

# Karakterizacija bakteriocina enterokoka izoliranih iz hrane životinjskog podrijetla

---

Vukušić, Nina

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:011299>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-30**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -  
Repository of PHD, master's thesis](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
VETERINARSKI FAKULTET**

**Nina Vukušić**

**KARAKTERIZACIJA BAKTERIOCINA ENTEROKOKA IZOLIRANIH  
IZ HRANE ŽIVOTINJSKOG PODRIJETLA**

**DIPLOMSKI RAD**

**Zagreb, 2019.**

**VETERINARSKI FAKULTET SVEUČILIŠTA U ZAGREBU  
ZAVOD ZA HIGIJENU, TEHNOLOGIJU I SIGURNOST HRANE**

**Predstojnik:**

**Izv. prof. dr. sc. Nevijo Zdolec**

**Mentor:**

**Izv. prof. dr. sc. Nevijo Zdolec**

**Članovi povjerenstva:**

- 1. prof. dr. sc. Vesna Dobranić**
- 2. prof. dr. sc. Željka Cvrtila**
- 3. izv. prof. dr. sc. Nevijo Zdolec**
- 4. prof. dr. sc. Bela Njari (zamjena)**

## **ZAHVALA**

*Zahvaljujem se roditeljima koji su me poticali i bili uz mene; prijateljima i svim djelatnicima Veterinarskog fakulteta koji su bili dio ovog lijepog putovanja.*

*I jedno posebno i veliko hvala mentoru izv. prof. dr. sc. Neviju Zdolecu s kojim je ova priča došla do kraja.*

## SADRŽAJ

1.	UVOD	1
2.	PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA	3
2.1.	Značaj enterokoka u hrani životinjskog podrijetla	3
2.2.	Bakteriocini	4
2.2.1.	Mehanizam djelovanja bakteriocina	5
2.2.2.	Detekcija i kvantifikacija bakteriocina	6
2.3.	Bakteriocini enterokoka - enterocini	7
2.3.1.	Primjena enterocina u prehrambenoj industriji	7
3.	MATERIJAL I METODE	9
3.1.	Izolati enterokoka	9
3.2.	Priprema sojeva za ispitivanje antimikrobne aktivnosti	9
3.3.	Mjerenje aktivnosti bakteriocina	10
4.	REZULTATI	11
5.	RASPRAVA	16
6.	ZAKLJUČCI	19
7.	LITERATURA	20
8.	SAŽETAK	24
9.	SUMMARY	25
10.	ŽIVOTOPIS	26

## 1. UVOD

Primjena bakteriocina, antimikrobnih bakterijskih peptida, jedno je od vodećih područja znanstvenih-primjenjivih istraživanja s ciljem uvođenja prirodnih konzervanasa u proizvodnji hrane. S tim u vezi, bakterije mliječne kiseline najvažnija su mikrobna skupina u kojoj se pronalaze bakteriocin-sintetizirajući sojevi koji se potencijalno mogu koristiti kao probiotici. Mnogobrojnim istraživanjima utvrđen je njihov antimikrobni učinak u kontroliranim laboratorijskim uvjetima kao i u proizvodnji različitih vrsta hrane životinjskog podrijetla, posebno fermentirane hrane.

Bakteriocini enterokoka (enterocini) mogu biti širokog ili uskog spektra djelovanja, no uglavnom inhibiraju Gram – pozitivne bakterije. Najznačajnije enterocin-producirajuće vrste su *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus faecium*, a njihovi su bakteriocini iz II skupine bakteriocina koje smatramo malim, toplinski stabilnim i membranski aktivnim peptidima (van BELKUM i STILES, 2000.). Enterocini su opisani kao antimikrobni peptidi aktivni protiv nekih usko povezanih bakterija mliječne kiseline, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium* spp., *Staphylococcus aureus* i stoga pokazuju potencijal u unaprjeđenju sigurnosti hrane (GIRAFFA, 1995.). Mogu se primjenjivati u hrani kao svojevrsni aditivi tj. dodaci ili putem bakteriociogenih sojeva direktno u prehrambenom lancu. Također se ispituje primjenjivost enterokoka kao starter kultura koje sintetiziraju bakteriocine, no tu je nužna potpuna karakterizacija sojeva s obzirom na potencijalna rizična svojstva (ZDOLEC i sur., 2017.). Upotreba bakteriocina može pridonijeti sigurnosti hrane i na način da spriječiti rast nepoželjnih autohtonih bakterija mliječne kiseline u hrani. Ova osobina može poboljšati konkurentnost starter kultura i dovesti do više kontroliranih i standartiziranih fermentacijskih procesa.

U širem smislu, bakteriocini mogu pronaći svoju primjenu i u animalnoj proizvodnji tj. kao svojevrsna zamjena za antibiotike. Naime, danas je zabranjena primjena antibiotika kao promotora rasta, pa se teži pronaći određene neškodljive/prirodne tvari koje bi dostojno zamijenile antibiotike, odnosno doprinijele boljoj konverziji hrane i prirastu u tovu (npr. peradi i svinja). Općenito, bolja konverzija i prirast između ostalog je posljedica supresije štetne mikroflore crijeva. U tom smislu se kao alternativa antibioticima mogu predložiti bakteriocini koji bi se primjenjivali sami ili putem bakterijskih kultura koje će otpuštati bakteriocin u crijevu životinja. Ovakav pristup ne samo da može doprinijeti zdravlju i produktivnosti životinja, već i smanjenju rizika od širenja patogenih i/ili rezistentnih bakterija

kroz prehrambeni lanac. Naime, pod pretpostavkom da se u crijevu životinja djelovanjem bakteriocina smanji ili spriječi kliconoštvo (npr. *Salmonella*, *Campylobacter*), smije se očekivati i smanjenje pojave tih bakterija u animalnim proizvodima (npr. mlijeko, meso), naravno uz drugu pretpostavku da se uspješno spriječi onečišćenje iz drugih izvora.

Prvi preduvjet za odabir takvih potencijalnih probiotičkih sojeva je njihova antimikrobna aktivnost. Jedan od mehanizama antimikrobnog djelovanja enterokoka je sinteza bakteriocina, te je stoga u ovom radu cilj bio ispitati učinak odabranih sojeva enterokoka iz hrane životinjskog podrijetla na neke od patogenih bakterija važnih u veterinarskom javnom zdravlju, uključujući *L. monocytogenes*, *Y. enterocolitica* i *Salmonella* Typhimurium.

