

Mgr. Leona Wunderlichová

**Vývoj nových molekulárně biologických metod detekce
putrescin produkujících bakterií**

**Development of new molecular biological methods for the detection
of putrescine producing bacteria**

Dizertační práce

Program: P2808 Chemie a technologie materiálů
Obor: 2808V009 Chemie a technologie materiálů
Školitel: doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
Konzultant: doc. RNDr. Leona Buňková Ph.D.
doc. Mgr. Marek Koutný Ph.D.

Zlín, 4/2014

© Leona Wunderlichová

Vydala **Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně** v edici **Doctoral Thesis Summary**.
Publikace byla vydána v roce 2014

Klíčová slova: *PCR, primer, biogenní aminy, putrescin, touch-down PCR*

Key words: *PCR, primer, biogenic amines, putrescine, touch-down PCR*

Plná verze dizertační práce je dostupná v Knihovně UTB ve Zlíně.

Motto:

Neselhal jsem 10 000 krát, našel jsem 10 000 způsobů, které nefungují.

(Thomas Alva Edison)

Poděkování:

Touto cestou bych ráda poděkovala svému školiteli doc. Ing. Františku Buňkovi, Ph.D. a konzultantům doc. Mgr. Marku Koutnému, Ph.D. a doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky. Mé díky patří i všem mým ex-kolegům z UIOŽP za velkou podporu v průběhu studia, zejména doc. RNDr. Janu Růžičkovi, Ph.D., za umožnění studia při zaměstnání. Velký dík patří celé mé rodině, která mě podporovala v nelehkých chvílích. Děkuji za trpělivost svému muži a svým dětem, kteří to se mnou v průběhu studia neměli vždy lehké.

ABSTRAKT

Předložená dizertační práce se zabývá vývojem nových molekulárně biologických metod detekce putrescin produkujejících technologicky relevantních mikroorganismů. Zabývá se možnostmi detekce mikrobiálních producentů putrescinu metodami molekulární biologie, zejména pak vývojem polymerázové řetězové reakce (PCR) určené k detekci těchto producentů.

Putrescin může být u bakterií tvořen několika metabolickými drahami, v nichž je zahrnuta řada enzymů. Prozatím nebyla publikována žádná metoda pro detekci všech metabolických drah produkce putrescinu amplifikací odpovídajících genů pomocí PCR.

V dizertační práci je popsán postup vytvoření takovéto molekulárně biologické metody - tedy metoda umožňující detekci klíčových genů zahrnutých v bakteriální produkci putrescinu.

Byla vytvořena spolehlivá PCR metoda pro detekci a výzkum metabolismu putrescinu u gramnegativních i grampozitivních bakterií. Výsledkem je vytvoření sedmi nových sad PCR primerů, které jsou určeny k detekci cílových genů. Tyto primery byly úspěšně testovány s 32 kmeny gramnegativních producentů putrescinu. Pro potřeby detekce a výzkumu metabolismu putrescinu u grampozitivních kmenů, byla úspěšně testována a aplikována sada primerů publikovaná v předchozích výzkumech. Byla vytvořena a optimalizována PCR metoda s použitím těchto primerů.

Jak sekvenační analýza, tak i výsledky HPLC potvrdily specifčnost navržené metody a nově navržených primerů. Nové primery byly navíc také úspěšně testovány pro použití v jiných variantách PCR, jako je například multiplex PCR nebo PCR s předchozí reverzní transkripcí.

ABSTRACT

This doctoral thesis deals with the development of new molecular biological methods for the detection of putrescine producing technologically relevant microorganisms. It deals with the possibility of detection of microbial producers of putrescine by methods of molecular biology, in particular the development of new methods of polymerase chain reaction (PCR) for the detection of these producers.

Putrescine can be formed by microbial metabolism via several metabolic pathways in which a number of enzymes is included. There have been presented no method for the detection of metabolic pathways of production putrescine by amplification of the corresponding genes using PCR yet.

The dissertation describes development of such a molecular biological method – i.e. method that allows the detection of key genes involved in bacterial production of putrescine. It was created a reliable PCR method for the detection and investigation of putrescine metabolism in gram-negative and gram positive-bacteria. The result is the creation of seven new sets of PCR primers which are designed to detect target genes .The result of this work is the creation of seven new sets of PCR primers which are designed to detect target genes. These primers have been successfully tested in PCR with 32 strains of gram-negative producers of putrescine. For the purpose of detection and research in putrescine metabolism in gram-positive strains were successfully tested sets of primers published in previous research. It was optimized PCR method in applying those primers.

Sequence analysis as well as the HPLC results confirmed the specificity of the proposed methods and newly designed primers. New primers were also successfully tested for the use in other variations of PCR, such as multiplex PCR or PCR prior to reverse transcription.

OBSAH

1.	SEZNAM ILUSTRACÍ.....	7
2.	SEZNAM TABULEK.....	9
3.	SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK.....	10
4.	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY.....	11
4.1.	Základní charakteristika putrescinu.....	13
4.2.	Putrescin a jeho působení v lidském organismu.....	14
4.3.	Ovlivňování kvality potravin.....	17
4.4.	Bakteriální produkce putrescinu v potravinách.....	18
4.5.	Bakteriální metabolismus putrescinu.....	18
4.5.1.	Metabolismus putrescinu a jeho produkce v potravinách u gramnegativních bakterií	19
4.5.2.	Metabolismus putrescinu a jeho produkce v potravinách u grampozitivních bakterií.....	22
4.6.	Odbourávání putrescinu – detoxifikace.....	26
4.7.	Faktory ovlivňující výskyt putrescinu v potravinách.....	27
4.8.	Metody stanovení putrescinu a agmatinu.....	30
5.	CÍL PRÁCE.....	34
6.	ZVOLENÉ METODY ZPRACOVÁNÍ.....	35
6.1.	Bakteriální kmeny.....	36
6.2.	Izolace bakteriální DNA.....	37
6.3.	Návrh primeru.....	37
6.4.	Touch-down PCR.....	43
6.5.	Sekvenace PCR produktů.....	43
6.6.	Chromatografické stanovení obsahu putrescinu a agmatinu.....	43
7.	HLAVNÍ VÝSLEDKY PRÁCE.....	45
7.1.	Výsledky I. Fáze.....	45
7.1.1.	Návrh a testování sad primerů vhodných k detekci genu <i>speA</i>	45
7.1.2.	Návrh a testování sad primerů vhodných k detekci genu <i>adiA</i>	55
7.1.3.	Návrh a testování sad primerů vhodných k detekci genu kódujícího předpokládanou arginin dekarboxylázu u <i>Pseudomonas sp.</i>	61
7.1.4.	Návrh a testování sad primerů vhodných k detekci genu <i>speB</i>	64
7.1.5.	Návrh a testování sad primerů vhodných k detekci genu <i>aguA</i>	67
7.1.6.	Návrh a testování sad primerů vhodných k detekci genu <i>speC</i>	71
7.1.7.	Návrh a testování sad primerů pro detekci genu <i>speF</i>	76
7.1.8.	Multiplex PCR a PCR s předchozí reverzní transkripcí s novými sadami primerů	79
7.1.9.	Sekvenační analýza.....	82
7.1.10.	Produkce putrescinu a agmatinu.....	88
7.2.	Výsledky II. Fáze.....	89
7.2.1.	Testování primerů určených pro detekci genu <i>aguA</i> a <i>odc</i>	89
7.3.	Diskuze.....	92
8.	PŘÍNOS PRÁCE PRO VĚDU A PRAXI.....	95
9.	ZÁVĚR.....	97
10.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	98
11.	SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA.....	117
12.	PŘÍLOHY.....	119
13.	CURRICULUM VITAE.....	123

1. SEZNAM ILUSTRACÍ

Obr. 4.1	Nitrosace putrescinu za vzniku N-nitrosopyrrolidinu	16
Obr. 4.2	Schéma metabolismu putrescinu u gramnegativních bakterií.....	21
Obr. 4.3	Katabolismus agmatinu a ornitinu u bakterií mléčného kvašení.....	24
Obr. 4.4	Oxidativní deaminace aminů.....	27
Obr. 6.1	Popis experimentu.....	36
Obr. 6.2	Ukázka zadávání vstupních parametrů programu GeneFisher používaného pro návrh primerů.....	40
Obr. 6.3	Ukázka výstupu programu GeneFisher2.....	41
Obr. 6.4	Ukázka použití nástroje PrimerBlast.....	41
Obr. 6.5	Výstup programu PrimerBlast.....	42
Obr. 7.1	Ukázka porovnání sekvencí genů <i>speA</i> , <i>adiA</i> a <i>adi</i> kódujících různé formy arginin dekarboxylázy.....	46
Obr. 7.2	Fylogenetický strom – porovnání nukleotidových sekvencí genů <i>speA</i> , <i>adiA</i> a <i>adi</i> z různých gramnegativních bakterií.....	47
Obr. 7.3	Porovnání sekvencí genu.....	50
Obr. 7.4.	Porovnání sekvencí genu.....	51
Obr. 7.5	PCR mikrobiálních DNA s primery pro detekci genu <i>Agua</i>	53
Obr. 7.6	Optimalizace PCR se sadou primerů <i>adc5F/adc5R</i>	54
Obr. 7.7	Touch-down PCR se setem primerů <i>adc5F/adc5R</i>	54
Obr. 7.8	Touch-down PCR se sadou primerů <i>adc5F/adc5R</i>	55
Obr. 7.9	Porovnání sekvencí genu <i>adiA</i> u 10 gramnegativních bakterií.....	58
Obr. 7.10	Touch-down PCR se sadami primerů <i>adiA1F/adiA1R</i> (vlevo) a <i>adiA2F/adiA2R</i> (vpravo).....	60
Obr. 7.11	Touch-down PCR se sadou primerů <i>adiA3F/adiA3R</i>	60
Obr. 7.12	Porovnání sekvencí genu pro pravděpodobnou arginin dekarboxylázu u sedmi bakterií rodu <i>Pseudomonas</i>	62
Obr. 7.13	Touch-down PCR se sadou primerů <i>adi5F/adi5R</i>	63
Obr. 7.14	Touch-down PCR se sadami primerů <i>adc5F/adc5R</i> (dráhy 2 – 8) a <i>adi5F/adi5R</i> (dráhy 9 – 13).....	64
Obr. 7.15	Porovnání sekvencí genů <i>speB</i> u 17 enterobakterií.....	65
Obr. 7.16	Touch-down PCR s primery <i>agm1F/agm1R</i> , <i>agm2F/agm2R</i> a <i>gm3F/agm3R</i>	66
Obr. 7.17	Touch-down PCR se sadou primerů <i>agm4F/agm4R</i>	67
Obr. 7.18	Porovnání sekvencí genů <i>agua</i> u 13 bakteriálních kmenů.....	69
Obr. 7.19	Touch-down PCR se sadami primerů určených k detekci	

genu <i>Agua</i>	70
Obr. 7.20 Touch-down PCR se sadou primerů AgDI4F/AgDI6R.....	70
Obr. 7.21 Touch-down PCR se sadou primerů AgDI4F/AgDI6R.....	71
Obr. 7.22 Touch-down PCR se sadami primerů PUT1-F/PUT2-R (horní polovina) a 3/16 (spodní polovina).....	73
Obr. 7.23 Porovnání sekvencí genů <i>speC</i> u 31 bakteriálních kmenů.....	74
Obr. 7.24 Touch-down PCR se sadou primerů odc2F/odc2R.....	75
Obr. 7.25 Touch-down PCR se sadou primerů odc1F/odc1R.....	76
Obr. 7.26 Porovnání sekvencí genů <i>speF</i> u 16 bakteriálních kmenů.....	77
Obr. 7.27 Touch-down PCR se sadou set primerů speF2F/speF2R.....	78
Obr. 7.28 Touch-down PCR se sadou primerů speF1F/speF.....	79
Obr. 7.29 Multiplex PCR s kombinací více sad primerů určených pro detekci genů <i>speF</i> , <i>speA</i> a <i>speB</i> u gramnegativních bakterií...81	
Obr. 7.30 Multiplex PCR s kombinací tří sad primerů; detekce genů <i>speC</i> , <i>speF</i> , <i>speA</i> a <i>speB</i> u gramnegativních bakterií.....	82
Obr. 7.31 Výsledek sekvenace produktu touch-down PCR získaného se sadou primerů adi5F/adi5R u <i>Salmonella enterica</i> CAPM 5967.....	85
Obr. 7.32 Výsledek sekvenace produktu touch-down PCR získaného se sadou primerů adi5F/adi5R u <i>Salmonella enterica</i> CAPM 5967. Ukázka vyhodnocení kvality sekvence programem Sequence Scanner.....	85
Obr. 7.33 Výsledek sekvenace produktu touch-down PCR získaného se sadou primerů adi5F/adi5R u <i>Salmonella enterica</i> CAPM 5967.....	86
Obr. 7.34 Touch-down PCR se sadami primerů pro detekci genů <i>agua</i> u grampozitivních bakterií.....	90

2. SEZNAM TABULEK

Tab. 4.1	Strukturní vzorce, systematické a triviální názvy nejdůležitějších biogenních aminů vyskytující se v potravinách.....	12
Tab. 4.2	Přehled klíčových enzymů metabolismu putrescinu, jejich genů a skupin mikroorganismů.....	22
Tab. 4.3	Přehled publikovaných sad primerů, cílové geny a skupiny mikroorganismů.....	33
Tab. 6.1	Seznam mikroorganismů.....	38
Tab. 6.2	Označení degenerací a jejich význam.....	40
Tab. 7.1	Seznam primerů navržených pro detekci genu <i>speA</i>	49
Tab. 7.2	Bakteriální kmeny použité v dizertační práci, výsledky HPLC a TD-PCR s použitím nových primerů.....	56
Tab. 7.3	Seznam primerů navržených pro detekci genu <i>adiA</i>	59
Tab. 7.4	Seznam primerů navržených pro detekci genu <i>adi/ldc</i>	61
Tab. 7.5	Seznam primerů navržených pro detekci genu <i>speB</i>	65
Tab. 7.6	Primery navržené pro detekci genu <i>aguA</i>	68
Tab. 7.7	Seznam primerů navržených pro detekci genu <i>speC</i>	72
Tab. 7.8	Seznam primerů navržených pro detekci genu <i>speF</i>	78
Tab. 7.9	Výsledky sekvenace PCR produktů.....	83
Tab. 7.10	Seznam primerů použitých pro detekci genů <i>aguA</i> a <i>speF</i>	89

3. SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

BA	- biogenní aminy
LAB	- bakterie mléčného kvašení
PCR	- polymerázová řetězová reakce
TD-PCR	- touch-down PCR
IARC	- International Agency for Research on Cancer
ODC	- ornitin dekarboxyláza
BAI	- biogenic amines index
LAB	- lactic acid bacteria (bakterie mléčného kvašení)
ADC	- arginin dekarboxyláza
AgDI	- agmatin deimináza
MLF	- malolaktická fermentace
HPLC	- vysokoučinná kapalinová chromatografie
TLC	- tenkovrstvá chromatografie
CE	- kapilární elektroforéza
CZE	- kapilární zónová elektroforéza

4. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

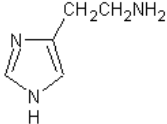
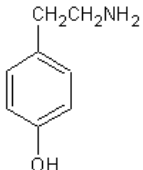
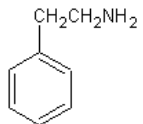
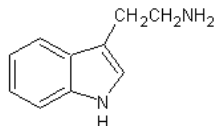
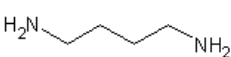
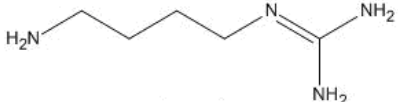

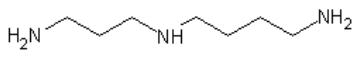
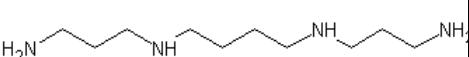
Biogenní aminy (BA) jsou nejčastěji definovány jako nízkomolekulární organické dusíkaté látky bazické povahy vznikající zejména dekarboxylací příslušné aminokyseliny (Silla Santos, 1996). BA mohou mít alifatickou (putrescin, kadaverin, spermin a spermidin), aromatickou (tyramin, 2-fenyletylamin) nebo heterocyklickou (histamin, tryptamin) strukturu (Lorenzo et al., 2007). Někteří autoři klasifikují kadaverin, putrescin, agmatin, spermin a spermidin jako polyaminy (tj. molekuly obsahující dvě a více aminoskupin v molekule) (Kalač a Křížek, 1997), případně pak putrescin a kadaverin mohou být považovány za diaminy a agmatin, spermidin a spermin za polyaminy (Smith, 1981). Z toho plyne, že v klasifikaci polyaminů je prozatím nejednotnost mezi různými autory. Jednoznačně lze mezi polyaminy zařadit spermin a spermidin. Pro potřeby této práce bude putrescin považován za alifatický BA. Přehled nejvýznamnějších BA s uvedením jejich strukturních vzorců, systematických i triviálních názvů je uveden v tabulce č. 4.1.

BA vznikají zejména dekarboxylací volných aminokyselin, tyto reakce jsou katalyzovány příslušnými substrátově specifickými dekarboxylázami. Při dekarboxylaci aminokyseliny dochází k odstranění alfa-karboxylové skupiny za vzniku odpovídajícího aminu (Smith, 1981; Halász, 1994). BA mohou vznikat také aminací či transaminací aldehydů a ketonů (Křížek a Kalač, 1998). BA vznikají přirozeně v běžném metabolismu mikroorganismů, rostlin i živočichů a jsou tedy přirozenou součástí rostlinné a živočišné stravy (endogenní původ). Nicméně za jejich výskyt a kumulaci v potravinách je zodpovědná hlavně dekarboxylázová aktivita v potravinách přítomných mikroorganismů (Smith, 1981; Ten Brink et al., 1990).

BA jsou přítomny v široké škále potravinářských produktů – maso a masné výrobky, ryby a rybí produkty, fermentovaná zelenina, fermentované nápoje, ořechy atd. (Silla Santos, 1996). Některé BA mají u člověka a živočichů důležité fyziologické funkce, například regulace tělesné teploty, zvýšení nebo snížení krevního tlaku, řízení obsahu a pH obsahu žaludku a aktivita mozku (Ten Brink et al., 1990). Na druhou stranu příjem potravy s vyšším obsahem BA může způsobit řadu závažných toxikologických problémů (Ten Brink et al., 1990; Shalaby, 1996) (viz kapitola č. 4.2, str. 14). Pro odbourávání BA u člověka hrají hlavní roli monoamin a diamin oxidázy (Halász, 1994).

Výskyt BA v potravinách je spojen s dekarboxylázovou aktivitou určitých typů bakterií (Ten Brink et al., 1990; Kalač et al., 2005a). Schopnost tvorby BA byla popsána pro několik skupin mikroorganismů zejména *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* sp. některé bakterie mléčného kvašení (LAB) (Rice a Koehler 1976; Halász, 1994; Choudhury et al., 1990; Geomaras et al., 1995). Mikroorganismy s dekarboxylázovou aktivitou mohou být kontaminující (Ten Brink et al., 1990) nebo startérové kultury (Fernandez-García et al., 2000).

Tabulka 4.1 Strukturní vzorce, systematické a triviální názvy nejdůležitějších biogenních aminů vyskytujících se v potravinách

Strukturní vzorec	Triviální název – zkratka	Název systematický
	Histamin – HIM	2-(1H-imidazol-5-yl)etanamin
	Tyramin – TYM	4-(2-aminoethyl) fenol
	Fenyletylam in – PEA	2-fenyletanamin
	Tryptamin – TPM	2-(1H-indol-3-yl)etanamin
	Putrescin – PUT	butan-1,4-diamin alifatické,
	Agmatin – AGM	1-(4-aminobutyl)guanidine
	Kadaverin – CAD	pentan-1,5-diamin alifatické,
	Spermidin – SPD	N-(3-aminopropyl)butan-1,4-diamin
	Spermin – SPN	N,N'-bis(3-aminopropyl)butan-1,4-diamin

Mezi faktory ovlivňující tvorbu BA v potravinách lze zařadit dostupnost volných aminokyselin, přítomnost mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou, vhodné podmínky pro jejich růst a produkci enzymů. Mezi důležité podmínky patří pH, obsah solí, obsah sacharidů (zdroj uhlíku), dostupnost zdrojů dusíku, teplota, doba skladování potravin (Silla Santos, 1996; Shalaby, 1996). Na základě mnoha výzkumů bylo dokázáno, že tyto podmínky silně ovlivňují produkci BA (Halász et al., 1994).

4.1. Základní charakteristika putrescinu

Putrescin, systematický název butan-1,4-diamin, je nízkomolekulární dusíkatá báze. Jde o alifatický diamin náležící ke skupině biogenních aminů (BA). Právě přítomnost dvou bazických aminoskupin, které za fyziologického pH 7,4 nesou kladný náboj, jej předurčuje k široké škále fyziologických funkcí v různých typech buněk (viz kapitola č. 4.2, str. 14). Podle některých autorů se spolu s kadaverinem, sperminem a spermidinem řadí také mezi polyaminy (tj. molekuly obsahující dvě a více aminoskupin v molekule) (Smith, 1981; Bardocz et. al, 1995). Polyaminy se vyskytují ve všech typech buněk a jejich přítomnost v různých potravinách je tak částečně dána jejich endogenním původem.

U člověka se běžně setkáváme se třemi zdroji putrescinu; prvním zdrojem je endogenní biosyntéza vlastními buňkami, druhým jsou potraviny (alimentární příjem) a poslední možností je produkce putrescinu bakteriemi střevní mikroflóry. Největší množství putrescinu přijímá člověk právě z potravy (Bardocz et. al, 1995). Není-li žádný ze tří uvedených zdrojů nadměrný, je putrescin využit pro jeho fyziologické role a nadbytek je odbouráván běžným metabolismem (viz kapitola č. 4.6, str. 26). Při zvýšeném příjmu potravou se však mohou projevit závažné toxikologické důsledky přítomnosti tohoto aminu.

V literatuře bývají běžněji zmiňovány toxikologické účinky ostatních BA, zejména histaminu a tyraminu. Mezi nejznámější otravy z potravin patří “scombroid fish poisoning” (otrava z konzumace rybího masa s obsahem histaminu) (Lehane a Olley, 2000) anebo také “cheese reaction” (způsobená zvýšeným obsahem tyraminu v sýrech) (Ten Brink et al, 1990). Histamin a tyramin mohou působit vazoaktivně a psychoaktivně a způsobovat širokou škálu zdravotních problémů, jako je zvracení, bolest hlavy, hyper- nebo hypotenze a alergické reakce (Halász et al., 1994; Ten Brink et al., 1990; Ladero et al., 2010a). O toxikologickém působení putrescinu se v literatuře objevují jen sporadické zmínky. Zdůvodnění je možné hledat ve skutečnosti, že vlastní putrescin má nižší toxikologickou aktivitu. Jeho působení je však závažné v tom, že zesiluje toxikologické účinky ostatních BA (Straub et al., 1995; Taylor, 1986). Putrescin však může také být prekurzorem pro vznik karcinogenních N-nitrosaminů (Ten Brink et al., 1990; Shalaby, 1996).

Nejen výše popsaná toxikologická hlediska jsou důvodem pro studium a sledování výskytu putrescinu v potravinách. Dalším závažným důvodem je negativní vliv putrescinu na kvalitu potravin, protože je jedním z indikátorů nežádoucích přeměn bílkovin (Lehtonen, 1996; Rokka et al., 2004). Putrescin může být příčinou hnilobného zápachu potravin (Wang et al., 1975). Putrescin je jedním z nejčastěji se vyskytujících biogenních aminů v potravinách a jeho zvýšený výskyt bývá zapříčiněn metabolickou produkcí kontaminující mikroflóry (Ten Brink et al., 1990). Putrescin však může být syntetizován také

zákysovémi (startérovými) kulturami, které se do potravin přidávají záměrně (Fernandez-García et al., 2000). Tento fakt je dalším důvodem vzrůstajícího množství výzkumných prací zabývajících se možnostmi detekce producentů, včetně detekce jednotlivých metabolických drah vedoucích k jeho produkci v potravinách. Metabolické dráhy jeho vzniku jsou však oproti ostatním BA poměrně komplikované (viz kapitola č. 4.5, str. 18).

Hlavním zaměřením teoretické části dizertační práce je podat ucelený přehled metabolismu putrescinu u bakterií a provedenými výzkumy metabolismu putrescinu metodami PCR. Mikrobiální metabolismus a možnosti jeho sledování a výzkumu jsou jednou z hlavních oblastí umožňujících ovlivňování jeho kumulace v potravinách. Tato část dizertační práce přináší přehled aktuálního stavu této oblasti.

4.2. Putrescin a jeho působení v lidském organismu

Jak již bylo řečeno v úvodní části, zvýšený výskyt putrescinu v potravinách může mít řadu negativních dopadů, ať už na lidské zdraví, tak také na kvalitu potravin (viz kapitola č. 4.3, str. 17). Tato část se zabývá jak fyziologickými funkcemi putrescinu, tak i jeho negativním působením na lidské zdraví a kvalitu potravin.

Putrescin plní významné fyziologické úlohy v široké škále živých buněk. Díky svým fyziologickým rolím a také díky tomu, že je prekurzorem pro syntézu dalších polyaminů (sperminu a spermidinu) je putrescin řazen mezi fyziologické aminy. Fyziologické funkce putrescinu a ostatních polyaminů jsou dány jejich polykationickou povahou, která je předurčuje k interakcím se záporně nabitými molekulami, jako jsou například DNA, RNA, bílkoviny, fosfolipidy aj. (Igarashi a Kashiwagi, 2010). Novější výzkumy pak ukazují, že putrescin spolu s ostatními polyaminy a fosforečnanovými ionty tvoří v jádrech buněk nukleární agregáty polyaminů (NAP), které jsou zodpovědné za výše uvedené interakce a mají vliv na trojrozměrnou strukturu DNA (Di Luccia et al., 2009). Tyto interakce potom souvisí s regulací funkce stabilizace struktury nukleových kyselin a syntézou proteinů (Santos, 1996; Ming-Hon Hou et al., 2001). Z analýz vyplynulo, že putrescin se váže na malý žlábek molekuly DNA (minor groove), čímž ovlivňuje její stabilitu (Medina et al., 2003; Ming-Hon Hou, 2001). Interakce polyaminů s nukleovými kyselinami jsou stále předmětem výzkumů (Wen a Xie, 2013; Kabir a Kumar, 2013).

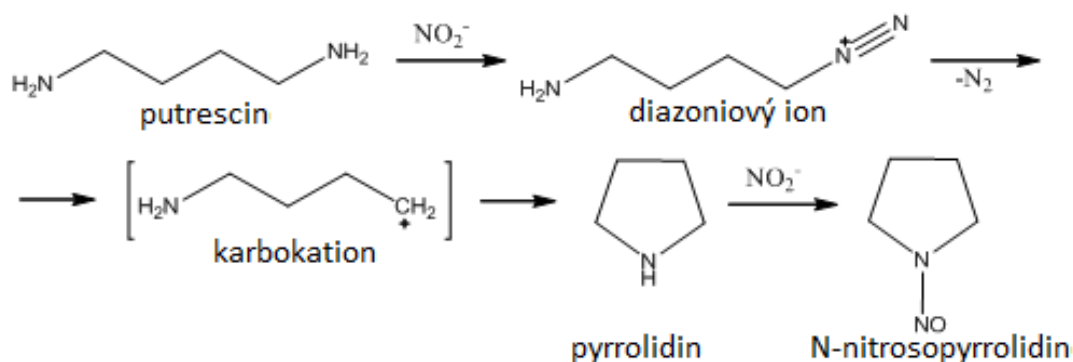
Spolu s ostatními polyaminy se putrescin váže na membránové struktury, jako jsou fosfolipidy, hlavně u erytrocytů, což může vést ke snížení fluidity membrány, ale také ke zvýšení odolnosti proti fragmentaci stabilizací membránového skeletu (Largue et al., 2007; Til et al., 1997). Bylo také zjištěno, že mimo stabilizace membrán a ovlivnění syntézy nukleových kyselin a proteinů se polyaminy podílí na odstraňování volných radikálů (Kaur-Sawhney

et al., 2003). Zajímavý je i fakt, že polyaminy se v relativně vysoké koncentraci vyskytují v mateřském mléce savců. U mnohých savců bylo zjištěno, že hrají důležitou roli jako lumenální růstové faktory pro střevní zránění a růst (Christian, 2000; Dufour et al., 1988) a mohou hrát významnou roli v prevenci vzniku potravinových alergií (Dandriofosse et al., 2000). U savců mají polyaminy přímý vliv na mnoho iontových kanálů a receptorů, z čehož vyplývá jejich vliv na regulaci homeostáze iontů Ca^{2+} , Na^+ a K^+ (Li et al., 2007; Johnson, 1996, William, 1997).

Bylo zjištěno, že orálně podaný putrescin je v těle velmi rychle distribuován, jak bylo prokázáno při pokusech s ^{14}C putrescinem u dospělých krys. Během 30 minut po podání putrescinu byla radioaktivita detekována ve střevech, krvi a různých orgánech, což naznačuje velmi rychlou distribuci putrescinu v organismu a zdůrazňuje důležitost sledování obsahu putrescinu v potravinách (Bardocz et al., 1995). Z fyziologického hlediska patří putrescin mezi vazoaktivní aminy, a může tedy zvyšovat srdeční výkon, což může vést k selhání srdce nebo krvácení do mozku (Til et al., 1997; Kalač, 2009; Mohan et al., 2009), může způsobovat také takychardii nebo hypotenzi (Ladero et al., 2010a).

Vzhledem k významným fyziologickým funkcím je zřejmé, že narušení rovnováhy zvýšeným příjmem putrescinu z potravy může mít závažné toxikologické dopady. Ačkoli toxické účinky putrescinu jsou výrazně nižší než je tomu u histaminu nebo tyraminu, existuje mnoho závažných sekundárních efektů, které podporují zvýšený zájem o tento amin. Diaminy, jako je putrescin, mají například velmi důležitou roli při alimentárních otravách, protože mohou zesilovat toxický účinek histaminu, tyraminu a fenyletylaminu, tím že interagují s enzymy, které tyto BA metabolizují (Taylor and Eitenmiller, 1986), například při pokusech na guinejských prasatech a krysách bylo prokázáno, že putrescin až desetinásobně zesiluje toxicitu histaminu (Parrot a Nicot, 1966; Lehane a Olley, 2000). Putrescin zvyšuje toxicitu histaminu tím, že inhibuje enzymy oxidující histamin: diaminooxidázu (DAO, EC 1.4.3.6) a histamin N-metyltransferázu (NMT, EC 2.1.1.8) (Stratton et al, 1991; Hernandez-Jover et al, 1997; Emborg a Dalgaard, 2006).

Z toxikologického hlediska je vážným aspektem výskytu putrescinu v potravinách také možnost vzniku karcinogenních nitrosaminů. Putrescin může tvořit karcinogenní nitrosaminy reakcí s dusitanem (Ten Brink et al., 1990; Shalaby, 1996; Bover-Cid a Holzapfel, 1999; Kalač et al., 2005a), která je zobrazena na obrázku č. 4.1.



Obr.4.1: Nitrosace putrescinu za vzniku N-nitrosopyrrolidinu (upraveno dle: Wainright, 1986)

Iniciátorem této reakce je oxid dusnatý, který vzniká z dusitanů, které jsou pravidelnými přídatnými látkami hlavně v masném průmyslu nebo doprovází mnoho potravin rostlinného původu. Zahříváním putrescinu se tvoří pyrrolidin a z něj působením tepla vzniká N-nitrosopyrrolidin (Gray a Collins, 1977; Karovičová a Kohajdová, 2005; Spinelli-Gugger et al., 1981). N-nitrosopyrrolidin je agenturou International Agency for Research on Cancer (IARC) řazen mezi karcinogeny skupiny 2B (pravděpodobný lidský karcinogen). Bylo také prokázáno, že putrescin zvyšuje riziko vzniku N-nitrosodimethylaminu (NDMA) v tepelně ošetřeném vepřovém mase (Drabik-Markiewicz et al., 2011), tento N-nitrosoamin je agenturou US Environmental Protection Agency (EPA) klasifikován jako karcinogen skupiny 2B (pravděpodobný lidský karcinogen) a agenturou IARC jako karcinogen skupiny 2A (podezřelý karcinogen pro člověka).

Putrescin se navíc na vývoji novotvarů podílí ještě jiným způsobem, který úzce souvisí s jeho fyziologickou rolí. Jak již bylo napsáno výše, putrescin se spolu s ostatními polyaminy podílí na buněčném růstu a proliferaci buněk. Z tohoto důvodu byly prováděny výzkumy, v nichž bylo testováno potlačení růstu nádorových buněk tím, že byla potlačována aktivita ornitin dekarboxylázy (ODC) (Pegg et al., 1995), jednoho z enzymů odpovědného za vznik putrescinu. Jedním z nejčastějších inhibitorů ornitin dekarboxylázy používaných v terapii rakoviny byl difluormethylornitin (DFMO) (Meyskens a Gerner, 1995). Nicméně tumorové buňky mají schopnost absorbovat extracelulární aminy z potravy nebo aminy produkované gastrointestinálními bakteriemi, a proto nebyla tato terapie účinná (Seiler, 2003a, 2003b; Carruthers et al., 2007). Předběžné klinické studie však prokázaly, že snížení dietetárního příjmu polyaminů a snížení produkce polyaminů střevní mikroflórou je přínosné pro kvalitu života pacientů a zvládání bolesti (Cipolla et al., 2007).

4.3. Ovlivňování kvality potravin

Kromě výše zmíněných toxických účinků má výskyt putrescinu v potravinách také nežádoucí organoleptické vlastnosti, nepříznivě ovlivňuje chuť i vůni potravin (Lehtonen, 1996), například v krevetách je sensoricky rozpoznatelný již v koncentracích 3 mg/kg (Benner et al., 2003). Zvýšený výskyt putrescinu je indikátorem kažení potravin způsobeným mikrobiální aktivitou a je například hlavním biogenním aminem, který indikuje kažení masa. Množství putrescinu, histaminu a kadaverinu je pak ukazatelem čerstvosti masa a je definováno jako BAI (Biogenic Amines Index), jak je uvedeno ve vztahu č. 1 (Karmas, 1981).

$$BAI = \frac{\text{histamin} \left[\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right] + \text{putrescin} \left[\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right] + \text{kadaverin} \left[\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right]}{1 + \text{spermin} \left[\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right] + \text{spermidin} \left[\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right]} \quad (1)$$

Dle tohoto indexu se pak usuzuje na kvalitu a čerstvost masa následujícím způsobem: pokud je $BAI < 5$ jedná se o kvalitní čerstvé maso; je-li BAI mezi 5 - 20 je pak maso označováno jako maso akceptovatelné kvality s počátečními známkami kažení; maso s hodnotou BAI 20-50 je maso nízké kvality a maso s $BAI > 50$ je označována jako maso zkažené (Hernández-Jover et al., 1996). Existují tedy dva hlavní důvody, proč se zaměřit na výzkum obsahu a vzniku putrescinu v potravinách – zaprvé pro jeho potencionální toxicitu a zadruhé lze jeho obsah použít jako ukazatele kvality potravin.

Putrescin patří mezi jeden z hlavních BA vyskytujících se ve fermentovaných zeleninových pokrmech (průměrně 264 mg/kg), rybích omáčkách (98,1 – 99,3 mg/kg), fermentovaných klobásách (84,2 – 84,6 mg/kg), sýrech (25,4 – 65,0 mg/kg) a fermentovaných rybách (13,4 – 17,0 mg/kg) (EFSA, 2011). Dále se putrescin hojně nachází v mase a masných produktech. Putrescin je dle různých výzkumů převažujícím BA ve víně (Ancin-Azpilicueta et al., 2008), kde se vyskytuje v rozmezí 1-200 mg/l (Soufleros et al., 1998). Putrescin byl také nalezen ve všech testovaných 195 vzorcích evropských piv (Izquierdo-Pulido et al., 1996). Přehled o výskytu polyaminů (putrescinu, sperminu a spermidinu) v různých potravinách přináší mnohé publikace (Buňka et al., 2013; Lorencova et al., 2012; Buňková et al., 2010 a 2013; Kalač a Krausova, 2005b; Kalač a Křížek, 2012) a byly vytvořeny také některé databáze obsahu polyaminů v potravinách (Zoumas-Morse et al., 2007; Ali et al., 2011). Všeobecně je putrescin jedním z nejčastěji se vyskytujících BA v potravinách (Fernandez et al., 2007).

Prozatím neexistuje legislativní limit pro obsah putrescinu v potravinách. Dle toxikologických dat byla akutní orální toxicita putrescinu u krys stanovena na

2000 mg/kg tělesné hmotnosti (Til et al., 1997). Někteří autoři se také zabývali návrhem maximální tolerovatelné hladiny putrescinu v potravinách. Například Rauscher-Gabernig et al. (2012) na základě toxikologických dat výskytu putrescinu v potravinách a průměrné spotřeby těchto potravin v Rakousku navrhli maximální tolerovatelné koncentrace putrescinu v rybách (170 mg/kg), fermentovaném zelí (140 mg/kg), sýrech (180 mg/kg), fermentovaných klobásách (360 mg/kg) a kořenících přípravcích (510 mg/kg).

4.4. Bakteriální produkce putrescinu v potravinách

Vysoké koncentrace putrescinu často odpovídají dekarboxylázové aktivitě (aktivitě dekarboxylačních enzymů) kontaminující mikroflóry. Produkce putrescinu v potravinách bývá spojována zejména s bakteriemi rodu *Pseudomonas* a enterobakteriemi (Smith, 1981; Ten Brink et al., 1990). Také bakterie mající technologickou roli při výrobě fermentovaných potravin, jako jsou například bakterie mléčného kvašení (LAB), se mohou výrazně podílet na tvorbě BA (Fernandéz-García et al., 2000; Buňková et al., 2009, 2011, 2012).

Všeobecně lze u bakterií říci, že jejich dekarboxylázová schopnost je závislá na jednotlivých kmenech a není tedy druhově specifická. Například kmeny *Lactobacillus curvatus* jsou známy svou aminogenezí (tvorbou BA), zatímco kmeny *Lactobacillus sakei* jsou často označovány za kmeny bez dekarboxylázové aktivity (netvořící BA) (Bover-Cid et al., 2008). LAB tvoří převážně tyramin, příležitostně však mohou produkovat i značná množství putrescinu a jiných BA (Straub et al., 1995; Bover-Cid et al., 2000; Buňková et al., 2009, 2010a).

4.5. Bakteriální metabolismus putrescinu

Vzhledem k tomu, že právě bakteriální metabolismus je hlavním zdrojem putrescinu v potravinách, zabývá se tato část podrobným popisem bakteriálního metabolismu putrescinu. Vznik putrescinu v potravinách může být řízen přes inhibici dekarboxylázové aktivity přítomných mikroorganismů (Wendakoon a Sakaguchi, 1995), proto je důležité jeho metabolismus a jeho možné ovlivňování intenzivně studovat. Tato část přináší přehled aktuálních poznatků o mikrobiálním metabolismu putrescinu u gramnegativních i grampozitivních bakterií.

Syntéza BA (včetně putrescinu) je u bakterií často spojována se získáním energie nebo s rezistencí proti kyselému pH (Konings et al., 1997; Griswold et al., 2006). Většina BA vzniká jednou metabolickou dráhou za katalýzy jedním dekarboxylázovým enzymem. Naproti tomu putrescin může vznikat u gramnegativních bakterií hned třemi různými drahami, v nichž může být zahrnuto až 8 různých enzymů. V případě grampozitivních bakterií se jedná o dvě dráhy, kde pracují až 3 enzymy. Některé z těchto enzymů navíc mohou

mít 2 formy - biosyntetickou a biodegradativní, přičemž degradativní formy bývají indukovány mnoha faktory (včetně nízkého pH, anaerobních podmínek, přítomnosti sacharidů, koncentrace NaCl aj.) a formy biosyntetické bývají konstitutivně přepisovány patrně jako první část biosyntézy polyaminů v buňkách (Tabor a Tabor, 1984).

4.5.1. Metabolismus putrescinu a jeho produkce v potravinách u gramnegativních bakterií

U gramnegativních bakterií může být putrescin produkován třemi metabolickými drahami (obr. 4.2). Putrescin může být syntetizován buď přímo z ornitinu enzymem ornitin dekarboxylázou (ODC, EC 4.1.1.17; ornitin dekarboxylázová dráha) nebo nepřímo z argininu arginin dekarboxylázou přes agmatin (ADC, EC 4.1.1.19; arginin dekarboxylázová dráha). Obě tyto dráhy mohou u mnoha bakterií fungovat simultánně (Cunin et al., 1996; Tabor and Tabor, 1972).

Navíc pak ještě existují dvě varianty arginin dekarboxylázové dráhy. U obou je nejprve L-arginin dekarboxylován za vzniku agmatinu enzymem arginin dekarboxylázou. U enterobakterií je pak agmatin konvertován na putrescin a močovinu enzymem agmatinázou, (EC 3.5.3.11) (kódovanou genem *speB*), zatímco například u bakterií rodu *Pseudomonas* je agmatin nejprve hydrolyzován enzymem agmatin deiminázou, (EC 3.5.3.12), (kódovanou genem *aguA*) za vzniku N-karbamoyl putrescinu a amoniaku, podobně jako je tomu u některých LAB (lactic acid bacteria). Vzniklý N-karbamoyl putrescin je pak přeměněn enzymem N-karbamoylputrescin amidohydrolázou, (EC 3.5.1.53) (N-CPAH, kódovaným genem *aguB*) za odštěpení močoviny a vzniku putrescinu. Celé schéma je zobrazeno na obrázku č. 4.2; v tabulce č. 4.2 je uveden výčet enzymů zahrnutých v metabolismu putrescinu (biosyntetická i katabolická dráha), genů kódujících tyto enzymy a skupiny mikroorganismů, u nichž se daný gen zpravidla vyskytuje (informace získané na základě databází metabolických drah).

