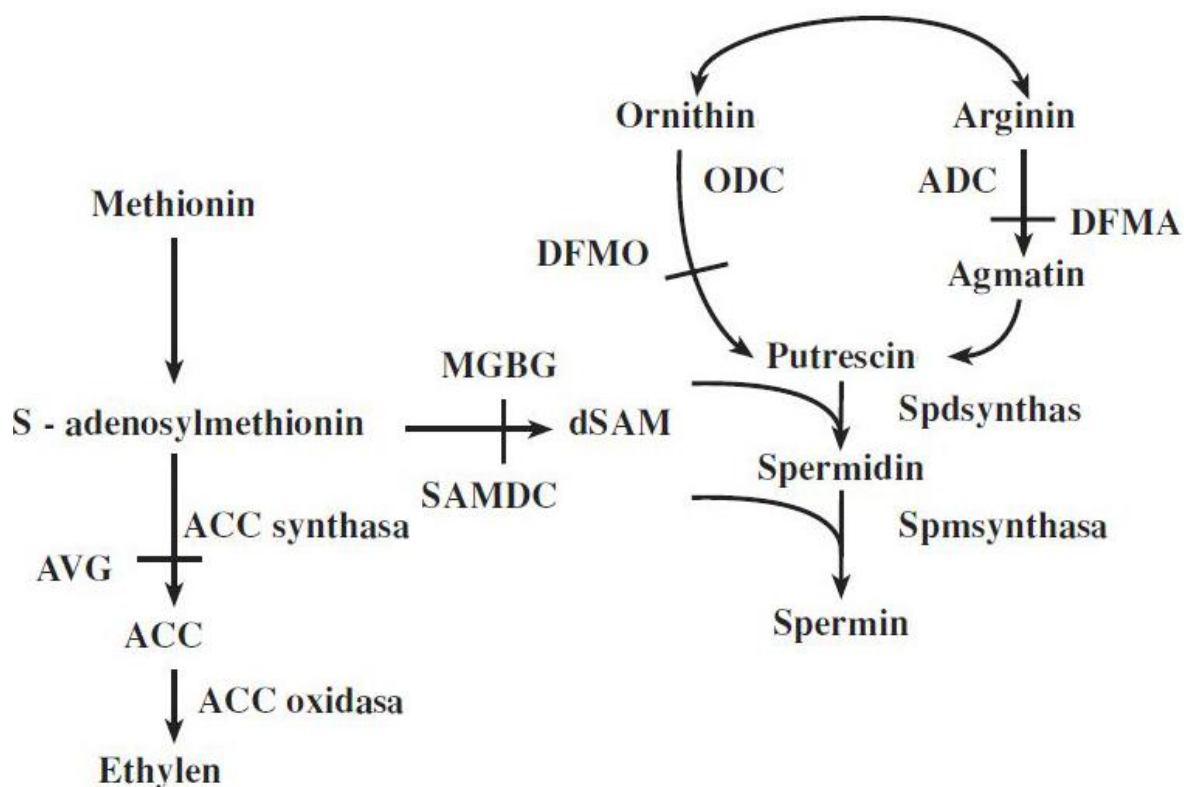
Hlavní cestou katabolismu polyaminů je oxidativní deaminace, enzymem diaminooxidasa, který se nachází ve značném množství ve střevní sliznici, játrech a ledvinách. Tento enzym nepůsobí jen na volné polyaminy, ale také na jejich acetylované deriváty. Putrescin je metabolizován na γ -aminomáselnou kyselinu. Polyamin oxidasa (PAO, EC 1.4.3.4) se podílí na metabolismu polyaminů, ikdyž tento enzym upřednostňuje volný spermin, než jeho acetylderivát, a v menší míře spermidin [25]. Spermin oxidasa (SMO) katalyzuje přímo přeměnu sperminu na spermidin a obě spermidin/spermin N^1 -acetyltransferasy (SSAT) a PAO katalyzují přeměnu sperminu na spermidin a spermidinu na putrescin [32]. Produkty těchto reakcí, spermidin nebo putrescin, mohou být znovu použity pro syntézu nového spermidinu nebo sperminu. Další produkt, 3-acetamidopropanal je transformován na β -alanin a může být dále metabolizován transaminací [20].



Obrázek 8: Metabolismus polyaminů u savců [20]

2.2.2 Biosyntéza u rostlin

Stejně jako v předchozím případě jsou polyaminy syntetizovány z argininu a ornithinu. Intermediát agmatin, který je syntetizován z argininu, je konvertován na putrescin, ten je dále transformován na spermidin a spermin po sobě následujícím přenosem aminopropylové skupiny z dekarboxylovaného *S*-adenosylmethioninu za katalýzy specifické spermidin a spermin syntetasy. Aminopropylové skupiny jsou odvozeny z methioninu, který je nejprve konvertován na *S*-adenosylmethionin a poté dekarboxylován v přítomnosti *S*-adenosylmethionin dekarboxylasy. *S*-adenosylmethionin je běžný prekurzor pro syntézu polyaminů a ethylenu, přičemž *S*-adenosylmethionin dekarboxylasa reguluje obě biosyntetické dráhy, jak je znázorněno na obrázku 9 [24].



Obrázek 9: Biosyntéza polyaminů a její napojení na biosyntézu ethylenu, biosyntetické enzymy jsou ADC, ODC a SAMDC, a inhibitory DFMA, DFMO a MGBG [24]

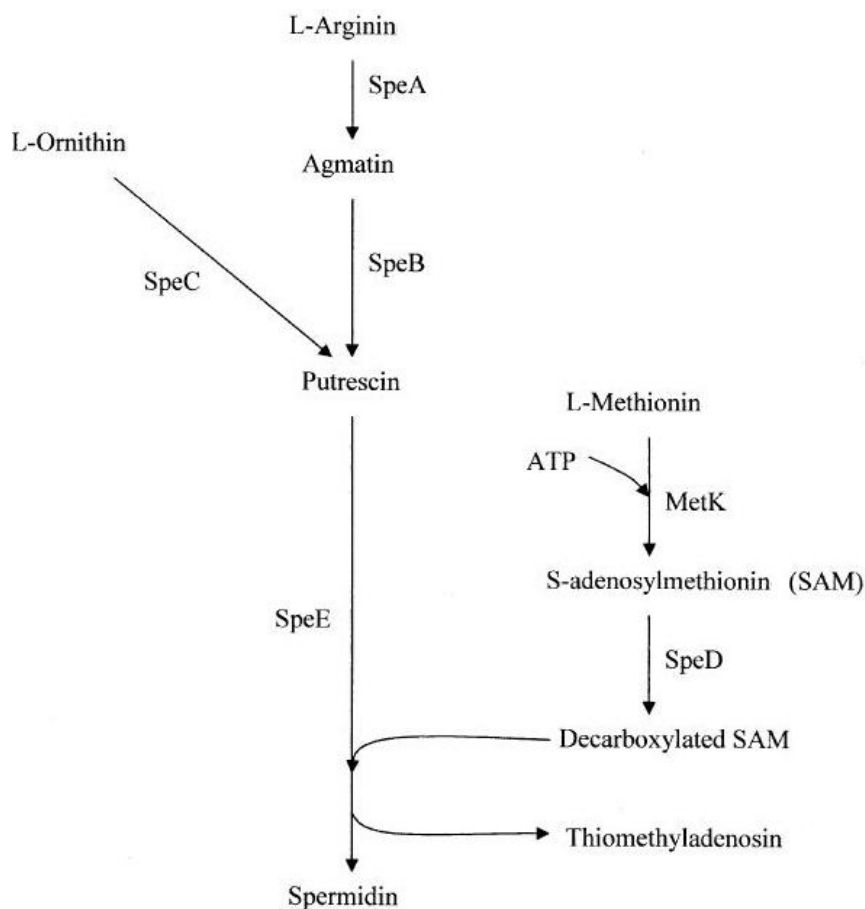
Enzymy ODC, SAMDC a spermidin synthasa jsou lokalizovány v cytoplasmě, zatímco ADC je lokalizován v tylakoidní membráně chloroplastů, PAO se vyskytuje v buněčné stěně [24].

2.2.3 Biosyntéza u bakterií

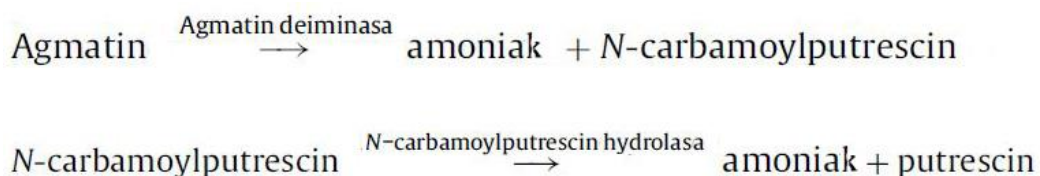
Vzhledem k negativním vlivům na kvalitu potravin i na zdraví člověka je pro nás velmi zajímavá zejména biosyntéza polyaminů u bakterií, které jsou jejich hlavními producenty v potravinách (ať už se jedná o startérové kultury či kontaminující mikroflóra).

U bakterií může být putrescin syntetizován třemi dráhami. První je dekarboxylace ornithinu na putrescin konstitutivním biosyntetickým enzymem ornithin dekarboxylasou kódovanou konstitutivním biosyntetickým genem *speC*. Inducibilní (biodegradabilní) ODC (produkt genu *speF*) produkuje putrescin při nízkém pH [52, 56, 61]. Tyto dvě formy ODC jsou imunologicky odlišné. Biosyntetická forma je podobná u všech organismů, biodegradabilní může využívat ornithin jako zdroj uhlíku [56]. Druhá dráha spočívá v dekarboxylaci argininu na agmatin arginin dekarboxylasou (kódovanou genem *speA*) a následné přeměně agmatinu na putrescin a močovinu enzymem agmatinasou (*speB*)

(obr. 10). Některé bakterie mají další dráhu, ve které je agmatin konvertován na putrescin přes *N*-karbamoylputrescin enzymy agmatin deiminasou (kódovanou genem *aguA*) a *N*-karbamoylputrescin aminohydrolasou (kódovanou genem *aguB*) (obr. 11). U bakterií zcela chybí mechanismus pro syntézu sperminu. Další rozdíl ve srovnání s biosyntézou PA u savců je SSAT, která je u bakterií nahrazena spermidin acetyltransferasou katalyzující N¹ nebo N⁸ acetylaci spermidinu [5, 19, 32, 33, 58, 61].



Obrázek 10: biosyntéze polyaminů u *E. coli* [19]



Obrázek 11: Přeměna agmatinu na putrescin [5]

ODC aktivita je u bakterií regulována na transkripční úrovni cyklickým AMP (cAMP) a cAMP receptorovým proteinovým komplexem, který potlačuje expresi genu *speC*. U některých bakterií byl rovněž popsán antizym. Arginin dekarboxylasova aktivita je inhibována zvýšením úrovně intracelulárního spermidinu a putrescinu způsobem podobným ODC [19].

3 STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ

Přítomnost biogenních aminů v potravinách je v popředí zájmu nejen potravinářských firem, ale i kontrolních orgánů a to vzhledem k možnému ohrožení zdraví spotřebitelů. Jak bylo popsáno v předchozích kapitolách, jedná se o významné biologicky aktivní látky s řadou fyziologických funkcí, které však mohou mít velké množství negativních vlivů, jsou-li přítomny ve zvýšené míře v potravinách – jedná se jak o závažné toxikologické účinky, tak také o výrazný vliv na kvalitu potravin.

Rostoucí zájem o znalost obsahu biogenních aminů, jak ze strany spotřebitelů tak i kontrolních orgánů, lze přičítat snaze stanovit případně snížit legislativní limity obsahu biogenních aminů v potravinách a nápojích. Pro účely sledování obsahu polyaminů v potravinách jsou potřeba rychlé a jednoduché metody pro analýzu schopnosti produkce biogenních aminů bakteriemi s cílem vyhodnotit potenciální riziko jejich vzniku [35].

Byla vyvinuta řada metod pro stanovení biogenních aminů, přičemž většina z nich je založena na chromatografických metodách [15]. Nejpoužívanějšími jsou plynová chromatografie (GC), tenkovrstvá chromatografie (TLC), vysoce účinná kapalinová chromatografie a ultra účinná kapalinová chromatografie (UPLC) [4, 15]. Mezi další používané analytické metody patří kapilární zónová elektroforéza nebo metoda blízké infračervené reflektanční spektroskopie [4, 7, 12]. Mezi starší patří např. metody založené na změně růstového média či stanovení dekarboxylasové aktivity měřením produkce CO₂ [35].

V současné době se dostávají do popředí metody molekulární biologie, které jsou vhodnou alternativou k metodám tradičním. Metoda polymerázové řetězové reakce (PCR) nabízí výhody rychlosti, citlivosti a jednoduchosti. Navíc jsou tyto metody schopné detekovat potenciální riziko tvorby biogenních aminů v potravinách dříve, než dojde k jejich produkci [9].

3.1 Polymerázová řetězová reakce

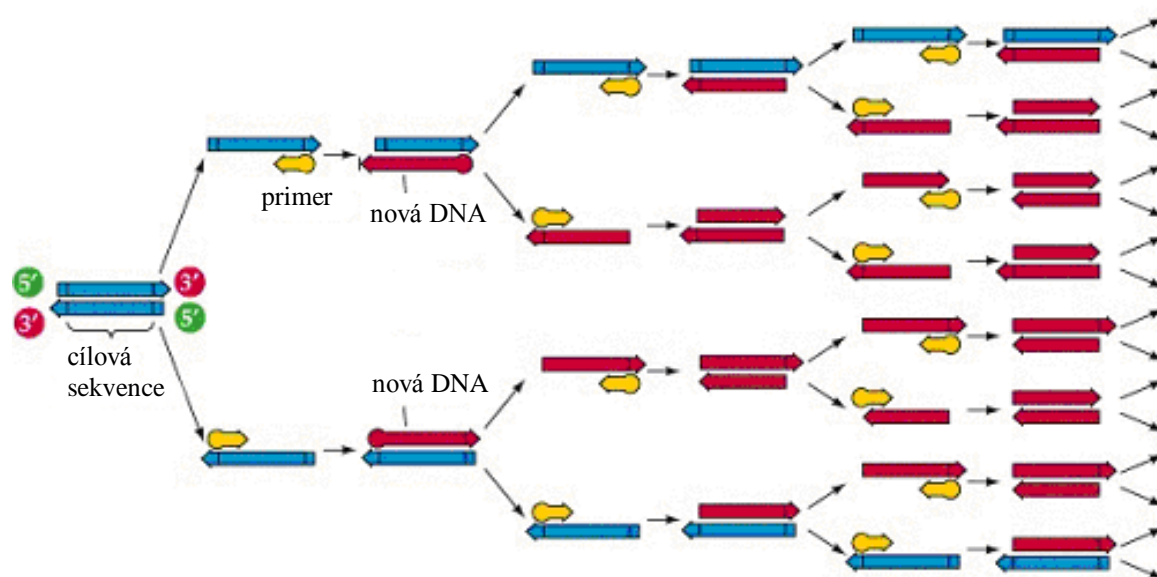
Princip PCR spočívá v replikaci nukleových kyselin (NK), která je základním molekulárním procesem všech živých organismů [36]. Podstatou je cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA ve směru 5'→3' za katalýzy DNA-polymerasy [36, 37]. Během tohoto procesu dochází k připojení dvou

primerů vázajících se na protilehlé řetězce DNA tak, že 3'OH-konce směřují proti sobě [37]. Primery jsou synteticky vyrobené sekvence obvykle 20 a více nukleotidů, přičemž jejich sekvence musí být komplementární k sekvenci sledovaného úseku DNA [38]. K syntéze se používají termostabilní polymerasy izolované z termofilních mikroorganismů, nejčastěji to bývá *Taq* DNA-polymerasa, izolovaná z *Thermus aquaticus* [36]. *Taq* polymerasa odolává teplotám, při nichž denaturuje DNA [37].