## 2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

### 2.1. Značaj enterokoka u hrani životinjskog podrijetla

Bakterije iz roda *Enterococcus* su gram-pozitivni, fakultativno anaerobni koki, koje zbog svoje visoke tolerancije na toplinu i mogućnosti preživljavanja u različitim vremenskim uvjetima nastanjuju (koloniziraju) tlo, vodu i hranu. Poznati su kao komenzali u gastro-intestinalnom traktu ljudi i životinja te imaju ulogu u zrenju i razvoju organoleptičkih svojstava hrane, ali i higijenske ispravnosti proizvoda.

Iako je izolirano više od 36 vrsta iz roda enterokoka, njih 26 povezano je sa infekcijama kod ljudi. *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus faecium*, dvije su vrste koje zadnjih par desetljeća kao oportunistički patogeni izazivaju bolničke infekcije (HAMMERUM, 2012., VAN TYNE i GILMORE, 2014.) urinarnog trakta, bakterijemije, meningitisa, neonatalne infekcije i infekcije rana. U novije vrijeme, infekcije povezane biofilmom sa medicinskih naprava, pripisuju se upravo ovim bakterijama (ARIAS-MOLIZ i sur., 2012.).

Enterokoki se mogu vrlo lako izolirati iz hrane životinjskog porijekla, uključujući tradicionalnu fermentiranu hranu. Koloniziraju sirovu hranu animalnog podrijetla (meso, mlijeko) preko probavnog sustava ili kontaminiranog okoliša, gdje mogu preživjeti i umnažati se tijekom procesa fermentacije (HUGAS i sur., 2003.). S jedne strane, upravo su enterokoki ti koji daju posebna organoleptička svojstva domaćim kobasicama i određenim vrstama sira, dok s druge, rezistencija na visoku temperaturu (preživljavaju na 62.8 °C 30 min.), sol (6.5% NaCl) i pH (4.0 – 9.6) (STILES, 2002.) može dovesti do njihovog prekomjernog rasta te uzrokovati kvarenje hrane.

Napretkom tehnologije i činjenicom da u današnje vrijeme enterokoke smatramo dijelom uobičajene mikroflore hrane, nakon točne identifikacije, karakterizacije i procjene sigurnosti soja, enterokoki se izabiru za uporabu kao starter kulture/ dodatci hrani ili krmi, s ciljem kako bi se postigao željeni učinak zaštite protiv patogenih bakterija u probavnom traktu domaćina. Naime, enterokoki tvore bakteriocine, peptide sa bakteriocidnim djelovanjem, čije je prisutstvo u prehrambenoj industriji veoma poželjno.

Usprkos dobrim karakteristikama, enterokoki se ne smatraju “dobrim” GRAS (eng. generally recognized as safe) bakterijama. Mogu stvarati biogene amine, aktivne kemijske spojeve, kojima se pripisuju epizode trovanja hranom. Nadalje, enterokoki su prirodno rezistentni na niz antibiotika kao što su cefalosporini, beta – laktami, sulfonamidi i drugi.



Najveći problem predstavlja stečena rezistencija posredovana genima na plazmidima na kloramfenikol, eritromicin, fluorokinolone i glikopeptide, kao što je vankomicin (antibiotik koji se upotrebljava u terapiji višestrukih rezistentnih infekcija ili kod alergije na penicilin i ampicilin) (FRANZ i sur., 2003.) kao i prijenos gena rezistencije gdje dolazimo do začaranog kruga prijenosa sa namirnica, odnosno hrane animalnog podrijetla na ljudski probavni trakt i okoliš (PALMER i GILMORE, 2010.). Tako su izolirani enterokoki rezistentni na antibiotike u mesnim i mliječnim proizvodima, “ready-to-eat” hrani čak i soju enterokoka koji se upotrebljavaju kao probiotici (TEUBER i sur., 1999., GIRAFFA i sur., 2000.), dok su enterokoki rezistentni na vankomicin (VRE- vankomicin-rezistentni enterokoki), posebice *E. faecium*, nađeni u goveđem i svinjskom mesu, peradi, mesnim proizvodima (BORGEN, 2001., LEMCKE i BÜLTE, 2000.), industriji sira i tradicionalnim siranama (TEUBER i sur., 1999.). Osim posjedovanja virulentnih gena i gena rezistencije, *E. faecalis* ima sposobnost horizontalnog širenja tih gena dok je u posljednjem desetljeću zabilježen prijenos gena rezistencije na antibiotike između sojeva *E. faecium*, kao i prijenos rezistencije na vankomicin sa *E. faecalis* na *S. aureus* (PALMER i GILMORE, 2010.).

## 2.2. Bakteriocini

Empirijska primjena mikroorganizama i/ili njihovih prirodnih metaboličkih produkata datira iz daleke ljudske prošlosti. Napretkom tehnologije i potrebom za upoznavanjem bakterija i njihovim djelovanjem, TAGG i sur. (1976.) prvi put predlažu termin *bakteriocini* - proteinski spojevi iz bakterija sposobni da inhibiraju rast bliskih bakterija. Prvi podaci o bakteriocinima zabilježeni su u radu sa Gram-negativnim bakterijama, točnije s *Escherichia coli* i nazvani su kolicini (GRATIA, 1925.). Do danas, okarakterizirano je više stotina vrsta bakteriocina iz velikog broja bakterija - „Gotovo 99 % svih bakterija mogu sintetizirati makar jedan bakteriocin, jedini razlog zašto ga nismo našli je zato što ga nismo ni tražili“ (KLAENHAMMER, 1988).

Posljednjih dvadeset godina, studije o bakteriocinima Gram-pozitivnih bakterija su u velikom porastu, s posebnim fokusom na bakterije mliječne kiseline (BMK), kako iz fundamentalnih razloga, tako i zbog njihove moguće primjene u prehrambenoj industriji i zaštiti od bakterijskih infekcija (MIRKOVIĆ, 2016.).

