

UDK 579.864.1:579.24
ISSN 0352-9193

Izvorni znanstveni rad

Rast bakterije *Lactobacillus brevis* i simultana proizvodnja metabolita u različitim podlogama

Growth of Bacteria *Lactobacillus brevis* and Simultaneous Production of Metabolites in Different Media

Vesna Stehlik-Tomas i S. Grba

Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb

Primljeno: 20.10.1993.

Prihvaćeno: 30.12.1994.

Sažetak

U ovom je radu istražen rast i fermentativna sposobnost bakterije *Lactobacillus brevis*. Da bi se proizvele visokoaktivne starter-kulture za pekarstvo, proveden je uzgoj bakterije *L. brevis* u podlozi sa sladnim ekstraktom (40 g/L) i u podlogama istog osnovnog sastava uz dodatak kvašćeva ekstrakta, kazein hidrolizata i mesnog ekstrakta kao izvora vitamina, proteina i aminokiselina te uz dodatak mineralnih tvari.

Eksperimenti prikazani u ovom radu pokazuju da se sladni ekstrakt može koristiti kao osnovni supstrat u proizvodnji bakterije *L. brevis*. Međutim, dobiveni rezultati potvrđuju da dodatak ispitivanih hranjivih i mineralnih tvari uvelike utječe na brzinu rasta bakterije *L. brevis*, a i na brzinu proizvodnje metabolita.

Najveća specifična brzina rasta postignuta je kada je osnovna podloga bila obogaćena kalij-hidrogen-fosfatom, magnezij-sulfatom i kvašćevim ekstraktom (0,77 l/h), dok je proizvodnja mliječne kiseline i hlapljivih kiselina postigla najveću vrijednost kada je uzgoj bakterije *L. brevis* proveden u podlozi obogaćenoj kalij-hidrogen-fosfatom i natrij-acetatom.

Summary

This study presents the investigation of growth and fermentation activity of *Lactobacillus brevis* bacteria. With the aim of producing highly active starter-cultures for the bakery industry, bacteria *L. brevis* was cultivated in the medium of malt extract (40 g/L) and in media based on malt extract supplemented with yeast extract, casein peptone, meat extract and addition of minerals.

The experiment led to the conclusion that the malt extract may be used as basic substrate for the production of *L. brevis*. It appears that the growth of bacteria *L. brevis*, as well as the metabolites production, depend to a large extent on the composition of the medium used.

The most satisfying specific growth rate was achieved when the medium was enriched with potassium hydrogen phosphate, magnesium sulphate, and yeast extract (0.77 l/h). On the other hand, the production of metabolites, lactic and acetic acid, was higher when the medium was enriched with potassium hydrogen phosphate and sodium acetate.

Uvod

Danas se u svim razvijenim zemljama, a i u Hrvatskoj, proizvodi stabilan kvasac dobre kakvoće koji zadovoljava suvremene postupke brzog zamjesa i kratke fermentacije u proizvodnji kruha. Naime, visokoaktivni pekarski kvasac omogućuje brzo stvaranje CO₂, tj. kratki proces dizanja tijesta. I pored svih prednosti takva brza postupka u proizvodnji kruha, kakvoća gotova proizvoda ne zadovoljava u potpunosti zahtjeve potrošača.

Da bi se poboljšala kakvoća pekarskih proizvoda, istraživači su obavili inokulaciju tijesta odabranim mikroorganizmima (bakterijama i/ili kvascima) koji ubrzavaju proizvodnju metabolita i tako pridonose poboljšanju okusa i mirisa proizvoda. Prednost procesa u kojem

se upotrebljava kiselo tijesto od raženog i pšeničnog brašna u pripravi gotovih proizvoda utvrdili su mnogi istraživači (1-4). Posebna pozornost usmjerena je na uporabu bakterija iz roda *Lactobacillus* u mješovitim kulturama s kvascima (2,3). Primjena tih kultura došla je do izražaja u proizvodnji raženog kruha, peciva i slastica (panetona).

