

# Utjecaj enterocina EF-101 na održivost mljevenog mesa

---

**Kralj, Dea**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

*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:178:400844>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-28**



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
VETERINARSKI FAKULTET**

**Dea Kralj**

**UTJECAJ ENTEROCINA EF-101 NA ODRŽIVOST MLJEVENOG  
MESA**

**DIPLOMSKI RAD**

**Zagreb, 2020.**

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. Lidija Kozačinski
2. prof. dr. sc. Željka Cvrtila
3. izv. prof. dr. sc. Nevijo Zdolec
4. izv. prof. dr. sc. Zrinka Štritof (zamjena)

## ZAHVALA

Hvala mami i tati, baki i prijateljima koji su cijelo ovo putovanje bili uz mene i bodrili me na svakom ispitu.

Posebno se zahvaljujem mom mentoru prof.dr.sc. Neviju Zdolecu na svom znanju koje mi je prenio i pomogao mi izraditi ovaj rad i Ani Konjević koja mi je puno pomogla u laboratorijskom radu.

## Sadržaj

1.	UVOD	1
2.	PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA	3
2.1.	Bakteriocini	3
2.2.	Enterokoki	4
2.3.	Bakteriocini enterokoka – enterocini	5
2.3.1.	Primjena enterocina u hrani životinjskog podrijetla	5
2.3.2.	Antimikrobna aktivnost enterokoka i enterocina <i>in vitro</i> i u hrani	7
2.4.	Mikroflora mljevenog mesa	10
3.	MATERIJAL I METODE	12
3.1.	<i>Enterococcus faecalis</i> EF-101	12
3.2.	Priprema enterocina	13
3.3.	Dodavanje enterocina u mljeveno meso	15
3.4.	Mikrobiološke pretrage mljevenog mesa	15
3.5.	Statistička obrada	16
4.	REZULTATI	17
5.	RASPRAVA	22
6.	ZAKLJUČAK	24
7.	LITERATURA	25
8.	SAŽETAK	32
9.	SUMMARY	33
10.	ŽIVOTOPIS	34

## 1. UVOD

Promjene potrošačkih navika, globalizacija i potražnja za prirodnom i minimalno prerađenom hranom dovela je do promjena u tehnologiji proizvodnje i prerade hrane (VERMA i sur., 2014.). Sve veća globalizacija često zahtijeva produženi rok trajanja prehrambenih proizvoda, a svjesnost potrošača o štetnosti nekih supstanci postavlja nove zahtjeve pa se tako sve više pažnje i istraživanja usmjerava prema alternativnim načinima očuvanja hrane. Tako su otkriveni bakteriocini, peptidne molekule koje sintetiziraju neke bakterije, a koje mogu djelovati kao prirodne antimikrobne tvari i konzervansi u mliječnim proizvodima, mesu, plodovima mora i raznim napitcima. Glavna uloga takvog biokonzerviranja je produžen rok trajanja i unapređenje sigurnosti hrane (VERMA i sur., 2014.). Biokonzerviranje je, dakle, postupak primjene prirodnih tvari u svrhu čuvanja odnosno produženja održivosti hrane. Zahtjevi potrošača uvjetuju takve trendove u kojima se zamjenjuju kemijski aditivi prirodnim spojevima sličnog ili istog djelovanja. Tvari s antimikrobnim djelovanjem nalazimo u brojnim ekosustavima, životinjama, biljkama, mikroorganizmima itd., a posebno su interesantni neribosomski ili ribosomski sintetizirani antimikrobni peptidi (LIU i sur., 2019.).

Bakteriocini su podjeljeni u 4 grupe – lantibiotici, kratki termostabilni peptidi, termolabilni proteini i proteinski kompleksi. 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*. Enterocini pokazuju antimikrobno svojstvo prema bliskim i srodnim bakterijama, a njihovi su bakteriocini iz II skupine bakteriocina koje smatramo malim, toplinski stabilnim i membranski aktivnim peptidima (BELKUM i STILES, 2000.) koji nisu podložni posttranslacijskim modifikacijama (ALVAREZ-CISNEROS i sur., 2011.). Neke od prednosti bakteriocina ove grupe su: stabilnost u ekstremnim uvjetima, dugotrajna aktivnost pri niskim temperaturama i termostabilnost što ih čini potencijalno upotrebljivima u fermentiranoj, smrznutoj i pasteriziranoj hrani (ALVAREZ-CISNEROS i sur., 2011.). Od svih poznatih bakteriocina, nizin, lantibiotik, široko je proučavan i već je odobren kao siguran za primjenu u hrani (VERMA i sur., 2014.). Od nedavno je odobren, i u nekim se zemljama koristi i pediocin AcH/PA1. Zahvaljujući svim navedenim svojstvima enterocini bi osim unaprijeđenja tehnologije i sigurnosti hrane mogli naći još niz primjena u veterinarskoj i humanoj medicini (kao starter kulture, promotori rasta, probiotici). No, obzirom na potencijalna rizična svojstva enterokoka kao starter kultura koje sintetiziraju bakteriocine potrebno ih je potpuno karakterizirati (ZDOLEC i sur., 2017.). Ne smije se zanemariti činjenica da su oni nositelji

gena rezistencije na razne antibiotike i u zadnjih tridesetak godina jedan od glavnih uzročnika bolničkih infekcija. Također, proizvode biogene amine koji su vezani uz epizode trovanja hranom.

S obzirom na navedeno, a u cilju unaprijeđenja sigurnosti i produljenja roka trajanja mljevenog mesa, u ovom radu istraženo je antimikrobno djelovanje enterocina EF-101 u mljevenom mesu koje je bilo skladišteno u hladnjaku tijekom roka trajanja. Pretpostavka je da će enterocin antimikrobno djelovati na patogene bakterije ukoliko su prisutne te na bakterije kvarenja.

## 2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

### 2.1. Bakteriocini

Bakteriocini su peptidne molekule koje se sintetiziraju na ribosomima bakterija i imaju antimikrobno svojstvo, prvenstveno na gram-pozitivne mikroorganizme. Oni jesu antibiotici, ali se taj termin za njih ne koristi kako ih se ne bi zamijenilo s terapijskim antibioticima. Također, od većine terapijskih antibiotika ih razlikuje proteinska struktura i usko područje djelovanja, uglavnom na iste ili blisko srodne mikroorganizme (VERMA i sur., 2014.). Bakteriocine proizvode gram-pozitivne i gram-negativne bakterije, a u manjoj mjeri neke arheje (ZHENG i SONOMOTO, 2015.). Prvi su put opisani 1925. godine, ali interes za njihovu proizvodnju, funkcioniranje i moguće primjene u medicinskim područjima raste tek nedavno (CHIKINDAS i sur., 2017.). TAGG i sur. (1976.) prvi put predlažu termin bakteriocini - proteinski spojevi bakterija koji su sposobni inhibirati rast srodnih bakterija. Prvi podaci o bakteriocinima zabilježeni su u radu o gram-negativnim bakterijama odnosno bakterijom *Escherichia coli* i nazvani su kolicini (GRATIA, 1925.).

Do danas, okarakterizirano je više stotina vrsta bakteriocina iz velikog broja bakterija (KLAENHAMMER, 1988.). Različite vrste bakteriocina opisane su veličinom, inhibicijskim mehanizmom, ciljnim stanicama, spektrom djelovanja, interakcijom s imunološkim sustavom i biokemijskim osobinama (HEGARTY i sur., 2016.). Različiti autori su klasificirali bakteriocine u 3 do 5 grupa, ali se prema zadnjoj klasifikaciji iz 1993. koju je predložio Klaenhammer, svrstavaju u 4 grupe – lantibiotike, kratke termostabilne peptide, termolabilne proteine i proteinske komplekse. 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.

Bakteriocini imaju dva antimikrobna mehanizma, vežu se za specifične receptore na vanjskoj staničnoj membrani što dovodi do povećane propustljivosti ionskih kanala i gubitka intracelularnih elektrolita i/ili pH balansa i prolaze kroz citoplazmatsku membranu indukcijom aktivnih nukleaza. 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 (CINTAS i sur., 2000.). Za detekciju i kvantifikaciju bakteriocina koriste se imunološki testovi (ELISA, western blotting, spot



blotting). Genetski su testovi PCR i DNA hibridizacija kojima se određuje ima li bakterijski soj genetski potencijal za kodiranje određenog bakteriocina (MARTINEZ i sur., 2000.). Informacije o genima za sintezu bakteriocina su i dalje 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.).

## 2.2. Enterokoki

Bakterije iz roda *Enterococcus* (enterokoki) su nekada bile uvrštene u rod *Streptococcus* pa se u veterinarskoj praksi još i danas znaju nazivati streptokokima; točnije, prema Lancefieldovoj podjeli, enterokoki su u početku bili svrstani u skupinu D. Naime, samo po morfološkim karakteristikama teško ih je razlikovati od streptokoka. Kasnije su enterokoki klasificirani kao posebna skupina. U suvremenoj mikrobiologiji rod *Enterococcus* (grč. énteron, crijevo; kókkos, zrno) pripada porodici *Enterococcaceae*, redu *Lactobacillales*. Enterokoki su kuglasti ili jajoliki, nemaju kapsulu, uglavnom nisu gijbljivi i boje se gram pozitivno. Fakultativno su anaerobi s fermentacijskim tipom metabolizma, a tijekom razgradnje ugljikohidrata uglavnom tvore L(+) mliječnu kiselinu i ne tvore katalazu. Rastu na temperaturama od 10 °C do 45 °C i pri pH od 9.6. Koloniziraju tlo, vodu i hranu te mogu preživjeti u različitim vremenskim uvjetima. Nalazimo ih kao komenzale u gastrointestinalnom sustavu i često uzrokuju infekcije urinarnog trakta, bakterijemiju, meningitis, neonatalne infekcije i infekcije rana.

