

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



Růst bakterií mléčného kvašení ve velbloudím mléce

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Eliška Krajáková

Obor studia: Výživa a potraviny

Vedoucí práce: Ing. Šárka Musilová, Ph.D.

© 2018 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Růst bakterií mléčného kvašení ve velbloudím mléce" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 12. 4. 2018

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Šárce Musilové, Ph.D. za odborné konzultace a rady při vedení diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala konzultantce Ing. Chahrazed Mekadim za věnovaný čas a pomoc při práci v laboratoři.

Růst bakterií mléčného kvašení ve velbloudím mléce

Souhrn

Mléko a mléčné výrobky hrají důležitou roli ve stravě lidí. Velbloudí mléko je důležitou součástí stravy především obyvatel v oblastech Afriky, Asie a Středního východu jak pro dospělé i dětskou populaci. Velbloudí mléko je bohatým zdrojem minerálních látek. Laktosa ve velbloudím mléce je snadno metabolizována osobami trpícími nesnášenlivostí laktosy a kaseiny velbloudího mléka vyvolávají méně alergických reakcí. Velbloudí mléko má pozitivní vliv na řadu onemocnění a jeho hojivé vlastnosti mohou být spojeny s některými jeho proteinovými ochrannými složkami, jako jsou lysozym, laktoferin, laktoperoxidasa, imunoglobuliny atd.

Syrové velbloudí mléko a jeho fermentované produkty jsou dobrým zdrojem potenciálních probiotických kmenů. Důležitou roli zde hrají bakterie mléčného kvašení kvůli produkci kyseliny mléčné, která je nezbytná pro výrobu fermentovaných mléčných výrobků. Nejdůležitější kmeny bakterií mléčného kvašení, které byly izolovány také z velbloudího mléka, jsou: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*.

Cílem práce je izolovat a identifikovat bakterie z velbloudího mléka a dále testovat jejich schopnost růstu ve velbloudím mléce se zaměřením na možné faktory ovlivňujících jejich růst.

Hypotézou bylo, že velbloudí mléko bude dobrým prostředím pro růst bakterií z něj izolovaných. Hypotéza byla potvrzena. Po kultivaci bakterií ve velbloudím mléce došlo k poklesu pH (nejnižší pH bylo zaznamenáno 4,7) a k produkci kyseliny mléčné (průměrná produkce laktátu u izolovaných bakteriálních kmenů byla $20,2 \pm 3,25$ g/l). Mezi porovnávanými skupinami bakterií izolovaných z velbloudího mléka laktobacilů a koků nebyl prokázán statisticky významný rozdíl v růstu po kultivaci ve velbloudím mléce a v produkci kyseliny mléčné. Obsah lysozymu ve velbloudím mléce dosahoval vysokých hodnot (u vzorku: Velbloudí mléko 4 byla koncentrace lysozymu nejvyšší a to 154,49 $\mu\text{g/ml}$).

Klíčová slova: velbloudí mléko; bakterie mléčného kvašení; lysozym; MALDI-TOF

Growth of lactic acid bacteria in camel milk

Summary

Milk and dairy products play an important role in people's diet. Camel milk is an important part of the diet primarily for people in Africa, Asia and the Middle East, for both the adult and the pediatric population. Camel milk is a rich source of minerals. Lactose intolerant people easily metabolize lactose from camel milk and camel casein causes less allergic reactions. Camel milk has a positive effect on a number of diseases and its healing properties can be associated with some of its protein protective components such as lysozyme, lactoferrin, lactoperoxidase, immunoglobulins etc.

Raw camel milk and its fermented products are a good source of potential probiotic strains. Lactic acid bacteria play an important role in the production of lactic acid, which is essential for the production of fermented dairy products. The most important strains of lactic acid bacteria that have also been isolated from camel milk are: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*.

The aim of the thesis is to isolate and identify camel milk bacteria and to test their ability to grow in camel milk, focusing on possible factors influencing their growth.

The hypothesis was that camel milk would be a good medium for the growth of bacteria isolated from it. The hypothesis has been confirmed. After the cultivation of bacteria in camel milk, the pH was lowered (the lowest pH was 4,7) and lactic acid production occurred (mean lactate production in isolated bacterial strains was $20,2 \pm 3,25$ g/l). Comparative groups of bacteria isolated from camel milk: lactobacilli and cocci milk did not show a statistically significant difference in growth after camel milk cultivation and lactic acid production. The lysozyme content in camel milk was high (for the Camel Milk sample 4 was the lysozyme concentration at the highest value, i. e. 154,49 µg/ml).

Keywords: camel milk, lactic acid bacteria, lysozyme, MALDI-TOF

Obsah

1	Úvod	1
2	Cíl	2
3	Literární rešerše	3
3.1	Bakterie mléčného kvašení	3
3.1.1	Charakteristika rodu <i>Lactobacillus</i>	3
3.1.2	Charakteristika rodu <i>Lactococcus</i>	6
3.1.3	Charakteristika rodu <i>Leuconostoc</i>	7
3.1.4	Charakteristika rodu <i>Pediococcus</i>	8
3.1.5	Charakteristika rodu <i>Weissella</i>	8
3.2	Bifidobakterie	9
3.2.1	Charakteristika rodu <i>Bifidobacterium</i>	9
3.3	Velbloudí mléko	13
3.3.1	Mikrobiologie velbloudího mléka	14
3.4	Imunologicky aktivní látky ve velbloudím mléce	16
3.4.1	Laktoferin	16
3.4.2	Laktoperoxidasa	17
3.4.3	Peptidoglykan rozeznávající protein - PGRP	17
3.4.4	IgGs	18
3.4.5	Lysozym	18
3.4.5.1	Tween – Polysorbát 80	21
3.4.6	Bakteriociny	21
3.5	Role bakterie mléčného kvašení při výrobě produktů z velbloudího mléka	23
3.5.1	Fermentované produkty z velbloudího mléka	24
4	Materiál a metody	28
4.1	Původ vzorků	28
4.2	Metody	28
4.2.1	Lysozym test	28
4.2.1.1	Tween 80	29
4.2.2	Stanovení celkového počtu bakterií ve velbloudím mléce	29
4.2.3	Identifikace bakterií z velbloudího mléka	30
4.2.4	Stanovení inokulační dávky bakterií pro testování schopnosti růst ve velbloudím mléce (rozbor v 0 hodin)	30
4.2.5	Testování schopnosti růstu bakterií ve velbloudím mléce	30
4.2.6	Stanovení pH a kyseliny mléčné	32
5	Výsledky	34
5.1	Lysozym test	34

5.1.1	Tween 80.....	37
5.2	Celkový počet bakterií - Mikrobiologické vyšetření.....	39
5.3	Identifikace bakterií z velbloudího mléka.....	40
5.4	Rozbor bakterií před kultivací ve velbloudím mléce (0 hodin).....	41
5.5	Rozbor bakterií po kultivaci ve velbloudím mléce.....	42
5.6	Stanovení pH a kyseliny mléčné.....	45
6	Diskuze.....	49
6.1	Lysozym test.....	49
6.2	Tween 80.....	50
6.3	Mikrobiologický rozbor.....	51
6.3.1	Celkový počet bakterií.....	51
6.3.2	Identifikace bakterií z velbloudího mléka.....	51
6.3.3	Kultivace a rozbor bakterií.....	53
6.4	Stanovení pH a kyseliny mléčné.....	54
7	Závěr.....	56
8	Přílohy.....	57
9	Seznam literatury.....	59

1 Úvod

Velbloudí mléko a jeho výrobky hrají důležitou roli ve stravě lidí u obyvatel v Africe, Asii a v oblasti Středního východu. Mléko je významným zdrojem živin pro dospělou i dětskou populaci. Velbloudí mléko je také nazýváno bílé zlato a to z toho důvodu, že obsahuje velké množství bílkovin. Kaseiny z velbloudího mléka jsou dobře stravitelné a vyvolávají méně alergických reakcí. Velbloudí mléko je bohatým zdrojem minerálních látek a jeho laktosa je snadno metabolizována osobami trpícími nesnášenlivostí laktosy.

Pozitivní vliv je znám po dobu 5000 let. V posledních deseti letech mnoho studií oznamovalo používání velbloudího mléka při léčbě lidských chorob. Jeho pozitivní efekt byl prokázán při poruchách žaludku a střev, při diabetu I. typu, potravinových alergií, při léčbě pacientů s tuberkulózou, k posílení lidského imunitního systému, ke snížení růstu nádorových buněk a k léčení autismu. Vědci se domnívají, že protilátky ve velbloudím mléce by mohly působit proti rakovině, HIV/AIDS, Alzheimerově chorobě a hepatitidě C.

Pro konzumaci a uchování výrobků z velbloudího mléka jsou důležité bakterie mléčného kvašení (ve velbloudím mléce zejména bakterie rodu: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Weissella*) díky kterým se dají vyrábět fermentované mléčné výrobky.

Bakterie mléčného kvašení jsou cenné pro fermentaci mléka kvůli jejich schopnosti snížit pH produkcí kyseliny mléčné a také produkovat antimikrobiální činidla. Správný výběr a vyváženost počáteční kultury je rozhodující pro výrobu fermentovaných produktů s požadovanou strukturou a chutí.

Mezi nejznámější fermentované produkty z velbloudího mléka patří: Shubat (tradiční šumivý fermentovaný mléčný výrobek), Suusac (tradiční fermentované mléko ve východní Africe, Keni a Somálsku, má nízkou viskozitu, kouřovou vůni a trpkou chuť), Gariss (fermentovaný v kozím koženém vaku zavěšeném na velbloudím sedle), máslo, sýry jogurty.

2 Cíl

Cílem práce je popsat mikrobiologické složení a imunologické látky obsažené ve velbloudím mléce. Poskytnou informace z mikrobiologického hlediska užitečné pro potravinářství, zejména pro výrobu fermentovaných mléčných výrobků z velbloudího mléka pomocí bakterií mléčného kvašení a jejich produkce kyseliny mléčné, která je podmínkou pro prodloužení trvanlivosti mléčných výrobků díky snížení pH a zabraňuje růstu nežádoucích kmenů bakterií.

Dalším cílem práce bylo izolovat bakterie z velbloudího mléka a testovat jejich schopnost růstu ve velbloudím mléce. Velbloudí mléko bylo dále testováno na obsah lysozymu.

Hypotézou je, že velbloudí mléko bude dobrým prostředím pro růst bakterií z něj izolovaných.

3 Literární rešerše

3.1 Bakterie mléčného kvašení

Bakterie mléčného kvašení (BMK) jsou komerčně využívány v potravinářském průmyslu z důvodu tvorby chuti, vůně a prodloužení trvanlivosti fermentovaných výrobků. BMK jsou skupina gram-pozitivních anaerobních bakterií, které nevytvářejí spory a vylučují kyselinu mléčnou jako hlavní fermentační produkt a to pokud jsou dodávány vhodné sacharidy.

Bakterie mléčného kvašení jsou důležitými mikroorganismy v lidském organismu. Některé kolonizují ústa a nasofaryngeální sliznici (ústní streptokoky), střeva (enterokoky, některé laktobacily) a sliznice pochvy (specifické laktobacily). V těchto biotopech nejsou patogenní, nýbrž užitečné, nicméně jejich přesné funkce v lidském těle jsou stále nejasné (Teuber, 2001). Bakterie mléčného kvašení jsou schopny růst při teplotách od 5 °C do více než 45 °C, převážně se však jedná o mezofilní mikroorganismy. Současně jsou velmi odolné vůči pH, schopnost růstu byla pozorována při pH 3,2, ale i při 9,6, ovšem majoritně rostou v rozmezí pH 4,0 - 4,5 (Caplice, 1999).

Pro identifikaci BMK byly nejčastěji používány fenotypové metody, ale v poslední době byly vyvinuty molekulární techniky, jako je sekvenování 16S rRNA, což umožňuje konzistentnější a přesnější identifikaci jednotlivých kmenů (Khalid, 2011). BMK jsou tvořeny fylogeneticky příbuznými rody s několika společnými biochemickými a ekologickými rysy. Pro fermentaci v potravinářství se využívají především rody: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Weissella* a *Pediococcus* (Adams, 2008).

3.1.1 Charakteristika rodu *Lactobacillus*

Doména: Bacteria

Kmen: Firmicutes

Třída: Bacilli

Řád: Lactobacillales

Čeleď: Lactobacillaceae

Rod: *Lactobacillus* (Beijerinck, 1901)

Druhy rodu *Lactobacillus* jsou jedny z nejdůležitějších taxonů, které zastávají významnou roli v potravinářské mikrobiologii a lidské výživě. Několik druhů z rodu *Lactobacillus* je podstatných při výrobě fermentovaných potravin a používají se jako výchozí kultury nebo konzervační látky (Salvetti, 2012). Tento rod zahrnuje velký počet druhů GRAS (všeobecně uznávaných jako bezpečné mikroorganismy), které jsou schopny přežít a kolonizovat střevní trakt. Jsou to gram-positivní bakterie, které produkují kyselinu mléčnou jako hlavní konečný metabolický produkt fermentace uhlohydrátů (Klaenhammer, 2011). Členové rodu *Lactobacillus* jsou nesporeující, katalasa negativní (i když některé kmeny jsou schopné produkovat pseudokatalasu), obligátně sacharolytické tyčinky nebo kokobacily. Vedle kyseliny mléčné jsou dalšími vedlejšími produkty: octan, ethanol, CO₂, formiát a sukcinát (Cai, 2012). Laktobacily jsou obecně aerorezistentní nebo anaerobní a acidofilní (Hammes, 1995). Růstová teplota se pohybuje od 2 do 53 °C a mohou růst v rozsahu pH mezi 3 a 8. Optimální růstová teplota a pH jsou obvykle 30 - 40 °C a 5,5 - 6,2. Mají složité nutriční požadavky na aminokyseliny, peptidy, vitamíny, soli, mastné kyseliny nebo estery mastných kyselin, nacházejí se proto v prostředích bohaté na tyto složky. Jde o substráty obsahující uhlohydráty v potravinách, jako jsou mléčné výrobky, obilné výrobky, rybí výrobky, pivo, víno, ovoce a ovocné šťávy, nakládaná zelenina, kaše, zelí, siláž, půda a odpadní vody; jsou součástí normální mikrobioty v ústech, gastrointestinálního a genitálního traktu lidí a mnoha zvířat (Hammes, 2009). Většina druhů rodu *Lactobacillus* byla izolována z gastrointestinálního traktu lidí a zvířat (Todorov, 2009).

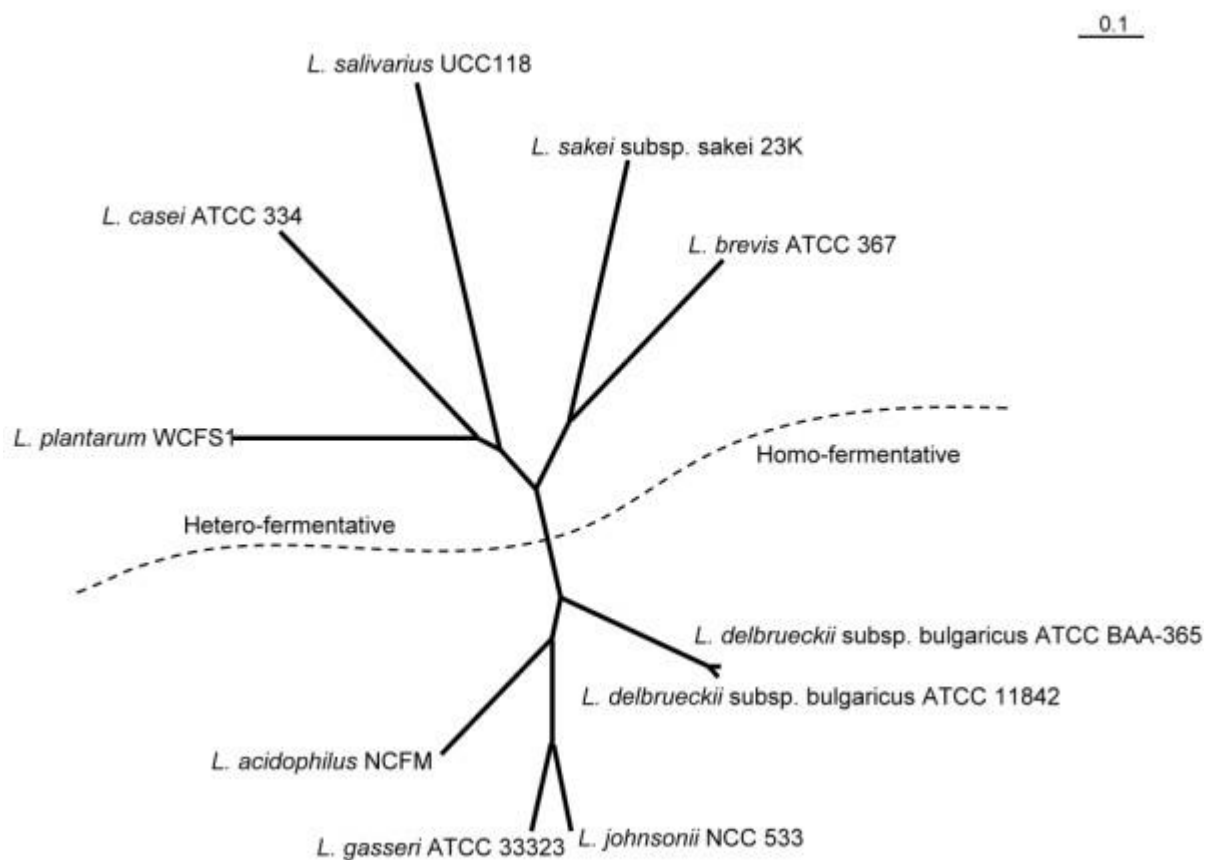
Taxonomie laktobacilů je léta založena na fenotypových vlastnostech jako jsou struktura sacharidů pro fermentaci, odolnost proti různým koncentracím NaCl, růst v různých médiích při definované teplotě nebo v rozmezí pH, rezistence vůči antibiotikům, složení buněčné stěny, buněčné mastné kyseliny, isoprenoidních chinonů a dalších vlastností buněk (Klein, 1998). Původně byly laktobacily seskupeny na základě jejich růstové teploty a fermentace hexos a následně podle jejich homo/heterofermentativního potenciálu. "Moderní" dělení je dáno podle Hammesem a Vogel a Hammes a Hertel, kteří dělí laktobacily jako obligátně homofermentativní, fakultativně heterofermentativní a obligátně heterofermentativní, které je založené na typu fermentovaných cukrů a fermentačních produktů (Salvetti, 2012). Proteotomický strom rodu *Lactobacillus* a rozdělení rodu na homofermentativní a heterofermentativní skupiny je vidět na Obrázku 1.

Homofermentativní laktobacily (běžně označované jako metabolická skupina A) fermentují hexosy téměř výlučně (z 85 %) na kyselinu mléčnou prostřednictvím cesty EMP (Embden-Meyerhof-Parnas) nebo-li glykolýzou, pentosy a glukonát jsou nefermentované.

