

Vplyv NaCl na produkciu organických kyselín *Enterococcus faecium*

JOLANA KAROVIČOVÁ - ZLATICA KOHAJDOVÁ - MÁRIA GREIFOVÁ
- GABRIEL GREIF - DRAHOMÍRA LUKÁČOVÁ

SÚHRN. Kapilárnou izotachoforézou bola sledovaná produkcia kyseliny mliečnej a octovej *Enterococcus faecium* CCM 2038 v mäso-peptónovom bujóne s obsahom 0,6; 1,4; 2,2; 3,5; 5,3; 6,7 a 8,1 % NaCl. Najviac kyseliny mliečnej bolo produkovanej v bujóne s prídavkom 1,4 % NaCl. Jej obsah po 11 h kultivácie dosiahol 6,4 g.l⁻¹. Produkcia kyseliny mliečnej bola najnižšia v bujóne s prídavkom 8,1 % NaCl a jej najvyšší obsah bol po 39 h kultivácie 3,7 g.l⁻¹. Obsah kyseliny octovej sa počas kultivácie výrazne nemenil.

KLÚČOVÉ SLOVÁ: *Enterococcus faecium*; NaCl; organické kyseliny; kapilárna izotachoforéza

Enterokoky sú prirodzenou súčasťou živočíšnej a ľudskej intestinálnej mikroflóry [1]. Od ostatných fakultatívne anaeróbných kokov sa líšia schopnosťou rásť pri 10 °C, v bujóne s 6,5 % NaCl aj pri 45 °C a pri pH 9,6 [2]. Prítomnosť enterokokov v niektorých potravinárskych výrobkoch je považovaná za indikátor fekálnej kontaminácie a nízkej úrovne hygieny a sanitácie [1]. Niektorí autori posudzujú enterokoky ako fakultatívne toxikogénne organizmy, ktoré dekarboxyláciou aminokyselín môžu spôsobiť tvorbu biogénnych amínov. Príslušníci rodu *Enterococcus*, v Bergeyovom manuáli vedenom ako skupina „enterokoky“, boli a sú predmetom záujmu potravinárskych mikrobiológov a technológov [2].

Je známe, že enterokoky zohrávajú dôležitú úlohu pri zrení syrov, kde prispievajú k chuti a k aróme [2], napr. *Enterococcus faecium* je štartovacou kultúrou do syrov typu Čedar a Mozzarella [3].

Doc. Ing. Jolana KAROVIČOVÁ, PhD., Ing. Zlatica KOHAJDOVÁ, Ing. Mária GREIFOVÁ, PhD., Ing. Gabriel GREIF, Ing. Drahomíra LUKÁČOVÁ, Katedra potravinárskej technológie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.

Korešpondujúci autor: Doc. Ing. Jolana KAROVIČOVÁ, PhD.

Enterococcus faecium produkuje kyselinu mliečnu, ale vyznačuje sa aj schopnosťou tvoriť kyselinu mravčiu a octovú, acetoín a metabolizovať citrát [3].

E. faecium P21 bol izolovaný zo španielskych salám a vykazuje vysoký antimikrobiálny účinok voči G⁻ baktériam ako sú *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* a *Clostridium botulinum* v MRS médiu (Man-Rogosa-Sharp médium). Antimikrobiálny účinok je spôsobený dvoma peptidovými bakteriocínmi, enterocínom A a enterocínom B [4].

E. faecium CCM 4231 a RZS C18 boli použité ako štartovacie kultúry do fermentovaných salám [5]. Oba kmene produkovali bakteriocíny (enterocín 4231 a 13), ktoré boli neúčinné voči iným mliečnym baktériam, ale inhibovali *Listeria monocytogenes*. Takto vyrobené salámy boli sladšie v porovnaní s kontrolnou vzorkou (bez inokulácie) a mali menej kyslú chuť [5].

E. faecium EFM01, ktorý bol izolovaný zo syra produkoval bakteriocín A. Tento bakteriocín bol vysoko účinný proti *Listeria* spp. [6].

E. faecium CTC produkoval bakteriocíny enterocín A a B, ktoré inhibovali *Listeria monocytogenes* a ich produkcia bola regulovaná vnútorným indukčným faktorom-enterocínom F. Podmienky pre tvorbu uvedených bakteriocínov v MRS médiu boli: pH 5,5, teplota 25–35 °C, 0,25 % glukózy a 2 % sacharózy. Dusičnan sodný, zmes soli a čierneho korenia inhibovali tvorbu bakteriocínov [7].