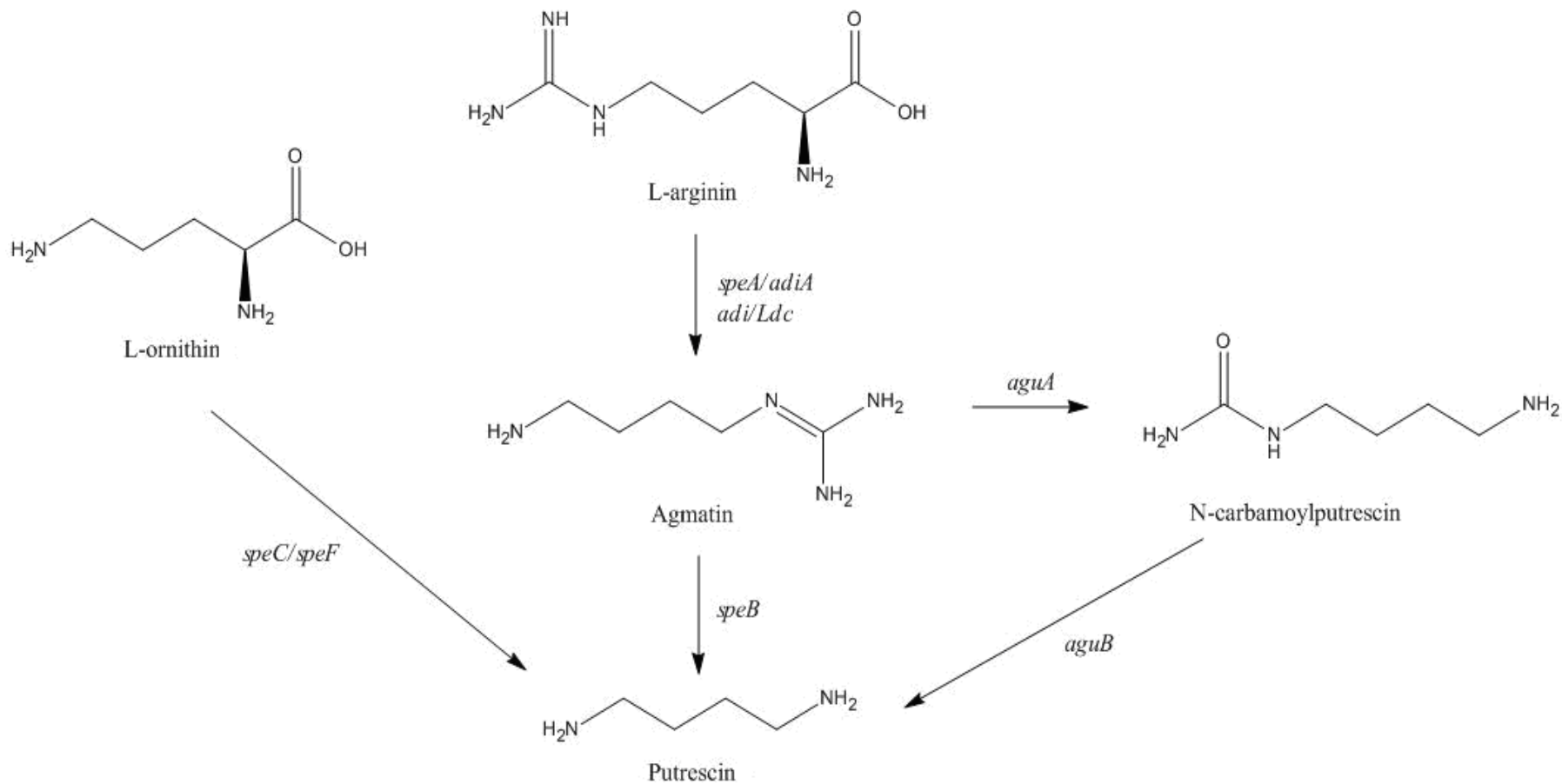
U mnohých gramnegativních bakterií pak můžeme nalézt dvě formy ADC: biosyntetickou ADC (EC 4.1.1.19), kódovanou genem *speA* a biodegradativní, kódovanou genem *AdiA* u enterobakterií (*Escherichia coli*, *Salmonella*). U bakterií rodu *Pseudomonas* se vedle biosyntetické ADC (produkt *speA*) nachází také druhá forma dekarboxylázy schopná dekarboxylace argininu, zpravidla bývá označována jako „předpokládaná“ arginin dekarboxyláza a je kódována genem *adi* (někdy také označován jako gen *Ldc*). Geny pro biosyntetickou a biodegradativní ADC u gramnegativních bakterií nevykazují fylogenetickou příbuznost (zjištěno porovnáním sekvencí).

Podobná situace je také v případě ornitin dekarboxylázy, kde například bakterie *Escherichia coli* má dvě formy ornitin dekarboxylázy – konstitutivní

(biosyntetickou), kódovanou genem *speC* a inducibilní, kódovanou genem *speF*. U *E. coli* se jedná o isozymy, kdy oba geny mají podobnou strukturu, ale liší se v regulaci. Tyto dva geny vykazují velmi nápadnou podobnost a pravděpodobně sdílí společný evoluční vývoj (Applebaum et al., 1977). Podobně je tomu patrně i u ostatních enterobakterií u nichž se vyskytují obě formy ornitin dekarboxylázy.

Enterobacteriaceae, stejně tak jako *Pseudomonas* sp., byly identifikovány jako hlavní producenti putrescinu v různých typech potravin. V mnoha publikacích byla popsána zvýšená produkce putrescinu ve spojení s výskytem enterobakterií v potravinách. Enterobakterie byly shledány jako zodpovědné za produkci putrescinu ve fermentovaných klobásách (Lu et al., 2010; Curiel et al., 2011; Pircher et al., 2007), mletém mase a hamburgerech (Durlu-Özkaya et al., 2001), v rybích produktech (Pons-Sánchez-Cascado et al., 2005; Özogul a Özogul, 2005; Özogul et al., 2002), ve vzorcích z povrchu chlazené drůbeže (Buňková et al., 2010a) nebo v sýrech (Marino et al., 2000). *Enterobacteriaceae* a *Pseudomonas* izolované ze špenátu byly také shledány jako *in vitro* producenti putrescinu (Lavizzari et al., 2010). Některé kmeny rodu *Pseudomonas* byly určeny jako dobří producenti putrescinu jak v modelovém médiu (Landete et al., 2008, 2010), tak v rybích produktech (Pons-Sánchez-Cascado et al., 2005; Özogul a Özogul, 2005).

Někteří autoři pak také detekovali výskyt prekurzoru putrescinu - agmatinu - v souvislosti s výskytem gramnegativních bakterií v potravinách (Pons-Sánchez-Cascado et al., 2005; Özogul and Özogul, 2005; Buňková et al., 2010a; Curiel et al., 2011; Saccani et al., 2005). Přítomnost agmatinu je důležitým důkazem skutečnosti, že gramnegativní mikroorganizmy tvoří putrescin nejen ODC dráhou, ale že aktivně využívají i ADC dráhy.



Obr. 4.2: Schéma metabolismu putrescinu u gramnegativních bakterií; zkratky jsou vysvětleny v tabulce č. 4.2.

Tabulka 4.2 Přehled klíčových enzymů metabolismu putrescinu, jejich genů a skupin mikroorganismů

Enzym	Gen	Skupiny mikroorganismů nesoucí gen
Arginin dekarboxyláza - biosyntetická	<i>speA</i>	<i>Enterobacteriaceae</i> ; <i>Pseudomonas</i> sp.
Arginine dekarboxyláza - biodegradativní	<i>AdiA</i>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> sp.
Orn/Lys/Arg dekarboxyláza family protein	<i>Ldc</i> , <i>adi</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.
Agmatináza	<i>speB</i>	<i>Enterobacteriaceae</i> (kromě <i>Yersinia</i> sp. a <i>Pectobacterium carotovorum</i>)
Agmatin deimináza	<i>aguA</i>	<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Yersinia</i> sp., grampozitivní bakterie
N-karbamoylputrescin amidohydroláza	<i>aguB</i>	<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Yersinia</i> sp.
Ornitin dekarboxyláza - biosyntetická	<i>speC</i>	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Pseudomonas</i> sp.
Ornitin dekarboxyláza - biodegradativní	<i>speF</i>	<i>Enterobacteriaceae</i> , grampozitivní bakterie
Putrescin karbamoyl transferáza	<i>ptcA</i>	LAB

4.5.2. Metabolismus putrescinu a jeho produkce v potravinách u grampozitivních bakterií

LAB, které se řadí mezi technologicky významné grampozitivní bakterie, využívají metabolické dráhy biodegradace (katabolizmu) aminokyselin pro získání metabolické energie (Fernández a Zúñiga, 2006), případně jako mechanismus rezistence proti nízkému pH (Konings, 2002). Tyto LAB nesoucí katabolické cesty vzniku putrescinu jsou pak jeho zdrojem v potravinách (Silla Santos, 1996; Ten Brink et al., 1990). Tyto dráhy jsou u LAB zmiňovány spíše jako kmenově specifické, než-li druhově specifické, což naznačuje, že výskyt těchto drah je dán horizontálním přenosem genů (Lucas et al., 2005; Marcobal et al., 2006). V poslední době se však objevují také výzkumy, které potvrzují i druhově specifickou schopnost tvořit určitý BA (Ladero et al., 2011a). Například 90 % všech testovaných kmenů *Enterococcus faecium* izolovaných ze sýrů bylo označeno jako producenti tyraminu. Rovněž Pleva et al. (2012) zjistili téměř 85 % produkci tyraminu u enterokoků izolovaných z masa králíků. Mezi kmeny rodů *E. faecalis* se pak velmi často objevují putrescin produkující kmeny (Llácer et al., 2006; Ladero et al., 2012a), což by mohlo naznačovat druhově specifickou schopnost produkce putrescinu (agmatin deiminázovou cestou).

U grampozitivních mikroorganismů se mohou v metabolismu putrescinu všeobecně vyskytovat dvě metabolické dráhy: ornitin dekarboxylázová (ODC,

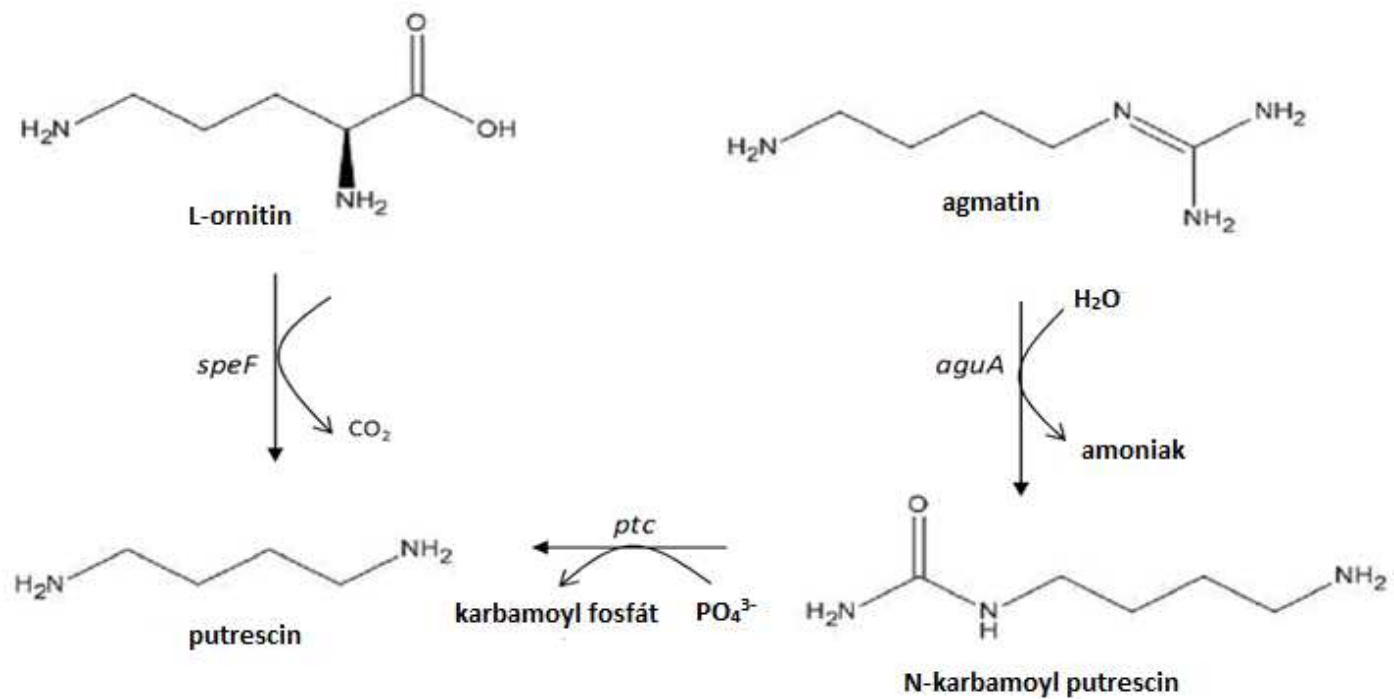
pouze biodegradativní forma) a agmatin deiminázová (AgDI), přičemž ODC dráha se vyskytuje spíše u bakterií izolovaných z vína a AgDI dráha u bakterií izolovaných z moštů a sýrů (Romano et al., 2012). Prozatím pouze u jednoho kmene LAB (*Lactobacillus hilgardii* X1B izolovaného ze vzorku vína) byla popsána arginin dekarboxylázová dráha (Arena a Manca de Nadra, 2001). Schéma metabolismu putrescinu u grampozitivních bakterií je znázorněno na obrázku č. 4.3., výčet enzymů zahrnutých v metabolismu putrescinu je uveden v tabulce č. 4.2.

První skupina z výše jmenovaných drah, tedy dekarboxylační dráha (například ODC dráha), zahrnuje vždy dva proteiny – dekarboxylázu a příslušný transportní protein, který je zodpovědný za transport aminokyselin do cytoplazmy a antiport biogenního aminu ven z buňky. Dekarboxyláza pak dekarboxyluje aminokyselinu za vzniku BA a oxidu uhličitého. Tato dráha produkuje protonmotivní sílu a alkalizuje cytoplazmu (Romano et al., 2012).

AgDI dráha funguje na jiném principu než přímá dekarboxylační dráha. Tato dráha sestává z transportního kroku následovaného dvěma enzymy. Prvním enzymem je agmatin deimináza (kódovaná genem *aguA*), která konvertuje agmatin na N-karbamoylputrescin a amoniak. Druhým enzymem je putrescin karbamoyláza (kódovaná genem *ptcA*, některými autory označován také jako *aguB*) produkující karbamoylfosfát a putrescin. Vzniklý karbamoylfosfát je pak rozložen kinázou (kódovaná genem *aguC*) za vzniku ATP, oxidu uhličitého a amoniaku. Tímto způsobem mohou LAB získávat energii. Substrát a produkt jsou opět vyměněny antiportem (Driessen et al., 1988). Přítomnost genu *ptc* byla prozatím prokázána pouze u malého počtu bakterií; např. *Enterococcus Faecalis*, *Lactobacillus brevis* (Llacer et al., 2007; Lucas et al., 2007)

Všechny geny AgDI dráhy se nacházejí na agmatin deiminázovém genovém klastru (AGDIc). AgDI dráha se u většiny LAB vyskytuje společně s tyrozin dekarboxylázovou dráhou, což je dáno faktem, že geny pro AgDI dráhu jsou propojeny s operonem pro tyrozin dekarboxylázovou dráhu (předpokládaný lokus rezistence proti kyselému prostředí (Lucas et al., 2007). Toto pravidlo však neplatí vždy, protože v poslední době bylo zjištěno, že u kmenů *E. faecalis* se klastry pro TDC (tyramin dekarboxyláza) a AgDI dráhy vyskytují odděleně (Ladero et al., 2012a).

V poslední době byla AgDI dráha prokázána u *Lactobacillus brevis* (Lucas et al., 2007; Coton et al., 2010), *Lactobacillus collinoides*, *Lactobacillus mali*, *Leuconostoc mesenteroides* a *Oenococcus oeni* v moštu a u *Lactobacillus fructivorans* ve víně (Coton et al., 2010), *Pediococcus parvulus*, *Lactobacillus paracollinoides* (Ladero et al., 2011b), *Lactobacillus hilgardii* (Alberto et al., 2007, Coton et al., 2010), *Streptococcus mutans* (Griswold, et al., 2004), *Enterococcus faecalis* (Simon a Stalon, 1982; Driessen et al., 1988; Llacer et al., 2006; Ladero et al., 2012a). Klastry podobných genů pak byly nalezeny také



Obr. 4.3: Katabolizmus agmatinu a ornitinu u bakterií mléčného kvašení. *AguA* – agmatin deimináza, *speF* (*odc*) – ornitin dekarboxyláza, *ptc* – putrescin karbamoyl transferáza.

u *Lactococcus lactis*, *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus sakei* a *Pediococcus pentosaceus* (Naumoff et al., 2004).

Některé *Oenococcus oeni* mají ODC dráhu (Marcobal et al., 2004), což potvrdili i Ladero et al. (2011b), Coton et al. (2010), Izquierdo Canas et al., (2009) a Romano et al., (2012), kteří identifikovali ODC pozitivní kmeny *Oenococcus oeni*. U kmenů *O. oeni* se vyskytuje ODC dráha patrně díky horizontálnímu transferu (Marcobal et al., 2006). ODC byla také prokázána u kmene *Lactobacillus* sp. 30a (Hackert et al., 1994), *Lactobacillus mali* (Coton et al., 2010) a *Lactobacillus brevis* IOEB 9906 (Romano et al., 2012). Geny vysoce podobné genům pro ODC byly také nalezeny u *Lactobacillus acidophilus* (Azcarate-Peril et al., 2004) a u některých kmenů *Lactobacillus johnsonii* (Pridmore et al., 2004; Wegmann et al., 2009).

U metabolických drah LAB byla zatím vyzorována pouze některá pravidla v metabolismu putrescinu. Například dle Cotton et al. (2010) a Ladero et al. (2011b) u putrescin produkujících kmenů LAB v moštu a víně byla dominantní AgDI dráha. Naproti tomu dle Nannelli et al. (2008) jsou hlavními producenty putrescinu ve víně LAB nesoucí ODC dráhu. Romano et al., (2012) publikovali práci, v níž předpokládají existenci dvou odlišných ODC drah u LAB. Druhá, nově publikovaná dráha, se skládá z dekarboxylázy ornitinu a L-2,4-diaminomáslé kyseliny (DABA) a transportéru, který zprostředkovává jednosměrný transport ornitinu do cytoplazmy. Diaminy, které vznikají tímto systémem, jsou ponechány v cytosolu. Tato druhá dráha byla prokázána například u *Lactobacillus gasseri* a *Lactobacillus casei* a může být obdobou biosyntetické dráhy vyskytující se běžně u gramnegativních bakterií.

LAB patří mezi hlavní bakterie zodpovědnými za přítomnost putrescinu ve víně (Ancin-Azpilicueta et al., 2008). Prozatím nebyla ze sýrů vyizolována žádná LAB nesoucí ODC dráhu, LAB izolované ze sýrů produkují putrescin deaminací agmatinu přes AgDI dráhu. Tato dráha byla prokázána např. u kmenů *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus curvatus* a *Lactococcus lactis* (Joosten a Northolt, 1987; Komprda et al., 2008, Ladero et al., 2011a; Ladero et al., 2011c). U *Lactococcus lactis* bylo zjištěno, že AgDI dráha je pro tyto kmeny druhově specifická a nebyla patrně získána horizontálním přenosem. Mnohé kmeny *Lactococcus lactis* však nesou v AgDI clusteru inzerci (IS983 element), která inaktivuje prepis tohoto klastru, a tyto *Lactococcus lactis* jsou díky tomu putrescin neprodukující (Ladero et al., 2011a).

Mnohé grampozitivní bakterie jsou využívány jako startérové kultury a mnohé z nich jsou zodpovědné za zvýšený výskyt putrescinu ve fermentovaných výrobkách. Na druhou stranu vhodně zvolená zákysová kultura (neprodukující BA nebo produkující v omezeném rozsahu) může pomoci omezit kumulaci BA (Bover-Cid et al., 2001; Fernández-García et al., 1999).

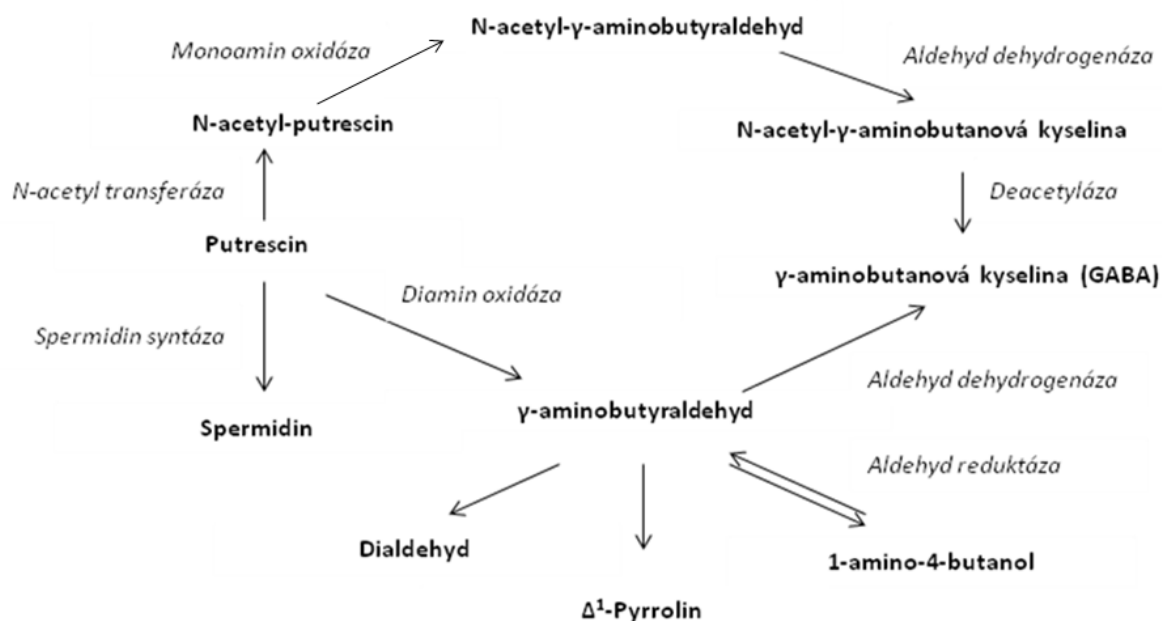
4.6. Odbourávání putrescinu – detoxifikace

Detoxifikační systém biogenních aminů u savců zahrnuje specifické enzymy – aminooxidázy, které katalyzují oxidativní deaminaci aminů za vzniku odpovídajícího aldehydu, amoniaku a peroxidu vodíku (viz obrázek č. 4.4). Tyto aldehydy jsou (kvůli své toxicitě) rychle přeměňovány intracelulárními aldehyd dehydrogenázami na aminokyseliny a laktamy (Seiler a Douaud, 1998). Tato dráha se nazývá dráhou terminační, protože vzniklé produkty už nemohou být recyklovány na polyaminy. Všechny deriváty polyaminů vznikající při této terminální degradaci jsou pak složkami moči savců (Van den Berg et al., 1985)

Hlavní cestou katabolizmu polyaminů u savců je oxidativní deaminace, enzymem Cu^{2+} diaminoxidázou (DAO, EC 1.4.3.22) (Brazeau et al., 2004), který se ve značném množství nachází ve střevní sliznici, játrech a ledvinách. Tyto diaminoxidázy kromě putrescinu deaminují také histamin a kadaverin. V různých tkáních pak mají tyto DAO různé biochemické vlastnosti (Seiler and Douaud, 1998). Putrescin je výše zmíněným enzymem přeměněn na γ -aminobutyraldehyd za současné tvorby amoniaku a peroxidu vodíku. Vzniklý aminoaldehyd je následně metabolizován na GABA (γ -aminobutanovou kyselinu) (Bagni a Tassoni, 2001).

Další možností je odbourávání putrescinu enzymem monoaminoxidázou (MAO). Pro tuto reakci je putrescin nejprve acetylován enzymem diamin acetyl transferázou (EC 2.3.1.57) za vzniku N-acetylputrescinu, ten je následně působením MAO (N-acetylputrescin oxidázou, EC 1.4.3.4) převeden na N-acetyl- γ -aminobutyraldehyd. Ten je dále dehydrogenován a hydrolyzován až na kyselinu γ -aminomáselnou. Tato dráha probíhá např. uvnitř mitochondrií savčích mozkových buněk (Seiler a Therib, 1974).

Katabolismus polyaminů u člověka není za určitých podmínek dostačující a mohou se dostavit toxikologické projevy způsobené zvýšením hladiny jednotlivých polyaminů. Mezi rizikové skupiny patří zejména děti, alergici, lidé užívající inhibitory mono- a diaminoxidáz (antidepresiva, antiparkinsonika) a lidé s gastrointestinálními problémy (zánět žaludku, Crohnova choroba, žaludeční vředy), protože aktivita oxidáz u těchto jedinců bývá nižší než u zdravých lidí. Toxikologické účinky putrescinu mohou být zesíleny současnou přítomností etanolu a acetaldehydu, protože podporují jejich transport přes střevní stěnu. Současné působení putrescinu a alkoholu je pak závažné zejména při konzumaci alkoholických nápojů se zvýšeným obsahem putrescinu (Santos, 1996). Dalším faktorem snižujícím aktivitu aminooxidáz je kouření, kdy u kuřáků bylo pozorováno snížení aktivity aminooxidáz až o 30 % v důsledku inhibičního efektu některé ze sloučenin obsažené v tabáku či tabákovém kouři (Berlin and Anthenelli, 2001).



Obr. 4.4: Oxidativní deaminace aminů (upraveno dle James Storer a Antonio Ferrante, 1998)

4.7. Faktory ovlivňující výskyt putrescinu v potravinách

Hlavním zdrojem BA v potravinách jsou mikroorganismy s dekarboxylázovou aktivitou. Mikrobiální vznik BA je ovlivňován mnoha faktory – přítomnými mikroorganismy, pH, teplotou, obsahem NaCl atd.

Co se týká mikrobiálního zastoupení, tak dekarboxylázová i deiminační aktivita bývají popisovány u různých druhů, rodů a kmenů gram pozitivních i gram negativních bakterií. Pro tyto bakterie může být produkce biogenních aminů zdrojem energie, formou rezistence proti kyselému prostředí (Konings et al., 1997), formou regulace DNA či mohou vystupovat jako antioxidanty (Kaur-Sawhney et al., 2003).

V některých případech se schopnost tvorby BA jeví jako druhově charakteristická, například produkce putrescinu agmatin deiminázovou dráhou u druhů *Lactococcus* (Ladero 2011a), v jiných případech pak je schopnost produkce BA kmenově specifická (Bover-Cid a Holzapfel, 1999, Buňková et al., 2011) například u gram negativních bakterií, zejména enterobakterií a bakterií rodu *Pseudomonas*. Poslední výzkumy však ukázaly že i mnohé gram pozitivní bakterie mají tuto schopnost (viz kapitola 4.5.2.) a bylo prokázáno, že v určitých typech potravin (např. víno) jsou LAB hlavním zdrojem putrescinu (Ancin-Azpilicueta et al., 2008).

Přítomnost zvýšeného množství putrescinu však bývá nejčastěji spojována se zvýšeným výskytem gram negativních bakterií (ten Brink et al., 1990, Pircher et al., 2007; Delbès-Paus et al., 2012; Buňková et al., 2010a), kde se zpravidla

jedná o výsledek špatného výrobního procesu, špatné kvality surovin nebo nedostačujících hygienických podmínek při výrobě anebo skladování. V případě gram pozitivních bakterií pak takováto přímá úměra neexistuje, což může být dáno právě faktem, že dekarboxylázová či deiminační aktivita bývá často kmenově specifická (Halász et al., 1994). Všeobecně však platí, že i zvýšený výskyt mikroorganismů nemusí nutně vést ke zvýšené produkci BA. Mikroorganismy totiž využívají uvedené metabolické dráhy často za specifických podmínek. Výskyt BA může být tedy ovlivněn kombinací dalších významných faktorů.

Jedním z nejvýznamnějších faktorů ovlivňujících produkci BA je pH, které souvisí s pH optimem dekarboxyláz, přičemž je známo, že bakteriální inducibilní dekarboxylázy mají zpravidla pH optimum v kyselé oblasti (viz následující text) (Gale, 1946). Mnohé výzkumy pak potvrdily, že mírné snížení pH vede ke zvýšení tvorby putrescinu (Greif et al., 2006). Naproti tomu však jiné výzkumy ukázaly, že rychlý pokles pH má opačné účinky, a to díky poklesu růstu dekarboxylačních mikroorganismů (Gardini et al., 2001, Maijala et al., 1993; Bover-Cid et al., 2001). Zvýšení pH pak vede ke snížení produkce putrescinu (Greif et al., 2006).

Jedním z enzymů, který je v tomto ohledu dobře prostudován, je biodegradativní arginin dekarboxyláza. Ta je velmi silně indukována v kyselém prostředí v nadbytku substrátu. Expres genu *AdiA*, který kóduje tuto dekarboxylázu, je indukována nízkým pH (Stim and Bennett 1993). Také biodegradabilní ODC je u *E. coli* indukována nízkým pH a hraje roli při regulaci intracelulárního pH (Applebaum et al., 1977). Dekarboxylace ornitinu na putrescin a následná výměna putrescinu za ornitin je cyklus, který vytváří protonmotivní sílu a který je indukován při nízkém pH za účelem chránit bakterii při snížení pH (Romano et al., 2012)

U LAB byla prozatím prokázána pouze existence biodegradativní formy ODC u *Lactobacillus* sp. 30a, která je také indukována nízkým pH, čímž kompenzuje pokles pH vzniklý produkcí kyseliny mléčné (Gale, 1946).

Nejen dekarboxylázy jsou indukovány mírně kyselým pH, obdobné chování bylo zaznamenáno i u agmatin deiminázy, enzymu nacházejícím se v agmatin deiminázové dráze, kdy bylo zjištěno, že gen *aguA1* bakterie *Lactobacillus brevis* je transkripčně indukován nízkým pH (Arena et al., 2010).

Dalším významným faktorem ovlivňujícím bakteriální produkci BA je obsah NaCl. Bylo publikováno mnoho prací, které potvrzují, že s vyšší koncentrací NaCl dochází k poklesu tvorby BA obecně. Důvodem je jak snížení počtu bakteriálních buněk (Gardini et al., 2001), tak snížení aktivity membránově vázaných dekarboxyláz (Sumner et al., 1990; Chander et al., 1989). Tento trend byl popsán například u kmene *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Chander et al., 1989), u *Enterococcus faecalis* EF37 (Gardini et al., 2001) nebo

u *Enterococcus faecium*, kde byl sledován pokles produkce tyraminu (Pleva et al., 2012). Pokles v produkci BA se zvýšením obsahu NaCl byl popsán také u některých typů potravin, například ve fermentovaných klobásách (Roseiro et al., 2006), v sýru feta (Valsamaki et al., 2000), či íránských sýrech (bílé sýry zrající/skladované v solném nálevu) (Aliakbarlu et al., 2009).

Naproti tomu vyšší produkce tyraminu byla u *Enterococcus durans* CCDM 53 zaznamenána v prostředí s vyšší koncentrací NaCl (Buňková et al., 2012). Podobně Buňková et al. (2011) zjistili u pěti kmenů *Lactococcus lactis* využívaných v technologii výroby sýrů vyšší produkci tyraminu v prostředí se 2% (w/v) NaCl než v prostředí s 1% (w/v) nebo bez přidané soli. Rovněž i u gramnegativních bakterií rodů *Enterobacter* nebo *Morganella* byla zjištěna vyšší produkce BA v prostředí s vyšší koncentrací NaCl než v prostředí s nižší koncentrací nebo bez přídavku soli (Greif et al., 2006; Emborg and Dalgaard, 2008). Vyšší produkci tyraminu v prostředí s vyšší koncentrací NaCl si lze podle Wolken et al. (2006) and Pereira et al. (2009) vysvětlit tím, že Na⁺ ionty jsou zahrnuty v regulaci intracelulárního pH. Ionty Na⁺ jsou antiportem vyměňovány za ionty H⁺, které jsou tak odstraňovány z buňky.

Snížení produkce putrescinu u *Enterobacter cloacae* v důsledku zvýšení koncentrace NaCl ve své práci pak publikoval Greif et al. (2006); také Bover-Cid et al. (2009) sledovali pokles produkce putrescinu enterobakteriemi v souvislosti se zvýšením obsahu NaCl.

Obsah cukrů také významně ovlivňuje produkci BA v potravinách. Jak již bylo zmíněno výše, vhodně zvolená zákysová kultura může pomoci omezit kumulaci BA. Bylo zjištěno, že přídavek cukrů významně podporuje růst startérových kultur, což vede k potlačení růstu *Enterobacteriaceae* a tím ke snížení akumulace putrescinu (Bover-Cid et al., 2000, 2009).

Obdobně pak ovlivňuje produkci BA teplota. Mnoho publikací potvrzuje zvýšení obsahu BA v různých typech potravin se zvyšující se teplotou a dobou skladování (Halasz et al., 1994; Stratton et al., 1991; Gardini et al., 2001; Pinho et al., 2001; Gennaro et al., 2003; Santos et al., 2003; Martuscelli et al., 2000; Buňková et al., 2010a). Avšak i dlouhodobé skladování masa za nízkých teplot (4 °C) může vést ke kumulaci putrescinu v důsledku aktivity psychrotrofních pseudomonád (Paulsen a Bauer, 1997), stejně tak bylo shledáno, že při skladování ryb a krevet na ledu mohou přežívat některé rody produkující BA jako *Photobacterium*, *Aeromonas* nebo *Micrococcus*. (Lakshmanan et al., 2002). Naopak zvýšení teploty u fermentovaných výrobků může vést k posílení startérových LAB a tím k potlačení růstu nestrartérových BA pozitivních mikroorganismů (Maijala et al., 1995).

Mezi další faktory ovlivňující produkci BA v potravinách patří také obsah volných aminokyselin, přítomnost kyslíku, vodní aktivita, přítomnost dalších látek či interakce mezi mikrobiálními kulturami (Naila et al. 2010).

Bylo publikováno několik prací, které se zabývají sledováním více faktorů na produkci BA současně, například sledování vlivu faktorů délky a teploty skladování u zrajících sýrů (Komprda et al., 2012; Buňková et al., 2010a; Pachlová et al., 2012). Hernández-Orte et al. (2008) zkoumali ovlivňování produkce BA v průběhu malolaktické fermentace (MLF) použitím různých bakteriálních kultur (srovnání přirozených a zaočkovaných MLF kultur) a sledování vlivu doby zrání v dubových sudech. Po MLF došlo ke zvýšení obsahu všech sledovaných BA, včetně putrescinu, u vín se starterovou kulturou byl však tento nárůst výrazně nižší. S dobou zrání se zvyšoval obsah všech BA. Přímý vliv faktorů na produkci BA byl zkoumán například u 2 kmenů bakterie *Oenococcus oeni*. Byl zkoumán vliv pH, obsahu etanolu a kyseliny jablečné, kdy výraznější vliv na produkci putrescinu ornitin dekarboxylázovou dráhou mělo pouze snížení pH (Marques et al., 2008). U bakterie *Lactobacillus hilgardii* X1B byl podrobně analyzován vliv faktorů (čas, teplota, pH, množství etanolu, cukrů a organických kyselin) na produkci putrescinu agmatin deiminázovou cestou. Bylo zjištěno, že nejvyšší produkce putrescinu nastává při pH 4-6; obsah cukrů a argininu pak výrazně inhibují produkci putrescinu, naproti tomu zvýšení koncentrace kyseliny vinné a mléčné zvyšuje produkci putrescinu; přídavek putrescinu pak neměl vliv na produkci putrescinu u tohoto kmene (Arena et al., 2008).

Více informací o vlivu faktorů na vznik BA v potravinách lze najít v přehledových článcích například Chong et al. (2011) a Suzzi a Gardini (2003).

4.8. Metody stanovení putrescinu a agmatinu

Pro stanovení obsahu putrescinu a agmatinu (jako jednoho z prekurzorů putrescinu), či jejich producentů v potravinách, bylo v posledních letech vyvinuto velké množství metod. Nejčastěji používanými jsou metody mikrobiologické založené na použití dekarboxylačního média obsahujícího pH indikátor a aminokyselinu(y) jako prekurzory BA; analytické - hlavně separační metody v různých modifikacích (nejčastěji vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) a kapilární zónová elektroforéza (CZE)) a molekulárně biologické (zahrnující zejména metody polymerázové řetězové reakce (PCR)).

Mnoho autorů se zabývalo zjišťováním obsahu BA v různých typech potravin (za různých podmínek úpravy a skladování) metodami HPLC, tenkovrstvé chromatografie (TLC) a kapilární elektroforézy (CE). Pro bližší přehled analytických metod je možné použít přehledový článek Önal (2007).

Většina autorů stanovovala pouze koncentraci putrescinu, jen málo autorů zařadilo mezi sledované BA i agmatin. Pro potvrzení faktu, že putrescin je v potravinách produkován více metabolickými drahami, je důležitý právě důkaz přítomnosti meziprojektu agmatinu (meziprojekt arginin dekarboxylázových

drah). Agmatin v různých vzorcích potravin detekovala řada autorů. Za použití iontově výměnné chromatografie detekovali agmatin v potravinách Buňková et al. (2010a), Saccani et al. (2005), Curriel et al. (2011) a metodou HPLC pak našli agmatin v různých vzorcích potravin také Pons–Sanchez-Cascado et al. (2005), Özogul and Özogul (2007) and Arena and Manca de Nadra (2001).

Nicméně klasické analytické metody nám podávají pouze informaci o již vyprodukovaných množstvích BA. Jiný druh informace nám mohou dát metody molekulární biologie, zejména pak PCR a její modifikace. Tyto metody nám umožňují detekovat přítomnost mikroorganismů, které mají potenciál tyto aminy vytvořit (Landete et al., 2007). Můžeme tedy detekovat potenciální tvorbu BA. Těmito metodami pak také můžeme detekovat přítomnost klíčových genů zapojených v metabolismu jednotlivých BA a zjišťovat, které mikroorganismy jsou v dané potravine za produkci BA zodpovědné (De las Rivas et al., 2005; Landete et al., 2007; Torriani et al., 2008). Dále je možné metodami molekulární biologie zkoumat metabolismus aminů a možnosti jeho ovlivňování; metodou real time PCR je pak možno přímo kvantitativně vyhodnocovat množství přítomných genů/mikroorganismů či sledovat genovou expresi klíčových genů (Fernández et al., 2006; Ladero et al., 2010b; Nannelli et al., 2008). Metodami sledování genové exprese pak můžeme experimentálně sledovat expresi klíčových genů za různých podmínek (Arena et al., 2010), případně sledovat vliv faktorů na expresi těchto genů (Calles-Enríquez et al., 2010).

V metabolismu putrescinu je zahrnuto několik enzymů, které jsou kódovány příslušnými geny (viz tabulka č. 4.2). PCR umožňuje amplifikovat několik molekul cílového genu (DNA templátu) a generovat miliony kopií tohoto sledovaného genu. Takto můžeme detekovat sekvence genů odpovídající zkoumaným enzymům a tím předpovědět, zda daný mikroorganismus má potenciál tvořit BA.

Pro detekci producentů putrescinu bylo vyvinuto pouze několik PCR metod. Většina vyvinutých primerů je určena pro detekci směsi genů kódujícího ornitin dekarboxylázu u gramnegativních i grampozitivních bakterií (Constantini et al., 2006; De las Rivas et al., 2005, 2006, 2007; Marcobal et al., 2005) a pro detekci genu *AguA* kódujícího agmatin deiminázu, která produkuje putrescin z agmatinu u některých LAB a *Pseudomonas* sp. (Coton et al., 2010; Landete et al., 2010; Nannelli et al., 2008). Některé z těchto primerů byly použity také v multiplex PCR pro simultánní detekci více dekarboxylázových genů (Coton et al., 2010; Nannelli et al., 2008, Constantini et al., 2009). V tabulce č. 4.3 je uveden přehled publikovaných primerů, cílové geny a informační zdroj.

PCR primery byly vyvinuty zejména k detekci genu *odc* hlavně u grampozitivních bakterií. Pro detekci genu *odc* u LAB byly vyvinuty primery *odcf/odcr* (Nannelli et al., 2008), *ODC1/ODC2* (Coton et al., 2010),

AODC1/AODC2 (Constantini et al., 2006) a 4/15 (Marcobal et al., 2005). Pro detekci *odc* genů u obou – LAB i enterobakterií byly vyvinuty dvě sady primerů. První z nich navrhli Marcobal et al. (2005); primery 3/16 byly vyvinuty k detekci *odc* genů v LAB stejně tak jako pro *odc* geny u některých gramnegativních bakterií. Posledně zmíněné primery umožňují například detekci *odc* u *Escherichia coli* a *Morganella morganii*. Bohužel však tato sada primerů nedetekovala gen *odc* u *Proteus vulgaris*, u nějž je známo, že je ornitin dekarboxyláza pozitivní. Primer set 3/16 nebyl navržen pro detekci genu *odc* u bakterií rodu *Pseudomonas*. Druhá sada primerů vytvořená pro detekci genů *odc* u LAB i enterobakterií je PUT1-F/PUT1-R (Muñoz et al., 2004). Tento set primerů spolehlivě detekuje přítomnost genů *odc* u enterobakterií, není však určen pro *Pseudomonas*. Fadhlaoui-Zid et al. (2012) prokázali, že tato sada primerů amplifikuje směs genů *speC* a *speF*. Speciální sada primerů PUT2F/PUT2-R byla navržena pro detekci genů u *Pseudomonas* (Muñoz et al., 2004).

Pro detekci genů *aguA* u LAB bylo navrženo několik sad primerů: AGDIfor/AGDIrev (Lucas et al., 2007), agdif/agdir (Nanneli et al., 2008) a AgD1/AgD2 (Coton et al., 2010). Dále byly vyvinuty tři sady primerů pro detekci klastru genů zahrnutých v AgDI dráze pro tři LAB. Tyto primery byly úspěšně použity v multiplex qPCR (Ladero et al., 2012b). Landete et al. (2010) vytvořili set primerů AguA-F/AguA-R k detekci genu *aguA* u LAB a *Pseudomonas* sp. V téže publikaci je prezentována také sada primerů určená pro detekci putrescin transkarbamoylázy (kódováno genem *ptc*) v AgDI dráze u LAB. Speciální sady primerů byly vytvořeny pro odlišení putrescin produkujících (přes AgDI dráhu) a putrescin neprodukujících *Lactobacillus lactis*, a to pomocí detekce přítomnosti inaktivující inzerce (IS983) (Ladero et al., 2011a).

Byly vytvořeny také metody multiplex PCR, které zefektivňují využití těchto primerů v praxi. Například Coton et al. (2010) vyvinuli multiplex PCR se čtyřmi sadami primerů pro simultánní detekci tyrozin dekarboxylázy, histidin dekarboxylázy, ODC (za použití ODC1/ODC2 primerů) a agmatin deiminázy (detekce genu *aguA* za použití AgD1/AgD2 primerů) u LAB. Constantini et al. (2009) použili tři sady primerů pro detekci TDC, HDC a ODC (s primery 16/AODC1u LAB).

Dále byly publikovány také některé qPCR metody pro kvantifikaci producentů putrescinu. Nanneli et al. (2008) a Ladero et al. (2011c) použili primerů agdif/agdir a odcf/odcr pro kvantifikaci LAB produkujících putrescin. Přehled publikovaných primerů nabízí tab. č. 4.3.