Fakultativní heterofermentativní druhy (metabolická skupina B) fermentují hexosy na kyselinu mléčnou pomocí EMP cesty a jsou schopny degradovat pentosy a glukonát prostřednictvím indukovatelné fosfoketolasy enzymem pentosyfosfát (PP) s výslednou produkcí kyseliny octové, ethanolu a kyseliny mravenčí při nedostatku glukosy.

Obligátně heterofermentativní laktobacily (metabolická skupina C) mají aldolasu, ale ne fosfoketolasu, metabolizují pentosy a hexosy výlučně cestou fosfoglukonátu (odpovídající první části PP) a produkují kyselinu mléčnou, ethanol (nebo kyselinu octovou) a CO₂ (Hammes, 2009).

Obrázek 1: Proteotomický strom rodu *Lactobacillus*, (Lee, 2012)



Výjimky z těchto vlastností jsou známy a naznačují, že klasifikace a identifikace založená na metabolických charakteristikách mohou být zavádějící. Dostupnost genové sekvence 16S rRNA umožnila první fylogenetickou analýzu rodu, kterou provedli Collins a kol. (1991). Rod *Lactobacillus* obsahuje 152 druhů (říjen 2012) (Salveti, 2012).

3.1.2 Charakteristika rodu *Lactococcus*

Doména: Bacteria

Kmen: Firmicutes

Třída: Bacilli

Řád: Lactobacillales

Čeleď: Streptococcaceae

Rod: *Lactococcus* (Schleifer et al., 1985)

Rod *Lactococcus* je součástí bakterií mléčného kvašení (Oliveira, 2017). V současnosti je uznáno devět druhů *Lactococcus* společně se čtyřmi poddruhy: *L. chungangensis*, *L. formosensis*, *L. fujiensis*, *L. garvieae*, *L. lactis*, (*L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *Hordniae*, *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *tractae*, *L. piscium*, *L. plantarum*, *L. raffinolactis*, *L. taiwanensis*).

Jsou to grampozitivní, katalasa negativní, nesporulující, fakultativně anaerobní, nepohyblivé koky, které se nacházejí jednotlivě, ve dvojicích nebo v řetězcích. Rod obsahuje kmeny, o kterých je známo, že rostou při nebo pod teplotou 7 °C. Jejich homofermentivní charakter může být změněn úpravou podmínek prostředí, jako je pH, koncentrace glukosy a omezení živin (Jay, 2000). Navzdory obvyklému spojení *Lactococcus lactis* s mléčnými produkty byly bakterie původně izolovány z rostlin, kde se předpokládalo, že jsou dormantní a stanou se aktivní a začnou se množit až v gastrointestinálním traktu po konzumaci přežvýkavců (Bolotin, 2001). *Lactococcus lactis* byl používán po staletí při fermentaci potravin, zejména sýrů, jogurtů, zelí a podobně, čímž je Food and Drug Administration (FDA) obecně uznávaný jako bezpečný (GRAS) (Song, 2017). Laktokoky se obvykle nenacházejí ve fekálním materiálu ani v půdě (Teuber, 2001). Získáním plazmidové DNA kódující fosfoenolpyruvát-fosfotransferasový systém (PEP-PTS) se některé kmeny dobře přizpůsobily růstu v mléku díky jejich účinnému vychytávání a fermentaci laktosy (Stiles et al., 1997). Produkce inhibičních látek (bakteriocinů) je oblastí, která zvyšuje zájem a právě kmeny *Lc. lactis* produkují řadu bakteriocinů, z nichž nejdůležitější je lantibiotikum, nisin, který má široké spektrum účinnosti proti grampozitivním bakteriím, včetně *Clostridium botulinum* a jeho spór (Delves-Broughton, 1990).

3.1.3 Charakteristika rodu *Leuconostoc*

Doména: Bacteria

Kmen: Firmicutes

Třída: Bacilli

Řád: Lactobacillales

Čeleď: Leuconostocaceae

Rod: *Leuconostoc* (van Tieghem, 1878)

Členové rodu *Leuconostoc* jsou mezofilní fakultativně anaerobní, katalasa negativní, gram-pozitivní koky uspořádané v párech nebo řetězech. Všechny druhy v tomto rodu jsou heterofermentativní a jsou schopné produkovat dextran ze sacharosy (Garvie, 1986). *Leuconostoc* spp. jsou mikroorganismy, které se obvykle vyskytují na čerstvých rostlinách. Z tohoto přirozeného prostředí se šíří např. do syrového mléka nebo do chlazených potravinářských výrobků jako jsou fermentované klobásy, fermentovaná zelenina, obilné výrobky a mléčné výrobky (Dicks et al., 1993). Leukonostoky jsou primárně využívány jako výrobci chuti v kombinaci s laktokoky. Citrát fermentační kmeny *Leuconostoc* poskytují máslovou příchuť prostřednictvím tvorby diacetylu (Liu, 2016).

Rod *Leuconostoc* zahrnuje: *L. mesenteroides* (s třemi poddruhy *mesenteroides*, *dextranicum* a *cremoris*) a třináct druhů *L. citreum*, *L. carnosum*, *L. durionis*, *L. fallax*, *L. ficulneum*, *L. pseudoficulneum*, *L. fructosum*, *L. gasicomitatum*, *L. gelidum*, *L. inhae*, *L. kimchii*, *L. lactis*, *L. pseudomesenteroides* (Euzéby, 1997). Zajímavou vlastností rodu *Leuconostoc* je exkluzivní výroba D-laktátu z glukosy, protože většina dalších bakterií mléčného kvašení produkuje DL-laktát. Fyziologické studie ukázaly, že druhy *Leuconostoc* jsou bakteriemi mléčného kvašení úzce spojenými s heterofermentativními laktobacily. Můžeme je odlišovat od laktobacilů jejich morfologií a jejich výlučnou produkcí D-laktátu z glukosy cestou pentosfosfátu. Různá selektivní média byla také vytvořena pro specifickou izolaci a rozpoznání bakterií rodu *Leuconostoc*. Rozpoznání je usnadněno použitím vankomycinu v růstovém médiu, protože všechny druhy přípravku *Leuconostoc* jsou proti vankomycinu vnitřně odolné (Billie et al., 1985; Benkerroum et al., 1993). Identifikační metody založené na DNA (16S nebo 23S ribozomální RNA) jsou rychlejší a spolehlivější než tradiční metody a jsou široce používány k odlišení druhů *Leuconostoc* (Ogier et al., 2008).

3.1.4 Charakteristika rodu *Pediococcus*

Doména: Bacteria

Kmen: Firmicutes

Třída: Bacilli

Řád: Lactobacillales

Čeleď: Leuconostocaceae

Rod: *Pediococcus* (Claussen, 1903)

Pediococcus spp. jsou bakterie mléčného kvašení, které jsou široce popsány jako probiotika a jsou charakterizovány jako gram-pozitivní, nepohyblivé, katalasa negativní a fakultativně anaerobní koky seskupeny většinou do tetrad (Porto, 2017). Tyto mikroorganismy jsou potenciálně nebezpečné pro pivo v tom, že jsou mikroaerofilní a relativně tolerantní k alkoholu (Weiss, 1991). V důsledku jejich vztahu ke zkažení piva byly pediokoky mezi prvními bakteriemi, které studoval Louis Pasteur. Pediokoky jsou homofermentativní a kromě *L. dextrinicus*, který produkuje L (+) - kyselinu mléčnou všechny druhy produkují DL-laktát z glukosy (Stiles et al., 1997). Je popsáno 11 druhů rodu *Pediococcus*: *P. acidilactici*, *P. clausenii*, *P. cellicola*, *P. damnosus* (pivní zákal, cider, víno), *P. dextrinicus* (pivo, siláž), *P. ethanolidurans*, *P. parvulus* (kysané zelí, siláž), *P. inopinatus* (kysané zelí, pivo), *P. pentosaceus* (zelenina, fermentované klobásy, mléko a mléčné výrobky), *P. siamensis*, *P. stilesi* (Haakensen, 2009).

3.1.5 Charakteristika rodu *Weissella*

Doména: Bacteria

Kmen: Firmicutes

Třída: Bacilli

Řád: Lactobacillales

Čeleď: Leuconostocaceae

Rod: *Weissella* (Collins et al. 1993)

Weissella spp. jsou heterofermentativní, fakultativně anaerobní, gram-pozitivní, katalasa negativní, alfa hemolytické bakterie, které se objevují jako krátké tyčinky nebo kokobacily ve dvojicích a řetězcích. Na základě neobvyklé morfologie skvrn a vlastní rezistence na vankomycin, byla *Weissella* spp. často zaměňována s rodem *Lactobacillus* spp. nebo organismy podobné *Lactobacillus*. *Weissella* byla identifikována jako jedinečný rod v roce 1993 na základě analýzy sekvence genu 16S rRNA a pojmenována podle německého

mikrobiologa Norberta Weissea pro jeho mnoho příspěvků k taxonomii mléčných bakterií (Collins et al., 1993). *Leuconostoc paramesenteroides* a příbuzné druhy gram-pozitivních koků s negativní na katalasu a vankomycin-rezistentní, byly reklasifikovány do tohoto rodu. *Weissella* nyní tvoří odlišnou fylogenetickou skupinu oddělenou od jiných rodů bakterií mléčného kvašení, včetně *Leuconostoc*, *Lactobacillus* a *Streptococcus* (Flaherty et al., 2003). K roku 2015 byly identifikovány tyto druhy *Weissella*: *W. beninensis*, *W. ceti*, *W. cibaria*, *W. confusa*, *W. diestrammenae*, *W. fabalis*, *W. fabaria*, *W. ghanensis*, *W. halotolerans*, *W. kandleri*, *W. koreensis*, *W. minor*, *W. oryzae*, *W. paramesenteroides*, *W. soli*, *W. thailandensis*, *W. uvarum*, *W. viridescens* (Fusco et al., 2015).

W. confusa byly izolovány z fermentovaného velbloudího mléka. Tyto bakterie se často vyskytují ve fermentovaných potravinách a byly navrženy jako potenciální probiotikum. Kromě toho byla z Shubatu izolována *Weissella helleca*. Podle nejlepších znalostí nebyly na *Weissella helleca* nalezeny žádné studie, kde by tato bakterie měla prokázaný probiotický účinek nebo vykazovala potenciální zdravotní rizika pro spotřebitele (Shori, 2017).

3.2 Bifidobakterie

Dříve byly bifidobakterie kvůli svým morfologickým a fyziologickým rysům, které jsou podobné těm, které obsahují laktobacily, zařazovány do rodu *Lactobacillus*, tak jako např.: *Lactobacillus bifidus*, ale nyní jsou klasifikovány jako samostatný rod *Bifidobacterium*, tak jak to navrhl Orla – Jensen v roce 1924 (Mitsuoka, 1984).

3.2.1 Charakteristika rodu *Bifidobacterium*

Doména: Bacteria

Kmen: Actinobacteria

Třída: Actinobacteria

Podtřída: Actinobacteridae

Řád: Bifidobacteriales

Čladed': Bifidobacteriaceae

Rod: *Bifidobacterium* (Orla – Jensen, 1924)

Rod *Bifidobacterium*, který je členem rodiny *Bifidobacteriaceae* a řádu Bifidobacteriales, patří do kmenu Actinobacteria, což představuje jednu z největších bakteriálních taxonomických jednotek (Dworkin, 1999). Bifidobakterie jsou gram-pozitivní

(nicméně často se objevují nepravidelné gram negativní oblasti), heterofermentativní bakterie (Biavati et al, 2001). Tvar bifidobakterií je tyčovitý a zakřivený, variabilní na závislosti růstového média, vyskytující se jednotlivě nebo v řetězcích, tvar Y má např. pokud je ve stolici kojence (Bezkorovainy, 1989).

Bifidobakterie řadíme mezi mikroorganismy sacharolytické. Produkty fermentace sacharidů jsou kyselina octová a kyselina mléčná. Vzniklá kyselina mléčná se vyskytuje ve formě izomeru L (+), a proto ji lze snadno metabolizovat organismem dítěte. Od bakterií mléčného kvašení je odlišuje nepřítomnost glukoso-6-fosfát-dehydrogenasy a aldolasy. Bifidobakterie vytváří enzym fruktoso-6-fosfát-fosfoketolasu, jehož přítomnost je významným identifikačním znakem (Maxa et Rada, 1996). Bifidobakterie mají schopnost adheze na lidská střeva, což je nezbytné pro úspěšnou kolonizaci a tím dosažení probiotických účinků (Kainulainen et al., 2013). U výlučně kojených novorozenců představují více než 95 % střevních bakterií. V kojeneckém věku mají tedy bifidobakterie nejvýznamnější roli. Vzhledem k jejich dominanci u kojených dětí ve srovnání s dětmi krmenými kojeneckými výživami jsou spojovány se zdravým střevním traktem již od jejich objevení (Krejsek et al., 2007).

První kmen *Bifidobacterium* nazývaný *Bacillus bifidus communis* byl izolovaný Tissierem (1900) z výkalů kojence. Od té doby se počet druhů neustále zvyšuje (srpen 2016), přibývají nové přírůstky jako je *Bifidobacterium tsurumiense* izolovaný z křeččího plaku, *Bifidobacterium mongoliense* izolovaný z airag (tradiční fermentované kobyli mléko mongolů), *Bifidobacterium psychraerophilum*, pocházející z prasečích střev atd. Mnohé bifidobakterie jsou stále ještě neobjeveny, jak to naznačují různé metagenomické studie (Pokusaeva, 2011). V současnosti je popsáno 54 druhů a 10 poddruhů s celkem 60 taxony.

54 druhů rodu *Bifidobacterium* (z roku 2018) a jejich výskyt:

1. *B. actinocoloniformis* - trávicí trakt (TT) čmeláků
2. *B. aquikefiri* - kefír
3. *B. adolescentis* - TT dospělých lidí
4. *B. aerophilum* - výkaly tamarína pinčí (*Saguinus oedipus*)
5. *B. aesculapii* – výkaly tosmána bělovousého (*Callithrix jacchus*)
6. *B. angulatum* - TT lidí
7. *B. animalis*
 - subsp. *animalis* - králíčí, krysí, telecí výkaly
 - subsp. *lactis* - fermentované mléko

8. *B. asteroides* - TT včel
9. *B. avesanii* - výkaly tamarína pinčí (*Saguinus oedipus*)
10. *B. biavatii* - výkaly tamarína žlutorukého (*Saguinus midas*)
11. *B. bifidum* - TT dětí a dospělých, vagína
12. *B. bohemicum* – TT čmeláka hájového (*Bombus lucorum*)
13. *B. bombi* - TT včel
14. *B. boum* - fekálie prasat, břidlice
15. *B. breve* - TT dětí, vagína, výkaly
16. *B. callitrichos* - výkaly kosmana bělovousého (*Callithrix jacchus*)
17. *B. catenulatum* - TT dětí a dospělých, vagína
18. *B. commune* – TT včel
19. *B. coryneforme* - TT včel
20. *B. crudilactis* - čerstvé mléko, česrtvý sýr
21. *B. cuniculi* - TT králíků
22. *B. choerinum* - TT prasat
23. *B. dentium* - ústní dutina (zubní kazy), TT dospělých, vagína
24. *B. eulemuris* – výkaly lemura tmavého (*Eulemuris macaco*)
25. *B. faecale* – TT dvouletého dítěte
26. *B. gallicum* - TT dospělých
27. *B. gallinarum* - TT kuřat
28. *B. hapali* - výkaly kosmana bělovousého (*Callithrix jacchus*)
29. *B. indicum* - TT včel
30. *B. kashiwanohense* - TT zdravého dítěte (1,5 roku)
31. *B. lemurum* – výkaly dospělého lemura kata (*Lemur catta*)
32. *B. longum*
 - subsp. *infantis* - TT dětí, vagína
 - subsp. *longum* - TT dětí a dospělých, vagína
 - subsp. *suis* - TT prasat
 - subsp. *suillum* - TT prasat
33. *B. magnum* - TT králíků
34. *B. merycicum* - bachor přežvýkavců
35. *B. minimum* - odpadní voda
36. *B. myosotis* - výkaly kosmana bělovousého (*Callithrix jacchus*)

37. *B. mongoliense* - fermentované kobydí mléko
38. *B. moukalabense* - výkaly divoké gorily
39. *B. pseudocatenulatum* - TT dětí
40. *B. pseudolongum*
 - subsp. *globosum* - prasečí, slepičí a telecí výkaly, bachor přežvýkavců
 - subsp. *pseudolongum* - prasečí, slepičí a telecí výkaly, bachor přežvýkavců
41. *B. psychraerophilum* - TT prasete
42. *B. pullorum* - TT kuřat
43. *B. ramosum* - výkaly tamarína pinčího (*Saguinus oedipus*)
45. *B. ruminantium* - bachor přežvýkavců
46. *B. saguini* – výkaly tamarín červenorukého (*S. mida*)
47. *B. saeculare* - TT králíků
48. *B. scardovii* - TT člověka
49. *B. stellenboschense* - výkaly tamarín červenorukého (*S. mida*)
50. *B. subtile* - odpadní voda
51. *B. thermacidophilum*
 - subsp. *B. thermacidophilum* - TT selat, kuřat, telat, bachor
 - subsp. *porcinum* - TT selat, kuřat
52. *B. thermophilum* - TT selat, kuřat, telat, bachor
53. *B. tissieri* - výkaly Kosmana bělovousého (*Callithrix jacchus*)
54. *B. tsurumiense* - křeččí zubní plak (Mattarelli, 2018)

3.3 Velbloudí mléko

Velbloudí mléko a velbloudí mléčné výrobky dnes hrají důležitou roli ve stravě obyvatel ve venkovských oblastech Afriky, Asie a Středního východu se zhoršenými zemědělskými podmínkami, vysokými teplotami a malým množstvím srážek. Při zhoršených okolních podmínkách mohou velbloudi produkovat více mléka než jakýkoli jiný druh, zatímco jejich poptávka po jídle je velmi skromná (Brezovečki, 2015). Aby došlo k produkci mléka, mláďata po porodu nejsou oddělována od matky, na rozdíl od skotu. Podle FAO (z roku 2008) je světová produkce velbloudího mléka zhruba 5,3 milionu tun ročně, s pouhými 1,3 milionu tun konzumovaných lidmi. Velbloudí mléko je také nazýváno bílé zlato z pouště, protože obsahuje dostatek živin, může být podáváno podvyživeným dětem v afrických zemích k zachování jejich života (Mekadim, 2017).

