

PREGLEDNI RAD / REVIEW

Katabolizam aminokiselina u stanicama bakterija mliječne kiseline

Catabolism of Amino Acids in the Cells of Lactic Acid Bacteria

Nuša Jelovac, Anamarija Perković, Marina Pupovac, Antonija Trontel, Anita Slavica*

Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva
Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Pierottijeva 6, Zagreb, Hrvatska

Sažetak

Bakterije mliječne kiseline su auksotrofni industrijski mikroorganizmi i uzgajaju se u hranjivim podlogama kompleksnog sastava. Između ostalih sastojaka, u hranjive podloge u kojima se uzgajaju ove bakterije potrebno je dodati i određene aminokiseline. Aminokiseline s razgranatim bočnim lancem, leucin, izoleucin i valin, moraju se dodati u podloge u kojima rastu bakterije mliječne kiseline. Potreba za preostalim aminokiselinama zavisi o vrsti i soju bakterije pomoću koje se provodi određeni bioproces. Tijekom transporta aminokiselina u stanice bakterija mliječne kiseline i razgradnje ovih izvora dušika i ugljika formira se elektrokemijski gradijent, pridobiva se metabolička energija, regeneriraju kofaktori enzima, ublažava se učinak proizvodnje mliječne kiseline tj. snižavanja pH vrijednosti, stanice se prilagođavaju osmotskom šoku kao i uvjetima okoline u stacionarnoj fazi rasta. Aminokiseline i/ili (među)spojevi nastali tijekom katabolizma ovih supstrata ishodišni su spojevi za proizvodnju: drugih aminokiselina i masnih kiselina, koje se ugrađuju u membrane; α -keto kiselina i α -hidroksi kiselina, koje mogu imati ulogu siderofora; laktona; nukleinskih kiselina; proteina; lipida i poliamina. Katabolizam aminokiselina u stanicama bakterija mliječne kiseline nedovoljno je poznat i uglavnom se istražuje u cilju smanjenja koncentracije nepoželjnih amina u fermentiranim proizvodima.

Glavne riječi: aminokiseline, bakterije mliječne kiseline, katabolizam, pridobivanje metaboličke energije, regulacija pH vrijednosti, reoksidacija kofaktora, osmotski šok

Summary

Lactic acid bacteria are auxotrophic industrial microorganisms usually cultivated in complex growth media. Among other ingredients, in the media for cultivation of the bacteria, particular amino acids need to be added. Branched-chain amino acids, leucine, isoleucine and valine, have to be added in the media in which lactic acid bacteria are expected to grow. Requirement for the rest of amino acids depends on the species and strain of the bacteria that have been used in defined bioprocess. During transport of amino acids in the lactic acid bacteria cells and degradation of this nitrogen and carbon sources, electrochemical gradient is formed, metabolic energy is yielded, enzyme cofactors are regenerated, effect of produced lactic acid i.e. reduction of pH value is moderated, the cells are adapted to osmotic shock as well as to stationary growth phase conditions. Amino acids and/or (intermediate) compounds generated during their catabolism represent precursors for production of: other amino acids and fatty acids, which can be incorporated in membranes; α -keto acids and α -hydroxy acids, which can also act as siderophores; lactones; nucleic acids; lipides and polyamines. Amino acids catabolism in lactic acid bacteria cells is not known enough and it is mainly investigated in order to reduce concentration of undesired amines in fermented food.

Keywords: amino acids, lactic acid bacteria, catabolism, metabolic energy-yielding, regulation of pH value, cofactor reoxidation, osmotic shock

1. Uvod

Bakterije mliječne kiseline (BMK) su grupa Gram-pozitivnih nesporelirajućih katalaza-negativnih aerotolerantnih bakterija koje nemaju citokrome, a imaju specifične zahtjeve za supstratima u hranjivoj podlozi u kojoj fermentiraju izvore ugljika i proizvode mliječnu kiselinu kao krajnji proizvod katabolizma (Axelsson, 1998). U ovu se grupu bakterija pribrajaju rodovi: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* i *Weissella* (Carr i sur., 2002). BMK su auksotrofi i, između ostalih supstrata, u hranjivu podlogu u kojoj se uzgajaju dodaju se i aminokiseline, peptidi i/ili proteini. Genom BMK *Lactobacillus plantarum* kodira za enzime koji su uključeni u biosintezu većine aminokiselina. Ove bakterijske stanice ne mogu sintetizirati leucin (Leu), izoleucin (Ile) i valin (Val) (Kleerebezem i Hugenholtz,

2003). Nasuprot tomu, *Lactobacillus acidophilus* je auksotrof za 14 aminokiselina (Altermann i sur., 2005), a u stanicama bakterije *Lactobacillus johnsonii* ne može se odvijati *de novo* sinteza niti jedne aminokiseline (Pridmore i sur., 2004).

Ukoliko se u hranjivu podlogu dodaju peptidi i/ili proteini, rast i aktivnost BMK zavisi o njihovim proteolitičkim sustavima. Komponente proteolitičkih sustava možemo razlikovati na temelju njihove funkcije na: (1) proteinaze, enzime koje hidrolitički razgrađuju proteine do peptida; (2) transportne sustave pomoću kojih se hidrolizom nastale podjedinice proteina transportiraju kroz membranu citoplazme; i (3) peptidaze, enzime koji dalje razgrađuju transportirane peptide do aminokiselina. Aktivnost enzima ovih sustava može osigurati određenu koncentraciju pojedinih aminokiselina koje su potrebne za optimalno odvijanje metaboličkih reakcija u stanicama ovih industrijskih mikroorganizama.

Corresponding author: aslavica@pbf.hr



Aminokiseline transportirane u stanicu prevode se različitim kataboličkim putevima do određenih (među)spojeva, što zavisi o vrsti i soju BMK. Određenim metaboličkim putevima pregradnje aminokiselina mogu se proizvesti spojevi čija koncentracija utječe na organoleptička svojstva prehrambenih proizvoda (Smit i sur., 2005; Savijoki i sur., 2006).

U ovom radu dan je pregled razgradnje aminokiselina u stanicama BMK u cilju pridobivanja metaboličke energije, regulacije pH vrijednosti, reoksidacije kofaktora određenih enzima i prilagodbe stanice na osmotski šok. Katabolizam aminokiselina ima značajan učinak na fiziologiju stanica BMK, pa tako i na iskorištenje bioprocasa u kojima se koriste ovi mikroorganizmi.

2. Katabolizam aminokiselina

Katabolizam aminokiselina kod prokariota najbolje je proučen u stanicama bakterija *Escherichia coli* i *Bacillus subtilis* (Fernández i sur., 2000). Razgradnja aminokiselina u stanicama ovih bakterija obično se odvija do acetyl-koenzima A (acetyl-CoA) i međuspojeva citratnog ciklusa. BMK su obligatno fermentativni mikroorganizmi i u njihovim se stanicama ne odvija kompletan citratni ciklus. Dakle, spojevi nastali razgradnjom aminokiselina u stanicama BMK ne mogu se dalje pregraditi citratnim ciklusom i njihov katabolizam se razlikuje od kataboličkih procesa okarakteriziranih u modelnim prokariotskim stanicama *E. coli* i *B. subtilis*. Aminotransferaze i dekarboksilaze su enzimi koji imaju vrlo važnu ulogu u razgradnji aminokiselina u stanicama BMK. Drugi enzimi koji sudjeluju u ovim kataboličkim reakcijama su liaze, dehidrogenaze i drugi specifični enzimi.

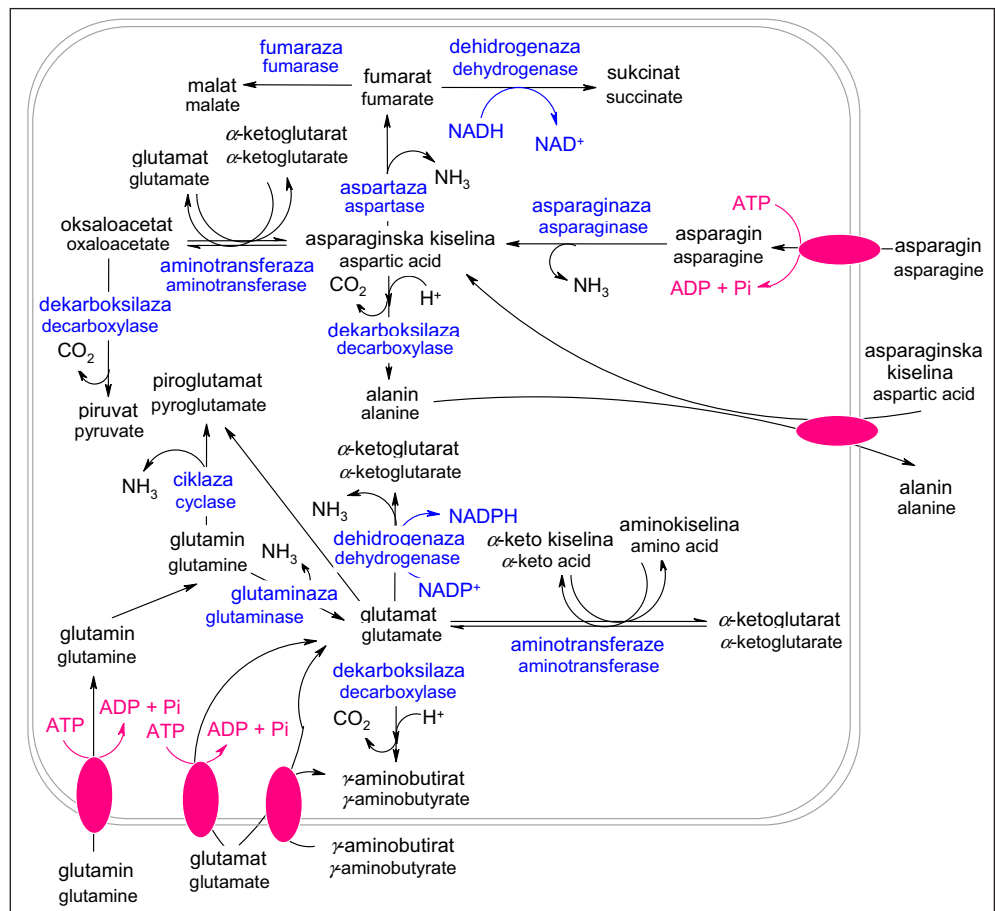
Brojni pregledni radovi opisuju katabolizam aminokiselina u stanicama BMK jer u ovim metaboličkim putevima razgradnje nastaju spojevi koji utječu na okus i miris fermentiranih proizvoda (Chistensen i sur., 1999; Weimer i sur., 1999; McSweeney i Sousa 2000; Tanous i sur. 2002; van Kranenburg i sur. 2002; Smit i sur., 2005). Istraživanja katabolizma na nivou genoma i proteoma su relativno slabo zastupljena i uglavnom se bave reakcijama razgradnje aminokiselina u vrstama iz rodova *Lactobacillus* i *Lactococcus*, dok su vrste iz rodova *Streptococcus* i *Enterococcus* manje zastupljene.