Tabulka 4.3 Přehled publikovaných sad primerů, cílové geny a skupiny mikroorganismů.

Set primerů	Cílový gen	Skupina mikroorganismů	Zdroj
3' + 16'	<i>odc</i> (mix <i>speF</i> a <i>speC</i>)	LAB i některé gramnegativní bakterie	Marcobal et al., 2005
4' + 15'	<i>odc</i> (mix <i>speF</i> a <i>speC</i>)	LAB	Marcobal et al., 2005
PUT1-F + PUT1R	<i>odc</i>	LAB, gramnegativní bakterie (kromě <i>Pseudomonas</i> sp.)	Muñoz et al., 2004
PUT2-F + PUT2-R	<i>odc</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	Muñoz et al., 2004
AODC1 + AODC2	<i>odc</i>	LAB	Constantini et al., 2006
agdif + agdir	<i>AguA</i>	LAB	Nanneli et al., 2008
<i>AguA</i> -F + <i>aguA</i> -R	<i>AguA</i>	LAB	Landete et al., 2010
AgD1 + AgD2	<i>AguA</i>	LAB	Coton et al., 2010
<i>ptcA</i> -F + <i>ptcA</i> -R	<i>ptc</i>	LAB	Landete et al., 2010
AgdI1 + AgdI1C	<i>AguA</i>	LAB	
PTC2 + AgDdr	AGDIc	LAB	
AgmSq1 + AgmSq2	AGDIc	LAB	Ladero et al., 2011a
PTC2 + PTC1	<i>AguB</i>	LAB	
IS1+ISCO	<i>IS983</i>	LAB	

5. CÍL PRÁCE

Cílem předkládané dizertační práce bylo vytvoření PCR metody vhodné pro sledování a výzkum metabolických drah syntézy biogenního aminu putrescinu u gramnegativních a grampozitivních producentů vyskytujících se v potravinách. Naplňování tohoto cíle bylo rozděleno na několik fází:

- provést literární rešerši týkající se doposud publikovaných metod zabývajících se PCR metodami určenými k detekci producentů putrescinu,
- testovat některé dříve publikované sady PCR primerů určených pro detekci enzymů zahrnutých v metabolismu putrescinu,
- navrhnout nové vhodné sady primerů určených pro detekci všech důležitých enzymů zahrnutých v produkci putrescinu u gramnegativních a grampozitivních bakterií,
- optimalizovat vhodnou PCR metodu pro použití navržených a zkoušených primerů,
- testovat nové PCR primery na vhodné skupině mikroorganismů (sbírkové kmeny, kmeny získané z různých druhů potravin),
- porovnat výsledky PCR s kvantitativními výsledky HPLC,
- sekvenovat PCR produkty za účelem potvrzení specifičnosti navržených sad primerů.

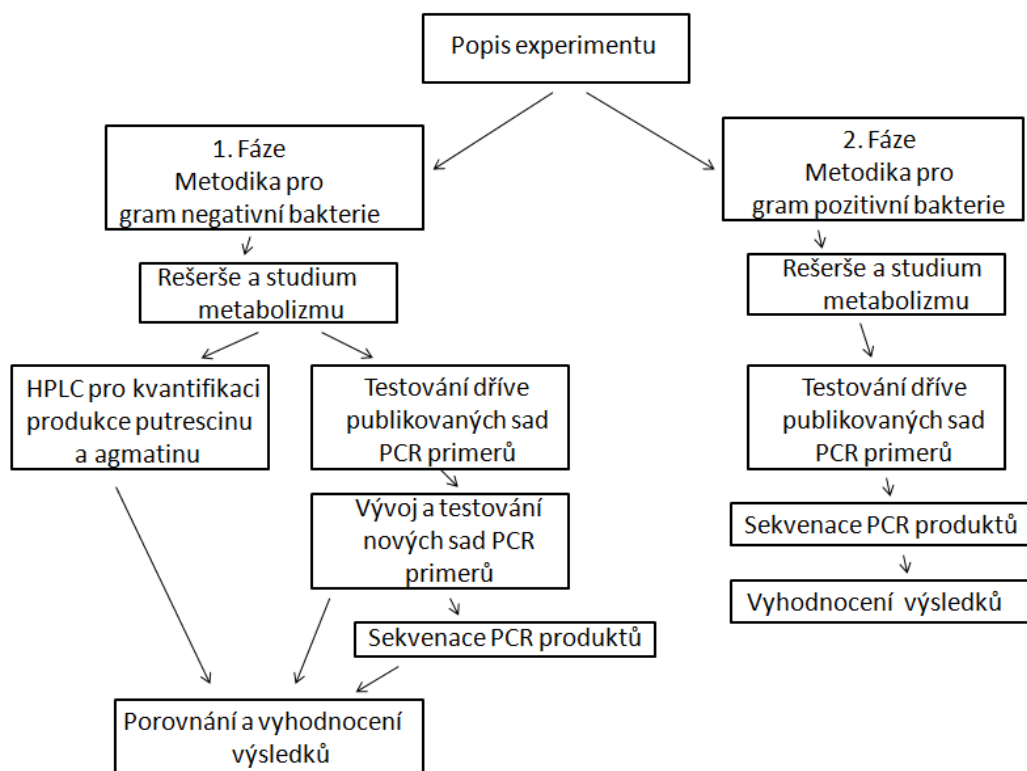
6. ZVOLENÉ METODY ZPRACOVÁNÍ

Do současnosti (12/2013) nebyla publikována ucelená metoda pro sledování metabolické produkce putrescinu v putrescin produkujících mikroorganismech. Z tohoto důvodu se předložená práce zabývá návrhem na vytvoření a testování nové molekulárně biologické metody pro výše zmíněné účely. V předkládané práci je prezentován postup vývoje nových primerů pro PCR a vytvoření PCR metody umožňující detekci a sledování produkce putrescinu všemi metabolickými drahami u široké škály bakterií. Součástí práce je i praktická aplikace nově vytvořené metody na bakterie izolované ze vzorků potravin. Ověření správnosti výsledků bylo provedeno sekvenací PCR produktů. Skutečná produkce putrescinu (a také agmatinu) testovanými mikroorganismy byla sledována metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

Dizertační práce sestává ze dvou základních částí (viz obrázek č. 6.1), které probíhaly v několika krocích. První fáze byla zaměřena na vývoj metodiky k detekci genů zahrnutých v metabolismu putrescinu u gramnegativních bakterií. Ve druhé části pak byla testována možnost využití dříve publikovaných metod pro detekci genů zahrnutých v metabolismu putrescinu u grampozitivních bakterií.

Prvním krokem v obou fázích práce bylo podrobné teoretické studium metabolismu putrescinu u studovaných bakterií (gramnegativních i grampozitivních), vytvoření rešerše již publikovaných PCR metod zaměřených na detekci putrescinu a shromažďování a porovnávání nukleotidových sekvencí sledovaných genů. Na základě jejich porovnání bylo navrženo několik nových sad primerů, které byly nejprve teoreticky testovány nástrojem PrimerBlast. Navržené nukleotidové sekvence sad primerů byly vloženy do programu PrimerBlast, který v genových databázích vyhledává sekvence, na něž testované primery teoreticky nasedají, a vygeneruje seznam úseků genů, které by byly touto sadou primerů amplifikovány. Mezi nalezenými sekvencemi pak bylo nutno vyhledat sledované geny a ověřit, zda byly nalezeny u všech cílových skupin mikroorganismů.

Nejlépe vyhodnocené sady primerů byly následně syntetizovány a laboratorně testovány pomocí PCR s DNA producentů putrescinu, stejně tak byly testovány i dříve publikované sady primerů za účelem zjištění jejich vhodnosti pro studium metabolismu putrescinu. Tato část taktéž zahrnovala nalezení nejvhodnějších podmínek PCR. Vybrané produkty PCR pak byly purifikovány a zaslány na sekvenační analýzu pro potvrzení specifčnosti navržených primerů. Získané výsledky byly porovnány s kvantitativními výsledky získanými metodou HPLC a s databázemi metabolických drah pro jednotlivé bakteriální kmeny.



Obr. 6.1: Popis experimentu

6.1. Bakteriální kmeny

V této práci bylo použito třicet dva kmenů gramnegativních bakterií a dva kmeny grampozitivních bakterií. Tyto kmeny byly známy produkcí putrescinu na základě dřívějšího testování (Buňková et al., 2010a, 2010b). Jejich seznam a původ je zobrazen v tabulce č. 6.1.

Dvacet čtyři gramnegativních kmenů bylo získáno z České sbírky mikroorganismů (CCM - Czech Collection of Microorganisms, Brno, Česká republika) a Sbírkou zoopatogenních mikroorganismů Výzkumného ústavu veterinárního lékařství (CAPM - Collection of Animal Pathogenic Microorganisms, Brno, Česká republika).

Jako reálné vzorky bylo použito jedenáct kmenů, které byly v předchozích pracích izolovány ze sýrů, masných výrobků a pochoutkových salátů. Jednalo se o osm gramnegativních a dva grampozitivní kmeny ze Sbírkou mikroorganismů Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí, Fakulty technologické, Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně (DEPE - Department of Environmental Protection Engineering, Zlín, Česká republika). Pro negativní kontrolu bylo použito osm kmenů bakterií (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CCDM 66, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48, *Staphylococcus aureus*

subsp. *aureus* CCM 3953 a *Enterococcus faecalis* CCM 4224, *Klebsiella* sp. DEPE 069, *Aeromonas hydrophila* DEPE 28, *Pseudomonas fragi* DEPE 19, *Pantoea* sp. DEPE 21), u nichž bylo dřívějšími studiemi potvrzeno, že nejsou producenty putrescinu.

Všechny bakteriální kmeny byly pro případné indukování dekarboxylační aktivity třikrát inkubovány po dobu 24 hodin při 30 ± 1 °C v příslušném dekarboxylačním médiu s 0,2 % w/v každé aminokyseliny (lyzin, histidin, tyrozin, arginin, ornitin; Sigma, USA). Použitá kultivační média byla následující: Nutrient Broth (HiMedia, Bombai, Indie) pro stafylokoky, enterokoky a gramnegativní tyčinky, pro laktokoky M17 Broth (Oxoid, GB) a pro laktobacily MRS Broth (Oxoid).

6.2. Izolace bakteriální DNA

Mikrobiální DNA byla izolována z bakteriální biomasy (2 ml) ve stacionární růstové fázi izolačním kitem UltraClean® DNA Isolation Kit (MO-BIO Laboratories, USA) dle přiloženého návodu.

Vyizolované vzorky DNA byly do doby testování uloženy v mrazicím boxu při -18°C do doby použití, následně byly použity pro testování primerů v PCR.

6.3. Návrh primeru

V GeneBank (Benson et al., 2013) byly nalezeny kompletní genomy 55 gramnegativních bakterií zahrnující běžné kontaminanty potravin a z nich byly vybrány nukleotidové sekvence zkoumaných genů. Sekvence byly vždy vybírány tak, aby seznam byl paritní; při vyšším počtu zastoupení jednotlivých druhů byl příslušný počet vybrán náhodně. Seznam těchto mikroorganismů a použitých referenčních sekvencí uvádí příloha A.

Tyto nukleotidové sekvence pro každý gen byly porovnány za použití algoritmu ClustalW (Larkin et al., 2007). Soubory porovnaných sekvencí byly zkoumány a editovány pomocí programu Jalview (Waterhouse et al., 2009), který umožňuje editovat, vizualizovat a analyzovat nukleotidové sekvence.

Tabulka 6.1 Seznam mikroorganismů použitých v dizertační práci

<i>Escherichia coli</i> CCM 3954	
<i>Escherichia coli</i> CAPM 6101	
<i>Escherichia coli</i> CAPM 6104	
<i>Escherichia coli</i> CAPM 6114	
<i>Escherichia coli</i> DEPE* 64	
<i>Escherichia coli</i> DEPE* 99	
<i>Salmonella enterica</i> CAPM 4420	
<i>Salmonella enterica</i> CAPM 5439	
<i>Salmonella enterica</i> CAPM 5967	
<i>Salmonella enterica</i> CAPM 6324	
<i>Enterobacter aerogenes</i> CAPM 5634	
<i>Enterobacter aerogenes</i> CCM 2531	
<i>Citrobacter freundii</i> CCM 7187	
<i>Proteus mirabilis</i> CCM 7188	
<i>Proteus vulgaris</i> DEPE* 18	
<i>Serratia marcescens</i> CCM 303	
<i>Serratia marcescens</i> DEPE* 3	
<i>Serratia marcescens</i> DEPE* 4	
<i>Pantoea</i> sp. DEPE* 52	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CAPM 6241	
<i>Klebsiella</i> sp. DEPE* 98	
<i>Klebsiella oxytoca</i> CCM 2934	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955	
<i>Pseudomonas fluorescens</i> CCM 2798	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CAPM 5707	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CAPM 5718	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CAPM 5712	
<i>Yersinia enterocolitica</i> CCM 7204	
<i>Yersinia enterocolitica</i> CAMP 6154	
<i>Yersinia ruckeri</i> CAPM 6095	
<i>Yersinia enterocolitica</i> DEPE* 88	
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> CCM 1008	
<i>Lactobacillus curvatus</i> * AI-2	
<i>Lactobacillus curvatus</i> * AI-3	
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> CCDM 66	
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 48	
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> CCM 3953	
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	
<i>Aeromonas hydrophila</i> DEPE* 28	
<i>Pseudomonas fragi</i> DEPE* 19	
<i>Pantoea</i> sp. DEPE* 21	
<i>Klebsiella</i> sp. DEPE* 069	
* kmeny izolované ze vzorků potravin	

Program Jalview byl použit s cílem zjistit fylogenetickou příbuznost těchto genů vytvořením fylogenetického stromu a editovat soubory porovnaných sekvencí. V programu byly identifikovány a eliminovány významně nekorespondující sekvence a byl vytvořen vyvážený soubor sekvencí (tak, aby určité typy sekvencí nepřevládaly nad jinými), což je velmi důležitý krok před započítáním návrhování sekvence degenerovaných univerzálních primerů pro určitou skupinu sekvencí.

Po vytvoření vhodného souboru nukleotidových sekvencí pro každý gen byl tento soubor vložen do programu GeneFisher2 (Giegerich et al., 1996), který na základě souboru sekvencí a po optimalizaci nastavených parametrů navrhnul vhodné sady univerzálních primerů (konsenzuálních primerů za použití degenerací). Vstupní parametry programu byly nastaveny následovně (viz obrázek č. 6.2):

- obsah guaninu a cytozinu 30-80%
- annealingová teplota T_m 54-70 °C
- velikost produktu 150-1000bp
- degenerace 4 krát
- délka 3' konce 4 bp
- obsah guaninu a cytosinu (GC) na 3' konci 45-100%

Výstupem programu je návrh sad konsenzuálních primerů (obrázek č. 6.3). Jak je vidět z obrázku 6.3, program používá tzv. degenerované báze. Vzhledem k tomu, že se snažíme nalézt univerzální sady primerů vhodné k detekci genů u široké škály bakterií, je nutno (kvůli odlišnostem v nukleotidových sekvencích) některé nukleotidy nahradit degenerovanou bází. Degenerace v podstatě znamená, že na dané pozici je více možných bazí, v zápisu sekvence se degenerace vyjádří pomocí písmenného kódu (tabulka č. 6.2). Reálně se potom jedná o směs primerů, které se liší bázemi právě na pozici degenerovaného nukleotidu/nukleotidů.

Navržené sady primerů (3 až 20 sad primerů pro každý gen) byly následně testovány *in-silico* nástrojem PrimerBlast (obrázek č. 6.4), který simuluje průběh PCR a podává informace o tom, které sekvence (uložené ve veřejných databázích) by byly navrženou sadou primerů detekovány. Do programu jsou vkládány různé varianty primerů, neboť je nutno nahradit „degenerované“ báze bázemi skutečnými. Takto vznikne mnoho kombinací různých variant kódujících a antikódujících primerů, z nichž je potřeba náhodně několik vybrat, teoreticky otestovat a nalézt vhodné kombinace.

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

Obr. 6.2: Ukázka zadávání vstupních parametrů programu GeneFisher používaného pro návrh primerů

Tabulka 6.2 Označení degenerací a jejich význam

Označení degenerace	N	V	D	B	R	Y	M	K	S	W
Význam	A,C, G,T	G,A,C	G,A,T	G,T,C	A,G	C,T	A,C	G,T	G,C	A,T

Primer Calculation Results

(get more detailed information by clicking in the pairs position)

8 best Pairs (of max. 185)						
Pair-ID	Forward Primer	Reverse Primer	Qual.	Prod. Len.	T _m Diff.	FPPos. RPPos.
1	TGGAAACCGCRCGTAACC	GGATAGAAAYGGGCTGGTG	589	476	3	806 1264
2	GGAAACCGCRCGTAACCC	GGATAGAAAYGGGCTGGTG	588	475	4	807 1264
3	TGGAAACCGCRCGTAACC	GATAGAAAYGGGCTGGTGG	588	475	3	806 1263
4	GGAAACCGCRCGTAACCC	GATAGAAAYGGGCTGGTGG	587	474	4	807 1263
5	GAAACCGCRCGTAACCCG	GGATAGAAAYGGGCTGGTG	587	474	5	808 1264
6	TGGAAACCGCRCGTAACC	TAGAAAYGGGCTGGTGGAG	586	473	2	806 1261
7	TGGAAACCGCRCGTAACC	AGAAYGGGCTGGTGGAGG	586	472	0	806 1260
8	GAAACCGCRCGTAACCCG	GATAGAAAYGGGCTGGTGG	586	473	5	808 1263

Obr. 6.3: Ukázka výstupu programu GeneFisher2 (tabulka navržených primerů)

The screenshot shows the Primer-BLAST web interface. At the top, it says "Primer-BLAST A tool for finding specific primers". Below that, there are navigation links: "NCBI/ Primer-BLAST: Finding primers specific to your PCR template (using Primer3 and BLAST). More... Tips for finding specific primers".

The main section is titled "PCR Template" and includes a "Reset page", "Save search parameters", and "Retrieve recent results" button. It has a text input field for "Enter accession, gi, or FASTA sequence (A refseq record is preferred)" with a "Clear" button. To the right, there is a "Range" section with "From" and "To" input fields for "Forward primer" and "Reverse primer", each with a "Clear" button. Below this is an "Or, upload FASTA file" section with a file upload button labeled "Procházet...".

The "Primer Parameters" section includes:

- "Use my own forward primer (5'→3' on plus strand)" with input "CAAcTTCTCGgTGTTCCAG" and a "Clear" button.
- "Use my own reverse primer (5'→3' on minus strand)" with input "TCaCCaAACAGGTTGTGC" and a "Clear" button.
- "PCR product size" with "Min" (70) and "Max" (1000) input fields.
- "# of primers to return" with input "5".
- "Primer melting temperatures (T_m)" with "Min" (57.0), "Opt" (60.0), "Max" (63.0), and "Max T_m difference" (3) input fields.

The "Exon/intron selection" section has a note: "A refseq mRNA sequence as PCR template input is required for options in the section". It includes an "Exon junction span" dropdown menu set to "No preference".

Obr. 6.4: Ukázka použití nástroje PrimerBlast; zadání sekvencí primerů pro jejich teoretické in-silico testování

Výstupem nástroje PrimerBlast je výpis teoretických PCR produktů, detekovaných genů (a organismů), které byly nalezeny v genových bankách a byly by navrženou sadou detekovány (obrázek č. 6.5). Sady primerů, které v teoretickém testování poskytovaly u všech cílových skupin mikroorganismů pouze produkty očekávané velikosti (velikost produktů PCR byla dána programem GeneFisher2), byly vybrány pro další práci (3-7 párů primerů pro každý gen). Primery byly dodány firmou KRD - obchodní společnost s.r.o., Česká republika.

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%
Forward primer	CAACTTCTCGGTGTCCAG	19	55.88	52.63
Reverse primer	TCACCAAACAGGTTGTGC	18	55.71	50.00

Products on target templates

>[NC_019905.1](#) Pseudomonas putida HB3267, complete genome

product length = 282

Features associated with this product:

[mercuric reductase](#)

[arginine decarboxylase](#)

```
Forward primer 1      CAACTTCTCGGTGTCCAG  19
Template       763231  .....                763249
```

```
Reverse primer 1      TCACCAAACAGGTTGTGC  18
Template       763512  .....G.....        763495
```

>[NC_019670.1](#) Pseudomonas putida UW4 chromosome, complete genome

product length = 282

Features associated with this product:

[arginine decarboxylase](#)

```
Forward primer 1      CAACTTCTCGGTGTCCAG  19
Template       645731  .....                645749
```

```
Reverse primer 1      TCACCAAACAGGTTGTGC  18
Template       646012  .....G.....        645995
```

>[NZ_CM001561.1](#) Pseudomonas fluorescens R124 chromosome, whole genome shotgun sequence

product length = 282

Obr. 6.5: Výstup programu PrimerBlast; ukázka pro sadu primerů *adcF/adc5F*. Výstup obsahuje názvy mikroorganismů, délky produktů (product length) a název kódovaného proteinu (v tomto případě arginin dekarboxyláza).

6.4. Touch-down PCR

Přítomnost zkoumaných genů v testovaných bakteriálních kmenech byla zjišťována pomocí touch-down PCR (TD-PCR) s navrženými sadami primerů. Reakční směs pro PCR (celkový objem 15 μ l) obsahovala následující komponenty: 2 μ mol/l každého primeru, 200 μ mol/l dNTP (TopBio, Česká Republika), 2U *Taq* polymerázy (New England Biolabs, USA), 1 μ l genové DNA a 2,5 μ l 10xThermoPol reakčního PCR pufru (New England Biolabs, USA). Reakce TD-PCR byly provedeny na přístroji PTC-200 DNA Engine thermocycler (MJ Research, USA). Pro metodu touch-down PCR bylo využito následující nastavení (vypočteno dle Don et. al. (1991), pro T_m 58°C): počáteční denaturace 94 °C/10 min, následuje 30 cyklů 94 °C/30 s, 62 °C/1 min, 72 °C/1 min; při nichž se annealingová teplota snižuje o jeden stupeň Celsia v každém druhém cyklu. Annealingová teplota tedy klesá od 61 do 47 °C, program je zakončen závěrečnou extenzí 72 °C/5 min. Stejně podmínky byly použity také při multiplex-PCR.

PCR produkty byly následně vizualizovány v 1,5 % (w/v) agarozovém gelu (Lonza, Švýcarsko) po 1 h při 90V v 0.5x TBE pufru (Fluka, Švédsko), barveny ethidium bromidem (0,5 μ g/ml) (SERVA, Německo). Gel byl dokumentován pomocí dokumentačního systému InGeniusLMR (Syngene, Anglie).

6.5. Sekvence PCR produktů

Vybrané produkty PCR (amplikony) byly purifikovány purifikačním kitem QIA PCR Purification Kit (QIAGEN, Německo) a zaslány na sekvenaci (Ústav molekulární biologie rostlin, Akademie věd České Republiky, České Budějovice). Porovnání získaných sekvencí s dostupnými veřejnými databázemi bylo provedeno použitím nástroje Blast (National Centre for Biotechnology Information - NCBI).

6.6. Chromatografické stanovení obsahu putrescinu a agmatinu

Všechny použité bakterie byly testovány na produkci putrescinu a agmatinu metodou HPLC. Všechny kmeny byly kultivovány 12 a 24 hodin při 30 \pm 1°C v dekarboxylačním mediu. Dekarboxylační bujón obsahoval příslušné živné medium (HiMedia, Indie), prekurzory biogenních aminů (lyzin, histidin, tyrozin, ornitin, arginin; SigmaAldrich, USA) v koncentraci 2,0 g/l (každý prekurzor, byla použita směs všech aminokyselin). Každý mikroorganismus byl kultivován 4 krát po dobu 12 a 24 hodin. Počáteční pH v dekarboxylačním mediu bylo upraveno 0,1 mol/l HCl (Merck, Německo)

na hodnoty mezi 5,7 až 5,9. Počáteční koncentrace testovaných bakterií (v inokulu) byla v rozmezí $5,1-7,3 \cdot 10^6$ CFU/ml.

Obsah putrescinu a agmatinu byl analyzován podle García-Marino et al. (2010) s několika modifikacemi. Bujón byl po kultivaci centrifugován (20.000 g po dobu 30 min) a filtrován přes 0,22 μm filtr. Pět set mikrolitrů filtrátu bylo smícháno s 800 μl borátového pufru (0,4 mol/l pH=10,0) (SigmaAldrich, USA) a 100 μl roztoku interního standardu (L-norvalin, 100 mg/l) (SigmaAldrich, USA). Tři sta mikrolitrů směsi bylo automaticky smícháno v autosampleru se 100 μl o-ftthalaldehydu (OPA, Agilent Technologies, Inc., USA) (směs 1% OPA a 3-merkaptopropionové kyseliny v 0,4 mol/l borátovém pufru (Agilent Technologies). Po jednodominutové reakci bylo pět mikrolitrů derivatizovaného vzorku automaticky nadávkováno na kolonu (Cogent column HPS C18, 150 x 4.6 mm, 5 μm , Cogent, USA). Použitý chromatografický systém sestával z binární pumpy a autosampleru (LabAlliance, USA); odplyňovací jednotky a fluorescencenčního detektoru (340 nm a 426 nm jako excitační a emisní vlnové délky) a termostatu kolon (Agilent Technologies, Inc., USA).

Chromatografická separace byla provedena za použití gradientové eluce mobilní fáze (A) 0,05 mol/l octan sodný (SigmaAldrich, USA) ve směsi s tetrahydrofuranem (SigmaAldrich, USA) (poměr 99:1, v/v; pH upraveno na 6,6 kyselinou octovou) a mobilní fáze (B) metanol/acetonitril (SigmaAldrich, USA) (50:50, v/v). Putrescin a agmatin byly eluovány podle programu popsáno García-Marino et al. (2010) s mírnou modifikací: 0–13 min, A 70 %; 13–20 min, A 50 %; 20–43 min, A 0 %; průtok 0.6 ml/min. Poté byla kolona regenerována mobilní fází B po dobu 6 min a stabilizována po dalších 8 min směsí mobilních fází A a B (70:30, v/v). Každý ze čtyř připravených bujonů (po 12 hodinách a také po 24 hodinách kultivace) byl derivatizován třikrát ($n = 12$). Homogenita obsahu putrescinu nebo agmatinu po 12 ti hodinách a 24 hodinách byla testována Wilcoxonovým testem (Unistat[®] 5.5 software; Unistat, Velká Británie). Hladina významnosti použitá v testech byla 0,01.

7. HLAVNÍ VÝSLEDKY PRÁCE

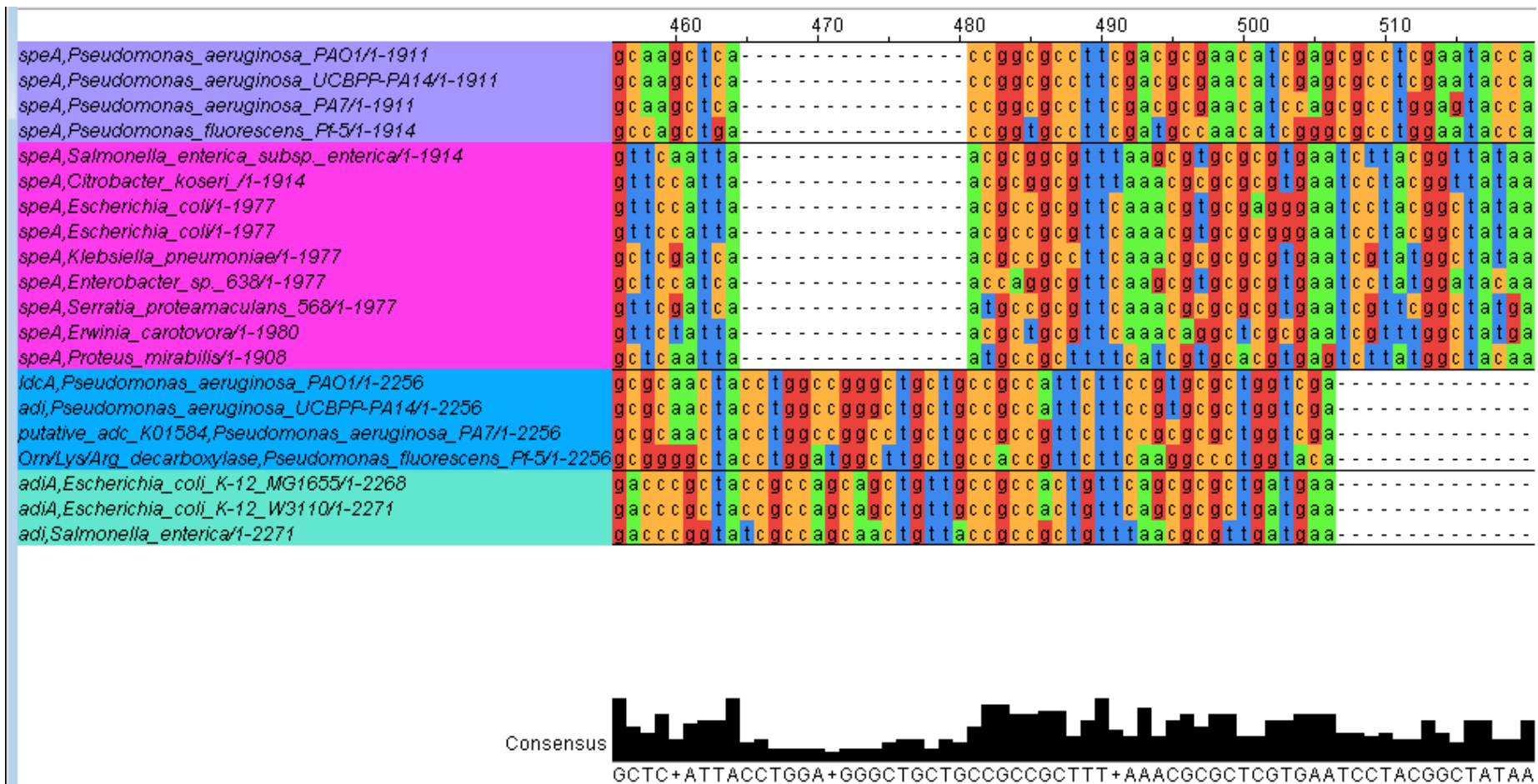
7.1. Výsledky I. fáze

První fáze dizertační práce byla zaměřena na návrhování a testování primerů pro gramnegativní bakterie. Vzhledem k tomu, že bakteriální metabolismus putrescinu u gramnegativních bakterií je poměrně složitý (viz kapitola č. 4.5.1, str. 19) a může zahrnovat až 8 různých enzymů, bylo v první fázi nutno prostudovat metabolismus jednotlivých skupin mikroorganismů, jejich odlišnosti, případně příbuznost. V této fázi jsem se zaměřila na 7 genů kódujících klíčové enzymy zahrnuté v metabolismu putrescinu (viz tabulka č. 4.2). Gen *AguB*, kódující N-karbamoylputrescin amidohydrolázu, se nachází na společném operonu s genem *AguA* a postačí tedy detekce jednoho z nich.

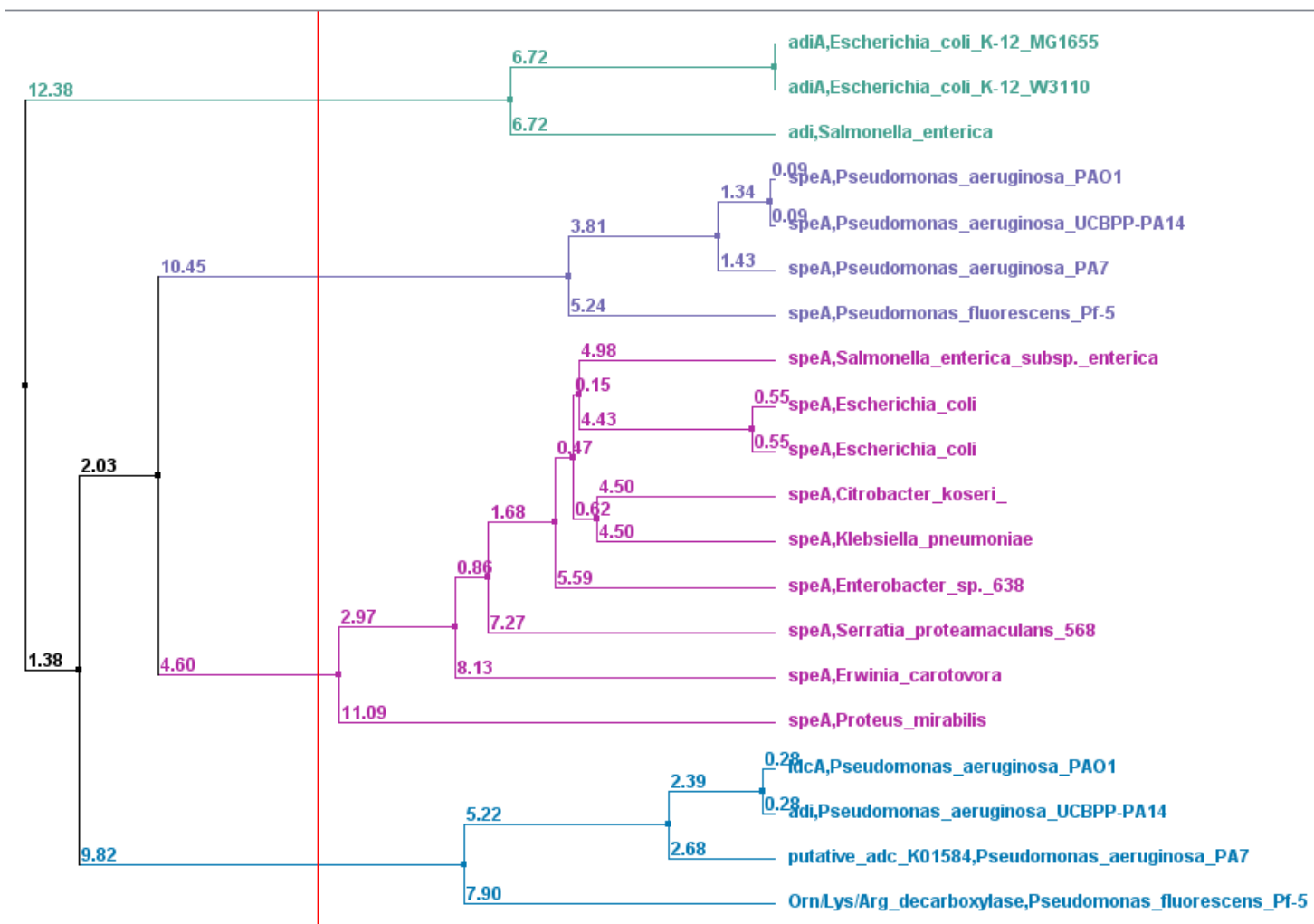
7.1.1. Návrh a testování sad primerů vhodných k detekci genu *speA*

Návrh primerů vhodných k detekci genu speA

Pro vytvoření sad primerů určených k detekci genu *speA*, který kóduje arginin dekarboxylázu (biosyntetickou) u gramnegativních bakterií, byly nejprve z GeneBank vybrány vhodné nukleotidové sekvence. Protože se u gramnegativních bakterií vyskytuje více typů arginin dekarboxyláz (viz kapitola č. 4.5.1, str. 19), bylo nejdříve přistoupeno ke zjištění příbuznosti/odlišnosti jejich nukleotidových sekvencí. Z GeneBank bylo vybráno několik sekvencí kódujících biosyntetickou arginin dekarboxylázu (*speA* geny), biodegradativní arginin dekarboxylázu (geny *adiA*) a pravděpodobnou arginin dekarboxylázu vyskytující se u bakterií rodu *Pseudomonas* (geny označovány *adi*, *ldc* či *orn/lys/arg* putative decarboxylase). Tyto tři sady byly porovnány algoritmem ClustalW a po porovnání byly vizualizovaný v programu Jalview (obrázek č. 7.1). V tomto programu byl také vytvořen fylogenetický strom (obrázek č. 7.2), který zcela zřetelně ukazuje na fylogenetickou odlišnost těchto tří skupin genů. Z obrázků č. 7.1 a 7.2 je zřejmé, že geny kódující různé arginin dekarboxylázy tvoří 4 odlišné skupiny (na obrázcích č. 7.1 a 7.2 barevně odlišeny, podrobněji viz následující text).



Obr. 7.1: Ukázka porovnání sekvencí genů *speA*, *adiA* a *adi* kódujících různé formy arginin dekarboxylázy. Barevné odlišení vystihuje příbuznost nukleotidových sekvencí. Pro podrobnější vysvětlení viz text.



Obr. 7. 2: *Fylogenetický strom – porovnání nukleotidových sekvencí genů speA, adiA a adi z různých gramnegativních bakterií.*

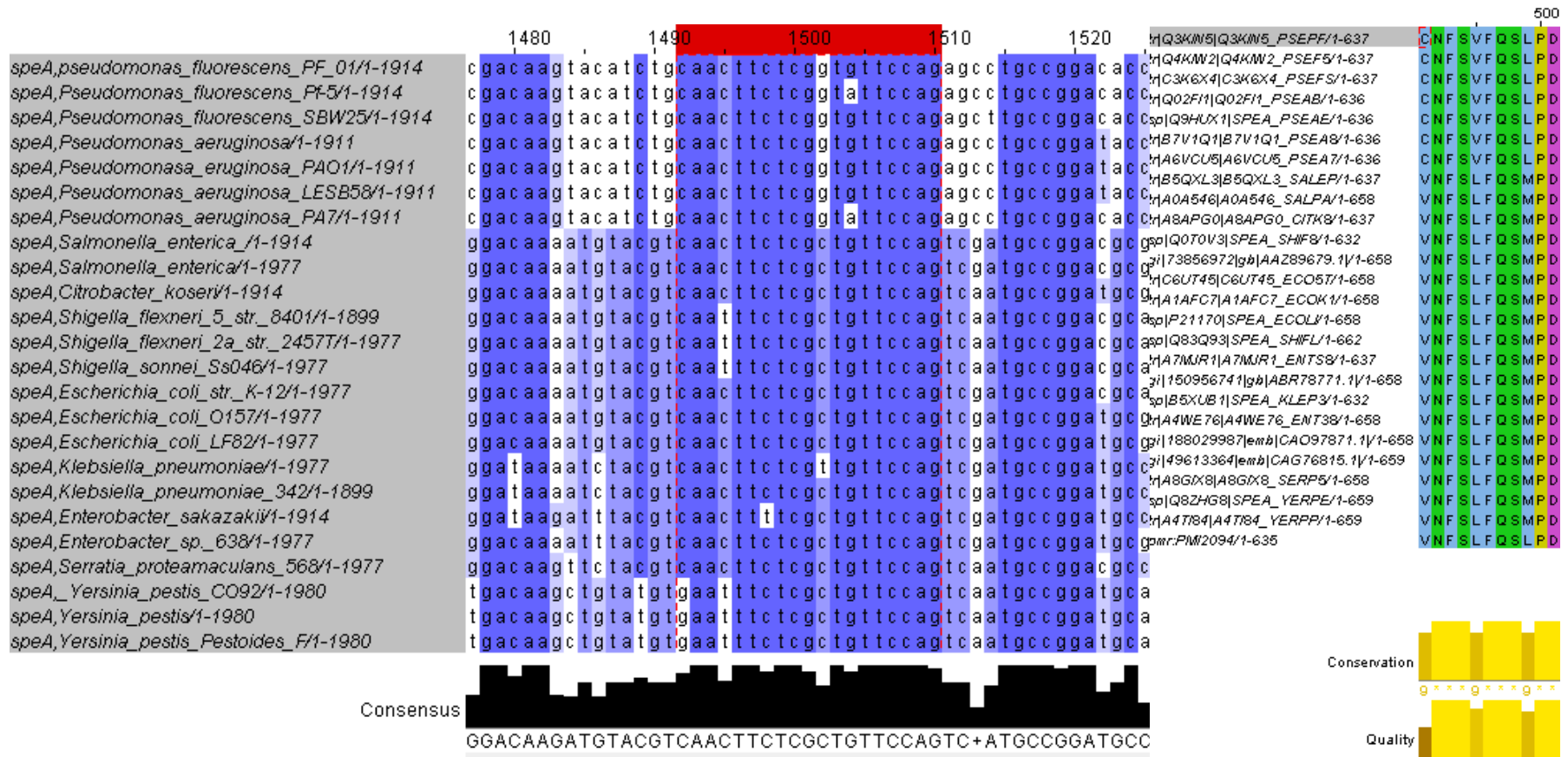
Podle fylogenetického stromu sestrojeného na základě procentní shody nukleotidových sekvencí je vidět, že nejodlišnější skupinu tvoří geny *adiA* enterobakterií (zelenomodrá barva). Tyto geny kódují biodegradativní formu arginin dekarboxylázy a zcela zřetelně se liší od genů *speA*. Další výrazně se lišící skupinou jsou pak geny pro druhou formu dekarboxylázy (v tabulce i grafu označeny jako *ldc*, *adi*, putative *adc*) u bakterií rodu *Pseudomonas* (modrá barva v obrázcích 7.1 a 7.2). Geny *speA* enterobakterií (růžovo-fialová barva) a *Pseudomonas* sp. (fialová barva) tvoří další dvě skupiny genů. Jejich odlišnost však není až tak velká, a proto byla testována možnost vytvořit univerzální sadu primerů pro detekci obou těchto skupin genů (pro *speA* jak enterobakterií tak *Pseudomonas* sp.).

V této fázi práce pak bylo vybráno a porovnáno 26 sekvencí genu *speA* různých kmenů enterobakterií a pseudomonád (viz příloha A). Sekvence byly vybírány tak, aby vznikl vyvážený soubor, prostý odlehlých sekvencí. Mezi těmito sekvencemi bylo nalezeno několik konzervovaných sekvencí, tj. sekvencí vyznačujících se vysokým stupněm shody (obrázky č. 7.3 a 7.4), které se ukázaly být vhodné pro návrh univerzálních primerů určených k detekci genů *speA* u obou výše zmíněných skupin bakterií. Sekvence byly vloženy do programu GeneFisher2, který vygeneroval 6 sad primerů, z nichž se v teoretickém testování algoritmem PrimerBlast pouze dvě sady ukázaly být vhodné pro detekci genu *speA* u všech výše zmíněných skupin gramnegativních bakterií. Tyto dvě sady v teoretickém testování detekovaly pouze produkty očekávané velikosti (280 bp a 825 bp), které kódovaly arginin dekarboxylázu u všech cílových skupin mikroorganismů (enterobakterií i *Pseudomonas* sp.).