Unatoč tome što neki sojevi *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus faecium* ne pokazuju virulentna svojstva, ne proizvode biogene amine niti su rezistentni na antibiotike (CALLEWAERT i sur., 2000.), a sama skupina pokazuje probiotska svojstva te ima važnu ulogu u fermentaciji hrane, enterokoki se ne smatraju “dobrim” GRAS (eng. generally recognized as safe) bakterijama. Kao što je već ranije napomenuto, oni mogu stvarati biogene amine, aktivne kemijske spojeve, kojima se pripisuju epizode trovanja hranom. Također, zadnjih par desetljeća veliki problem predstavljaju dvije vrste enterokoka, *E. faecalis* i *E. faecium* koji izazivaju bolničke infekcije koje su teško izlječive zbog rezistencije na antibiotike (HAMMERUM, 2012., VAN TYNE i GILMORE, 2014.) Karakteristika ovog roda je visoki

stupanj urođene rezistencije na antibiotike koji se uobičajeno koriste u humanoj i veterinarskoj medicini kao što su cefalosporini, klindamicin i trimetoprim-sulfametoksazol. Osim toga, smanjene su osjetljivosti na peniciline i aminoglikozide. Osim urođene rezistencije, značajna karakteristika enterokoka je ta da vrlo lako stječu nove mehanizme rezistencije. Stoga je vankomicin rezistentan *E. faecium* vrlo visoko na listi Svjetske zdravstvene organizacije na kojoj se nalaze mikrobi za koje je nužno razviti nove antibiotike (PINTARIĆ i sur., 2018.). Enterokoki rezistentni na vankomicin (VRE- vankomicin-rezistentni enterokoki), posebice *E. faecium*, pronađeni u goveđem i svinjskom mesu, mesu peradi, mesnim proizvodima (BORGEN i sur., 2001., LEMCKE i BÜLTE, 2000.), industriji sira i tradicionalnim siranama (TEUBER i sur., 1999.; GIRAFFA i sur., 2000.).

### **2.3. Bakteriocini enterokoka – enterocini**

Enterocini su vrsta bakteriocina, peptidnih molekula sintetiziranih na ribosomima bakterija, koje proizvode bakterije iz roda *Enterococcus*, kao što su *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* i *E. mundii*. Baktericidni učinak enterokoka je prvi put primijetio Kjems 1955. godine dok je proučavao bakteriofage. Od tada je opisan i karakteriziran velik broj enterocina (KJEMS, 1955., cit. KHAN i sur., 2010.). Mnogi imaju snažni baktericidni učinak prema bakterijama kvarenja ili patogenim mikroorganizmima prisutnima u hrani kao što su *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium* spp., *E. coli*, *Vibrio cholerae* i *Bacillus cereus* te zbog toga imaju važnu ulogu kao prirodni konzervansi (GIRAFFA i sur., 1997.). Enterocine je teško klasificirati jer imaju zajednička obilježja jednog ili više razreda i podrazreda bakteriocina pa FRANZ i sur. (2003.) predlažu novu podjelu temeljenu na njihovih posebnim karakteristikama:

I. razred – lantibiotički enterocini

II. razred – nelantibiotički enterocini; podijeljen u tri podrazreda

III. razred – ciklički enterocini

IV. razred – veliki, termolabilni proteini

#### **2.3.1. Primjena enterocina u hrani životinjskog podrijetla**

Enterokoki u hrani životinjskog podrijetla imaju dvojaku ulogu; potencijalno su patogeni i korisni, sintetiziraju enterocin - bakteriocin koji može uništavati druge bakterije. Većina bakteriocina je termostabilna pa tako može podnijeti termičku obradu hrane. Neki mogu

djelovati pri niskom pH i niskim temperaturama pa bi zato mogli biti korisni u preradi i obradi hrane u procesima kod kojih se koristi niska temperatura (VERMA i sur. 2014.). Također, oni su najprihvatljivije alternative korištenju konzervansa jer nisu štetni za eukariotsku stanicu i bivaju razgrađeni u želudcu zbog njihove proteinske strukture (KHAN i sur. 2010.). U raznim istraživanjima dokazano je baktericidno djelovanje enterocina na patogene i bakterije kvarenja (GIRAFFA, 2003.).

U raznim istraživanjima enterocini su izolirani iz različitih izvora, uključujući hranu za ljudsku prehranu i hranu za životinje. Zbog svojih svojstava mogu biti upotrebljeni kao starter kulture, antimikrobni starteri i/ili direktno dodani tijekom procesa fermentacije hrane. Primjena bakteriocina u biokontroli hrane uglavnom je orijentirana u dva alternativna smjera: (1) upotreba bakterija mliječne kiseline koje proizvode bakteriocin ili (2) izravno dodavanje bakteriocinskih pripravaka, sintetskih ili pročišćenih iz kulture nadtaloga (HUGAS i sur., 2003.). Već dugo se zna da neki sojevi enterokoka imaju svojstvo proizvodnje enterocina i mogu imati važnu ulogu u prirodnom očuvanju mesa kontrolirajući rast nekih patogena. Sojevi enterokoka koji proizvode bakteriocin s jakim anti-listerijskim djelovanjem, izolirani su iz različitih izvora kao npr. silaže (KATO i sur., 1994.), mliječnih proizvoda (PARENTE i HILL, 1992.; OLASUPO i sur., 1994.; VLAEMYNCK i sur., 1994.; MAISNIER-PATIN i sur., 1996.; O'KEEFFE i sur., 1999.), ribe (BEN EMBAREK i sur., 1994.), povrća (FRANZ i sur., 1996.; BENNIK i sur., 1998.) i fermentiranih kobasica (AYMERICH i sur., 1996.; CINTAS i sur., 1997., 1998.; CASAUS i sur., 1997.). Enterokokni bakteriocini (enterocini A, B, P, L50, Q i 1071) pokazali su se jakim inhibitorima rasta patogena u hrani kao što je *L. monocytogenes*, *Cl. tyrobutyricum* i *S. aureus* (AYMERICH i sur., 1996.; CASAUS i sur., 1997.; CINTAS i sur., 1997., 1998., 2000.; BALLA i sur., 2000.). Glavni faktori koji utječu na efikasnost i sintezu bakteriocina u mesu su neadekvatni okoliš za rast soja i/ili sinteze bakteriocina, gubitak mogućnosti sinteze bakteriocina, postojanje antagonističke populacije bakterija, pojava rezistencije na bakteriocin i stvaranje neaktivnih kompleksa između bakteriocina i makromolekula (HUGAS i sur., 2003.).

Da bi enterokoke 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 rezistentni na antibiotike pa ih to čini potencijalno primjenjivima u raznim prehrambenim proizvodima. Do sada, samo se nizin i pediocin AcH/PA1 koriste komercijalno u nekim zemljama kao biokonzervansi. Najčešći

razlozi za neupotrebljavanje enterocina su zakonske regulative za korištenje dodataka u prehrambenoj industriji, brza adaptacija patogenih bakterija na bakteriocine i njihov uski spektar djelovanja. Istraživanja su zato sve više usmjerena prema 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.). Za dobivanje dozvole korištenja novootkrivenog enterocina u hrani, potrebno je zadovoljiti niz zakonskih regulativa, toksikoloških analiza i analiza učinkovitosti, opisati detaljno proizvodnju istog i poštovati sigurnosne razine (CLEVELAND i sur., 2001.; FIELDS i sur., 1996.). Za komercijalnu primjenu bitno je i izračunati ekonomski trošak za proizvodnju i primjenu (ANANOU i sur., 2008.).

### **2.3.2. Antimikrobna aktivnost enterokoka i enterocina *in vitro* i u hrani**

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 prethodno smatralo indikatorima onečišćenja hrane. Međutim, zbog svoje ubikvitarnosti, nisu nužno pokazatelji fekalne kontaminacije (VUKUŠIĆ i ZDOLEC, 2019.). Posljednjih godina intenzivirala su se istraživanja antimikrobnog potencijala enterokoka iz hrane te njihove upotrebe u konzerviranju hrane. VUKUŠIĆ i ZDOLEC (2019.) izdvajaju nekoliko primjera iz literature poput ANANOU i suradnika (2004.) koji 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. Nadalje, 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 smanjivanju populacije *L. innocua* u raznim mesnim proizvodima (kuhana šunka, pašteta, fermentirani proizvodi).

U puno se istraživanja već dokazalo kako bakterije mliječne kiseline pokazuju inhibicijsko djelovanje na *E. coli* O157:H7 kada su inokulirani u mljeveno meso i ostalu hranu (BRASHEARS i sur., 1998.). SMITH i sur. (2005.), također bilježe antimikrobni učinak na *Salmonella* spp. i *E. coli*. CHAKCHOUK-MTIBAA i sur. (2017.) u istraživanju učinkovitosti polupročišćenog bakteriocina BacFL32 u mljevenom purećem mesu dokazuju njegovo

antimikrobno djelovanje na aerobne bakterije, odnosno da se rok trajanja mljevenog mesa produžio za 7 dana. Što se tiče psihrotrofnih bakterija i enterobakterija, njihov broj se smanjio i na kraju skladištenja bio znatno manji od broja bakterija u kontrolnoj skupini. Osim mikrobioloških parametara, autori su proučavali fizikalno - kemijske i senzorne parametre mljevenog mesa tijekom skladištenja. Dokazali su da je dodatak bakteriocina BacFL31 produžio rok trajanja i poboljšao senzorna svojstva. Bakteriocin su primjenjivali u koncentraciji od 200 AU/g i 400 AU/g, a veća koncentracija je pojačavala inhibitorni učinak na rast bakterija. U kontrolnoj skupini je pH s početne vrijednosti od 5,83 rastao do 7, dok je u testnim uzorcima s 200 AU/g rastao do 6,48, odnosno ostao isti u uzorcima s 400 AU/g.