2.1. Katabolizam asparagina i glutamina

U bakterijskim stanicama razgradnja asparagina (Asn) započinje u reakciji koju kataliziraju asparaginaze (EC 3.5.1.1). U ovoj se reakciji Asn hidrolizira do asparaginske kiseline (Asp) i NH_3 (Slika 1.). Okarakterizirane su tri bakterijske asparaginaze: asparaginaza A, asparaginaza B i asparaginaza C (Borek i Jaskoski, 2001). Iz stanica Gram-negativnih bakterija izolirana su dva izoenzima asparaginaze A koja, prema odjeljku u kojem su aktivni, mogu biti periplazmatski ili citoplazmatski enzimi, a kataliziraju hidrolizu Asn i/ili glutamina (Gln). Većina Gram-pozitivnih bakterija posjeduje jednu asparaginazu. Katabolizam Asn i Gln u stanicama BMK nije do kraja pojašnjen. Svi dosad kompletno sekvencirani genomi BMK imaju gen koji kodira za asparaginazu. Za razliku od asparaginaza Gram-negativnih bakterija, asparaginaze Gram-pozitivnih bakterija nemaju signalni peptid za sekreciju (Derst i sur., 2000).

Glutamin ciklotransferaza (EC 2.3.2.5) katalizira konverziju Gln do piroglutamata i NH_3 , a opisana reakcija je povezana sa (de)fosforilacijom ATP/ADP (Slika 1.) (Cook i Russell, 1993). Ova je reakcija detektirana u stanicama termofilnih BMK *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus helveticus* i *Streptococcus thermophilus* (Mucchetti i sur., 2002).

Glutamin transaminaza K (EC 2.6.1.64), izolirana iz *E. coli*, katalizira prijenos amino grupe sa Gln do fenil-piruvata i u ovoj reakciji nastaje ketoglutaramat i fenilalanin (Phe). Slična aktivnost nije identificirana u stanicama BMK.



Slika 1. Katabolizam asparaginske kiseline, asparagina, glutaminske kiseline i glutamina u stanici BMK (prilagođeno iz Fernández i sur., 2000).

Figure 1. Catabolic pathways of aspartic acid, asparagine, glutamic acid and glutamine in the LAB cell (adapted from Fernández et al., 2000).

2.2. Katabolizam asparaginske kiseline

Djelomično su okarakterizirana tri načina razgradnje asparaginske kiseline (aspartata) (Asp) u stanicama BMK koje provode enzimi: aspartat aminotransferaza (transaminaza) (EC 2.6.1.1), aspartat dekarboksilaza (EC 4.1.1.13) i aspartaza (EC 4.3.1.1) (Slika 1.). Enzim aspartat aminotransferaza izoliran je i pročišćen iz stanica *L. murinus* i kloniran iz stanica *L. lactis* (Rollan i sur., 1988). Aktivnost aspartat dekarboksilaze identificirana je u stanicama *Lactobacillus sp.* (Abe i sur., 1996). Aspartaza, enzim koji katalizira reverzibilnu reakciju konverzije Asp do fumarata i NH_3 , izoliran je i pročišćen iz stanica *L. murinus* (Rollan i sur., 1985).

Gen koji kodira za aspartat aminotransferazu (*aspC*) okarakteriziran je kod *L. lactis* LM0230. Sekvenca ove transferaze (*aspC*) vrlo je slična sekvenci prokariotske pridoksal-5'-fosfat-zavisne aspartat aminotransferaze. Stanice *E. coli*, u kojima se nakon kloniranja *aspC* sintetizira *aspC*, posjeduju aktivnost aspartat aminotransferaze, dok katabolizam preostalih 19 aminokiselina nije detektiran. Aktivnost *aspC* kod vrsta iz rodova *Lactobacillus* i *Lactococcus*, kao i kod drugih organizama, ključna je u posljednjoj reakciji biosinteze Asp (Paulus, 1993). Ovu hipotezu podupiru istraživanja u kojima je potvrđeno da stanice *L. lactis* LM0230, koje nemaju gen *aspC*, ne mogu rasti u hranjivoj podlozi definiranog kemijskog sastava u kojoj nedostaju Asp i Asn. Budući da je Asp ishodišna molekula za sintezu drugih aminokiselina i nukleotida u stanicama BMK, aspartat aminotransferaza ima vrlo važnu ulogu u fiziologiji BMK. Nije poznato je li *aspC* uključen u *in vivo* katabolizam Asp u stanicama BMK.

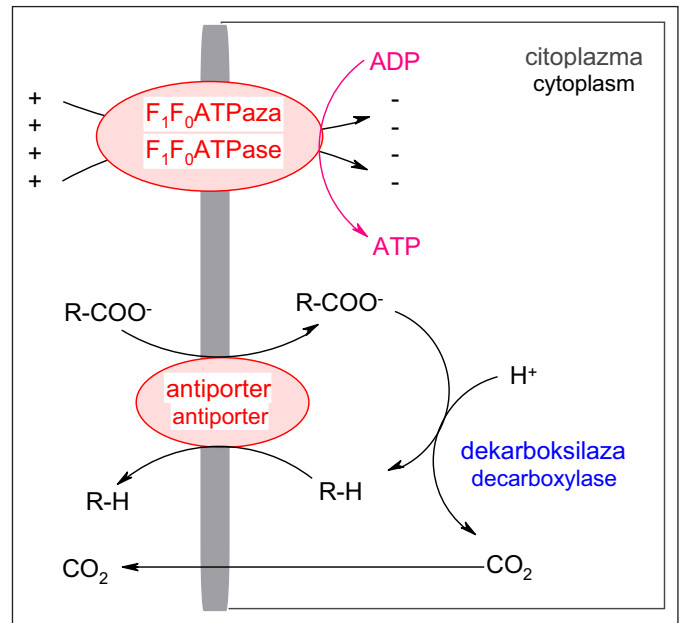
Reakcija dekarboksilacije Asp do alanina (Ala) može se koristiti za pridobivanje metaboličke energije i regulaciju pH vrijednosti u stanicama bakterija iz roda *Lactobacillus sp.* (Abe i sur., 1996; Konings i sur., 1995). Opći mehanizam dekarboksilacije kiseline, karakterističan za različite tipove dekarboksilaza, i regulacije pH vrijednosti u stanici mikroorganizma prikazan je na slici 2.

U citoplazmi stanice BMK odvija se dekarboksilacija aminokiseline (R-COO^-) uz utrošak jednog protona (H^+) i nastaje odgovarajući amin (R-H). Transport nastalog amina iz citoplazme indirektno uključuje i izbacivanje ovog protona iz stanice. Na ovaj se način smanjuje koncentracija H^+ iona u citoplazmi tj. povećava njezina pH vrijednost. Osim toga, transport amina iz citoplazme generira elektrokemijski gradijent, kojeg stanica može koristiti za reakcije u kojima se troši/pohranjuje energija. Takve reakcije su npr. aktivni transport otopljenih supstrata iz okoline stanice u stanicu ili fosforilacija ADP u ATP, koju katalizira $\text{F}_1\text{F}_0\text{ATPaza}$ (Konings i sur., 1997).

Aspartaza je izolirana i pročišćena iz stanica *L. murinus* (Chistensen i sur., 1999). Daljnja istraživanja nisu provedena pa fiziološka uloga ovog enzima u stanicama BMK nije poznata.

2.3. Katabolizam glutaminske kiseline

Razgradnja glutaminske kiseline (glutamata) (Glu) kod BMK može započeti u reakcijama koje kataliziraju tri grupe enzima: aminotransferaze (EC 2.6.1.79), dehidrogenaze (EC 1.4.1.2, EC 1.4.1.3, EC 1.4.1.4) ili dekarboksilaze (EC



Slika 2. Opći mehanizam za pridobivanje metaboličke energije i regulaciju pH vrijednosti u stanici BMK: dekarboksilacija aminokiseline i antiport aminokiseline i odgovarajućeg amina (prilagođeno iz Fernández i sur., 2000).

Figure 2. General mechanism of energy-yielding and pH regulation in the LAB cell: amino acid decarboxylation and amino acid/amine antiport (adapted from Fernández et al., 2000).

4.1.1.15). U reakcijama koje kataliziraju aminotransferaza i dehidrogenaza iz Glu nastaje α -ketoglutarat, dok dekarboksilaza prevodi Glu do γ -aminobutirata (GABA). Smatra se da se ova tri spoja ne razgrađuju dalje.

Dosad okarakterizirane aminotransferaze koje su izolirane i pročišćene iz stanica BMK sudjeluju u katabolizmu Glu (u ovim reakcijama Glu je donor amino grupe). Veliki broj prokariotskih stanica ima aktivnu α -ketoglutarat dehidrogenazu, koja katalizira reakciju u kojoj se α -ketoglutarat prevodi do sukcinil-CoA. Aktivnost ovog enzima nije detektirana u stanicama BMK (Morishita i Yajima, 1995; Lapujade i sur., 1998). Dakle, katabolizam Glu svodi se na aktivnost aminotransferaza i konverziju Glu do α -ketoglutarata.