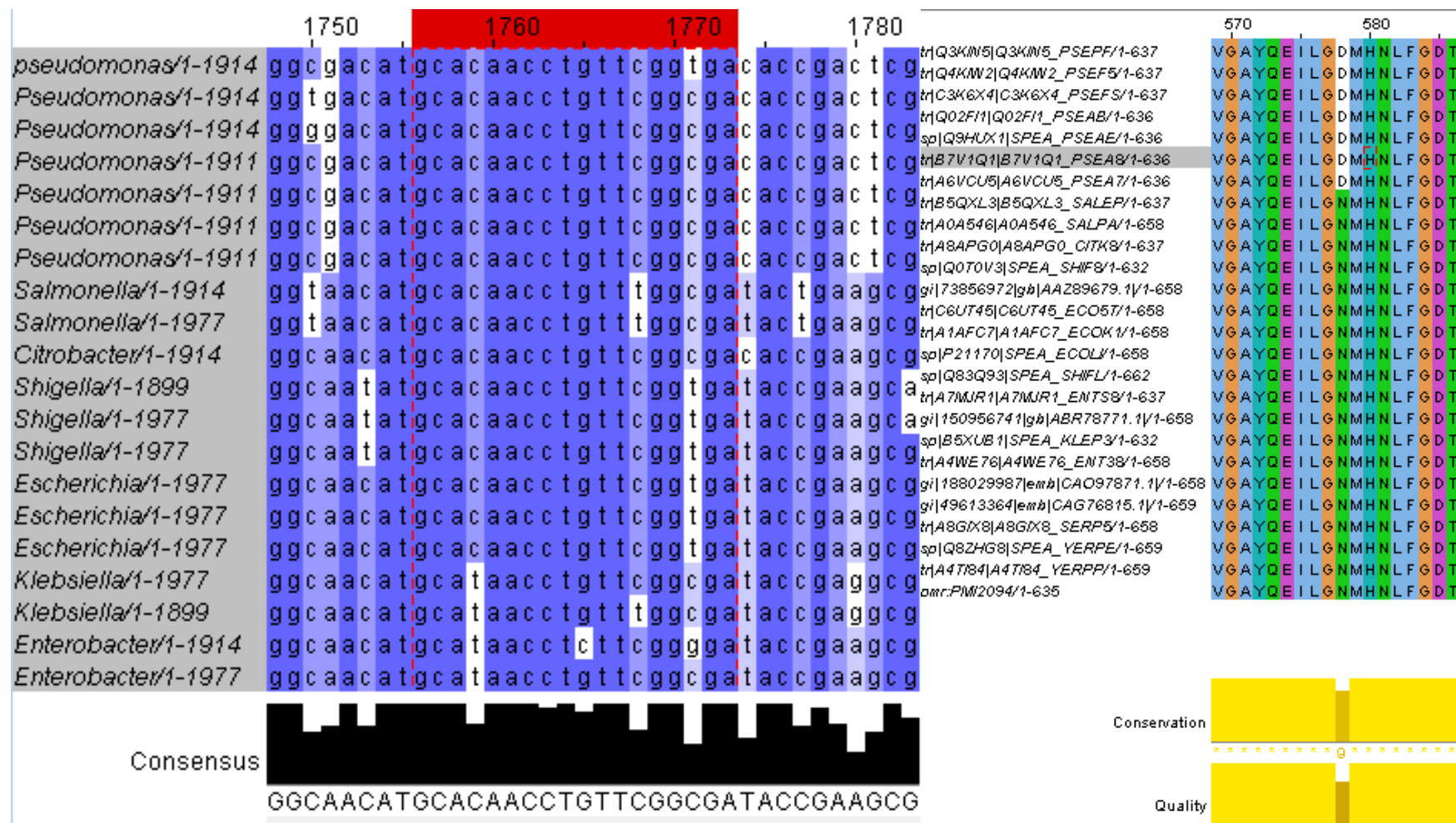
Vzhledem k určité odlišnosti tohoto genu u *Pseudomonas* spp, byly dvě sady primerů navrženy pouze pro detekci genu *speA* u této skupiny bakterií. Další dvě sady byly vhodné pro detekci genu *speA* u enterobakterií. Přehled navržených sad primerů, jejich sekvencí, velikosti produktů a skupin cílových mikroorganismů přináší tabulka č. 7.1.

Tabulka 7.1. Seznam primerů navržených pro detekci genu *speA*, jejich nukleotidové sekvence, velikosti PCR produktů a cílové skupiny mikroorganismů.

	Kódující primer	Antikódující primer	Velikost produktu (bp)	Skupina mikroorganismů
adc1	CGGCACCATCGTCTGCAACGG	GAACTTGGMCTTCTCGCCACCG	233	<i>Pseudomonas</i> sp.
adc2	GGCATGCTCAAGGAGTTCTGCG	GGCTGGTCTCGATGCTCTGCTC	610	<i>Pseudomonas</i> sp.
adc3	TGGGAAACCTGGCAGGARATGC	GGAAGACRAACACRTCAACCG	569	Enterobakterie
adc4	AGYATGTGGGAAACCTGGCAGG	CGGCATYGACTGGAACAGCGAG	291	Enterobakterie
adc5	CAAYTTCTCGSTGTTCCAG	TCRCCRAACAGGTTGTGC	280	Všechny G-
adc6	CWTCGACGTSGGCGGCGG	TCRCCRAACAGGTTGTGC	825	Všechny G-



Obr. 7.3: Porovnání sekvencí genu. Levá část: Porovnání sekvencí genu *speA* u 26 gramnegativních bakterií s vyznačením konzervované sekvence (červený rámeček) použité pro návrh primeru *adc5F*. Shoda mezi sekvencemi je vyjádřena modrou barvou (čím tmavší barva, tím vyšší % shoda). Pravá část: Porovnání sekvencí aminokyselin arginin dekarboxylázy u 26 gramnegativních bakterií, konzervovaná sekvence oblasti primeru *adc5F*. Grafy ve spodní části vyjadřují kvalitu konzervace.



Obr. 7.4: Porovnání sekvencí genu. Levá část: porovnání sekvencí genu *speA* u 26 gramnegativních bakterií s vyznačením konzervované sekvenční (červený rámeček) použité pro návrh primeru *adc5R*. Shoda mezi sekvencemi je vyjádřena modrou barvou (čím tmavší barva, tím vyšší % shoda). Pravá část: Porovnání sekvencí aminokyselin arginin dekarboxylázy u 26 gramnegativních bakterií, konzervovaná sekvenční oblasti primeru *adc5R*. Grafy ve spodní části vyjadřují kvalitu konzervace.

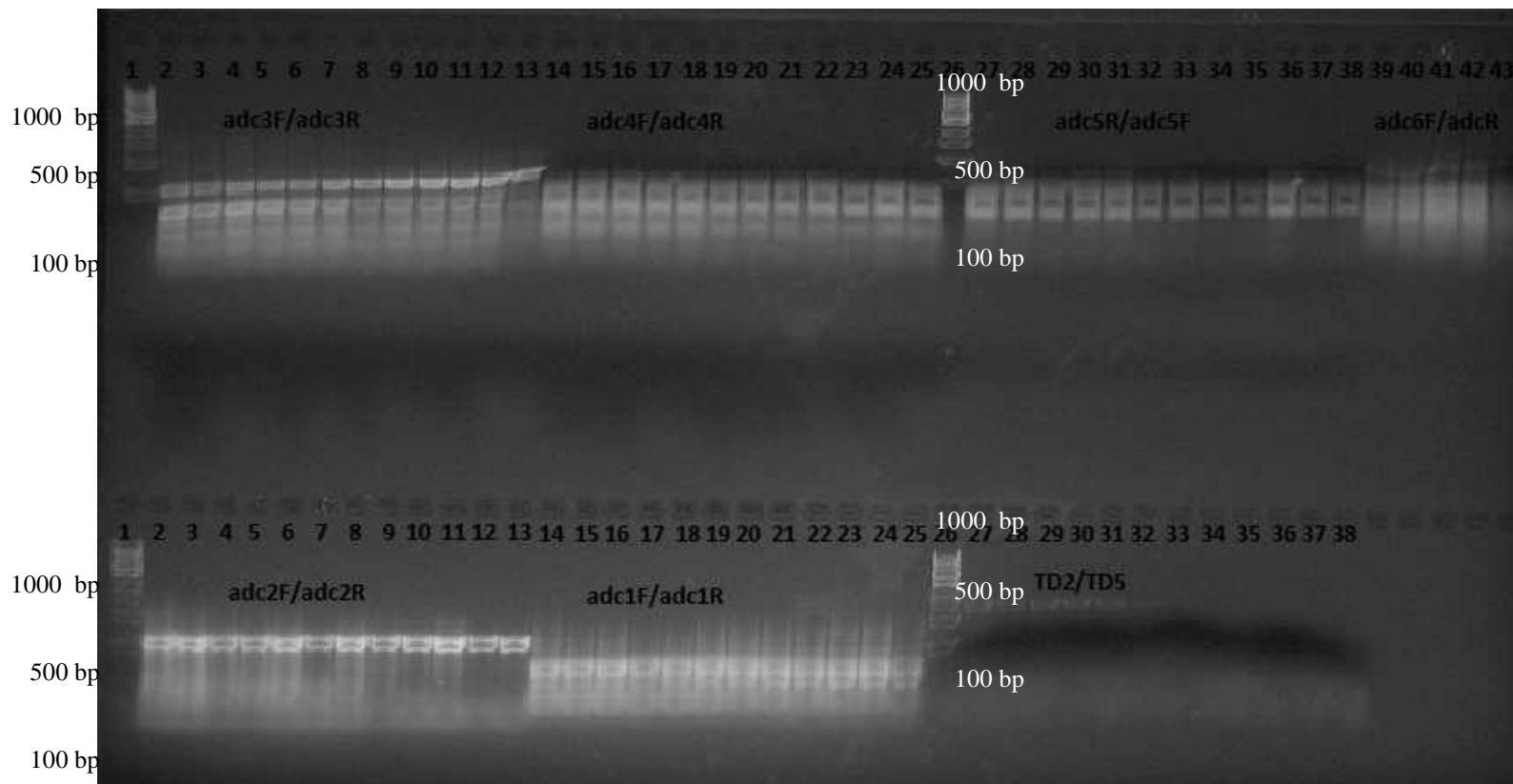
PCR se sadami primerů pro detekci genu speA

Nejprve bylo nutné najít vhodnou metodu PCR (optimalizace podmínek). Vzhledem k tomu, že annealingové teploty (T_m) pro jednotlivé primery byly odlišné (navrženy programem GeneFisher2) a často se odlišovala i navržená T_m pro kódující a antikódující primer, byla vhodná annealingová teplota pro PCR nejprve optimalizována za pomoci PCR v teplotním gradientu. Tato metoda byla aplikována na všech 6 testovaných sad primerů vyvinutých pro detekci genu *speA*. Pro sady primerů *adc1* a *adc2* byla jako templátová DNA použita DNA izolovaná z kmene *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955; pro všechny ostatní sady primerů byla jako templátová DNA použita DNA z kmene *Escherichia coli* CCM 3954. Jako pozitivní kontrola byla použita sada primerů TD2/TD5, u níž bylo dřívějším testováním prokázáno, že s kmenem *E. coli* poskytuje pozitivní PCR reakci (data nejsou uvedena).

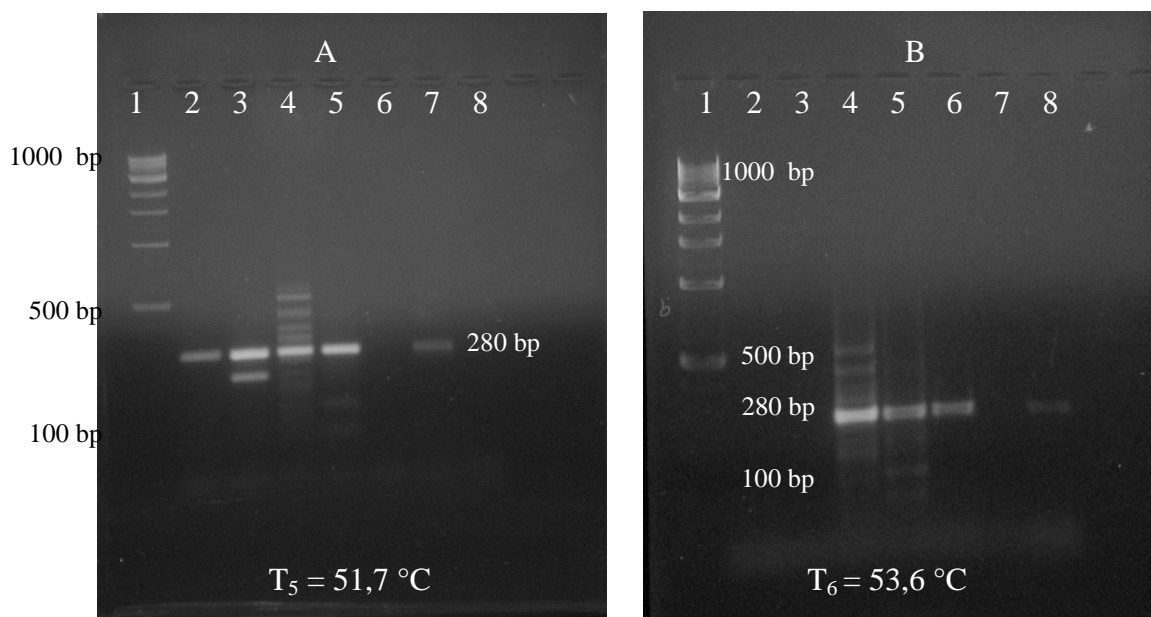
Z obrázku č. 7.5 je patrné, že sady *adc1*, *adc3*, *adc4* a *adc6* poskytují při všech teplotách také nespecifické produkty a nejsou tedy vhodné pro další použití. Sada *adc2* poskytovala pouze produkt očekávané velikosti (610 bp), nicméně jde o sadu navrženou pouze pro detekci genu *speA* u bakterií rodu *Pseudomonas*, což nepostačuje sledovanému cíli. Sada *adc5* poskytovala pouze produkt očekávané velikosti (280 bp) a byla tedy vybrána pro další testování.

Dalším krokem optimalizace metody PCR bylo nalezení vhodné annealingové teploty. Bylo pracováno se sadou primerů *adc5*, pro testování byl použit soubor 7 templátových DNA z různých kmenů gramnegativních bakterií (viz popis u obrázku č. 7.6). Optimalizace však nepřinesla očekávané výsledky. Byla testována PCR s různými annealingovými teplotami, dále byl testován přidavek hořčnatých iontů na pozitivní ovlivnění reakce. Tyto přístupy však nedokázaly omezit výskyt nespecifických produktů. Ukázkou optimalizačního postupu přináší obrázek č. 7.6, na kterém je vidět vznik nespecifických produktů (případně nepřítomnost produktu) s některými templátovými DNA.

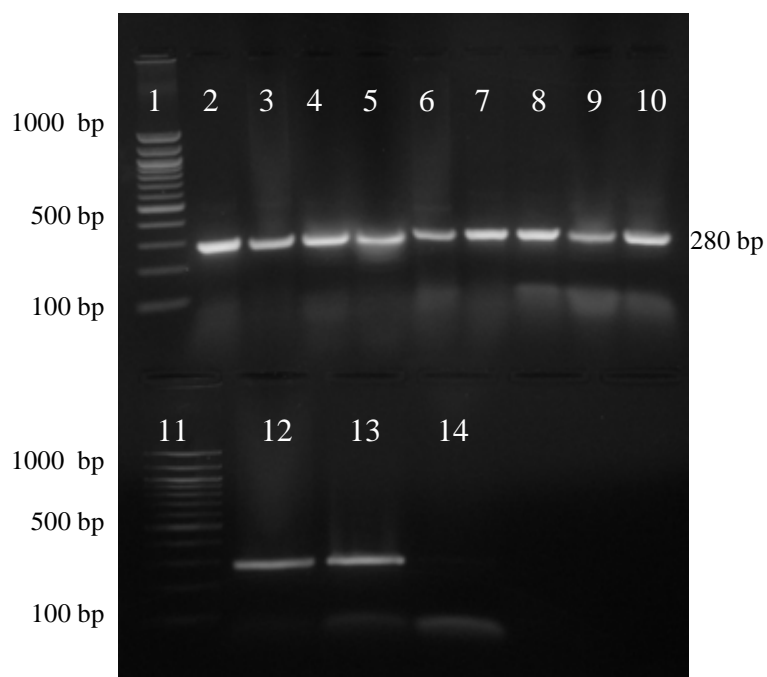
Problém s optimalizací annealingové teploty byl vyřešen aplikací metody touch-down PCR (TD-PCR), která je v literatuře označována za přístup vhodný k omezení vzniku nespecifických produktů (Don et al., 1991). Dle této metody byl teplotní program spočten z annealingové teploty *adc5* primerů ($T_m = 58$ °C). (parametry programu viz kapitola č. 6.4). Tento přístup se ukázal jako velmi vhodný a při testování sady primerů *adc5* s jedenácti různými DNA z výše uvedených bakteriálních kmenů, byly obdrženy pouze očekávané produkty o velikosti 280 bp (obrázek č. 7.7). S ohledem na problematické hledání optimálního teplotního programu PCR a k dobrým výsledkům dosaženým s metodou TD-PCR, byl vypočtený teplotní program TD-PCR používán v celé práci.



Obr. 7.5: PCR mikrobiálních DNA s primery pro detekci genu *AguA*. Metoda teplotního gradientu, T1-T12 (T1=48°C, T2=48,3°C, T3=49,1°C, T4=50,1°C, T5=51,7°C, T6=53,6°C, T7=55,8°C, T8=57,6°C, T9=59°C, T10=60°C, T11=60,8°C, T12=61°C.). Dolní řada: 1 a 26: marker (100 bp); 2-13: sada primerů *adc2F/adc2R*, templátová DNA *Pseudomonas aeruginosa*, teploty T1-12; 14-25: sada primerů *adc1F/adc1R*, templátová DNA *Pseudomonas aeruginosa*, teploty T1-12; 27 – 38: sada primerů TD2/TD5, templátová DNA *Escherichia coli*, teploty T1-12; Horní řada: 1 a 26: marker (100 bp); 2-13 sada primerů *adc3F/adc3R*, templátová DNA *Escherichia coli*, teploty T1-12; 14-25: sada primerů *adc4F/adc4R*, templátová DNA *Escherichia coli*, teploty T1-12; 27-38: sada primerů *adc5F/adc5R*, templátová DNA *Escherichia coli*, teploty T1-12; 38-43: sada primerů *adc6F/adc6R*, templátová DNA *Escherichia coli*, teploty T1-5.

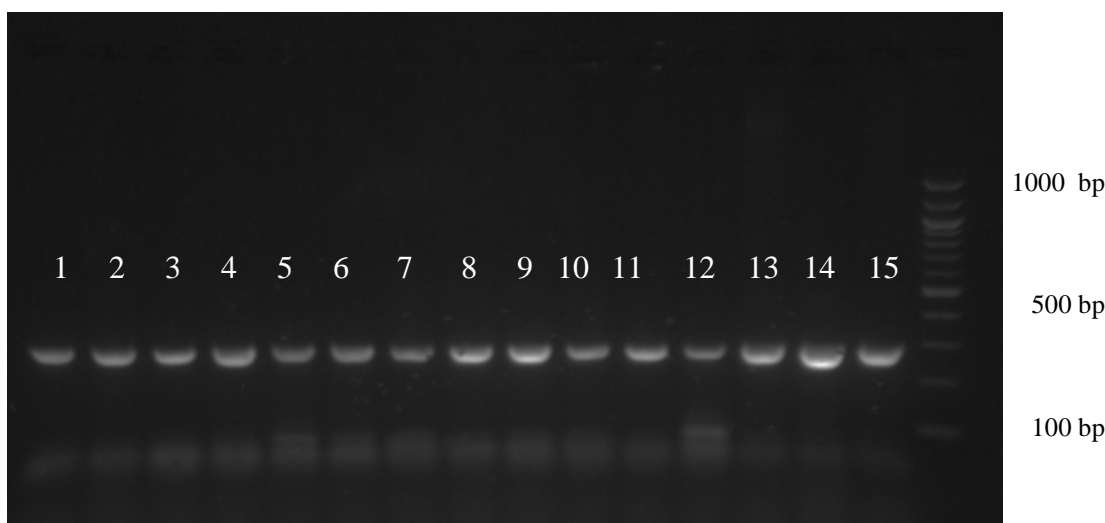


Obr. 7.6: Optimalizace PCR se sadou primerů *adc5F/adc5R*; A - annealingová teplota $T_5 = 51,7 \text{ }^\circ\text{C}$, B - annealingová teplota $T_6 = 53,6 \text{ }^\circ\text{C}$. Použité templátové DNA: 1 - marker (100 bp), 2 - *Escherichia coli* CCM 3954, 3 - *Serratia marcescens* CCM 303, 4 - *Salmonella enterica* CAPM 4420, 5 - *Proteus mirabilis* CCM 7188, 6 - *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955, 7 - *Pseudomonas fluorescens* CCM 2798, 8 - slepý vzorek – DNA nahrazena vodou.



Obr. 7.7: Touch-down PCR se setem primerů *adc5F/adc5R*; 1 a 11 – marker (100 bp); 2 - *Escherichia coli* CCM 3954, 3 - *Enterobacter aerogenes* CCM 2531, 4 - *Serratia marcescens* CCM 303, 5 - *Salmonella enterica* CAPM 4420, 6 - *Proteus mirabilis* CCM 7188, 7 - *Klebsiella oxytoca* CCM 2934, 8 - *Citrobacter freundii* CCM 7187, 9 - *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955, 10 - *Pseudomonas fluorescens* CCM 2798, 12 - *Pectobacterium carotovorum* CCM 1008, 13 - *Yersinia enterocolitica* CCM 7204, 14 - slepý vzorek – DNA nahrazena vodou.

Sada primerů *adc5* byla testována celkem s 32 kmeny gramnegativních bakterií. Výsledky PCR přináší tabulka č. 7.2, která je souhrnem nejdůležitějších výsledků I. fáze dizertační práce. Obrázek č. 7.8 zobrazuje výsledek TD-PCR s templátovými DNA izolovanými z dalších 16 bakteriálních kmenů.



Obr. 7.8: Touch-down PCR se sadou primerů *adc5F/adc5R*; 16 – marker (100bp); 1 - *Escherichia coli* CAPM 6101, 2 - *Escherichia coli* CAPM 6104, 3 - *Escherichia coli* CAPM 6114, 4 - *Salmonella enterica* CAPM 5439, 5 - *Salmonella enterica* CAPM 5967, 6 - *Salmonella enterica* CAPM 6324, 7 - *Enterobacter aerogenes* CAPM 5634, 8 - *Klebsiella pneumoniae* CAPM 6241, 9 - *Pseudomonas aeruginosa* CAPM 5707, 10 - *Pseudomonas aeruginosa* CAPM 5718, 11 - *Pseudomonas aeruginosa* CAPM 5712, 12 - *Yersinia enterocolitica* CAMP 6154, 13 - *Yersinia ruckeri* CAPM 6095, 14 - *Escherichia coli* DEPE 64, 15 - *Escherichia coli* DEPE 99.

7.1.2. Návrh a testování sad primerů vhodných k detekci genu *adiA*

Návrh primerů vhodných k detekci genu adiA

Některé enterobakterie, jako např. *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Yersinia pestis*, nebo *Pseudomonas* sp. mají také další formy arginin dekarboxylázy (Kieboom and Abee, 2006; Lee et al., 2006; Sher and Mallette, 1954). Porovnáním jejich sekvencí však nebyla nalezena žádná podobnost mezi geny *adiA* enterobakterií a geny označovanými *ldc*, *ldcA* či *adi*, které kódují (předpokládanou) arginin dekarboxylázu (označovanou jako Orn/Lys/Arg decarboxylase family protein) u *Pseudomonas* sp. Bylo tedy nezbytné vytvořit dvě rozdílné sady primerů pro detekci těchto genů.

Bylo porovnáno 10 sekvencí genu *adiA* pro tři kmeny *Escherichia coli*, čtyři kmeny *Salmonella* a tři kmeny *Yersinia pestis*. Porovnání sekvencí, konzervované sekvence a vyznačení oblastí vhodných pro návrh primerů přináší obrázek č. 7.9.

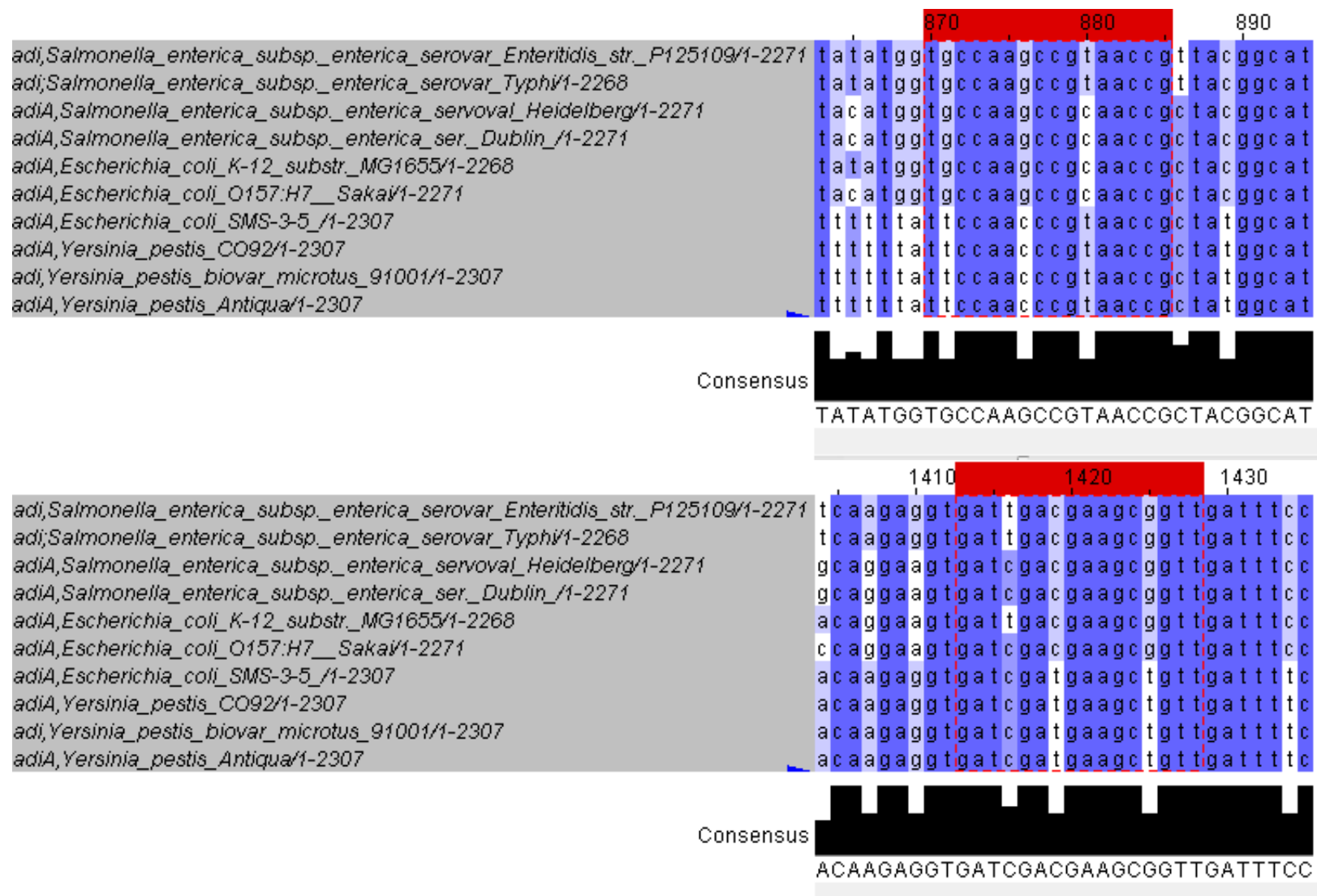
Tabulka 7.2 Bakteriální kmeny použité v dizertační práci, výsledky HPLC a TD-PCR s použitím nových primerů. Cílové geny byly detekovány sety primerů uvedenými v příloze B.

Bakteriální kmeny a zdroje	Výsledky TD-PCR							Obsah biogenních aminů (mg/l) *			
	speA	AdiA	adi/l dc	speB	AguA	speC	speF	agmatin		putrescin	
								12 hodin	24 hodin	12 hodin	24 hodin
<i>Escherichia coli</i> CCM 3954	+	+	-	+	-	+	+	2,06 ± 0,12	0,95 ± 0,04	4,62 ± 0,11	24,65 ± 0,83
<i>Escherichia coli</i> CAPM 6101	+	+	-	+	-	+	+	5,61 ± 0,28	2,33 ± 0,05	19,44 ± 0,85	930,03 ± 4,77
<i>Escherichia coli</i> CAPM 6104	+	+	-	+	-	+	+	4,04 ± 0,07	1,31 ± 0,05	20,70 ± 0,60	95,35 ± 1,02
<i>Escherichia coli</i> CAPM 6114	+	+	-	+	-	+	+	3,19 ± 0,22	2,03 ± 0,04	119,50 ± 4,50	270,95 ± 6,70
<i>Escherichia coli</i> DEPE 64	+	+	-	+	-	+	+	5,86 ± 0,13	2,40 ± 0,10	22,16 ± 0,62	145,33 ± 4,95
<i>Escherichia coli</i> DEPE 99	+	+	-	+	-	+	+	6,84 ± 0,08	2,32 ± 0,10	11,28 ± 0,15	92,85 ± 1,91
<i>Salmonella enterica</i> CAPM 4420	+	+	-	+	-	+	+	3,65 ± 0,01	0,68 ± 0,03	23,98 ± 0,10	442,03 ± 1,48
<i>Salmonella enterica</i> CAPM 5439	+	+	-	+	-	+	+	2,91 ± 0,16	1,22 ± 0,04	22,77 ± 0,55	64,49 ± 1,19
<i>Salmonella enterica</i> CAPM 5967	+	+	-	+	-	+	+	5,05 ± 0,21	2,79 ± 0,05	8,44 ± 0,20	22,14 ± 0,96
<i>Salmonella enterica</i> CAPM 6324	+	+	-	+	-	+	+	1,14 ± 0,07	0,65 ± 0,03	25,99 ± 0,46	35,82 ± 1,17
<i>Enterobacter aerogenes</i> CAPM 5634	+	-	-	+	-	+	+	3,76 ± 0,17	1,11 ± 0,08	134,94 ± 3,68	332,06 ± 3,78
<i>Enterobacter aerogenes</i> CCM 2531	+	-	-	+	-	+	+	10,28 ± 0,83	4,03 ± 0,25	32,82 ± 0,19	218,78 ± 7,23
<i>Citrobacter freundii</i> CCM 7187	+	-	-	+	-	+	+	1,47 ± 0,01	0,89 ± 0,01	2,15 ± 0,08	39,36 ± 1,13
<i>Proteus mirabilis</i> CCM 7188	+	-	-	+	-	+	+	13,95 ± 0,71	2,60 ± 0,06	122,20 ± 1,4	236,63 ± 6,97
<i>Proteus vulgaris</i> DEPE 18	+	-	-	+	-	+	+	3,27 ± 0,06	1,22 ± 0,04	21,86 ± 1,12	228,01 ± 7,60
<i>Serratia marcescens</i> CCM 303	+	-	-	+	-	+	+	3,61 ± 0,06	1,33 ± 0,06	31,75 ± 0,08	267,66 ± 6,98
<i>Serratia marcescens</i> DEPE 3	+	-	-	+	-	+	+	3,66 ± 0,05	1,12 ± 0,02	21,31 ± 0,05	74,85 ± 1,53
<i>Serratia marcescens</i> DEPE 4	+	-	-	+	-	+	+	4,01 ± 0,13	1,69 ± 0,12	21,51 ± 0,25	75,30 ± 1,19
<i>Pantoea</i> sp, DEPE 52	+	-	-	+	-	+	+	4,27 ± 0,14	2,02 ± 0,15	23,60 ± 0,74	75,54 ± 3,03
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CAPM 6241	+	-	-	+	-	+	-	2,83 ± 0,19	1,48 ± 0,12	12,56 ± 0,22	31,82 ± 1,82
<i>Klebsiella</i> sp, DEPE 98	+	-	-	+	-	+	-	5,21 ± 0,26	2,32 ± 0,08	13,15 ± 0,76	15,39 ± 0,78

Pokračování tabulky 7.2

<i>Klebsiella oxytoca</i> CCM 2934	+	-	-	+	-	+	-	1,96 ± 0,07	1,08 ± 0,01	9,76 ± 0,17	215,41 ± 7,53
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955	+	-	+	-	+	+	-	1,46 ± 0,04	1,20 ± 0,06	15,54 ± 0,73	39,01 ± 0,79
<i>Pseudomonas fluorescens</i> CCM 2798	+	-	+	-	+	+	-	1,29 ± 0,04	0,72 ± 0,01	5,26 ± 0,42	28,45 ± 1,47
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CAPM 5707	+	-	+	-	+	+	-	2,65 ± 0,11	1,21 ± 0,03	17,59 ± 0,30	25,66 ± 1,00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CAPM 5718	+	-	+	-	+	+	-	2,51 ± 0,05	1,42 ± 0,03	4,82 ± 0,07	27,09 ± 0,22
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CAPM 5712	+	-	+	-	+	+	-	3,19 ± 0,06	2,53 ± 0,08	9,01 ± 0,25	46,15 ± 1,85
<i>Yersinia enterocolitica</i> CCM 7204	+	-	-	-	+	+	+	4,49 ± 0,17	1,28 ± 0,04	12,45 ± 0,47	44,45 ± 0,30
<i>Yersinia enterocolitica</i> CAMP 6154	+	-	-	-	+	+	+	2,90 ± 0,13	1,07 ± 0,08	17,59 ± 0,03	30,80 ± 1,20
<i>Yersinia ruckeri</i> CAPM 6095	+	-	-	-	+	+	+	3,52 ± 0,06	1,69 ± 0,11	11,55 ± 0,57	32,14 ± 0,50
<i>Yersinia enterocolitica</i> DEPE 88	+	-	-	-	+	+	+	4,27 ± 0,14	3,18 ± 0,17	9,78 ± 0,05	145,51 ± 4,48
<i>Pectobacterium carotovorum</i> CCM 1008	+	+	-	-	+	+	-	2,38 ± 0,08	1,20 ± 0,01	13,95 ± 0,13	50,13 ± 2,42

* použit průměr ± směrodatná odchylka (n = 12).



Obr. 7.9: Porovnání sekvencí genu *adiA* u 10 gramnegativních bakterií s vyznačením konzervovaných sekvencí (červený rámeček) použitých pro návrh primerů *adiA3F* (horní část) a *adiA3R* (spodní část).

Porovnané sekvence byly vloženy do programu GeneFisher2, který na základě vložených parametrů vygeneroval několik sad primerů; 15 nejkvalitnějších (vyjádřeno indexem kvality programu GeneFisher2) bylo, obdobně jako primery navržené pro detekci genu *speA*, testováno algoritmem PrimerBlast. Na základě tohoto testování (nalezení pouze očekávaných PCR produktů u všech sledovaných skupin mikroorganismů) pak byly tři sady objednané pro laboratorní testování. Přehled navržených sad primerů, jejich sekvencí a velikosti produktů přináší tabulka č. 7.3.

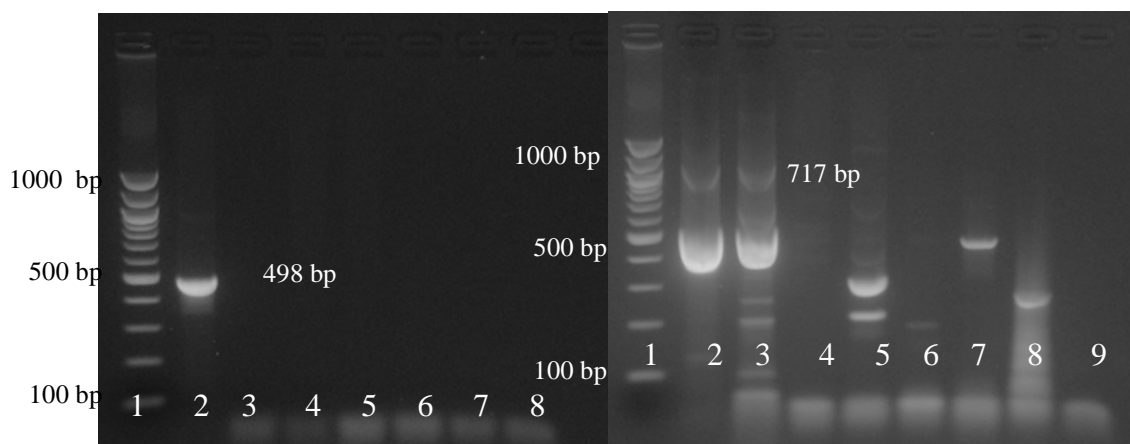
Tabulka 7.3 Seznam primerů navržených pro detekci genu *adiA*, jejich nukleotidové sekvence a velikosti PCR produktů.

	Kódující primer	Antikódující primer	Velikost produktu (bp)
adiA1	TACCKCCGASTTTATCGC	CCRATAATGCCRTAGCGG	498
adiA2	AGATACCKCCGASTTTATCG	AAACGKGCATAGSCGTAC	717
adiA3	TKCCAASCCGYAACCG	AACMGCTTCRTCRTACAC	548

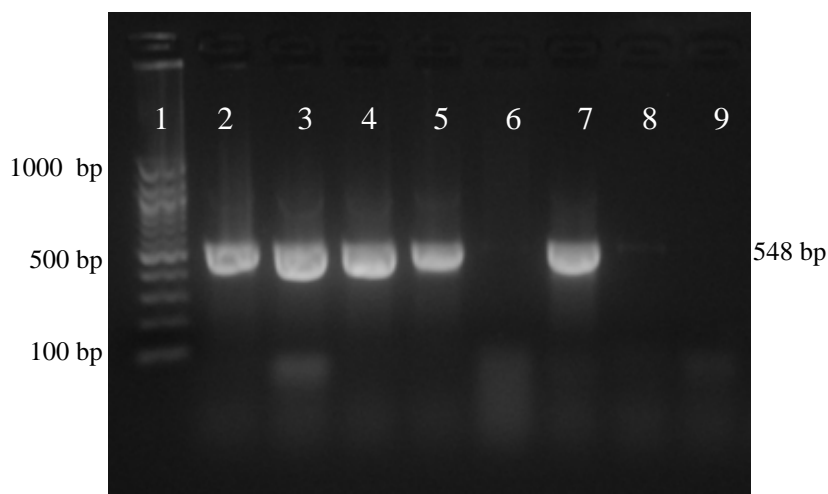
PCR se sadami primerů pro detekci genu adiA

Postupně byly testovány všechny tři sady objednaných primerů a to zejména s DNA *Escherichia coli*, salmonel a yersinií. Obrázek č. 7.10 prezentuje sady primerů adiA1 a adiA2, které se ukázaly být nevhodnými. První sada u většiny DNA nedetekovala gen *adiA*; druhá sada primerů zase amplifikovala množství nespecifických produktů a očekávaný produkt o velikosti 717 bp byl amplifikován jen u dvou DNA a to pouze v malé míře.

Na obrázku č. 7.11 je prezentováno úspěšné použití sady primerů adiA3, která detekovala přítomnost genu *adiA* u všech testovaných salmonel i *Escherichia coli*. U zón č. 6 a 8 je patrný pouze náznak produktu, nicméně k amplifikaci produktu došlo a reakci lze považovat za pozitivní. Sada primerů adiA3 byla následně testována se všemi *Escherichia coli* a salmonelami a u všech bakteriálních DNA byla PCR reakce pozitivní (viz tabulka č. 7.2).



Obr. 7.10: Touch-down PCR se sadami primerů *adiA1F/adiA1R* (vlevo) a *adiA2F/adiA2R* (vpravo); 1 – marker (100bp); 2 - *Escherichia coli* DEPE 64, 3 - *Salmonella enterica* CAPM 5439, 4 - *Escherichia coli* CAPM 6104, 5 - *Escherichia coli* CAPM 6114, 6 - *Salmonella enterica* CAPM 5439, 7 - *Salmonella enterica* CAPM 5967, 8 - *Salmonella enterica* CAPM 6324, 9 - slepý vzorek – DNA nahrazena vodou



Obr. 7.11: Touch-down PCR se sadou primerů *adiA3F/adiA3R*; 1 – marker (100bp); 2 - *Escherichia coli* CAPM 6101, 2 - *Escherichia coli* CAPM 6104, 3 - *Escherichia coli* CAPM 6114, 4 - *Salmonella enterica* CAPM 5439, 5 - *Salmonella enterica* CAPM 5967, 6 - *Salmonella enterica* CAPM 6324, 7 - *Escherichia coli* DEPE 64, 8 - *Escherichia coli* DEPE 99, 9 - slepý vzorek – DNA nahrazena vodou

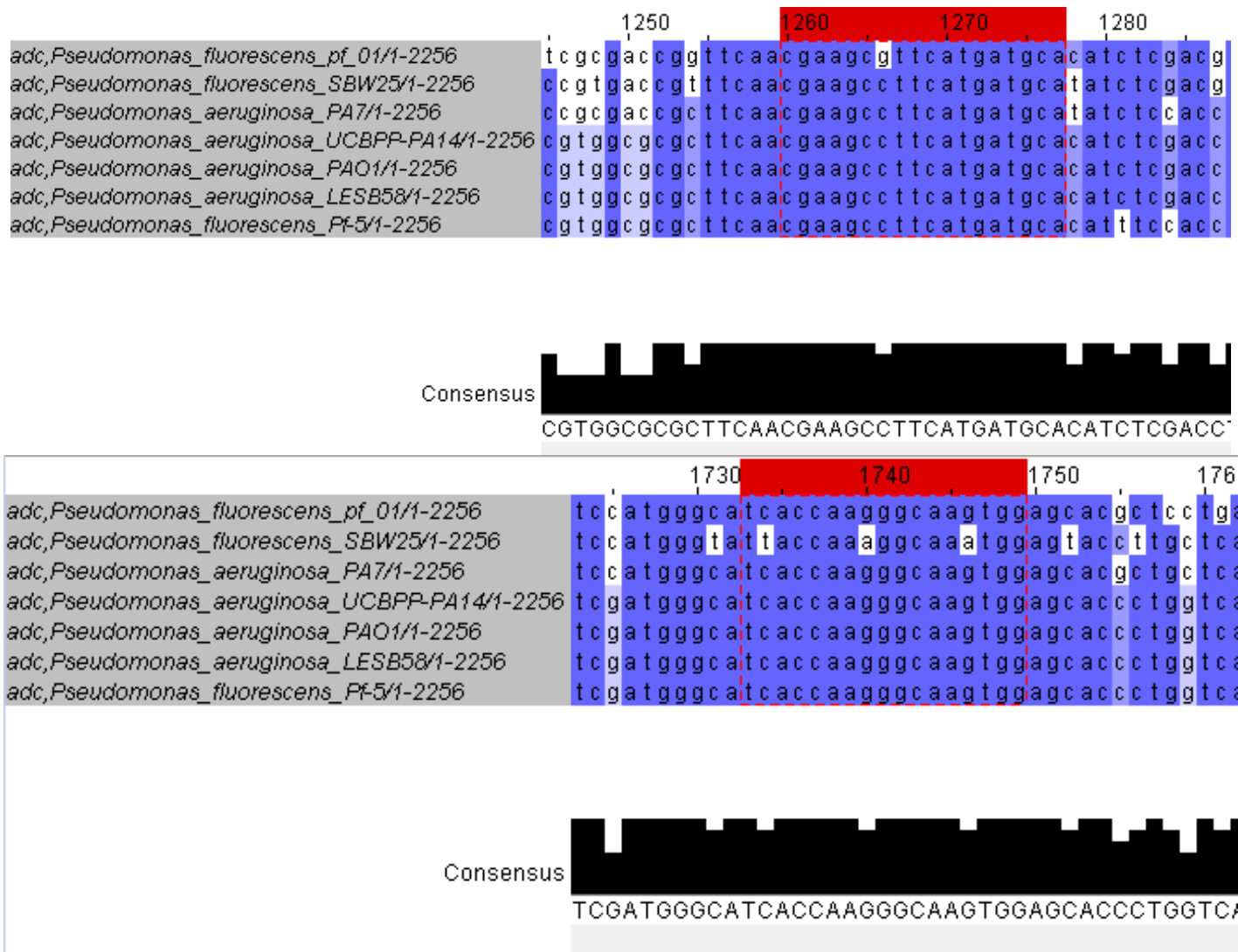
7.1.3. Návrh a testování sad primerů vhodných k detekci genu kódujícího předpokládanou arginin dekarboxylázu u *Pseudomonas* sp.