Naša práca bola zameraná na sledovanie produkcie kyseliny mliečnej a octovej *E. faecium* CCM 2038 v mäso-peptónovom bujóne (MPB) s prídavkami NaCl (0,56; 1,35; 2,18; 3,48; 5,25; 6,65; 8,10 %) a pri hodnotách pH 5,5; 6 a 8.

Materiál a metódy

Príprava inokula *Enterococcus faecium* CCM 2038

Z 24-hodinovej kultúry uchováanej na šikmom agare sme pripravili suspenziu baktérií *E. faecium* vo fyziologickom roztoku s požadovanou hustotou (3.10^6 KTJ.ml⁻¹). Inokulum sme pripravili desiatkovým riedením. Vstupná koncentrácia inokula bola 10^4 KTJ.ml⁻¹. Inokulum sme aplikovali do MPB do skúmaviek s objemom 15 ml. Stacionárna kultivácia prebiehala v termostate pri teplote (37 ± 1 °C).

Vzorky sme odoberali v stanovených časových intervaloch a mikrobiologicky vyšetrili kultivačnou metódou na Petriho miske so selektívnym agarom pre izoláciu fekálnych streptokokov (Imuna, Šarišské Michaľany).

Stanovenie organických kyselín kapilárnou izotachoforézou [8,9]

Všetky izotachoforetické merania sme uskutočnili na izotachoforetickom analyzátoe s technikou spájania kolón ZKI 01 (Villa Labeco, Spišská Nová Ves) s vodivostným detektorom, ktorého signál bol po zosilnení registrovaný dvojlíniovým zapisovačom TZ 4200. Vzorke sme pred analýzou vhodne nariedili a prefiltrovali.

Na stanovenie sme použili elektrolytický systém tohto zloženia:

Vodiaci elektrolyt:

HCl	$10^{-2} \text{ mol.l}^{-1}$
protiion	kyselina 6-aminokaprónová
aditívum	metylhydroxyetylcelulóza 0,1 %
pH	4,25

Zakončujúci elektrolyt:

kyselina kaprónová	$5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$
--------------------	--------------------------------------

Výsledky a diskusia

Na kultiváciu *E. faecium* CCM 2308 bol použitý MPB s prídavkom 0,5 % glc (glukóza), 0,1 % Tyr (tyrozín) a s rôznymi koncentraciami NaCl (0,56 %, 1,35 %, 2,18 %, 3,48 %, 5,25 %, 6,65 % a 8,10 %).

Vo vzorkách s koncentraciou 0,56 % NaCl bol zaznamenaný maximálny obsah kyseliny mliečnej po 11 h kultivácie ($3,97 \text{ g.l}^{-1}$). Najväčší nárast kyseliny mliečnej bol zaznamenaný medzi 7. a 8. h kultivácie z $1,231 \text{ g.l}^{-1}$ na $2,474 \text{ g.l}^{-1}$, čo predstavuje nárast o 95,78 %. Obsah kyseliny octovej sa v priebehu kultivácie významne nemenil. Medzi 2. a 9. h predstavoval jej obsah $0,550 \text{ g.l}^{-1}$. Najviac kyseliny octovej bolo produkované po 11 h kultivácie ($0,801 \text{ g.l}^{-1}$). Po dosiahnutí tohto maxima jej obsah poklesol na hodnotu $0,550 \text{ g.l}^{-1}$.

Vzorke kultivované s prídavkom 1,35 % NaCl v počiatočných hodinách kultivácie (2 až 4 h) obsahovali $0,733 \text{ g.l}^{-1}$ resp. $1,106 \text{ g.l}^{-1}$ kyseliny mliečnej a $0,300 \text{ g.l}^{-1}$ kyseliny octovej. Najväčšie množstvo kyseliny mliečnej a octovej bolo produkované po 11 h kultivácie $6,389 \text{ g.l}^{-1}$ a $0,801 \text{ g.l}^{-1}$. Po dosiahnutí tohto maxima obsah obidvoch kyselín nepatrne poklesol. Najväčší nárast kyseliny mliečnej a octovej bol zaznamenaný medzi 9. a 10. h kultivácie, kedy sa obsah kyseliny mliečnej zvýšil o 43,78 % a kyseliny octovej o 27,45 %.