Aktivnost glutamat dehidrogenaze detektirana je u ekstraktu stanica *L. fermentum* i *L. lactis* (Misono i sur., 1985). Nije definirana ekspresija ovog enzima kod stanica BMK iz roda *Lactococcus*.

Enzim glutamat dekarboksilaza izolirana je i pročišćena iz stanica *Lactobacillus brevis* (Ueno i sur., 1997). Geni koji kodiraju za: glutamat dekarboksilazu (*gadB*), Glu/ γ -aminobutirat antiporter (*gadC*) i aktivator transkripcije ovih gena (*gadR*), identificirani su u stanicama *L. lactis* (Sanders i sur., 1998). Glutamat dekarboksilaza i Glu/ γ -aminobutirat antiporter dio su istog operona, a *gadR* je ključan za transkripciju *gadB* i *gadC* (*gadCB*). Pojačana transkripcija *gadCB* odvija se na početku stacionarne faze rasta stanica u hranjivoj podlozi kompleksnog sastava i pozitivno je regulirana pri niskim pH vrijednostima podloge i nakon dodatka NaCl i Glu.

Higuchi i sur. (1997) opisali su pridobivanje energije u stanicama *Lactobacillus sp.*, koje su bile aktivne u podlozi u koju je dodan Glu. U ovim se stanicama ADP fosforilira na račun energije pohranjene u obliku elektrokemijskog gradijen-



ta (Slika 2.). Preživljavanje stanica *L. lactis* u hranjivoj podlozi definiranog sastava povećano je za 2500-5000 puta nakon dodatka NaCl i Glu (Sanders i sur., 1998). Negativan učinak proizvedene mliječne kiseline tj. snižavanja pH vrijednosti na preživljavanje i aktivnost ovih bakterija značajno je ublažen zbog katabolizma Glu kao i zbog pozitivne regulacije transkripcije *gadR* i *gadB* gena nakon dodatka NaCl u podlogu.

Proizvodnja GABA odvija se u nekim mliječnim proizvodima npr. u siru. Istraživanja ne povezuju direktno nastanak GABA i karakterističan okus sira u kojem se odvijaju ove kataboličke reakcije. Zoon i Allersma (1996) opisali su povezanost povećane proizvodnje CO₂ i GABA u sirevima. Ovi autori smatraju da je aktivnost glutamat dekarboksilaze u stanicama *S. thermophilus* i *L. helveticus* odgovorna za nastanak plina i rupica u siru.

2.4. Katabolizam alanina i prolina

Katabolizam Ala u stanicama BMK nije u cijelosti okarakteriziran. Neke vrste BMK mogu katabolizirati Ala ukoliko je u hranjivoj podlozi prisutan i α -ketoglutarat (Tamman i sur., 2000; Williams i sur., 2001). Dakle, pretpostavlja se da katabolizam Ala započinje reakcijom transaminacije. Liu i sur. (2003) ne podupiru ovu hipotezu. U stanici Gram-negativne bakterije *E. coli* alanin racemaza (EC 5.1.1.1) prevodi L-Ala u D-Ala, koji se nakon toga, u reakciji koju katalizira dehidrogenaza D-amino kiselina (EC 1.4.5.1, EC 1.4.99.1), hidrolizira do piruvata i NH₃ (Reitzer i Magasanilk, 1987). Kod stanica *E. coli* mogu se razlikovati alanin racemaza, koja sudjeluje u anaboličkim reakcijama, i alanin racemaza čija se aktivnost pribraja u kataboličke reakcije. Aktivnost anaboličke alanin racemaze osigurava dovoljnu koncentraciju D-Ala koji se koristi za izgradnju stanične stijenke. Geni koji kodiraju za dehidrogenazu D-amino kiselina i kataboličku alanin racemazu organizirani su u jedan operon. Pregradnju L-Ala katalizira i alanin dehidrogenaza (EC 1.4.1.1), enzim izoliran iz bakterijskih vrsta koje pripadaju ogranku *Firmicutes*. Geni koji kodiraju za alanin dehidrogenazu nisu identificirani u sekvenciranim genomima BMK. Aktivnost alanin racemaze određena je u stanicama *Lactobacillus reuterii* (Thompson i sur., 2002), *Lactobacillus plantarum* i *Lactococcus lactis* (Hols i sur., 1999). Ala bi se mogao razgraditi do piruvata u reakciji transaminacije. Aktivnost alanin aminotransferaze nije još detektirana u stanicama BMK.

Neke vrste bakterija iz roda *Lactobacillus* nakupljaju prolin (Pro) (Tammam i sur., 2000; Williams i sur., 2001; Liu i sur., 2003). Putevi razgradnje Pro za sada nisu poznati. Kod većine aerobnih mikroorganizama prolin dehidrogenaza (EC 1.5.99.8) katalizira konverziju Pro do L-1-pirolin-5-karboksilata, koji se može oksidirati do Glu. Pro je supstrat i za pirolin-5-karboksilat reduktazu (EC 1.5.1.2). Međutim, ova je reakcija reverzibilna i njezina ravnoteža je na strani reaktanta Pro (Kenkies i sur., 1999). Geni koji kodiraju za homologe pirolin-5-karboksilat reduktaze identificirani su kao dio genoma *E. faecalis*, *L. lactis* i *L. plantarum*. Nakupljanje Pro se odvija u stanicama BMK kao prilagodba na osmotski šok (Baliarda i sur., 2003). Katabolizam ove aminokiseline u smislu pridobivanja energije manje je vjerojatan.

2.5. Katabolizam aminokiselina s razgranatim bočnim lancima

Razgradnja aminokiselina s razgranatim bočnim lancem (leucin, Leu; izoleucin, Ile; valin, Val) i aminokiselina koje sadrže sumpor (cistein, Cys; metionin, Met) obično započinje transaminacijom. U reakciji transaminacije Leu, Ile i Val prevode se do odgovarajućih α -keto kiselina i to redom do α -ketoizokaproata, α -keto- β -metil-valerata i α -ketoizovalerata (Jackson & Morgan, 1954). Dalje se ove α -keto kiseline prevode u reakcijama: oksidativne dekarboksilacije do karboksilnih kiselina, dekarboksilacije do aldehida, i redukcije do hidroksi-kiselina.

Aminotransferaze koje sudjeluju u katabolizmu aminokiselina s razgranatim bočnim lancem u stanicama BMK znatno se međusobno razlikuju i to s obzirom na supstrate čiju konverziju kataliziraju (Yvon i sur., 1997; Gao i Steele, 1998; Roudot-Algaron i Yvon, 1998). Bakterije iz roda *Lactococcus* posjeduju najmanje dvije aminotransferaze koje pokazuju aktivnost prema Leu (Chistensen i sur., 1999). Odgovarajuće α -keto kiseline, nastale u reakciji transaminacije, prevode se u aldehide i ove reakcije kataliziraju dekarboksilaze. Tucker i Morgan (1967) okarakterizirali su dekarboksilazu iz *L. lactis* var. *maltigenes* koja katalizira redukciju α -ketoizokaproata u 3-metil-butanal kao i dekarboksilaciju α -keto- β -metil-valerata i α -ketoizovalerata. Drugi soj *L. lactis* može iz Leu i Val proizvesti odgovarajuće aldehide. Aktivnost dekarboksilaze kojoj su supstrati α -keto kiseline s razgranatim bočnim lancem detektirana je u stanicama *L. casei* (Hickey i sur., 1983).

L-2-hidroksiizokaproat dehidrogenaza, izolirana iz *L. confusus*, je NADH-zavisna enzim i pokazuje najveću aktivnost tijekom konverzije α -keto kiselina s razgranatim bočnim lancem koje imaju pet ili šest ugljikovih atoma (Schütte i sur., 1984). Primarna sekvencija ovog proteina vrlo je slična primarnoj sekvenci L-laktat dehidrogenaze izolirane iz *L. casei* (Lerch i sur., 1989).

D-2-hidroksiizokaproat dehidrogenaza izolirana je iz vrsta iz roda *Leuconostoc*, zatim iz *L. casei* i *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Hummel i sur., 1985). I ovaj enzim je NADH-zavisna dehidrogenaza, pokazuje aktivnost prema različitim α -keto kiselinama i prema strukturi je sličan L-laktat dehidrogenazi (Hummel i sur., 1985; Kallwass, 1992). Međutim, L-2-hidroksiizokaproat dehidrogenaza i D-2-hidroksiizokaproat dehidrogenaza nisu genetički srodni proteini (Lerch i sur., 1989; Kochhar i sur., 1992).

Osim ove dvije dehidrogenaze, α -keto kiseline su supstrati za dehidrogenazu D-(-)-bademove kiseline (eng. mandelic acid), izoliranu iz *L. curvatus* i alkohol dehidrogenazu, izoliranu iz *L. lactis* var. *maltigenes* (Morgan i sur., 1965).

Transaminacija aminokiselina s razgranatim bočnim lancem i nastajanje odgovarajućih masnih kiselina nije reakcija koja se uobičajeno odvija u stanicama BMK. U stanicama *L. lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* pregradnjom Val nastaje izobutirična kiselina, dok pregradnjom Leu i Ile nastaju, redom, izovalerijanska i druge kiseline s pet ugljikovih atoma (Nakae i Elliot, 1965). Pregradnju ovih aminokiselina može započeti aminotransferaza, ali za proizvodnju izobutirične kiseline i kiselina s pet ugljikovih atoma potrebna je aktivnost drugih enzima, koji za sada nisu okarakterizirani.