Během PCR probíhají v závislosti na teplotě reakční směsi tři kroky (obr. 12), během nichž probíhají tři odlišné děje s odlišnými nároky na teplotu [36].

Princip PCR [36, 37, 38] :

1. denaturace dvouřetězcových molekul DNA (teplota 94 – 95 °C)
2. připojení primerů k odděleným řetězcům DNA (30-65 °C), tzv. annealing
3. syntéza nových řetězců DNA prostřednictvím DNA-polymerasy (65-75 °C).



Obrázek 12: princip PCR [48]

Počet jednotlivých cyklů se opakuje a tak dochází ke zvýšení počtu nových DNA geometrickou řadou. Při prvním cyklu s jednou molekulou DNA získáme dvě nové molekuly, při druhém cyklu vzniknou 4 molekuly a při dvaceti cyklech získáme 1048576 (čili 2^{20}) kopií nových DNA [38]. Počet cyklů bývá obvykle 25-30 [36].

Reakce se provádí v zařízení zvaném termocycler, ve kterém se teplota automaticky mění v naprogramovaných časových intervalech [36, 37]. Jelikož výsledkem PCR jsou

mnohonásobně zmnožené vybrané úseky DNA, můžeme tak PCR označit za způsob klonování DNA [36].

Přesnost a úspěšnost PCR je závislá na pečlivém návrhu obou primerů, při čemž je třeba přihlížet k celkové sekvenci studovaného genomu. Pro genom o velikosti 3 miliardy bp je teoreticky postačující sekvence primerů o délce 16 nukleotidů. Takováto sekvence by měla být v dané velikosti v genomu jedinečná, a proto by se měla vázat specificky jen k jedinému místu. Primery se však zpravidla navrhují delší a to z toho důvodu, že genomy organismů nemají náhodné sekvence [36].

Výsledným produktem PCR jsou fragmenty DNA, tzv. amplikony, úseky definované délkou obvykle desítek až tisíc bp, jejíž přítomnost se prokazuje stanovením jejich velikosti elektroforézou v agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu [36, 37].

V případě návrhu nových primerů je vždy potřeba prokázat správnost výsledků na základě sekvenční analýzy.

3.1.1 Návrh primeru

Jak již bylo zmíněno výše, návrh primerů je nejdůležitější součástí PCR. Sekvence téhož genu (např. *speA*) u různých bakteriálních kmenů nebývají často identické, liší se jak v nukleotidové sekvenci tak i délce genu. Porovnáním těchto genu však lze nalézt úseky, ve kterých jsou si nukleotidové sekvence velmi podobné, tzv. konzervované domény. Na základě sekvencí těchto úseků lze sestavit komplementární primery, které nám umožňují detekci hledaného genu. Navrhují-li se primery pro větší skupinu mikroorganismů, pak se tyto úseky mírně liší a je proto nutné použít tzv. degenerované primery. Sekvence genu takto široké skupiny bakterií mají jiné nukleotidové sekvence, a proto nelze navrhnout univerzální primer bez degenerací. Degenerace v podstatě znamená nahrazení jednoho, či více nukleotidů v primeru jiným „písmenem“, který supluje různé nukleotidy, jak je znázorněno v tabulce č 1. Reálně se potom jedná o směs primerů.

Tabulka 1: Degenerace primerů

n	d	h	b	r	y	v	m	k	s	w
a, c, g, t	g, a, t	a, t, c	g, t, c	a, g	c, t	g, a, c	a, c	g, t	g, c	a, t

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Většina biogenních aminů vzniká jednoduchou metabolickou dráhu zahrnující jeden dekarboxylasový enzym. Pro detekci jejich potencionální produkce tedy postačuje detekovat příslušný gen pro danou dekarboxylasu. Polyamin putrescin však může být syntetizován až třemi dráhami. Doposud nebyla publikována žádná metoda umožňující detekci všech tří metabolických drah. Cílem mého výzkumu je vytvoření a testování nových primerů umožňujících detekci některých metabolických drah (ADC a ODC) a najít a optimalizovat metodu (PCR, touchdown-PCR), v níž by bylo možné detekovat přítomnost genů zapojených do syntézy putrescinu. Následně pomocí sekvenční analýzy potvrdit specifičnost primerů.

5 MATERIÁLY A METODY

5.1 Použité mikroorganismy

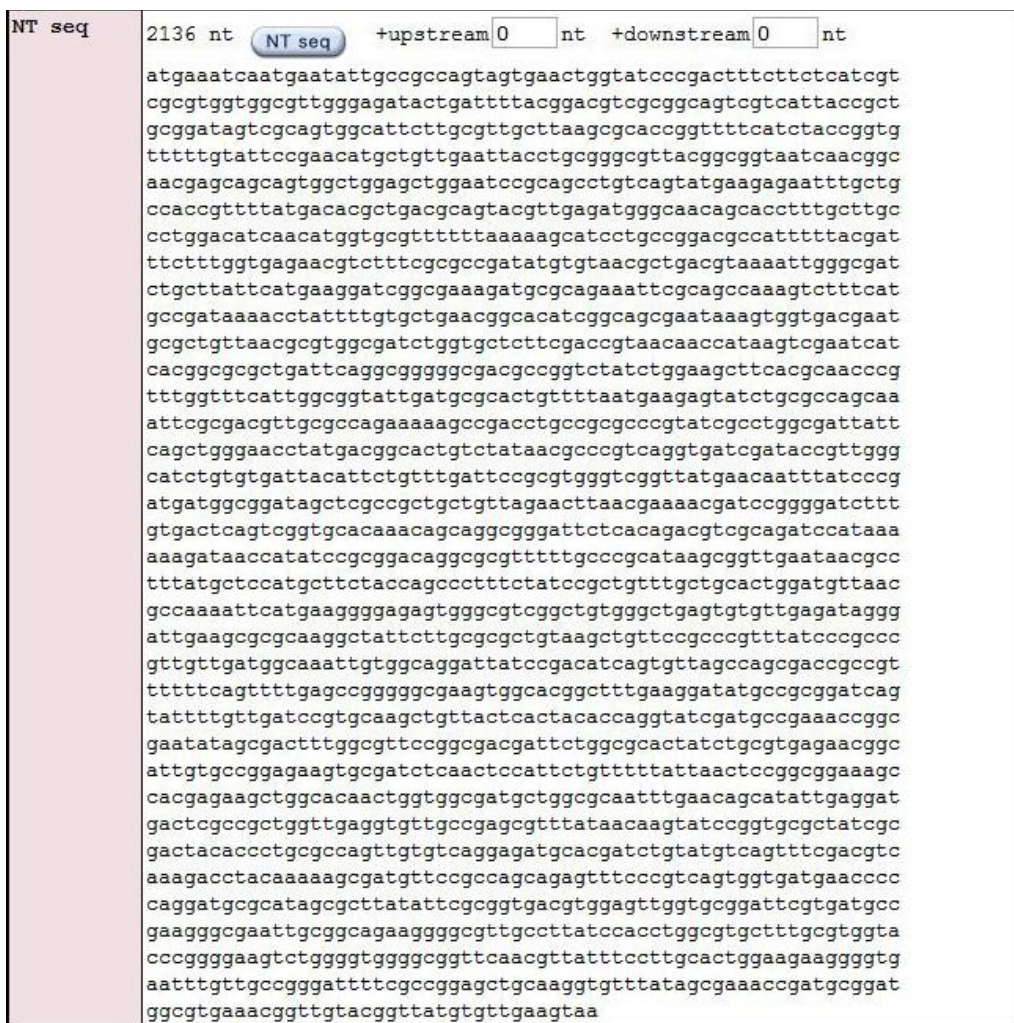
Pro experimentální část bylo použito třicet dva kmenů gramnegativních bakterií. Dvacet čtyři kmenů bylo získáno ze sbírek CCM (Czech Collection of Microorganisms) a CAPM (The Collection of Animal Pathogenic Microorganisms at Veterinary research institute). Osm kmenů bylo obdrženo ze sbírky mikroorganismů z ústavu technologie tuků, tenzidů a kosmetiky fakulty technologické univerzity Tomáše Bati ve Zlíně. Prvních jedenáct kmenů sloužilo k návrhu primeru a optimalizaci metody. Zbýlých 21 bakterií bylo použito pro následné otestování navržených primerů. Bakterie 25-32 nejsou kmenově zařazené, jedná se o reálné izoláty z povrchu drůbeže.

1. *Escherichia coli* CCM 3954
2. *Enterobacter aerogenes* CCM 2531
3. *Serratia marcescens* CCM 303
4. *Salmonella enterica* CCM4420
5. *Proteus mirabilis* CCM7188
6. *Klebsiella oxytoca* CCM2934
7. *Citrobacter freundii* CCM 7187
8. *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955
9. *Pseudomonas fluorescens* CCM 2798
10. *Pectobacterium carotovorum* CCM 1008^T
11. *Yersinia enterocolitica* CCM 7204^T
12. *Enterobacter aerogenes* CAPM 5634
13. *Escherichia coli* CAPM 6101
14. *Escherichia coli* CAPM 6104
15. *Escherichia coli* CAPM 6114
16. *Klebsiella pneumoniae* CAPM 6241
17. *Pseudomonas aeruginosa* CAPM 5707
18. *Pseudomonas aeruginosa* CAPM 5718
19. *Pseudomonas aeruginosa* CAPM 5712
20. *Salmonella enterica* CAPM 5439

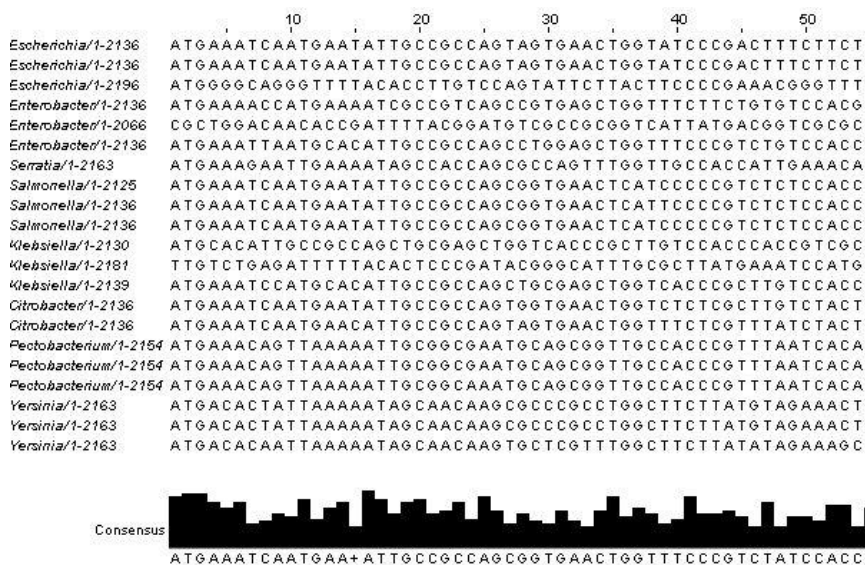
21. *Salmonella enterica* CAPM 5967
22. *Salmonella enterica* CAPM 6324
23. *Yersinia enterocolitica* CAPM 6154
24. *Yersinia ruckeri* CAPM 6095
25. *Serratia marcescens*
26. *Serratia marcescens*
27. *Pantoea* sp.
28. *Escherichia coli*
29. *Yersinia enterocolitica*
30. *Klebsiella oxytoca*
31. *Escherichia coli*
32. *Proteus vulgaris*