Od *Lactobacillus* vrsta za kiseljenje tijesta primjenjuju se homofermentativne i heterofermentativne vrste. Drži se da bakterija *L. plantarum* od homofermentativnih bakterija ima najveće značenje u pripravi kiselih tijesta (2). Međutim, zbog važnosti proizvodnje smjese metabolita (mliječna i octena kiselina, ugljik-(IV)-oksid) značajnije su heterofermentativne bakterije od kojih treba spome-

nuti bakterije *L. brevis* i *L. sanfrancisco* (3). Naime, kiseljenjem tijesta navedenim bakterijama sintetiziraju se aromatične supstancije i prekursori arome, poboljšavaju se svojstva tijesta, tj. njegova elastičnost, što se očituje u boljoj strukturi kore kruha, aromatičnijem okusu, produljenju trajnosti te smanjenju mrvljenja i kvarenja kruha (5).

Istraživači posebno naglašavaju važnost primjene bakterije *L. brevis* u kiseljenju tijesta (6-8). Naime, dodatkom vode u tijesto aktiviraju se amilaze brašna čime počinje razgradnja škroba do maltoze. Kako bakterija *L. brevis* vrlo dobro asimilira maltozu, prisutnosti fiziološki aktivne bakterije *L. brevis* u starter-kulturi omogućuje fermentaciju maltoze do osnovnih kiselina, mliječne i octene, koje gotovom proizvodu daju potrebnu aromu i svježinu.

Da bi se proizvođače pekarskih proizvoda moglo opskrbiti aktivnim mikrobnim kulturama, važan je odabir podloge prikladne za uzgoj fiziološki aktivne starter-kulture, koja u fermentaciji tijesta utječe na snižavanje pH-vrijednosti, proizvodnjom mliječne kiseline i hlapljivih kiselina (u najvećoj mjeri octene) u željenom mase-nom omjeru (4:1). U ovom je radu za pripravu startera odabrana podloga na bazi sladnog ekstrakta, a kao starter-kultura upotrijebljena bakterija *L. brevis*. Sladni ekstrakt sadržava oko 70 % fermentabilnih šećera, a bogat je aminokiselinama i vitaminima, tvarima prijeko potrebnim za dobar rast bakterije *L. brevis* (9). Dodatak tvari za stimulaciju rasta bakterije *L. brevis* u osnovnu podlogu utječe na dobar puferski sustav, što nakon uzgoja omogućuje održavanje starter-kulture dulje vrijeme u aktivnom fiziološkom stanju (10).

Materijal i metode rada

Radni mikroorganizam

U radu je primijenjena liofilizirana kultura bakterije *L. brevis*, označene pod brojem 62, dobivena iz Laboratorija CHR HANSENS' (Danska). Kultura je reaktivirana i održavana u modificiranoj MRS- podlozi (naziv podloge uzet je prema početnim slovima autora) (9). Glukoza je zamijenjena istom količinom maltoze. Bakterija *L. brevis* čuvana je na čvrstoj MRS-podlozi s 15 g/L Difco-agara. MRS-podloga pripremljena je otapanjem 20 g maltoze, 10 g kazein hidrolizata, 10 g kvasčeva ekstrakta, 5 g kalij-hidrogenfosfata, 2 g amonij-citrata, 2 g natrij-acetata, 0,05 g mangan-sulfata, 2 g magnezij-sulfata, 1 g Tween 80 i 15 g agara u destiliranoj vodi i dopunjena do 1 L, a pH-vrijednost otopine bila je 6,5.

Priprema cjepiva

S kosog agara kultura *L. brevis* precijepljena je u epruvete koje su sadržavale po 10 mL tekuće sterilne modificirane MRS-podloge. Inkubacija je provedena u termostatskoj komori pri 37 °C tijekom 24 h.

Priprema podloge i uzgoj bakterije *L. brevis*

Uzgoj je proveden u podlogama na bazi sladnog ekstrakta uz dodatak hranjivih i mineralnih tvari potrebnih za stimulaciju rasta kulture *L. brevis*. Sastav podloga za uzgoj prikazan je u tablici 1. Uzgoj je proveden u Erlenmeyerovim tikvicama od 500 mL (s 200 mL podloge), u termostatu pri 37 °C tijekom 24 sata.