Vo vzorkách kultivovaných v MPB s prídavkom 2,18 % NaCl sa obsah kyseliny mliečnej v prvých 6 hodinách nemenil ($1,057 \text{ g.l}^{-1}$). Obsah kyseliny

octovej zostal nezmenený počas celej kultivačnej periódy ($0,550 \text{ g.l}^{-1}$). Obsah kyseliny mliečnej v ďalších hodinách kultivácie narastal, pričom jej maximálne množstvo bolo zaznamenané po 30 h kultivácie $4,773 \text{ g.l}^{-1}$. Najväčší nárast kyseliny mliečnej bol zaznamenaný medzi 8. a 9. h kultivácie z $1,728 \text{ g.l}^{-1}$ na $2,536 \text{ g.l}^{-1}$, čo predstavuje nárast o 44,68 % a medzi 12. a 25. h o 25,53 %.

Vo vzorkách s prídavkom 3,48 % NaCl bol medzi 2. a 9. h kultivácie zaznamenaný nárast kyseliny mliečnej z $1,168 \text{ g.l}^{-1}$ na $1,666 \text{ g.l}^{-1}$, čo predstavuje nárast o $0,498 \text{ g.l}^{-1}$. Najviac kyseliny mliečnej bolo produkovanej po 25 h kultivácie ($5,581 \text{ g.l}^{-1}$), po dosiahnutí tejto hodnoty jej obsah poklesol na $4,773 \text{ g.l}^{-1}$. Najväčší nárast kyseliny mliečnej bol zaznamenaný medzi 9. a 10. h kultivácie o 63,39 % (z $1,666 \text{ g.l}^{-1}$ na $2,722 \text{ g.l}^{-1}$) a medzi 12. a 25. h kultivácie o 52,74 % (z $3,654 \text{ g.l}^{-1}$ na $5,581 \text{ g.l}^{-1}$). Obsah kyseliny octovej sa počas celej doby kultivácie signifikantne nemenil, v počiatočných hodinách kultivácie predstavoval jej obsah $0,550 \text{ g.l}^{-1}$. Mierne zvýšenie bolo zaznamenané po 8 h kultivácie ($0,601 \text{ g.l}^{-1}$). Najviac kyseliny octovej bolo produkovanej po 25 h kultivácie ($0,651 \text{ g.l}^{-1}$).

Vo vzorkách s prídavkom 5,25 % NaCl sa v počiatočných hodinách obsah kyseliny mliečnej výrazne nemenil, medzi 2. a 9. h kultivácie jej obsah vzrástol len o 26,96 % (z $0,920 \text{ g.l}^{-1}$ na $1,168 \text{ g.l}^{-1}$). Mierne zvýšenie množstva kyseliny mliečnej bolo zaznamenané medzi 10. a 11. h kultivácie z $1,355 \text{ g.l}^{-1}$ na $1,728 \text{ g.l}^{-1}$ (o 27,53 %) a medzi 13. a 14. h o 36,74 % (z $2,722 \text{ g.l}^{-1}$ na $3,281 \text{ g.l}^{-1}$). Najvyššia koncentrácia kyseliny mliečnej bola nameraná po 25 h kultivácie ($4,959 \text{ g.l}^{-1}$). Po dosiahnutí tohto maxima obsah kyseliny mliečnej nepatrne poklesol. Najväčší nárast kyseliny mliečnej bol pozorovaný medzi 11. a 12. h kultivácie o 51,14 % (z $1,728 \text{ g.l}^{-1}$ na $2,598 \text{ g.l}^{-1}$) a medzi 14. až 25. h o 50,35 % (z $3,281 \text{ g.l}^{-1}$ na $4,955 \text{ g.l}^{-1}$). Obsah kyseliny octovej zostával počas celej kultivácie nezmenený ($0,550 \text{ g.l}^{-1}$).