Fiziološki značaj katabolizma aminokiselina s razgranatim bočnim lancem u stanicama BMK nije do kraja razjašnjen. Ove su bakterije auksotrofi i u hranjivu podlogu u kojoj se očekuje njihov rast i aktivnost moraju se dodati aminokiseline s razgranatim bočnim lancem (Chopin, 1993). Aminotransferaza, koja katalizira redukciju α -ketoizokaproata, ima ulogu u regeneraciji kofaktora NAD⁺ kod bakterija iz roda *Lactococcus*. Ovaj je enzim uključen u regeneraciju Glu iz α -ketoglutarata, koji se tada može koristiti za biosintezu drugih aminokiselina u reakcijama koje kataliziraju aminotransferaze. Fiziološka uloga katabolizma aminokiselina s razgranatim bočnim lancem kod drugih organizama je pridobivanje metaboličke energije. Ove aminokiseline mogu biti: supstrati - izvori ugljika za stanicu BMK; ishodišne molekule za proizvodnju masnih kiselina s razgranatim bočnim lancem, koje se onda mogu koristiti za biosintezu membrana; ishodišne molekule za proizvodnju α -keto kiselina i α -hidroksi kiselina, koje su siderofori u uvjetima s niskim koncentracijama željeza (Massey i sur., 1976; de Mendoza i sur., 1993; Kingsley i sur., 1996).

2.6. Katabolizam aminokiselina s aromatskim prstenom

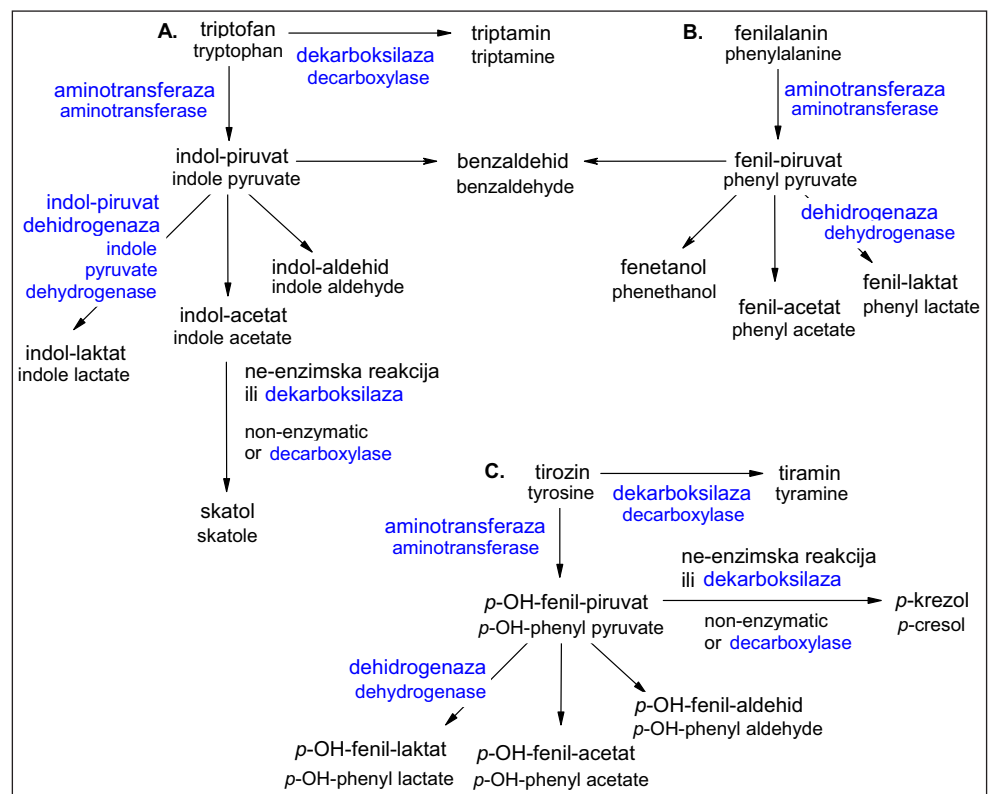
Kod većine BMK katabolizam aminokiselina s aromatskim prstenom započinje aktivnošću enzima aminotransferaze (Gao i sur., 1997; Yvon i sur., 1997; Gummala i Broadbent, 1998). Katabolizam triptofana (Trp), fenilalanina (Phe) i tirozina (Tyr) shematski su prikazani na slici 3. U stanicama nekih sojeva BMK eksprimiraju se dekarboksilaze koje pokazuju aktivnost prema aminokiselinama s aromatskim prstenom.

Indol-piruvat nastaje u reakciji konverzije Trp, koju katalizira aminotransferaza. Dalje se indol-piruvat prevodi do indol-laktata, indol-acetata, indol-aldehida i benzaldehida (Slika 3.A.) (Hummel i sur., 1984; Gao i sur., 1997). Kod nekih vrsta bakterija iz roda *Lactobacillus* indol-piruvat se prevodi do indol-laktata. Ovu reakciju katalizira indol-piruvat dehidrogenaza (Hummel i sur., 1994; Gummala & Broadbent, 1998). Iz indol-piruvata mogu nastati i indol-acetat i indol-aldehid. Nakupljanje indol-piruvata i indol-aldehida u stanicama bakterija iz roda *Lactococcus* zavisi o soju (Gao i sur., 1997). Dakle, u stanicama različitih sojeva BMK nakupljaju se različiti spojevi nastali razgradnjom Trp. Indol-acetat može se ne-enzimskom reakcijom prevesti u skatol (Urbach, 1995) ili, kod nekih *Lactobacillus* vrsta, u reakciji koju katalizira odgovarajuća dekarboksilaza (Honeyfield i Carlson, 1990).

U reakciji koju katalizira aminotransferaza Phe se prevodi do fenil-piruvata (Slika 3.B.). U stanicama bakterija iz roda *Lactococcus* ovaj je spoj stabilan i dalje se ne razgrađuje (Gao i sur., 1997). Međutim, fenil-piruvat, fenil-laktat i fenil-acetat mogu se detektirati u stanicama bakterija iz roda *Lactococcus* u definiranim uvjetima uzgoja (Yvon i sur., 1997). Okarakterizirana je i ne-enzimska konverzija fenil-piruvata do benzaldehida i fenetanola (Slika 3.B.) (Kong i sur., 1996).

Aminotransferaza katalizira reakciju u kojoj se Tyr prevodi do *p*-OH-fenil-piruvata (Slika 3.C.). U stanicama bakterija iz roda *Lactococcus* međuspoj *p*-OH-fenil-piruvat se dalje konvertira do 4-hidroksil-benzaldehida i *p*-OH-fenil-acetata (Gao i sur., 1997). U stanicama nekih vrsta iz roda *Lactobacillus* *p*-OH-fenil-piruvat se dekarboksilira i nastaje *p*-krezol (Yokoyama i Carlson, 1981).

Aminotransferaze, čiji su supstrati aminokiseline s aromatskim prstenom, izolirane su i pročišćene iz stanica *L. lactis* NCDO763 i *L. lactis* S3 (Yvon i sur., 1997; Gao i sur., 1998). Aminotransferaza iz *L. lactis* NCDO763 je protein molekulske mase od 86 kDa i njegova aktivnost je zavisna o koenzimu piridoksal-5'-fosfatu. U reakcijama koje katalizira ovaj enzim donori amino-grupe mogu biti aminokiseline s aromatskim prstenom kao i Leu i Met. Okarakterizirane su dvije oligomerne aminotransferaze iz *L. lactis* S3 (Gao i sur., 1998). Aminotransferaza 1 je homodimer s molekulskom masom od 84 kDa, dok je aminotransferaza 2 homotetramer koji se sastoji od istovjetnih podjedinica kao i aminotransferaza 1. Aminotransferaza iz *L. lactis* NCDO763 i aminotransferaza 1 iz *L. lactis* S3 slične su u nekoliko ključnih karakteristika



Slika 3. Katabolizam triptofana (A.), fenilalanina (B.) i tirozina (C.) (prilagođeno iz Fernández i sur., 2000).

Figure 3. Pathways for the catabolism of tryptophan (A.), phenylalanine (B.) and tyrosine (C.) (adapted from Fernández et al., 2000).



- imaju slične: pH vrijednosti kod kojih je njihova aktivnost maksimalna, veličinu podjedinica i molekulska masu nativnog proteina. Osim toga, ova dva enzima pokazuju aktivnost prema istim supstratima i promjenu aktivnosti nakon dodatka NaCl. Redoslijed prema kojem aminotransferaza iz *L. lactis* NCDO763 preferira različite aminokiseline - supstrate je Trp > Tyr > Phe, a aminotransferaza 1 iz *L. lactis* S3 je Trp > Tyr > Phe (Chistensen i sur., 1999).

Nije jasno koje dehidrogenaze kataliziraju konverziju fenil-piruvata i *p*-OH-fenil-piruvata do fenil-laktata i *p*-OH-fenil-laktata. Poznato je da L-hidroksiizokaproat dehidrogenaza ima vrlo širok spektar supstrata, a u ovu se grupu supstrata ubraja i fenil-piruvat (Feil i sur., 1994; Feil i sur., 1997). Redukciju fenil-piruvata može katalizirati NAD(H)-zavisna dehidrogenaza 2-hidroksi kiselina (Hummel i Kula, 1989).

Deakarboksilacijom Tyr i Trp nastaju tiramin i triptamin. Tiramin je detektiran u stanicama *L. brevis*, *L. casei*, *L. curvatus*, *L. delbrueckii*, *L. paracasei* i *Leuconostoc lactis* (Straub i sur., 1995; Roig-sagues i sur., 1997). Aktivnost triptofan dekarboksilaze detektirana je u stanicama *L. casei* i *L. helveticus*, dok triptamin nije detektiran (Gummalla i Broadbent, 1996). Fiziološki značaj dekarboksilacije Tyr i Trp obuhvatio bi regulaciju pH vrijednosti unutar stanice kao i pridobivanje metaboličke energije (Slika 2.).

Tijekom razgradnje aminokiselina s aromatskim prstenom nastaju spojevi, kao što su npr. *p*-krezol, fenetanol, fenil-acetaldehid, indol i skatol (Dunn i Lindsay, 1985; Vangtal i Hammond, 1986; Milo i Reineccius, 1997), koji su odgovorni za razvoj nepoželjnog okusa i mirisa mliječnih proizvoda. Ovo je jedan od problema koji se javljaju tijekom fermentacije u mlijeku i mliječnim proizvodima pomoću BMK. Biogeni amini, kao što je npr. tiramin, često se detektiraju u siru (McCabe, 1986). Konzumiranje takvih proizvoda može dovesti do trovanja monoaminima, što se manifestira kao porast krvnog tlaka te se javljaju: palpitacija, glavobolja, hipertenzija, mučnina, povraćanje i malaksalost. Dakle, važno je poznavati uvjete u kojima dolazi do nakupljanja tiramina u mliječnim proizvodima.

