

Antimikrobna aktivnost *Lactobacillus acidophilus*

Jagoda Šušković, Maša Krobot, Milena Mehak i S. Matošić

Izvorni znanstveni rad — Original scientific paper

UDK: 637.146.35

Sažetak

Lactobacillus acidophilus se često spominje kao djelotvoran prehrambeni dodatak. Ovaj organizam posjeduje svojstva koja mu omogućavaju preživljavanje i rast u intestinalnom traktu. Posebna pozornost mu se posvećuje zbog inhibicijskog djelovanja na patogene mikroorganizme koji se obično pojavljuju u hrani.

U ovom radu je proučen utjecaj različitih hranjivih podloga na antimikrobnu aktivnost *L. acidophilus*. Hranjive podloge, MRS i APT, sa i bez dodatka kalcij karbonata (za vezanje nastale mliječne kiseline), korištene su za rast *L. acidophilus*. Proučena je antimikrobna aktivnost cjelokupne podloge sa stanicama supernatanta iz kojeg su uklonjene stanice, te dijalizata kulture *L. acidophilus*, prema enteropatogenim mikroorganizmima (*Staphylococcus aureus* 3048, *Staph. aureus* K-144, *Salmonella mummy*, *Escherichia coli*) i prema sporogenim bakterijama *Bacillus subtilis* i *Bacillus cereus*. Najbolji rast i najveća antimikrobna aktivnost su postignuti u MRS podlozi nakon 48 sati uzgoja. Najosjetljiviji mikroorganizmi su bili *Salmonella mummy*, *Escherichia coli* i *Bacillus subtilis*.

Riječi natuknice: Antimikrobna aktivnost *Lactobacillus acidophilus*, *L. acidophilus* kao prehrambeni dodatak, bakteriocini, antibakterijske tvari.

Uvod

Lactobacillus acidophilus je jedna od najčešće proučavanih bakterija mliječne kiseline koja je zastupljena u gastrointestinalnom traktu čovjeka gotovo u najvećem broju. U organizam se unosi zajedno s drugim bakterijama mliječne kiseline putem fermentiranih mliječnih proizvoda i ostalih namirnica.

Proizvodnjom antimikrobnih supstanci, kao što su različiti proizvodi metabolizma, mliječna kiselina i tvari slične antibiotiku (antibiotic-like substances), tj. proteini s baktericidnim djelovanjem, nazvani bakteriocini, kontroliraju razmnožavanje nepoželjnih crijevnih patogenih mikroorganizama.

Još 1908. god., kao razlog dugovječnosti Bugara Metchnikoff (1908) navodi konzumaciju mliječnih proizvoda fermentiranih pomoću bakterije *Lactobacillus bulgaricus*. Spomenuo je i upotrebu bakterija mliječne kiseline kao prehrambenih dodataka. Poželjne karakteristike koje ti mikroorganizmi moraju imati da bi se mogli koristiti kao prehrambeni dodaci su:

1) poželjno je da budu uobičajeni mikroorganizmi probavnog trakta zdrave osobe

2) u probavnom traktu moraju biti otporni na žučne kiseline, preživjeti pri relativno niskim pH vrijednostima i niskim vrijednostima površinske napetosti

Rad iznijet na XXX. Simpoziju za mljekarsku industriju, održanom u Zagrebu, 1992. godine

medija, a moraju se prilagoditi i na brzinu i učestalost prolaska hrane kroz probavni trakt (Gilliland, 1979; Gilliland, 1990).

Mogućnost primjene *L. acidophilus* su mnogostruke. Prehrambeni proizvodi i preparati u kojima je prisutna ova bakterija koriste se protiv pojava raznih crijevnih upala, upale mokraćnih puteva koje uzrokuje patogena *E. coli*, mogu poboljšati metabolizam laktoze u osoba koje nemaju mogućnost sinteze enzima laktaze, reguliraju razinu holesterola u krvi, te djeluju protiv nastajanja tumora debelog crijeva (Gilliland i Speck, 1977; Wilkelstein, 1955; Lin et al. 1991).

Iako su mnoge antibiotske i bakteriocinske supstancije *L. acidophilus* već opisane, do danas se još ni jedna industrijski ne proizvodi. Vjerojatni razlog je taj što se često postupcima pročišćavanja smanjuje antimikrobna aktivnost ovakvih supstanci čemu pridonosi i nepotpuno poznavanje strukture odnosno, mehanizma sinteze prirodnih antimikrobnih supstancija. Prirodne antimikrobne supstancije koje proizvodi *L. acidophilus* navode se u Tablici 1 (Fernandes et al. 1987).

Tablica 1. Prirodne antimikrobne supstancije *L. acidophilus*

Table 1. Natural antimicrobial substances of *L. acidophilus*

Vrsta Strain	Supstancije Substances	Literatura References
<i>L. acidophilus</i>	acidolin acidofilin laktocidin (lactocidin) bakteriocin (bacteriocin) protein	Hamdan i Mikolajcik, 1974. Shanani et al. 1977. Vincent et al. 1959. Barefoot i Klaenhammer, 1983. Barefoot i Klaenhammer, 1984. Mehta et al. 1984.