U Hrvatskoj, VUKUŠIĆ i ZDOLEC (2020.) su istraživali antimikrobnu aktivnost enterokoka iz hrane životinjskog podrijetla pri čemu su koristili indikatorske bakterije *L. monocytogenes* (izolat iz sirovog mlijeka), *Yersinia enterocolitica* (izolat iz tonzila divljih svinja), *L. monocytogenes* NCTC 10527, *L. monocytogenes* ATCC 7644, *Listeria ivanovii* ATCC 19111, *Listeria innocua* ATCC 33090 i *Salmonella* Typhimurium 14028. Kao pozitivnu kontrolu koristili su bakteriocinogeni soj *E. faecalis* EF-101, koji je primijenjen i u ovom diplomskom radu. Istraživanje je pokazalo da pojedini sojevi (2 od 10 testiranih) enterokoka djeluju inhibirajuće na sojeve bakterije *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* i *L. innocua* te *Y. enterocolitica*. U slučaju *E. faecalis* EF-101, antimikrobno djelovanje na sojeve iz roda *Listeria* zabilježeno je i nakon neutraliziranja nadtaloga kulture, što može biti rezultat djelovanja bakteriocina. Proteinska struktura inhibitora je potvrđena primjenom proteinaze K, što se smatra dokazom postojanja bakteriocina u otopini (nadtalogu). CRK i ZDOLEC (2018.) također ističu da *E. faecalis* EF-101 pokazuje u agar spot i agar difuzijskim testovima inhibicijsko djelovanje prema referentnom soju *L. monocytogenes* te prema šest izolata *L. monocytogenes* iz uzoraka hrane životinjskog podrijetla. Autori su istovremenom inokulacijom *E. faecalis* EF-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 nadtalog bez stanica) dovela je do još izraženijeg smanjenja broja *L. monocytogenes* u oba tekuća hranilišta.

Enterocini ili enterocin-sintetizirajuće mikrobne kulture su također primjenjivane u različitim proizvodima životinjskog podrijetla u smislu testiranja njihova djelovanja na umjetno inokuliranu patogenu mikrofloru. YILDIRIM i sur. (2016.) su inokulirali soj *L. monocytogenes* ATCC 7644 u sterilizirano mlijeko u različitim koncentracijama zajedno s različitim koncentracijama enterocina KP. Utvrdili su snažno inhibirajuće djelovanje

enterocina, no taj je učinak bio obrnuto proporcionalan sadržaju masti u mlijeku i koncentraciji patogena; odnosno što je mlijeko imalo manji sadržaj masti i manji početni broj patogena, enterocin je bio učinkovitiji. Željeni utjecaj enterocina na *L. monocytogenes* potvrđen je i u različitim mliječnim proizvodima, poput jogurta i različitih tradicionalnih i industrijskih sireva (LAUKOVA, 2012.; cit. CRK i ZDOLEC, 2018.). RUBIO i sur. (2013.) istraživali su primjenjivost tri bakteriocinogena soja enterokoka u slabo kiselim fermentiranim kobasicama s ciljem smanjivanja populacije *L. monocytogenes* i *S. aureus*. Sva tri soja uspješno su prerasla prirodnu mikrofloru enterokoka, a dva su soja potpuno inhibirala rast *L. monocytogenes* tijekom zrenja kobasica, no ne i *S. aureus*. SPARO i sur. (2008.) su koristili kulturu *E. faecalis* mliječnog podrijetla u proizvodnji fermentiranih kobasica. Autori nisu našli statistički značajnih razlika između kontrolne i kobasica u koje je inokulirana kultura *E. faecalis* CECT7121 s obzirom na proizvodnju mliječne kiseline, pH oscilacije, postizanja minimalne vrijednosti pH od 5,1 i senzoričke analize u obje serije. Kobasice s inokuliranim *E. faecalis* CECT7121 su imale manji broj populacije enterobakterija, *S. aureus* i drugih gram+ koka na kraju fermentacije. ZDOLEC i sur. (2017.) inokulirali su soj *E. faecalis* EF-101 u trajne kobasice (zrenje 40 dana) s ciljem uvida utjecaja na prirodnu mikrofloru proizvoda te senzorna svojstva. Pokazalo se da je broj aerobnih mezofilnih bakterija u kontrolnim kobasicama bio manji za približno 1 log u odnosu na kobasice s dodatkom *E. faecalis* do 30. dana zrenja, da bi u gotovom proizvodu bio podjednak u obje skupine kobasica. U kobasicama s kulturom *E. faecalis* broj aerobnih mezofilnih bakterija se povećavao do 14. dana ( $8 \times 10^6$  CFU/g) te potom smanjivao za 1 log prema kraju zrenja. U kontrolnim se kobasicama broj značajno povećavao u ranijoj fazi fermentacije (do 14. dana). Nadalje, broj kvasaca i plijesni u kontrolnim kobasicama bio je ispod granica detekcije metode brojenja ( $< 100$  CFU/g), i tek neznatno veći od tog 40. dana zrenja. U kobasicama s kulturom *E. faecalis* broj kvasaca i plijesni se povećavao do 14. dana ( $2,9 \times 10^4$  CFU/g) te potom smanjivao na neznatnih  $5 \times 10^2$  CFU/g. Broj enterokoka je u kontrolnim kobasicama bio ispod 100 CFU/g što govori o dobroj higijenskoj praksi u proizvodnji. U kobasicama s kulturom *E. faecalis* broj enterokoka bio je na razini  $10^5$  CFU/g tijekom zrenja, bez značajnih odstupanja. Budući da se populacija održala stabilnom, pretpostavka je da se soj dobro prilagodio uvjetima fermentacije mesa. Primjenom kulture *E. faecalis* broj bakterija mliječne kiseline nije se značajno mijenjao (5-6 log CFU/g), dok je u kontrolnim uzorcima njihov broj bio u stalnom porastu. Senzornom ocjenom kontrolnih kobasica najbolje su ocijenjena svojstva kvalitete masti, okusa, mirisa, a najslabijim ocjenama svojstva nježnosti i sočnosti što je vjerojatno posljedica presušenosti kobasica. Kobasice s kulturom *E. faecalis* su ocjenjivane bez kušanja i nisu pokazale nikakva odstupanja

u kvaliteti ocjenjivanih svojstava u odnosu na kontrolne kobasice. U nedavnom su istraživanju ZDOLEC i sur. (2020.) pratili utjecaj kulture *E. faecalis* EF-101 na količine biogenih amina kadaverina, histamina, feniletilamina, putrescina, spermidina, triptamina i tiramina tijekom zrenja trajnih kobasica. Nije zabilježena povezanost broja enterokoka i količine kadaverina, histamina, tiramina, indeksa biogenih amina i ukupnih amina. U kontrolnim je kobasicama količina histamina i tiramina umjereno korelirala s brojem bakterija mliječne kiseline. Ukupna količina biogenih amina u pokusnim je kobasicama bila znakovito veća ( $p < 0,05$ ) tek 14. dan zrenja. Istraživanje je pokazalo da bakteriocinogena kultura *E. faecalis* EF-101 reducira količinu histamina i kadaverina, vjerojatno sistiranjem aminogene mikroflore.

#### **2.4. Mikroflora mljevenog mesa**

Mljeveno meso predstavlja idealnu podlogu za rast mikroorganizama koji mogu sudjelovati u procesima kvarenja ili čak izazvati oboljenja ljudi. Razlog bržeg mikrobnog rasta je u razaranju stanica tkiva usitnjavanjem mesa, kidanju vezivnotkivnih ovojnica te oslobađanju tekućine i nutrijenata (MILIN, 2015.). Osim što je dobar medij za razmnožavanje mikroorganizama, ograničena trajnost mljevenoga mesa pripisuje se velikom početnom broju bakterija te uporabi mesa loše kakvoće (DURAKOVIĆ i sur., 2002.). Naknadno onečišćenje mljevenoga mesa moguće je tijekom procesa obrade mesa i pohrane. Pri tome je bitna i ambalaža (pakovina) koja treba biti nepropusna za vodu, kako bi se smanjila mogućnost stvaranja pogodnih uvjeta za rast bakterija. Temperatura na kojoj se čuva mljeveno meso u proizvodnji iznosi od  $+0,5$  °C do  $+4$  °C, dok se u prodavaonicama čuva na temperaturi i do  $+8$  °C. Temperatura od  $+4$  °C, koja je uobičajena temperatura čuvanja mesnih prerađevina povoljno djeluje na mogućnost razmnožavanja psihrotrofnih bakterija. Laka kvarljivost, visoki stupanj bakterijske kontaminacije te velika mogućnost sekundarne kontaminacije razlog su zbog kojeg je mljeveno meso vrlo čest uzročnik alimentarnih infekcija i intoksikacija (BIJELIĆ, 2016.).

Mljeveno meso posebno je osjetljivo u smislu higijene u proizvodnji i sigurnosti proizvoda. Pri usitnjavanju mesa, mikroflora koja se nalazi na površini podjednako se raspoređuje u mljevenom mesu, što povećava dodirnu površinu mikroorganizama i mesa, te uz visok aktivitet vode dovodi do brže bakterijske razgradnje i kvarenja nego li u porcioniranom mesu (MILIN i sur., 2016.). U primarnoj mikroflori mesa prevladavaju gram-negativne bakterije što uključuje i vrlo česte crijevne bakterije kao što su *E. coli*, *Salmonella* spp. te neke

vrste roda *Pseudomonas*, a od gram-pozitivnih najčešće nalazimo laktobacile i enterokoke (JAY i sur., 2005.; cit. MILIN, 2015.).

Početni ukupni broj bakterija u mljevenom mesu presudan je za daljnji tijek mikrobioloških procesa u pakiranom mesu. Održivost je proizvoda također ovisna o temperaturi pohrane (LIMBO i sur., 2010.). MILIN i sur. (2016.) navode inicijalni broj aerobnih mezofilnih bakterija u mljevenom mesu pakiranom u modificiranoj atmosferi od  $6 \log_{10}$  CFU/g što uvjetuje i kraću održivost proizvoda, a posebice pri oscilacijama temperature pohrane. Kvarenje obično nastupa pri porastu mikrobne populacije do  $10^7$ - $10^8$  CFU/g ili pak  $10^9$  CFU/g kada nastupaju proteolitički procesi (BROOKS i sur., 2008.). MILIN i sur. (2016.) navode da ukupni broj bakterija takve granične vrijednosti postiže 6. dana pohrane (kontrolni uzorci, MAP, bez dodataka), dok se dodavanjem ekstrakata začina, stabilizatora, antioksidansa ili bakteriocinogene kulture *Leuconostoc mesenteroides* ukupni broj bakterija donekle sistira pa je i održivost mesa potencijalno duža. U tom istraživanju broj aerobnih mezofilnih bakterija povećava se značajnije 6. dana pohrane, a isti trend pokazuje i broj bakterija mliječne kiseline. Enterokoki su bili druga najbrojnija mikrobna populacija u mljevenome mesu, a broj im se do kraja roka trajanja povećao za 1 log (s  $4 \log_{10}$  CFU/g na  $5 \log_{10}$  CFU/g). Broj enterobakterija, koliformnih te stafilokoka se u usitnjenom mesu povećavao kontinuirano do kraja roka trajanja, a *E. coli* je utvrđena od 7. dana pohrane.



### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. *Enterococcus faecalis* EF-101

*Enterococcus faecalis* EF-101 izdvojen je iz sirovog mlijeka u prijašnjem istraživanju (ZDOLEC i sur., 2016.). Identifikacija soja provedena je pomoću MALDI-TOF prema preporukama proizvođača (Bruker Daltonik, Bremen, Njemačka) u Institutu Ruđer Bošković (dr. sc. Snježana Kazazić). Ukratko, uzorak za MALDI-TOF MS analizu je pripremljen postupkom za ekstrakciju etanola/mravlje kiseline. Nekoliko kolonija suspendirano je u 300  $\mu$ L vode (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD) i dodano 900  $\mu$ L etanola (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska) te pomiješano sa staničnom suspenzijom. Nakon centrifugiranja na 13 000 okretaja u minuti tijekom 2 minute, supernatant je odbačen. Talog je pomiješan s 10  $\mu$ L 70%-tne mravlje kiseline (v/v) (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD) i dodan je jednak volumen acetonitrila (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD). Smjesa je centrifugirana na 13 000 rpm tijekom 2 minute. 1  $\mu$ L supernatanta nanešen je na ploču od poliranog čelika i osušen na zraku na sobnoj temperaturi. Svaki uzorak prekriven je s 1  $\mu$ L MALDI matriksa (zasićena otopina  $\alpha$ -cijano-4-hidroksicijanaminske kiseline (HCCA, Bruker Daltonik, Njemačka) u 50% acetonitrila i 2.5% trifluoroctene kiseline) (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD) i osušen na zraku na sobnoj temperaturi.

Maseni spektri su automatski generirani pomoću microflex LT MALDI TOF masenog spektrometra (Bruker Daltonik, Bremen, Njemačka) koji je korišten u linearnom pozitivnom modu unutar raspona mase od 2 000 – 20 000 Da. Instrument je kalibriran pomoću Bruker bakterijskog standardnog testa. Zabilježeni maseni spektri su obrađeni MALDI Biotyper 3.0 softverskim paketom (Bruker Daltonik, Bremen, Njemačka), koristeći standardne postavke. Izlaz u MALDI Biotyperu je log vrijednost rezultata u rasponu 0 – 3.0 koja predstavlja vjerojatnost ispravne identifikacije izolata, izračunata uspoređivanjem pikova (engl. peak) nepoznatog izolata s referentnim spektrom u bazi podataka. Korišteni su sljedeći kriteriji za identifikaciju: rezultat od 2,300 do 3,000 ukazivao je na vrlo vjerojatnu identifikaciju na razini vrste, rezultat od 2,000 do 2,299 ukazivao je na sigurnu identifikaciju roda s vjerojatnom identifikacijom vrste, rezultat 1,700 do 1,999 ukazivao je na vjerojatnu identifikaciju na razini roda, a rezultat <1,700 smatrao se nepouzdanim.

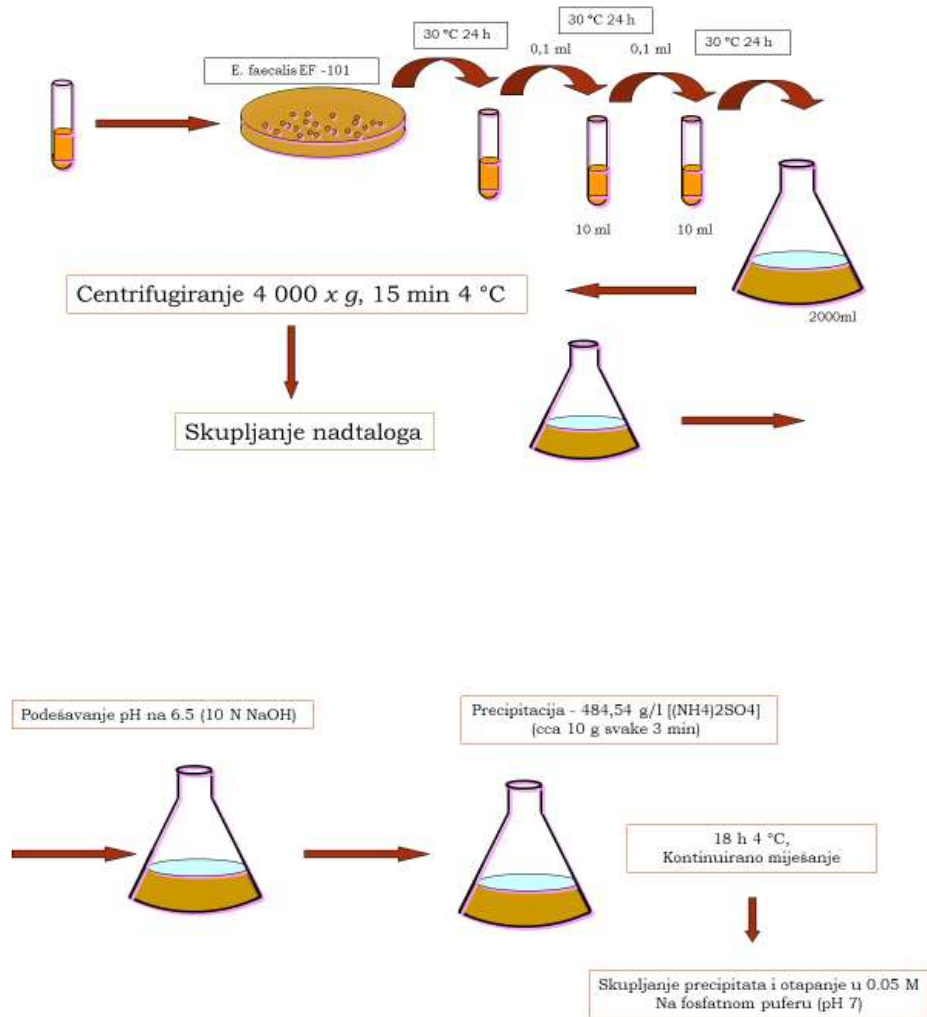
### 3.2. Priprema enterocina

Preliminarno je antimikrobna aktivnost soja testirana agar difuzijskim testom primjenom bakterije *L. monocytogenes* NCTC 10527 kao indikatorskog mikroorganizma. Soj je namnažan u MRS bujonu (Merck, Darmstadt, Njemačka) tijekom 24 h na 37 °C. Potom je aktivna kultura centrifugirana na 10000 o/min tijekom 10 minuta na 4 °C. Nadtalog je izdvojen te neutraliziran s 1M NaOH. Brain Heart Infusion agar je prekriven s mekim (0,8 % agara) BHI agarom u koji je dodano 0,1 ml kulture *L. monocytogenes*. Potom su načinjene jažice u koje je dodano 100 µl kulture *E. faecalis* EF-101, supernatanta kulture te neutraliziranog supernatanta. Ploče su potom ostavljene 60 min. u hladnjaku i zatim inkubirane 24 h na 37 °C. Po inkubaciji provjerena je pojava zone inhibicije rasta *L. monocytogenes*. Pojava zone inhibicije oko jažice s neutraliziranim supernatantom smatra se posljedicom djelovanja inhibitora koji nije organska kiselina. 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.

Priprema nadtaloga inhibirajuće kulture enterokoka provedena je prema ZDOLEC i sur. (2008.). Ukratko, soj je namnažan 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. Pri temperaturi od 4 °C u supernatant je radi precipitacije bakteriocina dodano 484,54 g/l amonij-sulfata [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] (cca 10 g svake tri minute). Otopina je potom držana 18 sati na 4 °C uz stalno polagano miješanje na magnetskoj mješalici. S površine i postranih stijenki posude sakupljena je opna stvorenog precipitata i prebačena u 0,05 M natrij fosfatnog pufera (pH 7).

Jedan mililitar nadtaloga je steriliziran kroz filtere veličine pora 0,22 µm (FilterBio, Kina). Nakon sterilizacije otopina je razrijeđena 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 korišten u 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). Postupak pripreme enterocina je sažeto prikazan na slici 1.



Slika 1. Postupak pripreme enterocina (ZDOLEC i sur., 2008.)

### 3.3. Dodavanje enterocina u mljeveno meso

Za potrebe istraživanja korišteno je mljeveno meso pakirano u modificiranoj atmosferi kupljeno u maloprodaji. Odvagano je po 10 g mljevenog mesa u sterilne vrećice za homegenizaciju. Ukupno je odvagano 30 uzoraka, od čega je u 15 uzoraka dodavan enterocin. Aktivnost bakteriocina izmjerena je prije dodavanja u uzorke kako je gore opisano. Količina dodane otopine bakteriocina prilagođena je masi uzorka, odnosno preračunata na 10 g mesa. Po danu uzorkovanja pretražena su tri uzorka svake skupine.

### 3.4. Mikrobiološke pretrage mljevenog mesa

Kontrolni uzorci i uzorci s dodanim enterocinom (n=30) pohranjeni su u hladnjak na 4 °C te pretraživani 0., 1., 2., 3. i 4. dana pohrane.