Bakteriocini su peptidne molekule sintetizirane na ribosomima bakterija koji ispoljavaju antimikrobno svojstvo, prvenstveno, na Gram-pozitivne mikroorganizme, pri čemu stanice koje ih proizvode ostaju imune na vlastite bakteriocine. Klasificiraju se u 4 skupine, koje je 1993. predložio Klaenhammer – lantibiotici, kratki termostabilni peptidi, termolabilni proteini i proteinski kompleksi. Bakteriocini su uglavnom mali, termolabilni, pozitivno nabijeni peptidi koji svoje djelovanje ispoljavaju povećanjem membranske propustljivosti što za posljedicu ima gubitak malih metabolita iz bakterijske stanice. Smatra se da njihova raznovrsnost u smislu veličine, antimikrobnog spektra i mehanizma djelovanja, omogućuje bakteriji koja ga proizvodi ekološku prednost i opstanak u okruženju koje dijeli sa blisko srodnim vrstama sa kojima su u kompeticiji za iste nutrijente.

### **2.2.1. Mehanizam djelovanja bakteriocina**

Bakteriocini svojim antimikrobnim djelovanjem u najvećoj mjeri djeluju na mikroorganizme srodnih vrsta. Unatoč mnogobrojnim istraživanjima, informacije o genima za sintezu bakteriocina i dalje su oskudne. Zna se da su ribosomalno sintetizirani peptidi, a geni za kodiranje i produkciju su, uobičajeno, *operon clusteri*. Nalaze se na kromosomima ili na plazmidima. Karakteristično je postojanje genetskog koda prvo za sintezu strukturalnog proteina, proteina koji prevodi bakteriocin u aktivnu formu, obavlja njegov transport kroz membranu i proteina koji štiti stanicu koja ih sintetizira (VESKOVIĆ - MORAČANIN, 2010.).

Svoje antimikrobno svojstvo bakteriocini ispoljavaju putem dva mehanizma:

- Vezanjem bakteriocina za specifične receptore na vanjskoj staničnoj membrani što dovodi do povećane propustljivosti ionskih kanala i gubitka intracelularnih elektrolita i/ili pH balansa
- Penetracijom bakteriocina kroz citoplazmatsku membranu indukcijom aktivnih nukleaza

Poznato je da bakteriocini BMK djeluju na Gram-pozitivne bakterije, dok djelovanje na Gram-negativne nije uobičajeno najvjerojatnije zbog složenije strukture njihove

stanične membrane koja je nepropusna za većinu makromolekula i hidrofobnih supstanci (VESKOVIĆ - MORAČANIN, 2010.).

### **2.2.2. Detekcija i kvantifikacija bakteriocina**

Tehnike koje se koriste za identifikaciju, detekciju i kvantifikaciju bakteriocina dijele se u tri grupe: biološki, genetski i imunološki testovi. Biološki testovi polazišna su točka u laboratorijskim analizama bakteriocina. Najčešće upotrebljavani testovi su agar difuzijski test i turbidimetrijske metode temeljene na inhibiciji rasta indikatorskih mikroorganizama inokuliranih na ploči (CINTAS i sur., 2000.). Kvantifikacija antimikrobne aktivnosti provodi se pomoću arbitrarnih jedinica (engl. arbitrary units; AU) u agar difuzijskim testovima ili bacteriocin jedinicama (engl. Bacteriocin units; BU) u turbidimetrijskim testovima. Oba parametra su definirana kao recipročne vrijednosti najvišeg razrjeđenja uzorka (otopine bakteriocina) u kojem se pojavljuje inhibicija osjetljivih mikroorganizama u agaru (AU) ili koji inhibiraju 50% indikatorskih mikroorganizama u mikrotitracijskoj ploči (BU). Unatoč tome što su korisne, osjetljive i jednostavne, dva su nedostatka ovih metoda koja ih čine nepouzdanima i otežava njihovo provođenje. Kvantifikacija antimikrobne aktivnosti je subjektivna i ovisi o osjetljivosti indikatorskih sojeva i testovi nisu visoko specifični jer ne mogu razlikovati ostale spojeve ili komponente sa antimikrobnom aktivnosti.

Lančana reakcija umnažanja polimerazom (PCR) ili DNA hibridizacija (Southern blotting), genetski su testovi kojima se određuje ima li bakterijski soj genetski potencijal za kodiranje određenog bakteriocina (MARTINEZ i sur., 2000.). Ovi testovi su visoko osjetljivi i specifični, i iako mogu detektirati bakteriocinski strukturni gen u domaćinu, ne daju informaciju o kvantifikaciji istih.

Imunološki testovi su metode izbora kod detekcije i kvantifikacije bakteriocina. Temelje se na reakciji antigen – antitijelo, pri čemu se nastali kompleks detektira pomoću enzima. Generalno, ove metode omogućuju izolaciju bakteriocina iz raznih podloga, bilo da se radi o kulturi stanica u nadtalogu ili mikroorganizmima u hrani. Neke od imuno – enzimnih tehnika koje se koriste su western blotting, spot blotting i imunoenzimni test (ELISA).

### 2.3. Bakteriocini enterokoka – enterocini

Enterocini su bakteriocini koje proizvode bakterije iz roda *Enterococcus*, kao što su *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* i *E. mundii*. Mnogi od tih enterocina pokazali su snažni baktericidni učinak prema bakterijama kvarenja ili patogenim mikroorganizama prisutnih u hrani kao što su *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium* sp., *E. coli*, *Vibrio cholerae* i *Bacillus cereus* te zbog toga imaju važnu ulogu kao prirodni konzervansi (GIRAFFA i sur., 1997.).

Kriteriji za podjelu bakteriocina ne mogu se u potpunosti primjeniti na enterocine jer imaju zajednička obilježja iz jednog ili više razreda ili podrazreda. Stoga FRANZ i sur. (2003.) predlaže novu klasifikaciju prema njihovim specijalnim karakteristikama:

- I. razred – lantibiotički enterocini
- II. razred – nelantibiotički enterocini; podijeljen u tri podrazreda
- III. razred – ciklički enterocini
- IV. razred – veliki proteini

#### 2.3.1. Primjena enterocina u prehrambenoj industriji

Proces obrade i prerade, posebno mesnih proizvoda, u današnjoj industrijalizaciji uključuje brojne kemijske procese. U posljednje vrijeme zdravstvena svijest javnosti dovela je do povećane potražnje proizvoda koji zaobilaze te procese, stoga upotreba bakteriocina nije samo prednost za same bakterije već se može iskoristiti u prehrambenoj industriji kao sredstvo za kontrolu nepoželjnih mikroorganizama u namirnicama i to na prirodan način, što je na kraju i osnovni zahtjev samih potrošača.