Ove antimikrobne supstancije proteinskog su karaktera, međusobno se razlikuju po-spektru inhibicijske aktivnosti, načinu djelovanja, molekularnoj masi, osjetljivosti na proteolitičke enzime, pH stabilnosti i toplinskoj stabilnosti, a izolirane su iz različitih sojeva *L. acidophilus*.

Cilj ovog rada bio je: istražiti antimikrobnu aktivnost *L. acidophilus* soj 20 079 prema različitim test-mikroorganizmima (isključujući djelovanje mliječne kiseline), te utjecaj hranjive podloge za uzgoj kulture *L. acidophilus* na proizvodnju antimikrobnih supstancija.

Materijal i metode rada

Lactobacillus acidophilus je čuvan pri +4°C u hladnjaku. Precjepljivan je svakih 14 dana na MRS i APT kosi agar uz inkubaciju pri 37°C tijekom 48 sati. Svi upotrijebljeni test mikroorganizmi (*S. aureus* 3048, *S. aureus* K-144, *E. coli* 3014, *Salmonella mumm*, *Bacillus cereus* i *Bacillus subtilis*) održavani su precjepljivanjem svakih 14 dana na hranjivi agar uz inkubaciju pri 37°C tijekom 24 sata. Čuvani su u hladnjaku pri +4°C.

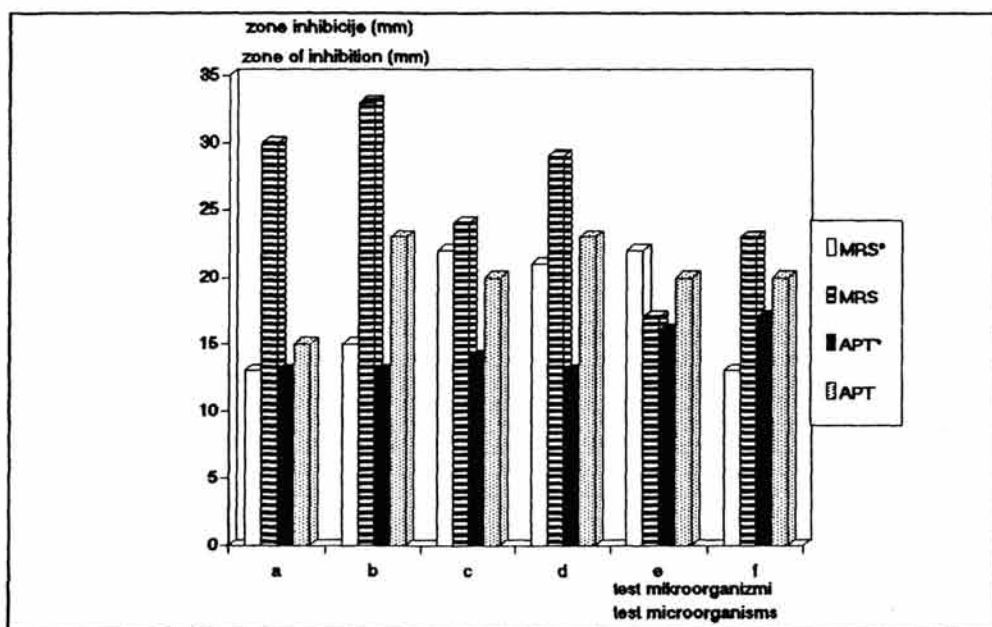
Podloge za uzgoj *L. acidophilus* (MRS, MRS*, APT i APT*) su inokulirane s 20% inokuluma. Kultivacija je trajala 48 sati/37°C na rotacijskoj tresilici pri 25 okr/min.

Za dokazivanje antimikrobne aktivnosti *L. acidophilus* mikrobiološkom metodom difuzije u agar, korištena je podloga ABA (Antibiotic base agar — Biolife).

Obrada uzoraka

a) pripremanje kulture *L. acidophilus*

Nakon uzorkovanja, uzorak se podijeli na tri dijela. Prvom dijelu, kulturi *L. acidophilus* bez ikakve prethodne obrade, odmah se određuje antimikrobna aktivnost. Iz ostala dva dijela se centrifugiranjem pri 6000 okr/min, tijekom 20 minuta, uklone stanice i višak CaCO_3 . Supernatanti se dalje analiziraju.



Slika 1. Antimikrobna aktivnost *Lactobacillus acidophilus* kulture uzgojene u različitim hranjivim podlogama prema različitim test mikroorganizmima (trajanje uzgoja 48 sati)

Figure 1 Antimicrobial activity of *Lactobacillus acidophilus* culture cultivated in different nutrient media against different test microorganisms (duration of cultivation 48 hours)

- a — *Staphylococcus aureus* 3048
- b — *Staphylococcus aureus* K-144
- c — *Salmonella mumm*
- d — *Escherichia coli*
- e — *Bacillus subtilis*
- f — *Bacillus cereus*

b) pripremanje filtrata kulture *L. acidophilus*

Supernatant se sterilno profiltrira kroz membranski mikrofilter (0,22 μm) kako bi se odvojile još eventualno zaostale stanice.

c) pripremanje dijalizata kulture *L. acidophilus*

Potpuno uklanjanje zaostale slobodne mliječne kiseline dijalizom kroz vrećicu za dijalizu (10000 cut off) koja propušta mliječnu kiselinu. Dijalizat se sterilizira filtracijom kroz membranski mikrofilter (0,22 μm). Nakon toga mu se određuje antimikrobna aktivnost.