5.2 Návrh primerů

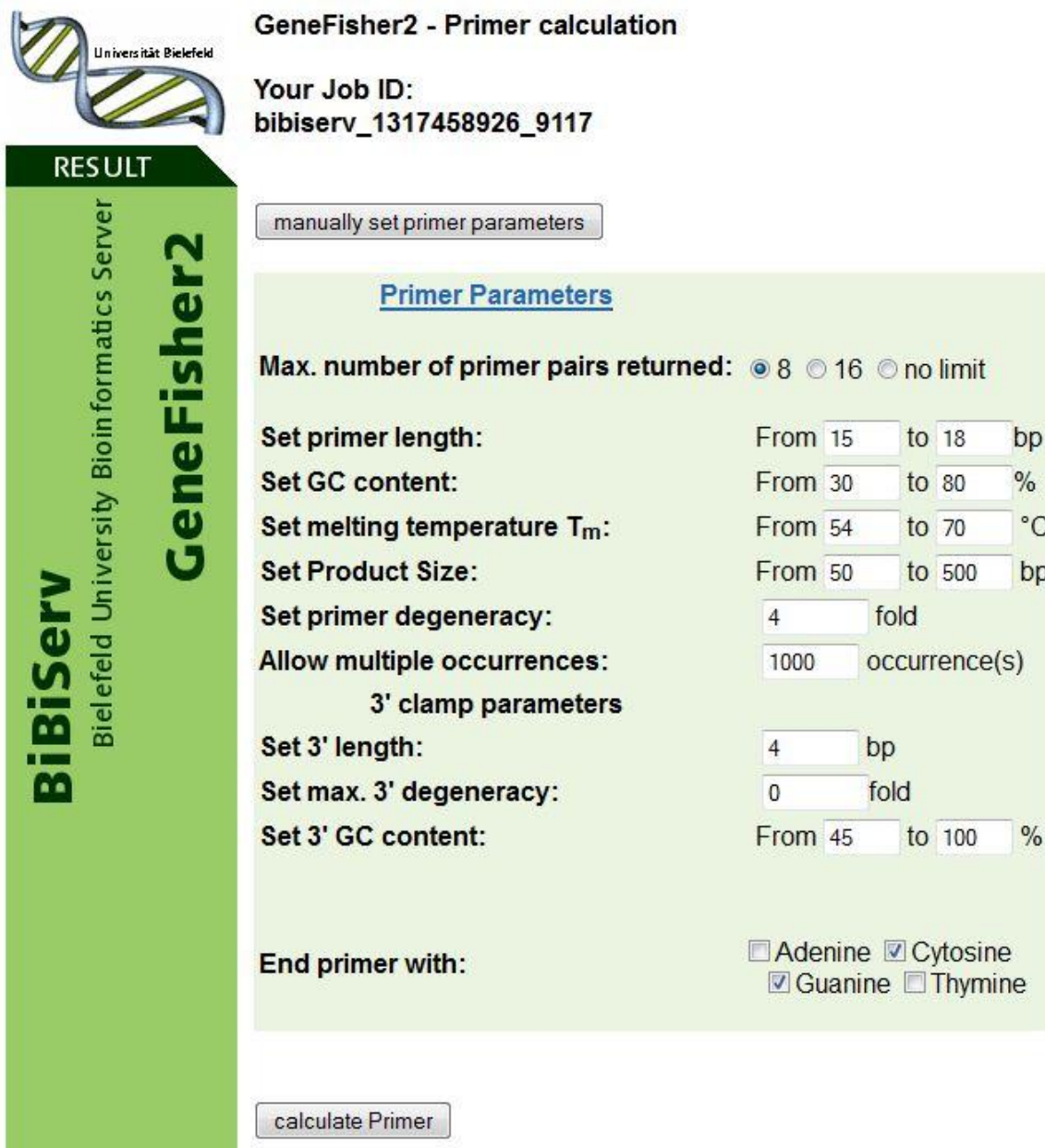
Prvním krokem při návrhu primerů je nalezení nukleotidové sekvence (Obr. 13) daného genu kódujícího vznik příslušného enzymu v genových databázích. Tyto geny jsou poté porovnávány v programu Jalview (Obr. 14), který ukáže podobnost sekvencí a místa, kde kde by mohl primer nasednout. Nalezené sekvence se poté vkládají do programu GeneFisher2 (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/>), který na základě porovnání sekvencí těchto genů navrhne sérii sad primerů dle předem zadaných parametrů, jakými jsou např. délka produktu, annealingová teplota, počet degenerovaných bází apod. (Obr. 15). Navržené primery jsou následně testovány programem Primer-BLAST (Obr. 16) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Sady primerů s nejlepšími výsledky jsou poté testovány v laboratoři.




Obrázek 13: Nukleotidová sekvence



Obrázek 14: Porovnání nukleotidových sekvencí




 Universität Bielefeld

GeneFisher2 - Primer calculation

Your Job ID:
bibiserv_1317458926_9117

RESULT

manually set primer parameters

BiBiserv
Bielefeld University Bioinformatics Server

GeneFisher2

Primer Parameters

Max. number of primer pairs returned: 8 16 no limit

Set primer length: From to bp

Set GC content: From to %

Set melting temperature T_m : From to °C

Set Product Size: From to bp

Set primer degeneracy: fold

Allow multiple occurrences: occurrence(s)

3' clamp parameters

Set 3' length: bp

Set max. 3' degeneracy: fold

Set 3' GC content: From to %

End primer with: Adenine Cytosine
 Guanine Thymine

calculate Primer

Obrázek 15: Návrh primeru pomocí programu GeneFisher2

The image shows the Primer-BLAST web interface, a tool for finding specific primers. The interface is divided into several sections:

- PCR Template:** Includes a text input for the accession, GI, or FASTA sequence, a 'Pročíst...' button, and a 'Range' section with 'From' and 'To' fields for forward and reverse primers.
- Primer Parameters:** Contains checkboxes for 'Use my own forward primer' and 'Use my own reverse primer', a 'PCR product size' range (70-1000), '# of primers to return' (5), and 'Primer melting temperatures (Tm)' (57.0-65.0).
- Exon/Intron selection:** Features dropdowns for 'Exon junction span' and 'Exon junction match', a '7' value for 'Exon number of bases that must occur at the 5' or 3' side of the junction', and a '1000' value for 'Intron length range'.
- Primer Pair Specificity Checking Parameters:** Includes a checked 'Specificity check' box, 'Organism' set to 'Homo sapiens', 'Database' set to 'RefSeq mRNA', and 'Primer stringency' settings (at least 2 total mismatches, at least 2 mismatches within the last 5' bases, ignore targets with 6 or more mismatches).

At the bottom, there are 'Get Primers' and 'Advanced parameters' buttons.

Obrázek 16: Simulace PCR pomocí programu Primer-BLAST

5.3 Izolace DNA

Mikroorganismy byly pomnoženy v médiu MPB (HiMedia-Bombai, Indie) a kultivovány 24 hodin při 30 ± 1 °C. Bakteriální DNA byla následně izolována pomocí izolačního kitu UltraClean® DNA Isolation Kit (MO-BIO Laboratories, Carlsbad, CA USA).

5.4 Polymerázová řetězová reakce

Výskyt sledovaných genů byl testován pomocí PCR. Veškeré DNA amplifikační reakce probíhaly v celkovém objemu amplifikační směsi 15,01 μ l, z čehož 11,2 μ l tvořila H₂O; 1,5 μ l pufr pro *Taq* polymerasu (New England Biolabs); 0,6 μ l dNTP (TopBio, Czech Republic); 0,15 μ l *Taq* polymerasy (New England Biolabs, USA) a 1 μ l DNA. Primery pro amplifikaci sledovaného genu gramnegativních bakterií byly použity v koncentraci 0,3 μ l. Reagencie pro PCR byly získány z Roche Diagnostics, Praha, ČR.

Syntéza specifického DNA fragmentu byla prováděna v termocykleru PTC 100 MJ Research (Bio-Rad, USA), který má vyhřívané víko. Amplifikace probíhala nejprve podle programu teplotní gradient: 29 cyklů, počáteční denaturace 95 °C/10 min, první denaturace 95 °C/45 s, annealing 48 - 61 °C/45 s a následná extenze 72 °C/2 min.

Testování annealingových teplot T5-T8 probíhalo podle programu: počáteční denaturace 95 °C/10, první denaturace 95 °C/45 s, annealing 58 °C/45s, extenze 72 °C/2 min a závěrečná extenze 72 °C/20 min.

Touchdown PCR probíhala podle programu: počáteční denaturační teplota 95 °C 10 minut, denaturační teplota 94 °C 30 sekund, annealingová teplota 62 °C 1 minutu, závěrečná extenze 72 °C 1 minutu. Následné annealingové teploty klesaly od 61 °C až k 47 °C vždy po 1 minutě. Závěrečná extenze byla 72 °C 5 minut.

K detekci amplifikovaného PCR fragmentu byla použita agarózová gelová elektroforéza. Program elektroforézy byl nastaven na 45 min a napětí 90 V. PCR produkty byly nanášeny do 1 % gelu, který obsahoval ethidium bromid jako interkalační barvivo pro zviditelnění amplifikovaných sekvencí. Gel byl vyfocen na UV transluminátoru firmy SynGene.

5.5 Purifikace a sekvenace

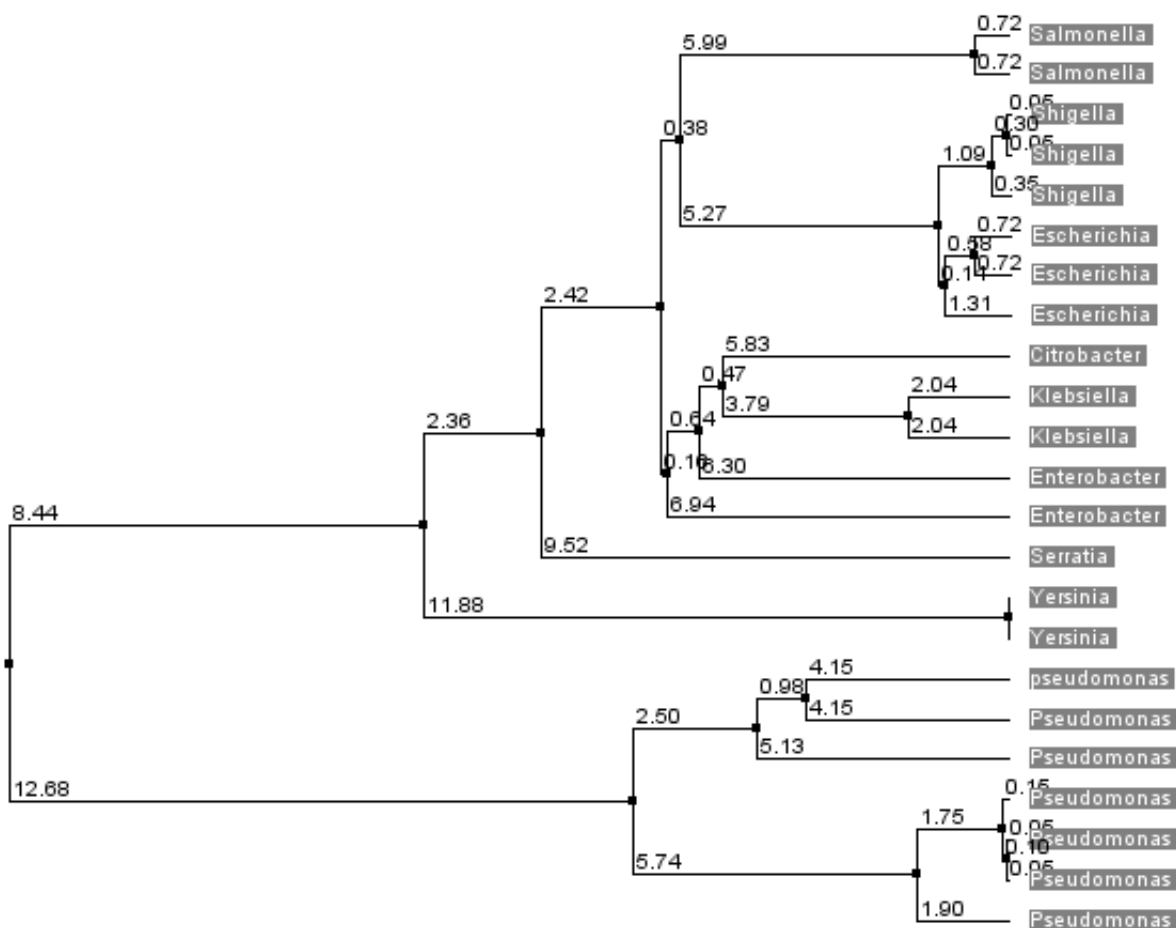
Vybrané produkty PCR byly purifikovány kitem (QIA® PCR Purification Kit (250), QIAGEN) a následně odeslány na sekvenční analýzu (Biologické Centrum Akademie Věd České republiky). Výsledky sekvenční analýzy byly zkoumány v programu Segue Scanner (Version: 1.0) a sledovaná sekvence byla přkopírována do programu Blast, který je volně dostupný nainternetu (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome). Program Blast nám poskytl údaje o správnosti amplifikovaného produktu.

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem práce bylo vyvinout primery pro detekci genů *speA* a *speC*.

6.1 Arginin dekarboxylasa

Pro detekci genu *speA*, který kóduje biosyntetickou arginin dekarboxylasu bylo vytvořeno a testováno 6 sad primerů. Primery byly vytvořeny v programu GeneFisher porovnáním známých sekvencí genu *speA* z 27 různých bakteriálních kmenů. Sekvence byly získány z genových bank, volně dostupných na internetu. Phylogenetickou příbuznost těchto genů znázorňuje fylogenetický strom (obr. 17).



Obrázek 17: Fylogenetický strom pro gen *speA*

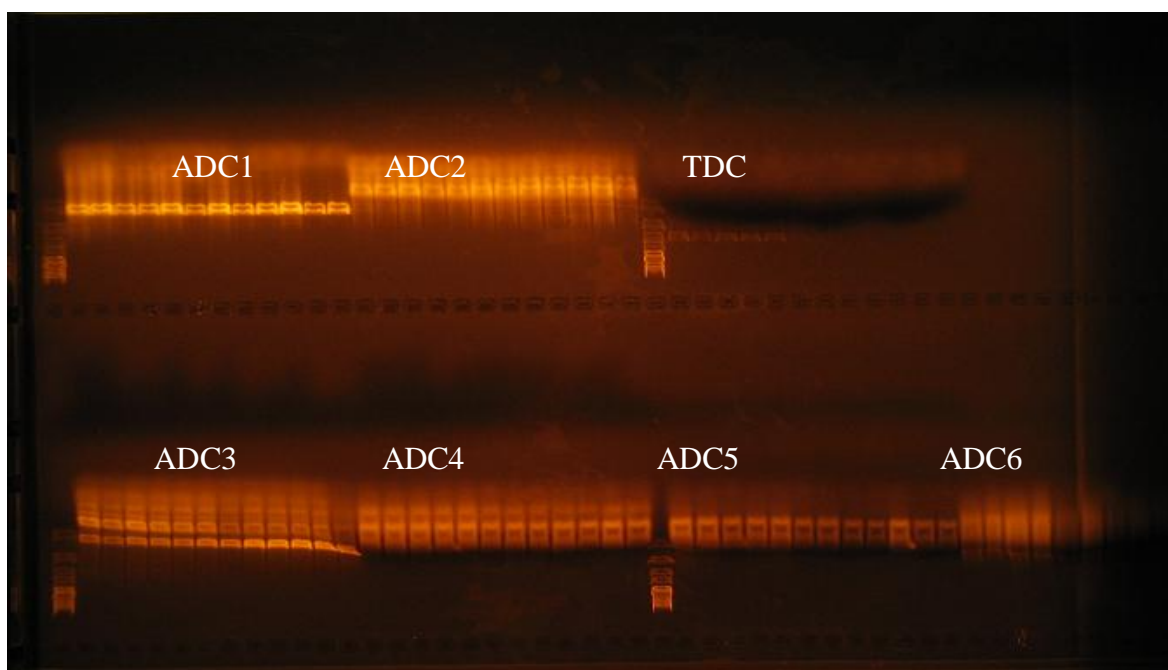
Z obrázku je patrné, že gen *speA* u *Pseudomonas* spp. tvoří fylogeneticky oddělenou skupinu, což může zkomplikovat navržení univerzálního primeru. Nicméně pomocí programu GeneFisher bylo nakonec nalezeno několik vhodných sad primerů (Tab. 2), z toho sada primerů 5 a 6 měla detekovat přítomnost genu *speA* u všech gramnegativních bakterií včetně *Pseudomonas* spp. Vzhledem k fylogenetické odlišnosti genu *speA* u *Pseudomonas* spp. byly navrženy sady primerů 1 a 2, které jsou vhodné pouze pro *Pseudomonas* spp. Sady primerů ADC 3 a 4 jsou vhodné pro stanovení genu *speA* u gramnegativních bakterií s výjimkou rodu *Pseudomonas* spp.