Hodnota velbloudího mléka je dána vysokou koncentrací těkavých kyselin, zejména kyseliny linolové a polynenasycených mastných kyselin, které jsou nezbytné pro lidskou výživu (Mati, 2017). Dominantními mastnými kyselinami ve velbloudím mléce jsou palmitová a olejová (Farah, 1993). Velbloudí mléko je považováno za hojný zdroj bílkovin, který obsahuje ochrannou složku zahrnující lysozym, laktoferin, laktoperoxidasu a peptidoglykanový rozpoznávací protein (PGRP), který je nejvíce zastoupen ve velbloudím mléce a byl z něj poprvé izolován (Singh et al. 2006). Imunoglobuliny IgA a IgG, které jsou kompatibilní s lidskými, poskytují účinnou obranu proti několika virovým a bakteriálním patogenům. Skutečnost, že velbloudí mléko má nulový obsah β -kaseinů a β -laktoglobulinu - dva silné alergeny v kravském mléku, činí tak mléko pro lidi s alergiemi na mléko více atraktivní. Kaseiny z velbloudího mléka jsou dobře stravitelné a vyvolávají u kojenců méně alergických reakcí. Velbloudí mléko je bohatým zdrojem chloridu a jeho laktosa je snadno metabolizována osobami trpícími nesnášenlivostí laktosy, protože velbloudí mléko neobsahuje β -laktoglobulin (Ahmed, 2013, Shabo, 2005).

Na složení velbloudího mléka má vliv několik faktorů jako je zeměpisná oblast, stádium laktace, sezónní vlivy, ale především výživa. Energetická hodnota je 2 784 kJ/l (665 kcal/l). Úroveň vitamínu C je více než trojnásobná v porovnání s kravským mlékem a jeden a půl násobná v případě lidského mléka. Průměrná koncentrace vitamínu C ve velbloudím mléce je 34,16 mg/l. Velbloudí mléko má také nízký obsah cukru a bílkovin a vysoký obsah minerálů (sodík, draslík, železo, měď, zinek, selen a hořčík) (Ahmed, 2013). Vedle nutriční hodnoty velbloudího mléka se zdá, že toto mléko má potenciální léčivé vlastnosti; po dlouhou dobu se velbloudí mléko používalo pro léčebné účely, jako je například léčba metabolických

a autoimunních onemocnění. Rovněž se tvrdí, že velbloudí mléko má pozitivní vliv na snížení symptomů autismu (Mati, 2017).

3.3.1 Mikrobiologie velbloudího mléka

Syrové velbloudí mléko a jeho fermentované produkty mohou být dobrým zdrojem potenciálních probiotických kmenů. *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* a *Enterococcus* jsou nejběžnější kmeny používané jako probiotické bakterie. Směs různých druhů bakterií, např. *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Enterococcus faecium* a *Streptococcus thermophilus* byly identifikovány jako převládající bakterie ve velbloudím mléce (Yateem, 2008).

Výrobky z velbloudího mléka vzniklé spontánní fermentací mají obecně nekonzistentní smyslové vlastnosti. Správný výběr a vyváženost počáteční kultury je rozhodující pro výrobu fermentovaných produktů s požadovanou strukturou a chutí. Mikrobiologická kvalita mléka a mléčných výrobků je ovlivněna počátečním stavem syrového mléka (Fguiri, 2016). Maurad a Meriem (2008) izolovali dva kmeny *Lactobacillus plantarum* z tradičního másla vyrobeného z velbloudího mléka (shmen) jako výchozí kultury pro fermentaci velbloudího mléka. Tyto dva kmeny vykazovaly rychlou acidifikační aktivitu, proteolytickou aktivitu, antibakteriální aktivitu a vysokou míru přežití po lyofilizaci. Předchozí studie uváděla, že distribuce BMK v syrovém velbloudím mléce z Maroka měla velkou rozmanitost dominantních druhů, jako je *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (17,5 %), *Lactobacillus helveticus* (10 %), *Streptococcus salivarius* subsp. *termophilus* (9,20 %), *Lactobacillus casei* subsp. *casei* (5,80 %) a *Lactobacillus plantarum* (5 %) (Khedid, 2009). Bakteriální kmen *Enterococcus hirae* (MTCC 10507) byl izolován z velbloudího mléka od Madhuet al. (Madhu, 2012). Izolace několika BMK ze syrového velbloudího mléka shromážděného z arabských velbloudů v Egyptě byly identifikovány jako *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Aerococcus viridians*, *Lactococcus lactis* a *Lactobacillus plantarum*. Všechny tyto bakterie prokázaly potenciální probiotickou schopnost, jako je účinnost proti patogenům (*Salmonella typhi* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922 a *Vibrio fluvialis*), odolnost vůči kyselině žaludku (pH 3,0), tolerance proti 0,3% žlučovým solí a žádný z izolátů nezpůsobil krevní hemolýzu (Hamed, 2013). Navíc Benmechernene a kol. izolovali dva kmeny *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (B7 a Z8) z alžírského velbloudího mléka. Tyto dva kmeny vykazovaly vysoký potenciální probiotický profil *in vitro*, tj. dobré přežití při nízkém pH (3). Navíc oba kmeny měly antimikrobiální aktivitu proti patogenním kmenům, např. *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii* a *Staphylococcus aureus* (Benmechernene,

2013). Některé nové mikrobiální druhy, jako jsou *Streptococcus tangierensis*, *Streptococcus cameli* a *Enterococcus bulliens*, byly také izolovány z velbloudího mléka (Kadri et al., 2014).

3.4 Imunologicky aktivní látky ve velbloudím mléce

Vědecké údaje podporují antidiabetické, protiinfekční, anticytotoxické a imunomodulační účinky velbloudího mléka. Hojivé vlastnosti velbloudího mléka mohou být spojeny s některými jeho proteinovými složkami, tj. laktoferinem, imunoglobuliny, lysozymem, laktoperoxidase, vitamínem C a některými bioaktivními peptidy produkovanými během trávení mléka v gastrointestinálním traktu. Celkový obsah bílkovin ve velbloudím mléce je $33,5 \pm 6,2$ g/l plnotučného mléka a variabilita závisí na zeměpisném původu zvířat. Kaseiny představují přibližně 80 % celkového obsahu mléčných proteinů, zatímco podíl syrovátkových bílkovin je relativně nízký. Syrovátka obsahuje mnoho rozpustných proteinů, stejně jako mnoho různorodých peptidů generovaných proteázami přítomnými ve velbloudím mléce, jako je chymotrypsin A a katepsin D. Samotné velbloudí mléčné bílkoviny mohou být bioaktivní nebo by mohly sloužit jako prekurzory bioaktivních peptidů (Mati, 2017).

3.4.1 Laktoferin

Laktoferin (Lf) patří do rodiny transferinu a hraje důležitou roli ve vrozené a specifické hostitelské obraně proti infekci mikroorganismy. Lf je důležitým regulátorem hladiny volného železa v tělních tekutinách savců. Jeho schopnost vázat Fe^{3+} vysokou afinitou a udržet tuto vazbu i v prostředí s nízkým pH dává bílkovinám bakteriostatické a antioxidační vlastnosti (Baker, 2004). Nasycené železo laktoferinu z mléka ovlivňuje absorpci střevního železa u kojenců a zároveň je zdrojem železa. Hojně je laktoferin obsažen v kolostru, tím pomáhá zabránit mikrobiálnímu růstu ve střevech kojenců, které se mohou snadno infikovat. Je tedy důležitý v prvních týdnech života kojence, aby přežili, dokud se jejich imunitní systém nevyvine. Laktoferin ve velbloudím mléce obsahuje 689 aminokyselinových zbytků. Skládá se z jediného polypeptidového řetězce složeného do dvou homologních *N* a *C*-konců. Kationtový *N*-konec molekuly je schopen přímo poškodit membránu bakterií (patogenu) (Kappeler, 1999). Pozitivně nabitě aminokyseliny v Lf mohou interagovat s aniontovými sloučeninami na určitých bakteriálních, virových, plísňových a parazitních površích, což způsobuje lýzu buněk. Následné uvolňování lipopolysacharidů (LPS) vede ke změně permeability a vyšší citlivosti na lysozym a jiné antimikrobiální látky. Další možný poškozující mechanismus laktoferinu proti mikroorganismům je ten, že mikroorganismy, které vyžadují železo, tak laktoferin má schopnost chelátovat tento kov, čímž zbavuje

mikroorganismy zdroje těchto živin. Antimikrobiální vlastnosti přípravku Lf jsou také přičítány některým jeho peptidům, jako je laktofericin (fragment 17-42) a laktoferanpin (fragment 265-284), které prokázaly, že mají antibakteriální, protiplísňové a antiparazitické aktivity silnější než celý Lf (Bruni et al., 2016). Velbloudí Lf vykazuje nejvyšší antibakteriální aktivitu proti *Escherichia coli* ve srovnání s alpagovými (*Vicugna pacos*), kozími, lidskými a ovčími laktoferiny a jeho spektrum antibakteriální aktivity je podobné jako u hovězího Lf (El-Agamy et al., 1992). Avšak velbloudí Lf vykazuje velmi nízkou aktivitu pro zachytávání volných radikálů a antioxidační účinnost redukující železo. Velbloudí Lf je schopen inhibovat poškození DNA a proliferaci buněk rakoviny tlustého střeva *in vitro*. Navíc, velbloudí Lf je schopen inhibovat vstup viru hepatitidy C do lidských leukocytů s větší účinností než lidský nebo hovězí Lf (Mati, 2017).

Srovnávací výzkumy Lf v různých mlékách ukazují, že koncentrace Lf ve velbloudím mléce je 30 - 100krát vyšší než u mléka jiných druhů (Al-Majali, 2007).

3.4.2 Laktoperoxidasa

Laktoperoxidasa je glykoprotein, který se přirozeně vyskytuje v kolostru, mléce a v mnoha dalších lidských a zvířecích sekretech. Tento protein přispívá k ochraně neimunitního systému proti hostitelům, působí bakteriostatickou a baktericidní aktivitou hlavně na gram-negativní bakterie (Touch, 2004). Pro antimikrobiální funkci vyžaduje laktoperoxidasa přítomnost peroxidu vodíku a thiokyanátu, které jsou nazývány jako "laktoperoxidasový systém". V současné době se tento systém považuje za důležitou součást přirozeného hostitelského obranného systému u savců (Boots, 2006). Antibakteriální účinek laktoperoxidasového systému je způsoben účinkem reakčních produktů oxidace thiokyanátu, OSCN⁻ a HOSCN, které jsou schopny oxidovat volné thiolátové skupiny různých proteinů, které jsou důležité pro životaschopnost patogenů (Sermon, 2005). Velbloudí laktoperoxidasa vykazuje významné antibakteriální účinky proti *Pseudomonas aeruginosa* a bakteriostatické účinky proti grampozitivním bakteriím *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* a *Staphylococcus aureus* a baktericidní vůči gramnegativním bakteriím *E. coli* a *Salmonella typhimurium* (El-Agamy, 1992).

3.4.3 Peptidoglykan rozeznávající protein - PGRP

PGRP-1 je rozpustný konzervovaný protein pro rozpoznávání vzorků obratlovců a bezobratlých, který se váže na bakteriální peptidoglykan (Liu, 2000). Protein byl poprvé

popsán u prasat a později izolován z velbloudího mléka (Kappeler et al., 2004). Velbloudí PGRP-1 tvoří tetramer se dvěma funkčními místy: peptidoglykanové vazebné místo a druhé místo zapojené do vazby molekuly nepeptidoglykanu. PGRP-1 se může vázat na peptidoglykanové struktury v buněčné stěně a inhibovat růst patogenů. Tento protein je multifunkční a proto se může vázat na lipopolysacharid z gramnegativních bakterií a na kyselinu lipoteichoovou gram-pozitivních bakterií a v důsledku toho inhibuje expresi indukovatelných prozánětlivých cytokinů (Sharma, 2011).

3.4.4 IgGs

Velbloudí IgGs nejsou omezeny na jednu hlavní podtřídu IgGs1, ale zahrnují dvě další podtřídy IgGs2 a IgGs3, které jsou zbaveny lehkých řetězců a mají těžké řetězce 46 a 43 kDa. Velbloudí protilátky těžkého řetězce interferují s několika biologickými procesy a jsou dobrými kandidáty pro humánní terapii, protože působí jako skutečné kompetitivní inhibitory, které penetrují do aktivních míst některých enzymů, jako je reverzní transkriptasa viru lidské imunodeficiency typu 1 (HIV-1), proteasy a integrasy, které jsou rozhodující pro životní cyklus HIV-1 (Daley-Bauer, 2010).

3.4.5 Lysozym

Lysozym (EC 3.2.1.17) je enzym katalyzující hydrolytické reakce. Spadá tak do velké rodiny hydroláz, které využívají ke své katalytické štěpné funkci molekulu vody. Lysozym byl „náhodou“ objeven Alexandrem Flemingem v roce 1922 jako pozoruhodný bakteriolytický prvek, když se mu dostal nosní hlen na bakterie nanesené na agaru. Postupem času se mu začaly bakteriální kolonie rozpouštět.

Lysozym je bakteriolytický enzym, který štěpí β -1,4-glykosidické vazby buněčné stěny mureinu (peptidoglykanu), což vede k lýze buňky. Peptidoglykan je základní konstrukční kámen bakteriálních buněčných stěn. Díky své pevnosti zvyšuje odolnost vůči buněčnému turgoru. Ztráta integrity peptidoglykanové vrstvy vede k bezprostřední rychlé buněčné lýzi následované nevyhnutelnou buněčnou smrtí. Dlouhodobé studium lysozymu vedlo k objevu členité rodiny. Tato rodina enzymů zahrnuje 3 základní typy odvozené od jejich prvně objevených zástupců:

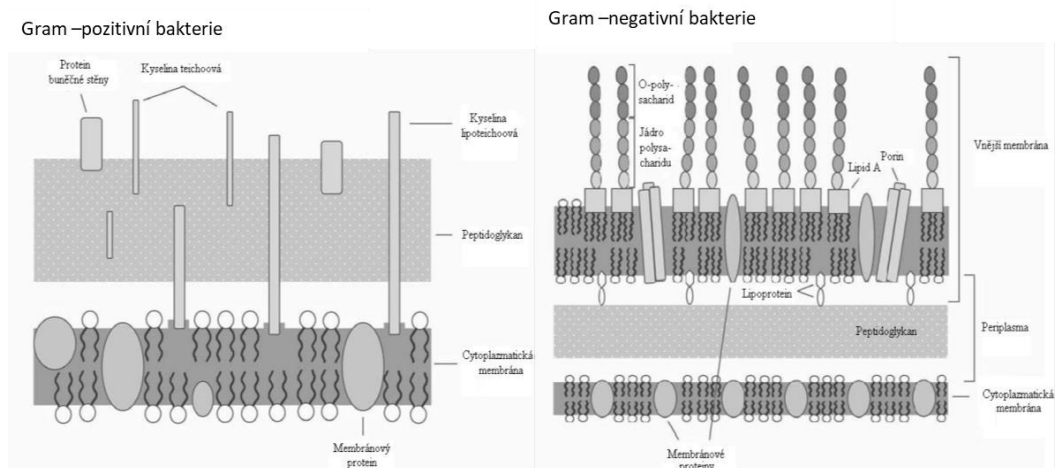
- a) lysozomy typu-c (chicken, conventional-type)
- b) lysozomy typu-g (goose-type)
- c) lysozomy typu-i (invertebrate-type).

Všechny tři typy jsou široce rozšířené mezi nejrůznějšími živočichy. Liší se hlavně primární strukturou, tedy sekvencí aminokyselin (AMK). Rozdíly v sekvenci AMK tak ovlivňují jejich biochemické a enzymatické vlastnosti.

Antibakteriální aktivita mléčného lysozemu jako součásti nespecifického vrozeného obranného mechanismu. Antibakteriální lysozomy jsou proto nejčastěji produkovány v tkáních a tekutinách přímo vystavených vnějšímu prostředí, kde slouží k přímé likvidaci bakterií a zabraňují vzniku infekce. Činí buď nezávisle lýzu citlivých bakterií nebo jsou součástí komplexních imunologických reakcí např.: pomáhá makrofágům ke zvýšení fagocytosy proti bakteriím (Varaldo et al., 1989), (Callewaert & Michiels 2010). Lysozym takto přispívá k vrozené ochraně před mikrobiálními infekcemi ještě ve vemeni a zpomaluje zkažení mléka po nadojení. Antimikrobiální aktivita lysozemu byla ve velké míře prokázána *in vitro* nebo ve fyziologických tekutinách a sekretech včetně mléka, krevního séra, slin a moči. Přestože se prokázalo, že lysozym má antimikrobiální účinky vůči bakteriím, houbám, prvokům a virům, je v podstatě známý svou antibakteriální aktivitou a na tomto základě je používán při konzervaci potravin (Benkerroum, 2008).

Antibakteriální aktivita lysozemu je v podstatě zaměřena na grampozitivní bakterie, neboť jejich složka pro cílovou buněčnou stěnu (peptidoglykan) je pro tento enzym volně přístupná, oproti gram-negativním bakteriím, která je chráněna lipopolysacharidovou vrstvou vnější membrány. Nedávné studie však naznačují, že rezistence bakterií na lysozym není výlučně spojena s přítomností LPS vrstvy.

Obrázek 2: Buněčné stěny bakterií (Callewaert & Michiels, 2010)



Ve skutečnosti není přesný mechanismus rezistence na lysozymu zcela pochopen a může se měnit podle bakteriálního kmene nebo druhu. Byly navrženy různé mechanismy rezistence u gram-pozitivních bakterií: (i) zabránění působení lysozymu polymery pro povrchové připojení (např. kapsulární polysacharidy a teichoové kyseliny), (ii) vysoký stupeň zesílení peptidů, (iii) O-acetylace hexosaminových zbytků peptidoglykanu buněčné stěny, (iv) N-deacetylace acetamidokupiny z hexosaminových zbytků, (v) začlenění kyseliny D-asparagové do bakteriálního peptidoglykanového kříže, jak bylo prokázáno u *Lactococcus lactis* a (vi) produkci proteinových inhibitorů specifických pro lysozym (Benkerroum, 2008).

Lysozym v mléce chrání kojence před gastrointestinální invazí patogenních bakterií. Mléko prakticky všech savců obsahuje lysozym buď jako volně rozpustný protein, nebo v leukocytech a lysosomech. Přestože všechny mléčné lysozymy patří do typu c, mění se široce ve struktuře a fyzikálně-chemických vlastnostech jako např.: schopnost vázat vápníkové ionty, stabilita vůči teplu, pH, nebo izoelektrický bod. Kromě toho se koncentrace rozpustného lysozymu v mléce značně liší od jednoho druhu k druhému a ve stejném druhu v závislosti na různých faktorech, jako je plemeno, stupeň laktace, porod, výživa, zdraví vemene a období roku (viz tabulka koncentrace (mg/l) lysozymu v mléce různých savců).