Mnogobrojnim istraživanjima enterocini su izolirani iz različitih izvora, uključujući hranu za ljudsku prehranu i hranu za životinje – mesa, ribe, sireva, kobasica i dr. Zbog svojih svojstava mogu biti upotrebljeni kao starter kulture, antimikrobni starteri i/ili direktno dodani tijekom procesa fermentacije hrane, no u praksi se još uvijek upotrebljavaju u kontroliranim uvjetima. Da bi se razmatrali kao potencijalne probiotičke kulture, moraju zadovoljiti kriterije sigurnosti poput izostanka virulentnih faktora, prenosivih gena rezistencije ili dekarboksilacijske aktivnosti (ZDOLEC, 2018.). Pojedini sojevi *E. faecalis* i *E. faecium* ne pokazuju virulentna svojstva, ne tvore biogene amine

niti su otporni na antibiotike, pa ih to čini potencijalno primjenjivima u fermentiranim proizvodima. Zabilježeno je da enterokoki tijekom fermentacije snažno inhibiraju rast *Listeria* sp., ne uzrokuju promjenu kvalitete okusa te ih autori preporučuju kao starter kulture mesnim proizvodima kako bi se poboljšala sigurnost hrane. Tako su *E. faecium* RZS C13 i *E. faecium* CCM 4231 korišteni kao starter kulture u proizvodnji španjolskih kobasica (CALLEWAERT i sur., 2000.). ANANOU i sur. (2004.) su upotrijebili enterocin AS-48 iz *E. faecalis* za kontrolu enterotoksičnih sojeva *S. aureus*. Autori su kombinirali metode čuvanja hrane i dodali enterocin na 4 °C, zajedno sa povećanom koncentracijom NaCl (6-7%) i time dobili željene rezultate. ENNAHAR i DESCHAMPS (2000.) zapazili su visoku aktivnost enterocina A iz *E. faecium* na 13 sojeva *L. monocytogenes*. AYMERICH i sur. (2000.) su demonstrirali učinkovitost enterocina A i B u kontroli *L. innocua* u raznim mesnim proizvodima (kuhana šunka, pašteta, fermentirani proizvodi) u kojima su postigli redukciju iste.

Unatoč intenzivnom proučavanju bakteriocina kao biokonzervansa hrane, samo se nizin i pediocin AcH/PA1 koriste komercijalno kao prirodni konzervansi hrane u zemljama širom svijeta. Relativno uski spektri djelovanja mnogih bakteriocina, stalne promjene zakonskih regulativa za korištenje dodataka u prehrambenoj industriji i brza adaptacija patogenih bakterija na bakteriocine koji se dodaju, najčešći su razlozi njihovog neupotrebljavanja. Zbog toga, istraživanja su sve više usmjerena ka stvaranju mutant sojeva koji će proizvoditi dva ili više bakteriocina istovremeno (MARTINEZ i sur., 2000.; HORN i sur., 1999.). Međutim, kako je korištenje rekombinantnih mutanata u prehrambenoj industriji ograničeno, prirodni izolati su i dalje najveći izvor novih bakteriocina sa širokim spektrom djelovanja (MIRKOVIĆ, 2016.).

### **3. MATERIJAL I METODE**

#### **3.1. Izolati enterokoka**

Za potrebe ovog istraživanja korišteni su izolati enterokoka iz hrane životinjskog podrijetla prikupljeni tijekom rutinskih mikrobioloških analiza. 25 grama uzoraka homogenizirano je u slanoj peptonskoj vodi te su načinjena serijska decimalna razrjeđenja iz kojih je uzeto 0,1 ml inokuluma i nasadeno na površinu Compass *Enterococcus* agara (Biokar, Francuska) koji je inkubiran 24 h na 44 °C. Odabrani izolati (n=10) namnažani su u MRS bujonu te korišteni za ispitivanja antimikrobne aktivnosti.

#### **3.2. Priprema sojeva za ispitivanje antimikrobne aktivnosti**

Svaki pojedini izolat enterokoka namnažan je u 10 ml MRS bujona na 37 °C. Aktivna kultura (10 ml) je potom prebačena u 100 ml MRS bujona i inkubirana u istim uvjetima. Jedan ml kulture je centrifugiran na 14000 o/min tijekom 10 minuta na 4 °C. Potom je uzet nadtalog koji je korišten za ispitivanje antimikrobnog učinka.

Antimikrobna aktivnost nadtaloga provjerena je agar difuzijskim testom u BHI agar s mekim pokrovnim agarom (s 0,7 % agara) u koji su dodavane indikatorske bakterije. Indikatorske bakterije prethodno su namnožene u primjerenom tekućoj podlozi (PPV, BHI, PSB).

Nakon pripreme ploča (tvrdi BHI agar prekriven s 5 ml mekog BHI agara) s indikatorskim mikroorganizmom, u agaru su načinjene jažice u koje se stavlja 100 µL nadtaloga. Kako bi se isključilo antimikrobno djelovanje kiselina, pH nadtaloga je neutraliziran na pH 7 pomoću 1N NaOH. Po nanošenju nadtaloga u jažice, ploče su stavljene u hladnjak na 60 min. te potom inkubirane na 37 °C tijekom 24 sata. Nakon inkubacije provjerena je pojava zone inhibicije rasta indikatorskog mikroorganizma. Istovremena pojava inhibicije rasta indikatorske bakterije oko jažice s nadtalogom te oko jažice s neutraliziranim nadtalogom smatra se preliminarnim dokazom djelovanja antimikrobne tvari koja nije organska kiselina (mliječna, octena i dr.). Proteinska struktura inhibitora provjerena je pomoću enzima proteinaze K (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD). U slučaju pojave inhibicije neutraliziranim nadtalogom i potom izostanka inhibicije neutraliziranim nadtalogom tretiranog proteazom, govorimo o djelovanju bakteriocina ili bakteriocin-sličnoj tvari. Kao

pozitivna kontrola korišten je soj *Enterococcus faecalis* 101, bakteriocin-sintetizirajući enterokok izoliran iz sirovog mlijeka (ZDOLEC i sur., 2016.)