Tablica 1. Podloge za uzgoj bakterija *L. brevis*
Table 1. Media for the growth of bacteria *L. brevis*

Podloga Medium	Sastojci Ingredient	γ (Masekoncentracija) Mass concentration g/L
Osnovna podloga (podloga 1) Basic medium (medium 1)	Sladni ekstrakt Malt extract	40
Podloga 2 Medium 2	Sladni ekstrakt Malt extract K_2HPO_4 $MgSO_4 \cdot 4H_2O$	40 2,0 2,0
Podloga 3 Medium 3	Sladni ekstrakt Malt extract K_2HPO_4 $CH_3 \cdot COONa$	40 2,0 2,0
Podloga 4 Medium 4	Sladni ekstrakt Malt extract Kvasčev ekstrakt Yeast extract K_2HPO_4 $MgSO_4 \cdot 4H_2O$	40 5,0 2,0 2,0
Podloga 5 Medium 5	Sladni ekstrakt Malt extract Kazein hidrolizat Casein peptone Mesni ekstrakt Meat extract Kvasčev ekstrakt Yeast extract CH_3COONa	40 10 10 5 2,0

Analitičke metode

Hlapljive kiseline mjerene su metodom po Muštroviću (11). Slobodna mliječna kiselina određivana je metodom po Gregu (12). Broj živih bakterija tijekom uzgoja praćen je brojenjem kolonija izraslih u Petrijevim zdjelicama na čvrstoj MRS-podlozi. Nakon 48 sati inkubacije pri 30 °C izbrojene su izrasle kolonije, što je preračunano na broj živih bakterija u mililitru komine.

Prirast broja bakterija izračunan je prema izrazu:

$$\Delta N = N_t - N_0 \text{ gdje je,}$$

N_t – broj bakterija nakon 24 sati uzgoja
u 1 mL komine

N_0 – početni broj bakterija u 1 mL komine

Maksimalna specifična brzina rasta izračunana je u eksponencijalnoj fazi rasta prema izrazu:

$$\mu_{\max} = \frac{\ln(N_2 - N_1)}{t_2 - t_1} \text{ gdje je,}$$

N_2 – broj bakterija u 1 mL komine na kraju eksponencijalne faze rasta

N_1 – broj bakterija u 1 mL komine na početku eksponencijalne faze rasta

t_2 – vrijeme na kraju eksponencijalne faze rasta

t_1 – vrijeme na početku eksponencijalne faze rasta

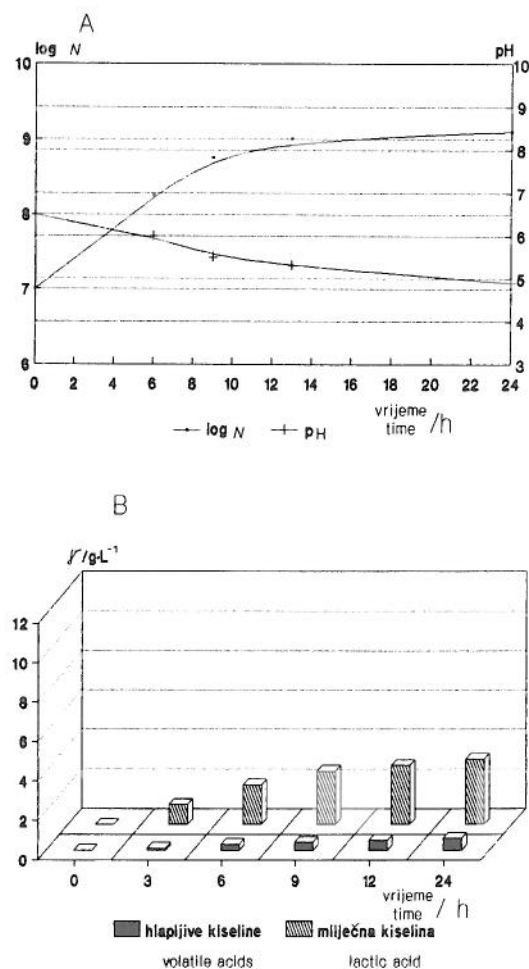
Rezultati i rasprava

Sladni je ekstrakt izabran za umnožavanje bakterije *L. brevis* jer je to relativno jeftina, a po sastavu kompleksna podloga, koja kao osnovni šećer sadržava maltozu. Neki autori (13) navode da bakterija *L. sanfrancisco* i neke druge heterofermentativne bakterije dobro previru maltozu. Kako danas genetičari drže da je *L. sanfrancisco* identičan bakteriji *L. brevis* var. *lindneri*, a po fiziološkim značajkama sličan temeljnoj bakteriji *L. brevis*, ta je bakterija odabrana u ovom radu. Osnovni cilj rada bio je odrediti kinetiku rasta bakterije *L. brevis* na podlozi koja kao osnovni sastojak sadržava sladni ekstrakt te optimirati tu podlogu za proizvodnju starter-kulture u pekarstvu.