Tabulka 1: Porovnání koncentrací lysozymu u různých druhů mlék

Zvířecí druh	Průměrná koncentrace lysozymu (mg/l)	Zdroj
Člověk	400 320 270 - 890 224 - 426	Mathur, et al. (1990) Montagne et al. (1998) Montagne et al. (1998), Chandan et al. (1968) Hennart et al. (1991)
Osel	1428	Salimei et al. (2004)
Kobyła	790 1330	Jauregui- Adell (1975) Sarwar et al. (2001)
Kráva	0, 13 0,07 0,05 - 0,21	Chandan et al. (1968) El Agamy et al. (1996) Piccinini et al. (2005)
Buvol	0,0012	Priyadarshini a Kansal (2003)
Ovce	0,1	Chandan et al. (1968)
Koza	0,25	Chandan et al. (1968)
Prasnice	6,8	Schultz a Müller (1980)
Velbloud	0,6 - 6,5 0,15	Barbour et al. (1984) El Agamy et al. (1996)

Mléko ze zdravých velbloudů obsahuje koncentraci lysozymu vyšší než je koncentrace u kravského mléka (0,07 mg/l) v rozmezí od 0,15 mg/l až 5 mg/l (Mati, 2017), (Callewaert, Michiels 2010). Podle El-Agamy a kol. (1996) obsah lysozymu u velbloudů se velmi liší v závislosti na stupni laktace. Vyšší lytický účinek než u kravského mléka vykazuje velbloudí lysozym u gram-pozitivních bakterií, jako je *Micrococcus lysodeikticus* a gram-negativních bakterií jako je *E. coli*. Rozdíly mohou být vysvětleny v odlišném složení a struktuře lysozymu u skotu a velbloudů (El-Agamy et al., 1996).

3.4.5.1 Tween – Polysorbát 80

Tweeny jsou pravděpodobně nejčastěji používané neiontové povrchově aktivní látky a solubilizační činidla ve farmaceutickém průmyslu. Obsahují parciální ester mastné kyseliny cyklického etheru odvozeného od sorbitolu, kondenzovaný s pevným, ale statisticky distribuovaným počtem jednotek ethylenoxidu, což činí výrobek spíše heterogenní (Bartolo, 1993). Tween 80 se používá v několika stovkách farmaceutických a kosmetických přípravků, a to díky nízkým nákladům a relativně nízké toxicitě (CIR, 1984).

Tween 20 a Tween 80 (Polysorbát 20 a 80) jsou používány pro prevenci povrchové adsorpce, tak i jako stabilizátory proti agregaci proteinů. Jeho méně stabilní konformace a relativně malé rušivé síly mohou narušit strukturu bílkovin způsobující ztrátu biologické aktivity nebo imunologickou odpověď (Kerwin, 2008).

Tween 20 se používá k předběžné extrakci membrán k odstranění periferních proteinů. Tween 20 byl použit jako blokující činidlo pro imunoanalýzy založené na membránách v typické koncentraci 0,05 %. Tween 20 může být použit pro lýzu savčích buněk v koncentraci 0,05 až 0,5 % (Neugebauer, 1990). Je rozpustný ve vodě, ethanolu, methanolu, ethylacetátu a toluenu. Nerozpustný v minerálním oleji a petroletheru. Tweeny jsou připraveny ze sorbitolu ve třístupňovém procesu. Voda se nejprve odstraní ze sorbitolu za vzniku sorbitanu (cyklického anhydridu sorbitolu). Sorbitan se pak částečně esterifikuje mastnou kyselinou, jako je kyselina olejová nebo kyselina stearová, čímž se získá ester hexanu. Nakonec se chemicky přidává ethylenoxid v přítomnosti katalyzátoru za vzniku polysorbátu (Rowe, 2009).

3.4.6 Bakteriociny

Bakteriociny jsou malé peptidy produkující ribosomy buď s úzkým spektrem antimikrobiální aktivity v rámci stejného druhu, nebo s širokým spektrem napříč rody (Cotter, 2005). Mohou proto vytvořit selektivní výhodu pro produkující kmen a přispět k inhibici

škodlivých organismů a patogenů (Deegan et al., 2006). Produkce bakteriocinových inhibičních látek (BLIS) bakterií mléčného kvašení je pravidelně hlášena u tradičních mléčných výrobků v Africe, v Asii a v Evropě (Jans, 2012).

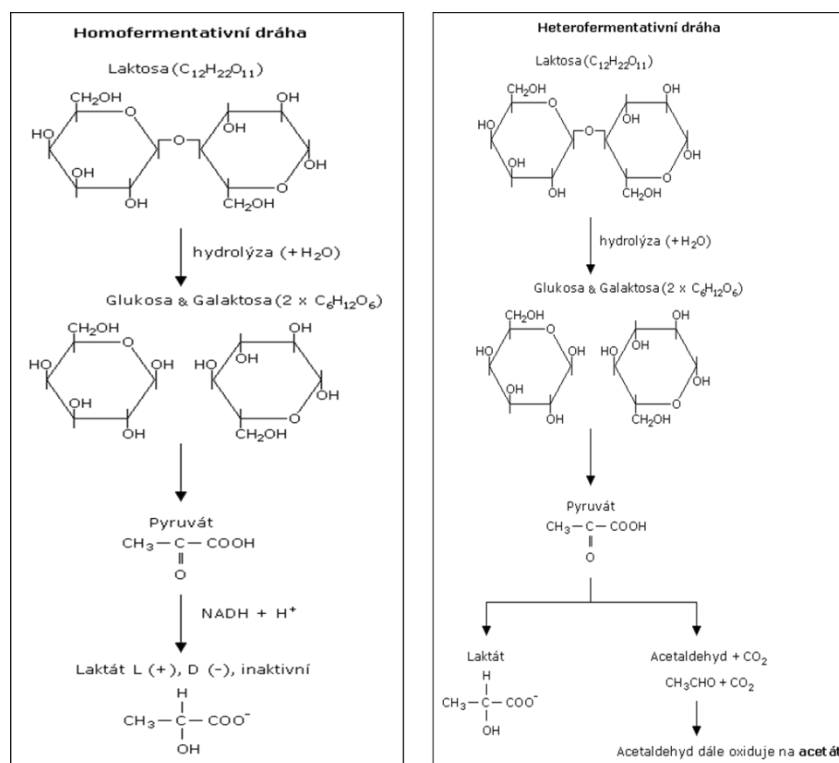
Bakteriociny produkované BMK jsou rozděleny do čtyř skupin na základě jejich charakteristiky a strukturních vlastností. Bakteriociny I. třídy jsou malé peptidy obsahující lanthioninové orb-methyl-lanthioninové zbytky, zahrnují nisin a jiná lantibiotika (Cotter, 2005). Bakteriociny třídy II jsou malé (<10 kDa), teplotně stabilní, hydrofobní a membránově aktivní a jsou rozděleny do podtřídy IIa, IIb a IIc. Bakteriociny, které mají vysokou aktivitu proti *Listeria monocytogenes*, jsou zařazeny do třídy IIa např. jako je pediocin PA-1 (Todorov et al., 2011). Bakteriociny, jako je laktokocin Q, které fungují ve dvojicích, jsou seskupeny do třídy IIb (Rodriguez, 2003) a bakteriociny, které se spoléhají na mechanismus secdependentní sekrece jsou seskupeny do třídy IIc. Bakteriociny III. třídy jsou velké a tepelně stabilní proteiny. Bakteriociny IV. třídy jsou definovány jako komplexní bakteriociny obsahující modifikace lipidů nebo uhlohydrátů (Ahern, 2003).

Bakteriociny produkované kmeny BMK usnadňují konkurenční schopnost kmene v životním prostředí a maximalizují jeho šance na přežití (Dobson, 2012). Různé bakteriociny produkované BMK byly purifikovány, charakterizovány a sekvenovány, například nisin, enterociny, reutericyclin, pediocin, lacticin a sakacin. Nisin je povolen jako konzervační prostředek ve více než 50 zemích (Field et al., 2012). Bylo však zjištěno, že nisin byl v některých potravinářských maticích neúčinný a neinhibuje tak mnoho patogenních mikroorganismů (Deegan, 2006). V bakteriocinovém výzkumu bakteriocinů (Sharafi et al., 2013) je kladen důraz na nové bakteriociny se širokým antimikrobiálním spektrem.

3.5 Role bakterie mléčného kvašení při výrobě produktů z velbloudího mléka

Jednou z nejdůležitějších skupin bakterií produkujících kyselinu v potravinářském průmyslu jsou bakterie mléčného kvašení, které se používají k přípravě startovací kultury pro výrobu mléčných výrobků (Temmerman et al., 2002). Bakterie mléčného kvašení dělíme na homofermentativní a heterofermentativní podle produktů vzniklých při fermentaci sacharidů. Homofermentativní BMK produkují hlavně kyselinu mléčnou z cukrů, zatímco heterofermentativní BMK produkují kyselinu mléčnou, kyselinu octovou nebo alkohol a oxid uhličitý (Mokoena, 2017).

Obrázek 3: Schéma hlavních cest fermentace bakterií mléčného kvašení (Teuber, 2001)



Čerstvé velbloudí mléko je obtížné zachovat a je zřídka přijatelné kvůli jeho nepříjemné chuti. Fermentace je běžnou praxí ke zvýšení trvanlivosti mléčných výrobků, pokud se fermentace provádí s bezpečnými kulturami při teplotách, které daná kultura poskytuje pro požadovaný výsledek. Mléčné kultury pro mléko skotu jsou v mlékárenském průmyslu obecně známé, v případě velbloudího mléka musí být použity jiné kultury, aby

vznikl žádoucí produkt. Fermentované mléko je poměrně snadno skladovatelné a má lepší chuť (Fguiri et al., 2015, Attia, 2001).

BMK jsou cenné pro fermentaci mléka kvůli jejich schopnosti snížit pH produkcí kyseliny mléčné a také produkovat antimikrobiální činidla, jako jsou bakteriociny (Jans, 2012). Při zvažování různých fermentačních strategií obecně používaných v mlékárenském průmyslu by bylo užitečné izolovat různé druhy BMK specificky zaměřené na velbloudí mléko, včetně mezofilních i termofilních druhů. Vzhledem k tomu, že je důležité mít kmeny s rychlou produkcí kyseliny mléčné, souběžně snižující pH, kmeny, které jsou schopné produkovat plyn a chuť, byl by tak žádoucí výběr homofermentativních i heterofermentativních druhů (Caplice, 1999). Bezpečnost je jednou z nejdůležitějších vlastností pro počáteční mlékárenské kultury. Hodnocení bezpečnosti je sledováno Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (EFSA, 2015), který je zaměřen především na izolaci mikrobiálních druhů, které mají zdokumentovanou historii pro použití při výrobě fermentovaných výrobků (Bourdichon, 2012). Ve spontánně fermentovaném velbloudím mléce bakterie mléčného kvašení zahrnují tyto rody: *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Weissella*, *Pediococcus*, *Lactobacillus* a *Enterococcus*. Existuje také významné množství gramnegativních bakterií, jako jsou *Escherichia*, *Klebsiella* a *Enterobacter*, což demonstruje potřebu změnit samovolnou spontánní fermentaci směrem k rozvoji bezpečných mléčných výrobků z velbloudího mléka (Fugl, 2017). Převaha některého kmene během procesu fermentace může vyplývat z několika faktorů: vysoce přizpůsobivého metabolismu, prostřednictvím okyselení a výroby antimikrobiálních sloučenin, např. organických kyselin a bakteriocinů, které inhibují konkurenty (Deegan, 2006). Bylo prokázáno, že velbloudí mléko vykazuje větší odolnost proti bakteriálnímu růstu vedoucímu k méně aktivním kulturám.

Titrační kyselost a pH velbloudího mléka jsou asi 0,2 % a 6,4. Dosud bylo získáno několik nových mléčných výrobků z velbloudího mléka, jako je pasterizované mléko, ochucené mléko, máslo, jogurt, sýr a mléčný čaj (Abu-Tarboush, 1996).

3.5.1 Fermentované produkty z velbloudího mléka

Produkce mléka je nižší než u krav a tím je cena mléka vyšší, což je určitou překážkou k zavedení této potraviny do každodenního stravování.

Shubat (Chal)

Jedná se o tradiční šumivý fermentovaný mléčný výrobek v Turecku, Kazachstánu a Turkmenistánu s extrémně kyselou chutí. Je vyroben ze syrového mléka nebo mléka

zředěného teplou vodou v poměru 1:1. Mléko se pak skladuje v kozí kůži nebo keramických nádobách a naočkuje se z 1/3 nebo 1/5 dříve fermentovaným mlékem. Inkubace trvá 3 až 4 hodiny při 25-30 °C, ale obvykle se nechá 8 hodin při stejné teplotě, aby se dosáhlo jeho typické chuti. Je také možné přidat mléčné kultury, jako je *Lactobacillus casei* a *Streptococcus thermophilus*, stejně jako kvasinky, přičemž inkubace trvá 8 hodin při 25 °C a dalších 16 hodin při 20 °C (Kuliev, 1959).

Obsah tuku je 4,3 % - stejný jako obsah tuku v čerstvém velbloudím mléce použitým pro výrobu. Nicméně, Shubat obsahuje nižší množství laktosy, popela a vitamínu C než syrové velbloudí mléko. Obsah ethylalkoholu vzniklého během fermentačního procesu v Shubatu je 1,1 %, což je důsledkem přítomnosti BMK, zejména *Lactobacillus*, *Enterococcus* a kvasinek, zejména *Kluyveromyces*, a vzniklých během fermentačního procesu (Rahman, 2009).

Suusac (Susa)

Jedná se o tradiční fermentované mléko ve východní Africe, Keni a Somálsku. Produkt má nízkou viskozitou, kouřovou vůni a trpkou chuť. Čerstvé mléko je umístěno do dříve uzených dýňových nádob po dobu 2 dnů při teplotě 25 až 30 °C a ponechá se fermentovat (Lore et al., 2005). Získaný produkt je proměnlivý s chutí a vůní a často hygienicky nevhodný. Zvláštní dřevo jako *Olea Africana* nebo *Acacia busia* se používá pro kouření. Bylo zjištěno, že kouř zlepšuje barvu a chuť a prodlužuje trvanlivost až o 20 dní. Farah a kolektiv (1990) studovali možnost zlepšení tradičního Suusac přidáním mezofilní mléčné kultury. V tom případě se mléko zahřeje na 85 °C po dobu 30 min, ochladí na 22-25 °C, naočkuje 2-3% mléčných kultur a inkubuje se při 27-30 °C po dobu 24 hodin (Farah et al., 1990).

Suusac obsahuje celkem 12,5 % pevných látek a 4,0 % tuku. Dále jsou obsaženy chemické složky Suusacu, jako jsou proteiny, uhlohydráty a vápník, přibližně 0,030, 0,050 a 0,001 g/g (Khalesi, 2017).

Gariss

Tradičně se vyrábí a konzumuje v Súdánu a Somálsku. Surové mléko je umístěno do kozího koženého vaku, který je zavěšen na velbloudím sedle. Vaky jsou obvykle pokryté zelení trávou nebo suché trávy navlhčené vodou a zabaleny do pevné sítě z palmových listů. Díky specificky kolíbaté chůzi velblouda se mléko během cesty protřepe a promíchá a výsledkem je obohacení mléka kyslíkem, což významně ovlivňuje fermentaci. Kromě toho je fermentace stimulována přidáním několika semen černého kmínu (*Nigella sativa*) a cibule

do mléka. Inkubace trvá jeden den při teplotě 25 až 30 °C (Brezovički, 2015). Celkový obsah pevných látek Garissu je v rozmezí od 10 do 11 %. Obsahuje tuky kolem 2,8 - 5,0 %. Obsah bílkovin a popelů v Gariss je 3,0 % a 1,0 % (Shori, 2012).

Máslo

Máslo není tradičním výrobkem z velbloudího mléka a je obtížné ho vyrobit stejnou technologií výroby jako máslo z kravského mléka. Vysoká teplota tání velbloudího mléčného tuku (41-42 °C) znesnadňuje stloukání smetany při teplotách používaných pro stloukání kravského mléka (8-12 °C). Barva je prominentně bílá, má více máslové a viskózní konzistence, zatímco chuť a aroma jsou neutrální (Farah et al., 1989). Nomádi vyrábějí máslo z velbloudího mléka několika způsoby. Máslo se používá pro lékařské účely nebo vaření. V oblasti severovýchodní Keni používají metody, při kterých se získává jen malé množství mléčného tuku. Na ohni se rozežře pár kamenů, mezi ně se vloží nádoba se syrovým mlékem. Kapky tuku se tvoří a objevují se na povrchu. Po ochlazení se mléko stlouká, dokud se kapky tuku nezmění na zrna másla (Brezovečki, 2015).

Sýr

Zpracování velbloudího mléka na sýr je obtížné, dokonce považováno za nemožné. Je překvapující, že ačkoli většina nomádských komunit vyráběla alespoň jeden typ sýra, neexistuje tradiční způsob výroby sýra z velbloudího mléka. To lze vysvětlit skutečností, že vysoce kazící povaha sýra v horkém pouštním podnebí není příznivá pro obchod mezi izolovanými komunitami. Navíc koagulační vlastnosti velbloudího mléka nejsou vhodné pro výrobu sýra (Brezovečki, 2015). Je zde snižená syřitelnost při koagulaci chymosinovým syřidlem. To souvisí s rozdíly v celkovém obsahu pevných látek, koncentrací vápníku a fosforu, nízkou elektroforetickou pohyblivostí, složením a velikostí micel kaseinu (CN) (Ibrahim, 2016). Z těchto vyjmenovaných hlavním rozdílem v koagulaci je nižší poměr κ -CN k β -CN ve velbloudím mléce, kdy kasein je odpovědný za srážení a tvorbu sýřeniny. Navíc syrovátka z velbloudího mléka je tepelně stabilnější oproti syrovátce z kravského mléka. Při záhřevu na teplotu 80 °C po dobu 30 minut denaturuje 32–35 % velbloudích syrovátkových bílkovin, zatímco u kravských je to 70–75 % (Farah, 1993).

Hydrolyza kaseinu může být maximalizována zvýšením teploty gelovatění, koncentrací chymozinu a snížením pH (Hailu et al., 2016). Optimalizace rychlosti solení a doplnění syřidla a chloridu vápenatého může částečně vyřešit tento problém, aby se vytvořilo měkké

světlo koagulum. Produkce velbloudího sýra je ale v průmyslovém měřítku omezená (Khalesi, 2017).

Jogurt

Produkce fermentovaných produktů velbloudího mléka je obtížná kvůli problému srážení mléka. Jogurtová struktura je velmi důležitou vlastností, která ovlivňuje její kvalitu (vzhled, pocit v ústech a celkovou přijatelnost). Ve snaze zvýšit pevnost byly do jogurtu přidány stabilizátory a hydrokoloidy (Keogh a O'Kennedy, 1998). Senzorické výsledky ukázaly, že přidání 0,75% alginátu sodného a 0,075% chloridu vápenatého způsobilo přijatelnost jogurtu, který se pak podobal jogurtu z kravského mléka (Hashim, 2009).