Tabulka 2: Navržené primery pro detekci genu *speA*

	FP	RP	Produkt	Mikroorganismus
ADC1	GGCATGCTCAAGGAGTTCTGCG	GGCTGGTCTCGATGCTCTGCTC	610	<i>Pseudomonas</i> spp.
ADC2	CGGCACCATCGTCTGCAACGG	GAACTTGGMCTTCTCGCCACCG	233	<i>Pseudomonas</i> spp
ADC3	TGGGAAACCTGGCAGGARATGC	GGGAAGACRAACACRTCAACCG	569	G ⁻ kromě <i>Pseudomonas</i>
ADC4	AGYATGTGGGAAACCTGGCAG	CGGCATYGACTGGAACAGCGAG	291	G ⁻ kromě <i>Pseudomonas</i>
ADC5	CAAYTTCTCGSTGTTCCAG	TCRCCRAACAGGTTGTGC	280	všechny G ⁻
ADC6	CWTCGACGTSGGCGGCGG	TCRCCRAACAGGTTGTGC	825	všechny G ⁻

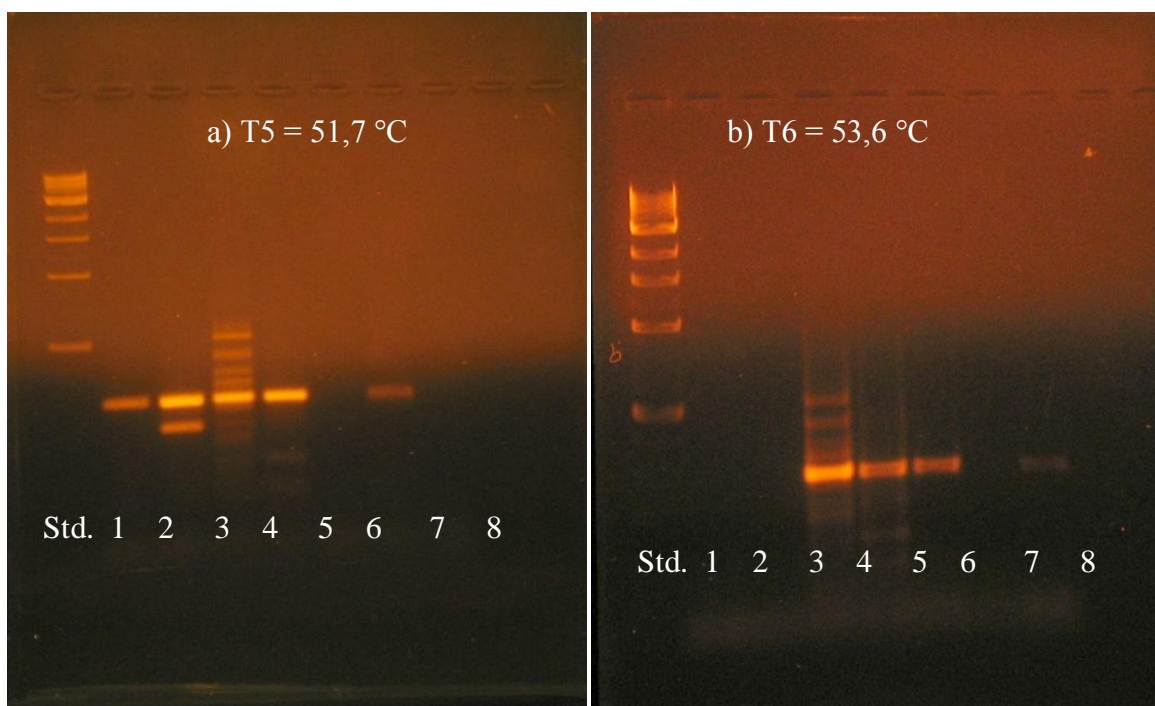
Výše uvedené primery byly nejprve testovány metodou PCR v programu teplotní gradient (Obr. 18).

Pro první dvě sady primerů byla jako templát použita DNA vyizolovaná z kmene *Pseudomonas aeruginosa* (prvních 24 vzorků), pro testování ostatních sad primerů byla jako templát použita DNA *E. coli*. Jako pozitivní kontrola byla použita dříve úspěšně testovaná sada primerů pro stanovení tyrosindekarboxylasy (TDC).



Obrázek 18: Teplotní gradient (kapitola 5.4), 6 sad primerů, *Pseudomonas aeruginosa* (1-24), *E. coli* (25-51), sada primerů: ADC1, ADC2, TDC (pozitivní kontrola), ADC3, ADC4, ADC5 a ADC6

Nejllepších výsledků bylo dosaženo se sadou primerů ADC5 při teplotách T5 až T8, kdy jsme obdrželi pouze očekávané amplikony o velikosti 280 bp. Navíc je tato sada určena pro všechny sledované gramnegativní bakterie, a proto byla tato sada dále testována. Metoda byla optimalizována za použití této sady primerů při různých teplotách a za použití 7 bakteriálních DNA (Obr. 19). Touto metodou se bohužel nepodařilo optimalizovat metodu PCR tak, abychom obdrželi pouze očekávaný produkt o délce 280 bp. Z tohoto důvodu bylo přistoupeno k testování metody touchdown PCR, při které byl teplotní program spočten z annealingové teploty ($T_m = 58 \text{ }^\circ\text{C}$). Při testování sady primerů ADC5 s 11 různými DNA z výše uvedených bakteriálních kmenů v programu touchdown PCR byly obdrženy pouze očekávané produkty (Obr. 20).



Obrázek 19: Set primerů ADC5: a) annealingová teplota $T_5 = 51,7\text{ °C}$, b) annealingová teplota $T_6 = 53,6\text{ °C}$
 DNA: *Escherichia coli* (1), *Enterobacter aerogenes* (2), *Serratia marcescens* (3), *Salmonella enterica* (4),
Proteus mirabilis (5), *Pseudomonas aeruginosa* (6) a *Pseudomonas fluorescens* (7), slepý vzorek (8)



Obrázek 20: Touchdown PCR, set primerů ADC5, DNA: *E. coli* (1), *Enterobacter aerogenes* (2), *Serratia marcescens* (3), *Salmonella enterica* (4), *Proteus mirabilis* (5), *Klebsiella oxytoca* (6), *Citrobacter freundii* (7), *Pseudomonas aeruginosa* (8), *Pseudomonas fluorescens* (9), *Pectobacterium carotovorum* (10), *Yersinia enterocolitica* (11), pozitivní kontrola (12)

6.1.1 Sekvence

Pro ověření správnosti metody byly vybrány amplikony genu *speA* kmenů *E.coli*, *Enterobacter aerogenes* a *Salmonella enterica* pro sekvenční analýzu. Sekvence PCR amplikonů ve všech testovaných případech potvrdila, že se jedná o očekávanou biosyntetickou arginindekarboxylasu.

6.2 Ornithin dekarboxylasa

Dalším důležitým enzymem, který je zahrnut v metabolismu putrescinu je ornithin dekarboxylasa kódovaná genem *speC*. Pro detekci tohoto genu u gramnegativních bakterií byla dříve vyvinuta sada primerů PUT1-F/PUT2-R (Muñoz et al., 2004) a 3/16 (de las Rivas et al., 2005). S těmito sadami však nebyly obdrženy očekávané produkty (Obr. 21).



Obrázek 21: Set primerů PUT1-F/PUT2-R a 3/16; DNA: *E. coli* (1), *Enterobacter aerogenes* (2), *Serratia marcescens* (3), *Salmonella enterica* (4), *Proteus mirabilis* (5), *Klebsiella oxytoca* (6), *Citrobacter freundii* (7), *Pseudomonas aeruginosa* (8), *Pseudomonas fluorescens* (9), *Pectobacterium carotovorum* (10), *Yersinia enterocolitica* (11), pozitivní kontrola (12)

Z obrázku 21 je patrné, že výše uvedené primery nebyly vhodné k použití v touchdown PCR pro detekci genu *speC* u všech gramnegativních bakterií. Z tohoto důvodu byly navrženy tři vlastní sady primerů. Fylogenetickou příbuznost genu *speC* u sledovaných bakterií znázorňuje obr. 22.

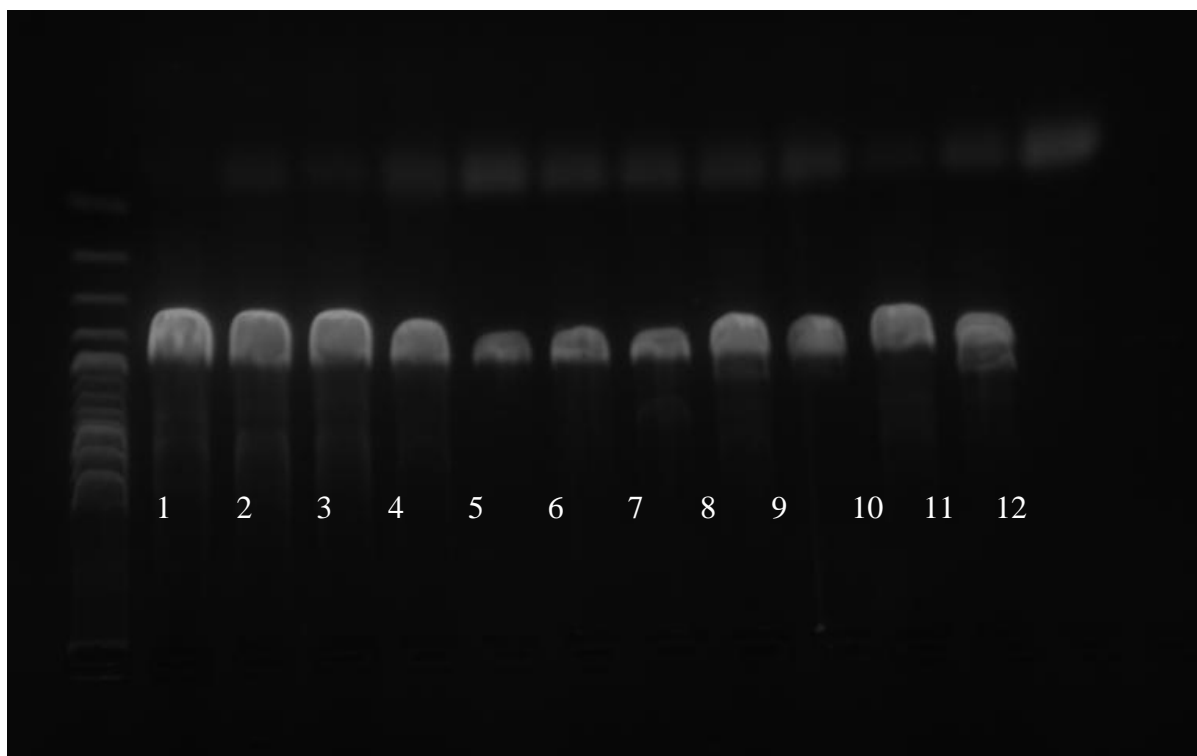


Obrázek 22: Fylogenetický strom

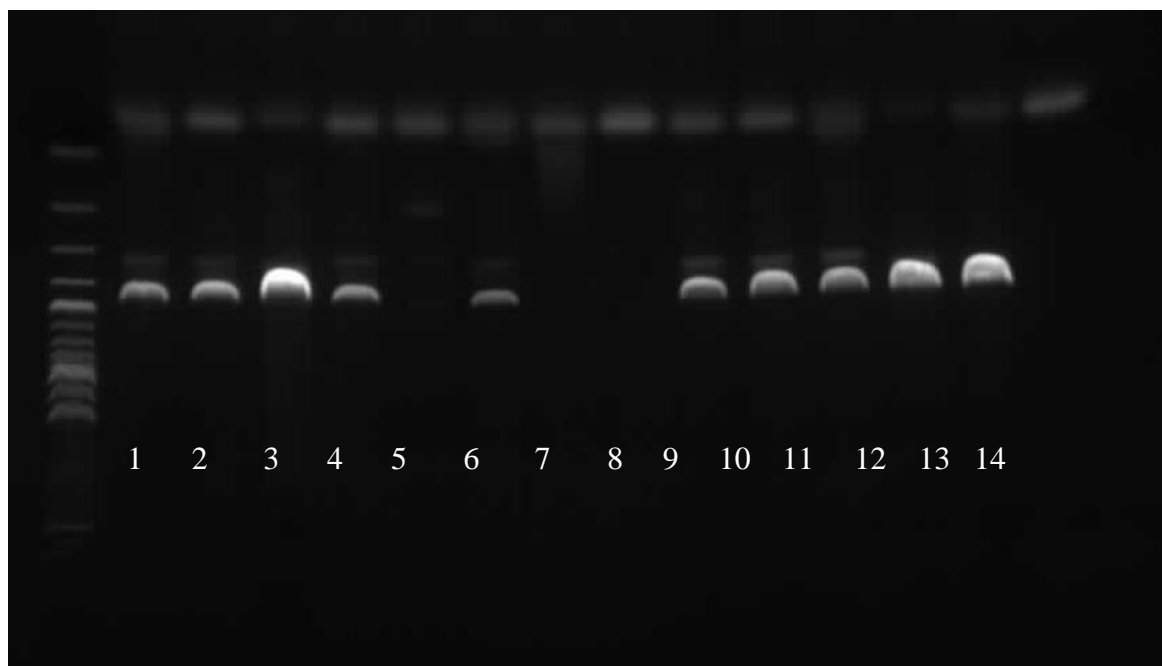
Z obrázku je opět patrná fylogenetická odlišnost sledovaného genu u těchto bakterií, zejména pak rodu *Pseudomonas* sp. Tyto odlišnosti opět zdůvodňují využití degenerovaných primerů. Pomocí programu GeneFisher bylo nakonec nalezeno několik vhodných sad primerů (Tab. 3). Sada SpeC2 měla detekovat přítomnost genu *speC* u všech gramnegativních bakterií a sada SpeC1 měla detekovat sledovaný gen u všech gramnegativních bakterií kromě rodu *Proteus*. Ve skutečnosti však sada SpeC1 (Obr. 23) detekovala gen *speC* u všech gramnegativních bakterií a SpeC2 ne (Obr. 24).