Na slici 1 prikazan je rast bakterije *L. brevis* u podlozi koja je sadržavala samo sladni ekstrakt (osnovna podloga). Budući da sladni ekstrakt, osim fermentabilnih šećera, sadržava i različite aminokiseline (9,14), postignut je dobar rast stanica bakterije *L. brevis* ($9,1 \times 10^9$ /mL komine). Međutim, mali prinosi mliječne kiseline (3,6 g/L) i hlapljivih kiselina (0,6 g/L) nakon provedene fermentacije tijekom 24 sata upućuju na nedovoljno fiziološki aktivnu starter-kulturu. Da bi se povećala brzina rasta bakterije *L. brevis* i poboljšala njezina fermentativna aktivnost, osnovna je podloga bila obogaćena dodacima koji, prema literaturnim podacima, pospješuju rast bakterija mliječno-kiselog vrenja (9,14).

Osnovni pokazatelji kinetike rasta bakterije *L. brevis* i proizvodnje metabolita u različitim podlogama nakon 24 sata submerznog uzgoja u Erlenmeyerovim tikvicama (500 mL) pri 37 °C prikazani su u tablici 2.

Kako je vidljivo iz tablice 2, već dodatak anorganskog fosfata i prisutnosti kationa (Mg^{+2}) povoljno utječu na brzinu rasta bakterije *L. brevis*, a još više na proizvodnju metabolita (podloga 2). To potvrđuje nalaze nekih autora koji drže da je za dobar rast bakterija roda *Lactobacillus* potrebna prisutnost kationa Mg^{+2} , Mn^{+2} , Fe^{+2} i izvora anorganskog fosfata (14). U skladu s tim dodatkom kalij-hidrogenfosfata i natrij-acetata (podloga 3, tablica 2) još više je pospješena proizvodnja mliječne kiseline i hlapljivih



Slika 1. Krivulja rasta, promjena pH-vrijednosti (A) i proizvodnja metabolita (B) tijekom uzgoja bakterije *L. brevis* u osnovnoj podlozi (sladni ekstrakt 40 g/L)

Fig. 1. Growth rate, changes of pH value (A) and production of metabolites (B) during cultivation of bacteria *L. brevis* in basic medium (malt extract 40 g/L).

Tablica 2. Pregled rezultata za ocjenu rasta i fiziološke aktivnosti bakterije *L. brevis*
Table 2. Review of results for estimation of the physiological state of *L. brevis* bacteria

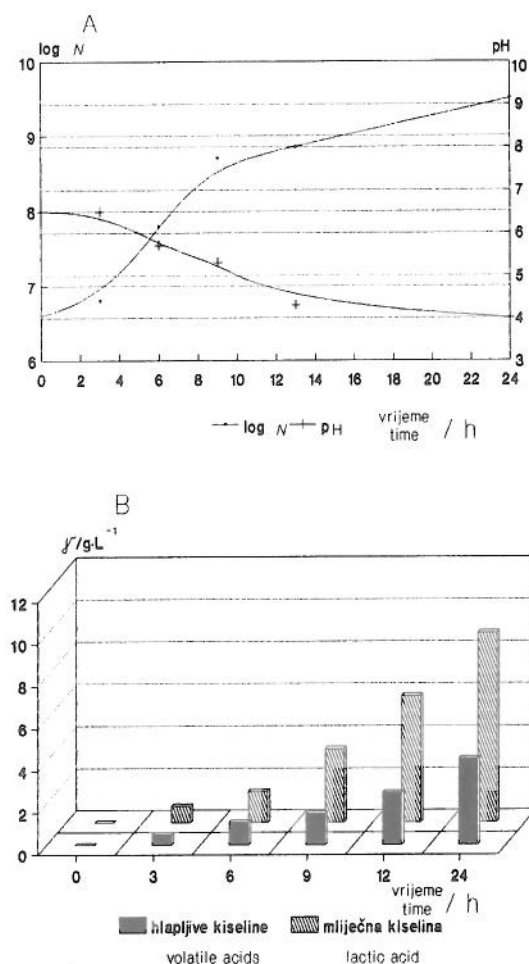
Podloga* Medium	Proizvodnja metabolita tijekom 24 h Metabolite production for 24 h		c (stanica cell) L
	γ (mliječna kiselina) lactic acid	γ (hlapljive kiseline) volatile acids	
	g/L	g/L	
Osnovna podloga (podloga 1) Basic medium (medium 1)	3,3	0,6	$1,6 \times 10^9$
Podloga 2 Medium 2	5,9	0,8	$1,9 \times 10^9$
Podloga 3 Medium 3	10,5	3,6	$2,1 \times 10^9$
Podloga 4 Medium 4	8,2	0,7	$3,9 \times 10^9$
Podloga 5 Medium 5	8,2	2,2	$3,2 \times 10^9$