Antimikrobna aktivnost enterokoka ispitana je prema slijedećim bakterijama:

- *Listeria monocytogenes* 8 (izolat iz sirovog mlijeka),
- *Yersinia enterocolitica* 14 (izolat iz tonzila divljih svinja),
- *L. monocytogenes* NCTC 10527,
- *L. monocytogenes* ATCC 7644,
- *Listeria ivanovii* ATCC 19111,
- *Listeria innocua* ATCC 33090,
- *Salmonella* Typhimurium 14028

### 3.3. Mjerenje aktivnosti bakteriocina

Priprema nadtaloga inhibirajuće kulture enterokoka provedena je prema ZDOLEC i sur. (2008.). Ukratko, soj enterokoka s antimikrobnom aktivnosti prema više indikatorskih bakterija namnažan je u 10 ml MRS bujona, potom je ta kultura namnažana dalje u omjeru 1:10 te je dobiveno 1 L kulture. Kultura je podijeljena u 20 jednakih dijelova po 50 ml radi centrifugiranja (Eppendorf centrifuge 5804R) 10 minuta na 5000 o/min. Centrifugiranje je ponovljeno dva puta. Nadtalog je pažljivo odvojen i prikupljen u novu sterilnu čašu (2 L). Izmjeren je pH (pH510, Eutech Instruments, Nizozemska) koji je potom podešen na pH 7 pomoću 10 N NaOH uz stalno miješanje nadtaloga.

Jedan mililitar nadtaloga je steriliziran kroz filtere veličine pora 0,22 µm (FilterBio, Kina). Nakon sterilizacije otopina je razrjeđena u sterilnoj destiliranoj vodi 1:1 tj. načinjena su razrjeđenja 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024. Potom je 100 µl određenog razrjeđenja korištena agar difuzijskom testu s indikatorskom bakterijom kako bi se odredila koncentracija bakteriocina. Ona je jednaka recipročnoj vrijednosti najvećeg razrjeđenja u kojem se pojavljuje inhibicija indikatorske bakterije i izražava se u AU/ml (arbitrarne jedinice/ml).

#### 4. REZULTATI

Rezultati testiranja antimikrobne aktivnosti enterokoka prema različitim sojevima *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *Y. enterocolitica* i *S. Typhimurium* prikazani su u tablicama 1–7. Detalj pretraga prikazan je slikom 1.



Slika 1. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti enterokoka (snimila Nina Vukušić)

Tablica 1. Inhibicija rasta *L. monocytogenes* 8 iz sirovog mlijeka primjenom nadtaloga kulture enterokoka (n=10)

Soj enterokoka	Inhibicija nadtalogom	Inhibicija neutraliziranim nadtalogom (pH 7)
1	+	-
2	+	-
3	-	-
4	+	-
5	+	-
6	-	-
7	+	-
9	+	-
10	+	-
EF-101	+	+



Tablica 2. Inhibicija rasta *L. monocytogenes* ATCC 7644 primjenom nadtaloga kulture enterokoka (n=10)

Soj enterokoka	Inhibicija nadtalogom	Inhibicija neutraliziranim nadtalogom (pH 7)
1	-	-
2	-	-
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6	-	-
7	-	-
9	-	-
10	+	-
EF-101	+	+

Tablica 3. Inhibicija rasta *L. monocytogenes* NCTC 10527 primjenom nadtaloga kulture enterokoka (n=10)

Soj enterokoka	Inhibicija nadtalogom	Inhibicija neutraliziranim nadtalogom (pH 7)
1	-	-
2	-	-
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6	-	-
7	-	-
9	-	-
10	+	-
EF-101	+	+

Tablica 4. Inhibicija rasta *L. ivanovii* ATCC 19111 primjenom nadtaloga kulture enterokoka (n=10)

Soj enterokoka	Inhibicija nadtalogom	Inhibicija neutraliziranim nadtalogom (pH 7)
1	-	-
2	-	-
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6	-	-
7	-	-
9	-	-
10	+	+
EF-101	+	+

Tablica 5. Inhibicija rasta *L. innocua* ATCC 33090 primjenom nadtaloga kulture enterokoka (n=10)

Soj enterokoka	Inhibicija nadtalogom	Inhibicija neutraliziranim nadtalogom (pH 7)
1	-	-
2	-	-
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6	-	-
7	-	-
9	-	-
10	-	-
EF-101	+	+

Tablica 6. Inhibicija rasta *Y. enterocolitica* 14 iz tonzila svinja primjenom nadtaloga kulture enterokoka (n=10)

Soj enterokoka	Inhibicija nadtalogom	Inhibicija neutraliziranim nadtalogom (pH 7)
1	-	-
2	-	-
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6	-	-
7	-	-
9	+	-
10	-	-
EF-101	+	+

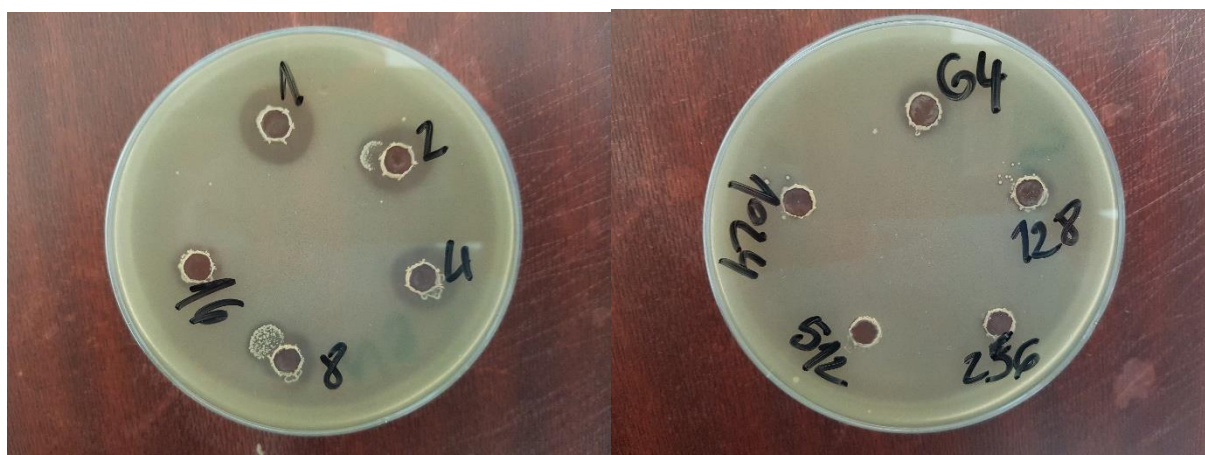
Tablica 7. Inhibicija rasta *S. Typhimurium* ATCC 14028 primjenom nadtaloga kulture enterokoka (n=10)

Soj enterokoka	Inhibicija nadtalogom	Inhibicija neutraliziranim nadtalogom (pH 7)
1	-	-
2	-	-
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6	-	-
7	-	-
9	-	-
10	-	-
EF-101	-	-

Soj *E. faecalis* EF-101 korišten je za karakterizaciju i određivanje njegove koncentracije postupkom serijskih razrjeđivanja (slike 2 i 3).