Návrh primerů vhodných k detekci genu kódujícího předpokládanou arginin dekarboxylázu u Pseudomonas sp.

Pro návrh specifické sady primerů určené k detekci předpokládané arginin dekarboxylázy vyskytující se u bakterií rodu *Pseudomonas* bylo z GeneBank vybráno sedm nukleotidových sekvencí (viz příloha A), které byly označeny jako *adi*, *ldc*, putative *arn/arg/lys* decarboxylase aj. Sekvence byly porovnány pomocí algoritmu ClustalW a porovnané sekvence byly vizualizovány programem Jalview. Nebyly nalezeny žádné odlehlé sekvence, naopak byl zjištěn vysoký stupeň homologie mezi těmito sekvencemi (obrázek č. 7.12). Soubor sekvencí byl tedy použit pro návrh primerů programem GeneFisher2. Program vygeneroval několik sad primerů, z nichž prvních deset (s nejvyšším indexem kvality) bylo teoreticky testováno algoritmem PrimerBlast. U šesti sad primerů byly při teoretickém testování získány očekávané výsledky (pouze produkty očekávané velikosti u všech *Pseudomonas* sp.). Tabulka č. 7.4 poskytuje přehled těchto primerů, jejich nukleotidových sekvencí a velikosti očekávaných produktů.

Tabulka 7.4 Seznam primerů navržených pro detekci genu *adi/ldc*, jejich nukleotidové sekvence a velikosti PCR produktů.

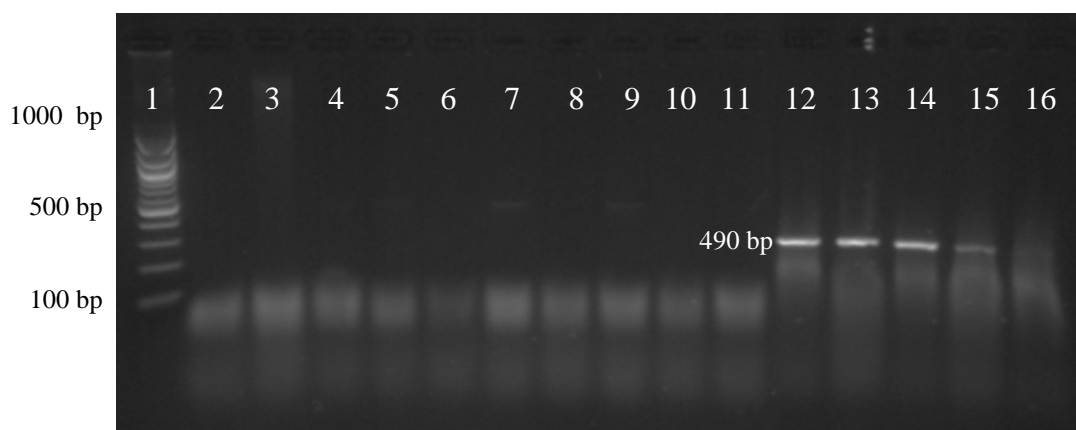
	Kódující primer	Antikódující primer	Velikost produktu (bp)
adi1	ACCKCCGASTTTATCGC	CCRATAATGCCRTAGCG	395
adi2	GATACCKCCGASTTTATC	AAACGKGCATAGSCGTA	615
adi3	TKCCAASCCGYAACCG	AACMGCTTCRTRATCA	338
adi4	GCHTGGTACGSCATATGC	YGGGATKCCYGGCGG	1014
adi5	CGAAGCCTTCATGATGCA	CCACTTGCCCTTGGTGA	490
adi6	GACATCAAGGCCGACA	TGCCAGGAATAGTTGGA	458



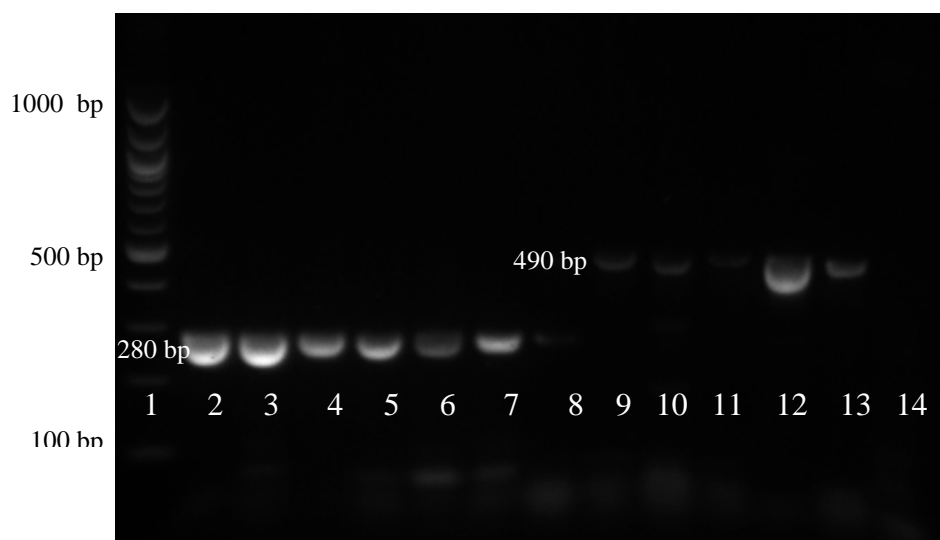
Obr. 7.12: Porovnání sekvencí genu pro pravděpodobnou arginin dekarboxylázu u sedmi bakterií rodu *Pseudomonas* s vyznačením konzervovaných sekvencí (červený rámeček) použitých pro návrh primerů *adi5F* (horní část) a *adi5R* (spodní část).

PCR se sadami primerů pro detekci genu kódujícího předpokládanou arginin dekarboxylázu u *Pseudomonas* sp.

Laboratorním testováním bylo nejlepších výsledků dosaženo se sadou primerů označenou adi5; PCR reakce ostatních sad primerů produkovaly velké množství nespecifických produktů nebo nedetekovaly sledovaný gen u všech testovaných *Pseudomonas* sp. (data nejsou uvedena). Sada primerů adi5F/adi5R amplifikovala produkt o velikosti 489 bp (fragment genu kódujícího předpokládanou Orn/Lys/Arg dekarboxylázu) u všech testovaných *Pseudomonas* sp. Na obrázku č. 7.13 je elektroforegram produktů PCR získaných pomocí touch-down PCR s použitím primerů adi5f/adi5R. Na obrázcích je vidět, že produkty jsou získávány pouze v přítomnosti templátové DNA vyizolované z bakterií rodu *Pseudomonas*. Na obrázku č. 7.14 bylo v první části použito primerů adc5 pro detekci genu *speA* (kódujícího biosyntetickou arginin dekarboxylázu) a ve druhé části primerů adi5 pro detekci genu kódujícího druhý typ dekarboxylázy (předpokládaná orn/arg/lys dekarboxyláza).



Obr. 7.13: Touch-down PCR se sadou primerů adi5F/adi5R; 1 – marker (100bp); 2 - *Escherichia coli* CCM 3954, 3 - *Enterobacter aerogenes* CCM 2531, 4 - *Serratia marcescens* CCM 303, 5 - *Salmonella enterica* CAPM 4420, 6 - *Proteus mirabilis* CCM 7188, 7- *Klebsiella oxytoca* CCM 2934, 8 - *Citrobacter freundii* CCM 7187, 9 - *Pectobacterium carotovorum* CCM 1008, 10 - *Yersinia enterocolitica* CCM 7204, 11 - *Escherichia coli* CAPM 6114, 12 - *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955, 13 - *Pseudomonas fluorescens* CCM 2798, 14 - *Pseudomonas aeruginosa* CAPM 5707, 15 - *Pseudomonas aeruginosa* CAPM 5712, 16 - slepý vzorek – DNA nahrazena vodou.



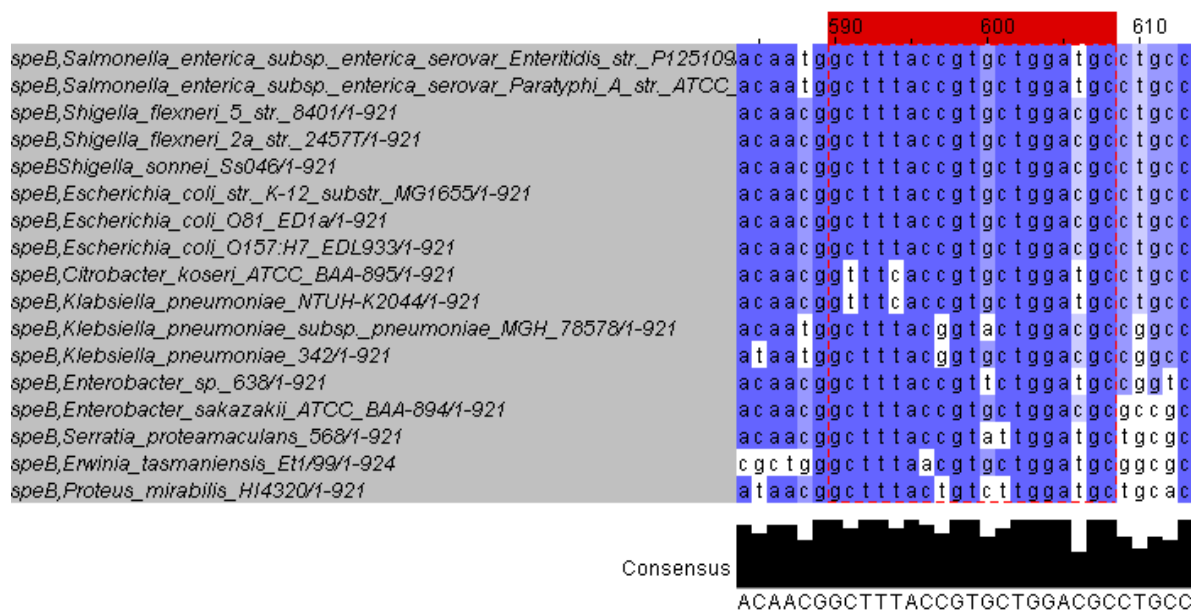
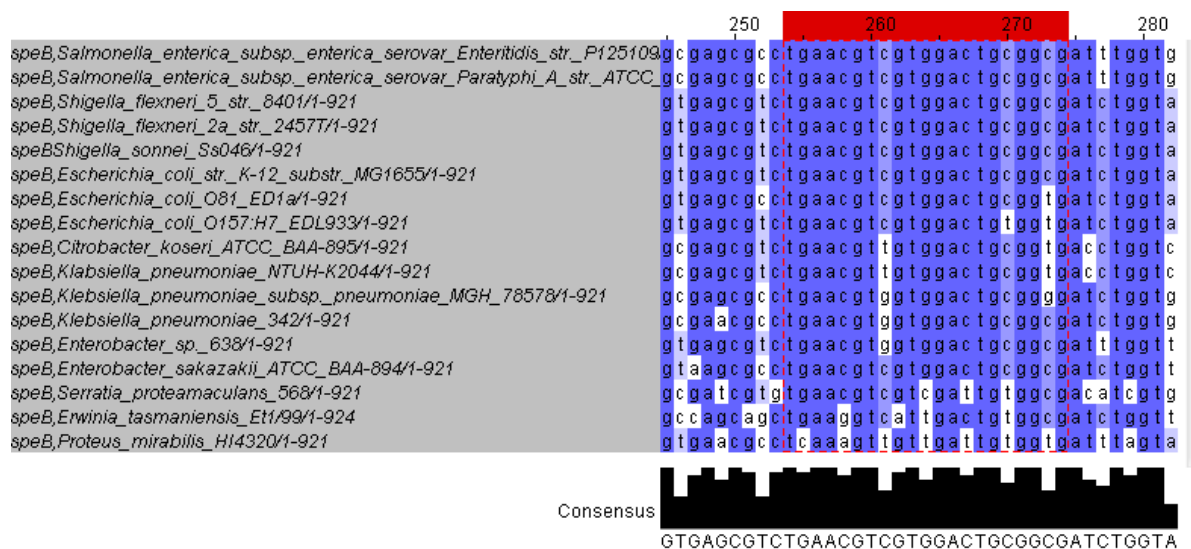
Obr. 7.14: Touch-down PCR se sadami primerů *adc5F/adc5R* (dráhy 2 – 8) a *adi5F/adi5R* (dráhy 9 – 13); 1 – marker (100bp); 2 - *Escherichia coli* CCM 3954, 3 - *Enterobacter aerogenes* CCM 2531, 4 - *Serratia marcescens* CCM 303, 5 - *Salmonella enterica* CAPM 4420, 6 - *Proteus mirabilis* CCM 7188, 7- *Klebsiella oxytoca* CCM 2934, 8 - *Citrobacter freundii* CCM 7187, 9 - *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955, 10 - *Pseudomonas fluorescens* CCM 2798, 11 - *Pseudomonas aeruginosa* CAPM 5707, 12 - *Pseudomonas aeruginosa* CAPM 5712, 13 - *Pseudomonas aeruginosa* CAPM 5718, 14 - slepý vzorek – DNA nahrazena vodou.

Sada primerů *adi5* byla testována se všemi *Pseudomonas* sp. a u všech bakteriálních DNA byla PCR reakce pozitivní (viz tabulka č. 7.2).

7.1.4. Návrh a testování sad primerů vhodných k detekci genu *speB*

Návrh primerů vhodných k detekci genu speB

Agmatináza je mezi enterobakteriemi široce rozšířený enzym. Pro návrh sady primerů určených k detekci genu *speB* kódujícího agmatinázu bylo porovnáno sedmnáct nukleotidových sekvencí genu *speB* získaných z GeneBank z různých enterobakterií (viz příloha A). Sekvence byly porovnány algoritmem ClustalW a vizualizovány programem Jalview (obrázek č. 7.15). Nebyly shledány odlehlé sekvence. Soubor sekvencí byl tedy vložen do programu GeneFisher2 a dle zadaných kritérií program navrhl několik párů primerů. Z nich bylo vybráno deset primerů s nejvyšším stupněm kvality a tyto primery byly podrobeny teoretickému testování nástrojem PrimerBlast. Na základě dobrých výsledků z teoretického testování pak bylo syntetizováno pět párů primerů, které byly následně laboratorně testovány. Přehled těchto primerů, jejich sekvencí a velikostí produktů prezentuje tabulka č. 7.5.



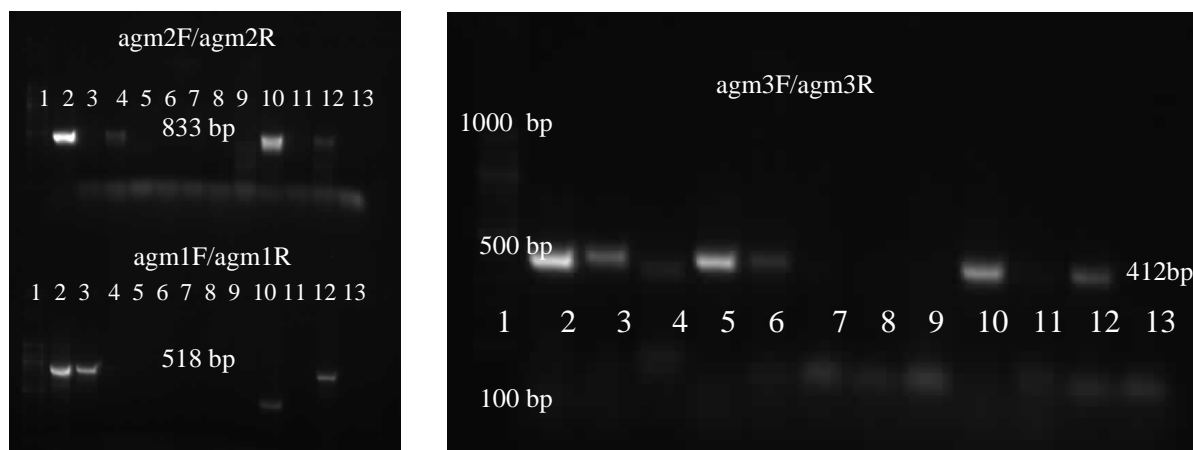
Obr. 7.15: Porovnání sekvencí genů *speB* u 17 enterobakterií s vyznačením konzervovaných sekvencí (červený rámeček) použitých pro návrh primerů *agm4F* (horní část) a *agm4R* (spodní část).

Tabulka 7.5 Seznam primerů navržených pro detekci genu *speB*, jejich nukleotidové sekvence a velikosti PCR produktů.

	Kódující primer	Antikódující primer	Velikost produktu (bp)
agm1	CTGAACGTCGTGGACTGCG	GCGCGATCGGAGGTCAGGC	518
agm2	TGGTTTCCAAYGCCTTTGG	TCGCCYTTYTTCGCCGCC	883
agm3	CTGAACGTCGTGGACTGCGG	CRATCTGTTTCACCTGGGCG	412
agm4	TGAACGTCGTGGACTGCGG	GCRTCCAGCACGGTAAAGC	355
agm5	GGTTTCCAAYGCCTTTGG	GCGCGATCGGAGGTCAGG	729

PCR se sadami primerů pro detekci genu *speB*

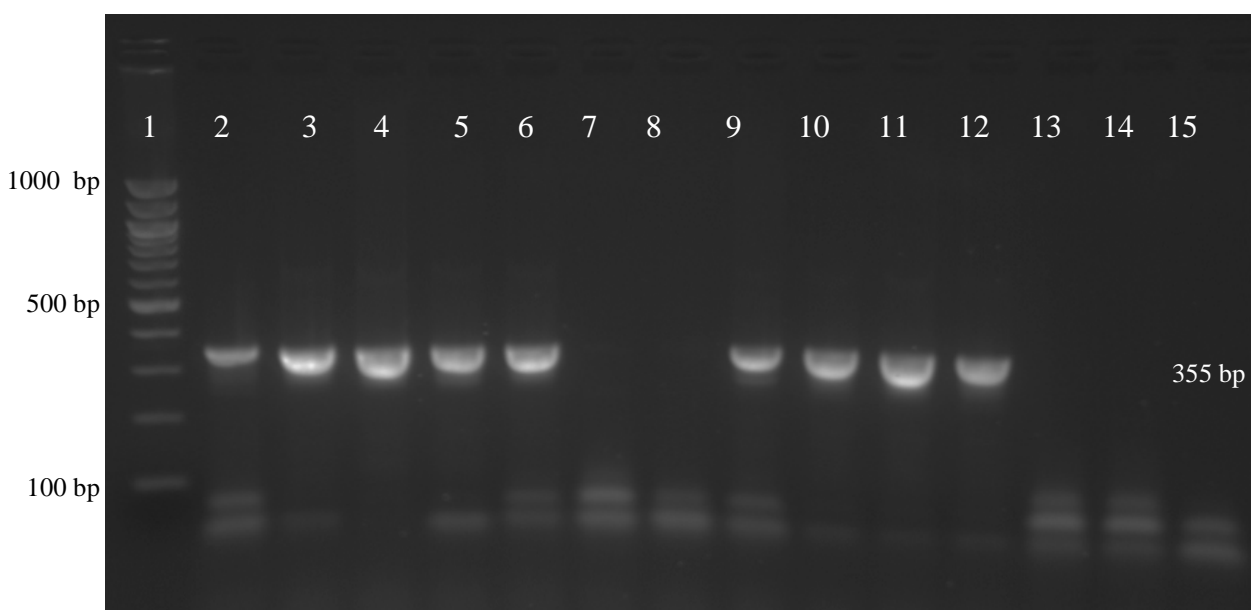
Laboratorním testováním bylo nejlepších výsledků dosaženo se sadou primerů označenou agm4F/agm4R, ostatní sady primerů neposkytovaly produkt očekávané velikosti u všech testovaných bakteriálních DNA (viz obrázek č. 7.16). Z obrázku č. 7.16, který zobrazuje elektroforegramy testování tří sad primerů je zřejmé, že tyto sady primerů nebyly vhodné pro další testování.



Obr. 7.16: Touch-down PCR s primery *agm1F/agm1R*, *agm2F/agm2R* a *agm3F/agm3R* (sady primerů uvedeny přímo v obrázcích); 1 – marker (100bp), DNA: 2 - *Enterobacter aerogenes* CAPM 5634, 3 - *Escherichia coli* CAPM 6101, 4 - *Escherichia coli* CAPM 6104, 5 - *Escherichia coli* CAPM 6114, 6 - *Klebsiella pneumoniae* CAPM 6241M, 7 - *Pseudomonas aeruginosa* CAPM 5707, 8 – *Pseudomonas aeruginosa* CAPM 5718, 9 - *Salmonella enterica* CAPM 5439, 10 - *Salmonella enterica* CAPM 5967, 11 - *Salmonella enterica* CAPM 6324, 12 - *Citrobacter freundii* CCM 7187, 13 - slepý vzorek – DNA nahrazena vodou.

Pouze pomocí sady primerů agm4F/agm4R byl u všech testovaných enterobakterií amplifikován produkt o velikosti 355 bp (fragment genu *speB*, kódujícího enzym agmatinázu). Z obrázku č. 7.17 je zřejmé, že produkty očekávané velikosti byly získávány pouze v přítomnosti odpovídající templátové DNA. U zón č. 7, 8, 13 a 14 nebyl získán produkt PCR, protože u bakterií rodů *Pseudomonas* a *Yersinia* se gen *speB* nevyskytuje, případně (u bakterií rodu *Pseudomonas*) má tento gen odlišnou nukleotidovou sekvenci. Vzhledem k tomu, že bakterie rodu *Pseudomonas* jsou známy tím, že tuto dráhu nevyužívají a jsou nositeli agmatin deiminázové dráhy, nebyly primery k detekci genů podobných genu *speB* (označeny např. *speB1* apod.) u této skupiny mikroorganismů zahrnuty k testování v této práci.

Pomocí sady primerů agm4F/agm4R byl úspěšně amplifikován PCR produkt 355 bp vnitřní fragment genu *speB* u všech testovaných enterobakterií (viz tabulka č. 7.2). Sada primerů agm4F/agm4R nevykazovala tvorbu nespecifických produktů, lze tedy tuto sadu primerů považovat za univerzální sadu primerů určenou k detekci genu *speB* pro enterobakterie.



Obr. 7.17: Touch-down PCR se sadou primerů *agm4F/agm4R*; 1 – marker (100bp), DNA: 2 - *Enterobacter aerogenes* CAPM 5634, 3 - *Escherichia coli* CAPM 6101, 4 - *Escherichia coli* CAPM 6104, 5 - *Escherichia coli* CAPM 6114, 6 - *Klebsiella pneumoniae* CAPM 6241M, 7 - *Pseudomonas aeruginosa* CAPM 5707, 8 - *Pseudomonas aeruginosa* CAPM 5718, 9 - *Salmonella enterica* CAPM 5439, 10 - *Salmonella enterica* CAPM 5967, 11 - *Salmonella enterica* CAPM 6324, 12 - *Citrobacter freundii* CCM 7187, 13 - *Yersinia enterocolitica* CAPM 6154, 14 - *Yersinia ruckeri* CAPM 6095, 15 – slepý vzorek – DNA nahrazena vodou.

7.1.5. Návrh a testování sad primerů vhodných k detekci genu *aguA*

Návrh primerů vhodných k detekci genu aguA

Agmatin deiminázová dráha byla popsána u bakterií rodů *Pseudomonas* a *Yersinia*. Pro vytvoření genově specifických primerů bylo porovnáno třináct dostupných sekvencí genu *aguA* získaných z GeneBank (viz příloha A). Sekvence byly porovnány algoritmem ClustalW a porovnané sekvence byly vizualizovaný programem Jalview. Nebyly zjištěny žádné odlehlé sekvence a analýzou bylo zjištěno několik konzervovaných domén vhodných pro návrh primerů (obrázek č. 7.18). Soubor sekvencí byl tedy použit v programu GeneFisher2 pro návrh nových sad primerů.

Z vygenerovaných sad bylo patnáct sad teoreticky testováno algoritmem PrimerBlast. Testování ukázalo, že pouze šest sad poskytuje očekávané výsledky (v genových databázích nalezen produkt očekávané velikosti u všech cílových skupin bakterií). Těchto šest párů primerů bylo syntetizováno pro laboratorní testování. Tabulka č. 7.6 prezentuje sekvence primerů navržených

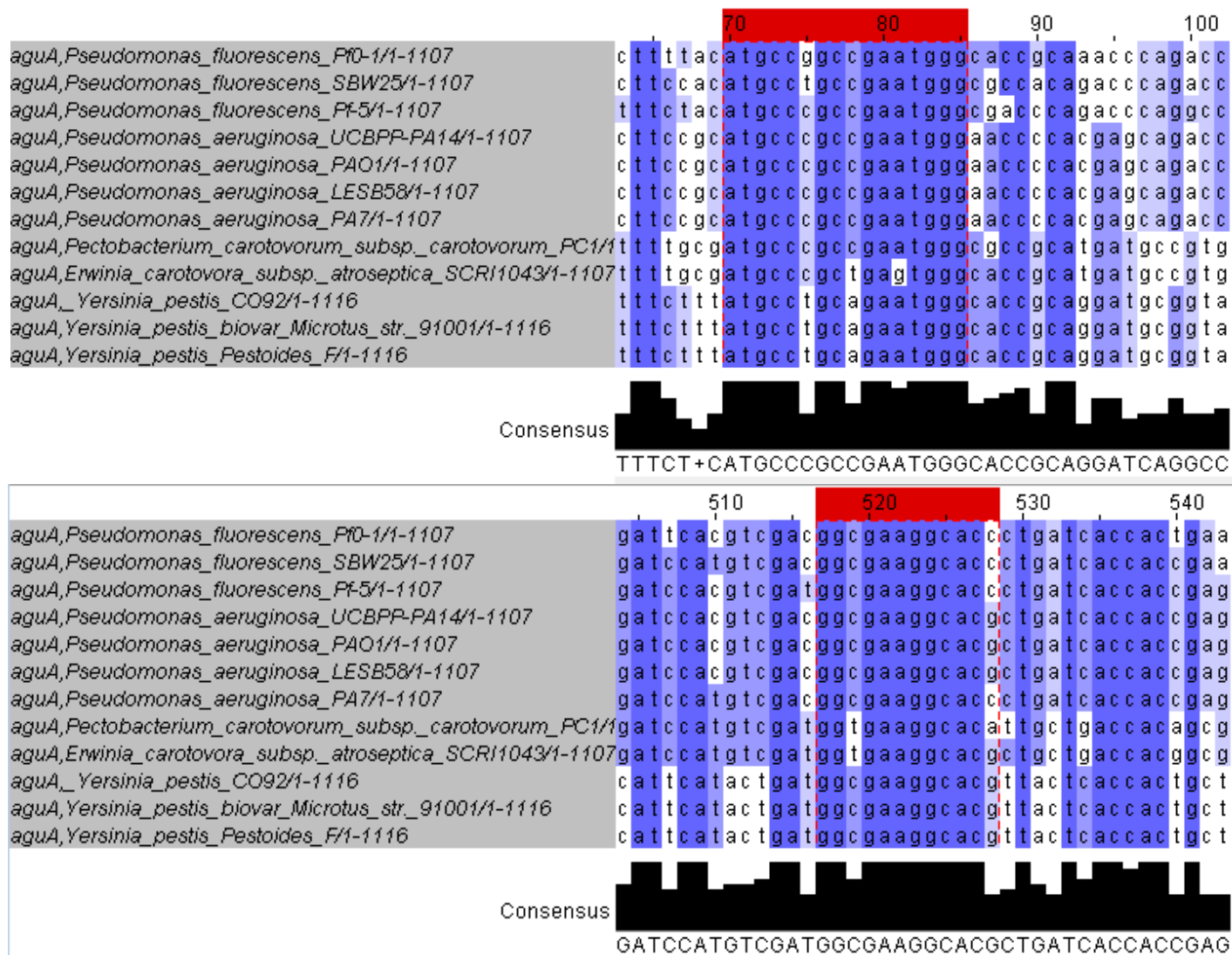
pro detekci genu *aguA* a velikosti očekávaných produktů. Sekvence primerů AgDI4F, 5F a 6F jsou shodné, obdobně sekvence primerů AgDI1R-4R jsou totožné, tabulka č. 7.6 uvádí kombinace těchto primerů navržené programem GeneFisher2.

Tabulka 7.6 Primery navržené pro detekci genu *aguA*, jejich nukleotidové sekvence a předpokládané velikosti PCR produktů.

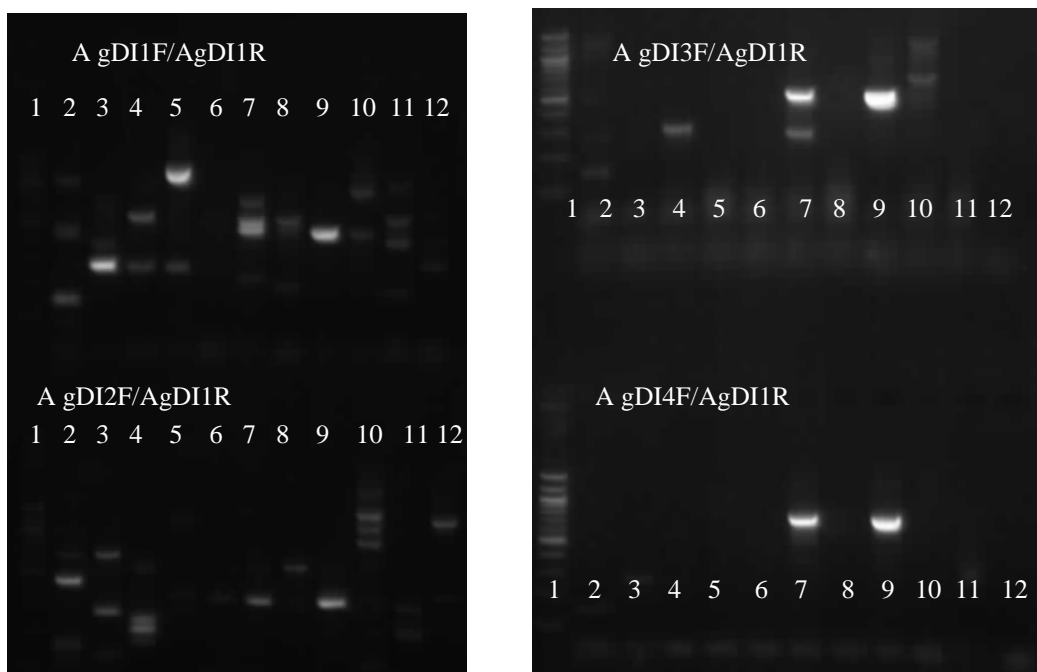
	Kódující primer	Antikódující primer	Velikost produktu (bp)
AgDI1	AAYGCM TGGGGCGGC	RTAMAGCGGGCCGGG	485
AgDI2	YGAYGGCGAAGGCAC	RTAMAGCGGGCCGGG	343
AgDI3	CAGYGACGAYGCCTGG	RTAMAGCGGGCCGGG	570
AgDI4	ATGCCYGCMGAATGGG	RTAMAGCGGGCCGGG	789
AgDI5	ATGCCYGCMGAATGGG	TCARRTGYGGGTTGCG	515
AgDI6	ATGCCYGCMGAATGGG	SGTGCCTTCGCCRTC	453

PCR se sadami primerů pro detekci genu *AguA*

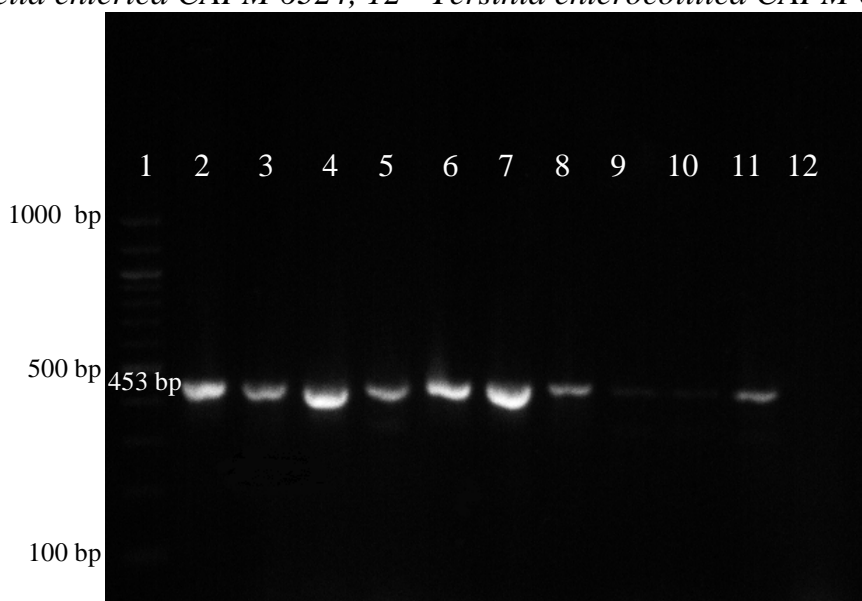
Při laboratorním testování se jako nejvhodnější ukázala kombinace primerů AgDI4F a AgDI6R. Ostatní kombinace primerů neposkytovaly u všech testovaných bakteriálních DNA produkt očekávané velikosti, případně poskytovaly velké množství nespecifických produktů (obrázek č. 7.19). Pouze se sadou AgDI4F/AgDI6R byl obdržen produkt o správné velikosti u všech *Pseudomonas* sp. i *Yersinia* sp. (viz tabulka č. 7.2).



Obr. 7.18: Porovnání sekvencí genů *aguA* u 13 bakteriálních kmenů s vyznačením konzervovaných sekvencí (červený rámeček) použitých pro návrh primerů AgDI4F (horní část) a AgDI6R (spodní část).



Obr. 7.19: Touch-down PCR se sadami primerů určených k detekci genu *AguA*; sady primerů jsou uvedeny přímo na obrázcích; 1 – marker (100bp), DNA: 2 - *Enterobacter aerogenes* CAPM 5634, 3 - *Escherichia coli* CAPM 6101, 4 - *Escherichia coli* CAPM 6104, 5 - *Escherichia coli* CAPM 6114, 6 - *Klebsiella pneumoniae* CAPM 6241M, 7 - *Pseudomonas aeruginosa* CAPM 5707, 8 – *Salmonella enterica* CAPM, 5439, 9 - *Pseudomonas aeruginosa* CAPM 5718, 10 - *Salmonella enterica* CAPM 5967, 11 - *Salmonella enterica* CAPM 6324, 12 - *Yersinia enterocolitica* CAPM 6154



Obr. 7.20: Touch-down PCR se sadou primerů *AgDI4F/AgDI6R*; 1 – marker (100bp), 2 - *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955, 3 - *Pseudomonas fluorescens* CCM 2798, 4 - *Pectobacterium carotovorum* CCM 1008, 5 - *Yersinia enterocolitica* CCM, 6 - *Pseudomonas aeruginosa* CAPM 5707, 7 - *Pseudomonas aeruginosa* CAPM 5712, 8 - *Pseudomonas aeruginosa* CAPM 5718, 9 - *Yersinia enterocolitica* CAPM 6154, 10 - *Yersinia ruckeri* CAPM 6095, 11 - *Yersinia enterocolitica* DEPE 88, 12 – slepý vzorek – DNA nahrazena vodou.



Obr. 7.21: Touch-down PCR se sadou primerů AgDI4F/AgDI6R; 1 – marker (100bp), DNA: 2 - *Enterobacter aerogenes* CAPM 5634, 3 - *Escherichia coli* CAPM 6101, 4 - *Klebsiella pneumoniae* CAPM 6241, 5 - *Pseudomonas aeruginosa* CAPM 5707, 6 - *Pseudomonas aeruginosa* CAPM 5718, 7 - *Pseudomonas aeruginosa* CAPM 5722, 8 - *Salmonella enterica* CAPM 5439, 9 - *Yersinia enterocolitica* CAPM 6154, 10 - *Yersinia ruckeri* CAPM 6095, 11 - *Serratia marcescens* DEPE 3, 12 - *Pantotea* sp. DEPE 52, 13 - *Yersinia enterocolitica* DEPE 88, 14 - *Proteus vulgaris* DEPE 101, 15 - *Pectobacterium carotovorum* CCM 1008, 16 - slepý vzorek – DNA nahrazena vodou.

Z obrázků č. 7.20 a 7.21 je patrné, že k amplifikaci 453 bp fragmentu genu *aguA* došlo vždy pouze v přítomnosti DNA kmenů *Pseudomonas* sp., *Yersinia* sp. a *Pectobacterium carotovorum* a nedocházelo ke vzniku nespecifických produkt. Tuto sadu primerů lze tedy považovat za univerzální sadu primerů určenou k detekci genu *aguA* pro tuto skupinu gramnegativních bakterií.

7.1.6. Návrh a testování sad primerů vhodných k detekci genu *speC*

Návrh primerů vhodných k detekci genu speC

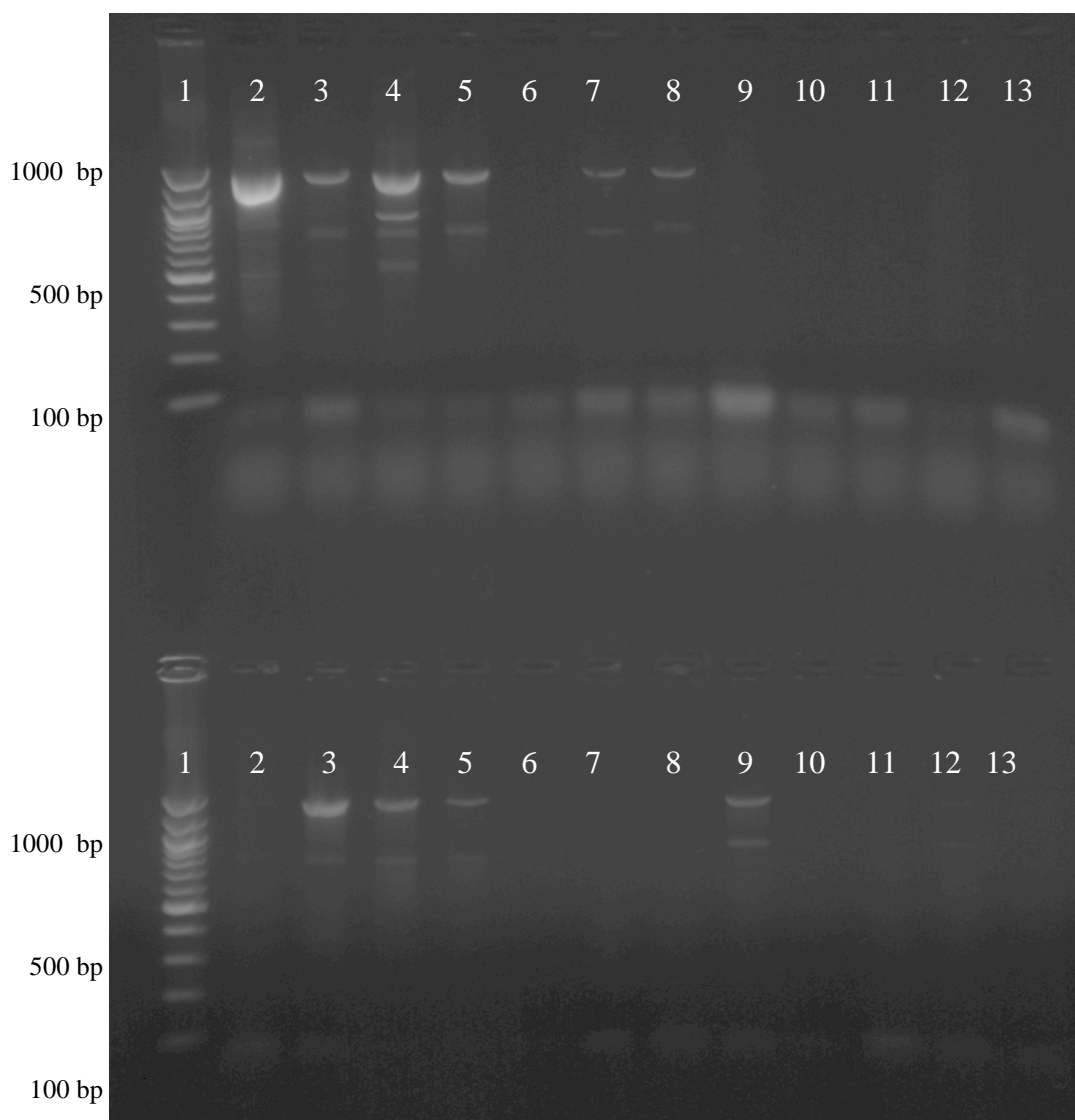
Ornitin dekarboxyláza je (z hlediska produkce putrescinu) jedním z nejvíce prostudovaných enzymů a gen *odc* (často používané označení pro geny *speC* a *speF*), který tuto dekarboxylázu kóduje, je také genem, pro který byly již dříve publikovány některé sady primerů. Nejprve tedy bylo přistoupeno k testování těchto sad primerů. Jmenovitě byly testovány dříve publikované primery 3' 16' (Marcobal et al., 2005) a PUT1-F/PUT2-R (Muñoz et al., 2004) (viz tabulka č. 4.3), které se jeví jako nejvhodnější z hlediska širší aplikovatelnosti (tyto primery byly jako jediné navrženy i pro gramnegativní bakterie). Výsledky však nebyly příliš uspokojivé, viz obrázek č. 7.22. PCR se sadou primerů 3'/16' by měla amplifikovat produkt o velikosti 1446 bp a se sadou PUT1-F/PUT2-R produkt o velikosti 1440 bp (není určena pro *Pseudomonas* sp.). U obou sad však docházelo ke vzniku nespecifických

produktů a u některých templátových DNA nedošlo ke vzniku očekávaných produktů. Žádný z dříve publikovaných primerů tedy nebyl vhodný pro detekci *odc* genu u všech důležitých skupin gramnegativních mikroorganismů. Metoda nebyla dále optimalizována a bylo přistoupeno k návrhu vlastních primerů.