*Sastav podloga prikazan je u tablici 1
Media composition is shown in Table 1

kiselina, a također je bio veći prirast stanica. Naime, kalij-hidrogenfosfat i natrij-acetat utječu na veličinu stanica a time i na fiziološku aktivnost, čime se mogu objasniti dobri rezultati dobiveni fermentacijom bakterije *L. brevis* u toj podlozi (14).

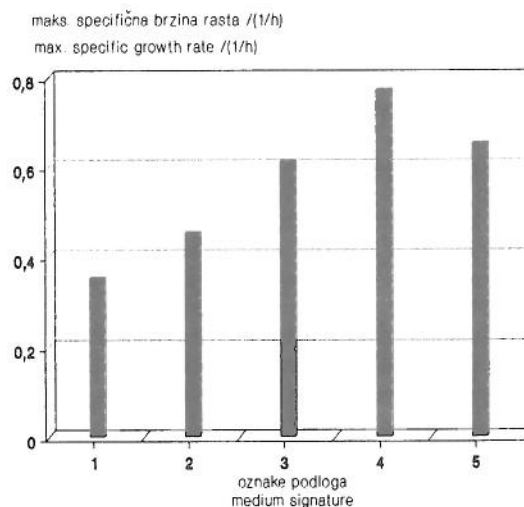
Poznato je da kvašćev ekstrakt koji sadržava različite vitamine i aminokiseline pospješuje rast većine mikroorganizama (9). Da bi se to provjerilo u ovom radu, u podlogu 4 dodani su kvašćev ekstrakt te kalij-hidrogen fosfat i magnezijeve soli. Rezultati uzgoja bakterije na tako obogaćenoj podlozi prikazani su na slici 2 i u tablici 2.

Vidljivo je da je na tako obogaćenoj osnovnoj podlozi postignut maksimalan rast bakterije *L. brevis* pri čemu je na kraju uzgoja (24 h) postignuta koncentracija stanica od $9,6 \times 10^9$ /mL komine. Međutim, prinosi mliječne kiseline, a napose hlapljivih kiselina, bili su nešto niži nego u podlozi 3. Dobiveni rezultati potvrđuju literaturne podatke da je za optimalan rast bakterije *L. brevis* bilo



Slika 2. Krivulja rasta, promjena pH-vrijednosti (A) i proizvodnja metabolita (B) tijekom uzgoja bakterije *L. brevis* u osnovnoj podlozi uz dodatak kvašćeva ekstrakta, kalij-hidrogenfosfata i magnezij-sulfata (podloga 4).

Fig. 2. Growth rate, changes of pH value (A) and production of metabolites (B) during cultivation of bacteria *L. brevis* in medium with addition of yeast extract, potassium phosphate, and magnesium sulphate (medium 4).



Slika 3. Utjecaj sastava podloge na specifičnu brzinu rasta bakterije *L. brevis*. (Sastav podloga 1-5 prikazan je u tablici 1.).

Fig. 3. Influence of medium composition on the specific growth rate of bacteria *L. brevis*. (Compositions of media 1-5 is shown in Table 1)

potrebno osigurati dodatni izvor vitamina i aminokiselina u obliku kvašćeva ekstrakta.