Pri prídavku 6,65 % NaCl bol prvý odber vzorky uskutočnený po 11,5 h, kedy vzorka obsahovala už $1,168 \text{ g.l}^{-1}$ kyseliny mliečnej a $0,1 \text{ g.l}^{-1}$ kyseliny octovej. Medzi 11. h 30. min až 17. h kultivácie došlo k nárastu kyseliny mliečnej o 85,12 % (z $1,168 \text{ g.l}^{-1}$ na $2,163 \text{ g.l}^{-1}$). V čase medzi 17. a 36. h kultivácie sa jej obsah zvýšil z $2,163 \text{ g.l}^{-1}$ na $3,841 \text{ g.l}^{-1}$, čo predstavuje nárast o 77,58 %. Najvyššie množstvo kyseliny mliečnej bolo zaznamenané po 36 h kultivácie ($3,841 \text{ g.l}^{-1}$). Obsah kyseliny octovej sa v priebehu kultivácie výrazne nemenil, najvyšší obsah tejto kyseliny bol zaznamenaný po 20 h kultivácie ($0,3 \text{ g.l}^{-1}$) a až do konca kultivácie sa už nemenil.

Vo vzorkách s prídavkom 8,10 % NaCl boli obsahy jednotlivých kyselín sledované medzi 9. h 30. min a 39. h kultivácie. Medzi 9. h 30. min a 17. h nastal len mierny nárast v produkcii kyseliny mliečnej (o 33,8 %). Množstvo

kyseliny mliečnej sa medzi 17. a 23. h kultivácie zvýšilo cca dvojnásobne (z 1,231 g.l⁻¹ na 2,536 g.l⁻¹). Najvyšší obsah kyseliny mliečnej bol zaznamenaný po 37 h kultivácie (3,716 g.l⁻¹), čo predstavuje oproti 9,5 h asi 4-násobný nárast. Obsah kyseliny octovej sa v priebehu kultivácie výrazne nemenil (jej obsah sa pohyboval v rozmedzí od 0,3 g.l⁻¹ do 0,4 g.l⁻¹), pričom najvyšší obsah kyseliny octovej bol po 16 h kultivácie.

Freitas a kol. [3] sledovali vplyv *E. faecium* počas 6-dňovej kultivácie na zmeny organických kyselín v ovčom mlieku pri 30 °C. Organické kyseliny boli stanovené metódou HPLC s použitím 5 mM H₂SO₄ ako mobilnej fázy a UV detektora. Meraním zistili zmeny v obsahu kyseliny mliečnej, octovej, citrónovej, mravčej a jantárovej. Obsah kyseliny mliečnej vzrástol z 1,04.10⁻² mg.g⁻¹ na 51,82.10⁻² mg.g⁻¹ a kyseliny octovej z 0,13.10⁻² mg.g⁻¹ na 8,7.10⁻² mg.g⁻¹. Dochádzalo teda k nárastu oboch kyselín, čo potvrdzujú aj naše merania.

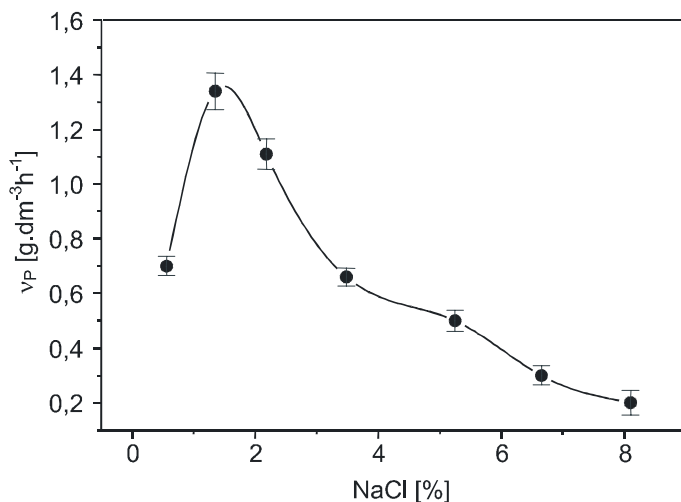
Vplyv koncentrácie NaCl na produkciu kyseliny mliečnej *E. faecium* bol popísaný exponenciálnou funkciou, z ktorej boli vypočítané parametre: špecifická rýchlosť nárastu kyseliny mliečnej (ν_P), čas, v ktorom je ν_P maximálna (M_P) a teoreticky vypočítaný čas začiatku produkcie kyseliny mliečnej (λ_P). Závislosť medzi koncentráciou NaCl a týmito parametrami je uvedená na obr. 1 a 2. Z obr. 1 a 2 je vidieť, že koncentrácia 1 až 2 % NaCl priaznivo vplýva na produkciu kyseliny mliečnej *E. faecium*. Pri vyšších koncentráciách NaCl dochádza k inhibícii rýchlosti jej produkcie (obr. 1) a taktiež k predlžovaniu časov M_P a λ_P (obr. 2).