Slika 2. Detalj mikrobiološke pretrage mljevenog mesa

U uzorak mesa dodano je 90 ml puferirane peptonske vode te homogenizirano 2 minute (Stomacher, 400 Circulator, Seward, UK). Nakon homogenizacije načinjena su serijska decimalna razrjeđenja i provedeno nacijepljivanje na određene selektivne i neselektivne hranjive podloge u triplikatu radi određivanja broja: aerobnih mezofilnih bakterija na Plate

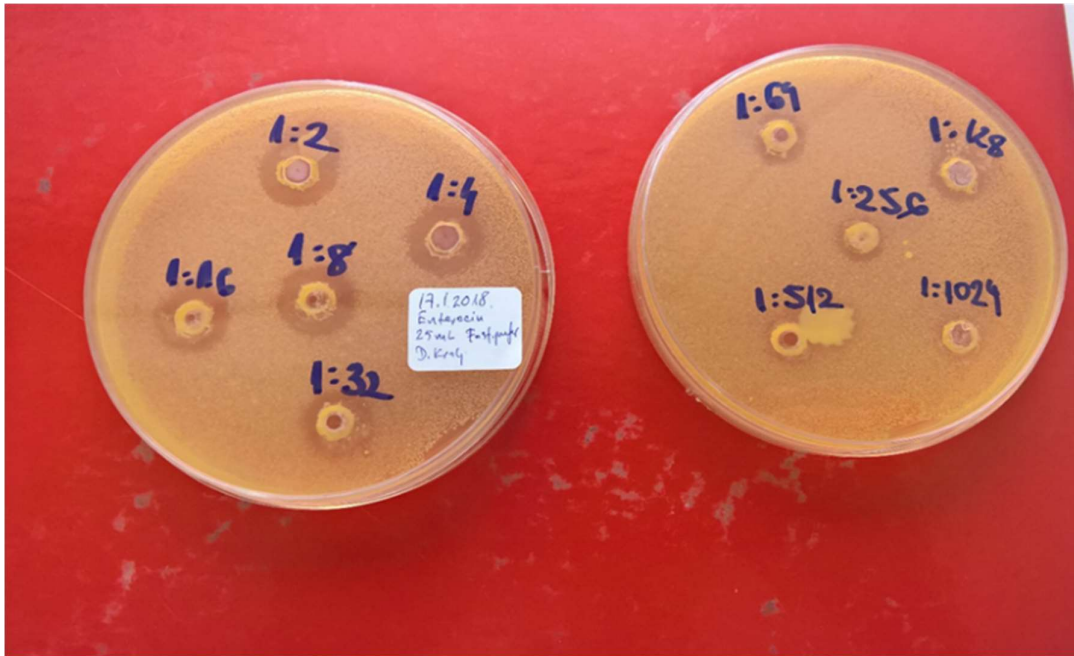
Count Agar-u (PCA, BioMerieux, Francuska) uz inkubaciju pri 30 °C tijekom 72 sata, psihrofilnih bakterija na PCA agaru pri 6,5 °C tijekom 10 dana, bakterija mliječne kiseline na MRS agaru (Biomerieux, Francuska) prekrivenom s 5 ml istog medija pri 30 °C 48-72 sata, koagulaza-negativnih stafilokoka na Baird Parker agaru (Merck, Njemačka) pri 37 °C tijekom 48 sati, enterobakterija na VRBG agaru (Merck, Njemačka) pri 37 °C tijekom 24 sata, *Escherichia coli* i ostalih koliformnih na Rapid *E.coli* agaru (Biorad, SAD) pri 44 °C 24 sata i *L. monocytogenes* na Palcam agaru (Merck, Njemačka) pri 37 °C tijekom 24 sata. pH otopine je izmjerena nakon uzimanja inokuluma za mikrobiološke pretrage (pH metar, pH 510 Eutech instruments, Nizozemska).

### **3.5. Statistička obrada**

Podaci su statistički obrađeni u programu Statistica 13.5. Osnovna statistička analiza provedena je uobičajenim metodama deskriptivne statistike, a rezultati su izraženi kao srednja vrijednost i standardna devijacija ( $\bar{x} \pm SD$ ). Provjera normalnosti raspodjele utvrđena je Kolmogorov-Smirnovim testom na temelju kojeg je odabran Studentov t-test za testiranje statističke hipoteze. Značajnost razlika srednjih vrijednosti dviju skupina uzoraka promatrana je na razini značajnosti  $p < 0,05$ .

#### 4. REZULTATI

Mjerenjem aktivnosti polupročišćenog bakteriocina enterocina EF-101 utvrđena je inhibicija *L. monocytogenes* u razrjeđenju 1:256 (slika 3) što je dobar pokazatelj antimikrobnog potencijala inhibitora *in vitro*.



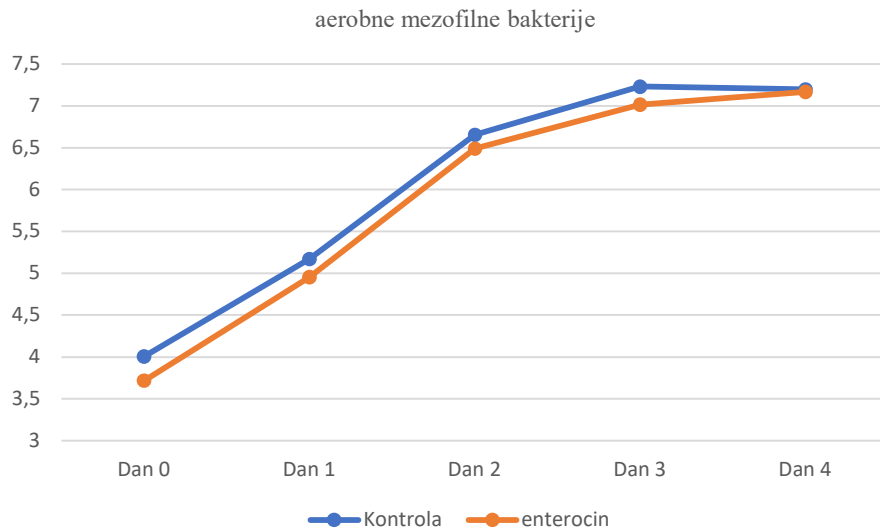
Slika 3. Prikaz agar difuzijskog testa u jažicama enterocina EF-101 s indikatorskom bakterijom *L. monocytogenes* NCTC 10527. Inhibicija u najvećem razrjeđenju 1:256.

Broj *E. coli* i *L. monocytogenes* bio je ispod granica detekcije metoda ( $< 2 \log_{10}$  CFU/g) u svim uzorcima. U tablici 1. prikazani su rezultati mikrobioloških pretraga mljevenog mesa bez enterocina (kontrola) i uz dodatak enterocina. Iz tablice je vidljivo da se je broj svih mikrobnih populacija u mljevenom mesu bez enterocina ili njegovim dodavanjem povećavao tijekom 4 dana pohrane. Ukupno gledajući, uočava se smanjenje broja enterobakterija pri kraju pohrane, odnosno 3. i 4. dana u uzorcima s enterocinom, kao i bakterija mliječne kiseline. Nultoga dana u uzorcima s enterocinom nije bilo koliformnih bakterija dok je u uzorcima s enterocinom njihov broj bio i do  $2,3 \log_{10}$  CFU/g. Broj bakterija mliječne kiseline u uzorcima s enterocinom je manji tijekom cijelog vremena skladištenja.

Tablica 1. Rezultati mikrobiološke pretrage ( $\log_{10}$  CFU/g;  $\bar{x} \pm SD$ ) i pH mljevenog mesa s enterocinom i bez njega

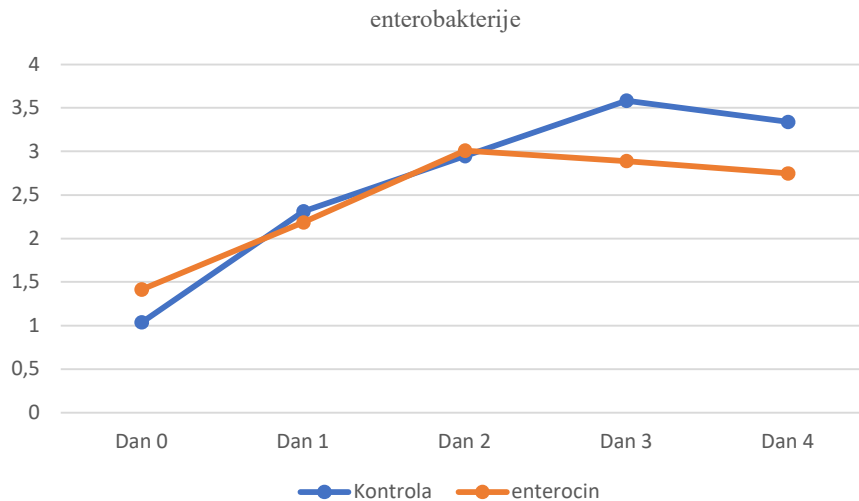
Parametar		Dani pohrane (4 °C)				
		0	1	2	3	4
Aerobne mezofilne bakterije	Kontrola	4,00±0,06	5,17±0,08	6,65±0,26	7,23±0,38	7,19±0,52
	Enterocin	3,71±0,21	4,95±0,49	6,49±0,37	7,01±0,09	7,16±0,37
Bakterije mliječne kiseline	Kontrola	3,18±0,05	3,81±0,28	5,18±0,25	5,88a±0,04	5,59±0,58
	Enterocin	3,18±0,19	3,61±0,24	4,95±0,14	5,53b±0,12	5,27±0,72
Enterobakterije	Kontrola	1,03±0,93	2,31±0,07	2,95±0,35	3,58±0,35	3,34±1,28
	Enterocin	1,41±0,38	2,18±0,19	3,01±0,27	2,89±0,25	2,74±0,73
Psihrofilne bakterije	Kontrola	4,31a±0,15	5,11±0,06	5,78±0,10	6,25±0,07	6,74±0,04
	Enterocin	3,80b±0,20	5,06±0,07	5,72±0,04	6,18±0,11	6,79±0,04
Koagulaza negativni stafilokoki	Kontrola	2,66±0,18	3,23±0,25	3,90a±0,46	5,17±0,20	5,12±0,10
	Enterocin	2,76±0,12	3,33±0,09	4,84b±0,06	5,12±0,11	5,06±0,05
Koliformne bakterije	Kontrola	1,53±1,32	2,89±0,21	3,45±0,15	4,55±0,23	4,02±0,35
	Enterocin	<1	2,64±0,15	3,56±0,08	4,03±0,54	4,26±0,60
pH	Kontrola	5,95±0,05	5,94±0,04	5,91±0,05	5,92±0,03	5,83±0,02
	Enterocin	5,92±0,04	5,88±0,01	5,94±0,01	5,92±0,04	5,87±0,08

a,b - vrijednosti označene različitim slovima u stupcima unutar pretraženog parametra (grupe bakterija) statistički se značajno razlikuju ( $p < 0.05$ )