Rezultati rada i rasprava

Prema istraživanjima mnogih autora (Ten Brink et al. 1990; Barnby-Smith et al. 1989; Fernandes et al. 1988.), sastav hranjive podloge utječe na antimikrobnu aktivnost kulture *L. acidophilus*. Brink i sur. (1990) utvrdili su da je za proizvodnju bakteriocina ili neke od antibiotskih supstanci bakterija mliječne kiseline, uz izvor energije (glukoze) neophodno prisustvo vitamina i aminokiselina. Podloga APT je kao i podloga MRS pogodna za rast laktobacila (Barnby-Smith et al. 1989.), samo što APT podloga sadrži dvostruko manju koncentraciju glukoze od MRS podloge što rezultira i znatno manjom koncentracijom nastale mliječne kiseline (tablica 2).

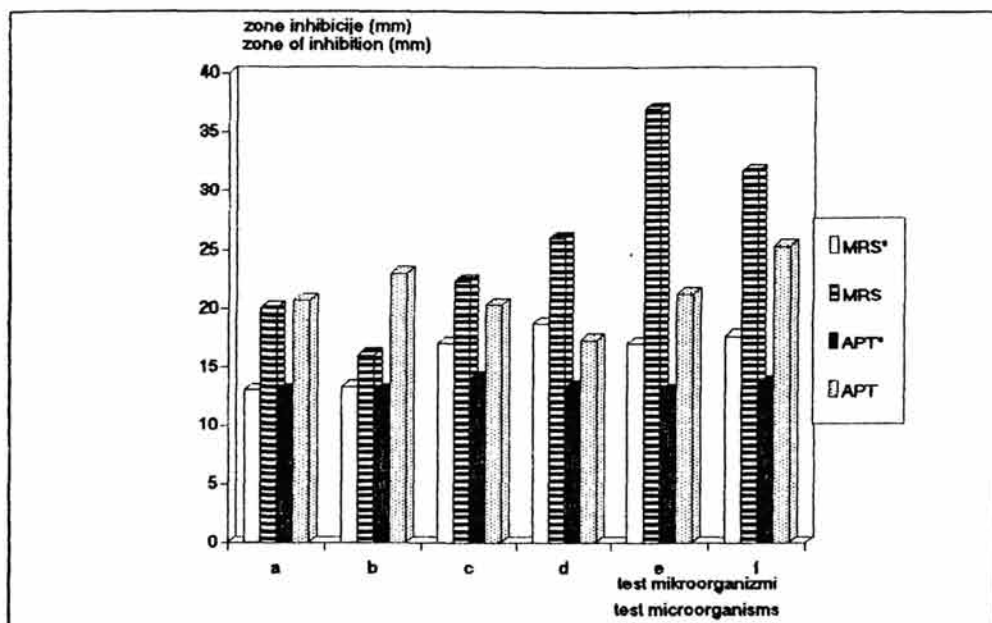
Tablica 2. Promjena količine slobodne mliječne kiseline i pH vrijednosti tijekom uzgoja kulture *L. acidophilus* u različitim hranjivim podlogama

Table 2 Changes of free lactic acid content and pH value during the cultivation of *L. acidophilus* in different nutrient media

Hranjive podloge Nutrient media	Trajanje uzgoja (h) Duration of cultivat. (h)	Slobod. mlij. kis. (%) Free lactic acid (%)	pH vrijednost pH value
MRS*	24	0,42	5,2
	48	0,30	5,5
MRS	24	1,29	3,9
	48	1,23	4,1
APT*	24	0,32	5,2
	48	0,32	5,5
APT	24	0,89	4,0
	48	0,92	4,3

Uspoređujući rast kulture *L. acidophilus* na kosim podlogama (APT-agar i MRS-agar), primijećen je slabiji rast na APT agaru, što je vjerojatno i razlog slabije antimikrobne aktivnosti u podlogama APT i APT* nego u podlogama MRS i MRS* (slika 1).

Najveću antimikrobnu aktivnost pokazuje kultura uzgojena u MRS podlozi (bez karbonata) nakon 48 sati uzgoja, iz čega bi se u prvi mah moglo zaključiti da je u uzorku nastala slobodna mliječna kiselina. Međutim, iz tablice