Također je praćen rast i proizvodnja metabolita bakterije *L. brevis* u podlozi kojoj je osim kvašćeva ekstrakta dodan kazein hidrolizat i mesni ekstrakt (podloga 5, tablica 2). Iako je ta podloga sadržavala više izvora vitamina, aminokiselina i proteina nego podloga 4, nije postignut veći prirast stanica, ali je prinos hlapljivih kiselina bio bolji. Bolji rast bakterije *L. brevis* u podlozi 4 može se objasniti činjenicom što je tijekom fermentacije pad pH-vrijednosti tekao sporije u usporedbi s njezinim smanjenjem u podlozi 5 pa je postignut i bolji rast bakterije *L. brevis*. Dodatak kalij-hidrogenfosfata u podlogu 4 svojim puferskim svojstvima utjecao je na sporiji pad pH-vrijednosti podloge. Maksimalna specifična brzina rasta bakterije *L. brevis* postignuta je kada je pH pao do 5,5 (0,77 1/h). Naime, potvrđeno je da bakterije roda *Lactobacillus* najbolje rastu u slabo kiselom mediju (pH do 5,5) (8,15).

Utjecaj sastava podloge na specifičnu brzinu rasta bakterije *L. brevis* sažeto je prikazan histogramski na slici 3.

Na slici 3 također se vidi da dodatak stimulatora rasta u podlogu znatno povećava specifičnu brzinu rasta bakterije *L. brevis*, što je u suglasnosti s literaturnim navodima (9,14), te da je najveća vrijednost (0,77 1/h) postignuta u podlozi 4. Prethodnim istraživanjima utvrđeno je da se, u istim uvjetima uzgoja kao u ovom radu, u MRS-podlozi postiže maksimalna specifična brzina rasta bakterije *L. brevis* od 1,02 1/h (16). Međutim, to je bogata podloga složena kemijskog sastava i vrlo je skupa.

Postignuti rezultati pokazuju da su (unatoč optimalnom rastu bakterije *L. brevis* u podlozi 4) podloge 3 i 5 prikladnije za pripremu starter-kulture za pekarstvo jer omogućuju dobar rast i željenu fiziološku aktivnost bakterije *L. brevis*. Naime, u spomenutim podlogama (3 i 5),

koje su kudikamo jeftinije od MRS-podloge, postiže se optimalan odnos mliječne kiseline i hlapljivih kiselina uz zadovoljavajući rast bakterije *L. brevis*, što je potpuno u suglasju s literaturnim podacima (1,4,8) i zahtjevima pekarske industrije za proizvodnju panetona i raženog kruha (4,18).

S umnoženom biomasom bakterije *L. brevis* u podlozi 3 provedena je fermentacija tijesta radi provjere njezine fiziološke aktivnosti. Za usporedbu provedena je fermentacija tijesta s umnoženom biomasom bakterije *L. brevis* u MRS-podlozi (20). Rezultati su pokazali vrlo dobru fiziološku aktivnost bakterije umnožene u podlozi 3. Naime, postignuti su dobri prinosi mliječne i hlapljivih kiselina u željenom omjeru. Utvrđeno je također da su prinosi mliječne i hlapljivih kiselina inokulacijom tijesta s biomasom iz MRS-podloge bili samo viši 5–10 %.

Zaključak

Prema postignutim rezultatima može se zaključiti da je podloga na bazi sladnog ekstrakta (40 g/L) prikladna za uzgoj bakterije *L. brevis*. Međutim, za uzgoj te bakterije kao starter-kulture u pekarstvu tu je podlogu bilo prijeko potrebno optimirati. Dodatkom kvasčeva ekstrakta postignut je bolji rast bakterije *L. brevis*, ali ne i zadovoljavajuća proizvodnja metabolita. Daljnjim obogaćivanjem podloge, dodatkom stimulatora rasta u obliku kazein hidrolizata i mesnog ekstrakta, postignut je još brži rast i zadovoljavajuća proizvodnja metabolita. Najbolja proizvodnja metabolita postignuta je u podlozi koja je osim sladnog ekstrakta (40 g/L) sadržavala kalij-hidrogenfosfat (2 g/L) i natrij-acetat (2 g/L). Dobra fiziološka aktivnost uzgojene kulture te zadovoljavajuća kinetika rasta bakterije *L. brevis* uputili su na konačnu ocjenu da je ta podloga prikladna za uzgoj starter-kulture u pekarstvu. Mogućnost zamjene kompleksne i skupe MRS-podloge s jeftinijom podlogom na bazi sladnog ekstrakta uz dodatak kalij-hidrogenfosfata i Na-acetata pridonosi ekonomičnosti proizvodnje pekarskih proizvoda s pomoću starter-kultura.