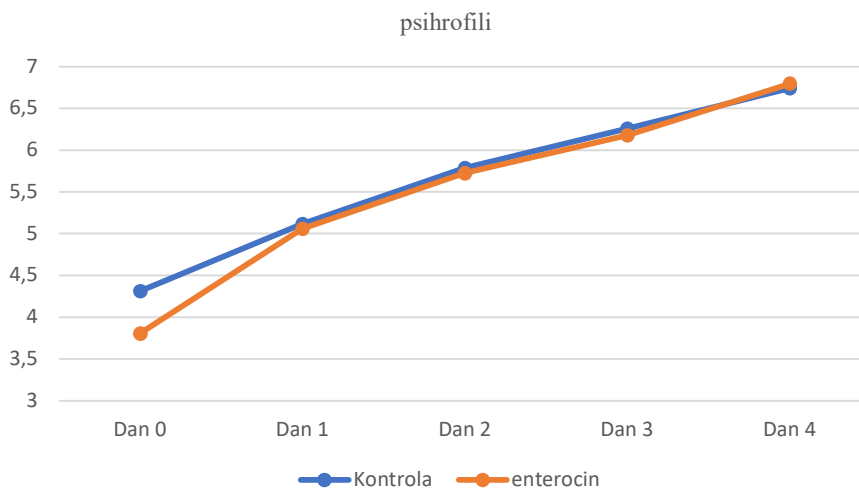
Slika 4. Broj aerobnih mezofilnih bakterija u kontrolnim uzorcima i uzorcima s dodanim enterocinom

Pojedinačno gledano, na grafičkom prikazu (slika 4), vidljiv je manji broj aerobnih mezofilnih bakterija u uzorcima s dodanim enterocinom, da bi pri kraju skladištenja broj u kontrolnim i uzorcima s enterocinom bio približno isti. Tijekom pohrane broj se aerobnih mezofilnih bakterija nije znatno razlikovao među skupinama uzoraka ( $p>0,05$ ).



Slika 5. Broj enterobakterija u kontrolnim uzorcima i uzorcima s dodanim enterocinom

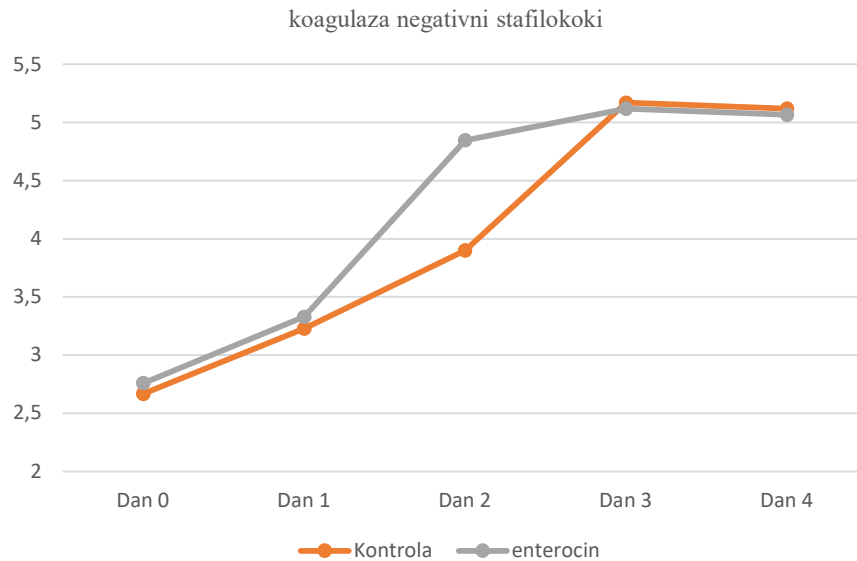
Broj enterobakterija (slika 5) je bio znatno manji pri kraju pohrane, odnosno trećeg i četvrtog dana u uzorcima s enterocinom. Zadnjeg dana skladištenja je u uzorcima s enterocinom opažen 0,6 log manji broj enterobakterija.



Slika 6. Broj psihrofilnih bakterija u kontrolnim uzorcima i uzorcima s dodanim enterocinom

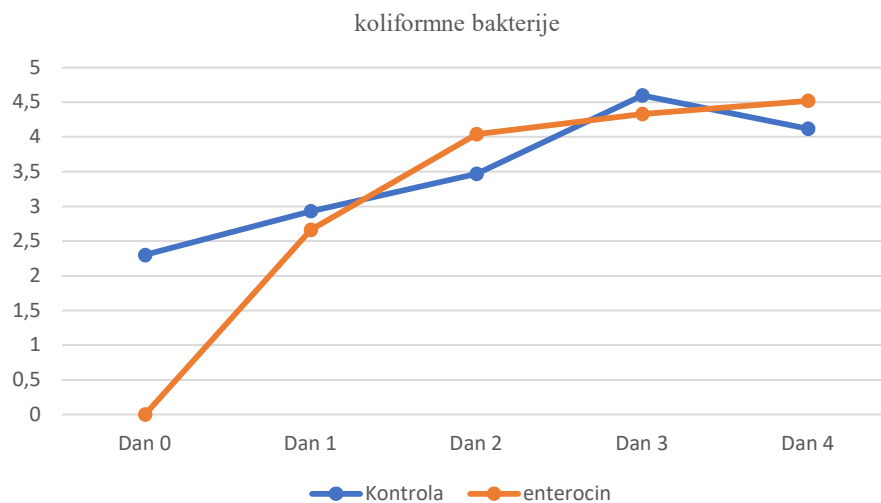


Na slici 6 vidljiv je podjednak broj psihrofilnih bakterija u obje skupine uzoraka, osim nultoga dana. Na početku je broj psihrofilnih bakterija u uzorcima s enterocinom bio statistički značajno manji ( $p < 0,05$ ).



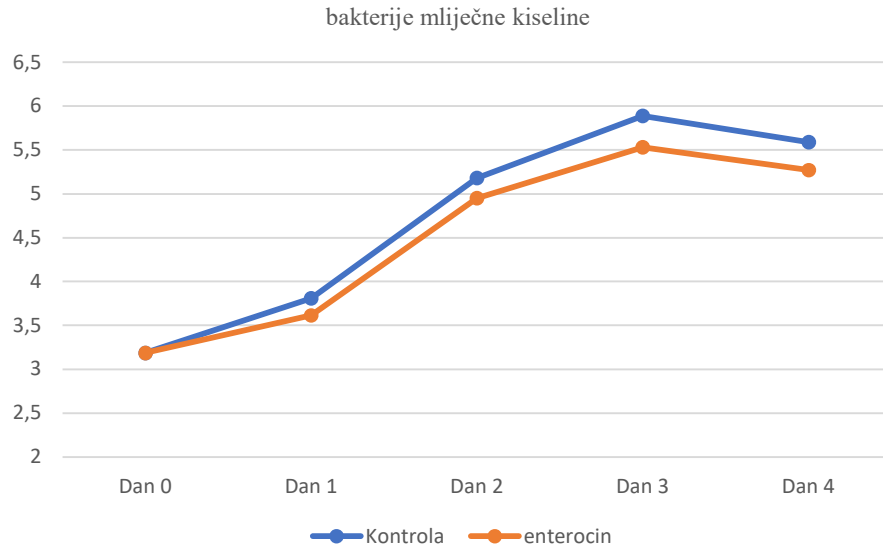
Slika 7. Broj koagulaza negativnih stafilokoka u kontrolnim uzorcima i uzorcima s dodanim enterocinom

Na slici 7 vidljivo je da se broj koagulaza negativnih stafilokoka nije značajno razlikovao među skupinama, osim drugoga dana gdje je broj bio veći za 1 log u uzorcima s enterocinom ( $p < 0,05$ ).



Slika 8. Broj koliformnih bakterija u kontrolnim uzorcima i uzorcima s dodanim enterocinom

Broj koliformnih bio je nultog dana ispod praga detekcije u uzorcima s enterocinom, dok u narednim danima pohrane nije utvrđena značajna razlika u njihovu broju među pretraženim skupinama uzoraka ( $p>0,05$ ).



Slika 9. Broj bakterija mliječne kiseline u kontrolnim uzorcima i uzorcima s dodanim enterocinom

Tijekom cijelog vremena pohrane vidljiv je manji broj bakterija mliječne kiseline u uzorcima s enterocinom, osim nultog dana. Statistički značajna razlika između skupina uočena je 3. dana ( $p<0.05$ ).

## 5. RASPRAVA

Kako je prije navedeno, u primarnoj mikroflori mesa prevladavaju gram-negativne bakterije što uključuje i vrlo česte enterobakterije te neke vrste roda *Pseudomonas*, a od gram-pozitivnih najčešće nalazimo laktobacile i enterokoke (JAY i sur., 2005.; cit. MILIN, 2015.). Pri usitnjavanju mesa, mikroflora koja se nalazi na površini podjednako se raspoređuje u mljevenom mesu, što povećava dodirnu površinu mikroorganizama i mesa, te uz visok aktivitet vode dovodi do brže bakterijske razgradnje i kvarenja nego li u porcioniranom mesu (MILIN i sur., 2016.). Općenito, inicijalni broj bakterija u mljevenom mesu vrlo je bitan za daljnji tijek mikrobioloških procesa u pakiranom mesu. U istraživanju MILINA i sur. (2016.) inicijalni broj aerobnih mezofilnih bakterija u mljevenom mesu pakiranom u modificiranoj atmosferi bio je visok (oko  $6 \log_{10}$  CFU/g) što jasno uvjetuje i kraću održivost proizvoda, a naročito pri oscilacijama temperature pohrane. Promatrajući brojeve mikroorganizama na početku našeg pokusa, uočava se inicijalni broj aerobnih mezofilnih bakterija u mljevenom mesu od oko  $10^4$  CFU/g. Međutim, već drugoga dana pohrane utvrđeno je preko  $10^6$  CFU/g što nadvisuje najveće dopuštene granice preporučene nacionalnim Vodičem za mikrobiološke kriterije za hranu. Pohrana je nastavljena do 4. dana kada je broj bakterija porastao i dalje za 1 log u obje skupine uzoraka i nije se međusobno značajno razlikovao. Nadalje, psihrofilni mikroorganizmi koji rastu na temperaturama hlađenja hrane mogu prouzročiti brže kvarenje mljevenog mesa ili ugroziti zdravlje potrošača (*L. monocytogenes* i *Y. enterocolitica*) (RAY i BHUNIA, 2013.). U našem istraživanju psihrofilne patogene bakterije nisu bile utvrđene, a broj ukupnih psihrofila je rastao kontinuirano za 2-3 log tijekom pohrane mljevenog mesa na 4 °C. Isti trend i slična dinamika rasta je vidljiva i za enterobakterije, koliformne bakterije, stafilokoke i bakterije mliječne kiseline (povećanje 2-3 log).