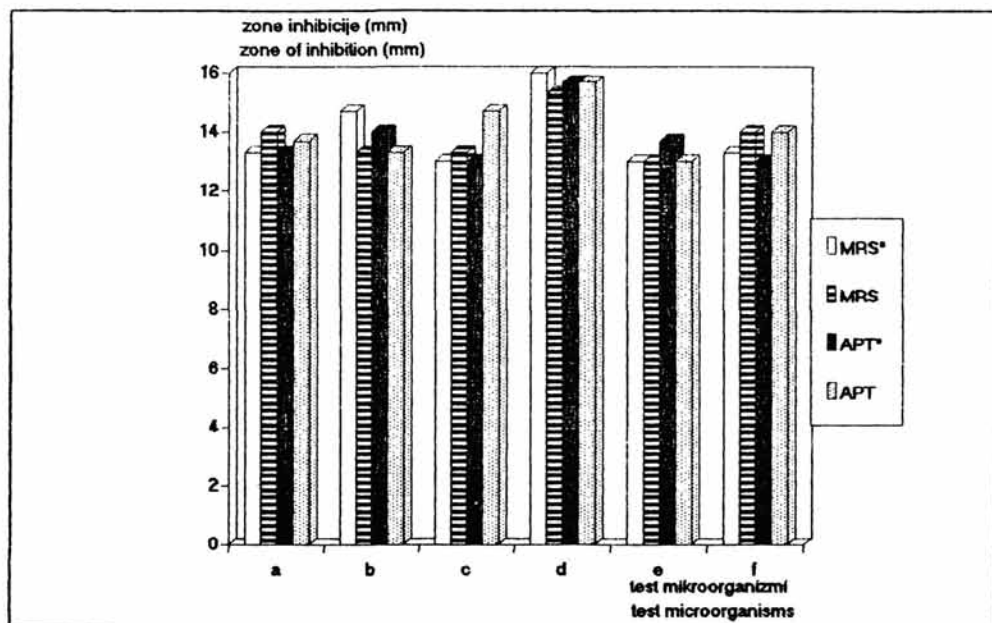
Slika 2. Antimikrobna aktivnost *L. acidophilus* filtrata uzgojene u različitim hranjivim podlogama prema različitim test mikroorganizmima (trajanje uzgoja 48 sati)

Figure 2 Antimicrobial activity of *L. acidophilus* culture filtrate cultivated in different nutrient media against different test microorganisms (duration of cultivation 48 hours)

- a — *Staphylococcus aureus* 3048
 b — *Staphylococcus aureus* K-144
 c — *Salmonella mumm*
 d — *Escherichia coli*
 e — *Bacillus subtilis*
 f — *Bacillus cereus*

2 vidi se da je koncentracija slobodne mliječne kiseline u 24. i 48. satu skoro jednaka, pa se razlog povećanog antimikrobnog djelovanja u 48. satu može pripisati povećanoj koncentraciji nastale antibiotičke supstancije. Prema Fernandesu i sur. (1988), do maksimalne biosinteze antibiotičke supstancije dolazi nakon 48 sati uzgoja kulture *L. acidophilus*. Povećanje antimikrobnog djelovanja i u podlogama s CaCO_3 može se objasniti pozitivnim utjecajem iona kalcija. Nastala mliječna kiselina se s kalcijem veže u Ca-laktat i na taj način se kulturi produžuje rast u logaritamskoj fazi, što rezultira povećanjem broja stanica, a time i povećanjem koncentracije antibiotičke supstancije (Fernandes et al. 1988).

Test mikroorganizmi *S. mumm*, *E. coli* i *B. subtilis* pokazali su najveću osjetljivost prema antimikrobnom djelovanju kulture *L. acidophilus* uzgojene u podlozi MRS* (slika 1) što je u skladu s rezultatima Zychowicza i suradnika



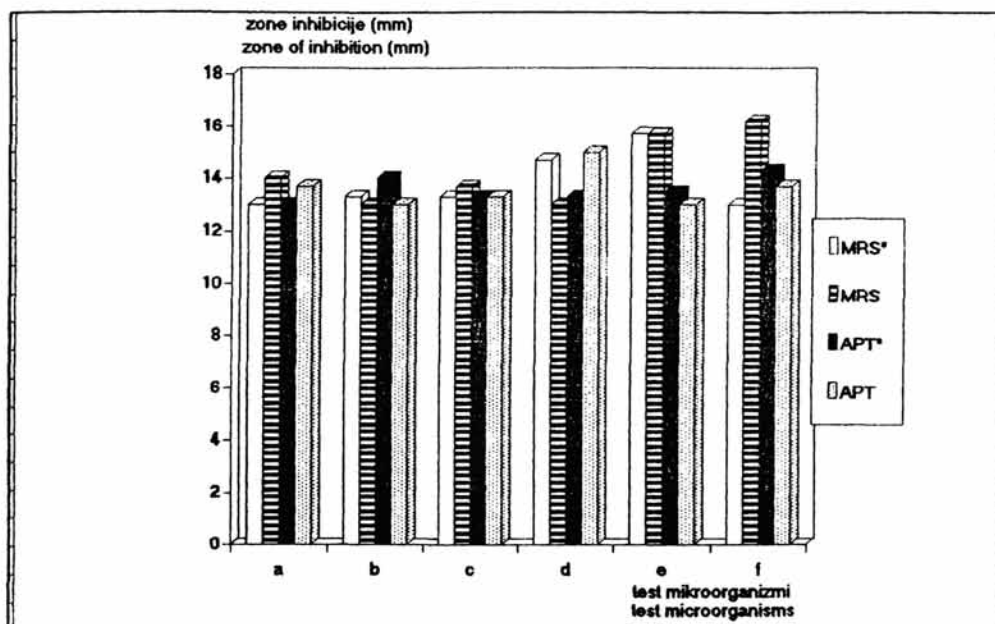
Slika 3. Antimikrobna aktivnost *L. acidophilus* dijalizata kulture uzgojene u različitim hranjivim podlogama prema različitim test mikroorganizmima (trajanje uzgoja 24 sati)

Figure 3 Antimicrobial activity of *L. acidophilus* culture dialysate cultivated in different nutrient media against different test microorganisms (duration of cultivation 24 hours)

- a — *Staphylococcus aureus* 3048
- b — *Staphylococcus aureus* K-144
- c — *Salmonella mumm*
- d — *Escherichia coli*
- e — *Bacillus subtilis*
- f — *Bacillus cereus*

(1974) koji su utvrdili da kultura *L. acidophilus* suzbija rast *Salmonella* i *Shigella* vrsta koje uzrokuju dječju dizenteriju. Na slici 1. se također vidi da sve test mikroorganizme najviše inhibira kultura *L. acidophilus* uzgojena u podlozi MRS bez CaCO_3 što svakako uzrokuje na dodatni inhibicijski efekt slobodne mliječne kiseline.