4 Materiál a metody

4.1 Původ vzorků

Byly použity 4 vzorky, které byly získány z Alžírsko od jednohrbých velbloudů (*Camelus dromedarius*), žijících v pouštních podmínkách.

Označení vzorků:

Velbloudí mléko 1

Velbloudí mléko 2

Velbloudí mléko 3

Velbloudí mléko 4

4.2 Metody

4.2.1 Lysozym test

Lysozym se dá stanovit metodou jak diluční, tak metodou difúzní. Pro stanovení lysozymu ve velbloudím mléce byla použita metoda difúzní.

Difúzní metoda

Touto metodou se dá stanovit neznámá koncentrace určité antimikrobiální látky. Jsou používány agary a mikroorganismy citlivé na tuto látku. Citlivé mikroorganismy jsou vmíchány do agaru a po utužení agaru jsou v něm vytvořeny jamky. Do jamek jsou inokulovány antimikrobiální látky známé koncentrace (standarty). Antimikrobiální látka difunduje do agaru a inhibuje růst testovaných mikroorganismů, což se projeví čirou zónou (inhibiční zónou) bez nárůstu mikroorganismů. Poté se změří průměry inhibičních zón (v mm) a pomocí vzorce je vypočítána koncentrace antimikrobiálních látek (Osserman, 1966).

Postup

1. Přípravení suspenze *M. luteus* v masopeptonovém agaru
2. Agar necháme ztuhnout, poté vytvořím jamky se stejným průměrem
3. Očkování 5 µl standardů do jamek, standarty: 5, 50, 500 a 1000 µg/ml
4. Očkování do páté jamky 5 µl nepasterizovaného velbloudího mléka
5. Inkubace při teplotě 37 °C pod dobu 24 h
6. Odečtení inhibičních zón
7. Výpočet koncentrace lysozymu (viz kapitola: Výsledky)

4.2.1.1 Tween 80

Dále byl testován účinek Tween 80 na koncentraci lysozymu. K Wilkins-Chalgren agaru byl přidán Tween o koncentraci: 1 ml/l, 5 ml/l, 10 ml/l. Nadále postup probíhal stejně jako u lysozym testu, kde byly do jamek aplikovány koncentrace lysozymu 5, 50, 500 a 1000 µg/ml.

4.2.2 Stanovení celkového počtu bakterií ve velbloudím mléce

Pro mikrobiologické vyšetření byla použita kultivační desková metoda. Při kultivačním stanovení se využívá schopnosti mikroorganismů množit se při vhodně zvolených podmínkách na médiích, která obsahují veškeré živiny potřebné pro jejich množení. Mikroorganismy jsou řízeně kultivovány a z každé bakterie v původním vzorku vzniká okem viditelná kolonie.

Cílem bylo stanovení celkového počtu mikroorganismů (CPM) v syrovém velbloudím mléce.

Postup:

K vyšetření byla použita injekční stříkačka se sterilní jehlou a byl odebrán 1 ml syrového nepasterovaného vzorku mléka.

Byly připraveny vialky, které byly naplněny bazálním médiem (BM) 9 ml.

Dále byl vzorek sériově anaerobně naředěn do ředění 10^{-9} KTJ/ml.

Vzorky z vialek byly naočkovány na Petriho misky (1 ml) a zality Wilkins-Chalgren agarem. Kultivace Petriho misek probíhala anaerobně 37 °C/48 h.

Po kultivaci se spočítaly viditelné kolonie na Petriho miskách podle vzorce:

$$N = \frac{\Sigma \text{kolonií}}{V \times (n1 + 0.1 n2) \times d1}$$

N: Počet CMP na 1 ml původního vzorku

Σ: Součet kolonií na dvou po sobě jdoucích miskách

V: Objem použitého vzorku (1 ml)

n1: Počet misek u prvního ředění

n2: Počet misek u druhého ředění

d1: Faktor ředění

4.2.3 Identifikace bakterií z velbloudího mléka

K identifikaci mikroorganismů byla použita metoda MALDI TOF a sekvence jejich genu pro 16S rRNA ze vzorků Velbloudí mléko 1 a Velbloudí mléko 2. Vzorek Velbloudí mléko 3 a 4 nebyly pro identifikaci použity. Tato izolace proběhla ve spolupráci s Akademií věd České republiky a byla prováděna Ing. Chahrazed Mekadim. Vyizolované kmeny jsou uvedeny v kapitole Výsledky 5.3.

4.2.4 Stanovení inokulační dávky bakterií pro testování schopnosti růst ve velbloudím mléce (rozbor v 0 hodin)

Izolované kmeny bakterií mléčného kvašení a bifidobakterií přes noc narostlé ve Wilkins-Chalgren bujónu byly propláchnuty pufrem a desítkově naředěny do koncentrace 10^{-8} KTJ/ml. Příslušná ředění byla nalita na Petriho misky a zalita Wilkins-Chalgren agarem. Po anaerobní kultivaci při 37 °C/24 h byly stanoveny počáteční koncentrace bakterií. Poté byl spočítán počet kolonií na Petriho miskách podle vzorce, který je uveden v kapitole 4.2.2.

4.2.5 Testování schopnosti růstu bakterií ve velbloudím mléce

Testované kultury byly přeočkovány z mrazicího boxu do penicilinek s Wilkins-Chalgren bujónem. Kultivace v penicilinkách probíhala anaerobně během 24 hodin v laboratorním inkubátoru při teplotě 37 °C.

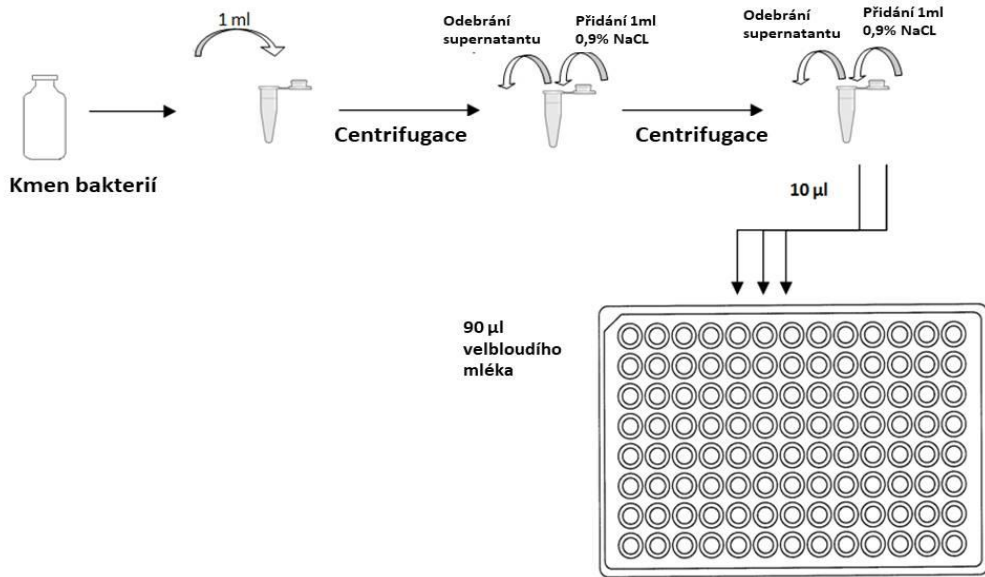
Z takto aktivovaných kmenů byl 1 ml odebrán do zkumavky (eppendorfky) a proběhla centrifugace při 6000 g po dobu 5 minut.

Supernatant byl odebrán, bakteriální buňky byly propláchnuty fyziologickým roztokem (1 ml 0,9% NaCl), aby došlo k vymytí médií.

Nakonec byly resuspendovány ve fyziologickém roztoku za účelem přípravy bakteriální suspenze. Odpipetovalo se 10 μ l z ředěného vzorku (od každého kmene ředění: 10^{-6} KTJ/ml, 10^{-7} KTJ/ml, 10^{-8} KTJ/ml) a vzorek byl aplikován do destičky. Do jamek bylo přidáno 90 μ l velbloudího mléka vzorek Velbloudí mléko 3 pasterovaného při 63 °C/30 min ponořením do vodní lázně. U každého kmene byl vytvořen jeden kontrolní vzorek, kde místo mléka bylo aplikováno 90 μ l Wilkins-Chalgren agaru.

Mikrotitrační destička byla inkubována anaerobně při 43 °C po dobu 24 h.

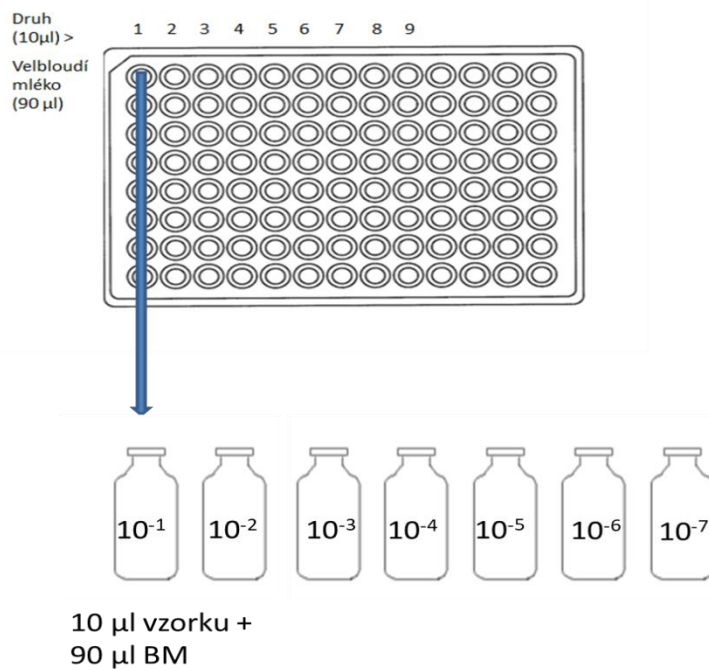
Obrázek 4: Příprava vzorku na kultivaci ve velbloudím mléce



Po anaerobní kultivaci kmenů bakterií ve velbloudím mléce (Velbloudí mléko 3) byl proveden mikrobiologický rozbor.

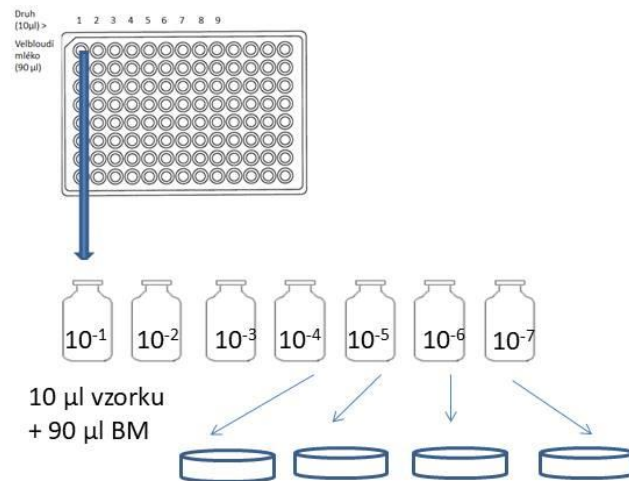
Bylo provedeno ředění: 10 µl vzorku + 90 µl (anaerobně) do ředění 10^{-7} KTJ/ml v bazálním médiu.

Obrázek 5: Ředění vzorku



Kmeny bakterií (z ředění 10^{-4} KTJ/ml až 10^{-7} KTJ/ml) byly přeočkovány sterilní stříkačkou na Petriho misku a byly zality Wilkins-Chalgren agarem a nechaly se anaerobně kultivovat 37 °C/24 h.

Obrázek 6: Očkování na Petriho misky



Počty kolonií byly spočítány stejným postupem jako v kapitole 4.2.2.

4.2.6 Stanovení pH a kyseliny mléčné

Po kultivaci bakterií ve vzorku mléka: Velbloudí mléko 3 bylo stanoveno pH a kyselina mléčná.

1, stanovení pH

pH bylo stanoveno pomocí indikátorového papírku, kdy byl pipetou nanesen vzorek z mikrotitrační destičky na indikátorový papírek a podle stupnice bylo odečteno pH

2, měření koncentrace kyseliny mléčné

Koncentrace kyseliny mléčné byla změřena pomocí přístroje Reflectoquant® (Merck)

Reflectoquant

Přístroj je schopen stanovit koncentraci určité látky na základě porovnání intenzity zbarvení indikátorového papírku, který je ponořen do testovaného roztoku o neznámé koncentraci dané látky a intenzity zbarvení stanovené při měření stejné látky o známé koncentraci. Tyto testy jsou analyzovány pomocí metody zvané reflektometrie. Přístroj měří intenzitu světla, které se odrazilo od reakční zóny analytického proužku.

Obrázek 7: Přístroj Reflectoquant®



<https://3.imimg.com/data3/YB/JL/MY-3476499/1-250x250.jpg>

Princip: Pomocí enzymu laktátdehydrogenasa je kyselina mléčná oxidovaná nikotinamidnukleotidem (NAD) na pyruvát. Vytvořený NADH redukuje za přítomnosti enzymu diaforasy tetrazoliovou sůl bílé barvy na modrý formazan. Test se provádí pomocí testovacího proužku, který obsahuje chemikálie umožňující průběh reakce. Intenzita se měří pomocí přístroje.

Ředění:

Odebere se 10 μ l vzorku a 990 μ l destilované vody, pokud je tato koncentrace vysoká a přístroj ji nedokáže změřit, pokračuji v ředění: 100 μ l z předchozího ředění + 900 μ l vody.

Vzorek se pomocí pipety nanese na testovací proužek, vloží se do přístroje a nechá se vyhodnotit.

Výsledná koncentrace na přístroji je ukázána v jednotkách mg/l.

5 Výsledky

5.1 Lysozym test

Lysozym test probíhal difúzní metodou u čtyř vzorků mléka:

Velbloudí mléko 1 (C1)

Velbloudí mléko 2 (C2)

Velbloudí mléko 3 (C3)

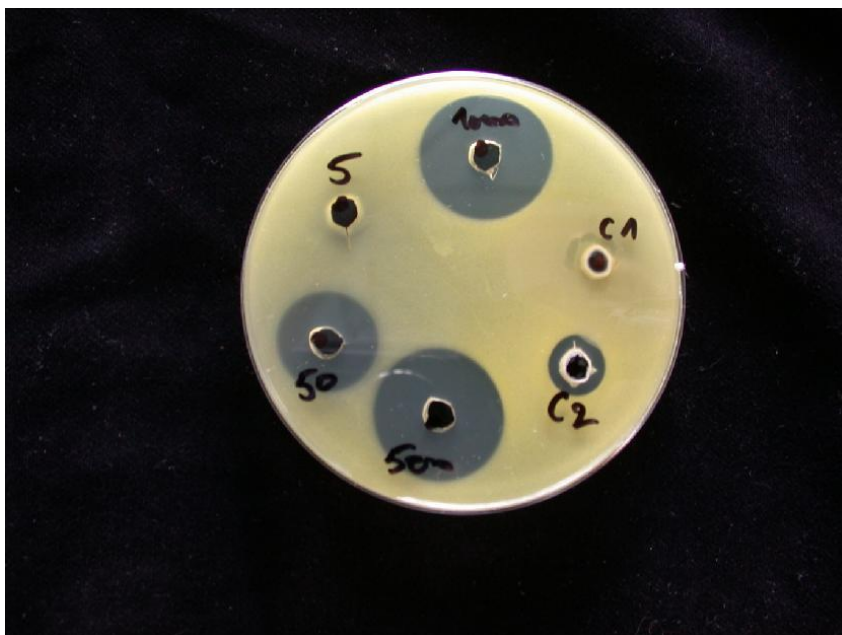
Velbloudí mléko 4 (C4)

Odečtení průměrů proběhlo za pomoci posuvného měřítka ze vzorků na Petriho miskách.

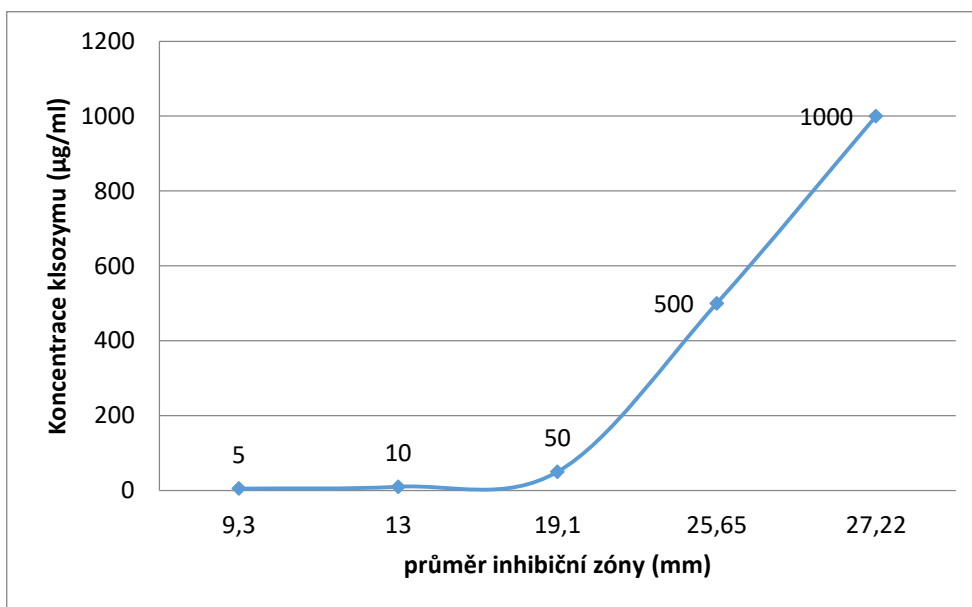
Obrázek 8: Standardy lysozymu



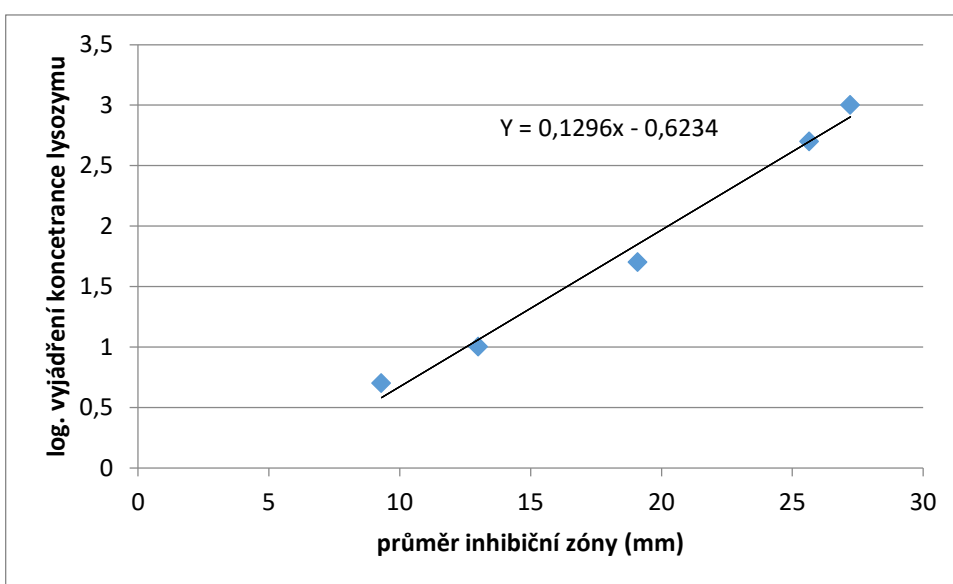
Obrázek 9: Vzorek C1 a C2, lysozym test



Graf 1: Závislost inhibiční zóny na koncentraci lysozymu $\mu\text{g/ml}$



Graf 2: Závislost inhibiční zóny na koncentraci lysozymu (log. vyjádření)