2.7. Katabolizam aminokiselina koje sadrže sumpor

Razgradnja aminokiselina koje sadrže sumpor, Met i Cys, može se odvijati različitim putevima. Met se može razgraditi: (1) konverzijom preko *S*-adenozil metionina do cistationa, ovim putem povezuju se razgradnja Met i Cys, ali i katabolizam Met i različite anaboličke reakcije (Slika 4.); (2) u reakciji deaminacije u kojoj nastaje α -keto- γ -metiltiobutirat, koju katalizira aminotransferaza; i (3) u simultanoj reakciji deaminacije i detiometilacije, koju katalizira metionin liaza, a u kojoj nastaje metantiole.

Reakciju u kojoj se Met prevodi do metantiole mogu katalizirati piridoksal-5'-fosfat-zavisne liaze: cistation β -liaza (CBL), cistation γ -liaza (CGL) i metionin γ -liaza (MGL). Metionin γ -liaza je rasprostranjena u stanicama bakterija, ali nije identificirana i kod BMK. Cistation β -liaza i cistation γ -liaza

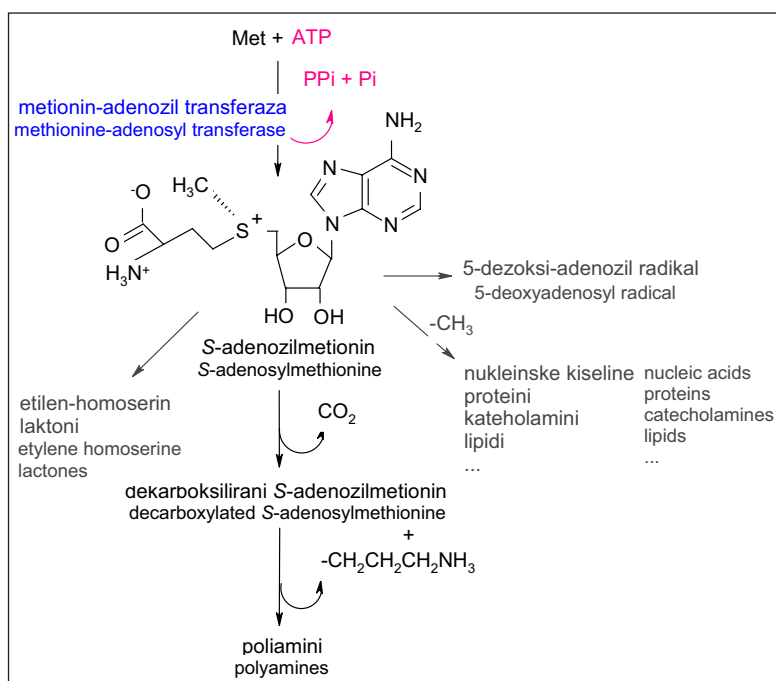
mogu katalizirati konverziju različitih supstrata koji sadrže sumpor, pa tako i Met, koje α - i γ -eliminacijskom reakcijom prevodi do metantiole. Geni koji kodiraju za cistation β -liazu i cistation γ -liazu identificirani su u stanicama različitih vrsta BMK, međutim, ove liaze nemaju veću ulogu u katabolizmu Met u stanicama BMK npr. u stanicama *L. lactis* (Fernández i sur., 2000). Met se može deaminirati i tijekom deaminacije nastaje 2-keto-4-(metiltio) butirična kiselina, koja se zasad neokarakteriziranim putem prevodi do metantiole (Yvon i Ri-jnen, 2001). U stanicama bakterija iz roda *Lactobacillus* i kod *S. thermophilus* transaminacija je glavni put razgradnje Met (Amárita i sur., 2001).

Većina BMK može koristiti Cys, međutim, relativno malo podataka je dostupno o katabolizmu ove aminokiseline u stanicama BMK (Williams i sur., 2001). Dokazano je da cistation γ -liaza katalizira pregradnju Cys i cistina do NH₃, H₂S i piruvata (Bruinenberg i sur., 1997). Ova je aktivnost kod *Streptococcus anginosus* i drugih vrsta streptokoka identificirana kao aktivnost enzima cistein desulfhidraza (Yoshida i sur., 2003). Cys se može koristiti kao supstrat za sintezu Met.

2.8. Katabolizam glicina i serina

Katabolizam glicina (Gly) u stanicama BMK je uglavnom nepoznat. Ova se aminokiselina iscrpljuje iz hranjive podloge u kojoj je otopljen i α -ketoglutarat (Williams i sur., 2001). Glicin aminotransferaza (EC 2.6.1.4), enzim koji katalizira reverzibilni prijenos amino grupe sa Gly do α -ketoglutarata, izoliran je i pročišćen iz *L. plantarum* (Fernández i sur., 2000).

U stanicama BMK serin deaminaza (EC 4.3.1.17) direktno prevodi serin (Ser) u piruvat (Liu i sur., 2003). I neke treonin deaminaze (EC 4.3.1.19) mogu katalizirati ovakvu pregradnju Ser.



Slika 4. Metabolička raznovrsnost *S*-adenozilmetionina (prilagođeno iz Fernández i sur., 2000).

Figure 4. Metabolic versatility of *S*-adenosylmethionine (adapted from Fernández et al., 2000).

Aktivnost serin deaminaze detektirana je u stanicama *E. faecalis*, *L. fermentum* i *L. murinus* (Farias i sur., 1991). Ova C-N liaza sastoji se od dvije različite podjedinice, koje kodiraju geni *sdaA* i *sdaB*, a kofaktor enzima je piridoksal-5'-fosfat. Prisutnost serin deaminaze u stanicama BMK upućuje na važnost katabolizma Ser za fiziologiju ovih bakterija. Procjenjuje se da oko 10% fluksa piruvata potječe iz katabolizma Ser (Novák i Loubière, 2000). Tijekom uzgoja nekih vrsta BMK koje kataboliziraju Ser, postižu se veće koncentracije bakterijske biomase (Benthin i Villadsen, 1996). Značajnijom se smatra i uloga Ser u preživljavanju stanica tijekom stacionarne faze rasta (Liu i sur., 2003). Osim toga, proizvodnja NH_3 ublažava učinak zakiseljavanja citoplazme i okoline stanice tijekom homofermentativne razgradnje ugljikohidrata.

2.9. Katabolizam treonina

Katabolizam treonina (Thr) u stanicama BMK započinje aktivnošću enzima treonin aldolaze (EC 4.1.2.5). Ovaj enzim katalizira reakciju u kojoj se Thr prevodi do acetaldehida i Gly (Lees i Jago, 1976; Marshall i Cole, 1983). Treonin aldolaza izolirana iz *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* YOP₁₂ djelomično je okarakterizirana. Ovaj enzim ima molekulsku masu od 190 kDa (Manca de Nadra i sur., 1987). Aktivnost treonin aldolaze kod *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* i *S. thermophilus* povećava se nakon dodatka Thr, dok je ova aktivnost inhibirana nakon dodatka Gly i Cys (Lees i Jago, 1976; Manca de Nadra i sur., 1987). Neke vrste BMK koje posjeduju alkohol dehidrogenazu mogu konvertirati acetaldehid, nastao tijekom katabolizma Thr, do etanola (Marshall i Cole, 1983; Arnau i sur., 1998).

Općenito je prihvaćeno da je fiziološka uloga treonin aldolaze proizvodnja Gly. Ovu hipotezu podupiru rezultati dobiveni kod *L. lactis* Z8, koji ne posjeduje aktivnost treonin aldolaze, a koji treba Gly u podlozi za rast.

Prisutnost acetaldehida doprinosi karakterističnom okusu jogurta (Law, 1981; Sandine i Elliker, 1970; Tamime i Deeth, 1980). Osim tijekom katabolizma Thr, acetaldehid može nastati i tijekom fermentacije ugljikohidrata (Wilkins i sur., 1986).

2.10. Katabolizam histidina

Histidin dekarboksilaza (EC 4.1.1.22) katalizira reakciju u kojoj se aminokiselina histidin (His) prevodi u histamin i CO_2 . Ovaj je enzim izoliran u bakterijama iz rodova *Escherichia*, *Salmonella*, *Clostridia*, *Bacillus* i *Lactobacillus* (Voight i Eitenmiller, 1978). Većina dekarboksilaza, pa tako i histidin dekarboksilaze, trebaju koenzim piridoksal-5'-fosfat (Guirard i Snell, 1964). Druga velika grupa dekarboksilaza aminokiselina umjesto piridoksal-5'-fosfata koristi kovalentno vezan piruvat (Chang i Snell, 1968; Huynh i sur., 1984; Recsei i sur., 1983). Dobro okarakterizirana je histidin dekarboksilaza izolirana iz stanica bakterije *Lactobacillus* 30a (Parks i sur., 1985; Hackert i sur., 1981). Ovaj se protein sintetizira kao pro-enzim, koji u svojoj primarnoj strukturi ima 310 aminokiselina, a nakon

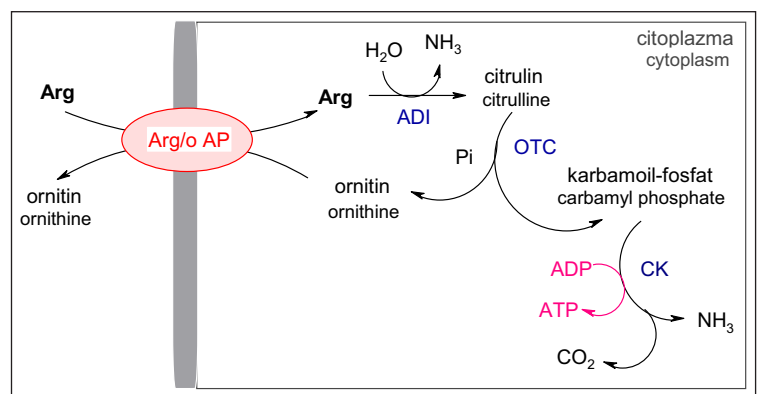
sinteze, autokatalitički se aktivira cijepanjem peptidne veze između Ser81 i Ser82. Gen koji kodira histidin dekarboksilazu (*hdcA*) dio je operona kojeg sačinjavaju i drugi neokarakterizirani geni, koji se obično označavaju kao *hdcB*. U prisutnosti histidina pojačava se transkripcija gena ovog operona za oko tri puta (Vanderslice i sur., 1986; Copeland i sur., 1989).