U prethodnim istraživanjima testirano je antimikrobno djelovanje kulture *L. acidophilus* što znači da nije uklonjen utjecaj bakterijskih stanica i nastale slobodne mliječne kiseline prilikom testiranja antimikrobne aktivnosti. Zato se obično radi sa »cellfree« supernatantom (bez stanica) (Barnby-Smith, 1989; Andersson, 1986) koji se postiže filtracijom kroz 0,2 μm mikrofiter. Antimikrobno djelovanje filtrata kulture *L. acidophilus*, uzgojenog



Slika 4. Antimikrobna aktivnost *L. acidophilus* kulture dijalizata uzgojene u različitim hranjivim podlogama prema različitim test mikroorganizmima (trajanje uzgoja 48 sati)

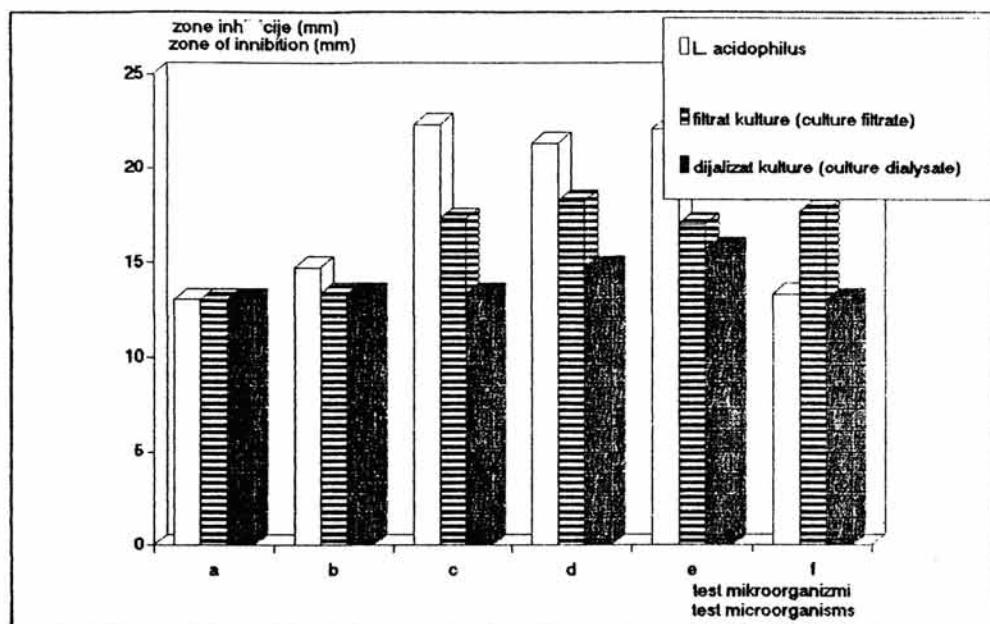
Figure 4 Antimicrobial activity of *L. acidophilus* culture dialysate cultivated in different nutrient media against different test microorganisms (duration of cultivation 48 hours)

- a — *Staphylococcus aureus* 3048
- b — *Staphylococcus aureus* K-144
- c — *Salmonella mimum*
- d — *Escherichia coli*
- e — *Bacillus subtilis*
- f — *Bacillus cereus*

na različitim podlogama, prema različitim test mikroorganizmima prikazano je na slici 2.

Iz slike 2 proizlazi da su test mikroorganizmi *E. coli*, *S. mimum*, *B. subtilis* i *B. cereus* pokazali približno istu osjetljivost na antimikrobnu aktivnost filtrata kulture *L. acidophilus*. Ovi rezultati upućuju na mogućnost upotrebe preparata *L. acidophilus* u sprečavanju raznih bolesti koje uzrokuje *E. coli* (diareja, infekcija mokraćnih puteva) kako navode mnogi autori (Watkins, 1982.; Tomić-Karović i Fanjek, 1962.).