Výpočty:

$$y = \log y_{C1}$$

$$\log y_{C1} = 0,1296x - 0,6234$$

$$x_{C1} = 11$$

$$\log y_{C1} = 0,8022$$

$$y_{C1} = 10^{0,8022} = 6,34$$

koncentrace vzorku C1 = 6,34 $\mu\text{g/ml}$

$$x_{C2} = 15,7$$

$$\log y_{C2} = 1,41132$$

$$y_{C2} = 10^{1,41132} = 25,78$$

koncentrace vzorku C2 = 25,78 $\mu\text{g/ml}$

koncentrace vzorku C3 = 0

$$x_{C4} = 21,7$$

$$\log y_{C4} = 2,1889$$

$$y_{C4} = 10^{2,1889} = 154,489$$

koncentrace vzorku C4 = 154,496 $\mu\text{g/ml}$

Tabulka 2: Lysozym test- výsledky

Koncentrace lysozymu ($\mu\text{g/ml}$)	Průměr inhibiční zóny (mm)	Log koncentrace lysozymu ($\mu\text{g/ml}$)
5	9,3	0,69897
10	13	1
50	19,1	1,69897
500	25,65	2,69897
1000	27,22	3
C1	11	6,34
C2	15,7	25,78
C3	00	00
C4	21,7	154,49

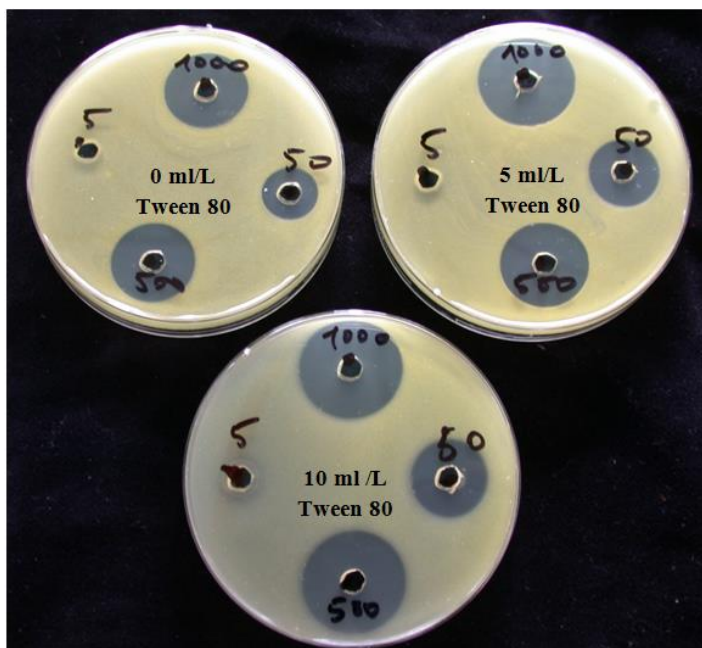
V tabulce jsou zaznamenány průměry inhibičních zón u standardů lysozymu a u vzorků mlék. Byla sestavena kalibrační křivka ze standardů se známou koncentrací a průměru jejich inhibičních zón. Po doplnění hodnot průměru inhibičních zón vzorků mlék do regresní rovnice byla dopočítána hodnota koncentrace lysozymu u vzorků.

Nejvyšší koncentrace lysozymu se nachází ve vzorku C4. Koncentrace u vzorku C3 je velmi nízká - průměr inhibiční zóny je menší než u standardu 5 (nedetekovatelný).

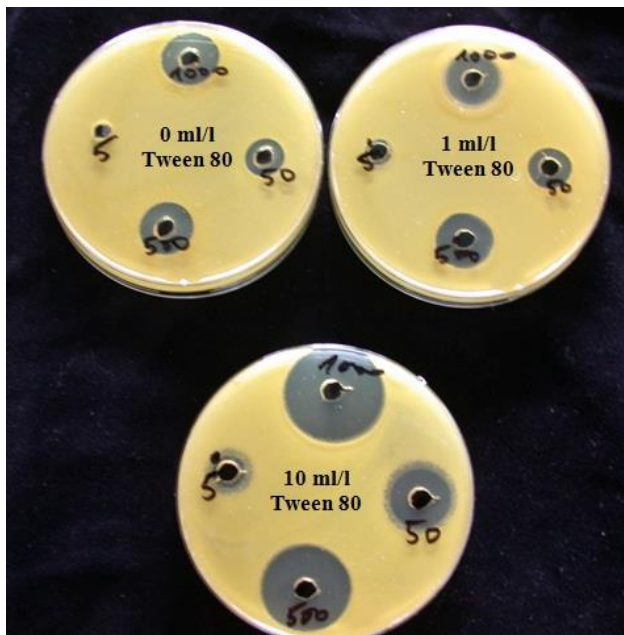
5.1.1 Tween 80

Vliv koncentrace Tween 80 na koncentraci lysozymu.

Obrázek 50: Lysozym test s různou koncentrací Tween 80



Obrázek 11: Lysozym test s různou koncentrací Tween 80



Na obrázcích jsou vidět inhibiční zóny při různých koncentracích Tween 80 (0 ml/l, 1 ml/l, 5 ml/l, 10 ml/l) u standardů 5, 50, 500 a 1000 µg/ml.

Tabulka 3: Vliv koncentrace Tween 80 na množství lysozymu

Lysozym (µg/ml) \ Tween 80 (ml/l)	5 µg/ml	50 µg/ml	500 µg/ml	1000 µg/ml
0 ml/l (0 %)	0	14,9	21,9	22,9
	0	14,0	20,9	22,3
	0	14,2	21,2	22,6
	0	14,3	20,4	22,7
1 ml (0,1 %)	0	15,5	20,5	21,7
	0	15,3	20,6	21,6
	0	15,8	20,5	21,9
	0	15,2	20,8	22,2
5 ml (0,5 %)	0	19,2	26,0	27,9
	0	18,8	23,1	26,5
	0	18,8	25,3	27,6
	0	18,4	22,2	27,2
10 ml (1 %)	9,3	18,6	26,0	27,6
	9,2	19,6	25,7	26,5
	9,7	19,2	25,6	27,8
	9,0	19,0	25,3	27,0

K nejvyššímu nárůstu inhibiční zóny došlo u koncentrace Tween 80 10 ml (1 %), kdy už u standardu 5 µg/ml byla zaznamenána inhibiční zóna.

5.2 Celkový počet bakterií - Mikrobiologické vyšetření

Pro stanovení celkového počtu bakterií v syrovém velbloudím mléce byla použita kultivační desková metoda. Kultivace Petriho misek probíhala anaerobně 37 °C/24 h na Petriho miskách, kde byl 1 ml naředěného vzorku zalit Wilkins-Chalgren agarem. Výsledky v Tabulce 4 jsou uvedeny v jednotkách KTJ (kolonie tvořící jednotku).

Tabulka 4: Celkový počet bakterií v syrovém velbloudím mléce

Vzorky \ Redění	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	Počet kolonií (KTJ/ml)	Počet kolonií (log KTJ/ml)
Velbloudí mléko 1	NC	720	124	/	/	7,672 x 10 ⁸	8,884
Velbloudí mléko 2	NC	352	54	/	/	3,691 x 10 ⁸	8,567
Velbloudí mléko 3	NC	230	26	00	/	2,327 x 10 ⁸	8,366
Velbloudí mléko 4	NC	NC	60	6	02	6,181 x 10 ⁸	8,791

Nejvyšší počet bakterií je obsažen ve vzorku Velbloudí mléko 1 a nejmenší počet ve vzorku Velbloudí mléko 3. Průměrně bylo ve velbloudích mlékách stanoveno $8,65 \pm 0,20$ log KTJ/ml bakterií.

5.3 Identifikace bakterií z velbloudího mléka

V tabulce 5 jsou uvedeny jednotlivé druhy vyizolovaných bakterií. Identifikace proběhla pomocí MALDI TOF a sekvence jejich genu pro 16S rRNA ze vzorků Velbloudí mléko 1 a Velbloudí mléko 2.

Tabulka 5: Vyizolované druhy bakterií

Vzorek	Izolace	Označení	Identifikace sekvence genu 16S rRNA
Velbloudí mléko 1	MC1/5W	9	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>
	MC1/1W/1B	5	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> subsp. <i>Globosum</i>
	CM1/2B	2	<i>Bifidobacterium mongoliense</i>
	CM1/3B	8	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>
	CM1/6B	7	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>
Velbloudí mléko 2	MC2/5W	1	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
	MC2/2W	6	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>
	CM2/5R	4	<i>Lactobacillus plantarum</i>
	CM2/8R	3	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
Velbloudí mléko 3	Nepoužitý		
Velbloudí mléko 4	Nepoužitý		

Byly identifikovány druhy bakterií mléčného kvašení z rodu *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* a také bakterie rodu *Bifidobacterium*, které nepatří do skupiny BMK, ale byly také dále testovány.

5.4 Rozbor bakterií před kultivací ve velbloudím mléce (0 hodin)

Naředěné jednotlivé kmeny bakterií byly naneseny na Petriho misky a byly kultivovány v anaerobních podmínkách při teplotě 37 °C po dobu 24 h. Výsledky v Tabulce 6 jsou uvedeny v logaritmech KTJ v 1ml.

Tabulka 6: Počty kolonií u jednotlivých druhů bakterií před kultivací

Druh	identifikace	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	Počet (log KTJ/ml)
1	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	NC	116	12	9,07
2	<i>Bifidobacterium mongoliense</i>	NC	124	16	9,10
3	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	300	30	0	7,48
4	<i>Lactobacillus plantarum</i>	516	18	06	8,69
5	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i>	NC	50	06	8,71
6	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	110	14	00	8,05
7	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>	296	40	00	8,48
8	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>	NC	60	10	8,80
9	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>	NC	58	16	8,83

Největší nárůst kolonií byl zaznamenán u *Bifidobacterium mongoliense* a z BMK: u *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, nejnižší naopak u *Pediococcus pentosaceus*. Počty kolonií u jednotlivých druhů bakterií byly velmi podobné.

5.5 Rozbor bakterií po kultivaci ve velbloudím mléce

Vyizolované kmeny bakterií byly kultivovány na mikrotitračních destičkách při 43 °C po dobu 24 h ve velbloudím pasterovaném mléce ve vzorku Velbloudí mléko 3.

Tabulka 7: Počty kolonií u jednotlivých druhů bakterií po kultivaci

Druh	identifikace	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	Počet (log KTJ/ml)
1	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	NC	NC	308	32	8,49
2	<i>Bifidobacterium mongoliense</i>	NC	NC	260	32	8,42
3	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	NC	520	82	06	7,74
4	<i>Lactobacillus plantarum</i>	NC	440	60	16	7,67
5	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i>	NC	NC	100	12	8,01
6	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	NC	NC	320	40	8,51
7	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>	NC	NC	178	18	8,25
8	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>	NC	NC	166	20	8,23
9	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>	102	12	00	00	6,02

Největší nárůst kolonií byl zaznamenán u *Leuconostoc pseudomesenteroides*.

Statistické vyhodnocení

Zpracování v programu STATISTICA (verze 12)

Dvouvýběrový T-test, hladina významnosti 95 %

Porovnání skupin bakterií laktobacily (*Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* - 3 druhy, *Lactobacillus plantarum*) a mléčné koky (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*) ve schopnosti růst ve velbloudím mléce (Velbloudí mléko 3).

Nulová hypotéza: Počet bakterií po kultivaci bude u laktobacilů a koků shodný.

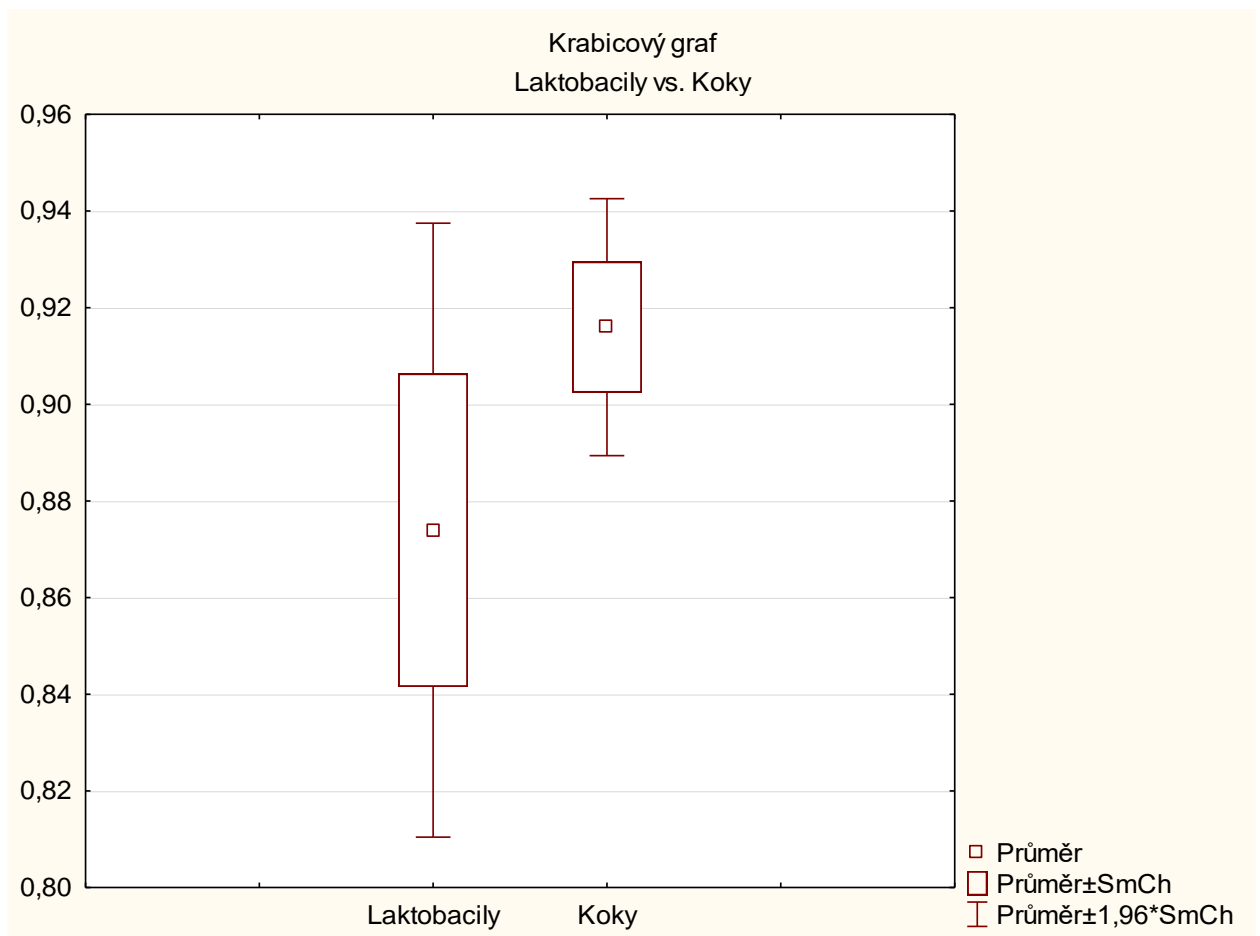
F-test:

Skup. 1 vs. skup. 2	T-test pro nezávislé vzorky (data_excel) Pozn.: Proměnné byly brány jako nezávislé vzorky				
	Poč.plat. skup. 2	Sm.odch. skup. 1	Sm.odch. skup. 2	F-poměr Rozptyly	p Rozptyly
Laktobacily vs. koky	3	0,064822	0,023487	7,616802	0,236520

T-test

Skup. 1 vs. skup. 2	T-test pro nezávislé vzorky (data_excel) Pozn.: Proměnné byly brány jako nezávislé vzorky					
	Průměr skup. 1	Průměr skup. 2	Hodnota t	sv	p	Poč.plat. skup. 1
Laktobacily vs. koky	0,873959	0,915965	-1,05035	5	0,341648	4

Graf 3: Grafický výstup, porovnání skupin - laktobacily a koky



Závěr:

$p > \alpha (0,05)$

Nelze zamítnout nulovou hypotézu, která zní: Počet bakterií po kultivaci bude u laktobacilů a koků shodný. Neexistuje statisticky významný rozdíl v počtu bakterií po kultivaci mezi laktobacily a koky. Obě skupiny bakterií rostly stejně v testovaném vzorku velbloudího mléka.

5.6 Stanovení pH a kyseliny mléčné

Po kultivaci bakterií v mikrotitrační destičce ve vzorku mléka: Velbloudí mléko 3 proběhlo měření pH pomocí indikátorového papírku a měření kyseliny mléčné přístrojem Reflectoquant. Kyselina mléčná byla měřena ve třech opakováních a hodnoty jsou uvedeny v g/l. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm standardní odchylka (SD) tří nezávislých měření.

Tabulka 8: pH a množství kyseliny mléčné

Druh	identifikace	pH	Kyselina mléčná g/l			průměr \pm SD
1	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	5	16,3	16,5	16,3	16,37 \pm 0,11
2	<i>Bifidobacterium mongoliense</i>	5	18,2	25,6	20,8	21,53 \pm 3,75
3	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	5	14,4	16,2	15	15,20 \pm 0,91
4	<i>Lactobacillus plantarum</i>	/	/	/	/	/
5	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i>	5	15,6	21,2	23,2	20,00 \pm 3,94
6	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	4,7	23,2	24	23,6	23,60 \pm 0,40
7	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>	5	21,4	20,9	23,2	21,83 \pm 1,21
8	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>	5	23,2	28	24,1	25,10 \pm 2,55
9	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>	5	18,4	17	18,5	17,97 \pm 0,84

Výsledné pH u heterofermentativních druhů (např. *Leuconostoc*) nekoreluje s množstvím kyseliny mléčné, protože vzniká i kyselina octová, která také snižuje pH.

Nejnižší pH naměřené indikátorovým papírkem bylo u *Leuconostoc pseudomesenteroides* zatímco nejvyšší obsah kyseliny mléčné byl pomocí Reflectoquantu změřen u *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* (8).