Okrem obsahu kyseliny mliečnej a octovej boli v priebehu kultivácie sledované aj zmeny pH. V tab. 1 sú uvedené zmeny pH v MPB s 0,56; 1,35; 2,18; 3,48 a 5,25 % NaCl. Na začiatku kultivácie sa pH vzoriek pohybovalo medzi 6,938 a 7,048 vzhľadom na počiatočnú úpravu hodnoty pH MPB na 7±0,1. V priebehu kultivácie sa pH vo všetkých vzorkách znížilo v dôsledku produkcie predovšetkým kyseliny mliečnej.

Na konci kultivácie boli zaznamenané hodnoty pH medzi 5,538 a 5,318. Významný pokles pH bol pozorovaný vo vzorkách s prídavkom 3,48 % NaCl (tab. 1).

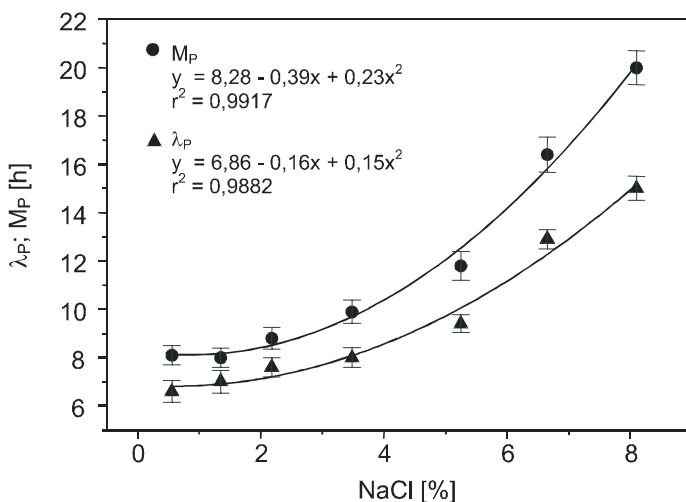
Produkcia organických kyselín (kyselina mliečna, octová a citrónová) *E. faecium* CCM 2308 v MPB bola tiež sledovaná pri rôznych hodnotách pH média. pH média bolo upravené na hodnotu 5,5 kyselinou citrónovou, na hodnotu 6 kyselinou octovou a na hodnotu 8 NaOH. V tomto prípade bola koncentrácia NaCl vo všetkých vzorkách 2 g.l⁻¹.

Vo vzorkách, kde bolo pH upravované kyselinou citrónovou, boli v množstve kyseliny citrónovej zaznamenané len nepatrné rozdiely, jej obsah sa pohyboval v rozmedzí (0,849 g.l⁻¹ a 0,950 g.l⁻¹). Rovnako aj obsah kyseliny



OBR. 1. Vplyv NaCl na špecifickú rýchlosť nárastu koncentrácie kyseliny mliečnej (v_p) produkovanej *Enterococcus faecium* v mäso-peptónovom bujóne pri 37 °C.

FIG. 1. Effect of NaCl on the specific growth rate of lactic acid concentration (v_p) produced by *Enterococcus faecium* in the meat-peptone broth at 37 °C.



OBR. 2. Vplyv NaCl na čas, v ktorom je v_p maximálna (M_p) a teoreticky vypočítaný čas začiatku produkcie kyseliny mliečnej (λ_p) produkovanej *Enterococcus faecium* v mäso-peptónovom bujóne pri 37 °C.

FIG. 2. Effect of NaCl on the time when v_p is maximal (M_p) and a calculated value of time in which the production of lactic acid begins (λ_p) by *Enterococcus faecium* in the meat-peptone broth at 37 °C.

TAB. 1. Zmeny pH v mäso-peptónovom bujóne s rôznymi prídavkami NaCl.
TAB. 1. Changes of pH in the meat-peptone broth with various NaCl additions.