Antimikrobno djelovanje dijalizata kulture *L. acidophilus* prikazano je na slikama 3 i 4. Koncentracija nastale slobodne mliječne kiseline u dijalizatu iznosila je između 0,016 i 0,023%, pa se antimikrobna aktivnost dijalizata kulture može pripisati antimikrobnoj aktivnosti antibiotičke supstancije *L. acidop-*



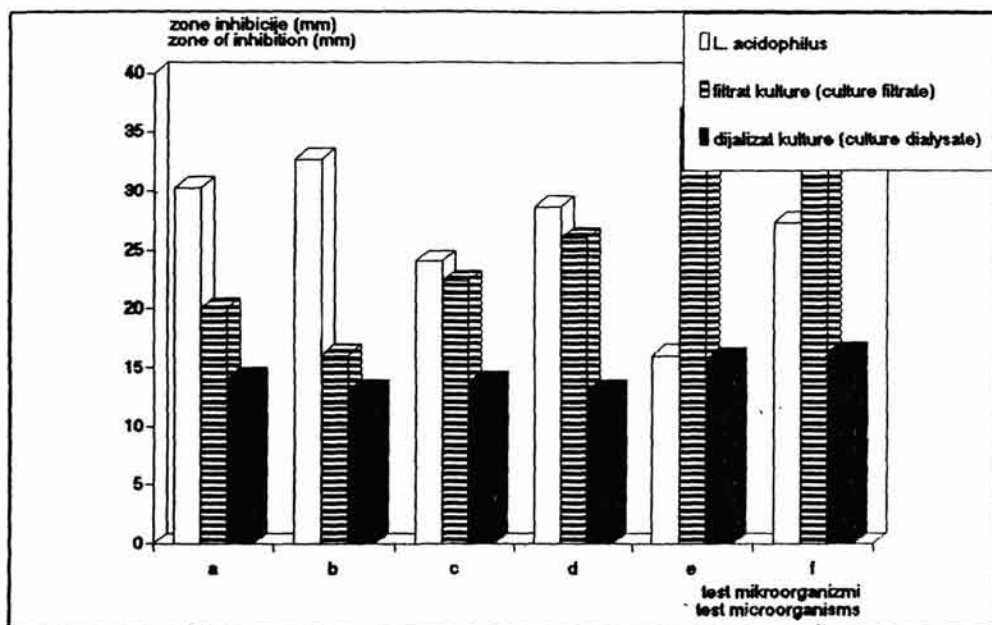
Slika 5. Usporedba antimikrobne aktivnosti pri različitoj obradi kulture *L. acidophilus* uzgojene u MRS bujonu sa CaCO_3 (MRS* trajanje uzgoja *L. acidophilus* 48 sati)

Figure 5 Comparison of antimicrobial activity at different treatment of *L. acidophilus* culture cultivated in MRS broth with CaCO_3 (MRS* duration of *L. acidophilus* cultivation 48 hours)

- a — *Staphylococcus aureus* 3048
- b — *Staphylococcus aureus* K-144
- c — *Salmonella mumm*
- d — *Escherichia coli*
- e — *Bacillus subtilis*
- f — *Bacillus cereus*

hilus, *E. coli* pokazuje najveću osjetljivost na djelovanje dijalizata kulture *L. acidophilus* i to nakon 24 sata uzgoja *L. acidophilus* u podlozi MRS* (slika 3). Vincent i sur. (1959) su ustanovili da su gram-negativne bakterije osjetljivije na laktocidin od gram-pozitivnih zbog razlike u građi i debljini stanične stijenke što je pokazano i rezultatima u ovom radu.

Kao što je već prije spomenuto, najveće antimikrobno djelovanje ima »neobrađena« kultura *L. acidophilus*. Vincent i sur. (1959) ustanovili su da nepročišćen laktocidin, koji proizvodi bakterija *L. acidophilus*, ima daleko širi spektar antibakterijske aktivnosti od pročišćenog. Usporedbom slika 2, 3, 4 i 8 očito je da se svakim idućim postupkom pročišćavanja antibiotske supstancije antimikrobna aktivnost sve više smanjuje. Može se reći da prisutna »onečišćenja« djeluju kao imunogeni sustav antibiotske supstancije (Vincent et al. 1959). Andersson (1986) tvrdi da do smanjenja antimikrobne aktivnosti nakon filtracije i dijalize može doći ne samo zbog uklanjanja slobodne mliječne



Slika 6. Usporedba antimikrobne aktivnosti pri različitoj obradi kulture *L. acidophilus* uzgojene u MRS bujonu (MRS trajanje uzgoja *L. acidophilus* 48 sati)

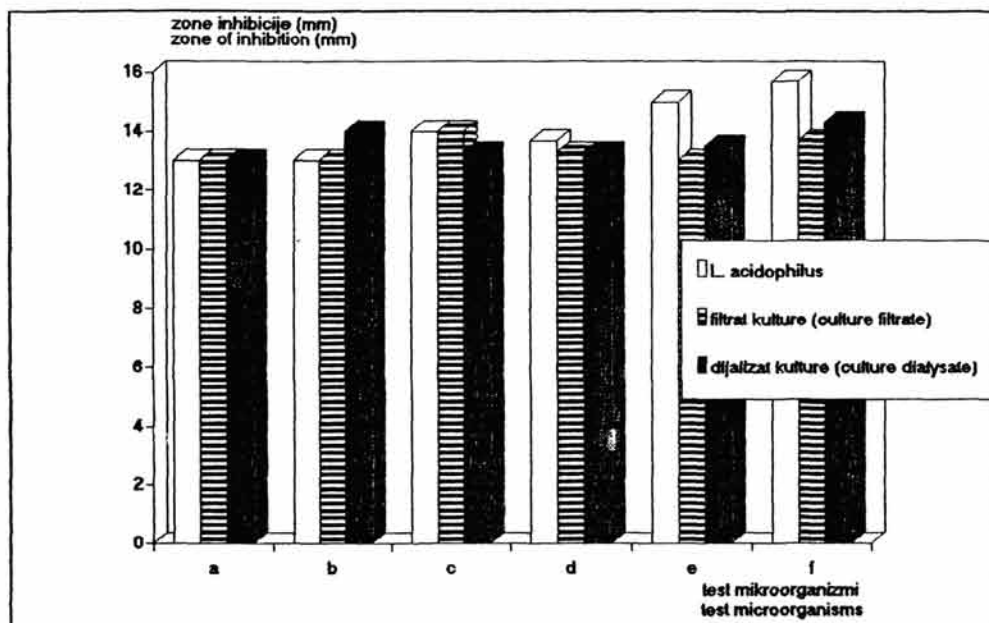
Figure 6 Comparison of antimicrobial activity at different treatment of *L. acidophilus* culture cultivated in MRS broth (MRS duration of *L. acidophilus* cultivation 48 hours)