Cílem práce bylo navrhnout sadu univerzálních primerů vhodnou k detekci genu *speC* u gramnegativních bakterií. Algoritmem ClustalW bylo porovnáno celkem 31 nukleotidových sekvencí genů *speC* z různých gramnegativních bakterií, vizualizace byla provedena v programu Jalview (obrázek č. 7.23). Porovnané sekvence byly vloženy do programu GeneFisher2, který na základě vložených parametrů navrhnul 3 sady primerů (tabulka č. 7.7), dvě z nich jsou navrženy pro detekci genu *speC* u všech gramnegativních bakterií, třetí sada je zaměřena na detekci tohoto genu u bakterií rodu *Pseudomonas*.

Tabulka 7.7 Seznam primerů navržených pro detekci genu *speC*, jejich nukleotidové sekvence, velikosti PCR produktů a cílová skupina mikroorganismů.

	Kódující primer	Antikódující primer	Velikost produktu (bp)	Skupina mikroorganismů
SpeC1	CGACGCCGGT CTATCTGG	AAACAGCGGAT AAAACGG	497	gramnegativní bakterie
SpeC2	GCGACGCCG GTTTATCTG	GCGTGCAGCA TAAAGGC	470	gramnegativní bakterie
SpeC3	TTCGCCGAC AAGCAGG	AGGTAGAACG CCTTCAGC	1103	<i>Pseudomonas</i> sp.



Obr. 7.22: Touch-down PCR se sadami primerů PUT1-F/PUT2-R (horní polovina) a 3/16 (spodní polovina); 1 – marker (100bp); DNA: 2 - *Escherichia coli* CCM 3954, 3 - *Enterobacter aerogenes* CCM 2531, 4 - *Serratia marcescens* CCM 303, 5 - *Salmonella enterica* CAPM 4420, 6 - *Proteus mirabilis* CCM 7188, 7- *Klebsiella oxytoca* CCM 2934, 8 - *Citrobacter freundii* CCM 7187, 9 - *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955, 10 - *Pseudomonas fluorescens* CCM 2798, 11 - *Pectobacterium carotovorum* CCM 1008, 12 - *Yersinia enterocolitica* CCM 7204, 13 - slepý vzorek – DNA nahrazena vodou.

	670	680
speC,Pseudomonas_aeruginosa_PA01/1-1142	aaactggac	aaggatgaagaccg
speC,Pseudomonas_aeruginosa_UCBPP-PA14_NC_008463.1/1-1142	aaactggac	aaggatgaagaccg
speC,Pseudomonas_aeruginosa_PA7_NC_009656.1/1-1142	agctggac	aaggatgaagaccg
speC,Pseudomonas_fluorescens_PF5_chromosome_NC_004129	agctggac	aaggatgctgggcg
speC,Pseudomonas_entomophila_L48_chromosome_NC_00802	agctggac	aaggatgctgggcg
speC,Pseudomonas_fluorescens_PF0-1_NC_007492.2/1-1142	agctggac	aaagtgctgagccgtg
speC,Escherichia_coli_str_K-12_MG1655_b0693_NC_000913.2/1-1142	cagcgaata	aaagtggtgacgaatg
speC,Escherichia_coli_BW2952_NC_012759.1/1-2114	cagcgaata	aaagtggtgacgaatg
speC,Escherichia_coli_IAI1/1-2114	cagcgaata	aaagtggtgacgaatg
speC,Escherichia_coli_O157:H7_str_EDL933/1-2174	cagcgaata	aaagtggtgacgaatg
speC,Escherichiacoli_APEC_O1/1-2114	cagcgaata	aaagtggtgacgaatg
speC,Salmonella_enterica_subsp_enterica_serovar_Typhi_str_C	cggcgaata	aaagtggtcaccacg
speC,Salmonella_enterica_subsp_enterica_serovar_Paratyphi_A	cggcgaata	aaagtggtcaccacg
speC,Salmonella_enterica_serovar_Typhimurium_str_LT2/1-2114	cggcgaata	aaagtggtcaccacg
speC,Salmonella_enterica_subsp_enterica_serovar_Paratyphi/1-2114	cggcgaata	aaagtggtcaccacg
speC,Citrobacter_koseri_ATCC_BAA-895_NC_009792.1/1-2114	cggcgaata	aaggttggtgaccacg
speC,Citrobacter_rodentium_ICC168_NC_013716.1/1-2114	cggcgaata	aaggttggtgaccacg
speC,Enterobacter_cloacae_SCF1_chromosome_NC_014618.1/1-2114	cggcgaata	aaggttggtgaccacg
speC,Klebsiella_pneumoniae_sp_pneumoniae_MGH_78578/1-2114	cggcgaata	aaagtggtgaccacg
speC,Klebsiella_pneumoniae_NTUH-K2044/1-2159	cggcgaata	aaagtggtgaccacg
speC,Klebsiella_pneumoniae_342_NC_011283.1/1-2117	cggcgaata	aaagtggtgaccacg
speC,Enterobacter_cloacae_subsp_cloacae_ATCC_13047/1-2114	cggcgaata	aaagtggtgaccacg
speC,Enterobacter_sp_638_NC_009436.1/1-2044	cggcgaata	aaagtggtgaccacg
speC,Enterobacter_sp_638_NC_009436.1/1-2044	cggcgaata	aaagtggtgaccacg
speC,Serratia_proteamaculans_568/1-2141	cggcgaata	aaggttggtgaccacg
speC,Yersinia_pestis_CO92/1-2141	cggcgaata	aaagtggtgaccacg
speC,Yersinia_pestis_CO92/1-2141	cggcgaata	aaagtggtgaccacg
speC,Yersinia_enterocolitica_subsp_enterocolitica_8081_NC_00600	cggcgaata	aaagtggtgaccacg
speC,Pectobacterium_atrosepticum_SCR11043/1-2132	ctgcgaata	aaagtggtgaccacg
speC,Pectobacterium_wasabiae_WPP163_NC_013421.1/1-2132	ctgcgaata	aaagtggtgaccacg
speC,Pectobacterium_carotovorum_subsp_carotovorum_PC1_NC_00600	ctgcgaata	aaagtggtgaccacg



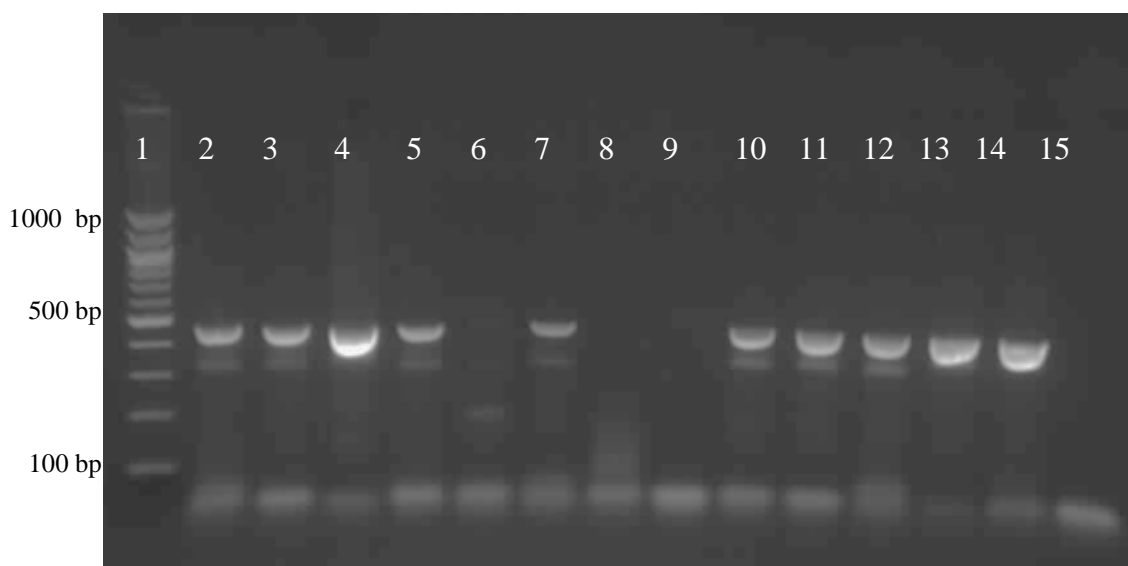
	1090	1100
speC,Pseudomonas_aeruginosa_PA01/1-1142	---tcgcagcagcggc	gacatctcgggt
speC,Pseudomonas_aeruginosa_UCBPP-PA14_NC_008463.1/1-1142	---tcgcagcagcggc	gacatctcgggt
speC,Pseudomonas_aeruginosa_PA7_NC_009656.1/1-1142	---tcgcagcagcggc	gacatctcgggt
speC,Pseudomonas_fluorescens_PF5_chromosome_NC_004129	---tcgcaacagcggc	gacatcagcgt
speC,Pseudomonas_entomophila_L48_chromosome_NC_00802	---tcgcaacagcggc	gacatcagcgt
speC,Pseudomonas_fluorescens_PF0-1_NC_007492.2/1-1142	---tcgcaacagcggc	gacatcagcgt
speC,Escherichia_coli_str_K-12_MG1655_b0693_NC_000913.2/1-1142	tcgcccgtgctgt	ttagaac taa cga
speC,Escherichia_coli_BW2952_NC_012759.1/1-2114	tcgcccgtgctgt	ttagaac taa cga
speC,Escherichia_coli_IAI1/1-2114	tcgcccgtgctgt	ttagaac taa cga
speC,Escherichiacoli_APEC_O1/1-2114	tcgcccgtgctgt	ttagaac taa cga
speC,Salmonella_enterica_subsp_enterica_serovar_Typhi_str_C	tcgcccgtgctgt	ttagaac taa cga
speC,Salmonella_enterica_subsp_enterica_serovar_Paratyphi_A	tcgcccgtgctgt	ttagaac taa cga
speC,Salmonella_enterica_serovar_Typhimurium_str_LT2/1-2114	tcgcccgtgctgt	ttagaac taa cga
speC,Salmonella_enterica_subsp_enterica_serovar_Paratyphi/1-2114	tcgcccgtgctgt	ttagaac taa cga
speC,Citrobacter_koseri_ATCC_BAA-895_NC_009792.1/1-2114	tcgcccgtgctgt	ttagaac taa cga
speC,Citrobacter_rodentium_ICC168_NC_013716.1/1-2114	tcgcccgtgctgt	ttagaac taa cga
speC,Enterobacter_cloacae_SCF1_chromosome_NC_014618.1/1-2114	tcgcccgtgctgt	ttagaac taa cga
speC,Klebsiella_pneumoniae_sp_pneumoniae_MGH_78578/1-2114	tcgcccgtgctgt	ttagaac taa cga
speC,Klebsiella_pneumoniae_NTUH-K2044/1-2159	tcgcccgtgctgt	ttagaac taa cga
speC,Klebsiella_pneumoniae_342_NC_011283.1/1-2117	tcgcccgtgctgt	ttagaac taa cga
speC,Enterobacter_cloacae_subsp_cloacae_ATCC_13047/1-2114	tcgcccgtgctgt	ttagaac taa cga
speC,Enterobacter_sp_638_NC_009436.1/1-2044	tcgcccgtgctgt	ttagaac taa cga
speC,Enterobacter_sp_638_NC_009436.1/1-2044	tcgcccgtgctgt	ttagaac taa cga
speC,Serratia_proteamaculans_568/1-2141	tcgcccgtgctgt	ttagaac taa cga
speC,Yersinia_pestis_CO92/1-2141	tcgcccgtgctgt	ttagaac taa cga
speC,Yersinia_pestis_CO92/1-2141	tcgcccgtgctgt	ttagaac taa cga
speC,Yersinia_enterocolitica_subsp_enterocolitica_8081_NC_00600	tcgcccgtgctgt	ttagaac taa cga
speC,Pectobacterium_atrosepticum_SCR11043/1-2132	tcgcccgtgctgt	ttagaac taa cga
speC,Pectobacterium_wasabiae_WPP163_NC_013421.1/1-2132	tcgcccgtgctgt	ttagaac taa cga
speC,Pectobacterium_carotovorum_subsp_carotovorum_PC1_NC_00600	tcgcccgtgctgt	ttagaac taa cga



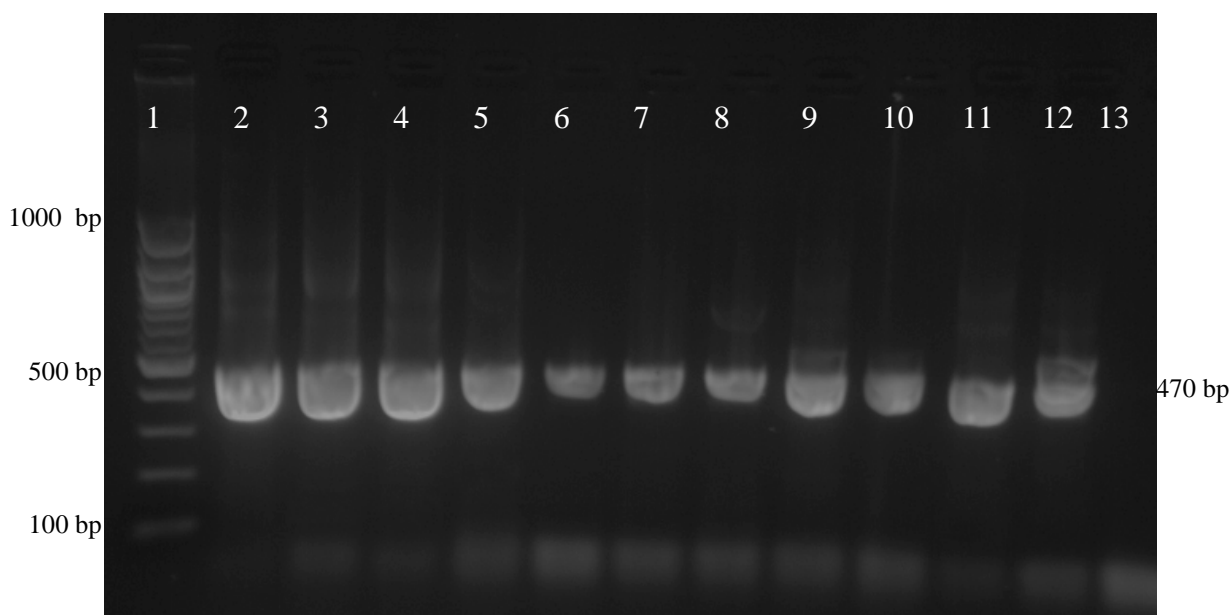
Obr. 7.23: Porovnání sekvencí genů *speC* u 31 bakteriálních kmenů s vyznačením konzervovaných sekvencí (červený rámeček) použitých pro návrh primerů *odc1F* (horní část) a *odc1R* (spodní část).

PCR se sadami primerů pro detekci genu *speC*

Všechny sady primerů byly laboratorně testovány s různými templátovými DNA, sada odc2F/odc2R v PCR reakci amplifikovala fragmenty genu *speC* jen u některých gramnegativních bakterií a amplifikovala také nespecifický produkt o velikosti cca 350 bp (obrázek č. 7.24). PCR se sadou odc1F/odc1R poskytovala očekávaný PCR produkt o velikosti 470 bp u všech testovaných gramnegativních bakterií (obrázek č. 7.25). Tato sada pak byla postupně použita v TD-PCR se všemi testovanými kmeny (viz tabulka č. 7.2).



Obr. 7.24: Touch-down PCR se sadou primerů odc2F/odc2R; 1 – marker (100bp), DNA: 2 - *Enterobacter aerogenes* CAPM 5634, 3 - *Escherichia coli* CAPM 6101, 4 - *Escherichia coli* CAPM 6104, 5 - *Escherichia coli* CAPM 6114, 6 - *Klebsiella pneumoniae* CAPM 6241M, 7 - *Pseudomonas aeruginosa* CAPM 5707, 8 - *Pseudomonas aeruginosa* CAPM 5718, 9 - *Pseudomonas aeruginosa* CAPM 5712, 10 - *Salmonella enterica* CAPM 5439, 11 - *Salmonella enterica* CAPM 5967, 12 - *Salmonella enterica* CAPM 6324, 13 - *Yersinia enterocolitica* CAMP 6154, 14 - *Yersinia ruckeri* CAPM 6095, 15 – slepý vzorek – DNA nahrazena vodou.

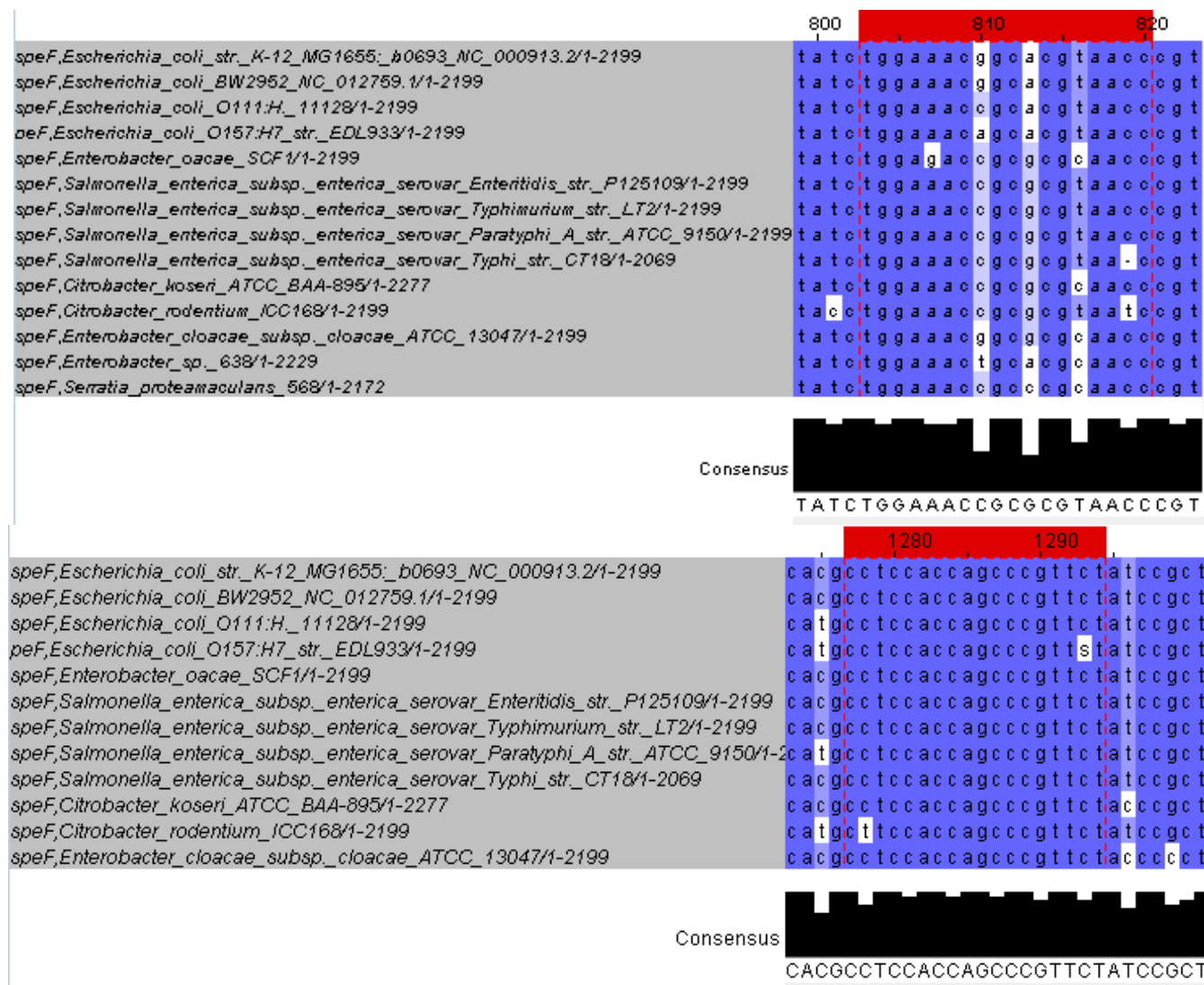


Obr. 7.25: Touch-down PCR se sadou primerů *odc1F/odc1R*; 1 – marker (100bp); DNA: 2 - *Escherichia coli* CCM 3954, 3 - *Enterobacter aerogenes* CCM 2531, 4 - *Serratia marcescens* CCM 303, 5 - *Salmonella enterica* CAPM 4420, 6 - *Proteus mirabilis* CCM 7188, 7- *Klebsiella oxytoca* CCM 2934, 8 - *Citrobacter freundii* CCM 7187, 9 - *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955, 10 - *Pseudomonas fluorescens* CCM 2798, 11 - *Pectobacterium carotovorum* CCM 1008, 12 - *Yersinia enterocolitica* CCM 7204, 13 - slepý vzorek – DNA nahrazena vodou.

7.1.7. Návrh a testování sad primerů pro detekci genu *speF*

Návrh primerů vhodných k detekci genu speF

Biodegradativní ornitin dekarboxyláza kódovaná genem *speF* se vyskytuje u mnoha rodů gramnegativních bakterií; u většiny z nich je tato forma označována jako inducibilní forma ornitin dekarboxylázy. Pro detekci genu *speF* u gramnegativních bakterií nebyla doposud navržena žádná sada primerů, byl tedy zvolen stejný postup, jako v předchozích případech. Z genových databází bylo vybráno 16 nukleotidových sekvencí genu *speF* a porovnáním algoritmem ClustalW po vizualizaci v programu Jalview bylo nalezeno několik konzervovaných domén vhodných pro návrh konsenzuálních primerů (viz obrázek č. 7.26). Přehled primerů navržených programem GeneFisher2 přináší tabulka č. 7.8.



Obr. 7.26: Porovnání sekvencí genů *speF* u 16 bakteriálních kmenů s vyznačením konservovaných sekvencí (červený rámeček) použitých pro návrh primerů *speF1F* (horní část) a *speF1R* (spodní část).

Tabulka 7.8 Seznam primerů navržených pro detekci genu *speF*, jejich nukleotidové sekvence a velikosti PCR produktů.

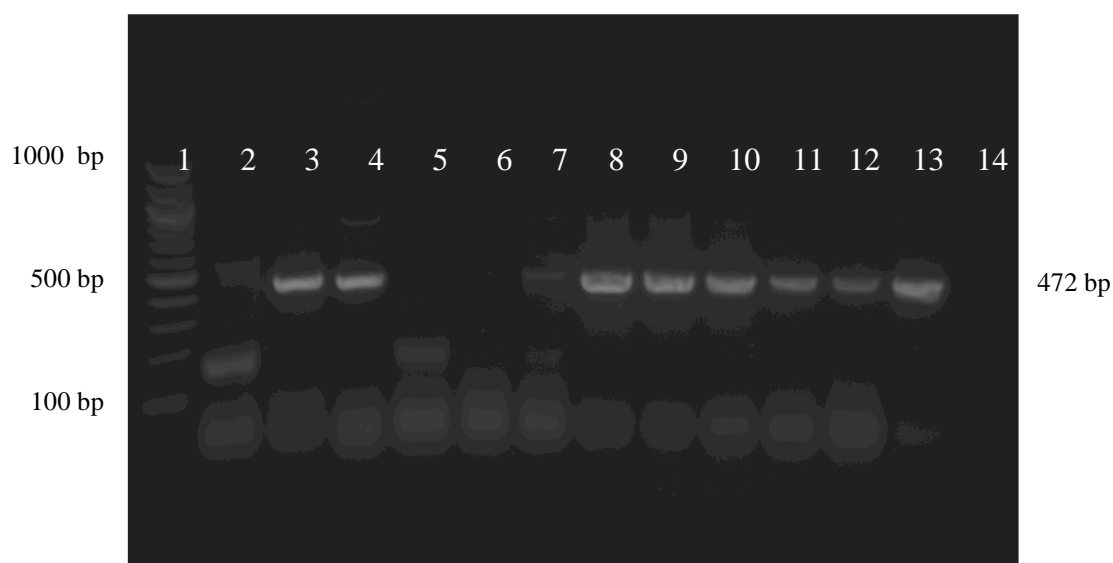
	Kódující primer	Antikódující primer	Velikost produktu (bp)
speF1	TGGAAACCGCRCGTAACC	AGAAYGGGCTGGTGGAGG	472
speF2	TCGCCRCTGYTGCTG	GGATAGAAAYGGGCTGGTG	200
speF3	TCGCCRCTGYTGCTGG	AGAAYGGGCTGGTGGAGG	196
speF4	TCGCCRCTGYTGCTG	GATAGAAAYGGGCTGGTGG	199

PCR se sadami primerů pro detekci genu *speF*

Všechny syntetizované primery byly testovány s několika kmeny gramnegativních bakterií. PCR se sadami speF3 a speF4 neamplifikovaly PCR produkty očekávané velikosti; PCR se sadou primerů speF2 zase u některých kmenů amplifikovala řadu nespecifických PCR produktů (obrázek č. 7.27). Jedinou sadou primerů, která v PCR amplifikovala pouze PCR produkt očekávané velikosti, byla sada s označením speF1 (obrázek č. 7.28), tato sada v PCR amplifikovala vnitřní fragment genu *speF* o velikosti 472 bp u cílových skupin mikroorganismů (viz tabulka č. 7.2).



Obr. 7.27: Touch-down PCR se sadou set primerů *speF2F/speF2R*; 1 – marker (100bp); DNA: 2 - *Escherichia coli* CCM 3954, 3 - *Enterobacter aerogenes* CCM 2531, 4 - *Serratia marcescens* CCM 303, 5 - *Salmonella enterica* CAPM 4420, 6 - *Proteus mirabilis* CCM 7188, 7- *Klebsiella oxytoca* CCM 2934, 8 - *Citrobacter freundii* CCM 7187, 9 - *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955, 10 - *Pseudomonas fluorescens* CCM 2798, 11 - *Pectobacterium carotovorum* CCM 1008, 12 - *Yersinia enterocolitica* CCM 7204, 13 - *Yersinia ruckeri* CAPM 6095, 14 - slepý vzorek – DNA nahrazena vodou.



Obr. 7.28: Touch-down PCR se sadou primerů *speF1F/speF*; 1 – marker (100bp); DNA: 2 - *Escherichia coli* CCM 3954, 3 - *Enterobacter aerogenes* CCM 2531, 4 - *Serratia marcescens* CCM 303, 5 - *Salmonella enterica* CAPM 4420, 6 - *Proteus mirabilis* CCM 7188, 7 - *Klebsiella oxytoca* CCM 2934, 8 - *Citrobacter freundii* CCM 7187, 9 - *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955, 10 - *Pseudomonas fluorescens* CCM 2798, 11 - *Pectobacterium carotovorum* CCM 1008, 12 - *Yersinia enterocolitica* CCM 7204, 13 - *Serratia marcescens* DEPE 4, 14 - slepý vzorek – DNA nahrazena vodou.

7.1.8. Multiplex PCR a PCR s předchozí reverzní transkripcí s novými sadami primerů

Teoretickým a následně *in situ* testováním byly vybrány sady primerů určené pro detekci klíčových genů zahrnutých v syntéze putrescinu u široké škály gramnegativních bakterií. Ucelený přehled vybraných primerů, jejich sekvencí, velikostí amplifikovaných produktů a identifikace polohy v cílovém genu přináší Příloha B.

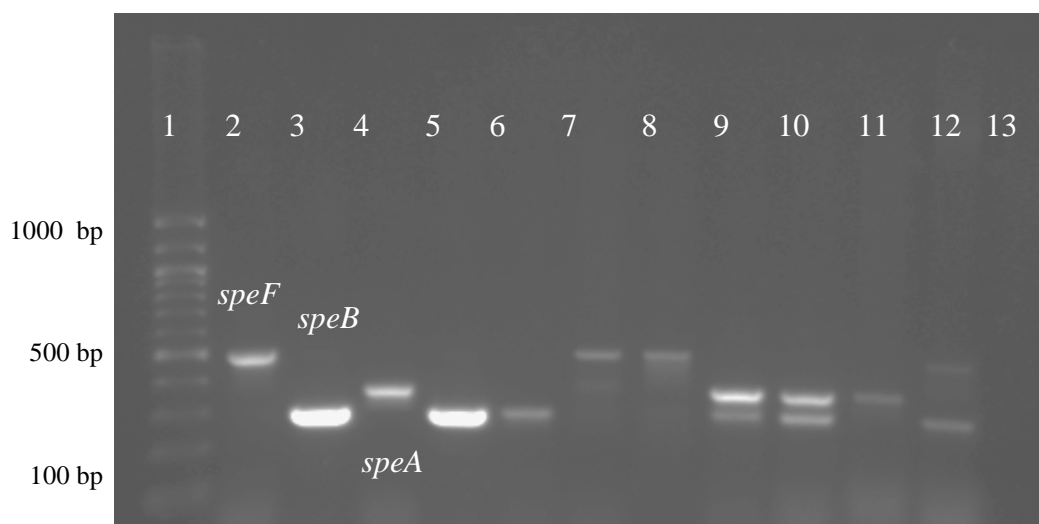
Provedení jednotlivých PCR reakcí pro detekci pouze jednoho genu je zdlouhavé a nové trendy se často zaměřují na tzv. multiplex PCR, což je v podstatě provedení klasické PCR reakce s cílem detekovat v průběhu jedné reakce více cílových genů. Toho je docíleno tak, že reakční směs obsahuje více sad primerů. Většinou jsou tyto multiplex PCR prováděny se 3 až 4 sadami primerů, přičemž je důležité navrhnout jejich kombinaci tak, aby velikosti amplifikovaných produktů byly různé a aby anealingové teploty primerů byly podobné. V této části je prezentováno celkem 7 sad nově navržených primerů určených k detekci genů kódujících důležité enzymy zahrnuté v metabolismu putrescinu u gramnegativních bakterií. Pro zjištění, zda je možné nově navržené primery použít také v multiplex PCR, byly testovány některé kombinace těchto primerů v multiplex PCR. Nejprve byly testovány různé varianty dvou sad

primerů – kombinace *speF1F/speF1R*; *adc5F/adc5R* a *agm4F/agm4R* (obrázek č. 7.29) a poté také kombinace tří sad primerů – kombinace *adc5F/adc5R*, *agm4F/agm4R*, *speF1F/speF1R* a *odc1F/odc1R* v jedné PCR reakci (obrázek č. 7.30). Při všech testech docházelo pouze k amplifikaci očekávaných produktů a nedocházelo ke vzniku produktů nespecifických. Nově navržené primery tedy lze použít v kombinaci s jinými primery v různých multiplex PCR. Kombinace více sad primerů nebyla testována, protože některé amplifikované produkty mají podobnou velikost a nebyly by při elektroforetickém dělení dostatečně separovány. Většina publikovaných multiplex PCR metod je ze stejného důvodu založena na kombinaci tří sad primerů (Marcobal et al., 2005, De las Rivas et al., 2005).

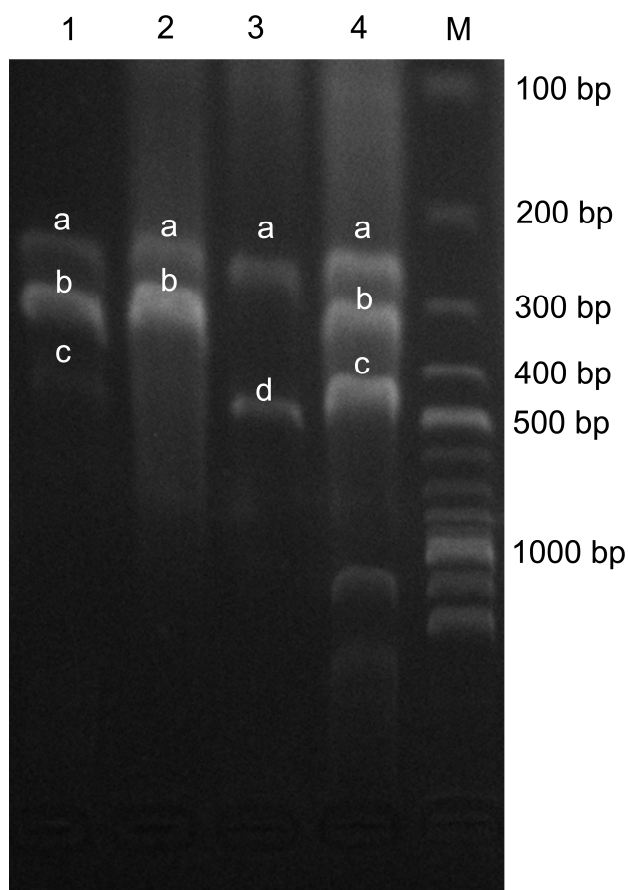
Dalším přístupem, který byl testován, bylo provedení PCR s předchozí reverzní transkripcí. V tomto případě se jedná o detekci transkriptu cílového genu, tedy detekci mRNA kódující sekvenci tohoto genu. Tímto přístupem lze detekovat nejen přítomnost genu, ale také to, zda je tento gen za daných podmínek aktivně využíván (přepisován). Tento přístup je vhodné kombinovat s metodou real-time PCR, která umožňuje kvantifikaci PCR produktů. Možnost kvantitativně sledovat přepis určitého genu má velký potenciál, a to zejména v oblasti výzkumu faktorů ovlivňujících produkci putrescinu v potravinách. Metodou real-time PCR můžeme nejen kvantifikovat přítomnost aminogenních mikroorganismů kvantifikací sledovaných genů (Fernández et al., 2006, Nannelli et al., 2008), ale také sledovat, za jakých podmínek využívají určitou metabolickou dráhu vedoucí ke kumulaci putrescinu. Tyto přístupy byly prozatím použity spíše sporadicky a bývají využívány spíše pro výzkum organizace genomu. V oblasti výzkumu metabolismu biogenních aminů byla tato metoda využita například u kvantifikace genové exprese genu *tdc* u producentů tyraminu (Torriani et al., 2008). Výzkumy a metody v této oblasti jsou prozatím v počátcích. Z hlediska problematiky výzkumu metabolismu putrescinu je tento přístup velmi perspektivní a nově navržené primery mají v této oblasti velký potenciál pro následné výzkumy.

Pro testování, byla vybrána sada primerů *adc5* amplifikující vnitřní úsek genu *speA* o velikosti 282 bp. PCR s předchozí reverzní transkripcí byla úspěšná a byla prokázána přítomnost transkriptu genu *speA* u bakterie *Escherichia coli* CCM 3954.

Tyto dílčí výsledky z multiplex PCR a PCR s předchozí reverzní transkripcí potvrdily přínos nově navržených primerů pro další výzkum v oblasti produkce putrescinu gramnegativními bakteriemi v potravinách.



Obr. 7.29: Multiplex PCR s kombinací více sad primerů určených pro detekci genů *speF*, *speA* a *speB* u gramnegativních bakterií; 1 – marker (100bp), 2 - *Escherichia coli* CAMP 6114 s primery *speF1F/speF1R*; 3 - *Klebsiella oxytoca* CCM 2934 s primery *adc5F/adc5R*; 4 - *E. coli* CAMP 6114 s primery *agm4F/agm4R*; 5 - *Pseudomonas aeruginosa* CCM 2798 s kombinací primerů *adc5F/adc5R* a *agm4F/agm4R*; 6 - *Pseudomonas fluorescens* CCM 2798 s kombinací primerů *adc5F/adc5R* a *agm4F/agm4R*; 7- *Serratia marcescens* DEPE 4 s kombinací primerů *speF1F/speF1R* a *agm4F/agm4R*; 8 - *Klebsiella oxytoca* CCM 2934 s kombinací primerů *speF1F/speF1R* a *agm4F/agm4R*; 9 - *Klebsiella pneumoniae* CAPM 6241 s kombinací primerů *adc5F/adc5R* a *agm4F/agm4R*; 10 - *Klebsiella* sp. DEPE 98 s kombinací primerů *adc5F/adc5R*, *agm4* a *speF1F/speF1R*; 11 - *Klebsiella oxytoca* CCM 2934 s primery *adiA4* a *speF1F/speF1R*; 12 - *Yersinia enterocolitica* DEPE 88 *adc5F/adc5R* a *speF1F/speF1R*, 13 - slepý vzorek – DNA nahrazena vodou.



Obr. 7.30: Multiplex PCR s kombinací tří sad primerů; detekce genů *speC*, *speF*, *speA* a *speB* u gramnegativních bakterií; 1 - *Escherichia coli* CAMP 6114; 2 - *Klebsiella oxytoca* CCM 2934; 3 - *Pseudomonas aeruginosa* CCM 2798; 4 - *Serratia marcescens* DEPE 4; M - marker (100bp); a - *speA* (282 bp); b - *speB* (355 bp); c - *speF* (472 bp); d – *odc* (470 bp) použité sady primerů: 1, 2 a 4 - *adc5F/adc5R*, *agm4F/agm4R*, a *speF1F/speF1R*; 3 - *adc5F/adc5R* a *odc1F/odc1R*.

7.1.9. Sekvenační analýza

Pro potvrzení, že amplifikované produkty skutečně pochází z cílových genů, byly pro každou sadu primerů vybrány PCR produkty získané PCR reakcí s DNA ze 3-5 různých mikroorganismů. PCR produkty byly purifikovány (viz kapitola č. 6.5, str. 43) a odeslány na sekvenaci. Výsledné sekvence byly vizualizovány programem Sequence scanner a porovnány s dostupnými genovými databázemi (GenBank) za použití nástroje NucleotideBlast. Ukázka a testování získané sekvence přináší obrázky č. 7.31, 7.32 a 7.33.

Tři amplikony genů *speA*, *adiA*, *adi*, *speB*, *aguA*, *speC* a 5 amplikonů genu *speF* získaných za použití nově navržených sad primerů v TD-PCR byly sekvenovány. Výsledky sekvenační analýzy přináší tabulka č. 7.9.

Tabulka 7.9 Výsledky sekvenace PCR produktů.

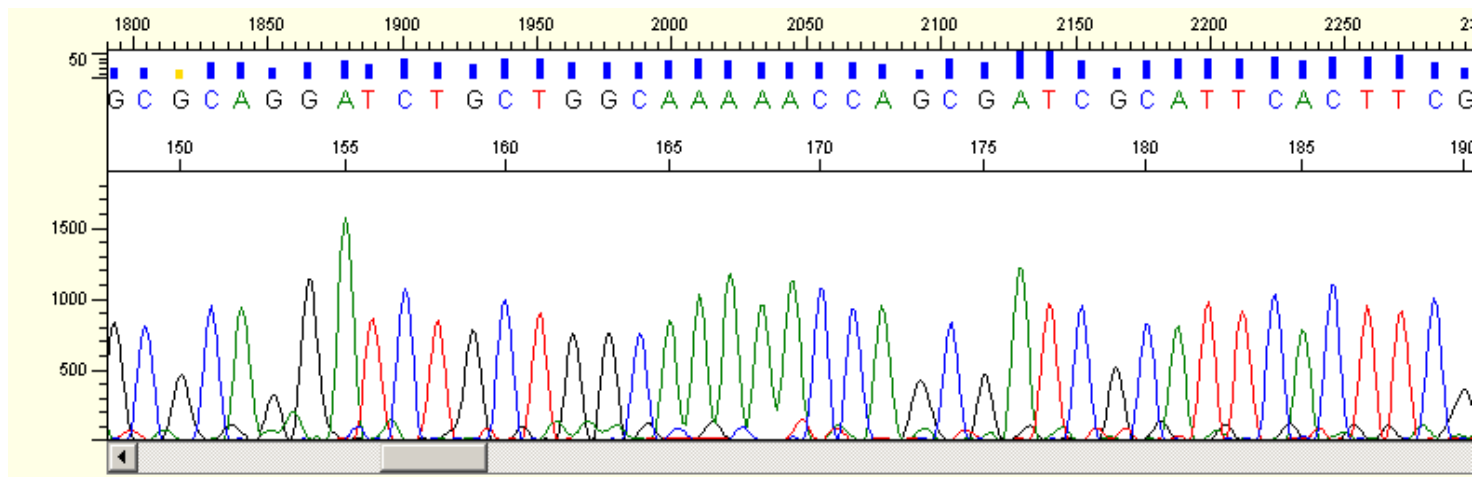
Cílový gen	Set primerů	Testovaný mikroorganismus	Procento identity se známou sekvencí
<i>speA</i>	adc5F/adc5R	<i>Escherichia coli</i> CCM 3954	99% <i>speA E. coli</i> O83:H1 NRG 857C
		<i>Salmonella enterica</i> CAPM 4420	99% <i>speA Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Dublin CT_02021853
		<i>Klebsiella oxytoca</i> CCM 2934	91% <i>speA Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> NTUH-K2044
<i>adiA</i>	adiA3F/adiA3R	<i>Escherichia coli</i> CAPM 6101	99% <i>adiA E. coli</i> UM146
		<i>Escherichia coli</i> CAPM 6114	99% <i>adiA E. coli</i> 042
		<i>Salmonella enterica</i> CAPM 5967	99% <i>adiA Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Choleraesuis str. SC-B67
<i>ldc, adi</i>	adi5F/adi5R	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955	99 % putative Orn/Arg/Lys decarboxylase <i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CAPM 5718	99% probable Orn/Arg/Lys decarboxylase <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA7
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CAPM 5712	99% probable Orn/Arg/Lys decarboxylase <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LESB58
<i>speB</i>	agm4F/agm4R	<i>Escherichia coli</i> CCM 3954	98% <i>speB E. coli</i> SE15.
		<i>Salmonella enterica</i> CCM 4420	99% <i>speB Salmonella Typhimurium</i> UK-1
		<i>Citrobacter freundii</i> CCM 7187	91% <i>speB Citrobacter rodentium</i> ICC168

Pokračování tabulky 7.9

<i>aguA</i>	AgDI4F/AgDI6R	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955	99% <i>aguA Pseudomonas aeruginosa</i> LESB58
		<i>Yersinia enterocolitica</i> CCM 7204	97% <i>aguA Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>palearctica</i> 105.5R
		<i>Pectobacterium carotovorum</i> CCM 1008	91% <i>aguA Pectobacterium wasabiae</i> WPP163
<i>speF</i>	spef1F/spef1R	<i>Escherichia coli</i> CCM 3954	99% ornithine decarboxylase, inducible, <i>E. coli</i> ABU 83972
		<i>Enterobacter aerogenes</i> CCM 2531	99% ornithine decarboxylase <i>Enterobacter aerogenes</i> KCTC 2190
		<i>Salmonella enterica</i> CAPM 4420	99% <i>speF Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium str. UK-1
		<i>Yersinia enterocolitica</i> CCM 7204	99% <i>speF Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> 8081
		<i>Serratia marcescens</i> CCM 303	99% <i>speF Edwardsiella tarda</i> FL6-60

1	GGCTGTYGST	ACTACATGAA	TGCAGCCTGA	ACCTTGCAGA	AAAAAATCAG	CGCCAGCCCA	CTGACC AAAA	CTAAA RMCGR	ACAGAAACCG	TCTTACAGCG	TAGTGACCAA	CTGTACCTAT	120
121	GACGGCGTAT	GCTATAACGC	CAAAGAGGCG	CAGGATCTGC	TGGCAAAAAC	CAGCGATCGC	ATTCACCTCG	ACGAA GCATG	GTACGGCTAT	GCGCGCTTCA	ACCCGATTTA	TTGCGATCAC	240
241	TACGGGATGC	GCGGCGAGCC	AGGCGACCAT	AACGGTCCGA	CCGTGTTTGC	CACCCACTCC	ACACACAAAC	TACTGAATGC	GCTTTCACAA	GCTTCCTACA	TTCACGTCCG	TGAAGGCCGT	360
361	GCGCGGGTGA	ATTTCTCCCG	CTTCAACCAG	GCATATATGA	TGCATGCCAC	CACCTCTCCG	TTATATGCCA	TCTGCGCATC	CAACGATGTG	GCGGTATCAA	TGATGGACGG	TAACAGCGGC	480
481	CTGTCCCTGA	CTCAAGAGGT	GATCGACGAA	GCGTTAACG	TCCATCATTG	ATACCGCCAC	ATCGTTGGAT	GCGCAGATGG	CATATAACGG	AGAGGTGGTG	GCATGCATCA	TATATGCCTG	600
601	GTTGAAGCGG	GAGAAATTC	CCGCGCCACG	GCCTTACGG	ACGTGAATGT	AGGAAGCTTG	TGAAAGCGCA	TTCAGTAGTT	TGTGTGTGGA	GTGGGTGGCA	AACACGGTCG	GACCGTTATG	720
721	GTCGCCTGGC	TCGCCGCGCA	TCGCGTAGTG	ATCGCAATAA	ATCGGGTTGA	AGCGCGCATA	GCCGTACCAT	GCTTCGTCGA	AGTGAATGCG	ATCGCTGGTT	TTTGCCAGCA	GATCCTGCGC	840
841	CTCTTTGGCG	TATAGCATAC	GCCGTCATAG	GTACAGTTGG	TCACVACGCT	GTAAGA CGGT	TTCTGTCCGG	CTTTAGTTTT	GGTCAGTGGG	CYGGCGCTGA	TTTTTTTTCT	GCAAMGTTAC	960
961	AGGGCTGCAT	TCCTGCAGGT	AGATTGGGCC	CGATAATGCC	GTAACGGTTA	CGGGCTTGGC	AA						1022

Obr. 7.31: Výsledek sekvenace produktu touch-down PCR získaného se sadou primerů *adi5F/adi5R* u *Salmonella enterica* CAPM 5967. Modrá barva vyznačuje úseky sekvenace získané s nejvyšší mírou jistoty.