Tabulka 3: Navržené primery pro detekci genu *speC*

	FP	RP	Produkt	Mikroorganismus
SpeC1	CGACGCCGGTCTATCTGG	AAACAGCGGATAAAAACGG	497	g- kromě Proteus
SpeC2	GCGACGCCGGTTTATCTG	GCGTGCAGCATAAAGGC	470	všechny g-
SpeC3	TTCGCCGACAAGCAGG	AGGTAGAACGCCTTCAGC	1103	<i>Pseudomonas</i> sp.



Obrázek 23: Touchdown PCR, set primerů *speC1*, DNA: *E. coli* (1), *Enterobacter aerogenes* (2), *Serratia marcescens* (3), *Salmonella enterica* (4), *Proteus mirabilis* (5), *Klebsiella oxytoca* (6), *Citrobacter freundii* (7), *Pseudomonas aeruginosa* (8), *Pseudomonas fluorescens* (9), *Pectobacterium carotovorum* (10), *Yersinia enterocolitica* (11), pozitivní kontrola (12)



Obrázek 24: Touchdown PCR, set primerů *speC2*, DNA: *Enterobacter aerogenes* (1), *E. coli* (2), *E. coli* (3), *E. coli* (4), *Klebsiella pneumoniae* (5), *Pseudomonas aeruginosa* (6), *Pseudomonas aeruginosa* (7), *Pseudomonas aeruginosa* (8), *Salmonella enterica* (9), *Salmonella enterica* (10), *Salmonella enterica* (11), *Yersinia enterocolitica* (12), *Yersinia ruckeri* (13), slepý vzorek (14)

6.2.1 Sekvenace

Pro ověření správnosti metody byly vybrány amplikony genu *E.coli*, *Enterobacter aerogenes* a *Salmonella enterica* pro sekvenční analýzu. Sekvenace PCR amplikonů ve všech testovaných případech potvrdila, že se jedná o sledovanou biosyntetickou ornithindekarboxylasu. Nicméně se u některých vzorků jednalo o směs genů *speC* a *speF*. Podobnost těchto genů je tak velká, že se nepodařilo vyvinout pouze primer pro *speC*. *SpeF* kóduje biodegradabilní formu ornithindekarboxylasy podílející se také na produkci putrescinu.

6.3 Souhrná diskuze

Cílem této práce bylo navrhnout a optimalizovat metodu PCR schopnou detekovat některé metabolické dráhy (ADC, ODC) biosyntézy putrescinu gramnegativními bakteriemi

v potravinách. V této práci byly navrženy 2 nové sady primerů pro detekci sledovaných genů (*speC* a *speA*) a zároveň byly otestovány již existující sady primerů (PUT2-F/PUT2-R (Muñoz et al., 2004) a 3/16 (de las Rivas et al., 2005)), které se ukázaly být nevhodné a to z toho důvodu, že primery nebyly vyvinuty pro sledování metabolismu putrescinu u všech sledovaných skupin gramnegativních bakterií. Specifita těchto navržených primerů byla stanovena pomocí metody touchdown PCR. Pro potvrzení správnosti této metody byly vzorky sekvenovány. Nicméně set primerů SpeC1-R/SpeC1-F amplifikoval směs genů *speC* a *speF*, což je dáno velkou podobností těchto dvou genů. S těmito výsledky se setkal i autor Fadhlaoui-Zid [64].

Doposud byly publikovány pouze metody pro detekci ornithin dekarboxylasy u některých bakteriálních kmenů. Metody pro detekci genu *speA* kódující arginin dekarboxylasu nebyly doposud publikovány. Vzhledem k tomu, že proteobakterie jsou běžné kontaminanty potravin a jsou také významnými producenty putrescinu, je potřeba vyvinout metodu pro detekci všech metabolických drah, kterými můžou produkovat putrescin. Detekce, výzkum a možnost blokace těchto drah se může podílet na zlepšování kvality potravin.

Detekce bakterií produkujících putrescin mikrobiologickými metodami je pomalá a zdoluhavá, navíc vyžaduje pro jejich testování izolaci a kultivaci mikroorganismů. Naproti tomu molekulární metody jsou rychlé a spolehlivé. Mnoho autorů se zabývalo vývojem spolehlivých PCR metod pro detekci mikroorganismů produkujících biogenní aminy. Někteří autoři vyvinuli universální konsenzuální degenerované primery pro detekci mikroorganismů produkujících jeden biogenní amin (většina se zaměřila na histamin) nebo vyvinuli multiplex-PCR pro stanovení dvou nebo více genů současně [2, 39, 40, 41, 42, 43]. Pouze de Las Rivas [2] zahrnul gramnegativní bakterie produkující putrescin do jejich výzkumu a sestavil tak multiplex-PCR pro současné stanovení ornithin, histidin a tyrosin dekarboxylasy. Nicméně opomenul možnost vzniku putrescinu z argininu jeho dekarboxylací a tak jeho multiplex-PCR neobsahuje žádné primery pro detekci této metabolické dráhy. Byla rovněž studována tvorba putrescinu u grampozitivních bakterií enzymem ornithin dekarboxylasou, hlavně u bakterií rodů *Lactococcus* a *Oenococcus*. Někteří autoři zahrnuli primery pro detekci agmatin deiminasy (*aguA*) do jejich multiplex-PCR [41, 42, 44].

ZÁVĚR

Tato práce byla zaměřena na studium metabolických drah biosyntézy putrescinu u vybraných kmenů proteobakterií.

Byla vyvinuta sada degenerovaných primerů pro detekci genu *speA* a *speC* u gramnegativních bakterií produkujících putrescin a také byla optimalizována metoda touchdown PCR. Tyto sady primerů mohou být použity v potravinářském průmyslu k určení potencionálního rizika produkce putrescinu mikroorganismy (mikrobiální kontaminace) a také v dalším výzkumu metabolismu putrescinu (jeho ovlivňování či případná inhibice) u jeho producentů za účelem zamezení kumulace putrescinu v potravinách

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] SANTOS, S. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 1996, vol. 29, p. 213–231.
- [2] RIVAS, B., MARCOBAL, Á., MUNOZ, R. Improved multiplex-PCR method for the simultaneous detection of food bacteria producing biogenic amines. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2005, vol. 244, p. 367–372.
- [3] MEDINA, M., et al. Biogenic amines and polyamines: Similar biochemistry for different physiological missions and biomedical applications. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 2003, vol. 38, p. 23–59.
- [4] DADÁKOVÁ, E., KŘÍTEK, M., PELIKÁNOVÁ, T. Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). *Food Chem.*, 2009, vol. 116, p. 365–370.
- [5] LANDETE, J., ARENA, M., PARDO, I., et al. Comparative survey of putrescine production from agmatine deamination in different bacteria. *Food Microbiol.*, 2008, vol. 25, p. 882–887
- [6] SHALABY, A. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Res. Int.*, 1997, vol. 29, no. 7, p. 675–690.
- [7] DRAČKOVÁ, M., et al. Determination of polyamine content in curd cheese by near-infrared reflectance spectrometry. *Acta fytotechnica et zootechnica*, 2009, p. 121–126.
- [8] SANTOS, W., SOUZA, M., CERQUEIRA, M., GLO'RIA, M. Bioactive amines formation in milk by *Lactococcus* in the presence or not of rennet and NaCl at 20 and 32 °C. *Food Chem.*, 2003, vol. 81, p. 595–606.
- [9] LANDETE, J., RIVAS, B., MARCOBAL, A., MUÑOZ, R. Molecular methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria on foods. *Int. J. Food Microbiol.*, 2007, vol. 117, p. 258–269.
- [10] FADDA, S., VIGNOLO, G., OLIVER, G. Tyramine degradation and tyramine/histamine production by lactic acid bacteria and *Kocuria* strains. *Biotechnology Letters*, 2001, vol. 23, p. 2015–2019.

- [11] NAILA, A., FLINT, S., FLETCHER, G., BREMER, P., MEERDINK, G. Control of biogenic amines in food-existing and emerging approaches. *J. Food Sci.*, 2010, vol. 75, p. 139–150.
- [12] ONAL, A. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chem.*, 2007, vol. 103, p. 1475–1486.
- [13] NOVELLA-RODRÍGUEZ, S., VECIANA-NOGUÉS, M.T., ROIG-SAGUÉS, A.X., TRUJILLO-MESA, A.J., VIDAL-CAROU, M.C. Influence of starter and nonstarter on the formation of biogenic amine in goat cheese during ripening. *J. Dairy Sci.*, 2002, vol. 85, p. 2471–2478.
- [14] LANGE, J., THOMAS, K., WITTMANN, Ch. Comparison of a capillary electrophoresis method with highperformance liquid chromatography for the determination of biogenic amines in various food samples. *J. Chromatogr., B*, 2002, vol. 779, p. 229–239.
- [15] KOROVIČOVÁ, J., KOHAJDOVÁ, Z. Biogenic amines in food. *Chem. Pap.*, 2003, vol. 59, p. 70–79.
- [16] HOZA, I., KRAMÁŘOVÁ, D., BUDÍNSKÝ, P. *Potravinářská biochemie II*. 1st ed. 2007. ISBN 80-7318-395-1.
- [17] SMĚLÁ, D., PECHOVÁ, P., KOMPRDA, T., KLEJDUS, B., KUBÁŇ, V. Chromatografické stanovení biogenních aminů v trvanlivých salámech během fermentace a skladování. *Chem. Listy*, 2004, vol. 98, p. 432–437.
- [18] HAMPL, F., PALEČEK, J. *Farmakochemie*. 1st ed. 2002. ISBN 80-7080-495-5.
- [19] SHAH, P., SWIATLO, E. A multifaceted role for polyamines in bacterial pathogens. *Mol. Microbiol.*, 2008, p. 4–16.
- [20] URDIALES, J., MEDINA, M., SANCHEZ-JIMENEZ, F. Polyamine metabolism revisited. *European journal of gastroenterology and hepatology*, 2001, p. 1015–1019.
- [21] BACHRACH, U. The early history of polyamine research. *Plant Physiol. Biochem.*, 2010, vol. 48, p. 490–495.

- [22] CARRUTHERS, L., MARTON, L., PETERSON, C. Polyamine analogues: potent inducers of nucleosomal array oligomerization and inhibitors of yeast cell growth. *Biochem. J.*, 2007, vol. 405, p. 541–545.
- [23] KALAČ, P., KRAUSOVÁ, P. A review of dietary polyamines: formation, implications for growth and health and occurrence in foods. *Food Chem.*, 2005, vol. 90, p. 219–230.
- [24] KAUR-SAWHNEY, R., et al. Polyamines in plants: An overview. *Journal of cell and molecular biology*, 2003, p. 1–12.
- [25] LARGUE, E., SABATER-MOLINA, M., ZAMORA, S. Biological significance of dietary polyamines. *Nutrition*, 2007, vol. 23, p. 87–95.
- [26] MING-HON, H., et al. Effects of polyamines on the thermal stability and formation kinetics of DNA duplexes with abnormal structure. *Nucleic Acids Res.*, 2001, vol. 29, no. 24, p. 5121–5128.
- [27] KALAČ, P., et al. Contents of polyamines in selected foods. *Food Chem.*, 2005, vol. 90, p. 561–564.
- [28] PEGG, A., MICHAEL, A. Spermine synthase. *Cell Mol. Life Sci.*, 2010, vol. 67, p. 1–13.
- [29] IGARASHI, K., KASHIWAGI, K. Polyamines: Mysterious modulators of cellular functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000, vol. 271, p. 559–564.
- [30] PEGG, A. Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. *Biochem. J.*, 1986, vol. 234, p. 249–262.
- [31] DA'DARA, A., WALTER, R. Molecular and biochemical characterization of S-adenosylmethionine decarboxylase from the free-living nematode *Ceanorhabditis elegans*. *Biochem. J.*, 1998, vol. 336, p. 545–550.
- [32] IGARASHI, K., KASHIWAGI, K. Modulation of cellular function by polyamines. *The international journal of biochemistry and cell biology*, 2010, vol. 42, p. 39–51.
- [33] GRISWOLD, A., JAMESON-LEE, M., BURNE, R. Regulation and physiologic significance of the agmatine deiminase system of streptococcus mutans UA159. *J. Bacteriol.*, 2006, vol. 188, no. 3, p. 834–841.

- [34] KOHAJDOVÁ, Z., KAROVIČOVÁ, J., GREIF, G. Biogénne amíny v potravinách. Potravinárstvo [online]. 2008, vol. 2, no. 1, p. 30–49. Available from http://www.potravinarstvo.com/dokumenty/potravinarstvo_no1_2008.pdf.
- [35] MARCOBAL, A., RIVAS, B., MUNOZ, R. Methods for the detection of bacteria producing biogenic amines on foods: A survey. *Journal of consumer protection and food safety*, 2006, p. 187–196.
- [36] ŠMARDA, J., et al. Metody molekulární biologie. 1st ed. 2008. ISBN 978-80-210-3841-7.
- [37] ROSYPAL, S. Úvod do molekulární biologie, třetí díl. 2nd ed. 1997.
- [38] RUSSELL, P. iGenetics. A Mendelian approach. 1st ed. 2005. ISBN 0-8053-4666-X
- [39] COTON, E., COTON, M. Multiplex PCR for colony direct detection of Gram-positive histamine- and tyramine-producing bacteria. *Journal of microbiological methods.*, 2005, vol. 63, p. 296-304.
- [40] MARCOBAL, Á., RIVAS, B., MORENO-ARRIBAS, M.V. & MUNOZ, R. Multiplex PCR method for the simultaneous detection of histamine-, tyramine-, and putrescine producing lactic acid bacteria in foods. *J. Food Protect.* 2005, p. 874-878.
- [41] COTON, M., ROMANO, A., SPANO, G., et al. Occurrence of biogenic amine-forming lactic acid bacteria in wine and cider. *Food mikrobiology.* 2010, vol. 27, p. 1078-1085.
- [42] NANNELLI, F., CLAISSE, O., GINDREAU, E., et al. Determination of lactic acid bacteria producing biogenic amines in wine by quantitative PCR methods. *Letters in applied mikrobiology.* 2008, vol. 47, p. 594-599.
- [43] MOON, JS., CHO, SK., CHOI, HY., KIM, JE., KIM, SY., CHO, KJ., HAN, NS. Isolation and characterization of biogenic amine-producing bacteria in fermented soybean pastes. *J Microbiol.* 2010, vol. 48, p. 257-261.
- [44] ALBERTO, M.R., ARENA, M.E., MANCA, C.M. Putrescine production from agmatine by lactobacillus hilgardii: Effect of phenolic compounds, *Food control.* 2007, vol. 18, p. 898-903.