Čas kultivácie ¹ [h]	pH				
	0,56 %	1,35 %	2,18 %	3,48 %	5,25 %
0	6,938	6,994	7,048	6,968	7,005
2	6,924	6,971	7,029	6,97	7,005
4	6,917	6,967	7,010	6,961	6,985
6	6,843	6,909	6,977	6,935	6,982
8	6,105	6,05	6,594	6,884	6,970
9	5,856	5,797	6,033	6,710	6,912
10	5,825	5,701	5,796	6,178	6,783
11	5,654	5,595	5,683	5,880	6,407
12	5,635	5,546	5,610	5,694	6,025
25	5,617	5,538	5,595	5,422	5,494
30	5,538	5,462	5,483	5,318	5,440

1 - cultivation time.

octovej nepodliehal v závislosti od času významným zmenám, jej množstvo bolo v priebehu kultivácie približne rovnaké (od 0,550 g.l⁻¹ do 0,651 g.l⁻¹). Výraznejšie zmeny boli zaznamenané len v prípade kyseliny mliečnej, ktorej obsah vzrástol (z 1,231 g.l⁻¹ v 11. h odberu) cca 2,5-násobne (3,157 g.l⁻¹ v 37. h odberu). Najvýraznejší nárast kyseliny mliečnej nastal medzi 24. a 36. h odberu z 1,728 g.l⁻¹ na 3,157 g.l⁻¹ (o 79,11 %).

Vo vzorkách, kde bolo pH upravené kyselinou octovou na hodnotu 6, boli opäť najvýraznejšie zmeny zaznamenané v produkcii kyseliny mliečnej. V poslednej hodine odberu (30. h) vzorka obsahovala 4,773 g.l⁻¹ kyseliny mliečnej, čo bolo maximálne vyprodukované množstvo. To znamená, že jej obsah v priebehu kultivácie vzrástol 3,9-násobne. Množstvá kyseliny octovej a citrónovej sa v priebehu experimentu len nepatrne menili, ich obsahy sa pohybovali v rozmedzí 0,550 g.l⁻¹ až 0,701 g.l⁻¹ resp. 0,242 g.l⁻¹ až 0,343 g.l⁻¹.

Vo vzorkách s pH 8 sa obsah kyseliny octovej výrazne nemenil, jej koncentrácia sa pohybovala v rozmedzí 0,450 g.l⁻¹ až 0,651 g.l⁻¹. Kyselina mliečna dosiahla maximum koncentrácie v 11. h odberu (3,965 g.l⁻¹), v poslednej hodine odberu jej množstvo pokleslo na 3,716 g.l⁻¹.

Zo stanovení obsahu kyseliny mliečnej vyplynulo, že pri kultivácii *E. faecium* CCM 2308 v MPB s prídavkom 0,56 % a 1,35 % NaCl jej maximálna produkcia bola po 11 h, pri prídavku soli 2,18 % po 30 h a pri prídavku soli

3,48 % a 5,25 % NaCl po 25 h, s prídavkom NaCl 6,65 % po 36 h a s prídavkom NaCl 8,1 % po 37 h kultivácie.

Z výsledkov vyplýva, že produkcia kyseliny mliečnej *E. faecium* CCM 2308 bola najviac ovplyvnená prídavkom kyseliny octovej do kultivačného média.

Validácia metódy kapilárnej izotachoforézy - validačné parametre [10,11]

Selektivita (špecifickosť)

Pri meraní štandardných roztokov bolo zistené, že hodnota r s. h. (relatívna výška skoku) sa pre stanovované látky nemenila a zóna si zachovávala svoju dĺžku.

Odozvoová funkcia

Pri izotachoforetickom stanovení bol na detekciu použitý vodivostný detektor. Vodivostný detektor meria vodivosť jednotlivých zón a jeho odozva lineárne závisí od množstva látky. To znamená, že jeho odozva je lineárna. Na meranie kalibračných závislostí boli postupne do kolóny dávkané štandardné roztoky kyseliny mliečnej o koncentracii $2 \cdot 10^{-4}$; $4 \cdot 10^{-4}$; $6 \cdot 10^{-4}$; $8 \cdot 10^{-4}$; $10 \cdot 10^{-4}$ mol.l⁻¹. Údaje boli spracované metódou lineárnej regresie. Hodnota korelačného koeficientu sa pohybovala od 0,9914 do 0,9948. Relatívna smerodajná odchýlka sa pohybovala v rozmedzí od 1,68 % do 9,12 %.