Fiziološka uloga histidin dekarboksilaze uključuje regulaciju pH vrijednosti u citoplazmi stanica BMK i pridobivanje metaboličke energije (Molenaar i sur., 1993), kako je već prije opisano kod katabolizma Asn i Glu (Slika 2.).

Proizvodnja histamina tijekom fermentacije važna je za ispravnost proizvoda dobivenih ovim bioprocesima. Histamin je biogeni amin koji može uzrokovati trovanje hranom (ten-Brink i sur., 1990; Stratton i sur., 1992; Santos i sur., 1996; Kahana i Todd, 1981; Taylor i sur., 1982).

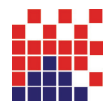
2.11. Katabolizam arginina

Do sada su opisana dva metabolička puta kojima se odvija razgradnja aminokiseline arginina (Arg). Sojevi *L. fermentum* proizvode dušikov oksid (NO) iz Arg. Prema istraživanju Morita i sur. (1997), za to je odgovorna aktivnost enzima sintetaze dušikova oksida (EC 1.14.13.39). U ovoj reakciji nastaje i citrulin. Drugi put za razgradnju Arg u stanicama BMK je preko enzima arginin deiminaze (ADI) (EC 3.5.3.6) ili ADI put (Manca de Nadra i sur., 1982; Cunin i sur., 1986; Konings i sur., 1995) (Slika 5.). ADI putem razgradnjom jednog mola arginina nastaju: 2 mola NH_3 , 1 mol ornitina, 1 mol CO_2 i 1 mol ATP. Ovaj metabolički put predstavlja jedan od načina za pridobivanje ATP i to na nivou fosforilacije supstrata. Na ovaj se način Arg razgrađuje uglavnom u stanicama heterofermentativnih vrsta iz roda *Lactobacillus*, dok se katabolizam ove aminokiseline kod *L. lactis*, *Oenococcus oenos* i *Thermobacterium* vrsta iz roda *Lactobacillus* odvija drugim kataboličkim putevima. Opisani su i nepotpuni putevi razgradnje Arg ADI putem (Crow i Thomas, 1982; Manca de Nadra i sur., 1982).



Slika 5. Transport arginina u stanicu BMK i razgradnja ove aminokiseline ADI putem (prilagođeno iz Crow i Thomas, 1982; Manca de Nadra i sur., 1982; Liu i sur., 1995). Arginin/ornitin antiporter, Arg/o AP; arginin deiminaza, ADI; ornitin transkarboksilaza, OTC; karbamat kinaza, CK.

Figure 5. Transport of arginine into LAB cell and catabolism of the amino acid by the ADI pathway (adapted from Crow and Thomas, 1982; Manca de Nadra et al., 1982; Liu et al., 1995). Arginine/ornithine antiporter, Arg/o AP; arginine deiminase, ADI; ornithine transcarboxylase, OTC; carbamate kinase, CK.



Redosljed gena iz skupine koja kodira za enzime ADI puta je: *arcA* (kodira ADI), *arcB* (kodira ornitin transkarboksilazu), *arcC* (kodira karbamat kinazu), *arcT* (kodira neokarakteriziranu transaminazu), *arcD* (kodira Arg/o antiporter) (Zúñiga i sur., 1998). Regulacija ovog metaboličkog puta istraživana je u stanicama: *L. buchneri*, *L. leichmanii*, *L. sake*, *L. lactis* i *O. oenos*. Arg inducira ekspresiju enzima ADI puta, dok neki ugljikohidrati reprimiraju sintezu ovih proteina. Gen *ahrC*, koji kodira protein koji regulira puteve za sintezu i razgradnju Arg, identificiran je u stanicama *L. lactis* (Rallu i sur., 1996). Moguće je da je ovaj protein, zajedno s Arg, uključen u indukciju sinteze enzima ADI puta. Represija sinteze enzima ADI puta ugljikohidratima zavisi o vrsti BMK kao i o vrsti ugljikohidrata koji reprimira sintezu ovih proteina. Dakle, katabolička represija može biti dio regulacije ADI puta. Identificirane su dvije *cre* (eng. catabolite responsive element) sekvence u promotorskoj regiji skupine gena koji kodiraju za enzime ADI puta i to uzvodno od gena *arcA* (Zúñiga i sur., 1998). Na ove se dvije sekvence može vezati protein CcpA (eng. Catabolite control protein A). Ovim je istraživanjem poduprta hipoteza o kataboličkoj represiji kao mehanizmu regulacije ADI puta kod *L. sake*.

Pridobivanje ATP i nastajanje NH₃ tijekom razgradnje Arg ima fiziološki značaj u stanicama BMK. Pokazano je da se energija pridobivena tijekom razgradnje Arg ADI putem u stanicama *L. buchneri*, *L. lactis* i *O. oenus* koristi u anaboličkim reakcijama (Crow i Thomas, 1982). Nadalje, preživljavanje stanica BMK pri relativno niskim pH vrijednostima u stanici i u okolini stanice, povećava se u slučajevima kada je aktivnost enzima ADI puta visoka. Naime, razgradnjom Arg proizvodi se i NH₃, čime se povećava pH vrijednost (Marquis i sur., 1987). Katabolizmom Arg u stanicama BMK, koje su aktivne tijekom fermentacije i proizvodnje vina, mogu se proizvesti i prekursori etil-karbonata. Ovaj je spoj karcinogen.

2.12. Katabolizam lizina

BMK mogu katabolizirati lizin (Lys) (Tammam i sur., 2000). Lys je supstrat enzima aminotransferaze i ova reakcija zahtijeva prisutnost α -ketoglutarata. Lys se može i dekarboksilirati do kadaverina. Ovu reakciju katalizira lizin dekarboksilaza (EC 4.1.1.18) čija aktivnost nije detektirana u stanicama BMK. Kod bakterija iz roda *Clostridium* Lys je supstrat za β -lizin-2,3-aminomutazu (EC 5.4.3.2) i u ovoj reakciji nastaje β -lizin.

3. Zaključak

Dostupan je relativno mali broj informacija o katabolizmu aminokiselina koji se odvija u stanicama BMK. Većina istraživanja bavi se katabolizmom ovih supstrata u smislu poboljšanja poželjnih organoleptičkih karakteristika proizvoda prehrambene industrije. Poznavanje puteva razgradnje aminokiselina u stanicama BMK važno je jer se ovim kataboličkim procesima može pridobivati metabolička energija, regulirati pH vrijednost u stanici i u okolini stanice, regenerirati kofaktori enzima i neki (među)spojevi te ublažiti učinak osmotskog šoka na stanicu. Aminokiseline mogu biti i izvori ugljika u

uvjetima ograničenja rasta stanica izvorom ugljika. Na temelju specifičnih kataboličkih puteva mogu se odabrati određene vrste i sojevi BMK za proizvodnju ciljanih spojeva i fermentiranih proizvoda. Na ovaj se način može smanjiti koncentracija biogenih amina koji se nakupljaju tijekom katabolizma aminokiselina i povećati koncentracija poželjnih spojeva čija koncentracija doprinosi formiranju poželjnog okusa i mirisa fermentiranih proizvoda.

4. Literatura

- Abe, K., Hayashi, H., Maloney, P.C. (1996) Exchange of aspartate and alanine. Mechanism for development of a proton-motive force in bacteria. *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 3079-3084.
- Altermann, E., Russell, W.M., Azcarate - Peril, M.A., Barrangou, R., Buck, B.L., McAuliffe, O., Souther, N., Dobson, A., Duong, T., Callanan, M., Lick, S., Hamrick, A., Cano, R., Klaenhammer, T.R. (2005) Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 3906-3912.
- Amárita, F., Fernández-Esplá, D., Requena, T., Peláez, C. (2001) Conversion of methionine to methional by *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiology Letters*, 204, 189-195.
- Arnau, J., Jorgensen, F., Madsen, S.M., Vrang, A., Israelsen, H. (1998) Cloning of the *Lactococcus lactis* adhE gene, encoding a multifunctional alcohol dehydrogenase, by complementation of a fermentative mutant of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 180, 3049-3055.
- Axelsson, L. (1998) Lactic acid bacteria: classification and physiology. U: Salminen, S., von Wright, A. (ed): Lactic acid bacteria. Microbiology and functional aspects, str. 1-72. Marcel Dekker Inc., New York, USA.
- Baliarda, A., Robert, H., Jebbar, M., Blanco, C., Deschamps, A., LeMarrec, C. (2003) Potential osmoprotectants for the lactic acid bacteria *Pediococcus pentosaceus* and *Tetragenococcus halophila*. *International Journal of Food Microbiology*, 84, 13-20.
- Benthin, S., Villadsen, J. (1996) Amino acid utilization by *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* FD1 during growth on yeast extract or casein peptone. *Journal of Applied Bacteriology*, 80, 65-72.
- Borek, D., Jaskoski, M. (2001) Sequence analysis of enzymes with asparaginase activity. *Acta Biochimica Polonica*, 48, 893-902.
- Bruinenberg, P.G., de Roo, G., Limsowtin, G.K.Y. (1997) Purification and characterisation of cystathionine gamma - lyase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11: Possible role in flavour compound formation during cheese maturation. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 561-566.
- Carr, F.J., Chill, D., Maida, N. (2002) The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28, 281-370.
- Chang, G.W., Snell, E.E. (1968) Histidine decarboxylase of *Lactobacillus* 30a. II. Purification, substrate specificity, and stereospecificity. *Biochemistry*, 7, 2005-2012.