- a — *Staphylococcus aureus* 3048
- b — *Staphylococcus aureus* K-144
- c — *Salmonella mumm*
- d — *Escherichia coli*
- e — *Bacillus subtilis*
- f — *Bacillus cereus*

kiseline, već i zbog mogućeg vezivanja antibiotske supstancije na površinu bakterijskih stanica koje se uklanjaju filtracijom.

Uspoređujući slike od 5 do 8 moglo bi se zaključiti da kultura uzgojena u MRS podlogama (MRS i MRS*) pokazuje veće antimikrobno djelovanje nego kultura uzgojena u APT podlogama (APT i APT*). Kako je već rečeno, razlog tome je vjerojatno slabiji rast kulture *L. acidophilus* u APT podlogama što je rezultiralo i slabijim antimikrobnim djelovanjem. Ako se promatra samo antimikrobno djelovanje različito obradenih uzoraka nastalih uzgojem kulture u podlogama MRS i MRS* (slike 5 i 6), jasno se vidi da je najveća antimikrobna aktivnost neobrađena kultura *L. acidophilus*. To je i logično jer slobodna mliječna kiselina i antibiotska supstanca zajedno djeluju na inhibiciju rasta test mikroorganizama.

Najveću osjetljivost na antibiotsku aktivnost *L. acidophilus* pokazali su test mikroorganizmi *S. mumm*, *E. coli* i *B. subtilis* (slika 5).



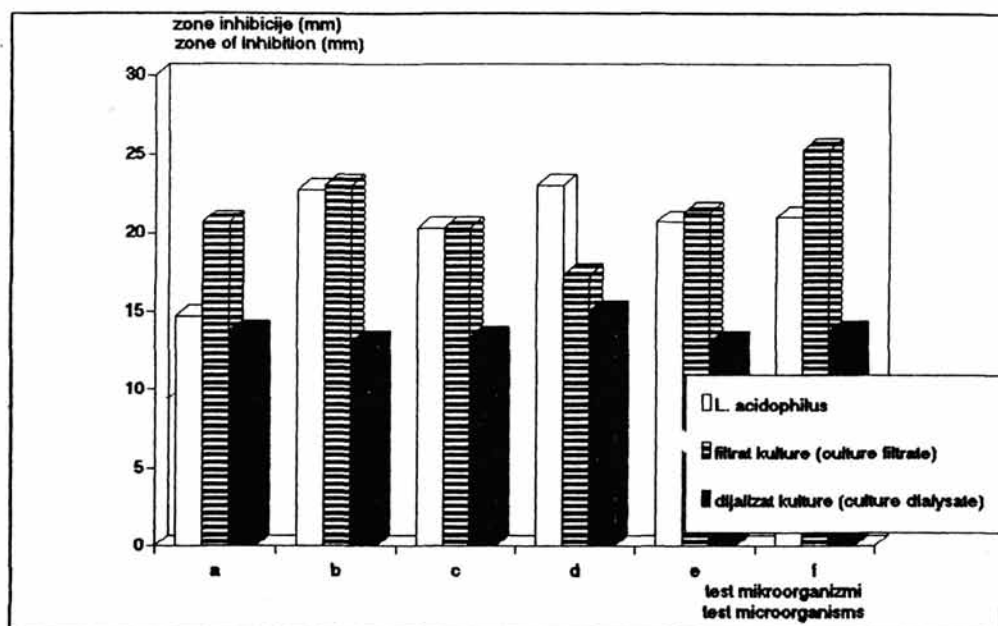
Slika 7. Usporedba antimikrobne aktivnosti pri različitoj obradi kulture *L. acidophilus* uzgojene u APT bujonu sa CaCO_3 (APT* trajanje uzgoja *L. acidophilus* 48 sati)

Figure 7 Comparison of antimicrobial activity at different treatment of *L. acidophilus* culture cultivated in APT broth with CaCO_3 (APT* duration of *L. acidophilus* cultivation 48 hours)

- a — *Staphylococcus aureus* 3048
- b — *Staphylococcus aureus* K-144
- c — *Salmonella mumm*
- d — *Escherichia coli*
- e — *Bacillus subtilis*
- f — *Bacillus cereus*

Zaključci

1. Maksimalna antimikrobna aktivnost kulture *L. acidophilus* postignuta je pri uzgoju u podlozi MRS.
2. Najveću antimikrobnu aktivnost pokazuje neobrađena kultura *L. acidophilus* nakon 48 sati uzgoja. Filtracijom, odnosno dijalizom kulture antimikrobna aktivnost opada i do 53%, odnosno 62%.
3. Najveću osjetljivost na antimikrobno djelovanje kulture *L. acidophilus* pokazali su test mikroorganizmi *Salmonella mumm*, *Escherichia coli* i *Bacillus subtilis*.