S obzirom na cilj istraživanja, mikroflora mljevenog mesa se dodatkom enterocina EF-101 nije značajno smanjila u promatranim uvjetima pohrane mljevenog mesa. Kako je navedeno, eventualno možemo pretpostaviti da je enterocin mogao sistirati rast koliformnih bakterija i nekih psihrofila na početku pokusa, gdje su zabilježene značajne razlike u broju tih mikroorganizama. Osim toga, tijekom cijelog vremena pohrane, broj je bakterija mliječne kiseline bio manji uz dodatak enterocina. Primjena bakteriocina u mljevenom mesu nije opsežno istraživana pa tek navodimo rezultate CHAKCHOUK-MTIBAA i sur. (2017.) koji su znatno obećavajući. Naime, primjenom polupročišćenog bakteriocina BacFL32 u mljevenom purećem mesu smanjuje se broj aerobnih mezofilnih bakterija i produžuje rok trajanja mljevenog mesa. Također navode da se smanjivao i broj psihrotrofnih bakterija i

enterobakterija u odnosu na kontrolne uzorke. U usporedbi s našim dobivenim vrijednostima može se primjetiti da je rast odnosno smanjenje bakterija u kontrolnoj i testnoj skupini bilo linearno s manje oscilacija.

Dosadašnja istraživanja enterocina EF-101 obuhvatila su *in vitro* testiranja antimikrobne aktivnosti pri čemu su naoptimalniji rezultati postignuti u inhibiciji brojnih patogenih i nepatogenih sojeva bakterija roda *Listeria* (CRK i ZDOLEC, 2018.; VUKUŠIĆ i ZDOLEC, 2020.). Primjenom u mesnom supstratu druge vrste, trajnim kobasicama, ali u obliku mikrobne kulture koja sintetizira enterocin EF-101, pokazalo se da je moguć i anti-biogeni učinak, odnosno smanjenje stvaranja biogenih amina u fermentiranom mesnom proizvodu (ZDOLEC i sur., 2020.). To se može pripisati inhibiciji aminogene mikroflore npr. bakterija mliječne kiseline. Imajući to na umu, može se pretpostaviti da je i smanjenje broja bakterija mliječne kiseline u našem istraživanju u mljevenom mesu nastalo istim mehanizmom. U tom smilu potrebno je dalje istražiti stabilnost i aktivnost enterocina EF-101 u kombinaciji s različitim antimikrobnim tehnologijama.

## 6. ZAKLJUČAK

- antimikrobni učinak enterocina može biti razlog smanjenom broju bakterija mliječne kiseline i enterobakterija za 0,3 odnosno 0,6 log na kraju pohrane mljevenog mesa pri 4 °C.
- istovremeni antimikrobni učinak na više mikrobnih skupina zabilježen je nultoga dana tj. neposredno nakon dodavanja enterocina na psihrofile, koliforme i aerobne mezofilne bakterije
- dobiveni rezultati ukazuju na aktivnost enterocina u mesnom supstratu, ali s ograničenim antimikrobnim učinkom, vjerovatno zbog brze razgradnje tkivnim enzimima.

## 7. LITERATURA

1. ALVAREZ-CISNEROS, Y., T.R. SÁINZ ESPUÑES, C. WACHER, F. FERNÁNDEZ, E. PONCE-ALQUICIRA, (2011.): Enterocins: bacteriocins with applications in the food industry. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. Microbiology Series N° 3(A. Méndez-Vilas), FORMATEX, str.1331-1341.
2. 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.
3. ANANOU, S., A. MUÑOZ, A. GÁLVEZ, M. MARTÍNEZ BUENO, M. MAQUEDA, E. VALDIVIA (2008.): Optimization of enterocin AS-48 production on a whey-based substrate. Int. Dairy J. 18, 923-927.
4. AYMERICH, T., H. HOLO, L.S. HÅVARSTEIN, M. HUGAS, M. GARRIGA (1996.): Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. Appl. Environ. Microbiol. 62, 1676-1682.
5. 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.
6. BALLA E., L.M. DICKS, M. DU TOIT, M.J. VAN DER MERWE, W.H. HOLZAPFEL (2000.): Characterization and cloning of the genes encoding enterocin 1071A and enterocin 1071B, two antimicrobial peptides produced by *Enterococcus faecalis* BFE 1071. Appl. Environ. Microbiol. 66, 1298-1304.
7. BELKUM, M.J., M.E. STILES (2000.): Nonlantibiotic antibacterial peptides from lactic acid bacteria. Nat. Prod. Rep. 17, 323–335.
8. BEN EMBAREK, P.K. (1994.): Presence, detection and growth of *Listeria monocytogenes* in seafoods: a review. Int. J. Food Microbiol. 23, 17–34.
9. BENNIK, M.H.J., B. VANLOO, R. BRASSEUR, L.G.M. GORRIS, E.J. SMID (1998.): A novel bacteriocin with a YGNGV motif from vegetable-associated *Enterococcus mundtii*: full characterization and interaction with target organisms. Biochim. Biophys. Acta 1373, 47–58.

10. BIJELIĆ, T. (2016.): Rast bakterije *Yersinia enterocolitica* u mljevenom svinjskom mesu na +4 °C i +10 °C. Diplomski rad. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
11. BORGES, 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.
12. BRASHEARS, M.M., S. REILLY, S.E. GUILLAND (1998.): Antagonistic action of cells of *Lactobacillus lactis* toward *E. coli* O157:H7 on refrigerated raw chicken meat. *J. Food Protect.* 61, 166–179.
13. BROOKS, J.C., M. ALVARADO, T. STEPHENS, J.D. KELLERMEIER, A.W. TITTOR, M.F. MILLER, M.M. BRASHEARS (2008.): Spoilage and safety characteristics of ground beef packaged in traditional and modified atmosphere packages. *J. Food Protect.* 71, 293–301.
14. 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.
15. CASAUS, P., T. NILSEN, L.M. CINTAS, I.F. NES, P.E. HERNÁNDEZ, H. HOLO (1997): Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136, which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology* 143, 2287–2294.
16. CHAKCHOUK-MTIBAA, A., S. SMAOUI, N. KTARI, I. SELLEM, S. NAJAH, I. KARRAY-REBAI, L. MELLOULI (2017.): Biopreservative Efficacy of Bacteriocin BacFL31 in Raw Ground Turkey Meat in terms of Microbiological, Physicochemical, and Sensory Qualities. *Biocontrol Sci.* 22. 67–77.
17. CHIKINDAS, M.L., R. WEEKS, D. DRIDER, V.A. CHISTYAKOV, L.M. DICKS (2017.): Functions and emerging applications of bacteriocins. *Curr. Opin. Biotechnol.* 49, 23–28.
18. CINTAS, L.M., P. CASAUS, L.S. HÅVARSTEIN, P.E. HERNÁNDEZ, I.F. NES (1997.): Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4321–4330.
19. CINTAS, L.M., P. CASAUS, H. HOLO, P.E. HERNANDEZ, L.S. HÅVARSTEIN (1998.): Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *J. Bacteriol.* 180, 1988–1994.
20. 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.
21. CLEVELAND, J., T.J. MONTVILLE, M. CHIKINDAS (2001.): Bacteriocins: Safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 7, 11–20.
  22. CRK, D., N. ZDOLEC (2018.): Antimicrobial potential of enterococci isolated from raw milk. *Hrvatski veterinarski vjesnik*, 26, 30–34.
  23. DURAKOVIĆ, S., F. DELAŠ, L. DURAKOVIĆ (2002.): Moderna mikrobiologija namirnica-knjiga druga, str. 116–117.
  24. 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.
  25. FIELDS, F.O. (1996.): Use of Bacteriocins in Food: Regulatory Considerations. *Food Prot.* 59, 72–77.
  26. FRANZ, C.M.A.P., U. SCHILLINGER, W.H. HOLZAPFEL (1996.): Production and characterization of enterocin 900, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* BFE 900 from black olives. *Int. J. Food Microbiol.* 29, 255–270.
  27. 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.
  28. 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.
  29. GIRAFFA, G., A.M. OLIVARI, E. NEVIANI (2000.): Isolation of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from Italian cheeses. *Food Microbiol.* 17, 671–677.
  30. GIRAFFA, G. (2003.): Functionality of enterococci in dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 215–222.
  31. GRATIA, A. (1925.): Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. *Comptes Rendus Biologies*, 93, 1040–1042.
  32. HAMMERUM, A. M. (2012.): Enterococci of animal origin and their significance for public health. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 7, 619–625.
  33. HEGARTY, J.W., C.M. GUINANE, R.P. ROSS, C. HILL, P.D. COTTER (2016.): Bacteriocin production: a relatively unharnessed probiotic trait? *F1000Res.*, 5, 2587.
  34. 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*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4443–4450.
35. HUGAS, M., M. GARRIGA, M.T. AYMERICH (2003.): Funcionality of enterococci in meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 223–233.
  36. JAY, J.M., M.J. LOESSNER, D.A. GOLDEN (2005.): *Modern food microbiology*. 7th edition., Springer, str. 38–66.
  37. KATO, T., T. MATSUDA, Y. YONEYAMA, H. KATO, R. NAKAMURA, (1994.) : Antibacterial substances produced by *Enterococcus faecium*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58, 411–412.
  38. KHAN, H., S. FLINT, P.L. YU (2010.): Enterocins in food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 141, 1–10.
  39. KJEMS, E. (1955): Studies on streptococcal bacteriophages: I. Techniques for isolating phageproducing strains. *Pathology and Microbiology Scandinavia*, 36, 433–440.
  40. KLAENHAMMER, T.R. (1988.): Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* 70, 337–349.
  41. LAUKOVA, A. (2012.): Potential applications of probiotic, bacteriocin- producing enterococci and their bacteriocins. U: *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, 4. izdanje; CRC Press, Boca Raton, Florida, 39–42.
  42. 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.
  43. LIMBO, S., L. TORRI, N. SINELLI, L. FRANZETTI, E. CASIRAGHI (2010.): Evaluation and predictive modeling of shelf life of minced beef stored in high-oxygen modified atmosphere packaging at different temperatures. *Meat Sci.* 84, 129–136.
  44. LIU, Y., S. DING, J. SHEN, K. ZHU (2019.): Nonribosomal antibacterial peptides that target multidrug-resistant bacteria. *Nat. Prod. Rep.* 36, 573.
  45. MAISNIER-PATIN S., E. FORNI, J. RICHARD (1996.): Purification, partial characterization and mode of action of enterococcin EFS2, an antilisterial bacteriocin produced by a strain of *Enterococcus faecalis* isolated from cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 30, 255–270.
  46. 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.
47. MILIN, M. (2015.): Održivost mljevenog mesa pakiranog u modificiranoj atmosferi uz dodatak stabilizatora i antioksidansa. Diplomski rad. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
48. MILIN, M., N. ZDOLEC, K. SOKOLIĆ, V. DOBRANIĆ, V. PAŽIN, J. GRBAVAC i K. ZDOLEC (2016.): Utjecaj antioksidansa i stabilizatora na mikrofloru mljevenog mesa pakiranog u modificiranoj atmosferi. *Hrvatski veterinarski vjesnik* 26, 3-4, 32–38.
49. MIRKOVIĆ, N.L. (2016.): Karakterizacija i determinacija bakteriocina autohtonih laktokoka. Disertacija, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu.
50. O'KEEFFE, T., C. HILL, R.P. ROSS (1999.): Characterization and heterologous expression of the genes encoding enterocin A production, immunity, and regulation in *Enterococcus faecium* DPC1146. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1506–1515.
51. OLASUPO, N.A., U. SCHILLINGER, C.M.A.P. FRANZ, W.H. HOLZAPFEL (1994.): Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* NA01 from “wara”—a fermented skimmed cow milk product from West Africa. *Lett. Appl. Microbiol.* 19, 438–441.
52. PARENTE, E., C. HILL (1992.): Characterization of enterocin 1146, a bacteriocin from *Enterococcus faecium* inhibitory to *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 55, 497–502.
53. PINTARIĆ, S., B. ŠEOL MARTINEC (2018.): Rezistencija enterokoka na antibiotike i preporuke za liječenje. *Vet. stn.* 49, 105–116.
54. RAY, B., A. BHUNIA (2013.): *Fundamental food microbiology*. CRC Press, Taylor and Francis, SAD.
55. 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.
56. SMITH, L., J.E. MANN, K. HARRIS, M.F. MILLER, M.M., BRASHEARS (2005.): Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* in ground beef using lactic acid bacteria and the impact on sensory properties. *J Food Prot.* 68, 1587–1592.
57. SPARO, M., G.G. NUÑEEZ, 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.