- Chistensen, J., Dudley, E.G., Pederson, J.A., Steele, J.L. (1999) Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76, 217-246.
- Chopin, A. (1993) Organization and regulation of genes for amino acid biosynthesis in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiological Reviews*, 12, 21-38.
- Cook, G.M., Russell, J.B. (1993) The glutamine cyclotransferase reaction of *Streptococcus bovis*: a novel mechanism of deriving energy from nonoxidative and non-reductive deamination. *FEMS Microbiology Letters*, 111, 263-268.
- Copeland, W.C., Domena, J.D., Robertus, J.D. (1989) The molecular cloning, sequence and expression of the *hdcB* gene from *Lactobacillus* 30A. *Gene*, 85, 259-265.
- Crow, V.L., Thomas, T.D. (1982) Arginine metabolism in lactic streptococci. *Journal of Bacteriology*, 150, 1024-1032.
- Cunin, R., Glansdorff, N., Piérard, A., Stalon, V. (1986) Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria. *Microbiological Reviews*, 50, 314-352.
- de Mendoza, D., Grau, R., Cronan, J.E.Jr. (1993) Biosynthesis and function of membrane lipids. U: Sonenshein, A.L., Hock, J.A., Losick, R. (ed): *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics, str. 411-421. American Society for Microbiology, Washington, DC, USA.
- Derst, C., Henseling, J., Rohm, K.H. (2000) Engineering the substrate specificity of *Escherichia coli* asparaginase. II. Selective reduction of glutaminase activity by amino acid replacements at position 248. *Protein Science*, 9, 2009-2017.
- Dunn, H.C., Lindsay, R.C. (1985) Evaluation of the role of microbial Strecker-derived aroma compounds in unclean-type flavors of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 68, 2859-2874.
- Farias, M.E., Strasser de Saad, A.M., Pesce de Ruiz Holgado, A.A., Oliver, G. (1991) Purification and properties of L-serine dehydratase from *Lactobacillus fermentum* ATCC 14931. *Current Microbiology*, 22, 205-211.
- Feil, I.K., Hendle, J., Schomburg, D. (1997) Modified substrate specificity of L-hydroxyisocaproate dehydrogenase derived from structure-based protein engineering. *Protein Engineering*, 10, 255-262.
- Feil, I.K., Lerch, H.P., Schomburg, D. (1994) Deletion variants of L-hydroxyisocaproate dehydrogenase. Probing substrate specificity. *European Journal of Biochemistry*, 223, 857-863.
- Fernández, M., van Doesburg, W., Rutten, G.A., Marugg, J.D., Alting, A.C., van Kranenburg, R., Kuipers, O.P. (2000) Molecular and functional analyses of the *metC* gene of *Lactococcus lactis*, encoding cystathione beta-lyase. *Applied Environmental Microbiology*, 66, 42-48.
- Gao, S., Mooberry, E.S., Steele, J.L. (1998) Use of ¹³C nuclear magnetic resonance and gas chromatography to examine methionine catabolism by lactococci. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 4670-4675.
- Gao, S., Oh, D.H., Broadbent, J.R., Johnson, M.E., Weimer, B.C., Steele, J.L. (1997) Aromatic amino acid catabolism by lactococci. *Lait*, 77, 371-381.
- Gao, S., Steele, J.L. (1998) Purification and characterization of oligomeric species of an aromatic amino acid aminotransferase from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* S3. *Journal of Food Biochemistry*, 22, 197-211.
- Guirard, B.M., Snell, E.E. (1964) Nutritional requirements of *Lactobacillus* 30a for growth and histidine decarboxylase production. *Journal of Bacteriology*, 87, 370-376.
- Gummalla, S., Broadbent, J.R. (1996) Indole production by *Lactobacillus* spp. in cheese: a possible role for tryptophanase. *Journal of Dairy Science*, 79, 101.
- Hackert, M.L., Meador, W.E., Oliver, R.M., Salmon, J.B., Recsei, P.A., Snell, E.E. (1981) Crystallization and subunit structure of histidine decarboxylase from *Lactobacillus* 30a. *Journal of Biological Chemistry*, 256, 687-690.
- Hickey, M.W., Hillier, A.J., Jago, G.R. (1983) Enzymic activities associated with lactobacilli in dairy products. *Australian Journal of Dairy Technology*, 38, 154-157.
- Higuchi, T., Hayashi, H., Abe, K. (1997) Exchange of glutamate and aminobutyrate in a *Lactobacillus* strain. *Journal of Bacteriology*, 179, 3362-3364.
- Hols, P., Kleerebezem, M., Schanck, A.N., Ferain, T., Hugenholtz, J., Delcour, J., de Vos, W.M. (1999) Conversion of *Lactococcus lactis* from homolactic to homoalanine fermentation through metabolic engineering. *Nature Biotechnology*, 17, 588-592.
- Honeyfield, D.C., Carlson, J.R. (1990) Assay for the enzymatic conversion of indoleacetic acid to 3-methylindole in a ruminal *Lactobacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 724-729.
- Hummel, W., Kula, M.R. (1989) Dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds. *European Journal of Biochemistry*, 184, 1-13.
- Hummel, W., Schütte, H., Kula, M. R. (1985) D-2-Hydroxyisocaproate dehydrogenase from *Lactobacillus casei*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 21, 7-15.
- Hummel, W., Weiss, N., Kula, M.R. (1984) Isolation and characterization of a bacterium possessing L-phenylalanine dehydrogenase activity. *Archives of Microbiology*, 137, 47-52.
- Huynh, Q.K., Recsei, P.A., Vaaler, G.L., Snell, E.E. (1984) Histidine decarboxylase of *Lactobacillus* 30a. Sequences of the overlapping peptides, the complete alpha chain, and pro-histidine decarboxylase. *Journal of Biological Chemistry*, 259, 2833-2839.
- Jackson, H.W., Morgan, M.E. (1954) Identity and origin of the malty aroma substance from milk cultures of *Streptococcus lactis* var. *Maltigenes*. *Journal of Dairy Science*, 37, 1316-1324.
- Kahana, L.M., Todd, E. (1981) Histamine poisoning and reaction to cheese. *Annals of Internal Medicine*, 88, 520-521.
- Kallwass, H.K.W. (1992) Potential of R-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase from *Lactobacillus casei* for stereospecific reductions. *Enzyme and Microbial Technology*, 14, 28-35.
- Kingsley, R., Rabsch, W., Roberts, M., Reissbrodt, R., Williams, P.H. (1996) TonB-dependent iron supply in *Salmonella* by ketoacids and hydroxyacids. *FEMS Microbiology Letters*, 140, 65-70.
- Kenkies, J., Ziehn, R., Fritsche, K., Pich, A., Andreesen, J.R. (1999) Proline biosynthesis from L-ornithine in *Clostridium sticklandii*: purification of delta1-pyrroline-5-carboxylate reductase, and sequence and expression of the encoding gene, *proC*. *Microbiology*, 145, 819-826.