- [45] MILOVIC, V., et al. Polyamines in the gut lumen: bioavailability and biodistribution. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 2001, vol. 13, p. 1021–1025.
- [46] MURRAY, R., GRANNER, D., MAYES, P., RODWELL, V. Harperova BIOCHEMIE. 4th ed. 2002. ISBN 80-7319-013-3efsa
- [47] KOSTYUKOVSKII, Y., MELAMED, D. Carcinogenic N-nitrosamines. Formation, Properties, and Analysis. *Russian Chemical Reviews*, 1988, vol. 57, p. 625–655.
- [48] Methods [online]. 2012 [cit. 2012-03-02]. Dostupné z http://www.odec.ca/projects/2005/anna5m0/public_html/methods.htm
- [49] KERN, A., OLIVEIRA, M., COFFINO, P., HACKERT, M. Structure of mammalian ornithine decarboxylase at 1.6 Å resolution: stereochemical implications of PLP-dependent amino acid decarboxylases. *Elsevier Science*, 1999, p. 567–581.
- [50] WALLACE, M., CASLAKE, R. Polyamines and colon cancer. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 2001, vol. 13, p. 1033–1039.
- [51] Beaded DNA: Chirality [online]. 2012 [cit. 2012-03-02]. Dostupné z <http://beadorigami.blogspot.com/2012/02/beaded-dna-chirality.html>
- [52] QIAN, Z., XIA, X., LEE, S. Metabolic Engineering of Escherichia coli for the Production of Putrescine: A Four Carbon Diamine. *Biotechnol. Bioeng.*, 2009, vol. 104, no. 4, p. 651–662.
- [53] ALMRUD1, J., OLIVEIRA1, M., KERN, A. Crystal Structure of Human Ornithine Decarboxylase at 2.1 Å Resolution: Structural Insights to Antizyme Binding. *J. Mol. Biol.*, 2000, vol. 295, no. 4, p. 7–16.
- [54] JAYARAJAH, C., SKELLEY, A., FORTNER, A., MATHIES, R. Analysis of Neuroactive Amines in Fermented Beverages Using a Portable Microchip Capillary Electrophoresis System. *Anal. Chem.*, 2007, vol. 79, p. 8162–8169.
- [55] TIL., H., FALKE, H., PRINSEN, M., WILLEMS, M. Acute and Subacute Toxicity of Tyramine, Spermidine, Spermine, Putrescine and Cadaverine in Rats. *Food Chem. Toxicol.*, 1997, vol. 35, p. 337–348.

- [56] MORGAN, D. Polyamines. *Methods Mol. Biol.*, 1997, vol. 79, p. 156–183.
- [57] SETLA, N., SETLA, R. Polyamines: An Overview and Prospects in Crop Improvement. 2008, p. 376–393.
- [58] CUNIN, R., GLANSDORFF, N., PIERARD, A., STALON, V. Biosynthesis and Metabolism of Arginine in Bacteria. *Microbiol. Rev.*, 1986, vol. 50, no. 3, p. 314–352.
- [59] ŠEBELA, M., FRÉBORT, I., PEČ, P. Nové poznatky o kofaktorech Cu-aminooxidas jako příspěvek k biochemii proteinů. *Chem. Listy*, 1998, vol. 92, p. 698–710.
- [60] MARKOVÁ, M., KRÁLOVÁ, B. Pyridoxalfosfát - katalyzátor přeměny aminokyselin. *Chem. Listy*, 2004, vol. 98, p. 102–107.
- [61] NAKADA, Y., ITOH, Y. Identification of the putrescine biosynthetic genes in *Pseudomonas aeruginosa* and characterization of agmatine deiminase and N-carbamoylputrescine amidohydrolase of the arginine decarboxylase pathway. *Microbiology*, 2003, vol. 149, p. 707–714.
- [62] ALCÁZAR, R., et al. Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta*, 2010, vol. 231, p. 1237–1249.
- [63] LEONARD, E., RUNGUPHAN, W., O'CONNOR, S., PRATHER, K., et al. Opportunities in metabolic engineering to facilitate scalable alkaloid production. *Nature chemical biology*, 2009, vol. 5, p. 292–300.
- [64] FADHLAOUI-ZID, K., CURIE, J. A., LANDETA, G., FATTOUCH, S., REVERÓN, I., DE LAS RIVAS B., SADOK S. & MUNOZ, R. Biogenic amine production by bacteria isolated from ice-preserved sardine and mackerel. *Food control*, 2012, vol. 25, p. 89–95.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ADC	arginin dekarboxylasa
AK	aminokyseliny
AMP	adenosinmonofosfát
BA	biogenní aminy
bp	base pare (páry bází)
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
DFMO	α -difluormethylornithin
GC	plynová chromatografie
MTA	5'-methylthioadenosin
NK	nukleové kyseliny
ODC	ornithin dekarboxylasa
PAO	polyamin oxidasa
PCR	polymerázová řetězová reakce
SAM	S-adenosylmethionin
SAMDC	S-adenosylmethionin dekarboxylasa
SMO	spermin oxidasa
SSAT	spermidin/spermin N ¹ acetyltransferasa
TLC	tenkovrstvá chromatografie
UPLC	ultra účinná kapalinová chromatografie

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Dekarboxylace [1]	12
Obrázek 2: Nejvýznamnější biogenní aminy [12]	13
Obrázek 3: Biosyntéza tropanových alkaloidů. (ODC: ornithin dekarboxylasa, PMT: putrescin N-methyltransferasa) [63].....	16
Obrázek 4: Oxidativní deaminace [10, 59].....	19
Obrázek 5: Konformace DNA [51].....	21
Obrázek 6: Nitrosace putrescinu [47].....	22
Obrázek 7: Biosyntéza putrescinu [21]	24
Obrázek 8: Metabolismus polyaminů u savců [20].....	26
Obrázek 9: Biosyntéza polyaminů a její napojení na biosyntézu ethylenu, biosyntetické enzymy jsou ADC, ODC a SAMDC, a inhibitory DFMA, DFMO a MGBG [24]	27
Obrázek 10: biosyntéze polyaminů u <i>E. coli</i> [19].....	28
Obrázek 11: Přeměna agmatinu na putrescin [5]	28
Obrázek 12: princip PCR [48]	31
Obrázek 13: Nukleotidová sekvence.....	37
Obrázek 14: Porovnání nukleotidových sekvencí.....	37
Obrázek 15: Návrh primeru pomocí programu GeneFisher2	38
Obrázek 16: Simulace PCR pomocí programu Primer-BLAST	39
Obrázek 17: Fylogenetický strom pro gen <i>speA</i>	41
Obrázek 18: Teplotní gradient (kapitola 5.4), 6 sad primerů, <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> (1-24), <i>E. coli</i> (25-51), sada primerů: ADC1, ADC2, TDC (pozitivní kontrola), ADC3, ADC4, ADC5 a ADC6	43
Obrázek 19: Set primerů ADC5: a) annealingová teplota $T_5 = 51,7$ °C, b) annealingová teplota $T_6 = 53,6$ °C DNA: <i>Escherichia coli</i> (1), <i>Enterobacter</i> <i>aerogenes</i> (2), <i>Serratia marcescens</i> (3), <i>Salmonella enterica</i> (4), <i>Proteus</i> <i>mirabilis</i> (5), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (6) a <i>Pseudomonas fluorescens</i> (7), slepý vzorek (8).....	44
Obrázek 20: Touchdown PCR, set primerů ADC5, DNA: <i>E. coli</i> (1), <i>Enterobacter</i> <i>aerogenes</i> (2), <i>Serratia marcescens</i> (3), <i>Salmonella enterica</i> (4), <i>Proteus</i>	

	<i>mirabilis</i> (5), <i>Klebsiella oxytoca</i> (6), <i>Citrobacter freundii</i> (7), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (8), <i>Pseudomonas fluorescens</i> (9), <i>Pectobacterium carotovorum</i> (10), <i>Yersinia enterocolitica</i> (11), pozitivní kontrola (12).....	44
Obrázek 21:	Set primerů PUT1-F/PUT2-R a 3/16; DNA: <i>E. coli</i> (1), <i>Enterobacter aerogenes</i> (2), <i>Serratia marcescens</i> (3), <i>Salmonella enterica</i> (4), <i>Proteus mirabilis</i> (5), <i>Klebsiella oxytoca</i> (6), <i>Citrobacter freundii</i> (7), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (8), <i>Pseudomonas fluorescens</i> (9), <i>Pectobacterium carotovorum</i> (10), <i>Yersinia enterocolitica</i> (11), pozitivní kontrola (12).....	46
Obrázek 22:	Fylogenetický strom.....	47
Obrázek 23:	Touchdown PCR, set primerů speC1, DNA: <i>E. coli</i> (1), <i>Enterobacter aerogenes</i> (2), <i>Serratia marcescens</i> (3), <i>Salmonella enterica</i> (4), <i>Proteus mirabilis</i> (5), <i>Klebsiella oxytoca</i> (6), <i>Citrobacter freundii</i> (7), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (8), <i>Pseudomonas fluorescens</i> (9), <i>Pectobacterium carotovorum</i> (10), <i>Yersinia enterocolitica</i> (11), pozitivní kontrola (12).....	48
Obrázek 24:	Touchdown PCR, set primerů speC2, DNA: <i>Enterobacter aerogenes</i> (1), <i>E. coli</i> (2), <i>E. coli</i> (3), <i>E.coli</i> (4), <i>Klebsiella pneumoniae</i> (5), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (6), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (7), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (8), <i>Salmonella enterica</i> (9), <i>Salmonella enterica</i> (10), <i>Salmonella enterica</i> (11), <i>Yersinia enterocolitica</i> (12), <i>Yersinia ruckeri</i> (13), slepý vzorek (14).....	49

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Degenerace primerů	32
Tabulka 2: Navržené primery pro detekci genu <i>speA</i>	42
Tabulka 3: Navržené primery pro detekci genu <i>speC</i>	48

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Připravený článek před otištěním ve vědeckém časopise

Příloha 1: Připravený článek před otištěním ve vědeckém časopise

NEW TOUCHDOWN-PCR METHOD FOR DETECTION OF PUTRESCINE-
PRODUCING GRAM-NEGATIVE BACTERIA IN FOOD PRODUCTS

Leona Wunderlichová, František Buňka, Leona Buňková, Marek Koutný, Tomáš Valenta

L. Wunderlichová ^{*1)}, *L. Buňková* ²⁾, *M. Koutný* ¹⁾, *T. Valenta* ³⁾,

F. Buňka ³⁾

¹⁾ Department of Environmental Protection Engineering, Faculty of Technology,
Tomas Bata University, nam. T. G. Masaryka 5555, 76001 Zlín, Czech Republic

²⁾ Department of Fat, Tenside and Cosmetics Technology, Faculty of Technology,
Tomas Bata University, nam. T. G. Masaryka 5555, 76001 Zlín, Czech Republic

³⁾ Department of Food chemistry, Faculty of Technology, Tomas Bata University, nam.
T. G. Masaryka 5555, 76001 Zlín, Czech Republic

Corresponding author adress *: Mgr. Leona Wunderlichová, Department of
Environmental Protection Engineering, Faculty of Technology, Tomas Bata University,
nam. T. G. Masaryka 5555, 76001 Zlín, Czech Republic; e-mail: wunderlichova@ft.utb.cz;
phone number: +420 576 031 209, fax: +420 577 210 172.

Abstract

Formation of BA may occur in food due to metabolic activities of contaminating Gram-negative bacteria. Putrescine could be assumed to one of the main biogenic amines associated to microbial food spoilage. Gram negative bacteria could form putrescine by three metabolic pathways that could include eight different enzymes.

The objective of this study was to design new sets of consensual primers to detect all important enzymes involved in production of putrescine in Gram-negative bacteria. Seven new sets of consensual primers based on gene sequences of different bacteria were designed for detection of *speA*, *adiA*, *adi*, *speB*, *aguA*, *speC* and *speF* genes. The newly developed touchdown PCR method with these primers was successfully applied to several putrescine-producers. Several PCR products were sequenced and high similarity (99-91%) with known sequences confirmed high specificity of our new sets of primers. Gram negative bacteria tested were also cultivated in decarboxylation broth. All used bacteria produced both putrescine and agmatine which was evaluated using HPLC (in broth after cultivation).

Presented new touchdown PCR method could be easily used to detect potentially putrescine producing foodborne Gram negative bacteria. The new sets of primers could be useful in following researches on putrescine metabolism by contaminating microflora.

1. Introduction

Biogenic amines (BA) can be described as low-molecular one or more amino group containing compounds principally produced by decarboxylation of certain amino acids are low molecular weight organic bases (Silla Santos, 1996). BA posses number of important *in-vivo* biological activities but as a consequence can also cause a wide range of undesirable toxicological effects if consumed with food in excessive amounts (headaches, low blood pressure or hypertension, edema etc. (Silla Santos, 1996; Shalaby, 1996; ten Brink et al., 1990). Carcinogenicity of some polyamines, particularly putrescine, undoubtedly is among the most serious. In the reaction with nitrite putrescine can provide corresponding nitrosamines, which are well recognised carcinogens (Shalaby, 1996;

Halász et al., 1994; Bover-Cid et al., 1999; Kalač et al., 2005). Putrescine is also known as one of the principal indicators of meat spoilage. Moreover, putrescine can potentiate toxic effects of other biogenic amines (especially histamine and/or tyramine) (Taylor, 1986). Recently, the prevention of biogenic amine accumulation (including putrescine) in food products has become one of the main priorities of the food industry. Therefore, it appears to be extremely important to possess a method for early detection of putrescine producers as well as to have appropriate tools for the research on their accumulation, which, in future, could contribute to avoiding the accumulation of putrescine and eventually other biogenic amines in food products.

Putrescine in food could be produced by both the contaminating microflora and the starter cultures. Contaminating microorganisms from *Enterobacteriaceae* (EB) and *Pseudomonadaceae* groups are among the most frequently found producers of putrescine (Halász et al., 1994; Simon Sarkadi et al., 1994; Pons-Sanchez-Cascado et al., 2005; Lavizzari et al., 2010; Curiel et al., 2011). In contrast to other biogenic amines that are formed by direct decarboxylation of the corresponding amino acids, Gram-negative bacteria can produce putrescine via three different metabolic pathways, in which some enzymes even may have two forms - biosynthetic and biodegradative. As shown in Figure 1 and Table 1, seven different enzymes can be included in these three metabolic pathways in production of putrescine in *Pseudomonas* spp. and enterobacteria. Moreover, some of these metabolic pathways can operate simultaneously in many bacteria (Tabor et al., 1972; Cunin et al., 1986; Glansdorf, 1996). The complexity of putrescine metabolism is probably one of the main causes of the relatively small number of studies focusing on the detection and the investigation of putrescine metabolism in Gram-negative bacteria.

Many methods for detecting the presence of biogenic amines and their producers in food products have been developed recently. The most frequently used methods are various microbiological methods based on the use of differential culture media containing pH indicators; analytical methods, particularly chromatographic methods, in various modifications; and molecular biology methods involving mainly PCR methods.