Slika 2. Određivanje aktivnosti bakteriocina iz nadtaloga *E. faecalis* EF-101 (snimila: Nina Vukušić)



Slika 3. Određivanje aktivnosti bakteriocina iz neutraliziranog nadtaloga *E. faecalis* EF-101 (snimila: Nina Vukušić)

## 5. RASPRAVA

Enterokoki kao predstavnici bakterija mliječne kiseline imaju važnu ulogu u mikrobiologiji hrane, odnosno biotehnologiji i sigurnosti hrane. Naime, nalazimo ih posvuda u okolišu, probavnom sustavu ljudi i životinja te ih se smatralo bakterijama indikatorima onečišćenja hrane. Enterokoki nisu, dakle, nužno pokazatelji fekalne kontaminacije, budući da su ubikvirarne bakterije. Na primjer, multi-rezistentni sojevi enterokoka su izolirani iz sirovog mlijeka sakupljenog iz vimena zdravih krava, koje nikada nisu bile liječene antibioticima, ali su držane uz liječene životinje (ZDOLEC i sur., 2016.). To može ukazivati na prisutnost otporne - rezistentne populacije enterokoka u biosustavu, što je vrlo važno s obzirom na higijenske postupke koji se provode u okviru proizvodnje hrane, a posebice u proizvodnji gotove hrane.

Danas enterokoke smatramo s jedne strane korisnim bakterijama budući da su fermentacijske bakterije koje doprinose senzorskim specifičnostima proizvoda, dok s druge strane su potencijalno virulentne bakterije, tvorci biogenih amina ili nosioci gena rezistencije (ZDOLEC, 2018.). Stoga su enterokoki bakterije s dvojakom ulogom u proizvodnji hrane, a u hrani životinjskog podrijetla najčešće nalazimo vrste *E. faecalis* i *E. faecium* (ČANŽEK MAJHENIČ, 2006.).

Antimikrobna aktivnost enterokoka također nije zanemariva i često stvaraju bakteriocine, antimikrobne peptide koji su potencijalno primjenjivi u hrani kao tzv. prirodni konzervansi. U našem istraživanju pokazalo se da enterokoki djeluju inhibirajuće na sojeve bakterije *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* i *L. innocua* te *Y. enterocolitica*. Antimikrobno djelovanje na sojeve iz roda *Listeria* zabilježeno je i nakon neutraliziranja nadtaloga kulture *E. faecalis* EF-101, što može biti rezultat djelovanja bakteriocina – enterocina. Proteinska struktura inhibitora je potvrđena primjenom proteinaze K, što se smatra dokazom postojanja bakteriocina u otopini (nadtalogu). CRK i ZDOLEC (2018.) navode da *Enterococcus faecalis* 101 pokazuje u agar spot i agar difuzijskim testovima inhibicijsko djelovanje prema referentnom soju *L. monocytogenes* te prema 6 izolata *L. monocytogenes* iz uzoraka hrane životinjskog podrijetla. Autori su istovremenom inokulacijom *E. faecalis* 101 i *L. monocytogenes* ATCC 7644 u BHI/MRS bujonima dokazali evidentno smanjenje populacije patogena u odnosu na bujone bez *E. faecalis*. Pored toga, primjena nadtaloga (neutraliziran nadalog bez stanica) dovela je do još izraženijeg smanjenja broja *L. monocytogenes* u oba tekuća hranilišta.

Općenito, različiti bakteriocini variraju u spektru i načinu antimikrobnog djelovanja, molekularnim težinama, genetskim i biokemijskim svojstvima (JACK i sur., 1995). Njihovo ciljno mjesto je citoplazmatska membrana u kojoj stvaraju pore kroz koje se gubi stanični materijal. S druge strane, učinak hidrofobnih bakteriocina na gram-negativne bakterije onemogućen je strukturom njihova staničnog zida (HELANDER i sur. 1997). Stoga bakteriocini bakterija mliječne kiseline mogu biti aktivni samo protiv srodnih gram-pozitivnih bakterija (JACK i sur., 1995). U našem istraživanju inhibirane su bile upravo gram-pozitivne bakterije, dok je inhibicija izostala u slučaju salmonele. Međutim, iznenađujuć je naš nalaz inhibicije *Y. enterocolitica* i u odsustvu organskih kiselina, što je potrebno dalje istražiti radi potvrde učinka djelovanja enterocina i na gram-negativne bakterije (*Yersinia*). Slične rezultate pokazuju KUBAŠOVA i sur. (2017.) koji nalaze samo dva soja enterokoka (*E. faecium* IK25 i *E. faecium* BRI) s antimikrobnom aktivnosti prema indikatorskim bakterijama i to samo prema *E. faecium*, *Listeria monocytogenes* i *Lactobacillus* spp., dok inhibicije nije bilo prema *Bacillus* sp., *Citrobacter* sp., *Enterobacter* sp., *Escherichia* sp., *Klebsiella* sp., *Proteus* sp., *Salmonella* sp., *Serratia* sp., *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., i *Yersinia* sp. Osim u laboratorijskim uvjetima, antimikrobni učinak enterokoka ispitivan je mnogo puta i u pokusnim proizvodnjama hrane gdje se inhibira *L. monocytogenes* (RUBIO i sur., 2013.) ili stafilocoki (SPARO, 2008.).