- Kleerebezem, M., Hugenholtz, J. (2003) Metabolic pathway engineering in lactic acid bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 14, 232-237.
- Kochhar, S., Hunziker, P.E., Leong-Morgenthaler, P., Hottinger, H. (1992) Evolutionary relationship of NADC-dependent D-lactate dehydrogenase: comparison of primary structure of 2-hydroxy acid dehydrogenases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 184, 60-66.
- Kong, Y., Strickland, M., Broadbent, J.R. (1996) Tyrosine and phenylalanine catabolism by *Lactobacillus casei* flavor adjuncts: biochemistry and implications in cheese flavor. *Journal of Dairy Science*, 79, 101.
- Konings, W.N., Lolkema, J.S., Bolhuis, H., 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, 117-128.
- Konings, W.N., Lolkema, J.S., Poolman, B. (1995) The generation of metabolic energy by solute transport. *Archives of Microbiology*, 164, 235-242.
- Lapujade, P., Coccagn-Bousquet, M., Loubiere, P. (1998) Glutamate biosynthesis in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 2118. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 2485-2489.
- Law, B.A. (1981) The formation of aroma and flavor compounds in fermented dairy products. *Dairy Science Abstracts*, 43, 143.
- Lees, G.J., Jago, G.R. (1976) Formation of acetaldehyde from threonine by lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Research*, 43, 75-83.
- Lerch, H.P., Frank, R., Collins, J. (1989) Cloning, sequencing and expression of the L-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase encoding gene of *Lactobacillus confusus* in *Escherichia coli*. *Gene*, 83, 263-270.
- Liu, S.Q., Pritchard, G.G., Hardman, M.J., Pilone, G.J. (1995) Occurrence of arginine deiminase pathway enzymes in arginine catabolism by wine lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 310-316.
- Liu, S.Q., Holland, R., Crow, V.L. (2003) The potential of dairy lactic acid bacteria to metabolise amino acids via non-transaminating reactions and endogenous transamination. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 257-269.
- Manca de Nadra, M.C., Pese de Ruiz Holgado, A.A., Oliver, G. (1982) Arginine dihydrolase activity in lactic acid bacteria. *Milchwissenschaft*, 37, 669-670.
- Manca De Nadra, M.C., Raya, R.R., Pesce De Ruiz Holgado, A., Oliver, G. (1987) Isolation and properties of threonine aldolase of *Lactobacillus bulgaricus* YOP12. *Milchwissenschaft*, 42, 92-94.
- Marquis, R.E., Bender, G.R., Murray, D.R., Wong, A. (1987) Arginine deiminase system and bacterial adaptation to acid environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 53, 198-200.
- Marshall, V.M., Cole, W.M. (1983) Threonine aldolase and alcohol dehydrogenase activities in *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus* and their contribution to flavour production in fermented milks. *Journal of Dairy Research*, 50, 375-379.
- Massey, L.K., Sokatch, J.R., Conrad, R.S. (1976) Branched-chain amino acid catabolism in bacteria. *Bacteriological Reviews*, 40, 42-54.
- McCabe, B.J. (1986) Dietary tyramine and other pressor amines in MAOI regimens: A review. *Journal of the American Dietetic Association*, 86, 1059-1064.
- McSweeney, P.L., Sousa, M.J. (2000) Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening, A review. *Lait*, 80, 293-324.
- Milo, C., Reineccius, G.A. (1997) Identification and quantification of potent odorants in regular-fat and low-fat mild Cheddar cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 3590-3594.
- Misono, H., Goto, N., Nagasaki, S. (1985) Purification, crystallization and properties of NADPC-specific glutamate dehydrogenase from *Lactobacillus fermentum*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 49, 117-123.
- Molenaar, D., Bosscher, J.S., Ten Brink, B., Driessen, A.J.M., Konings, W.N. (1993) Generation of a proton motive force by histidine decarboxylation and electrogenic histidine/histamine antiport in *Lactobacillus buchneri*. *Journal of Bacteriology*, 175, 2864-2870.
- Morgan, M.E., Lindsay, R.C., Libbey, L.M., Pereira, R.L. (1965) Identity of additional aroma constituents in milk cultures of *Streptococcus lactis* var. *maltigenes*. *Journal of Dairy Science*, 49, 15-18.
- Morishita, T., Yajima, M. (1995) Incomplete operation of biosynthetic and bioenergetic functions of the citric acid cycle in multiple auxotrophic lactobacilli. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 59, 251-255.
- Morita, H., Yoshikawa, H., Sakata, R., Nagata, Y., Tanaka, H. (1997) Synthesis of nitric oxide from the two equivalent guanidino nitrogens of L-arginine by *Lactobacillus fermentum*. *Journal of Bacteriology*, 179, 7812-7815.
- Mucchetti, G., Locci, F., Massara, P., Vitale, R., Neviani, E. (2002) Production of pyroglutamic acid by thermophilic lactic acid bacteria in hard-cooked mini-cheeses. *Journal of Dairy Science*, 85, 2489-2496.
- Nakae, T., Elliott, J.A. (1965) Production of volatile fatty acids by some lactic acid bacteria. II. Selective formation of volatile fatty acids by degradation of amino acids. *Journal of Dairy Science*, 48, 293-299.
- Novák, L., Loubiere, P. (2000) The metabolic network of *Lactococcus lactis*: distribution of (14)C-labeled substrates between catabolic and anabolic pathways. *Journal of Bacteriology*, 182, 1136-1143.
- Parks, E.H., Ernst, S.R., Hamlin, R., Xuong, N.H., Hackert, M.L. (1985) Structure determination of histidine decarboxylase from *Lactobacillus* 30a at 3.0 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 182, 455-465.
- Paulus, H. (1993): Biosynthesis of the aspartate family of amino acids. U: Sonenshein, A.L., Hock, J.A., Losick, R. (ed): *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics, str. 237-267. American Society for Microbiology, Washington, DC, USA.
- Pridmore, R.D., 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.R., 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, 2512-2517.
- Rallu, F., Gruss, A., Maguin, E. (1996) *Lactococcus lactis* and stress. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70, 243-251.
- Recsei, P.A., Huynh, Q.K., Snell, E.E. (1983) Conversion of prohistidine decarboxylase to histidine decarboxylase: peptide chain cleavage by nonhydrolytic serinolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80, 973-977.
- Reitzer, L.J., Magasanik, B. (1987) Ammonia assimilation and the biosynthesis of glutamine, glutamate, aspartate, asparagine, L-alanine, and D-alanine. U: Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L., Roig-Sagues, A.X., Hernandez-Herrero, M.N., Lopez-Sabater, E.I., Rodriguez-Jerez, J.J., Mora-Ventura, M.T. (1997) Evaluation of three decarboxylating agar media to detect histamine and tyramine-producing bacteria in ripened sausages. *Letters in Applied Microbiology*, 25, 309-312.
- Rollan, G., de Nadra, M.C.M., Holgado, P.R., Oliver, G. (1985) Aspartate metabolism in *Lactobacillus murinus* CNRS 313. I. Aspartase. *Journal of General and Applied Microbiology*, 31, 403-409.
- Rollan, G., de Nadra, M.C.M., Holgado, P.R., Oliver, G. (1988) Aspartate aminotransferase of *Lactobacillus murinus*. *Folia Microbiologica*, 33, 344-348.
- Roudot-Algaron, F., Yvon, M. (1998) Le catabolisme des acides aminés aromatiques et des acides aminés à chaîne ramifiée chez *Lactococcus lactis*. *Lait*, 78, 23-30.
- Sanders, J.W., Leenhouts, K., Burghoorn, J., Brands, J.R., Venema, G., Kok, J. (1998) A chloride-inducible acid resistance mechanism in *Lactococcus lactis* and its regulation. *Molecular Microbiology*, 27, 299-310.
- Sandine, W.E., Elliker, P.R. (1970) Microbially induced flavors in fermented dairy products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 18, 557.
- Savijoki, K., Ingmer, H., Varmanen, P. (2006) Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71, 394-406.
- Schütte, H., Hummel, W., Kula, M.R. (1984) L-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase-a new enzyme from *Lactobacillus confusus* for the stereospecific reduction of 2-ketocarboxylic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 19, 167-176.
- Smit, G., Smit, B.A., Engels, W.J. (2005) Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 591-610.
- Stratton, J.E., Hutkins, R.W., Sumner, S.S., Taylor, S.L. (1992) Histamine and histamine-producing bacteria in retail Swiss and low-salt cheeses. *Journal of Food Protection*, 55, 435-439.
- Straub, B.W., Kicherer, M., Schilcher, S.M., Hammes, W.P. (1995) The formation of biogenic amines by fermentation microorganisms. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A*, 201, 79-82.
- Tamime, A.Y., Deeth, H.C. (1980) Yogurt: technology and biochemistry. *Journal of Food Protection*, 43, 939.
- Tammam, J.D., Williams, A.G., Noble, J., Lloyd, D. (2000) Amino acid fermentation in non-starter *Lactobacillus* spp. isolated from Cheddar cheese. *Letters in Applied Microbiology*, 30, 370-374.
- Tanous, C., Kieronczyk, A., Helinck, S., Chambellon, E., Yvon, M. (2002) Glutamate dehydrogenase activity: a major criterion for the selection of flavour-producing lactic acid bacteria strains. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82, 271-278.
- Taylor, S.L., Keefe, T.J., Windham, E.S., Howell, J.F. (1982) Outbreak of histamine poisoning associated with consumption of Swiss cheese. *Journal of Food Protection*, 45, 455-457.
- ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H.M., Huis in't Veld, J.H. (1990) Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 11, 73-84.
- Thompson, A., Griffin, H., Gasson, M.J. (2002) Characterization of an alanine racemase gene from *Lactobacillus reuteri*. *Current Microbiology*, 44, 246-250.
- Tucker, J.S., Morgan, M.E. (1967) Decarboxylation of α -keto acids by *Streptococcus lactis* var. *maltigenes*. *Applied Microbiology*, 15, 694-700.
- Ueno, Y., Hayakawa, K., Takahashi, S., Oda, K. (1997) Purification and characterization of glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis* IFO 12005. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 61, 1168-1171.
- Urbach, G. (1995) Contribution of lactic acid bacteria to flavor compound formation in dairy products. *International Dairy Journal*, 5, 877-903.
- Vanderslice, P., Copeland, W.C., Robertus, J.D. (1986) Cloning and nucleotide sequence of wild type and a mutant histidine decarboxylase from *Lactobacillus* 30a. *Journal of Biological Chemistry*, 261, 15186-15191.
- Vangtal, A., Hammond, E.G. (1986) Correlation of the flavor characteristics of Swiss-type cheeses with chemical parameters. *Journal of Dairy Science*, 69, 2982-2993.
- van Kranenburg, R., Kleerebezem, M., Vlieg, J.V., Ursing, B.M., Boekhorst, J., Smit, B.A., Ayad, E.H., Smit, G., Siezen, R.J. (2002) Flavour formation from amino acids by lactic acid bacteria: predictions from genome sequence analysis. *International Dairy Journal*, 12, 111-121.
- Voight, M.N., Eitenmiller, R.R. (1978) Role of histidine and tyrosine decarboxylases and mono- and diamine oxidases in amine buildup in cheese. *Journal of Food Protection*, 41, 182-186.
- Weimer, B., Seefeldt, K., Dias, B. (1999) Sulfur metabolism in bacteria associated with cheese. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76, 247-261.
- Wilkins, D.W., Schmidt, R.H., Kennedy, L.B. (1986) Threonine aldolase activity in yogurt bacteria as determined by headspace gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34, 150-152.
- Williams, A.G., Noble, J., Banks, J.M. (2001) Catabolism of amino acids by lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 11, 203-215.
- Yokoyama, M.T., Carlson, J.R. (1981) Production of skatole and paracresol by a rumen *Lactobacillus* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, 41, 71-76.



Yoshida, Y., Negishi, M., Amano, A., Oho, T., Nakano, Y. (2003) Differences in the betaC-S lyase activities of viridans group streptococci. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 300, 55-60.

Yvon, M., Thirouin, S., Rijnen, L., Fromentier, D., Gripon, J.C. (1997) An aminotransferase from *Lactococcus lactis* initiates conversion of amino acids to cheese flavor compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 414-419.

Yvon, M., Rijnen, L. (2001) Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *International Dairy Journal*, 11, 185-201.

Zoon, P., Allersma, D. (1996) Eye and crack formation in cheese by carbon dioxide from decarboxylation of glutamic acid. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 50, 309-318.

Zúñiga, M., Champomier-Verges, M., Zagorec, M., Pérez-Martínez, G. (1998) Structural and functional analysis of the gene cluster encoding the enzymes of the arginine deiminase pathway of *Lactobacillus sake*. *Journal of Bacteriology*, 180, 4154-4159.

Autori / Authors

Nuša Jelovac
Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Pierottijeva 6

Anamarija Perković
Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Pierottijeva 6

Marina Pupovac
Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Pierottijeva 6

Antonija Trontel, dipl. ing.
Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Pierottijeva 6

Dr. sc. Anita Slavica, doc.
Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Pierottijeva 6