Slika 8. Usporedba antimikrobne aktivnosti pri različitoj obradi kulture *L. acidophilus* uzgojene u APT bujonu (APT trajanje uzgoja *L. acidophilus* 48 sati)

Figure 8 Comparison of antimicrobial activity at different treatment of *L. acidophilus* culture cultivated in APT broth (APT duration of *L. acidophilus* cultivation 48 hours)

- a — *Staphylococcus aureus* 3048
- b — *Staphylococcus aureus* K-144
- c — *Salmonella mumm*
- d — *Escherichia coli*
- e — *Bacillus subtilis*
- f — *Bacillus cereus*

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS

Summary

Lactobacillus acidophilus is often mentioned as beneficial dietary adjunct. This organism possesses characteristics which permit its survival and growth in the intestinal tract. *L. acidophilus* has received most attention in being inhibitory toward the commonly known foodborne pathogens.

The effect of different growth media on antimicrobial activity of *L. acidophilus* was examined in this paper. MRS and APT media with and without

chalk (to bind accumulated lactic acid) were used for the growth of *L. acidophilus*. Culture broth, cellfree supernatant and dialysate from *L. acidophilus* were examined for antimicrobial activity against the enteropathogenic microorganisms (*Staphylococcus aureus* 3048, *Staph. aureus* K-144, *Salmonella mummum* *Escherichia coli*) and the spore-forming bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus*.

The best growth and the highest antimicrobial activity were achieved in MRS medium, after 48 hours of cultivation. The most sensitive microorganisms, have been *Salmonella mummum*, *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*.

Additional index words: *Antibacterial activity of Lactobacillus acidophilus, L. acidophilus as dietary adjunct, bacteriocins, antibacterial substances.*

Literatura

- ANDERSSON R. (1986): *International Journal of Food Microbiology* **3**, 146–160.
- BAREFOOT S.F. i KLAENHAMMER T.R. (1983): *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 1808–1815.
- BAREFOOT S.F. i KLAENHAMMER T.R. (1984): *Antimicrobial agents and chemotherapy* **26**, 328–334.
- BARNBY-SMITH F.M., ROLLER S.D., WOODS L.F.J., BARKER M., NIGHTINGALE M and GIBBS P.A. (1989): *Research reports No. 662*, 22–23.
- FERNANDES C.F., SHAHANI K.M., AMER M.A. (1987): *FEMS Microbiol. Rev.* **46** 343–356.
- FERNANDES C.F., SHAHANI K.M. i M.A. (VIC) AMER. (1988): *J. Dairy Sci.* **71**, 3222–3229.
- GILLILAND, S.E. (1979): *J. Food Prot.* **42** (2), 164–167.
- GILLILAND, S.E. (1990): *FEMS Microbiol. Rev.* **87**, 175–188.
- GILLILAND S.E. and SPECK, M.L. (1977): *J. Food Prot.* **40**, 820–823.
- HAMDAN, I.Y., MIKOLAJCIK, E. M. (1974): *J. Antibiotics* **27**, 631–636.
- LIN, M.Y., SAVIANO, D., HARLANDER, S. (1991): *J. Dairy Sci.* **74** (1) 87–95.
- MEHTA A.M., PATEL K.A. and DAVE, P.J. (1984): *Milchwissenschaft* **39** (2), 86–89.
- METCHNIKOFF, E. (1908): *The prolongation of life*. 1st ed S.P. Putman's Sons, New York N.Y.
- SHAHANI, K.M., VAKIL, J.R. i KILARA A. (1977): *Cult Dairy Prod. J.* **12** (2), 8–11.
- TEN BRINK, B., J.H. HUIS in't VELD and MINEKUS, M. (1990): *FEMS Microbiol. Rev.* **87**
- TOMIC-KAROVIC, K. i FANJEK, J. J. (1962): *Ann. Pediatr.* **199**, 525–634.
- VINCENT, J.G., VEOMETT, R.C. and RILEY R.F. (1959): *J. Bacteriol.* **78**, 477–481.
- WATKINS, B.A. MILLER B.F. and NEIL, D.H. (1982): *Poultry Sci.* **61**, 1298–1308.
- WILKELSTEIN, A. (1955): *Am. Pract. Dig. Treat.* **1**, 1637–1639.
- ZYCHOWICZ, C., SURARYNSKA, A. SIEWIERSKA, B. and CIEPLINSKA, T. (1974): *Ped Pol.* **49**, 997–1003.

Adrese autora — Authors' addresses:

Mr. Jagoda Sušković
Maša Krobot, dipl. ing.
Mr. Milena Mehak
prof. dr. Srećko Matošić
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zagreb, Pierottijeva 6

Primljeno — Received

1. 5. 1993.