58. TAGG, J. R., A.S. DAJANI, L.W. WANNAMAKER (1976.): Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* 40, 722–756.
59. TEUBER, M., L. MEILE, F. SCHWARZ (1999.): Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Antonie van Leeuwenhoek* 76, 115–137.
60. VAN TYNE, D., M.S. GILMORE (2014.): Friend turned foe: evolution of enterococcal virulence and antibiotic resistance. *Annu. Rev. Microbiol.*, 68, 337–356.
61. VERMA, A., R. BANERJEE, H.P. DWIVEDI, V.K. JUNEJA (2014.): Bacteriocins. U: *Encyclopedia of Food Microbiology 2nd Edition* (Batt & Tortorello), Elsevier Ltd, Academic Press, str. 180–186.
62. VESKOVIĆ – MORACANIN, S. (2010.): Lactic acid bacteria bacteriocins as natural food protectors – possibilities of applications in food industry. *Tehnologija mesa*. 51, 83–94.
63. VLAEMYNCK, G., L. HERMAN, K. COUDIJZER (1994.): Isolation and characterization of two bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* strains inhibitory to *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 24, 211–225.
64. VUKUŠIĆ, N., N. ZDOLEC (2019.): Značenje bakteriocina enterokoka u sigurnosti hrane. *Veterinar : časopis studenata veterinarske medicine Zagreb*, 57, 1, 25–30.
65. VUKUŠIĆ, N., N. ZDOLEC (2020.): Utjecaj bakteriocina enterokoka na odabrane uzročnike bolesti prenosivih hranom. *Vet. stn.* 51, 2, 139–143.
66. YILDIRIM, Z., N. ÖNCÜL, M. YILDIRIM, S. KARABIYIKLI (2016.): Application of lactococin BZ and enterocin KP against *Listeria monocytogenes* in milk as biopreservation agents. *Acta Alimentaria* 45, 486–492.
67. 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.
68. 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.
69. 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.
70. 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.
71. ZDOLEC, N., T. BOGDANOVIĆ, V. PAŽIN, V. ŠIMUNIĆ-MEŽNARIĆ, N. MARTINEC, J.M. LORENZO (2020.): Control of biogenic amines in dry sausages inoculated with dairy-originated bacteriocinogenic *Enterococcus faecalis* EF-101. Vet. arhiv 90, 1, 77–85.
72. ZHENG, S., K. SONOMOTO (2018.): Diversified transporters and pathways for bacteriocin secretion in gram-positive bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol. 102, 4243–4253.

## 8. SAŽETAK

U ovom je diplomskom radu istražen utjecaj enterocina bakterije *Enterococcus faecalis* EF-101 na mikrofloru mljevenoga mesa pohranjenog u aerobnim uvjetima u hladnjaku na 4 °C. Enterocin je polu-pročišćen iz neutraliziranog nadtaloga (pH = 7; 10 N NaOH) kulture *E. faecalis* EF-101 precipitacijom amonijevim sulfatom (484.54 g/L). Aktivnost enterocina (AU/mL) testirana je prema indikatorskoj bakteriji *Listeria monocytogenes* NCTC 10527 i potom je dodano određeno razrjeđenje enterocina u fosfatnom puferu (pH = 7) u mljeveno meso (2560 AU/kg). Mljeveno meso s enterocinom i bez njega je mikrobiološki pretraživano u triplikatu tijekom četiri dana pohrane na broj aerobnih mezofilnih bakterija, enterobakterija, psihrotrofnih bakterija, stafilokoka, koliformnih bakterija, *Escherichia coli*, bakterija mliječne kiseline, *L. monocytogenes* te pH vrijednost. Ukupni broj bakterija, enterobakterija, psihrofila, stafilokoka, koliformnih i bakterija mliječne kiseline se povećavao očekivano tijekom pohrane, dok se pH nije znatno mijenjao. Antimikrobni učinak enterocina moguć je razlog smanjenja broja bakterija mliječne kiseline i enterobakterija na kraju pohrane za 0,3 odnosno 0,6 log. Enterocin je djelovao na psihrofile, koliforme i aerobne mezofilne bakterije nultoga dana tj. neposredno nakon njegovog dodavanja. Ostvareni rezultati upućuju na aktivnost enterocina u mesnom supstratu, no uz ograničeno antimikrobno djelovanje vjerojatno zbog njegove brze razgradnje tkivnim ili bakterijskim proteazama. Potrebno je dalje istražiti stabilnost i aktivnost enterocina EF-101 u kombinaciji s različitim antimikrobnim tehnologijama.

Ključne riječi: enterocin, *Enterococcus faecalis* EF-101, mljeveno meso, bakterije

## 9. SUMMARY

### EFFECT OF ENTEROCIN EF-101 ON SHELF-LIFE OF MINCED MEAT

In this work the antibacterial effect of enterocin EF-101 was investigated in minced meat packed in aerobic conditions and cold-stored during the shelf-life. Enterocin was semi-purified from the neutralized supernatant (pH = 7; 10 N NaOH) of *Enterococcus faecalis* EF-101 by precipitation with ammonium sulphate (484.54 g/L). Activity of enterocin (AU/mL) was tested toward *Listeria monocytogenes* NCTC 10527 and appropriate solution of enterocin in phosphate buffer (pH = 7) was added to minced meat (2560 AU/kg). Minced meat with and without enterocin was microbiologically analysed on day 0, 1, 2, 3 and 4 in triplicate for the aerobic mesophilic bacteria count, enterobacteria, psychrophiles, staphylococci, coliforms, *Escherichia coli*, lactic acid bacteria, *L. monocytogenes* and pH values. The number of aerobic mesophilic bacteria, enterobacteria, psychrophiles, staphylococci, coliforms and lactic acid bacteria increased during the storage in both groups, while pH was not significantly changed. However, an antimicrobial effect of enterocin may be the reason of 0.3 and 0.6 logs lower population of lactic acid bacteria and enterobacteria at the end of storage, respectively. Still, the strongest antimicrobial effect was noted on the day 0, or immediately after the addition of enterocin, to the population of psychrophiles, coliforms and aerobic mesophilic bacteria. The obtained results indicate the activity of enterocin in the meat substrate, but with a limited antimicrobial effect probably due to its rapid degradation by tissue or bacterial enzymes. It is necessary to further evaluate the stability and activity of enterocin EF-101 in the combination with other antimicrobial technologies.

Key words: enterocin, *Enterococcus faecalis* EF-101, minced meat, bacteria

## **10. ŽIVOTOPIS**

Rođena sam 3. travnja 1993. godine u Zagrebu. Osnovnu školu “Petar Preradović”, kao i opću VII. gimnaziju pohađala sam u Zagrebu. Učila sam engleski, njemački i španjolski jezik. 2012. godine upisala sam integrirani preddiplomski i diplomski studij na Veterinarskom Fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Apsolvirala sam akademske godine 2019./2020. Tijekom studiranja obavljala sam različite poslove preko Studentskog servisa.