Citlivosť

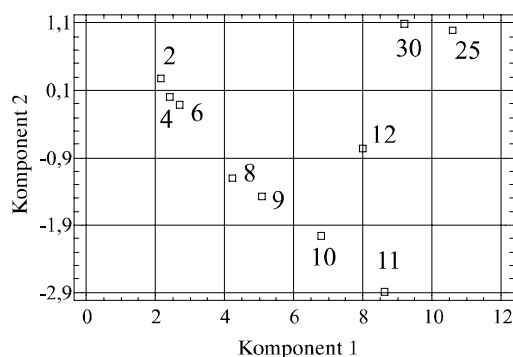
Medza stanovenia je najnižšia koncentrácia, ktorá sa dá presne a správne namerať. Limit detekcie pre kyselinu mliečnu bol 1,998 mg.l⁻¹, pre kyselinu octovú 2,000 mg.l⁻¹ a pre kyselinu citrónovú 1,616 mg.l⁻¹.

Presnosť a správnosť

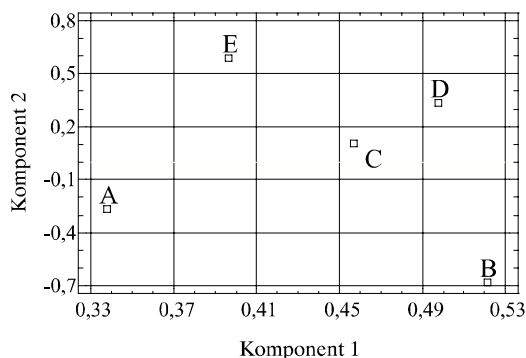
Presnosť je miera reprodukovateľnosti metódy pri stanovení sledovanej látky vo vzorke. Správnosť je odchýlka stanovenej hodnoty od skutočnej hodnoty. Správnosť bola vyhodnotená ako výťažnosť a ako chyba merania.

Presnosť bola sledovaná na štandardnom roztoku kyseliny mliečnej, pričom boli merané tri koncentrácie danej látky 5-krát za deň, po dva dni. Relatívna smerodajná odchýlka sa pohybovala v rozmedzí od 1,15 do 7,66 %. Výťažnosť sa pohybovala od 89 do 96 % a chyba merania od 3,5 do 11 %.

Na vyhodnotenie výsledkov chemických analýz bola aplikovaná multivariačná štatistická metóda - analýza hlavných komponentov (PCA). Výsledky boli upravené do matice 10 x 5, v ktorej riadky predstavovali jednotlivé hodiny kultivácie a stĺpce zahŕňali obsahy kyseliny mliečnej v médiu s rôznymi koncentraciami NaCl (od 0,56 % do 5,25). PCA bola aplikovaná bez štandardizácie vstupných údajov vzhľadom na to, že tieto mali rovnaké jednotky. PCA zredukovala pôvodných 5 premenných na 2 hlavné komponenty, ktoré vysvetľovali spolu 98,135 % (PC1 83,169 % a PC2 14,966 %) z celkovej premennivosti výsledkov. Na obr. 3 sú znázornené skóre vzoriek v osiach dvoch hlavných komponentov, táto závislosť umožňuje študovať vzťahy medzi vzor-



OBR. 3. Vynesenie skóre vzoriek v osiach PC1 a PC2.
FIG. 3. Plot of the score of samples in the axes of PC1 and PC2.



OBR. 4. Vynesenie saturácií premenných v osiach PC1 a PC2.
FIG. 4. Plot of saturations of variables in the axes of PC1 and PC2.

kami. Z obr. 3 vidíme, že PC1 najlepšie vystihoval vzorky označené ako 25, 30, 12 a 11 (tieto čísla predstavujú hodiny kultivácie) a PC2 vzorky 10 a 11 (záporná časť daného hlavného komponentu). Na obr. 4 sú vynesené saturácie premenných (obsahy kyseliny mliečnej v médiu s rôznymi prídavkami NaCl) v osiach PC1 a PC2. PC1 najlepšie vystihoval vzorky s koncentráciou NaCl 1,35 % (saturácia 0,522, označené ako B) a 3,48 % (saturácia 0,498, označené ako D). PC2 najlepšie vystihoval vzorky s koncentráciou 5,25 % NaCl (saturácia -0,681, označené ako E). PCA teda ukázala, že najväčší vplyv na produkciu kyseliny mliečnej má koncentrácia NaCl 1,35 až 3,48 % (obr. 4).