Naše istraživanje, uz prije provedene eksperimente na ovom soju (ZDOLEC i sur., 2017; CRK i ZDOLEC, 2018.) proširuje saznanja o njegovoj antimikrobnoj aktivnosti s obzirom na antimikrobni spektar te proteinsku strukturu inhibitora. Primjenjivost enterocina iz *E. faecalis* EF-101 u proizvodnji hrane ili animalnoj proizvodnji moguća je nakon daljnjih istraživanja. U tom smislu ZDOLEC i sur. (2017.) pokazali su da se soj dobro adaptira na mesni supstrat. Inokulacijom *E. faecalis* EF-101 u nadjev fermentiranih kobasica ( $10^5$  CFU/g) broj se enterokoka nije značajno mijenjao tijekom zrenja. Budući se populacija održala stabilnom, autori pretpostavljaju da se soj dobro prilagodio uvjetima fermentacije mesa, no potrebna su daljnja istraživanja i pokusne proizvodnje. Nadalje, zabilježen je i povoljan utjecaj dodane kulture na senzorna svojstva kobasica. Da bi se mogla provesti potpuna procjena senzorskih svojstava kobasica s dodatkom *E. faecalis* 101 potrebno je ispitati potencijalno štetna svojstva soja, poput produkcije biogenih amina, antimikrobne rezistencije i čimbenika virulencije.

Agar-difuzijskim testom nakon razrjeđivanja nadtaloga kulture *E. faecalis* EF-101 u našem istraživanju je zabilježena inhibicija *L. monocytogenes* u razrjeđenju 1:128, primjenom

netretiranog i neutraliziranog taloga. Aktivnost enterocina u zadanim uvjetima pripreme otopine je zadovoljavajuća te je potrebno dodatno ispitati sintezu bakteriocina u različitim uvjetima temperature, pH i dr. kao i njegovu stabilnost.

## 6. ZAKLJUČCI

- enterokoki pokazuju antimikrobnu aktivnost prema vrstama roda *Listeria*
- enterokoki ne inhibiraju Gram-negativne patogene, osim jednog soja koji inhibira patogenu *Y. enterocolitica*
- *E. faecalis* EF-101 potencijalni je probiotički soj budući da sintetizira bakteriocin aktivan prema patogenim bakterijama
- nužno je provesti ispitivanja enterocina u modelima hrane s ciljem uvida u stabilnost i učinak na mikrofloru i kvalitetu hrane



## 7. LITERATURA

1. ANANOU, S., E. VALDIVIA, M. MARTINEZ BUENO, A. GALVEZ, M. MAQUEDA (2004.): Effect of combined physico-chemical preservatives on enterocin AS-48 activity against the enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* CECT 976 strain. *J. Appl. Microbiol.* 97, 48-56.
2. ARIAS - MOLIZ, M. T., P. BACA, S. ORDONEZ - BECERRA, M.P. GONZALEZ-RODRIGUEZ, C.M. FERRER - LUQUE (2012.): Eradication of enterococci biofilms by lactic acid alone and combined with chlorhexidine and cetrimide. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal*, 17, e902–e906. doi: 10.4317/medoral.18133.
3. AYMERICH, T., M. GARRIGA, J. YLLA, J. VALLIER, J.M. MONFORT, M. HUGAS (2000.): Application of enterocins as biopreservatives against *Listeria innocua* in meat products. *J. Food Protect.* 63, 721-726.
4. BELKUM, M.J., M.E. STILES (2000.): Nonantibiotic antibacterial peptides from lactic acid bacteria. *Nat. Prod. Rep.* 17, 323-335.
5. BORGEN, K., M. SORUM, J. WASTESON, H. KRUSE (2001.): VanA-type vancomycin-resistant enterococci (VRE) remain prevalent in poultry carcasses 3 years after avoparcin was banned. *Int. J. Food Microbiol.* 64, 89-94.
6. CALLEWAERT, R., M. HUGAS, L. DE VUYST (2000.): Competitiveness and bacteriocin production of enterococci in production of Spanish style dry fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 57, 33-42.
7. CINTAS, L.M., P. CASAUS, L.S. HAVARSTEIN, H. HOLO, P.E. HERNANDEZ, I.F. NES (2000.): Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the sec-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *J. Bacteriol.* 182, 6806-6814.
8. CRK, D., N. ZDOLEC (2018): Antimicrobial potential of enterococci isolated from raw milk. *Hrvatski veterinarski vjesnik*, 26, 30–34.
9. ČANŽEK MAJHENIĆ, A. (2006.): Enterococci: yin – yang microbes. *Mljekarstvo* 56, 1, 5-20.

10. ENNAHAR, S., N. DESCHAMPS (2000.): Anti-*Listeria* effect of enterocin A, produced by cheese isolated *Enterococcus faecium* EFM01, relative to other bacteriocins from lactic acid bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 88, 449-457.
11. FRANZ, C.M.A.P., M.E. STILES, K.H. SCHLEIFER, W.H., HOLZAPFEL (2003.): Enterococci in foods-a conundrum for food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 105-122.
12. GIRAFFA, G. (1995.): Enterococcal bacteriocins their potencial as anti-*Listeria* factors in dairy technology. *Food Microbiol.* 12, 291-299.
13. GIRAFFA, G., A.M. OLIVARI, E. NEVIANI (2000.): Isolation of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from Italian cheeses. *Food Microbiol.* 17, 671-677.
14. GIRAFFA, G., D. CARMINATI, E. NEVIANI (1997.): Enterococci isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. *J. Food Prot.* 60, 732-738.
15. GRATIA, A. (1925): Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. *Comptes Rendus Biologies*, 93, 1040-1042.
16. HAMMERUM, A. M. (2012.): Enterococci of animal origin and their significance for public health. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 7, 619-625.
17. HELANDER, I., A. VON WRIGHT, T. MATTILA-SANDHOLM (1997): Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against gram-negative bacteria. *Trends Food Sci. Tech.* 8, 146-150.
18. HORN, N., M.I. MARTINEZ, J.M., MARTINEZ, P.E. HERNANDEZ, M.J. GASSON, J.M. RODRIGUEZ, H.M. DODD (1999): Enhanced production of pediocin PA-1 and coproduction of nisin and pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis*. *Appli. Environ. Microbiol.* 65, 4443-4450.
19. HUGAS, M., M. GARRIGA, M.T. AYMERICH (2003.): Funcionalidad de enterococci in meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 223-233.
20. JACK, R. W., J. R. TAGG, B. RAY (1995): Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* 59, 171-200.
21. KLAENHAMMER, T.R. (1988): Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70, 337-49.