Obr. 7.32: Výsledek sekvenace produktu touch-down PCR získaného se sadou primerů *adi5F/adi5R* u *Salmonella enterica* CAPM 5967. Ukázka vyhodnocení kvality sekvence programem *Sequence Scanner*.

Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. UK-1 chromosome, complete genome
 Sequence ID: [ref|NC_016863.1|](#) Length: 4817868 Number of Matches: 2

Range 1: 4500748 to 4501244 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
869 bits(470)	0.0	487/497(98%)	1/497(0%)	Plus/Minus

Features: [catabolic arginine decarboxylase](#)

Query	1	TGCAGCCTG-AACCTTGCAGaaaaaaaaTCAGCGCCAGCCCACTGACCAAAACTAAARMCG	59
Sbjct	4501244	TGCAGCCTGAAACCTTGCAGAAAAAAAAATCAGCGCCAGCCCGCTGACCAAAACTAAAGCCG	4501185
Query	60	RACAGAAACCGTCTTACAGCGTAGTGACCAACTGTACCTATGACGGCGTATGCTATAACG	119
Sbjct	4501184	GACAGAAACCGTCTTACAGCGTAGTGACCAACTGTACCTATGACGGCGTATGCTATAACG	4501125
Query	120	CCAAAGAGGGCGCAGGATCTGCTGGCAAAAACCAGCGATCGCATTCACTTTCGACGAAGCAT	179
Sbjct	4501124	CCAAAGAGGGCGCAGGATCTGCTGGCAAAAACCAGCGATCGCATTCACTTTCGACGAAGCAT	4501065
Query	180	GGTACGGCTATGCGCGCTTCAACCCGATTTATTGCGATCACTACGGGATGCGCGGCGGAGC	239
Sbjct	4501064	GGTACGGCTATGCGCGCTTCAACCCGATTTATTGCGATCACTACGGGATGCGCGGCGGAGC	4501005
Query	240	CAGGCGACCATAACGGTCCGACCGTGTGTTGCCACCCACTCCACACACAAACTACTGAATG	299
Sbjct	4501004	CAGGCGACCATAACGGTCCGACCGTGTGTTGCCACCCACTCCACACACAAACTACTGAATG	4500945
Query	300	CGCTTTCACAAGCTTCTTACATTACCGTCCGTAAGGCCGTTGGCGCGGTGAATTTCTCCC	359
Sbjct	4500944	CGCTTTCACAAGCTTCTTACATTACCGTCCGTAAGGCCGTTGGCGCGGTGAATTTCTCCC	4500885
Query	360	GCTTCAACCAGGCATATATGATGCATGCCACCACCTCTCCGTTATATGCCATCTGCGCAT	419
Sbjct	4500884	GCTTCAACCAGGCATATATGATGCATGCCACCACCTCTCCGTTATATGCCATCTGCGCAT	4500825
Query	420	CCAACGATGTGGCGGTATCAATGATGGACGGTAACAGCGGCCTGTCCCTGACTCAAGAGG	479
Sbjct	4500824	CCAACGATGTGGCGGTATCGATGATGGACGGTAACAGCGGCCTGTCCCTGACTCAAGAGG	4500765
Query	480	TGATCGACGAAGCKGTT 496	
Sbjct	4500764	TGATTGACGAAGCGGTT 4500748	

Range 2: 4500790 to 4501084 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match ▲ First Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
523 bits(283)	3e-144	291/295(99%)	0/295(0%)	Plus/Plus

Features: [catabolic arginine decarboxylase](#)

Query	494	GTTAACGTCCATCATTGATACCGCCACATCGTTGGATGCGCAGATGGCATATAACGGAGA	553
Sbjct	4500790	GTTAACGTCCATCATTGATACCGCCACATCGTTGGATGCGCAGATGGCATATAACGGAGA	4500849
Query	554	GGTGGTGGCATGCATCATATATGCTGTTGAAAGCGGGAGAAAATTCACCGCGCCACGGCC	613
Sbjct	4500850	GGTGGTGGCATGCATCATATAGGCTGTTGAAAGCGGGAGAAAATTCACCGCGCCACGGCC	4500909

Obr. 7.33: Výsledek sekvenace produktu touch-down PCR získaného se sadou primerů *adi5F/adi5R* u *Salmonella enterica* CAPM 5967. Ukázka vyhodnocení kvality sekvence nástrojem *NucleotideBlast*.

Analýza sekvencí amplikonů genu *speC* získaného v TD-PCR s primery odc1F/odc1R ukázala, že tato sada primerů amplifikuje směs genů *speC* a *speF*. Analýzou všech ostatních získaných sekvencí a jejich porovnáním s genovými databázemi byl zjištěn vysoký stupeň identity (99-91%) pro všechny zkoumané amplikony. Sekvenační analýza tedy potvrdila specifičnost nově navržených primerů.

7.1.10. Produkce putrescinu a agmatinu

Výsledky TD-PCR byly porovnány s výsledky kultivačního experimentu, který byl zaměřen na zjištění skutečné produkce putrescinu a agmatinu jednotlivými kmeny. Výsledky přináší tabulka č. 7.2.

Z tabulky je zřejmé, že všechny testované kmeny byly aktivními producenty putrescinu. Nejvyšší produkce putrescinu byla zaznamenána u kmene *Escherichia coli* CAPM 6101, který po kultivaci po dobu 24 hodin vyprodukoval 930 mg/l putrescinu.

Také produkce agmatinu byla zaznamenána u všech třiceti dvou testovaných bakteriálních kmenů. Produkce agmatinu byla zřetelně nižší než produkce putrescinu, nicméně všechny kmeny byly po kultivaci trvající 12 hodin schopny produkovat více než 1 mg/l agmatinu. Nejaktivnějšími producenty agmatinu byly kmeny *Proteus mirabilis* CCM 7188 a *Enterobacter aerogenes* CCM 2531, které produkovaly více než 10 mg/l agmatinu. U všech kmenů byl zaznamenán pokles koncentrace agmatinu o cca 50 % (od 21 % do 81 %) po dvacetičtyř-hodinové kultivaci vzhledem ke koncentraci vyprodukované po dvanácti-hodinové kultivaci ($P < 0.01$). Podrobněji viz diskuze 7.3 (str. 91).

7.2. Výsledky II. fáze

Metabolismus putrescinu grampozitivních bakterií je méně složitý než u gramnegativních bakterií, operuje hlavně v katabolickém směru a obsahuje pouze 3 enzymy ve dvou drahách (viz kapitola č. 4.5.2, str. 22). Práce byla zaměřena zejména na enzymy ODC (v tomto případě biodegradační forma), někdy označovány shodně jako u gramnegativních bakterií *speF*. Druhým významným enzymem je enzym agmatin deimináza kódovaný genem *aguA*. Zde bylo nutno zjistit, zda existuje podobnost mezi genem *aguA* u gramnegativních a grampozitivních bakterií. Gen *ptcA*, kódující putrescin transkarbamoylázu, se nachází (stejně jako gen *aguB* u gramnegativních bakterií) na společném operonu s genem *aguA* a postačí tedy detekce jednoho z nich.

Pro detekci obou výše zmíněných genů bylo vyvinuto několik dříve publikovaných sad primerů (viz tabulka č. 4.3). Narozdíl od gramnegativních bakterií, u nichž prakticky neexistovaly dříve navržené primery, v oblasti grampozitivních bakterií (zejména LAB) bylo v dřívějších výzkumech navrženo velké množství univerzálních primerů určených k detekci jak genu *speF*, tak genů *aguA* a *ptcA*. V prvním kroku této části práce byly tedy testovány tyto primery pro možnosti sledování metabolismu putrescinu u grampozitivních bakterií.

7.2.1. Testování primerů určených pro detekci genu *aguA* a *odc*

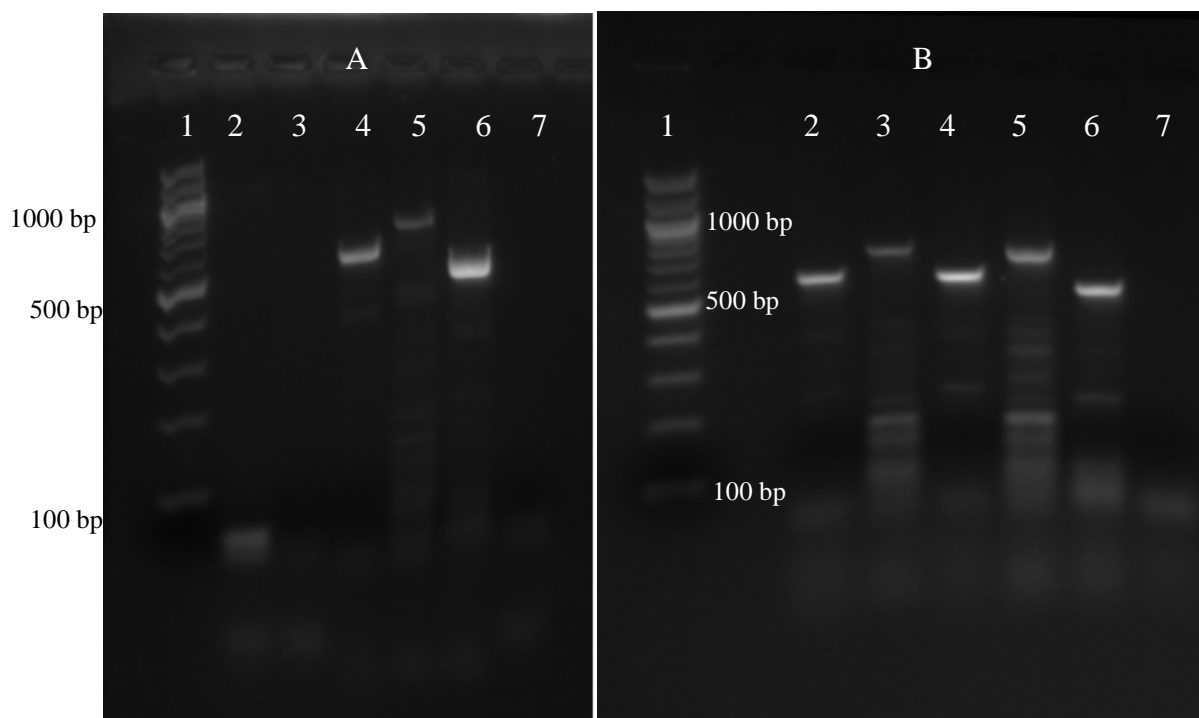
Jako testovací mikroorganismy byly použity kmeny *Lactobacillus curvatus* AI-2 a *Lactobacillus curvatus* AI-3, u nichž byla produkce putrescinu již dříve prokázána (Buňková et al., 2010b). Vzhledem k tomu, že v této oblasti již bylo publikováno několik sad primerů, bylo přistoupeno k jejich testování. Pro detekci genu *aguA* byly vybrány primery AgD1/AgD2 (Coton et al., 2010), agdif/agdir (Nannelli et al., 2008) a aguA-F/ aguA-R (Landete et al., 2010). Pro detekci genu *speF* (*odc*) byly použity primery 3'/16' (Marcobal et al., 2005) a PUT1-F/ PUT1-R (Muñoz et al., 2004). Sekvence primerů a velikosti produktů jsou uvedeny v tabulce č. 7.10.

Se sadami primerů 3'/16' a PUT1-F/ PUT1-R určených k detekci *odc* nebyl ani u jednoho kmene získán očekávaný amplikon. Tento výsledek se dal očekávat, protože geny *odc* se vyskytují pouze u některých LAB (viz kapitola č. 4.5.2, str. 22). Se sadami primerů určených k detekci genu *aguA* byly v PCR obdrženy amplikony očekávané velikosti pouze se sadami primerů aguA-R/aguA/F a AgD1/AgD2, přičemž s první sadou bylo získáno také velké množství nespecifických produktů (obr. 7.34 A). Obě sady primerů pak byly testovány s DNA obou kmenů *L. curvatus* (obr. 7.34 B). Amplikony získané PCR reakcí DNA obou kmenů *L. curvatus* s primery AgD1/AgD2 byly následně purifikovány a odeslány na sekvenci. Sekvenační analýza obou produktů

prokázala 99% shodu s genem pro agmatin deiminázu kmene *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KF147, čímž potvrdila možnost použít uvedené primery pro další výzkumy v oblasti studia metabolismu putrescinu u LAB.

Tabulka 7.10 Seznam primerů použitých pro detekci genů *aguA* a *speF*, jejich nukleotidové sekvence a velikosti PCR produktů

	Sekvence primeru	Cílový gen	Velikost produktu (bp)
AgD1	YGTNGAYGGHSAAGG	<i>aguA</i>	600
AgD2	GTTGNGTRATRCAGTGAAT		
agdiF	ATGCCCGGTGAATTTGAA	<i>aguA</i>	90
agdiR	TTGCGC TGGTTTAGCACC		
aguA-F	GACTGGAC(AGT)TT(CT)AAGG(GC/CT)TGGGG	<i>aguA</i>	830
aguA-R	TGYTGRGTRATRCARTGR		
PUT1-F	TWYMA YGCNGAYAARACNTAYYYTGT	<i>odc</i>	1440
PUT1-R	ACRCANAGNACNCCNGNGGRTANGG		
3´	GTNTTYAA YGCNGAYAARACNTAYTTYGT	<i>odc</i>	1440
16´	TACRCARAATACTCCNGGNGGRTANG		



Obr. 7.34: Touch-down PCR se sadami primerů pro detekci genů *aguA* u grampozitivních bakterií; A - Touch-down PCR, DNA *L. Curvatus* AI-2; 1 – marker (100bp); primery: 2 – *adiF/adiR*, 3 – *PUT1-F/PUT1-R*, 4 – *AgD1/AgD2*, 5 – *aguA-F/aguA-R*, 6 – pozitivní kontrola *adiA3F/R* s DNA *Escherichia coli* CAPM 6104, 7- slepý vzorek – DNA nahrazena vodou. B - Tchdown PCR, 1 – marker (100bp), 2 - *AgD1/AgD2* s DNA *L. Curvatus* AI-2, 3 - *aguA-F/aguA-Rs* DNA z DNA *L. Curvatus* AI-2, 4 - *AgD1/AgD2* s *L. Curvatus* AI-3, 5 - *aguA-F/aguA-Rs* DNA z DNA *L. Curvatus* AI-3, 6 – pozitivní kontrola *adiA3F/R* s DNA *Escherichia coli* CAPM 6104, 7- slepý vzorek – DNA nahrazena vodou.

7.3. Diskuze

V prvním kroku práce bylo nejprve testováno několik sad dříve publikovaných primerů. Z dříve publikovaných metod určených pro gramnegativní bakterie byly testovány dvě sady primerů - 3/16 (Marcobal et al, 2005) a PUT1-F/PUT1-R (Muñoz et al., 2004). Tyto primery byly určeny pro detekci genů *odc* u gramnegativních bakterií. Bohužel ani jedna sada nepřinesla uspokojivé výsledky (viz kapitola č. 7.1.6, str. 71, obrázek č. 7.22).

Cílem této práce bylo navrhnout univerzální sadu primerů určených k detekci genu *speC* u obou skupin mikroorganismů – jak u bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*, tak u bakterií rodu *Pseudomonas* a detekci genu *speF* u široké škály enterobakterií. Jak je vidět z tabulky výsledků TD-PCR (tabulka č. 7.2, str. 56) a tabulky výsledků sekvenční analýzy (tabulka č. 7.9, str. 84), set primerů *speF1F/speF1R* navržený v této práci vykazuje schopnost amplifikovat vnitřní fragment genu *speF* u různých kmenů enterobakterií.

Lze tedy říci, že primery navržené v této práci umožňují širší rozsah použitelnosti než dříve publikované sady primerů: (i) nová sada primerů *speC1F/speC1R* je schopna detekovat *odc* geny u obou – *Pseudomonas* sp. i enterobakterií; a (ii) se sadou primerů *speF1F/speF1R* můžeme specificky detekovat přítomnost genů *speF*, kódujících inducibilní ornitin dekarboxylázu.

Pro detekci genů *odc* u LAB bylo vyvinuto několik sad primerů (viz tabulka č. 4.3, str. 33). Tyto sady byly testovány, bohužel však žádný z testovaných grampozitivních kmenů s těmito sadami primerů nebyl *odc* pozitivní. To je patrně dáno tím, že se geny *odc* u těchto LAB nevyskytují.

Další z testovaných sad publikovaných v předchozích výzkumech byly sady určené k detekci genu *aguA* a u grampozitivních kmenů. Pro detekci tohoto genu bylo navrženo množství sad primerů (viz tabulka č. 4.3, str. 33), některé sady primerů byly testovány v této práci. Pouze se sadou *AgD1/AdD2* bylo dosaženo uspokojivých výsledků (viz kapitola č. 7.2.1, str. 88) a metodika byla také úspěšně ověřena sekvenční analýzou PCR produktů. Vzhledem k nízkému počtu LAB produkujících putrescin, nebyla tato část práce dále rozšířena. Byla pouze vypracována a ověřena TD-PCR metoda pro detekci genu *aguA* u LAB s dříve publikovanými primery *AgD1/AgD2*. V tomto bodě byl ukončen výzkum ve fázi II.

Další sady primerů určené k detekci cílových genů u gramnegativních bakterií nebyly dříve publikovány a bylo tedy přistoupeno k návrhu vlastních sad primerů a jejich testování.

Úspěšně testované sady primerů zahrnovaly nově navržené i dříve publikované sady primerů určených k detekci: genu *speA* kódujícího biosyntetickou arginin dekarboxylázu ve všech skupinách gramnegativních bakterií; genu *adiA* kódujícího biodegradativní arginin dekarboxylázu (inducibilní) u *Escherichia coli* a *Salmonella*; genu *Ldc/adi* kódujícího

„putative“ (předpokládanou) arginin dekarboxylázu u *Pseudomonas*; genu *speB* kódujícího agmatinázu u enterobakterií, genu *aguA* kódujícího agmatin deiminázu u *Pseudomonas*, *Yersinia* a LAB; genu *speC* kódujícího biosyntetickou ornitin dekarboxylázu u obou enterobakterií i pseudomonád, a genu *speF* kódujícího inducibilní ornitin dekarboxylázu u enterobakterií.

Všechny primery byly úspěšně testovány v TD-PCR se 32 gramnegativními a 2 grampozitivními producenty putrescinu. Výsledky PCR byly v souladu s informacemi ve volně dostupných databázích metabolických drah. Amplikony genů *speA* a *speC* byly získány s DNA ze všech gramnegativních producentů putrescinu, což potvrzuje, že všechny tyto kmeny nesou jak ornitin tak arginin dekarboxylázovou dráhu (dle očekávání).

Výsledky TD-PCR metody s ostatními navrženými a úspěšně testovanými primery byly vždy v souladu s informacemi uvedenými v databázích metabolických drah pro daný mikroorganismus.

Agmatin deiminázová dráha byla prokázána u všech testovaných kmenů *Pseudomonas* sp., *Yersinia*, LAB a u kmene *Pectobacterium carotovorum* CCM 1008. Všechny ostatní testované kmeny poskytovaly pozitivní výsledek v PCR s primery agm4F/agm4R, což ukazuje na přítomnost genu *speB* pro enzym agmatinázu. Žádný z testovaných kmenů nebyl zároveň nositelem genů *aguA* a *speB*. Všechny kmeny *Escherichia coli* a *Salmonella* byly *adiA* pozitivní (TD-PCR se sadou primerů *adiA3F/adiA3R*) a všechny *Pseudomonas* sp. poskytovaly pozitivní reakci s primery *adi5F/adi5R*, které detekují přítomnost genu druhého typu arginin dekarboxylázy (Orn/Lys/Arg decarboxylase family protein). Všechny enterobakterie, kromě kmenů *Klebsiella*, byly *speF* pozitivní se sadou primerů *speF1F/speF1R*.

Výsledky TD-PCR jak s DNA sbírkových kmenů, tak také s DNA izolátů z potravin prokázaly, že nově navržené primery spolehlivě detekují přítomnost cílových genů, které jsou důležité pro syntézu putrescinu u všech důležitých gramnegativních producentů putrescinu.

Bohužel pár primerů *odc1F/odc1R* v PCR amplifikoval směs genů *speC* a *speF* a nikoli selektivně pouze gen *speC*, jak bylo zamýšleno. Nicméně takovéto problémy byly očekávány, vzhledem k vysoké podobnosti těchto dvou genů. Obdobné problémy se vyskytly i u již dříve publikovaných sad primerů (Fadhlaoui-Zid et. al., 2012). Výskyt genu *speF* však může být selektivně detekována sadou primerů *speF1F/speF1R* a tím může být diferencována přítomnost genů *speF* a *speC*.

Nově navržené sady primerů byly také testovány na použití v multiplex PCR, a to v různých variantách. Bylo prokázáno, že nové primery je možné kombinovat a v jedné PCR reakci tak detekovat více genů (viz kapitola č. 7.1.8, str. 79). Nové primery jsou tedy vhodné pro použití v různých multilex PCR metodách.

Co se týče sledované produkce putrescinu a agmatinu u testovaných kmenů, tak nejvyšší produkce putrescinu (930,03 mg/l) byla detekována u kmene *Escherichia coli* CAPM 6101. Kmeny *Salmonella enterica* CCM 4420 a *Enterobacter aerogenes* CAPM 5634 byly shledány jako druhý a třetí nejproduktivnější kmen. V dřívějších publikacích byly jako producenti putrescinu popsány bakterie *Enterobacter aerogenes* ve fermentovaných klobásách (Shiling Lu et al., 2010) nebo *Klebsiella oxytoca* ve sledích (Özogul et al., 2005). V této práci bylo 9 testovaných kmenů schopno produkovat více než 200 mg/l putrescinu. U všech kmenů bylo zjištěno, že po dvacetičtyřhodinové kultivaci u nich vzroste produkce putrescinu průměrně 7krát (od 1,2 do 48krát) oproti dvanáctihodinové kultivaci. Toto zjištění potvrzuje, že produkce putrescinu se zpravidla zvyšuje se vzrůstající délkou skladování potravin.

Mnoho autorů vedle putrescinu detekovalo u gramnegativních kontaminantů také produkci agmatinu těmito kmeny (Buňková et al., 2010; Curiell et al., 2011; Özogul et al., 2005; Pons–Sanchez-Cascado et al., 2005; Saccani et al., 2005). V rámci našeho výzkumu bylo zjištěno, že všechny testované gramnegativní kmeny produkují agmatin. Detekce agmatinu potvrzuje existenci a také i aktivní využívání arginin dekarboxylázové dráhy v produkci putrescinu u těchto kmenů. Výskyt agmatinu a značný pokles jeho koncentrace mezi dvanácti a dvacetičtyř hodinovou kultivací potvrzuje fakt, že agmatin vystupuje coby metabolický meziprodukt a že všechny kmeny aktivně využívají metabolické dráhy vedoucí přes agmatin k produkci putrescinu. Agmatin je důležité detekovat mimo jiné také proto, že některé mikroorganismy (zejména grampozitivní kmeny) dokáží přeměňovat extracelulární agmatin na putrescin (Smit et al., 2008).

8. PŘÍNOS PRÁCE PRO VĚDU A PRAXI

Metody polymerázové řetězové reakce jsou rychlé a velmi spolehlivé. V různých variantách (kvantitativní PCR s předchozí reverzní transkripcí, realtime PCR, multiplex PCR) umožňují nejen detekci klíčových genů, ale také jejich kvantifikaci či sledování hladiny genové exprese. V posledních letech se začaly tyto přístupy aktivně používat také ve výzkumu bakteriální produkce biogenních aminů v potravinách. Byly navrženy mnohé metody určené k detekci cílových genů kódujících příslušnou dekarboxylázu, ke kvantifikaci mikrobiálních producentů BA i ke kvantifikaci genové exprese. Poslední výše zmíněný přístup pak mimo jiné dává možnost výzkumu regulace těchto metabolických drah a tím možnosti výzkumu omezování kumulace BA v potravinách. Pro možnosti využití těchto přístupů ve výzkumu producentů putrescinu byla v této dizertační práci vytvořena sada vhodných PCR primerů a byla optimalizována metoda pro jejich laboratorní využití.

Přínos pro vědu:

- Bylo vyvinuto 7 nových konsenzuálních sad primerů určených k detekci těchto genů: *speA*, *speB*, *speC*, *speF*, *adiA*, *adi* (*Ldc*) a *aguA*.
- Nová touch-down PCR metoda s novými primery umožňuje jednoduše detekovat všechny důležité geny zahrnuté v produkci putrescinu u gramnegativních bakterií, zejména těch, které se běžně vyskytují v potravinách
- Nově navržené primery jsou také použitelné v multiplex PCR a pro kvantitativní PCR případně kvantitativní PCR s předchozí reverzní transkripcí ke kvantifikaci exprese sledovaných genů
- Za pomoci navržených primerů může být podrobně zkoumán vliv faktorů na genovou expresi cílových genů zahrnutých v produkci putrescinu gramnegativními kmeny.
- Výsledky získané metodou HPLC v této práci potvrzují, že mnohé běžné gramnegativní kontaminanty potravin jsou dobrými producenty putrescinu, a že aktivně využívají více než jednu metabolickou dráhu k jeho produkci.
- Detekce agmatinu u všech testovaných gramnegativních kmenů potvrzuje, že gramnegativní bakterie využívají k produkci putrescinu více metabolických drah. Tento fakt poukazuje na důležitost výzkumu arginin dekarboxylázové dráhy.

- Navržená metoda pro sledování LAB producentů putrescinu využívajících agmatin deiminázovou dráhu může být, v případě, že bude izolováno více grampozitivních kmenů, dále využita ve výzkumu jejich metabolismu.

Přínos pro praxi:

- Nové primery umožňují detekci producentů putrescinu a mohou být použity v potravinářství ke zhodnocení potenciálu jak kontaminujících tak starterových mikroorganismů produkovat putrescin.
- Bylo potvrzeno, že gramnegativní kontaminanty jsou producenty jak putrescinu tak také agmatinu.

9. ZÁVĚR

Hlavním cílem této práce bylo vyvinutí nové PCR metody umožňující detekci všech genů kódujících klíčové enzymy zahrnuté v syntéze putrescinu u běžných gramnegativních bakterií vyskytujících se v potravinách. Bylo vyvinuto 7 nových konsenzuálních sad primerů určených k detekci těchto genů: *speA*, *speB*, *speC*, *speF*, *adiA*, *adi* (*Ldc*) a *aguA*. Tyto primery byly testovány jak teoreticky (*in-silico*), tak také *in vitro* s dostupnými modelovými mikroorganismy v touch-down PCR. Pro potvrzení správnosti metody bylo pro každý set primerů 3-5 PCR produktů podrobena sekvenaci. Produkce putrescinu a agmatinu u testovaných kmenů byla analyzována metodou HPLC a výsledky byly porovnány s výsledky touch-down PCR.

Pro další výzkum metabolických drah vedoucích k produkci putrescinu v bakteriálním metabolismu je nezbytně nutné mít vhodný molekulárně biologický nástroj. PCR primery vyvinuté v dříve publikovaných výzkumech byly určeny zejména pro detekci genu *odc* a to většinou pro kmeny grampozitivních bakterií.

Úspěšným testováním byla vyselektována sada sedmi párů nově navržených primerů určených k detekci všech cílových genů zahrnutých v metabolismu gramnegativních putrescin produkujících bakterií. Všechny sady primerů byly testovány v PCR s DNA producentů putrescinu a získané výsledky korespondovaly s údaji z databází metabolických drah. Správnost byla také úspěšně ověřena sekvenací.

10. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ALBERTO, M.R., ARENA, M.E. & MANCA DE NADRA, M.C. (2007). Putrescine production from agmatine by *Lactobacillus hilgardii*: effect Of phenolic compounds. *Food Control*, 18, pp. 898–903.
- ALI, M.A., POORTVLIET, E., STROMBERG, R. & YNGVE, A. (2011) Polyamines in foods: development of a food database. *Journal of Food and Nutrition Research*, 55, pp. 5572.
- ALIAKBARLU, J., M. ALIZADEH, S. MEHDI RAZAVI-ROHANI, Z. VAHABZADE, S. SIAVASH SAEI & S. AGH, (2009). Effects of processing factors on biogenic amines production in Iranian white brine cheese. *Research Journal of Biological Sciences*, 4, pp. 23-28.
- ANCIN-AZPILICUETA, C., GONZALEZ-MARCO, A. & JIMENEZ-MORENO, N. (2008). Current knowledge about the presence of amines in wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48, pp. 257-75.
- APPLEBAUM, D.M., DUNLAP, J.C. & MORRIS D.R. (1977). Comparison of the biosynthetic and biodegradative ornitine decarboxylases of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 16(8), pp. 1580-4.
- ARENA, M.E. & MANCA DE NADRA, M.C. (2001). Biogenic amine production by *Lactobacillus*. *Journal of Applied Microbiology*, 90, pp. 158–162.
- ARENA, M.E., LANDETE, J.M., MANCA DE NADRA, M.C., PARDO, I. & FERRER, S. (2008). Factors affecting the production of putrescine from agmatine by *Lactobacillus hilgardii* X1B isolated from wine. *Journal of Applied Microbiology*, 105, pp. 158–165.
- ARENA P. A., RUSSO P., CAPOZZI V., BENEDUCE L. & SPANO G. (2010). Effect of abiotic stress conditions on expression of the *Lactobacillus brevis* IOEB 9809 tyrosine decarboxylase and agmatine deiminase genes. *Ann. Microbiol.* 61, 179–183.
- AZCARATE-PERIL, M.A., ALTERMANN, E., HOOVER-FITZULA, R.L., CANO, R.J. & KLAENHAMMER, T.R. (2004). Identification and inactivation of Genetic loci involved with *Lactobacillus acidophilus* acid tolerance. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, pp.5315–5322.
- BAGNI, N., TASSONI, A. (2001). Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. *Amino Acids*, 20(3), pp. 301-17.

- BARDOCZ, S., DUGUID, T. J., BROWN, D. S., GRANT, G., PUSZTAI, A., WHITE, A. & RALPH, A. (1995). The importance of dietary polyamines in cell regeneration and growth. *British Journal of Nutrition*, 73, pp. 819–828.
- BENNER, R.A., JR., W.F. STARUSZKIEWICZ, W.F., ROGERS, P.L. & OTWELLE, W.S. (2003). Evaluation of Putrescine, Cadaverine, and Indole as Chemical Indicators of Decomposition in Penaeid Shrimp. *Journal of Food Science*, 68, pp. 2178–2185.
- BENSON, D.A., CAVANAUGH, M., CLARK, K., KARSCH-MIZRACHI, I., LIPMAN, D.J., OSTELL, J. & SAYERS EW (2013). *Nucleic Acids Research*, 2013 Jan; 41(D1):D36-42
- BERLIN, I. & ANTHENELLI, R.M. (2001). Monoamine oxidases and tabaco smoking. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 4, pp. 33-42
- BOVER-CID, S. & HOLZAPFEL, W.H. (1999). Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 53, pp. 33-41.
- BOVER-CID, S., IZQUIERDO-PULIDO, M. & VIDAL-CAROU, M.C. (2000). Influence of hygienic quality of raw material on biogenic amine production during ripening and storage of dry fermented sausages. *Journal of Food Protection*, 63, pp. 1544–1550.
- BOVER-CID, S., IZQUIERDO-PULIDO, M. & VIDAL-CAROU, M.C. (2001). Effect of the interaction between a low tyramine-producing *Lactobacillus* and proteolytic *staphylococci* on biogenic amine production during ripening and storage of dry sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 65, pp. 113–123.
- BOVER-CID, S., MIGUÉLEZ-ARRIZADO, M.J., BECKER, B., HOLZAPFEL, W.H. & VIDAL-CAROU, M.C. (2008). Amino acid decarboxylation by *Lactobacillus curvatus* CTC273 affected by the pH and glucose availability. *Food Microbiology*, 25 (2), pp. 269–277
- BOVER-CID, S., TORRIANI, S., GATTO, V., TOFALO, R., SUZZI, G. AND BELLETTI, N., (2009). Relationships between microbial population dynamics and putrescine and cadaverine accumulation during dry fermented sausage ripening. *Journal of Applied Microbiology* 106(4), pp. 1397-1407.
- BRAZEAU, B.J., JOHNSON , B.J. & WILMOT, C.M. (2004). Copper-containing amine oxidases. Biogenesis and catalysis; a structural perspective. *Archives of Biochemistry and Biophysic*, 428 (1), pp. 22-31.
- BUNKA, F., BUDINSKY, P., ZIMAKOVA, B., MERHAUT, M., FLASAROVÁ, R., PACHLOVÁ, V., KUBÁŇ, V. & BUŇKOVÁ, L. (2013).

Biogenic amines occurrence in fish meat sampled from restaurants in region of Czech Republic. *Food Control*, 31, pp. 49-52.

BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., HLOBILOVÁ, M., VAŇÁTKOVÁ, Z., NOVÁKOVÁ, D. & DRÁB, V (2009). Tyramine production of technological important strains of *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Streptococcus*. *European Food Research and Technology*, 229(3), pp. 533-538.

BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., KLČOVSKÁ, P., MRKVIČKA, V., DOLEŽALOVÁ, M. & KRÁČMAR, S. (2010a). Formation of biogenic amines by gram-negative bacteria isolated from poultry skin. *Food Chemistry*, 121, pp. 203-206.

BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., MANTLOVÁ, G., ČABLOVÁ, A., SEDLÁČEK, I., ŠVEC, P., PACHLOVÁ, V. & KRÁČMAR, S. (2010b). The effect of ripening and storage conditions on the distribution of tyramine, putrescine and cadaverine in Edam-cheese. *Food Microbiology*, 27, pp. 880 – 888.

BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., POLLAKOVA, E., PODEŠVOVÁ, T. & DRÁB, V (2011). The effect of lactose, NaCl and an aero/anaerobic environment on the tyrosine decarboxylase activity of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *International Journal of Food Microbiology*, 147, pp. 112-119.

BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., DRÁB, S., KRÁČMAR, S. & KUBÁŇ V. (2012). Effects of NaCl, lactose and availability of oxygen on tyramine production by the *Enterococcus durans* CCDM 53. *European Food Research and Technology*, 234, pp. 973-979.

BUŇKOVÁ, L., ADAMCOVÁ, G., HUDCOVÁ, K., VELICHOVÁ, H., PACHLOVÁ, V., LORENCOVÁ, E. & BUŇKA, F. (2013). Monitoring of biogenic amines in cheeses manufactured at small-scale farms in fermented dairy products in the Czech Republic. *Food Chemistry*, 141, pp. 548-551.

CALLES-ENRÍQUEZ, M., ERIKSEN, B.H, ANDERSEN, P.S., RATTRAY, F.P., JOHANSEN, A.H., FERNÁNDEZ, M., LADERO, V. & ALVAREZ, M.A. (2010). Sequencing and transcriptional analysis of *Streptococcus thermophilus* histamine biosynthesis gene cluster: factors that affect differential *hdca* expression. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, pp. 6231–6238.

CARRUTHERS, L., MARTON, L. & PETERSON, C. (2007). Polyamine analogues: potent inducers of nucleosomal array oligomerization and inhibitors of yeast cell growth. *Biochemical Journal*, 405, pp. 541–545.

- CHANDER H., BATISH V. H., BABU S., SINGH R. S. (1989). Factors affecting amine production by a selected strain of *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Food Sci.* 54, 940–942
- CHONG C. Y., ABU BAKAR F., RUSSLY A. R., JAMILAH B. & MAHYUDIN N. A. (2011). The effects of food processing on biogenic amines formation. *International Food Research Journal*, 18, pp. 867–876.
- CHOUDHURY, N., HANSEN, W., ENGESSER, D., HAMMES, W.P., HOLZAPFEL, W.H.: Formation of histamine and tyramine by lactic acid bacteria in decarboxylase medium. *Letters in Applied Microbiology*, 1990, Vol. 11, pp. 278– 281.
- CHRISTIAN LO. (2000). Polyamines in human and animal milk, *British Journal of Nutrition*, 84, pp. 55 - 58
- CIPOLLA, B.G., HAVOUIS, R. & MOULINOUX, J.P. (2007). Polyamine contents in current foods: a basis for polyamine reduced diet and a study of its long term observance and tolerance in prostate carcinoma patients. *Amino Acids*, 33, pp. 203–212.
- 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, pp. 391-396.
- CONSTANTINI, A., VAUDANO, E., DEL PRETE, V., DANEI, M. & GARCIA-MORUNO, E. (2009). Biogenic Amine Production by Contaminating Bacteria Found in Starter Preparations Used in Winemaking. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 57(22), pp. 10664-10669.
- COTON, M., ROMANO, A. & SPANO, G. (2010). Occurrence of biogenic amine-forming lactic acid bacteria in wine and cider. *Food Microbiology*, 27, pp. 1078-1085.
- CUNIN, R., GLANSDORFF, N., PIERARD, A. & STALON, V. (1986). Biosynthesis and Metabolism of Arginine in Bacteria, *Microbiological Reviews*, 50, pp. 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, pp. 368-373.

- DANDRIFOSSE, G., PEULEN, O., EL KHEFIF, N., DELOYER, P., DANDRIFOSSE, A.C. & GRANDFILS, C. (2000). Are milk polyamines preventive agents against food allergy? *Proceedings of the Nutrition Society*, 59, pp. 81-6.
- DAVID M.L. MORGAN (1999). Polyamines An Overview, *Molecular Biotechnology*, 11, pp. 229-250.
- 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, pp. 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, pp. 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 Microbiology*, 102, pp. 1551-1560.
- DELBÈS-PAUS C., POCHE S., HELINCK S., VEISSEIRE P., BORD C., LEBECQUE A., COTON M., DESMASURES N., COTON E., IRLINGER F. & MONTEL M. C. (2012). Impact of Gram-negative bacteria in interaction with a complex microbial consortium on biogenic amine content and sensory characteristics of an uncooked pressed cheese. *Food Microbiology* 30, 74–82
- DI LUCCIA, A., PICARIELLO, G., IACOMINO, G., FORMISANO, A., PADUANO, L. & D'AGOSTINO, L. (2009). The in vitro nuclear aggregates of polyamines. *FEBS Journal*, 276, pp. 2324–2335.
- 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, pp. 4008-4008.
- DRABIK-MARKIEWICZ, G.; DEJAEGHER, B.; DE MEY, E.; KOWALSKA, T.; PAELINCK, H. & HEYDEN VANDER, Y. (2011). Influence of putrescine, cadaverine, spermidine or spermine on the formation of N-nitrosamine in heated cured pork meat. *Food Chemistry*, 126, pp. 1539-1545.
- DRIESSEN, A.J., SMID, E.J. & KONINGS, W.N. (1988). Transport of Diamines by *Enterococcus faecalis* is mediated by an agmatine-Putrescine antiporter. *Journal of Bacteriology*, 170, pp. 4522–4527.
- DUFOUR, C., DANDRIFOSSE, G., FORGET, P., VERMESSE, F., ROMAIN, N. & LEPOINT, P. (1988). Spermine and spermidine induce intestinal maturation in the rat. *Gastroenterology*, 95, pp. 112–116

- DURLU-ÖZKAYA, F., AYHAN, K. & VURAL, N. (2001). Biogenic amines produced by Enterobacteriaceae isolated from meat products. *Meat Science*, 58, pp. 163-166.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) (2011). Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA Journal*, 9 (10), pp. 36-37.
- EMBORG, J. & DALGAARD, P. (2006). Formation of histamine and biogenic amines in cold-smoked tuna: an investigation of psychrotolerant bacteria from samples implicated in cases of histamine fish poisoning. *Journal of Food Protection*, 69, pp. 897–906.
- EMBORG, J. & DALGAARD, P. (2008). Modelling the effect of temperature, carbon dioxide, water activity and pH on growth and histamine formation on *Morganella psychrotolerans*. *International Journal of Food Microbiology*, 128, pp. 226-233.
- 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.
- FERNÁNDEZ-GARCÍA, E., TOMILLO, J. & NUÑEZ, M. (1999). Effect of added proteinases and level of starter culture on the formation of biogenic amines in raw milk Manchego cheese *International Journal of Food Microbiology*, 52, pp. 189-196.
- FERNANDEZ-GARCÍA, E., TOMILLO, J. & NUNEZ, M. (2000). Formation of biogenic amines in raw milk Hispánico cheese manufactured with proteinases and different levels of starter culture. *Journal of Food Protection*, 63, pp. 1551-1555.
- FERNÁNDEZ, M. & ZÚÑIGA, M. (2006). Aminoacid catabolic pathways in lactic acid bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 132, pp. 155–183.
- FERNÁNDEZ, M., LINARES, D.M., DEL RÍO, B., LADERO, V. & ALVAREZ, M.A. (2007). HPLC quantification of biogenic amines in cheeses: correlation with PCR-detection of tyramine-producing microorganisms. *Journal of Dairy Research*, 74, pp. 276–282.
- FERNÁNDEZ, M., DEL RÍO, B., LINARES, D. M., MARTÍN, M. C. & ÁLVAREZ, M. A. (2006). Real-time polymerase chain reaction for quantitative detection of histamine-producing bacteria: use in cheese production. *Journal of Dairy Science*, 89, pp. 3763–3769.
- GALE, E.F. (1946) The bacterial amino acid decarboxylases. *Advances in Enzymology*, 6, pp. 1–32.