1. Statistické vyhodnocení:

Statistické vyhodnocení bylo provedeno v programu: STATGRAPHICS Centurion XV. II

Test: Multiple range test - porovnání více vzorků

Bylo sledováno, zda existuje statisticky významný rozdíl mezi středními hodnotami v produkci kyseliny mléčné mezi jednotlivými druhy bakterií.

Hladina významnosti 95 %

Tabulka 9: Statistické vyhodnocení kyseliny mléčné

Druh	Identifikace	pH	Kyselina mléčná g/l			průměr ± SD
1	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	5	16,3	16,5	16,3	16,37 ^{ab} ± 0,12
2	<i>Bifidobacterium mongoliense</i>	5	18,2	25,6	20,8	21,53 ^{abc} ± 3,76
3	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	5	14,4	16,2	15	15,20 ^a ± 0,92
4	<i>Lactobacillus plantarum</i>	/	/	/	/	/
5	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i>	5	15,6	21,2	23,2	20,00 ^{abc} ± 3,94
6	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	4,7	23,2	24	23,6	23,60 ^{bc} ± 0,40
7	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>	5	21,4	20,9	23,2	21,83 ^{abc} ± 1,21
8	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>	5	23,2	28	24,1	25,10 ^c ± 2,56
9	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>	5	18,4	17	18,5	17,97 ^{abc} ± 0,84

Indexy ^{a, b, c} značí, zda je mezi vzorky rozdíl v produkci kyseliny mléčné.

Index ^a je u druhu 1, 2, 3, 5, 9 což znamená, že mezi těmito druhy není statisticky významný rozdíl v produkci kyseliny mléčné.

Index ^b značí, že u druhu 1, 2, 5, 6, 7, 9 není statisticky významný rozdíl v produkci kyseliny mléčné.

Index ^c značí, že u druhu 2, 5, 6, 7, 8, 9 není statisticky významný rozdíl.

Statisticky významný rozdíl je mezi druhy:

1 (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) a 8 (*Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans*)

3 (*Pediococcus pentosaceus*) a 8 (*Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans*)

3 (*Pediococcus pentosaceus*) a 6 (*Leuconostoc pseudomesenteroides*)

2. Statistické vyhodnocení

Dvouvýběrový T-test, hladina významnosti 95%

Nulová hypotéza: Množství produkované kyseliny u laktobacilů (*Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* - 3 druhy) a koky (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*) je shodné.

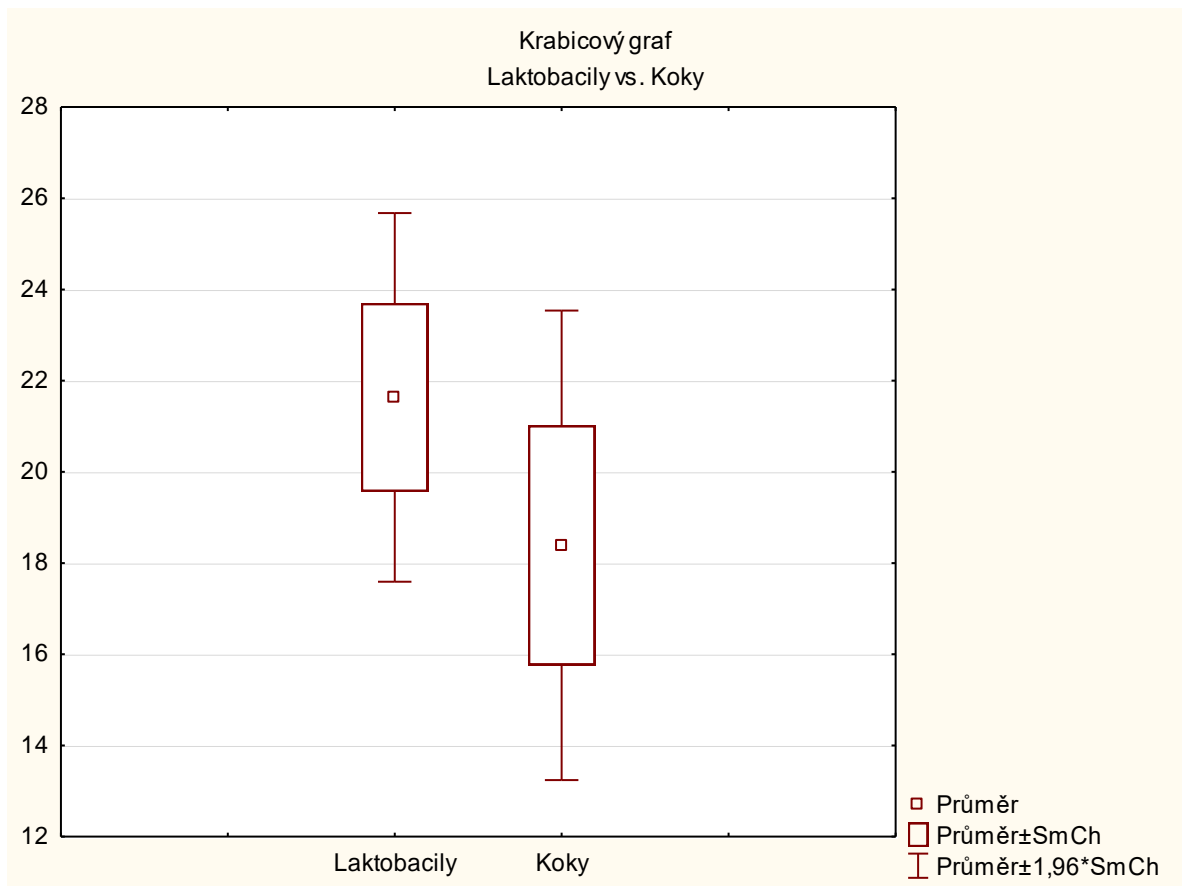
F-test

Skup. 1 vs. skup. 2	T-test pro nezávislé vzorky (data_excel) Pozn.: Proměnné byly brány jako nezávislé vzorky				
	Poč.plat. skup. 2	Sm.odch. skup. 1	Sm.odch. skup. 2	F-poměr Rozptyly	p Rozptyly
Laktobacily vs. koky	3	3,571203	4,550647	1,623743	0,762270

Dvouvýběrový T-test

Skup. 1 vs. skup. 2	T-test pro nezávislé vzorky (data_excel) Pozn.: Proměnné byly brány jako nezávislé vzorky					
	Průměr skup. 1	Průměr skup. 2	Hodnota t	sv	p	Poč.plat. skup. 1
Laktobacily vs. koky	21,63300	18,38867	0,971429	4	0,386343	3

Graf 4: Grafický výstup, porovnání laktobacilů a koků v produkci kyseliny mléčné



Závěr:

$p > \alpha (0,05)$

Nelze zamítnou nulovou hypotézu, která zní: Produkované množství kyseliny mléčné je u laktobacilů a koků shodné. Neexistuje statisticky významný rozdíl v produkci kyseliny mléčné u laktobacilů a koků.

6 Diskuze

6.1 Lysozym test

Velbloudí mléko je považováno za hojný zdroj bílkovin, který obsahuje ochrannou složku zahrnující lysozym, laktoferin, laktoperoxidasu a peptidoglykanový rozpoznávací protein (PGRP), který byl detekován pouze ve velbloudím mléce (Singh et al. 2006). Za důležitý faktor, který štěpí peptidoglykan gram pozitivních bakterií (G+), je považován lysozym. Lysozym je schopen štěpit glykosidové vazby v peptidoglykanech (polysacharidové vazby mezi *N*-acetylglukosaminovými jednotkami a zbytky *N*-acetylmuramové kyseliny) v buněčné stěně gram pozitivních bakterií a chrání tak organismus před bakteriální infekcí (Rahman, 2009).

Velbloudí mléko bylo testováno na obsah lysozymu. Lysozym byl jeden z nejdůležitějších nespecifických skupin studovaných syrovátkových proteinů. Ve studiích bylo popsáno, že hladiny lysozymů a laktoferinů jsou u velbloudího mléka 2 až 3 krát vyšší než u kravského mléka (Othman, 2016). Naopak koncentrace lysozymu u kravského mléka je zvýšena při mastitidách a zhoršených podmínkách prostředí (Priyadarshini, 2002).

Uvedená průměrná hladina lysozymu u lidského mléka je 39 000 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ (Barbour, 1984) u kravského mléka 130 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ a u velbloudího mléka je v průměru uváděna 288 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ (Shori, 2015), ale byly také naměřeny vyšší hodnoty jako 648 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ (Barbour, 1984).

Podle El-Agamy 1996 se pohybuje hladina lysozymu u velbloudího mléka v rozmezí od 0,15 mg/l (15 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$) do 5 mg/l (500 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$).

Přůmerný obsah lysozymu u našich vzorků byl 46,65 $\mu\text{g}/\text{ml} \pm 62,98$ (4 665 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$).

Z uvedených výsledků tedy vyplývá, že naměřený obsah lysozymu byl celkově vyšší, než jsou uváděné průměrné hodnoty v literatuře. Naměřená koncentrace lysozymu ve vzorku Velbloudí mléko 4 byla velmi vysoká a to 15 449,6 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$. Potvrzuje se tvrzení ze studií, že obsah je vyšší u kravského, ale nižší než u mateřského mléka.

Vzorek: Velbloudí mléko 3 měl inhibiční zónu nedetekovatelnou. Nízká koncentrace lysozymu může být způsobena z důvodu odběru vzorku v pozdní fázi laktace velblouda. Délka laktace u velblouda se pohybuje od 9 do 18 měsíců (Farah, 1993).

Ve studii od Barbour 1984 byla popsána negativní lineární korelace mezi hladinou lysozymu v syrovátce z velbloudího mléka a fází laktace. Každý den v období laktace vede ke snížení hladiny lysozymu v mléčné syrovátce o 2,86 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ (Barbour, 1984).

I El-Agamy a kol. (1996) potvrzuje, že obsah velbloudího lysozymu je závislý na laktaci. Dále uvádí, že velbloudí mléko má vyšší lytický účinek na grampozitivní bakterie, jako je *Micrococcus lysodeikticus* a gram-negativní bakterie, jako je *E. coli*, než kravské mléko.

Podle našich výsledků neměla koncentrace lysozymu vliv na celkový počet bakterií, jak vyplývá z výsledků.

6.2 Tween 80

Tweeny jsou pravděpodobně nejčastěji používané neiontové povrchově aktivní látky a solubilizační činidla. Podle našich výsledků má zvyšující se koncentrace Tween 80 pozitivní vliv na inhibiční vlastnosti lysozymu a přidáním Tween 80 dochází ke zvětšování inhibiční zóny. Největší inhibiční zóny bylo dosaženo při nejvyšší testované koncentraci Tween 80 10 ml (1%). Tento efekt může být spojován s tím, že Tween 80 působí jako stabilizátor proti agregaci proteinů a jako prevence proti povrchové adsorpci. Pro objasnění této skutečnosti by bylo nutné dalšího výzkumu.

6.3 Mikrobiologický rozbor

6.3.1 Celkový počet bakterií

Celkový počet bakterií byl prováděn v syrovém nepasterovaném mléce kultivační deskovou metodou anaerobně 37 °C/24 h.

Syrové velbloudí mléko může obsahovat řadu kontaminantů, jako je např. *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus sonorensis*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Salmonella* spp., *Klebsiella* spp. a *Enterobacter* spp. (Kadri, 2014).

Naopak syrové velbloudové mléko a jeho fermentované produkty mohou být dobrým zdrojem potenciálních probiotických kmenů, které mají příznivé účinky na lidské zdraví. *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* a *Enterococcus* jsou nejběžnější kmeny používané jako probiotické bakterie (Shori, 2017).

V zahraničních studiích vycházel celkový počet bakterií různě a je závislý na stupni kontaminace vzorku.

Benkerroum (2003) uvádí hodnotu celkového počtu bakterií $6,2 \times 10^7$ KTJ/ml (37 °C, 72 h).

Abera (2016) publikoval hodnotu $5,6 \times 10^4$ KTJ/ml.

Ismaili (2016) naměřil hodnotu v rozmezí od $5,6 \times 10^3$ do $1,8 \times 10^9$ KTJ/ml.

U mléka, které má být klasifikováno nejvyšší jakostí, by počet bakterií měl být menší než 100 000 KTJ/ml (Bylund, 1995).

Průměrná hodnota u našeho vzorku byla $4,97 \times 10^8$ KTJ/ml, což tedy patří k vyšším hodnotám uváděných ve studiích, a proto by se dalo konstatovat, že naše analyzované vzorky byly obecně vysoce kontaminované.

6.3.2 Identifikace bakterií z velbloudího mléka

K identifikaci byla použita metoda MALDI TOF a sekvence jejich genu pro 16S rRNA ze vzorků: Velbloudí mléko 1 a Velbloudí mléko 2. Došlo i k identifikaci bifidobakterií, které nepatří do skupiny bakterií mléčného kvašení, ale byly vyizolovány, a proto byly dále použity v pokusech pro kultivaci a měření kyseliny mléčné. V našich vzorcích byly vyizolovány BMK rodu: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*. Kromě těchto bakterií byly v minulosti z velbloudího mléka izolovány i jiné bakterie, které uvádí Shori ve svém článku z roku 2017.

Kmeny uvedené ve studii (Shori, 2017):

Aerococcus (*viridans*, *aagococcus* spp.)

Enterococcus (casseliflavus, faecalis, lactis)

*Lactobacillus (helveticus, brevis, paracasei subsp. tolerans, **paracasei**, amylophilus, curvatus, salivarius, acidophilus, animalis, **plantarum**, fermentum)*

*Lactococcus (**lactis subsp. cremoris**, lactis subsp. lactis)*

Leuconostoc spp. (mesenteroides)

*Pediococcus (acidilactici, damnosus, **pentosaceus**)*

Streptococcus (thermophilus, lactis, lactis subsp. diactylactis)

Weissella (helleca, cibaria)

Maurad a Meriem (2008) také vyizolovali bakterie druhu *Lactobacillus plantarum* a to z tradičního másla vyrobeného z velbloudího mléka (shmen). Benmechernene (2013) izoloval dva kmeny poddruhu *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* z alžírského velbloudího mléka, které vykazují dobré přežití při nízkém pH (3) a za přítomnosti 0,5 %, 1 % a 2 % žlučových solí a v přítomnosti 3 mg/ml pepsinu. Známy je i druh *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* a další druhy, které jsou spojovány s výskytem ve velbloudím mléce a které se shodují s našimi vyizolovanými kmeny.

6.3.3 Kultivace a rozbor bakterií

Byly zaznamenány hodnoty KTJ bakterií v čase 0 (před kultivací ve velbloudím mléce) a po kultivaci v pasterovaném Velbloudím mléce 3. Vyizolované bakterie patří mezi mezofilní (optimální růstové teploty mezi 20 a 44 °C) (Bylund, 1995). Kultivace probíhala při 43 °C a to z toho důvodu, že u většiny kmenů v literatuře je uvedeno, že je možné bakterie kultivovat při teplotě až do 45 °C. Pro výrobu zakysaných mléčných výrobků, konkrétněji při výrobě jogurtu, se používá teploty mezi 37 až 45 °C (Chandan, 2008).

Rahman (2009) prováděl kultivaci bakterií ve 43 °C po dobu 6 h ve velbloudím mléce. Počáteční počty životaschopných buněk počátečních kultur se pohybovaly v rozmezí od 4,39 (*L. lactis*) do 4,7 log KTJ/ml (kombinace *L. bulgaricus* a *St. thermophilus* 1: 1). Průměrné hodnoty po 3 hodinách inkubace byly 5,41; 5,65; 5,05; 5,51; 6,05 log KTJ/ml a po 6 hodinách se počet zvedl na 7,61; 8,03; 6,71; 7,52; a 8,2 log KTJ/ml.

Průměrný počet bakterií ze všech našich kmenů po kultivaci (43 °C, 24 h) byl $7,93 \pm 0,73$, což je hodnota velmi podobná hodnotám z Rahmanovy studie, kde těchto hodnot dosahovaly testované kmeny již po 6 hodinách kultivace. Největší nárůst bakterií po kultivaci ve Velbloudím mléce 3 byl zaznamenán u *Leuconostoc pseudomesenteroides* a konečný počet po 24 h po kultivaci činil 8,51 log KTJ/ml.

Proběhlo statistické porovnání růstu bakterií ve velbloudím mléce mezi skupinami bakterií laktobacily a koky. Hodnocení proběhlo T-testem na hladině významnosti 0,05. Mezi těmito skupinami, ale nebyl prokázán statisticky významný rozdíl v růstu ve velbloudím mléce.

6.4 Stanovení pH a kyseliny mléčné

Ve výsledcích v Tabulce 8 je uvedeno pH a množství kyseliny mléčné. Nejnižší pH bylo naměřeno u *Leuconostoc pseudomesenteroides* (pH 4,7), který je heterofermentativní. Snížení pH nebylo jen kvůli produkci kyselině mléčné, ale i díky kyselině octové. Farah (1993) uvádí, že průměrná hodnota pH syrového mléka se pohybuje kolem 6,56. Kysané mléko by pak mělo mít hodnotu pH 4,6 a nižší (Bylund, 1995).

Abu-Tarboush (1996) studoval růst bakterií *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* po kultivaci při 42 °C (4 h) ve velbloudím a kravském mléce. Po kultivaci *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* bylo naměřené pH ve velbloudím mléce 5,00 - 5,91 a v kravském 4,45 - 5,80 a po kultivaci *Streptococcus thermophilus* bylo naměřené pH ve velbloudím mléce 5,17 - 5,35 a v kravském 4,55 - 4,69. K většímu snížení pH došlo v kravském mléce.

Rahman (2009) popisuje změnu pH po kultivaci startovacích kultur ve velbloudím mléce ve 43 °C po dobu 6 hodin. Počáteční pH inokulovaného velbloudího mléka pro 5 kultur na počátku fermentace bylo 6,25 (*L. acidophilus*), 6,22 (*L. bulgaricus*), 6,24 (*Lactococcus lactis*), 6,22 (*St. thermophilus*) a 6,21 (kombinace kmenů *L. bulgaricus* a *St. thermophilus*, 1:1), zatímco na konci fermentace (6 h) hodnota pH klesla na 5,00; 4,60; 5,35; 5,00 a 4,35.

Naměřené pH po kultivaci našich kmenů je 5,00 (u *Leuconostoc pseudomesenteroides* pH 4,7), dá se tedy konstatovat, že po kultivaci bakterií došlo k poklesu pH.

Ahmed (2004) testoval schopnost vyizolovaných bakterií z velbloudího mléka přeměňovat laktosu na kyselinu mléčnou. Tuto schopnost měřil u tří kmenů, z nichž nejlepší aktivitu prokazoval kmen *L. acidophilus* 23, který byl schopen přeměnit laktosu na kyselinu mléčnou ze 74 %, *S. lactis* 20 z 66 %, *S. cremoris* 22 z 56 %. Poté byla vybrána startovací kultura (kmeny izolované z velbloudího mléka) na výrobu sýru z velbloudího a kravského mléka. Kmeny izolované z velbloudího mléka byly lepší pro produkci laktátu a koagulovaly mléko za kratší dobu ve velbloudím než v kravském mléce.