Recently, several PCR based methods have been developed for the detection of putrescine producers. Majority of the oligonucleotide primers designed were for the detection of ornithine decarboxylase producing putrescine directly by decarboxylation of

ornithine in Gram-positive and also in Gram-negative bacteria (de Las Rivas et al., 2005, Marcobal et al., 2004; Marcobal et al., 2005; Constantini et al., 2006; de las Rivas et al., 2006 and 2007) and agmatine deiminase (AgDI encoded by *aguA* gene) producing putrescine from extracellular agmatine in lactic acid bacteria and *Pseudomonas* spp. (Landete et al., 2010; Nannelli et al., 2008; Cotton et al., 2010). Some of these primers were also tested in multiplex PCRs for the simultaneous detection of several decarboxylases genes (de Las Rivas et al., 2005; Coton et al., 2010) and some authors used them as well for quantitative PCR (Ladero et al., 2010; Nannelli et al., 2008). Primers detecting genes important in other metabolic pathways for the putrescine production in Gram-negative bacteria (namely the metabolic pathways via agmatine) have not been developed yet. To obtain more complete information for the diagnostic purposes and to promote further research of the described pathways we must be able detect seven different genes defined in Table 1 (*speA*, *speB*, *speC*, *speF*, *adiA*, *Ldc* and *aguA* (detection of *aguAB* operon)).

The first aim of the study was to develop seven new primer pairs, universal for the most frequent food-borne Gram-negative bacteria (enterobacteria and pseudomonads), for the detection of *speA*, *adiA*, *Ldc*, *speB*, *aguA*, *speC* and *speF* genes by aligning and comparing available corresponding sequences from GenBank. The second objective then was to test these primers in a developed PCR method on Gram-negative putrescine producing bacterial strains. Several of obtained PCR products were sequenced to confirm that amplified PCR products originated from targeting genes. Further, we aimed to compare the gene detection with the chemicals analysis of the biogenic amines production and verify whether the PCR method would be able to predict utilization of a particular pathway in a given strain.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains

The thirty two Gram-negative bacterial strains were used in this study, their origin and eventual putrescine and agmatin productions are listed in Table 2. Twenty four strains were obtained from The Czech Collection of Microorganisms (CCM) and The Collection of Animal Pathogenic Microorganisms at Veterinary research institute (CAPM); eight strains were obtained from The Collection of Microorganisms, Department of Fat, Tenside

and Cosmetics Technology, Tomas Bata University, (DCT; isolates from food – cheese, sausages and gourmet salad). Eight strains of *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Staphylococcus* and *Enterococcus* used as a negative control group were purchased from The Czech Collection of Microorganisms and DCT. All strains were incubated for 24 h at 30 ± 1 °C in decarboxylase broth (Nutrient Broth (HiMedia, Bombai, India) with 0.3 % w/v of each amino acid (lysine, histidine, tyrosine, arginin, ornithin; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

2.2. Nucleic acid extraction from bacterial cultures

Microbial DNA was extracted from bacterial biomass grown in 2 ml cultures to stationary phase using UltraClean® DNA Isolation Kit (MO-BIO Laboratories, Carlsbad, CA USA) according to the manufacturer's recommendations.

2.3. Design of PCR primers

Complete genomes of 55 Gram-negative bacteria including common food containing bacteria and enterobacteria were found in GenBank and sequences of genes investigated retrieved (Table 3). For each gene the sequences were aligned (ClustalW, ref) and universal primers for the given group of sequences were searched using GeneFisher2 (Giegerich et al.,1996). Parameter set were: GC content 30-80 %, Tm 54-70°C, product size 150-1000bp, degeneracy 4 fold, 3'length 4 bp, 3'GC content 45-100%. Designed candidate primers were then tested *in-silico* using PrimerBlast (ref) and only those which provided expected amplicons only (??) were selected for further work (Table 4).

2.4. PCR amplification

The occurrence of the genes investigated in a given strain was tested in touchdown PCR assay with the developed sets of primers (KRD, Czech Republic). The PCR mixture (total volume 15 µL) contained: 2 µmol.L⁻¹ of each primer, 200 µmol.L⁻¹ of dNTPs (TopBio, Czech Republic), 2U of *Taq* polymerase (New England Biolabs, USA), 1 µL of genomic DNA and 2.5 µL of 10xThermoPol Reaction Buffer PCR buffer (New England Biolabs). Touchdown PCR program was executed in PTC-200 DNA Engine thermocycler (MJ Research, USA) under the following conditions: Initial denaturation 94 °C for X s; 32 cycles of 94 °C for 30 s; 62 °C for 1 min (annealing temperature was decreased by one degree of Celsius every other cycle); 72 °C for 1 min; followed by 15 cycles of 94 °C for 30 s; 47 °C for 1 min; 72 °C 1 min with and final extension step of 72 °C for 5 min.

PCR products were visualized in 1.5 % (w/v) agarose gel 1 h, 90V, 0.5x TBE buffer (Fluka, Buchs, Switzerland), stained with ethidium bromide (0.5 µg/ ml; SERVA, Germany). The gel was photographed on UV transilluminator (Syngenta).

2.5. Sequence analysis

Selected PCR products were purified (PCR purification kit, QIAGEN) and sent for sequencing (Biological Centre, Academy of Sciences of the Czech Republic). Comparisons with publically available database sequences were performed using the Blast resource at the National Center for Biotechnology Information, NCBI.

2.6. Chromatographic determination of putrescine and agmatine content

All strains were incubated four times for 12 and 24 hours at $30 \pm 1^\circ\text{C}$ in decarboxylase broth. Decarboxylase broth contained Nutrient Broth (HiMedia, Bombay, India) and proper precursors of biogenic amines (amino acids: lysine, histidine, tyrosine, ornithine, arginine; Sigma–Aldrich, St. Louis, USA) at a concentration of $3.0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ (each precursor – amino acid; the five amino acids were used together). The initial pH in the decarboxylase medium was 5.7–5.9. The initial concentration of tested bacteria (in inoculum) was in range of $5.1\text{--}7.3\cdot 10^6 \text{ CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$. Each microorganisms were cultivated four times for 12 and 24 hours.

The putrescine and agmatine content was analyzed according to García-Marino et al. (2010) with a few modifications. Briefly, the broth after cultivation was centrifuged (20.000 g for 30 min.) and filtered through 0.22 µm filters. Five hundred microliters of filtrate were mixed with 800 µl of borate buffer ($0.4 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$; pH=10.0) and 100 µl of the solution of internal standard (L-norvaline, $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$). Three hundred microliters of the mixture were mixed automatically in the autosampler with 100 µl of o-phthalaldehyde reagent (the mixture of 1% of ophthalaldehyde with 3-mercaptopropionic acid in a $0.4 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ borate buffer solution; OPA reagent was obtained from Agilent Technologies, Inc., New Castle, Delaware, USA). Five microliters of derivatized samples (after reaction one minute reaction time) were automatically applied on a column (Cogent column HPS C18, 150 x 4.6 mm, 5µm, Cogent, Eatontown, USA).

The chromatographic system consists of binary pump and autosampler (LabAlliance, State College, USA); degasser, fluorescence detector (340 nm and 426 nm

as excitation and emission wavelengths, respectively) and column thermostat (Agilent Technologies). Chromatographic separation was carried out using a gradient elution of solvent (A) $0.05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ adjusted to pH 6.6/tetrahydrofurane (99:1, v/v); and solvent (B) methanol/acetonitrile (50:50, v/v). Putrescine and agmatine were eluted according to the slightly modified program described by García-Marino et al. (2010): 0–13 min, A 70 %; 13–20 min, A 50 %; 20–43 min, A 0 %; a flow rate of $0.6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Then the column was regenerated by solvent B for 6 min and stabilized for further 8 min by solvent A. Each of the four broths (for 12 hours and also 24 hours) prepared was derivatised three times ($n = 12$).

3. Results

3.1. Development of new gene specific PCR primers and corresponding touchdown PCR assay

Seven new pairs of primers (Table 4) were designed to detect capacity for putrescine production in selected Gram-negative (enterobacteria and pseudomonads). Subsequently these primers were used in PCR assay with DNAs from thirty two Gram-negative putrescine producing bacterial strains and with DNAs from eight putrescine non-producing Gram-positive to detect genes in the described putrescin production pathways.

Seven new pairs of primers (Table 4) were designed to detect capacity for putrescine production in selected Gram-negative (enterobacteria and pseudomonads). Subsequently these primers were used in PCR assay with DNAs from thirty two Gram-negative putrescine producing bacterial strains and with DNAs from eight putrescine non-producing Gram-positive to detect genes in the described putrescin production pathways.

Since melting point (T_m) of each consensual primer differs from the others there was serious problem to find suitable PCR method reliable for all primer sets (especially due to presence of non-specific amplicons). To increase specificity thus, eliminate formation of non-specific amplicons and circumvent the problems with the optimization of annealing temperatures touchdown PCR (TD-PCR) approach was adopted, since it was reported as a solution to similar problems (Don et. al., 1991). With the TD-PCR method described expected amplicons only were obtained with the set of primers (Figure 2).

To confirm that amplified products truly originated from the targeting genes, three to five amplicons for each gene were selected, purified and sequenced and the sequence identities were tested in the public sequence databank (GeneBank). High identity (99% - 91%) was found for all amplicons therefore sequence analysis confirmed the specificity of the presented primers.

In order to design a new pair of primers for the detection of *speA* gene in Gram-negative bacteria nucleotide sequences of available *speA* sequences from twenty six strains (Table 3) were aligned. After constructing the phylogenetic tree it was evident that sequences from pseudomonades formed a distinct group (data not shown), but we managed to find some conserved domains that allowed for the design of seven sets of consensual primers suitable for all above mentioned group of Gram negative bacteria. Subsequent laboratory testing with putrescine producers by TD-PCR demonstrated that primer set *adc5F/adc5R* that amplified 282 bp fragment of *speA* gene provided expected amplicons only. Recognition sites for these primers were located at position 1461 - 1479 and 1725 - 1742 with respect to the *Escherichia coli* K-12 substr. MG1655 *speA* sequence used as a reference (GenBank ID: 947432).

Three amplicons of *speA* gene acquired in TD-PCR were sequenced to confirm specificity of these primers set; results of sequence analysis are listed in the Table 5.

Some bacteria like *E. coli*, *Salmonella*, *Yersinia pestis* and *Pseudomonas* have also second form of arginine decarboxylase (Sher et al., 1954; Kieboom et al., 2006; Lee et al., 2006). By aligning available sequences no similarity was found between *adiA* genes (from *E. coli*, *Salmonella* and *Yersinia pestis*) and other arginine decarboxylases (referred as Orn/Lys/Arg decarboxylase family protein) encoded by genes designated as *ldc*, *ldcA* or *adi* from pseudomonades. Therefore we decided to design two separate sets of primers for both these groups of decarboxylases.

Ten available sequences for *adiA* gene from four *E. coli*, three *Salmonella* and four *Yersinia pestis* strains were aligned (Table 3), several conserved domains found and finally consensual sets of primers designed. Expected amplicons only were obtained with this primer pair *adiA3F/adiA3R* amplifying 548 bp fragments within *adiA* gene between

positions 818 and 1365 respective to *Escherichia coli* K-12 substr. MG1655 sequence (GenBank ID: 948638).

Three amplicons for *adiA* obtained in TD-PCR were sequenced to confirm specificity of this primer set (Table 5).

Seven available sequences of putative arginine decarboxylase from *Pseudomonas* spp. were aligned (Table 3) to construct a new pair of primers *adi5F/adi5R* amplifying 489-bp fragment of the gene. Primers *adi5F/adi5R* were located at positions 1260 – 1278 and 1733 – 1749 on the *ldcA* sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (GenBank ID: 878596).

Three amplicons of gene *adi/ldc* for putative Orn/Arg/Lys decarboxylase from different strains of *Pseudomonas* obtained with TD-PCR were sequenced and sequence analysis confirmed the specificity of this set of primers (Table 5).

Agmatinase is widely distributed among enterobacteria. The design of primers for the detection of *speB* gene was based on the alignment of known sequences from seventeen enterobacteria (Table 3). Five pairs of primers were tested but finally the expected 355-bp fragment of *speB* gene we successfully obtained with primers *agm4F/agm4R* only. Primers *agm4F/agm4R* recognition sites were located at positions 248 – 266 and 585 – 602 with respect to the corresponding *E. coli* K-12 substr. MG1655 sequence (GenBank ID: 947715).

Three amplicons of *speB* gene were sequenced and high sequence similarity with known *speB* sequences confirmed specificity of this set of primers (Table 5).

Agmatine deiminase pathway was described in *Pseudomonas* and *Yersinia*. Gene *aguA* encoding the enzyme agmatine deiminase is located in the *aguAB* operon, therefore to detect the pathway detection of *aguA* gene only is sufficient. Thirteen available sequences of *aguA* were aligned (Table 3) to design desired gene specific primers. After selection and *in-silico* optimization of possible primer pairs, only primer pair *AgDI4F/AgDI6R* was found to amplify specifically the expected 515-bp fragment of *aguA* gene. The primer recognition sequences were located at positions 43 – 58 and 487 – 501 of the *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 *aguA* gene taken as a reference sequence (GenBank ID: 879730).

Three amplicons of the internal fragment of *aguA* obtained from selected strains were sequenced and showed high similarity with database sequences (Table 5).

Biosynthetic ornithine decarboxylase is one of the most-studied enzymes participating on putrescine production. Several sets of gene specific primers were described before; nevertheless none of them was suitable for the entire group of Gram-negative bacteria (or at least for enterobacteria and pseudomonads together) as it is investigated in this study. Therefore it was necessary, for the purposes of our research, to design a new more universal set of consensual primers with a broader range of application within Gram-negative bacteria. Five new pairs of primers based on thirty one selected sequences (Table 3) were developed and tested, but primer set *odc1F/odc1R* only proved to have required specificity and amplified 470-bp long *speC* fragment from various Gram-negative bacteria. Target sites of this primer pair were located at positions 686 - 703 and 1165 – 1182 of *E. coli* str. K-12 substr. MG1655 *speC* gene sequence taken as a reference (GenBank ID: 947457).

Three PCR amplicons of the internal part of *odc* gen from selected studied strains were sequenced. The analysis of the sequences found that primer set *odc1F/odc1R* amplified mixture of *speC* and *speF* genes.