- 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, pp. 455–462.
- GARDINI, F., MARTUSCELLI, M., CARUSO, M.C., GALGANO, F., CRUDELE, M.A., FAVATI, F., GUERZONI, M.E., SUZZI, G., (2001). Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Food Microbiology* 64, pp. 105–117.
- GENNARO M. C., GIANOTTI V., MARENGO E., PATTONO D., TURI R. M. (2003). A chemometric investigation of the effect of the cheese-making process on contents of biogenic amines in a semi-hard Italian cheese (Toma). *Food Chemistry*, 82, pp. 545–551.
- GIEGERICH, R., MEYER, F. & SCHLEIERMACHER, CH. (1996). GeneFisher - software support for the detection of postulated genes. *Proceedings International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*, 4, 68-77.
- GRAY, J.I. & COLLINS, M.E. (1977). A comparison of proline and putrescine as precursors of N-nitrosopyrrolidine in nitrite-treated pork system. *Journal of Food Science*, 42, pp. 1034–1037
- GREIF, G., GREIFOVA M. & KAROVIČOVÁ, J. (2006). Effects of NaCl concentration and initial pH value on biogenic amine formation dynamics by *Enterobacter* spp. bacteria in model conditions. *Journal of Food and Nutrition Research*, 45, pp. 21-29
- GRISWOLD, A.R., JAMESON-LEE, M. & BURNE, R.A. (2006). Regulation and physiologic significance of the agmatine deiminase system of *Streptococcus mutans* UA159. *Journal of Bacteriology*, 188, pp. 834–841.
- GRISWOLD, A.R., CHEN, Y.Y.M. & BURNE, R.A. (2004). Analysis of an Agmatine deiminase gene cluster in *Streptococcus mutans* UA 159. *Journal of Bacteriology*, 186, pp. 1902–1904.
- HACKERT, M.L., CARROLL, D.W., DAVIDSON, L., KIM, S., MOMANY, C., VAALER, G. & ZHANG L. (1994). Sequence of ornithine decarboxylase from *Lactobacillus* sp. strain 30a, *Journal of Bacteriology*, 176, pp. 7391–7394
- HALÁSZ, A., BARÁTH, Á., SIMON-SARKADI, L. & HOLZAPFEL, W. (1994). Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science & Technology*, 5, pp. 42-49.
- HERNANDEZ-JOVER, T., IZQUIERDO-PULIDO, M., VECIANA-NOGUE, S M.T., MARINE-FONT, A. & VIDAL-CAROU, M.C. (1997). Biogenic amine

and polyamine contents in meat and meat products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(6), pp. 2098–102.

HERNÁNDEZ-JOVER, T., IZQUIERDO-PULIDO, M., VECIANA-NOGUÉS, M.T., MARINÉ-FONT, A. & VIDAL-CAROU, M.C. (1996). Biogenic amine sources in cooked cured shoulder pork. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, pp. 3097–3101.

HERNÁNDEZ-ORTE, P., LAPEÑA, A.C., PEÑA-GALLEGO, A., ASTRAIN, J., BARON, C., PARDO, I., POLO, L., FERRER, S., CACHO, J. & FERREIRA, V. (2008). Biogenic amine determination in wine fermented in oak barrels: Factors affecting formation. *Food Research International*, 41, pp. 697-706.

IGARASHI K. & KASHIWAGI K. (2010). Modulation of cellular function by polyamines. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42, pp. 39–51.

IZQUIERDO-PULIDO, M., HERNÁNDEZ-JOVER, T., MARINÉ-FONT, A. & VIDAL-CAROU, M.C. (1996). Biogenic Amines in European Beers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44 (10), pp. 3159–3163.

IZQUIERDO CAÑAS, P.M., GÓMEZ ALONSO, S., RUIZ PÉREZ, P., SESEÑA PRIETO, S., GARCÍA ROMERO, E. & PALOP HERREROS, M.L.L. (2009). Biogenic amine production by *Oenococcus oeni* isolates from malolactic fermentation of Tempranillo wine. *Journal of Food Protection*, 72, 907-910.

JAMES STORER, R. & ANTONIO FERRANTE, Radiochemical Assay of Diamine Oxidase, *Methods in Molecular Biology*, 79, pp. 91-95, 1998

JOHNSON, T.D. (1996). Modulation of channel function by polyamines. *Trends in Pharmacological Sciences*, 17, pp. 22–27.

JOOSTEN H. M. & NORTHOLT M. D. (1987). Conditions allowing the formation of biogenic amines in cheese 2. Decarboxylative properties of some non starter bacteria. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 41, 259–280.

KABIR, A. & KUMAR, G.S. (2013). Binding of the Biogenic Polyamines to Deoxyribonucleic Acids of Varying Base Composition: Base Specificity and the Associated Energetics of the Interaction. (On line) Published: July 24, 2013 [cit. 2013-11-24]. Dostupné:

<<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0070510>>

KALÁČ, P., KŘÍŽEK, M. (1997). Formation of biogenic amines in four edible mushroom species stored under different conditions. *Food Chemistry*, 58, pp. 233-236.

- KALÁČ, P. (2009). Recent advances in the research on biological roles of dietary polyamines in man. *Journal of Applied Biomedicine*, 7, pp. 65–74.
- KALÁČ, P., KŘÍŽEK, M., PELIKÁNOVÁ, T., LANGOVÁ, M. & VEŠKRNA, O (2005a). Contents of polyamines in selected foods. *Food Chemistry*, 90, pp. 561-564.
- KALÁČ, P. & KRAUSOVA, P. A. (2005b). Review of dietary polyamines: formation, implications for growth and health and occurrence in foods. *Food Chemistry*, 90, p. 219–230.
- KALÁČ, P. & KRÍZEK, M. (2012). A review of biogenic amines and polyamines in beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 109, pp. 123-128.
- KARMAS, E. (1981). Biogenic amines as indicators of sea food freshness. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 14, pp. 273-275.
- KAROVIČOVÁ, J. & KOHAJDOVÁ, Z. (2005). Biogenic amines in food. *Chemical Papers*, 59, pp. 70–79
- KAUR-SAWHNEY, R., TIBURCIO, A.F., ALTABELLA, T. & GALSTON, A.W. (2003). Polyamines in plants: An overview. *Journal of cell and molecular biology*, 2, pp. 1–12.
- KIEBOOM, J. & ABEE, T. (2006). Arginine-dependent acid resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 194, 5650-5653.
- KOMPRDA, T., BURDYCHOVÁ, R., DOHNAL, V., CWIKOVÁ O. & SLÁDKOVÁ P. (2008): Some factors influencing biogenic amines and polyamines content in Dutchtype semi-hard cheese. *European Food Research and Technology*, 227, pp. 29–36.
- KOMPRDA, T., REJCHRTOVÁ, E., SLÁDKOVÁ, P., ZEMÁNEK, L. & VYMLÁTILOVÁ, L. (2012). Effect of some external factors on the content of biogenic amines and polyamines in a smear-ripened cheese. *Dairy Science & Technology*, 92, pp. 367-382.
- KONINGS, W.N., LOLKEMA, J.S., BOLHUIS, M., VAN VEEN, H.W., POOLMAN, B. & DRIESSEN, A.J., (1997). The role of transport processes in survival of lactic acid bacteria. Energy transduction and multidrug resistance. *Antonie van Leeuwenhoek*, 71, pp. 117-128.
- KONINGS, W.N. (2002). The cell membrane and the struggle for life of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82, pp. 3-27.
- KŘÍŽEK, M., KALÁČ, P. (1998). Biogenní aminy v potravinách a jejich role ve výživě. *Czech Journal of Food Science*, 4, pp. 110-116.

- LARGUE, E., SABATER-MOLINA, M. & ZAMORA, S. (2007). Biological significance of dietary polyamines. *Nutrition*, 23, pp. 87–95.
- LADERO, V., CALLES-ENRIQUEZ, M., FERNANDÉZ, M. & ALVAREZ, M.A. (2010a). Toxicological effects of dietary biogenic amines. *Current Nutrition & Food Science*, 6, pp. 145-156.
- LADERO, V., MARTINEZ, N. & MARTÍN, M. C. (2010b). qPCR for quantitative detection of tyramine-producing bacteria in dairy products. *Food research international*, 43, pp. 289-295.
- LADERO, V., RATTRAY, F. P., MAYO, B., MARTÍN, M. C., FERNÁNDEZ, M. & ÁLVAREZ, M. A. (2011a). Putrescine producing *Lactococcus lactis*: sequencing and transcriptional analysis of the biosynthesis gene cluster. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, pp. 5507–5511.
- LADERO, V., COTON, M., FERNÁNDEZ, M., BURON, N., MARTÍN MC., GUICHARD, H., COTON, E. & ALVAREZ, MA. (2011b). Biogenic amines content in Spanish and French natural ciders: Application of qPCR for quantitative detection of biogenic amine-producers. *Food Microbiology*, 28 (3), pp. 554–561.
- LADERO, V., SÁNCHEZ-LLANA, E., FERNÁNDEZ, M. & ALVAREZ MA. (2011c). Survival of biogenic amine-producing dairy LAB strains at pasteurisation. *International Journal of Food Science & Technology*, 46, pp. 516–521
- LADERO, V., FERNÁNDEZ M., CALLES-ENRÍQUEZ M., SÁNCHEZ-LLANA E., CAÑEDO E., MARTÍN M. C. & ÁLVAREZ M. A. (2012a). Is biogenic amines production a strain-dependent trait in enterococci?. *Food Microbiology*, 30, 132–138
- LADERO, V., CAÑEDO, E., PÉREZ, M., MARTÍN, M.C., FERNANDÉZ, M. & ALVAREZ, M.A. (2012b). Multiplex qPCR for the detection and quantification of putrescine-producing lactic acid bacteria in dairy products. *Food Control*, 27, 307-313
- LAKSHMANAN, R., SHAKILA R.J. & JEYASEKARAN G. (2002). Survival of amine-forming bacteria during the ice storage of fish and shrimp. *Food Microbiology*, 19, pp. 617-625.
- LANDETE, J. M., DE LAS RIVAS, B., MARCOBAL, A. & MUÑOZ, R. (2007). Molecular methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria on foods. *International Journal of Food Microbiology*, 117, pp. 258-269.

- LANDETE, J.M., ARENA, M.E., PARDO, I., MANCA DE NADRA & FERRER, S. (2008). Comparative survey of putrescine production from agmatine deamination in different bacteria. *Food microbiology*, 25 (7), pp. 882–887.
- 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 Microbiology*, 13, pp. 169-177.
- LARKIN, M.A., BLACKSHIELDS, G., BROWN, N.P., CHENNA, R., MCGETTIGAN, P.A., MC WILLIAM, H., VALENTIN, F., WALLACE, I.M., WILM, A., LOPEZ, R., THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J. & HIGGINS, D.G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23, 2947-2948.
- 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, pp. 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.
- LEHANE, L. & OLLEY, J. (2000). Review. Histamine fish poisoning revisited. *International Journal of Food Microbiology*, 58, pp. 1-37.
- LEHTONEN, P. (1996). Determination of amines and amino acids in wine, a review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 47, pp. 127–133.
- LI, J., DOYLE, K.M. & TATLISUMAK, T. (2007). Polyamines in the brain: distribution, biological interactions, and their potential therapeutic role in brain ischaemia. *Current Medicinal Chemistry*, 14, pp. 1804–1813.
- LLÁCER, J.L., POLO, L.M., TAVAREZ, S., ALARCON, B., HILARIO, R. & RUBIO, V. (2006). The gene cluster for agmatine catabolism of *Enterococcus faecalis*. Studies of recombinant putrescine transcarbamylase and agmatine deiminase and a snapshot of agmatine deiminase catalyzing its reaction. *Journal of Bacteriology*, 189, pp. 1254–1265.
- LORENCOVÁ, E., BUŇKOVÁ, L., MATOULKOVÁ, D., DRÁB, V., PLEVA, P., KUBÁŇ, V., BUŇKA, F., 2012: Production of biogenic amines by lactic acid bacteria isolated from dairy products and beer. *International Journal of Food Science & Technology* 47, pp. 2086 – 2091.

- LORENZO, J.M., MARTÍNEZ, S., FRANCO, I., CARBALLO, J.: Biogenic amine content during the manufacture of dry-cured lacón, a Spanish traditional meat product: Effect of some additives. *Meat Science*, 2007, Vol. 77 (2), pp. 287–293.
- LU S., XU X., ZHOU G., ZHU Z., MENG Y. & SUN Y. (2010). Effect of starter cultures on microbial ecosystem and biogenic amines in fermented sausage. *Food Control*, 21, pp. 444–449.
- LUCAS, P.M., WOLKEN, W.A., CLAISSE, O., LOLKEMA, J.S. & LONVAUD-FUNEL, A. (2005). Histamine-producing pathway encoded on an unstable plasmid in *Lactobacillus hilgardii*. *Applied and Environmental Microbiolog*, 71, pp. 1417-1424.
- 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, pp. 2221–2230.
- MAIJALA, R., EEROLA, S., AHO, M. & HIRN, J. (1993). The effect of GDL-induced pH decrease on the formation of biogenic amines in meat. *Journal of Food Protection*, 56, pp. 125–129.
- MAIJALA, R., NURMI, F. & FISCHER, A. (1995). Influence of processing temperature on the formation of biogenic amines in dry sausages. *Meat Science*, 39, pp. 19–22
- 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, pp. 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, pp. 874-878.
- MARCOBAL, A., DE LAS RIVAS, B., MORENO-ARRIBAS, M.V. & MUNOZ, R. (2006). Evidence for horizontal gene transfer as origin of putrescine reduction in *Oenococcus oeni* RM83. *Applied and Environmental Microbiolog*, 72, pp. 7954–7958.
- MARINO, M., MAIFRENI, M., MORET, S. & RONDININI, G. (2000). The capacity of Enterobacteriaceae species to produce biogenic amines in cheese. *Letters in Applied Microbiology*, 31, pp. 169–173.

- MARQUES, A.P., LEITÃO, M.C. & SAN ROMÃO, M.V. (2008). Biogenic amines in wines: influence of oenological factors. *Food Chemistry*, 107, pp. 853–860.
- MARTUSCELLI M., CRUDELE M. A., GARDINI F. & SUZZI G. (2000). Biogenic amine formation and oxidation by *Staphylococcus xylosus* strains from artisanal fermented sausages. *Letters in Applied Microbiology*, 31, pp. 228–232.
- MEDINA, M.A., URDIALES, J.L., RODRIGUEZ-CASO, C., RAMIREZ, F.J. & SANCHEZ-JIMENEZ, F. (2003). Biogenic amines and polyamines: similar biochemistry for different physiological missions and biomedical applications. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 38, pp. 23–59.
- MEYSKENS, F.L. JR. & GERNER, E.W. (1995). Development of difluoromethylornithine as a chemoprevention agent for the management of colon cancer. *Journal of Cellular Biochemistry. Supplement* 22, pp. 126-131
- MING-HON HOU, SHWU-BIN LIN, JEU-MING P. YUANN, WEI-CHEN LIN, ANDREW H.-J. WANG & LOU SING-KAN (2001). Effects of polyamines on the thermal stability and formation kinetics of DNA duplexes with abnormal structure. *Nucleic Acids Research*, 29 (24), pp. 5121–5128.
- MOHAN, C.O., RAVISHANKAR, C.N., GOPAL, T.K.S, KUMAR, K.A. & LALITHA, K.V. (2009). Biogenic amines formation in seer fish (*Scomberomorus commerson*) steaks packed with O₂ scavenger during chilled storage. *Food Research International*, 42(3), pp. 411–6.
- MUÑOZ, R., DE LAS RIVAS, B., MARCOBAL & A. CARRASCOSA, A. V. (2004). Simultaneous detection of bacteria producing biogenic amines by PCR. *Spanish patent application 200402314*.
- NAILA, A., FLINT, S., FLETCHER, G., BREMER, P. & MEERDINK, G (2010). Control of biogenic amines in food-existing and emerging approaches. *Journal of Food Science*, 75, pp. 139–150.
- 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, pp. 594-599.
- NAUMOFF, D.G., XU, Y., GLANSDORFF, N. & LABEDAN, B. (2004). Retrieving sequences of enzymes experimentally characterized but erroneously annotated: the case of the putrescine carbamoyltransferase. *BMCG enomics*, 5, pp. 52.

- ÖNAL, A. (2007). A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry*, 103(4), pp. 1475-1486.
- ÖZOGUL, F. & ÖZOGUL, Y. (2005). Formation of biogenic amines by Gram-negative rods isolated from fresh, spoiled, VP-packed and MAP-packed herring (*Clupea harengus*). *European Food Research and Technology*, 221, pp. 575–581.
- ÖZOGUL, F. & ÖZOGUL, Y. (2007). The ability of biogenic amines and ammonia production by single bacterial cultures. *European Food Research and Technology*, pp. 385-394.
- ÖZOGUL, F., TAYLOR, K.D.A., QUANTICK, P. & ÖZOGUL, Y. (2002). Biogenic amines Formation in Atlantic herring (*Clupea harengus*) stored under modified Atmosphere packaging using a rapid HPLC method. *International Journal of Food Science and Technology*, 37, pp. 515–522.
- PACHLOVÁ, V., BUŇKA, F., FLASAROVÁ, R., VÁLKOVÁ, P. & BUŇKOVÁ, L. (2012). The effect of elevated temperature on ripening of Dutch type cheese. *Food Chemistry*, 132(4), pp. 1846-1854.
- PARROT, J. & NICOT G. (1966). Pharmacology of histamine in: O. Eichler, S. Farah (Eds.), *Handbook of Experimental Pharmacology Springer-Verlag, New York*, pp. 148–161.
- PAULSEN, P. & BAUER, F. (1997). Biogenic amines in fermented sausages: 2. Factors influencing the formation of biogenic amines in fermented sausages. *Fleischwirtschaft International* 77, pp. 32–34.
- PEGG, A.E., SHANTZ, L.M. & COLEMAN, C.S. (1995). Ornithine decarboxylase as a target for chemoprevention. *Journal of Cellular Biochemistry. Supplement*, 22, 132-138.
- PEREIRA, C.I., MATOS, D., SAN ROMÃO, M.V. & CRESPO, M.T.B. (2009). Dual role for the tyrosine decarboxylation pathway in *Enterococcus faecium* E17: response to an acid challenge and generation of a proton motive force. *Applied and Environmental Microbiology* 75, pp. 345-352.
- PINHO O., FERREIRA I. M., MENDES E., OLIVEIRA B. M. & FERREIRA M. (2001). Effect of temperature on evolution of free amino acid and biogenic amine contents during storage of Azeitão cheese. *Food Chemistry*. 75, pp. 287–291.
- PIRCHER, A., BAUER, F. & PAULSEN, P. (2007). Formation of cadaverine, histamine, putrescine and tyramine by bacteria isolated from meat, fermented sausages and cheeses. *European Food Research and Technology*, 226, pp. 225–231

- PLEVA, P., BUŇKOVÁ, L., LAUKOVÁ, A., LORENCOVÁ, E., KUBÁŇ & V. BUŇKA, F. (2012). Factors affected decarboxylation activity of *Enterococcus faecium* isolated from rabbit. *Potravinárstvo*, 2, pp. 46-49
- 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, pp. 312–315.
- PRIDMORE, RD., BERGER, B., DESIERE, F., VILANOVA, D., BARRETTO, C., PITTET, A-C, ZWAHLEN, M-C., ROUVET, M., ALTERMANN, E., BARRANGOU, R., MOLLET, B., MERCENIER, A., KLAENHAMMER, T., ARIGONI, F. & SCHELL, M.A. (2004). The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, pp. 2512–2517.
- RAUSCHER-GABERNIG, E., GABERNIG, R., BRUELLER, W., GROSSGUT, R., BAUER, F. & PAULSEN, P. (2012). Dietary exposure assessment of putrescine and cadaverine and derivation of tolerable levels in selected foods consumed in Austria *European Food Research and Technology*, 235 (2), pp. 209 - 220
- RICE, S. L., KOEHLER, P. E. (1976). Tyrosine and histidine decarboxylase activities of *Pediococcus cerevisiae* and *Lactobacillus* species and the production of tyramine in fermented sausages. *Journal of Milk and Food Technology*, 39 (3), pp. 166-169.
- ROKKA, M., EEROLA, S., SMOLANDER, M., ALAKOMI, 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, pp. 601–607.
- ROMANO, A., TRIP, H., LONVAUD-FUNEL, A., LOLKEMA, J.S. & LUCASA P.M. (2012). Evidence of Two Functionally Distinct Ornithine Decarboxylation Systems in Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 78 (6), pp. 1953–1961.
- ROSEIRO, C., SANTOS, C., SOL, M., SILVA, L., & FERNANDES, I. (2006). Prevalence of biogenic amines during ripening of a traditional dry fermented pork sausage and its relation to the amount of sodium chloride added. *Meat Science*, 74 (3), pp. 557–563.

- SACCANI, G., TANZI, E., PASTORE, P., CAVALLI, S. & REY, M. (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, pp. 43–50
- SANTOS, W., SOUZA, M., CERQUEIRA, M. & GLORIA, M. (2003). Bioactive amines formation in milk by *Lactococcus* in the presence or not of rennet and NaCl at 20 and 32 °C. *Food Chemistry*, 81, pp. 595–606.
- SANTOS, S. (1996). Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 29, p. 213–231.
- SEILER, N. & AL-THERIB, M.J. (1974). Putrescine catabolism in mammalian brain. *Biochemical Journal*, 144(1), pp. 29–35.
- SEILER, N. & DOUAUD, F. (1998). Polyamine metabolism and transport in the mammalian organism in book Food science and technology, COST 917, Biogenically active amines in food, Volume II, Metabolic effects of biologically active amines in food, ISSN LOI8-5593.
- SEILER, N. (2003a). Thirty years of polyamine-related approaches to cancer therapy. Retrospect and prospect. Part 1. Selective enzyme inhibitors. *Current Drug Targets*, 4, pp. 537-564.
- SEILER, N. (2003b). Thirty years of polyamine-related approaches to cancer therapy. Retrospect and prospect. Part 2. Structural analogues and derivatives. *Current Drug Targets*, 4, pp. 565-585.
- SESSA, A., DESIDERIO, M.A. & PERIN, A. (1984). Effect of acute ethanol administration on diamine oxidase activity on the upper gastrointestinal tract of rat. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research.*, 8, pp. 185–190.
- SHALABY, A.R. (1996). Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*, 29, pp. 675-690
- SHER, I.H. & MALLETT, M.F. (1954). Purification and study of L-arginine decarboxylase from *Escherichia coli* B. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 53, 370-380.
- SIMON, J.P. & STALON. V. (1982). Enzymes of agmatine degradation and the Control of their synthesis in *Streptococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology*, 152, pp. 676–681.
- SMIT, A.Y., DU TOIT, W.J. & DU TOIT, M. (2008). Biogenic amines in wine: understanding the headache. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 29, 109–127.
- SMITH, T. A. (1981). Amines in fous. *Food Chemistry*, 6, pp. 169–200.
- SOUFLEROS, E., BARRIOS, M. L. & BERTRAND, A. (1998). Correlation between the content of biogenic amines and other wine compounds. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49 (3), pp. 266-278.

- SPINELLI-GUGGER, A.M., LAKRITZ, L., WASSERMAN, A.E. & GATES, R.A. (1981). Nitrosamine precursors in the adipose tissue of pork bellies. *Journal of Food Science*, 46, pp. 1136–1138
- STIM, K.P. & G. BENNETT (1993). Nucleotide sequence of the adi gene, which encodes the biodegradative acid-induced arginine decarboxylase of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 175, pp. 1221-1234.
- STRATTON, J.E., HUTKINS, R.W. & TAYLOR, S.L. (1991). Biogenic amines in cheese and other fermented foods: a review. *Journal of Food Protection*, 54(6), pp. 460–70.
- STRAUB, B. W., KICHERER, M., SCHILCHERT, S. M. & HAMMES, W. P. (1995). The Formation of biogenic amines by fermentation organisms. *Z Lebensm Unters Forsch*, 201, pp. 79–82.
- SUMNER, S.S., SPECKHARD, H.W., SOMERS, E.B. & TAYLOR, S.L. (1990). Factors controlling histamine production in Swiss cheese inoculated with *Lactobacillus buchneri*. *Journal of Dairy Science*, 73, 3050–3058.
- SUZZI, G. & GARDINI, F. (2003). Biogenic amine in dry fermented sausages: a review. *International Journal of Food Microbiology* 88, pp. 41-54.
- TABOR, C.W. & TABOR. H. (1984). Polyamines. *Annual Reviews in Biochemistry*, 53, pp. 749–790.
- 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, pp. 225–226.
- TAYLOR, S.L. & EITENMILLER, R.R. (1986). Histamine Food Poisoning: Toxicology and Clinical Aspects. *Critical review in toxicology*, 17 (2), pp. 91-128.
- TAYLOR, S.L. (1985). Histamine poisoning associate with fish, cheese and other foods. *World Health Organization, VPH/FOS*, 85, pp. 1-47.
- TIL, H.P., FALKE, H.E., PRINSEN, M.K. & WILLEMS, M.I. (1997). Acute and subacute toxicity of tyramine, spermidine, putrescine and cadaverine in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 35, pp. 337-348.
- 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, pp. 73-84
- TIL, H.P., FALKE, H.E., PRINSEN, M.K. & WILLEMS, M.I. (1997). Acute and subacute toxicity of tyramine, spermidine, spermine, putrescine and cadaverine in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 35, pp. 337–348

- TORRIANI S., GATTO V., SEMBENI S., TOFALO R., SUZZI G., BELLETTI N., GARDINI F. & BOVER-CID S. (2008). Rapid detection and quantification of tyrosine decarboxylase gene (*tdc*) and its expression in Gram-positive bacteria associated with fermented foods using PCR-based methods. *Journal of Food Protection*, 71, pp. 93–101.
- VALSAMAKI, K., A. MICHAELIDOU & A. POLYCHRONIADOU, (2000). Biogenic amine production in Feta cheese. *Food Chemistry*, 71, pp. 259-266.
- VAN DEN BERG, G.A., NAGEL, G.T., MUSKIET, F.A. & HALIE, M.R. (1985). Mass fragmentographic identification of polyamine metabolites in the urine of normal persons and cancer patients, and its relevance to the use of polyamines as tumour markers. *Journal of Chromatography*, 339(2), pp. 223–231.
- WAINRIGHT, T. (1986). The chemistry of nitrosamine formation: relevance to malting and brewing. *Journal of the Institute of Brewing*, 92, pp. 49–64.
- WANG, L.C., THOMAS B.W., WARNER, K., WOLF, W.J. & KWOLEK, W. F. (1975). Apparent odor thresholds of polyamines in water and 2% soybean flour dispersions. *Journal of Food Science*, 40, pp. 274-276.
- WATERHOUSE, A.M., PROCTER, J.B., MARTIN, D.M.A, CLAMP, M. & BARTON, G.J. (2009). Jalview Version 2 - a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, 25 (9), pp. 1189-1191
- WEGMANN, U., OVERWEG, K., HORN, N., GOESMANN, A., NARBAD, A., GASSON, M.J. & SHEARMAN, C. (2009). Complete genome sequence of *Lactobacillus johnsonii* FI9785, a competitive exclusion agent against pathogens in poultry. *Journal of Bacteriology*, 191(22), pp. 7142-3.
- WEN, L. N. & XIE, M.X (2013). Evidence of different G-quadruplex DNA binding with biogenic polyamines probed by electrospray ionization-quadrupole time of flight mass spectrometry, circular dichroism and atomic force microscopy. *Biochimie*, 95 (6), pp. 1185–1195.
- WENDA KOON, C.N. & SAKAGUCHI, M. (1995). Combined effect of sodium chloride and clove on growth and biogenic amine formation of *Enterobacter aerogenes* in mackerel muscle extract. *Journal of Food Protection* 56, pp. 410–413.
- WILLIAM, K. (1997). Interactions of polyamines with ion channels. *Biochemical Journal*, 325, pp. 289–297
- WOLKEN, W.A.M., LUCAS, P.M., LONVAUD-FUNEL, A. & LOLKEMA, J.S. (2008). The mechanism of the tyrosine transporter TyrP supports a proton

motive tyrosine decarboxylation pathway in *Lactobacillus brevis*. *Journal of Bacteriology* 188, pp. 2198-2206.

WUNDERLICHOVÁ, L., BUŇKOVÁ, L., KOUTNÝ, M., VALENTA, T., BUŇKA, F. (2013). Novel touchdown-PCR method for detection of putrescine-producing Gram-negative bacteria in food products, *Food Microbiology*, 34, pp. 268-276.

ZOUMAS-MORSE, C, ROCK C.L., QUINTANA, E.L., NEUHOUSER, M.L., GERNER, E. & MEYSKENS, F.L. JR (2007). Development of a polyamine database for assessing dietary intake. *Journal of the American Dietetic Association*, 107, pp. 1024–1027.

11. SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA

Publikační činnost před započatím postgraduálního studia:

Příspěvky v mezinárodních časopisech s impact faktorem

Kvasničkova, L., Glatz, Z., Štěrbova, H., Kahle, V., Slanina, J., Musil, P. (2001). Application of capillary electrochromatography using macroporous polyacrylamide columns for the analysis of lignans from seeds of *Schisandra chinensis*. *Journal of Chromatography A*, 916, pp. 265-271.

Štěrbova, H., Ševčíková, P., **Kvasničkova, L.**, Glatz, Z., Slanina, J. (2002). Determination of lignans in *Schisandra chinensis* using micellar electrokinetic capillary. *Electrophoresis*. 23, pp. 253-258.

Kvasničková L., Glatz Z., Kahle V. (2003). Kapilární elektrochromatografie. *Chemické Listy*, 97, pp. 86-92.

Příspěvky ve sbornících z konferencí v cizím jazyce

Kvasničková, L., Štěrbová, H., Glatz, Z., Kahle, V., Slanina, J.: Determination of Biologically Active Compounds in Medicinal Plants by Capillary Electrochromatography. In *Book of abstract 2nd International symposium "Separations in BioSciences SBS 2001"*. Prague: Czech Chemical Society, 2001. pp. 85-85. ISBN 80-7080-437-8.

Kvasničková, L., Štěrbová H., Ševčíková P., Glatz, Z., Kahle V., Slanina J.: Analysis of Lignans in Schisandra Extract, Comparison between CEC and MEKC. In *proceeding of the 13th International Symposium on Capillary Electroseparation Techniques ITP 2002*. 2002, Helsinki: University of Helsinki, pp. 110-110.

Kvasničková, L., Štěrbová H., Ševčíková P., Glatz, Z., Kahle V., Slanina J.: Analysis of Lignans in Schisandra Extract, Comparison between CEC and MEKC. In *Book of abstracts of Developments in Chromatography and Electrophoresis & Chiral 2002*. 2002. Olomouc: Česká společnost chemická - skupina pro chromatografii a elektroforézu, 2002. pp. 74-74. ISBN 80-86238-24-5.

Kvasničkova, L., Glatz, Z., Štěrbova, H., Kahle, V., Slanina, J., Musil, P.: Capillary Electrochromatography in Polyacrylamide Based Monolithic Capillary Columns. In *Book of Abstract, International Symposium on Capillary*

Electrophoresis, ITP 2000. Bratislava: Slovenská chemická spoločnosť, 2000. pp. 85-85.

Príspevek ve sborníku z konference v českém jazyce

Kvasničkova, L., Štěrbova, H., Glatz, Z., V., Slanina, J., Musil, P.: Stanovení biologicky aktivních látek v léčivých rostlinách pomocí kapilární elektrochromatografie. In *Sborník abstrakt 5. setkání biochemiků a molekulárních biologů*. Brno: Přírodovědecká fakulta MU v Brně, 2001. pp. 47-48. ISBN 80-210-2538-7.

Publikační činnost v rámci postgraduálního studia:

Príspevky v mezinárodních časopisech s impact faktorem

Wunderlichová, L., Buňková, L., Koutný, M., Valenta, T., Buňka, F.: Novel touchdown-PCR method for detection of putrescine-producing Gram-negative bacteria in food products *Food Microbiology*, 34, pp. 268-276.

Príspevky v jiných mezinárodních časopisech

Wunderlichová L., Buňková L., Koutný M., Buňka F. (2012) The Possibilities of Detection of Putrescine Production in Gram-negative Bacteria – a Kick off Study. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Science*, 1 848-854

Príspevky na mezinárodních kongresech, symposiích a významných konferencích

Husárová L., Marušincová H., Růžička J., **Wunderlichová L.**, Koutný M.: Biodegradation of synthetic polymers: application of TGGE. *Ecology of Soil Microorganisms*, 27.4. - 1.5. 2011, Prague, Czech Republic.

Účast na grantových projektech:

GAČR 503/11/1417

Produkce biogenních aminů u vybraných kmenů bakterií mléčného kvašení
IGA/12FT/11/D

Faktory ovlivňující dekarboxylázovou aktivitu vybraných bakterií čeledi
Enterobacteriaceae

IGA/FT/2012/027

Monitoring výskytu biogenních aminů ve vybraných potravinách a dekarboxylázové aktivity potravinářsky významných bakterií.

12. PŘÍLOHY

Příloha A: Seznam bakteriálních kmenů a referenčních sekvencí použitých pro návrh primerů určených k detekci cílových genů.

Bakteriální kmen použitý pro návrh sady primerů	NCBI Referenční číslo sekvence:	Cílový gen pro nějž byla použita nukleotidová sekvence z bakteriálního kmene						
		<i>speA</i>	<i>adiA</i>	<i>adi/lac</i>	<i>speB</i>	<i>aguA</i>	<i>speC</i>	<i>speF</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i> pf01	NC_007492	+	-	+	-	+	+	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> SBW25	NC_012660	+	-	+	-	+	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14	NC_008463	+	-	+	-	+	+	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	NC_002516	+	-	+	-	+	+	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA7	NC_009656	+	-	+	-	+	+	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LESB58	NC_011770	+	-	+	-	+	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5	NC_004129	+	-	+	-	+	+	-
<i>Pseudomonas entomophila</i> L48	NC_008027.1	-	-	-	-	-	+	-
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. <i>Enteritidis</i> P125109	NC_0011294	+	+	-	+	-	-	+
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. Paratyphi A ATCC 9150	NC_006511	+	-	-	+	-	+	+
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser Typhi CT18	NC_003198.1	-	+	-	-	-	+	-
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. Heidelberg SL476	NC_011083.1	-	+	-	-	-	-	-
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. Paratyphi C RKS4594	NC_012125.1	-	-	-	-	-	+	-
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. Typhimurium LT2	NC_003197.1	-	-	-	-	-	+	+
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser.	NC_011205.1	-	+	-	-	-	-	-

Dublin CT_02021853								
<i>Citrobacter koseri</i> ATCC BAA-895	NC_009792	+	-	-	+	-	+	+
<i>Citrobacter rodentium</i> ICC168	NC_013716.1	-	-	-	-	-	+	+
<i>Erwinia tasmaniensis</i> Et1/99	NC_010694	-	-	-	+	-	-	-
<i>Pectobacterium wasabiae</i> WPP163	NC_013421.1	-	-	-	-	-	+	-
<i>Pectobacterium carotovorum</i> : PC1	NC_012917.1	-	-	-	-	+	+	-
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i> SCRI1043 -	NC_004547	+	-	-	-	+	+	-
<i>Shigella flexneri</i> 5 8401	NC_008258	+	-	-	+	-	-	-
<i>Shigella flexneri</i> 2a 2457T	NC_004741	+	-	-	+	-	-	-
<i>Shigella sonnei</i> Ss046	NC_007384	+	-	-	+	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> K-12 substr. MG1655	NC_000913	+	+	-	+	-	+	-
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933	NC_002655	+	-	-	+	-	+	-
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 Sakai	NC_002695.1	-	+	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> BW2952	NC_012759.1	-	-	-	-	-	+	+
<i>Escherichia coli</i> O111:H-. 11128	NC_013364.1	-	-	-	-	-	-	+
<i>Escherichia coli</i> SMS-3-5	NC_010498.1	-	+	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> O103:H2 12009	NC_013353.1	-	-	-	-	-	-	+
<i>Escherichia coli</i> O127:H6 E2348/69	NC_011601.1	-	-	-	-	-	-	+
<i>Escherichia coli</i> LF82	NC_011993	+	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> O81 ED1a	NC_011745.1	-	-	-	+	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> IA11	NC_011741.1	-	-	-	-	-	+	-
<i>Escherichia coli</i> APEC O1	NC_008563.1	-	-	-	-	-	+	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NTUH- K2044	NC_012731	-	-	-	+	-	+	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> MGH	NC_009648	+	-	-	-	-	+	-

78578								
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NTUH-K2044	NC_012731.1	-	-	-	+	-	-	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 342	NC_011283	+	-	-	+	-	+	-
<i>Enterobacter</i> sp. 638	NC_009436	+	-	-	+	-	+	-
<i>Enterobacter sakazakii</i> ATCC BAA-894	NC_009778	+	-	-	+	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i> ATCC 13047	NC_014121.1	-	-	-	-	-	+	+
<i>Enterobacter</i> sp. 638	NC_009436.1	-	-	-	-	-	+	-
<i>Enterobacter cloacae</i> SCF1	NC_014618.1	-	-	-	-	-	+	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> KCTC 2190	NC_015663.1	-	-	-	-	-	-	+
<i>Enterobacter asburiae</i> LF7a	NC_015968.1	-	-	-	-	-	-	+
<i>Serratia proteamaculans</i> 568	NC_009832	+	-	-	+	-	+	+
<i>Proteus mirabilis</i> HI4320	NC_010554	+	-	-	+	-	-	+
<i>Yersinia pestis</i> CO92	NC_003143	+	+	-	-	+	+	-
<i>Yersinia pestis</i> biovar <i>microtus</i> 91001	NC_005810	+	+	-	-	+	-	-
<i>Yersinia pestis</i> Pestoides F	NC_009381	+	-	-	-	+	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> 8081	NC_008800.1	-	-	-	-	+	+	+
<i>Yersinia pestis</i> Antiqua	NC_008150.1	-	+	-	-	-	-	-
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> IP 32953	NC_006155.1	-	-	-	-	-	+	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>palaearctica</i> 105.5R(r)	NC_015224.1	-	-	-	-	-	-	+

Příloha B: Navržené konsenzuální primery použité v TD-PCR.

Cílový gen	Název primeru	Sekvence 5'→3'	Referenční sekvence	Pozice v genu	GenBank ID:	Velikost produktu (bp)
<i>speA</i>	adc5F	CAAYTTCTCGSTGTTCCAG	<i>Escherichia coli</i> K-12 substr. MG1655	1461 – 1479	947432	282
	adc5R	TCRCCRAACAGGTTGTGC		1725 – 1742		
<i>speB</i>	agm4F	TGAACGTCGTGGACTGCGG	<i>Escherichia coli</i> K-12 substr. MG1655	248 – 266	947715	355
	agm4R	GCRGCCAGCACGGTAAAGC		584 – 602		
<i>Ldc, adi</i>	adi5F	CGAAGCCTTCATGATGCA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	1260 – 1278	878596	489
	adi5R	CCACTTGCCCTTGGTGA		1733 – 1749		
<i>aguA</i>	AgDI4F	ATGCCYGCMGAATGGG	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	43 – 58	879730	515
	AgDI6R	SGTGCCTTCGCCRTC		487 – 501		
<i>AdiA</i>	adiA3F	TKCCAASCCGYAACCG	<i>Escherichia coli</i> K-12 substr. MG1655	818 - 833	948638	548
	adiA3R	AACMGCTTCRTRATCAC		1365 - 1383		
<i>speC</i>	odc1F	CGACGCCGGTYTATCTGG	<i>Escherichia coli</i> K-12 substr. MG1655	686 – 703	947457	470
	odc1R	AAACAGCGGRTARAACGG		1165 – 1182		
<i>speF</i>	speF1F	TGGAAACCGCRCGTAACC	<i>Escherichia coli</i> K-12 substr. MG1655	725 – 742	945297	472
	speF1R	AGAAYGGGCTGGTGGAGG		1178 – 1195.		

Y = C or T; R = A or C; W = A or T; M = A or C; K = G or T; S = G or C; N = A, C, G or T

13. CURRICULUM VITAE

Osobní údaje:

Jméno a příjmení: Mgr. Leona Wunderlichová (roz. Kvasničková)
Datum narození: 19. 5. 1977
Adresa: Trnková 429, Uherské Hradiště, 68601
e-mail: wunderlichova@ft.utb.cz

Vzdělání:

1991 – 1995: SPŠ Chemická Zlín, obor Analytická chemie
1995 – 2000: magisterské studium na Masarykově Univerzitě, Přírodovědecké Fakultě, studijní program Chemie, studijní obor Biochemie
2009 - dosud : doktorské studium na Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně

Zaměstnání:

1. 9. 2000-31. 12. 2000 : Výzkumný a vývojový pracovník, Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, Kunovice

1. 2. 2001-20. 4. 2004 : Odborný pracovník s vysokoškolskou kvalifikací, Zdravotní ústav se sídlem ve Zlíně, pracoviště Uherské Hradiště

20. 4. 2004-23. 4. 2010 : rodičovská dovolená

1. 8. 2010 – 20. 1. 2013: Asistent, Ústav inženýrství ochrany životního prostředí, Fakulta technologická, UTB ve Zlíně.

21. 1. 2013 – doposud: Výzkumný a vývojový pracovník, 5M s.r.o., Kunovice