Literatúra

1. LEKOWSKA-KOCHANIAK, A. E.: *Enterococci* - probiotics or pathogens? Postepy Mikrobiologii, 39, 2000, č. 4, s. 341-361.
2. GÖRNER, F. - ZEMANOVIČ, J.: Streptokoky z hľadiska systematickej bakteriológie. Bulletin potravinárskeho výskumu, 32(12), 1993, č. 2, s. 109-116.
3. FREITAS, A. C. - PINDATO, A. E. - PINDATO, M. E. - MALCATA, F. X.: Organic acids produced by *Lactobacilli*, *Enterococci* and yeasts isolated from Picante cheese. European Food Research and Technology, 209, 1999, s. 434-438.
4. HERRANZ, C. - CASAUS, P. - MUKHOPADHYAY, S. - MARTINEZ, J. M. - RODRIGUES, J. M. - NES, I. F. - HERNANDEZ, P. E. - CINTAS, L. M.: *Enterococcus faecium* P21 strain occurring naturally in dry-fermented sausages producing the class II bacteriocins enterocin A and enteocin B. Food Microbiology, 18, 2001, s. 115-131.
5. CALLEWAERT, R. - HUGAS, M. - VUYST, L. C.: Competitiveness and bacteriocin production of *Enterococci* in the production of Spanish-style dry fermented sausages. International Journal of Microbiology, 57, 2000, s. 33-42.
6. ENNAHAR, S. - DESCHAMPS, N.: Anti-*Listeria* effect of enterocin A, produced by cheese-isolated *Enterococcus faecium* EFM01, relate to other bacteriocins from lactic acid bacteria. Journal of Applied Microbiology, 88, 2000, č. 3, s. 449-457.
7. AYMERICH, T. - ARTIGAS, M. G. - GARRIGA, M. - MONFORT, J. M. - HUGAS, M.: Effect of sausage ingredients and additives on the production of enterocins A and B by *Enterococcus faecium* CTC 492. Optimisation of in vitro production and anti-*Listeria* effect in dry fermented sausages. Journal of Applied Microbiology, 88, 2000, s. 686-694.
8. KAROVIČOVÁ, J. - DRDÁK, M. - POLONSKÝ, J.: Utilization of capillary isotachopheresis in the determination of organic acids in food. Journal of Chromatography, 509, 1990, s. 283-286.
9. KAROVIČOVÁ, J. - DRDÁK, M. - GREIF, G. - HYBENOVÁ, E.: The choice of *Lactobacillus* species for the lactic acid fermentation of vegetable juices. European Food Research and Technology, 210, 1999, s. 53-56.
10. WIELING, J. - HENDRIKS, G. - TAMMINGA, W. J. - HEMPENIUS, J. - MERSINK, C. K.: Rational experimental desing for bioanalytical methods validation. Illustration using an assay method for total captopril in plasma. Journal of Chromatography A, 730, 1996, s. 381-394.

11. LINDNER, W. - WAINER, I. W.: Requirements for initial assay validation and publication in Journal of Chromatography B. Analytical Separations News, 3, 1998, č. 1, s. 7.

Do redakcie došlo 22.10.2001.

Effect of NaCl on the production of organic acids by *Enterococcus faecium*

KAROVIČOVÁ, J. - KOHAJDOVÁ, Z. - GREIFOVÁ, M. - GREIF, G. - LUKÁČOVÁ, D.:
Bull. potrav. Výsk., 41, 2002, p. 69-79.

SUMMARY: Production of lactic and acetic acids by *Enterococcus faecium* CCM 2038 in the meat-peptone broth with addition of 0.6; 1.4; 2.2; 3.5; 5.3; 6.7 and 8.1 % NaCl was followed using capillary isotachophoresis. The most of lactic acid was produced in the medium with the addition of 1.4 % NaCl. After 11 h of cultivation, its content reached 6.4 g.l⁻¹. Production of lactic acid was the lowest in the medium with the addition of 8.1 % NaCl and its content after 39 h of cultivation was 3.7 g.l⁻¹. During cultivation, content of acetic acid did not change extensively.

KEYWORDS: *Enterococcus faecium*; NaCl; organic acids; capillary isotachophoresis