Biodegradative ornithine decarboxylase occurs in many genera of Gram-negative bacteria and in some of them it is known as an inducible form of ornithine decarboxylase. To detect *speF* gene sequence alignment of sixteen available sequences (Table 3) was performed and new pairs of primers were designed. *In-silico* testing selected primers *spef1F/spef1R* as the only candidate producing the expected amplicon. Sites for these primers were located on the *E. coli* K-12 substr. MG1655 sequence taken as a reference (GenBank ID: 945297) at positions 725 – 742 and 1178 – 1195 and should allow for amplification of the 472-bp *speF* gene internal fragment. Five PCR products from selected strains were sequenced and high similarity with known sequences of *speF* gene was found for all amplicons (Table 5).

As it can be seen in Table 2 developed TD-PCR method produced only expected products with all new seven pairs of primers in the presence of respective DNA template from putrescine producing strains while no amplicons were obtained with DNAs from

strains unable to produce putrescine (eight putrescine negative strains were tested with negative results). Results from TD-PCR are summarized in Table 2.

3.2. Production of putrescine and agmatine

Above described results from PCR were compared with results of real putrescine production obtained in cultivation experiments with UPLC. As it can be seen in Table 2, all strains investigated were active putrescine producers with the production peak after about 24 hour of cultivation. Strain *E. coli* CAPM 6101 was identified to be an outstanding putrescine producer with 930 mg of putrescine per liter of media. Agmatin production was detected in all thirty two bacterial strains. Production of agmatine was considerably lower than the production of putrescine. Nevertheless all strains were able to produce even more than 1 mg.L⁻¹ of agmatine after 12 hours of cultivation. Most active producers were *Proteus mirabilis* CCM 7188 and *Enterobacter aerogenes* CCM 2531 that formed more than 10 mg.L⁻¹ of agmatine. In all strains concentrations of agmatine decreased by about 53 % (from 21 to 81%) after 24 hours with respect the concentration after 12 hours of cultivation(P<0.01).

4. Discussion

The main objective of this study was to develop a new PCR method allowing us to detect all synthetic pathways leading to the production of putrescine in regular food borne Gram-negative bacteria. In this study seven new consensual pairs of primers were designed to detect target genes involved in the production of putrescine: *speA*, *speB*, *speC*, *speF*, *adiA*, *Ldc*, and *aguA*. The specificities of our new sets of primers were evaluated *in-silico* and with available model strains in the developed touchdown PCR method. For each set of primers three to five PCR products were sequenced to confirm their identity and the accuracy of the method. Production of putrescine and agmatine in cultures was determined by HPLC and correlated with PCR results.

Useful molecular biology tools are a prerequisite for the investigation of metabolic pathways connected to putrescine formation. We attempt to improve and complete previously developed molecular biology methods and *de-novo* designed new sets of primers to detect all important pathways and included enzymes in putrescine metabolism. Described primer pairs include new consensual primer pair that allows detection of *speA* gene encoding biosynthetic arginine decarboxylase in all above mentioned groups of

Gram-negative bacteria, *adiA* encoding biodegradative arginine decarboxylase (inducible) in *E. coli* and *Salmonella*, *Ldc/adi* encoding putative arginine decarboxylase in *Pseudomonas*, *speB* encoding agmatinase in enterobacteria, *aguA* encoding agmatin deiminase in *Pseudomonas* and *Yersinia*, *speC* encoding biosynthetic ornithine decarboxylase in both enterobacteria and pseudomonads, and *speF* encoding inducible ornithine decarboxylase in enterobacteria and pseudomonads.

All primers were successfully tested in TD-PCR method with 32 Gram-negative putrescine producers and PCR results were always in agreement with metabolic pathways available in public databases. Amplicons from *speA* and *speC* genes were obtained with DNAs from all tested putrescine producing strains indicating that in all these strains both ornithine and arginine decarboxylases were present, as expected. Developed PCR detection method for other targeted genes was always exactly in agreement with metabolic pathway databases for a given microorganism. Agmatine deiminase pathway was demonstrated in all tested strains of *Pseudomonas* and *Yersinia* and in *Pectobacterium carotovorum* CCM 1008. All other strains giving the positive result of the PCR assay with *agm4F/agm4R* primers proved to utilize the agmatinase pathway. None of the strains revealed the simultaneous presence of *speB* and *aguA*. All of *E. coli* and *Salmonella* strains tested were *adiA* positive and all *Pseudomonas* strains gave the positive reaction with *adi5F/adi5R* primer pair specific to the second type of arginine decarboxylase (Orn/Lys/Arg decarboxylase family protein). Also all enterobacteria except of *Klebsiella* and *Citrobacter* strains were *speF* positive as tested with *speF1F/speF1R* primers.

TD-PCR results with microorganisms from various collections of microorganisms as well as with bacterial strains isolated from food showed that newly developed primers reliably allowed detecting the presence of targeted genes related to putrescine synthesis in all important Gram-negative producers of putrescine in food products.

For each set of primers (except of *odc1F/odc1R*) three to five amplified PCR products were sequenced and high sequence similarity (mostly 99%) with the corresponding gene sequence obtained from GenBank confirmed the specificity of our newly developed primers. Unfortunately, primer pair *odc1F/odc1R* amplified mixture of *speC* and *speF* genes, nevertheless such problems were expected considering the high similarity between these two genes and because previously published primers had the same

problem (Fadhlaoui-Zid et al., 2012). However, the occurrence of *speF* gene can be specifically detected by hereto revealed primer pair *speF1F/speF1R*, thus the presence of *speF* and *speC* genes could be differentiated.

From all bacterial strains tested in our study *E. coli* CAPM 6101 was able to produce the highest concentration of putrescine (930.03 mg.L⁻¹) followed by *Salmonella enterica* CCM 4420 and *Enterobacter aerogenes* CAPM 5634. Previously, *Enterobacter aerogenes* was described as a potent putrescine producer in fermented sausages (Shiling Lu et al., 2010) and *Klebsiella oxytoca* was described as the most active putrescine producer in Herrings (Ozogul et al., 2005). Nine of tested strains were able produce more than 200 mg.L⁻¹ of putrescine. Concentrations of putrescine was in average seven times higher (from 1.2 to 48 times) after 24 hours of cultivation than after 12 hours of cultivation in all strains. This observation confirms the theory that the production of putrescine is usually increasing with the time of storage.

Many authors detected also agmatine in relation with Gram-negative bacteria presence in food products (Curiell et al., 2011; Saccani et al., 2005; Buňková et al., 2010; Pons Sanchez et al., 2005b; Özogul et al., 2005). In the presented study the agmatine production was detected with all tested bacterial strains. The detection of agmatine confirms the existence and the active utilization of the arginine decarboxylase pathway. Other important reason why it may be to important to detect agmatine in food appears to be the fact that some microorganisms are able to use extracellular agmatine to form putrescine (Smit et al., 2008). All tested strains were able to produced putrescine and all of them were also producers of agmatine. The occurrence of agmatine and a significant decrease in agmatin concentrations between 12 and 24 hours of cultivation confirm that agmatine is a metabolic intermediate and that all tested strains actively used the metabolic pathways via agmatine to produce putrescine.

The results of the study presented confirmed that many common Gram-negative contaminants of food are potent producers of putrescine and can actively use more than one metabolic pathway of putrescine production. The new PCR assays designed here are able to easily detect all important genes participating on putrescine production in Gram-negative bacteria especially those frequently found in food. Presented seven new primer

pairs allows to detect Gram-negative putrescine producers and could be used in the food industry to evaluate the potential of food microorganisms for the putrescine production.

References

- Arena, M. E., & Manca de Nadra, M. C. (2001). Biogenic amine production by *Lactobacillus*. *Journal of Applied Microbiology*, *90*, 158-162.
- Bover-Cid, S. & Holzappel, W.H. (1999). Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Mikrobiology*, *53*, 33-41.
- Constantini, A., Cersomino, M., Del Prete, V., & Garcia-Moruno, E. (2006). Production of biogenic amines by lactic acid bacteria: Screening by PCR, thin-layer chromatography, and high-performance liquid chromatography of strains isolated from wine and must. *Journal of Food Protection*, *69*, 391-396.
- Coton, M., Romano, A., & Spano, G. (2010). Occurrence of biogenic amine-forming lactic acid bacteria in wine and cider. *Food Microbiology*, *27*, 1078-1085.
- Cunin, R., Glansdorff, N., Pierard, A., & Stalon, V. (1986): Biosynthesis and Metabolism of Arginine in Bacteria, *Microbiological Reviews*, *50*, 314-352.
- Curiel, J. A., Ruiz-Capillas, C., de las Rival, B., Carrascosa, A. V., Jiménez-Colmenero, & F., Muñoz, R. (2011). Production of biogenic amines by lactic acid bacteria and enterobacteria isolated from fresh pork sausages packaged in different atmospheres and kept under refrigeration. *Meat science*, *88*, 368-373.
- De Las Rivas B., Marcobal A., & Muñoz R. (2005). Improved multiplex-PCR method for the simultaneous detection of food bacteria producing biogenic amines, *FEMS Microbiology Letters*, *244*, 367-372.
- De las Rivas, B., Marcobal, Á., Carrascosa, A. V., & Muñoz, R. (2006). PCR detection of foodborne bacteria producing the biogenic amines histamine, tyramine, putrescine and cadaverine. *Journal of Food Protection*, *69*, 2509-2514.

De las Rival, B., Marcobal, A., & Muñoz, R. (2007). Gene organization of the ornithine decarboxylase-encoding region in *Morganella morganii*. *Journal of Applied Mikrobiology*, *102*, 1551-1560.

Don, R.H., Cox, P.T., Wainwright, B.J., Baker, K., & Mattick, J.S. (1991). Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Research*, *19*, 4008-4008.

Fadhlaoui-Zid, K., Curie, J. A., Landeta, G., Fattouch, S., Reverón, I., de las Rivas B., Sadok, S. & Muñoz, R. (2012). Biogenic amine production by bacteria isolated from ice-preserved sardine and mackerel. *Food control*, *25*, 89-95.

García-Marino, M., Trigueros, A., Escribano-Bailón, T. (2010). Influence of oenological practices on the formation of biogenic amines in quality red wines. *Journal of Food Composition and Analysis*, *23*, 455–462.

Giegerich, R., Meyer, F., & Schleiermacher, Ch. (1996). GeneFisher - software support for the detection of postulated genes. *Proceedings International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biolog.*, *4*, 68-77.

Glansdorf, N. (1996). Biosynthesis of arginine and polyamines. In F. C. Neidhardt, R. Curtis III., J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology* (pp. 408-433). Washington, D.C.: ASM Press.

Halász, A., Baráth, Á., Simon-Sarkadi, L. & Holzapfel, W. (1994). Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science & Technol*, *5*, 42-49.

Kalač P., Křížek M., Pelikánová T., Langová M., & Veškrna O. (2005). Contents of polyamines in selected foods. *Food Chemistry*, *90*, 561-564.

Kieboom, J., & Abee, T. (2006). Arginine-dependent acid resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, *194*, 5650-5653.

Ladero, V., Martinez, N., & Martin, M.C. (2010). qPCR for quantitative detection of tyramine-producing bacteria in dairy products. *Food Research International*, *43*, 289-295.

Landete, J. M., Arena, M. E., Pardo, I., Manca de Nadra, M. C., & Ferrer, S. (2010). The role of two families of bacterial enzymes in putrescine synthesis from agmatine via agmatine deiminase. *International Mikrobiology*, 13, 169-177.

Lavizzari, T., Breccia, M., Bover-Cid, S., Vidal-Carou, M. C., & Veciana-Nogués, M. T. (2010). Histamine, cadaverine, and putrescine produced in vitro by enterobacteriaceae and pseudomonadaceae isolated from spinach. *Journal of Food Protection*, 73, 385-389.

Lee, D.G., Urbach, J.M., Wu, G., Liberaci, N.T., Feinbaum, R.L., Miyata, S., Diggins, L.T., He J., Saucier, M., Deziel, E., Friedman, L., Li, L., Grills, G., Montgomery, K., Kucherlapati, R., Rahme L.G., & Ausubel, F.M. (2006). Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome Biology*, 7, R90.1-R90.14.

Lucas, P. M., Blancato, V. S., Claisse, O., Magni, C., Lolkema, J.S., & Lonvaud-Funel, A. (2007). Agmatine deiminase pathway genes in *Lactobacillus brevis* are linked to the tyrosine decarboxylation operon in a putative acid resistance locus. *Microbiology*, 153, 2221–2230.

Marcobal, A., de las Rivas, B., Moreno-Arribas, M. V. & Muñoz, R.(2004). Identification of

The ornithine decarboxylase gene in the putrescine - producer *Oenococcus oeni* BIFI-83. *FEMS Microbiological Letter*, 239, 213–220.

Marcobal, Á., de Las Rivas, B., Moreno-Arribas, M.V. & Muñoz, R. (2005). Multiplex PCR method for the simultaneous detection of histamine-, tyramine-, and putrescine producing lactic acid bacteria in foods. *Journal of Food Protection*, 68, 874-878.

Nannelli, F., Claisse, O., & Gindreau, E. (2008). Determination of lactic acid bacteria producing biogenic amines in wine by quantitative PCR methods. *Letters in Applied Microbiology*, 47, 594-599.

Pons-Sánchez-Cascado, S., Bover-Cid, S., Veciana-Nogués, M. T., & Vidal-Carou, M. C. (2005). Aminoacid-decarboxylase activity of bacteria isolated from ice-Preserved anchovies. *European Food Research and Technology*, 220, 312–315.

Rokka, M., Eerola, S., Smolander, M., Zlakomí H. L., & Ahvenainen, R. (2004). Monitoring of the quality of modified atmosphere packaged broiler chicken cuts stored in different temperature conditions B. Biogenic amines as quality indicating metabolites. *Food Control*, 15, 601–60

Saccani, E., Tanzi, P., Pastore, S., Cavalli M., & Ray (2005). Determination of biogenic amines in fresh and processed meat by suppressed ion chromatography–mass spectrometry using a cation exchange column. *Journal of Chromatography A*, 1082, 43–50.

Shalaby, A.R., (1996). Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*, 29, 675-690.

Sher, I.H., & Mallette, M.F. (1954). Purification and study of L-arginine decarboxylase from *Escherichia coli* B. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 53, 370-380.

Silla Santos, M.H., (1996). Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 29, 213-231.

Simon Sarkadi, L., Holzapfel, W. H., & Halász, A. (1994). Biogenic amine content and microbial contamination of leafy vegetables during storage at 5°C. *Journal of Food Biochemistry*, 17(6), 407-418.

Tabor, H., & Tabor, C. W. (1972). Biosynthesis and metabolism of 1,4-diaminobutane, spermidine, spermine, and related amines. IIE2a Speridine dehydrogenase. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 36, 225–226.

Taylor, S. L. (1986). Histamine food poisoning: Toxicology and Clinical aspects. *Critical Review of Toxicology* 17, 91–117.

Ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H. M. L. J., & Huis in 't Veld, J. H. J., (1990). Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 11, 73-84.