22. KUBAŠOVÁ, I., V. STROMPFOVÁ, A. LAUKOVÁ (2017): Safety assessment of commensal enterococci from dogs. *Folia Microbiol.* 62, 491–498.
23. LEMCKE, R., M. BÜLTE (2000.): Occurrence of the vancomycin – resistant genes vanA, vanB, vanC1, vanC2 and vanC3 in *Enterococcus* strains isolated from poultry and pork. *Int. J. Food Microbiol.* 60, 185-194.
24. MARTINEZ, J.M., J. KOK, J.W. SANDERS, P.E. HERNANDEZ (2000.): Heterologous coproduction of enterocin A and pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis*: detection by specific peptide-directed antibodies. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3543–3549.
25. MIRKOVIĆ, N.L. (2016): Karakterizacija i determinacija bakteriocina autohtonih laktokoka. Disertacija, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu.
26. PALMER, K.L., M.S. GILMORE (2010.): Multidrug-Resistant *Enterococci* Lack CRISPR-*cas*. *MBio* 1, e00227-10.
27. RUBIO, R., S. BOVER-CID, B. MARTIN, M. GARRIGA, T. AYMERICH (2013): Assessment of safe enterococci as bioprotective cultures in low-acid fermented sausages combined with high hydrostatic pressure. *Food Microbiol.* 33, 158–165.
28. SPARO, M, G.G. NUÑEEZ, G.G., M. GASTRO, M.L. CALCAGNO, M.A. GARCIA ALLENDE, M. CECI, R. NAJLE, M. MANGHI (2008): Characteristics of an environmental strain, *Enterococcus faecalis* CECT7121, and its effects as -additive on craft dry-fermented sausages. *Food Microbiol.* 25, 607–615.
29. STILES, M. (2002.): Safety aspects of enterococci from food point of view. Symposium on Enterococci in Foods-Functional and Safety aspects, Berlin, 30-31 May 2002, Abstract Book.0
30. TAGG, J. R., A.S. DAJANI, L.W. WANNAMAKER (1976.): Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* 40, 722-756.
31. TEUBER, M., L. MEILE, F. SCHWARZ (1999.): Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Antoine van Leeuwenhoek*, 76, 115-137.
32. VESKOVIĆ – MORAČANIN, S. (2010.): Lactic acid bacteria bacteriocins as natural food protectors – possibilities of applications in food industry. *Tehnologija mesa.* 51, 83-94.

33. VAN TYNE, D., M.S. GILMORE (2014.): Friend turned foe: evolution of enterococcal virulence and antibiotic resistance. *Annu. Rev. Microbiol.*, 68, 337-356.
34. ZDOLEC, N., M. HADŽIOSMANOVIĆ, L. KOZAČINSKI, Ž. CVRTILA, I. FILIPOVIĆ, M. ŠKRIVANKO, K. LESKOVAR (2008): Microbial and physicochemical succession in fermented sausages produced with bacteriocinogenic culture of *Lactobacillus sakei* and semi-purified bacteriocin mesenterocin Y. *Meat Sci.* 80, 480–487.
35. ZDOLEC, N., V. DOBRANIĆ, I. BUTKOVIĆ, A. KOTURIĆ, I. FILIPOVIĆ, V. MEDVID (2016): Antimicrobial susceptibility of milk bacteria from healthy and drug-treated cow udder. *Vet. arhiv* 86, 163-172.
36. ZDOLEC, N., M. ČOP, V. DOBRANIĆ (2017.): Primjena *Enterococcus faecalis* 101 iz mlijeka u proizvodnji trajnih kobasica. *Hrvatski veterinarski vjesnik* 25, 1-2, 56-62.
37. ZDOLEC, N. (2018): Technological interventions in fermented meat production: the commercial perspective. U: *Innovations in technologies for fermented food and beverage industries, Food Microbiology and Food Safety.* (Panda, S.K., P.H. Shetty, Eds.), Springer International Publishing AG, Cham, pp. 175–188.

## 8. SAŽETAK

Enterokoki imaju važnu ulogu u fermentaciji hrane te često pokazuju probiotička svojstva. U ovom radu istražen je njihov antimikrobni učinak *in vitro* prema referentnim sojevima i sojevima izoliranih iz hrane bakterija *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Listeria innocua*, *Yersinia enterocolitica* i *Salmonella* Typhimurium. Korištena je agar difuzijska metoda, a nadtalozni neutralizirani i tretirani proteazom. *Enterococcus faecalis* EF-101 je pokazao snažno inhibicijsko djelovanje prema svim sojevima bakterije roda *Listeria*, kao i soja *Y. enterocolitica* O:3. Karakterizacijom inhibitora utvrđeno je da se radi o tvari proteinske strukture, moguće bakteriocina enterocina čija je aktivnost bila 1280 AU/ml. Potrebna su daljnja istraživanja radi potencijalne primjene enterocina kao prirodnog konzervansa u očuvanju održivosti hrane i povećanja mikrobiološke sigurnosti.

Ključne riječi: enterocin, patogene bakterije, hrana životinjskog podrijetla

## 9. SUMMARY

### Characterisation of bacteriocins produced by enterococci isolated from food of animal origin

Enterococci have an important role in food fermentation and often exhibit probiotic properties. In this paper, their antimicrobial effect was investigated *in vitro* against reference strains and strains isolated from the food - *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Listeria innocua*, *Yersinia enterocolitica* and *Salmonella* Typhimurium. The agar diffusion method was used, and the supernatants were neutralized and treated with protease. *Enterococcus faecalis* EF-101 showed strong inhibitory activity against all strains of *Listeria* as well as *Y. enterocolitica* O:3 strain. By the characterization of the inhibitor, proteinaceous nature was found, a possible bacteriocin enterocin, whose activity was 1280 AU / ml. Further research should be carried out to assess the potential use of enterocin as a natural preservative in food conservation and protection.

Key words: enterocin, bacterial pathogens, food of animal origin

## **10. ŽIVOTOPIS**

Nina Vukušić rođena je 20. srpnja 1991. godine u Zagrebu. Osnovnu školu “Gračani”, kao i opću VII. Gimnaziju pohađala je u Zagrebu. 2012. godine upisuje integrirani preddiplomski i diplomski studij na Veterinarskom Fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Apsolvirala je akademske godine 2018./2019. Tijekom studija bila je aktivni član studentske udruge IVSA (International Veterinary Students` Association) Croatia, a 2015./2016. i 2016./2017. akademske godine i predsjednik udruge. Također bila je član studentskog zbora Veterinarskog fakulteta 2013./2014. i 2017./2018. akademske godine. Tijekom cijelog studija obavljala je različite poslove preko Studentskog servisa.