Extended Abstract

For the cultivation of *L. brevis* bacteria, malt extract was chosen as a basic substrate, because it is relatively cheap. On the other hand, this medium is not rich enough in vitamins and aminoacids, components which are considered to be very important for the growth of bacteria.

For this reason the cultivation kinetics of bacteria used in malt extract medium supplemented with yeast extract which contains vitamins, aminoacids and added mineral was investigated. The cultivation of *L. brevis* bacteria has been conducted under anaerobic conditions at 37 °C. Results in Fig. 1 show the possibility of using malt extract medium as the basic substrate for the production of *L. brevis* bacteria. The results of cultivation in media 2-5 proved that the growth of bacteria *L. brevis* as well as the metabolite production depended to a large extent on the different components of the basic medium.

Namely, the components which have been used for the enrichment of malt extract medium improved considerably the growth kinetic of bacteria *L. brevis* and the production of metabolites (lactic acid and volatile acids). The most satisfying specific growth rate was achieved when the medium was enriched with potassium hydrogen phosphate, magnesium sulphate and yeast extract. On the other hand, the production of metabolites, lactic acid and volatile acids, were higher when the medium was enriched with potassium hydrogen phosphate and sodium acetate.

The results presented in this paper show that malt extract could be used as the basic substrate for the production of bacteria *L. brevis*. Also it is important to point out that the optimal physiological state of used bacteria can be achieved when medium was enriched with potassium hydrogen phosphate and sodium acetate.

Literatura

1. G. Spicher, Z. *Lebensm. Unters.-Forsch.* 184 (1987) 300.
2. S. Barber, M. J. Torer, M. A. Martinez-Anaya, C. Benedito de Barber, Z. *Lebensm. Unters.-Forsch.* 189 (1989) 6.
3. M. A. Martinez-Anaya, C. Benedito de Barber, Z. *Lebensm. Unters.-Forsch.* 190 (1990) 126.
4. G. Spicher, *Microbial Interactions in Sourdough Bread Fermentation*, Proc. IV ISME, Schnitzenberg (1986) 277.
5. A. Vollmar, F. Meuser, *Cereal Chem.* 69 (1992) 20.
6. M. Infantes, C. Tourneur, *Sci. Aliment.* 11 (1991) 527.
7. M. Azar, N. Ter-Sarkissan, H. Ghavifer, T. Ferguson, H. Glaseni, J. *Food. Sci. Technol.* 14 (1977) 241.
8. G. Spicher, R. Schroeder, Z. *Lebensm. Unters.-Forsch.* 167 (1978) 342.
9. J. C. de Man, Rogosa, H. E. Sharpe, *Appl. Bacteriol.* 3 (1960) 130.
10. B. Antuna, H. Mack, W. Rocken, *Progress in Food Fermentation*, Proceedings of Food Chem VII, Vol. 1 Valencia, Spain (1993) str. 308-313.
11. S. Muštrović: *Vinarstvo s ekonomijom i mikrobiologijom*, Privredni pregled Beograd (1985) str. 624-625.
12. V. Greg: *Navody k praktickemu cviceni z kvasne technologie*, Statni Nakladatelství Technické Literatury, Praha (1958) str. 294-295.
13. R. W. Berg, W. E. Sandire, A. W. Anderson, *Appl. Environ. Microbiol.* 42 (1981) 786.
14. D. V. Ledesma, A. P. de Ruiz Holgards, G. Oliver, G. S. de Giorgi, P. Raibanol, J. V. Galpin, J. *Appl. Bacteriol.* 42 (1977) 123.
15. O. Kandler, N. Weiss, *Genus Lactobacillus*. U: »Bergey's Manual of Systematic Bacteriology«. Vol. 2, Williams, Wilkins (ured.), Baltimore, (1986) str. 1209-1234.
16. V. Kovač, Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Zagreb (1993) 55.
17. J. H. Kruger, *Proceeding of the European Conference, Starter Cultures for the Baking Industry*, London (1988) str. 11.
18. H. Stephan, *Allgem. Backer*, 40 (1985) 3.
19. H. Wultzel, *Brot Gebäck* (1954) 198.
20. S. Kordić, Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Zagreb (1992) 35.