Průměrná produkce laktátu u našich izolovaných bakteriálních kmenů byla $20,2 \pm 3,25$ g/l, což se dá označit za vysokou koncentraci, proto by se tyto kmeny daly považovat za vhodné startovací kultury při výrobě fermentovaných mléčných výrobků.

V zahraničních studiích nejsou publikovány výsledky měření kyseliny mléčné přístrojem Reflectoquant. Častým předmětem v zahraničních studiích bylo stanovení titrační

kyselosti po kultivaci se známými a v potravinářství používanými startovacími kulturami, což by mohlo být předmětem dalšího výzkumu.

Proběhlo statistické zpracování, zda existuje statisticky významný rozdíl mezi středními hodnotami v produkci kyseliny mléčné. Statisticky významný rozdíl byl jen mezi druhy: 1 (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) a 8 (*Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans*); 3 (*Pediococcus pentosaceus*) a 8 (*Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans*); 3 (*Pediococcus pentosaceus*) a 6 (*Leuconostoc pseudomesenteroides*).

Poté bylo opět provedeno statistické porovnání, zda mezi laktobacily a koky existuje rozdíl v produkci kyseliny mléčné. Tento rozdíl nebyl T-testem prokázán.

7 Závěr

V práci byly izolovány bakterie z velbloudího mléka a byla testována jejich schopnost růstu ve velbloudím mléce. Po kultivaci bakterií ve velbloudím mléce bylo změřeno pH a laktát. Dále bylo velbloudí mléko testováno na obsah lysozymu.

Bylo potvrzeno, že velbloudí mléko je dobrým prostředím pro růst bakterií z něj izolovaných, jelikož po kultivaci bakterií ve velbloudím mléce došlo k poklesu pH a k produkci kyseliny mléčné. Izolované bakterie z velbloudího mléka jsou vhodné pro výrobu fermentovaných mléčných výrobků z velbloudího mléka. Při vhodně zvolené startovací kultuře se dají vyrábět produkty s přijatelnou chutí a konzistencí. Proto by bylo vhodné vnést do podvědomí lidí prospěšnost konzumace výrobků z velbloudího mléka nejen v Afrických zemích a zemích Středního východu. Jeho konzumace má pozitivní efekt na lidské zdraví, je lépe snášeno u lidí trpících laktosovou intolerancí a lépe trávitelné u kojenců s alergiemi na kravské mléko.

8 Přílohy

(Příloha 1)

Bazální médium (BM), Ředící řada:

Trypton	0,5 g
Nutrient Broth	0,5 g
Yeast extrakt	0,25 g
Tween 80	0,05 g
Cystein	0,025 g
Destilovaná voda	100 ml

Upravit pH na 7,4 pomocí roztoku NaOH

Wilkins-Chalgren agar (Oxoid):

Trypton	10 mg/l
Želatinový pepton	10 mg/l
Yeast extract	5 mg/l
Glukosa	1 mg/l
NaCl	5 mg/l
L-Arginin	1 mg/l
Pyruvát sodný	1 mg/l
Menadione	0,0005 mg/l
Hemin	0,005 g
Agar	10 mg/l
Sojový pepton	5 g/l
Mupirocin	50 mg/l
Tween 80	1 ml/l
Cystein	0,5 g

Wilkins-Chalgren bujón (Oxoid)

Trypton	10 g/l
Pepton	10 g/l
Sojový pepton	5 g/l
Kvasničný autolyzát	5 g/l
Glukosa	1 g/l

Chlorid sodný	5 g/l
L-Arginin	1 g/l
Pyruvát sodný	1 g/l
Menadione	0,0005 g/l
Hemin	0,005 g
Tween 80	1ml/l
Cystein	0,5g

Masopeptonový agar (Lab-Lemco broth a agar, Oxoid)

„Lab-Lemco“ prášek	3 g
Agar	15 g
Pepton	5 g
Voda	1000 ml
pH	7,4 ± 0,2 při 25 °C

Rozpustit 23 g prášku v 1 litru destilované vody, rozpustit, rozplnit a sterilovat v autoklávu 15 min při 121 °C.

9 Seznam literatury

- Abera, T., Legesse, Y., Mummed, B., Urga, B. 2016. Bacteriological quality of raw camel milk along the market value chain in Fafen zone, Ethiopian Somali regional state. *BMC Research Notes*. 2016. 9. 285.
- Abu-Tarboush, H. M. 1996. Comparison of associative growth and proteolytic activity of yogurt starters in whole milk from camels and cows. *J. Dairy Sci.* 79. 366-371.
- Adams, M. R., Moss, M. O. 2008. *Food microbiology*. 3rd ed. Cambridge, UK: RSC Publishing, c2008. ISBN 978-0-85404-284-5.
- Ahern, M., Verschueren, S., & van Sinderen, D. 2003. Isolation and characterisation of a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* strain B439. *FEMS Microbiology Letters*. 220 (1). 127-131.
- Ahmed, T., Kanwal, R. 2004. Biochemical characteristics of lactic acid producing bacteria and preparation of camel milk cheese by using starter culture. *Pakistan Vet. J.* 24 (2).
- Ahmed, A., R. Sayed, Sayed, M. 2013. Nutritional value and sanitary evaluation of raw Camel's milk. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 2013. 26. 317-326.
- Al-Majali, A. M., Ismail, Z. B., Al-Hami, Y., Nour, A. Y. 2007. Lactoferrin concentration in milk from camels (*Camelus dromedarius*) with and without subclinical mastitis. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*. 5. 120-124.
- Attia, H., Kherouatou, N., Dhouib, A. 2001. Dromedary milk lactic acid fermentation: Microbiological and rheological characteristics. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 26. 263-270.
- Baker, H. M., Baker, E. N. 2004. Lactoferrin and iron: Structural and dynamic aspects of binding and release. *Biometals*. 17. 209-216.
- Barbour, E. K., Nabbut, N. H., Frechs, W. M., AL-Nakhli, H. M. 1984. Inhibition of pathogenic bacteria by camels milk relation to whey lysozyme and stage of lactation. *J Food Prod* 1984. 47. 838-840.
- Bartolo, R. G. 1993. Soap. In: Kroschwitz, J. I. (Ed.), *Encyclopedia of Chemical Technology*, 4th ed. Wiley Interscience. 297-326.
- Benkerroum, N. 2008. Antimicrobial activity of lysozyme with special relevance to milk [online]. 5. 12. 2008 [cit. 6. 10. 2017]. Dostupné z: <<http://www.academicjournals.org/AJB>>
- Benkerroum, N., Misbah, M., Sandine, W. E., Elaraki, A. T. 1993. Development and use of a selective medium for isolation of *Leuconostoc* spp. From vegetables and dairy products. *Applied and Environmental Microbiology*. 59. 607-609.

- Benkerroum, N., Boughdadi¹, A., Bennani¹, N., Hidane, K. 2003. Microbiological quality assessment of Moroccan camel's milk and identification of predominating lactic acid bacteria. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 19. 645-648.
- Benmechernene, Z., Chentouf, H. F., Yahia, B., Fatima, G., Quintela-Baluja, M., Calo-Mata, P., Barros-Velázquez, J. 2013. Technological aptitude and applications of *Leuconostoc mesenteroides* bioactive strains isolated from Algerian raw camel milk, *BioMed Res. Int.* 2013. 1-14.
- Bezkorovainy, A., Miller-Catchpole, R. 1989. *Biochemistry and physiology of bifidobacteria*. Boca Raton, Fla.: CRC Press. ISBN 084934753X.
- Biavati, B. 2001. *Bifidobacteria*. Microorganisms as health supporters. Mofin-Alce, Novara. 10-33.
- Beijerinck. 1901. GBIF Backbone Taxonomy *Lactobacillus* [online]. 17. 2. 2017 [cit. 14. 1. 2018]. Dostupné z: <<https://doi.org/10.15468/39omei>>
- Billie, P. G., Mullan, W. M. A., Espie, W. E. 1985. Observations on the effectiveness of selective agar media for the enumeration of leuconostocs from cheese and starter cultures. *International Journal of Food Science and Technology*. 9. 78.
- Bolotin, A., Wincker, P., Mauger, S., Jaillon, O., Malarne, K., Weissenbach, J., Ehrlich, SD., Sorokin, A. 2001. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* IL1403. *Genome Res.* 2001 (7). 31-53.
- Boots, J. W., Floris, R. 2006. Lactoperoxidase: From catalytic mechanism to practical applications. *International Dairy Journal*. 16. 1272-1276.
- Bourdichon, F., Casaregola, S., Farrokh, C., Frisvad, J. C., Gerds, M. L., Hammes, W. P., et al. 2012. Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. *International Journal of Food Microbiology*. 154. 87-97.
- Brezovečki, A., et al. 2015. Camel milk and milk products. *Mljekarstvo/Dairy*. 2015. 65 (2).
- Bruni, N., Capucchio, M. T., Biasibetti, E., Pessione, E., Cirrincione, S., Giraud, L., et al. 2016. Antimicrobial activity of lactoferrin-related peptides and applications in human and veterinary medicine. *Molecules*. 21. 752.
- Bylund G. 1995. *Dairy Processing Handbook*, Tetra Pak Processing Systems AB, Sweden.
- Cai, Y., Pang, H., Kitahara, M., Ohkuma, M. 2012. *Lactobacillus nasuensis* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from silage, and emended description of the genus *Lactobacillus*. *Int J Syst Evol Microbiol* 62. 1140-1144.
- Callewaert, L., Michiels, C. W. 2010. Lysozymes in the animal kingdom; *J. Biosci.* 35. 127-160.
- Caplice, E. 1999. Food fermentations: Role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 50. 131-149.

- CIR (Cosmetic Ingredient Review) Expert Panel. 1984. Final report on the safety assessment of polysorbates. *J. Am. Coll. Toxicol.* 3. 1-82.
- Claussen, N. H. 1903. Études sur les bactéries dites sarcines et sur les maladies qu'elles provoquent dans la bière. *Compte Rendu des Travaux du Laboratoire de Carlsberg*, 1903. 6. 64-83.
- Collins, M. D., Rodrigues, U. M., Ash, C., Aguirre, M., Farrow, J. A. E., Martinez-Murcia, A., Phillips, B. A., Williams, A. M., Wallbanks, S. 1991. Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *FEMS Microbiol Lett* 77. 5-12.
- Collins, M. D., Samelis, J., Metaxopoulos, J., Wallbanks, S. 1993. Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *Journal of Applied Microbiology*. 75 (6). 595-603.
- Cotter, P. D., Hill, C., Ross, R. P. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*. 3. 777-788.
- Daley-Bauer, L. P., Purdy, S. R., Smith, M. C., Gagliardo, L. F., Davis, W. C., Appleton, J. A. 2010. Contributions of conventional and heavy-chain IgG to immunity in fetal, neonatal, and adult alpacas. *Clinical and Vaccine Immunology*. 17. 2007-2015.
- Deegan, L. H., Cotter, P. D., Hill, C., Ross, P. 2006. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal*. 16. 1058-1071.
- Delves-Broughton, J. 1990. Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technol.* 44 (I 1). 100-117.
- Dobson, A., Cotter, P. D., Ross, R. P., Hill, C. 2012. Bacteriocin production: a probiotic trait? *Applied and Environmental Microbiology*. 78 (1). 1-6.
- Dicks, L. M. T., Fantuzzi, L., Gonzalez, F. C., du Toit, M., Dellaglio, F. 1993. *Leuconostoc argentinum* sp. nov., isolated from Argentine raw milk. *International Journal of Systematic Bacteriology* 43. 347-351.
- Dworkin, M. 1999. *The prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiological community*. 3rd ed. New York: Springer-Verlag.
- Euzeby, J. P. 1997. Corrigenda to the Approved Lists of Bacterial Names and to the amended edition of the Approved Lists of Bacterial Names. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1997. 47. 1271-1272.
- El-Agamy, E. I., Ruppanner, R., Ismail, A., Champagne, C. P., Assaf, R. 1992. Antibacterial and antiviral activity of camel milk protective proteins. *Journal of Dairy Research*. 59. 169-175.

- El-Agamy, E. I., Ruppanner, R., Ismail, A., Champagne, C. P., Assaf, R. 1996. Purification and characterization of lactoferrin, lactoperoxidase, lysozyme and immunoglobulins from camel's milk. *International Dairy Journal*, 6. 129-145.
- Farah, Z., Streiff, T., Bachmann, M. R. 1989. Manufacture and characterisation of camel milk butter, *Milchwissenschaft*. 44 (7). 412-414.
- Farah, Z., Streiff, T., Bachmann, M. R. 1990. Preparation and consumer acceptability tests of fermented camel milk in Kenya. *Journal of Dairy Research* 57. 281-283.
- Farah, Z. 1993. Composition and characteristics of camel milk. *Journal of Dairy Research* 1993. 60. 603-626.
- Fguiri, I., Ziadi, M., Atigui, M., Ayeb, N., Arroum, S., Assadi, M., et al. 2015. Isolation and characterisation of lactic acid bacteria strains from raw camel milk for potential use in the production of fermented Tunisian dairy products. *International Journal of Dairy Technology*, 68. 1-11.
- Fguiri, I., Ziadi, M., Atigui, M., Ayeb, N., Arroum, S., Assadi, M. and Khorchani, T. 2016, Isolation and characterisation of lactic acid bacteria strains from raw camel milk for potential use in the production of fermented Tunisian dairy products. *Int J Dairy Technol*. 69. 103-113.
- Field, D., Begley, M., O'Connor, P. M., Daly, K. M., Hugenholtz, F., Cotter, P. D., et al. 2012. Bioengineered nisin A derivatives with enhanced activity against both Gram positive and Gram negative pathogens. *PLoS One*. 7 (10). 1-12
- Flaherty J. D., Levett P. N., Dewhirst F. E., Troe T. E., Warren J. R., Johnson S. J. 2003. Fatal case of endocarditis due to *Weissella confusa*. *Clin Microbiol*. 2003 May. 41 (5). 2237-9.
- Fugl, A., Berhe, T., Kiran, A., Hussain, S., et al. 2017. Characterisation of lactic acid bacteria in spontaneously fermented camel milk and selection of strains for fermentation of camel milk, In *International Dairy Journal*. 2017 (73). 19-24.
- Fusco, V., Quero, G. M., Cho, G. S., Kabisch, J., Meske, D., Neve, H., Bockelmann, W., Franz, C. M. 2015. *Front Microbiol*. 2015 (6). 155.
- Garvie, E. I. 1986. Genus *Leuconostoc*. Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharp, M. E., Holt, J. G. (Eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 2. The Williams & Wilkins Co., Baltimore. 1071-1075.
- Hailu, Y., Bech, E., Seifu, E., Eshetu, M., & Ipsen, R. 2016. Factors influencing the gelation and rennetability of camel milk using camel chymosin. *International Dairy Journal*. 60. 62-69.
- Hamed, E., Elattar, A. 2013. Identification and some probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from Egyptian camels milk, *Life Sci. J*. 2013. 10 (1). 1952-1961.
- Hammes, W. P., Vogel, R. F. 1995. The genus *Lactobacillus*. Wood BJB, Holzappel WH (eds) *The genera of lactic acid bacteria*. Blackie Academic & Professional, London. 19-54.

- Hammes, W. P., Hertel, C. 2009. Genus *I. Lactobacillus* Beijerinck, 1901. In: De Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer K-H, Whitman WB (eds) Bergey's manual of systematic bacteriology. 3 (2). 465–510.
- Haakensen, M., Dobson, C., Hill, J., Ziola, B. 2009. Int J Syst Evol Microbiol. 59 (3). 615-621.
- Hashim, I. B., Khalil, A. H., Habib, H. 2009. Quality and acceptability of a set-type yogurt made from camel milk. Journal of Dairy Science. 2009. 92 (3). 857-862.
- Chandan, R., C., White, C. H., Kilara, A., Hui, Y. H. 2008. Manufacturing yogurt an fermented milk. John Wiley & Sons. 496.
- Ibrahem, S. A., Zubeir, I. E. M. 2016. Processing, composition and sensory characteristic of yoghurt made from camel milk and camel - sheep milk mixtures. Small Ruminant Research, 136. 109-112.
- Ismaili, A., et. al. 2016. Composition and Microbial Quality of Raw Camel Milk Produced in Morocco. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences. 2016 (12). 1.
- Jans, C., Bugnard, J., Njage, P. M. K., Lacroix, C., Meile, L. 2012. Lactic acid bacteria diversity of African raw and fermented camel milk products reveals a highly competitive, potentially health-threatening predominant microflora. LWT - Food Science and Technology. 47. 371-379.
- Jay, James M., 2000. Modern food microbiology. 6th ed. Gaithersburg, Md: Aspen Publishers. ISBN 083421671X.
- Kadri, Z., Vandamme, P., Ouadghiri, M., Cnockaert, M., Aerts, M., Farricha, O. E., et al. 2014. Streptococcus tangierensis sp. nov. And Streptococcus cameli sp. nov., two novel Streptococcus species isolated from raw camel milk in Morocco. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 64 (7). 2480-2485.
- Kainulainen, V., Reunanen, J., Hiippala, K., Guglielmetti, S., Vesterlund, S., Palva, A., Satokari, R. 2013. BopA does not have a major role in the adhesion of *Bifidobacterium bifidum* to intestinal epithelial cells, extracellular matrix proteins, and mucus. Applied and Environmental Microbiology. 79 (22). 6989-6997.
- Kappeler, S. R., Ackermann, M., Farah, Z., Puhani, Z. 1999. Sequence analysis of Camel (*Camelus dromedarius*) lactoferrin. International Dairy Journal. 9. 481-486.
- Kappeler, S. R., Heuberger, C., Farah, Z., Puhani, Z. 2004. Expression of the peptidoglycan recognition protein, PGRP, in the lactating mammary gland. Journal of Dairy Science. 87. 2660-2668.
- Keogh, M. K. O'Kennedy B.T. 1998. Rheology of Stirred Yogurt as Affected by Added Milk Fat, Protein and Hydrocolloids. Journal of food science. 1998. 63 (1).
- Kerwin, B. A. 2008. Polysorbates 20 and 80 used in the formulation of protein biotherapeutics: Structure and degradation pathways. J. Pharm. Sci. 97. 2924-2935.

- Khalid, K. 2011. An overview of lactic acid bacteria. *Int. J. Biosci.* 2011. 1. 1-13.
- Khedid K., Faid, M., Mokhtari, A., Soulaymani, A., Zinedine, A. 2009. Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco, *Microbiol. Res.* 2009. 164. 81-91.
- Khalesi, M., Salami, M., Moslehishad, M., et. al. 2017. Biomolecular content of camel milk: A traditional superfood towards future healthcare industry, In *Trends in Food Science & Technology.* 2017 (62). 49-58.
- Klaenhammer, T. R., de Vos, W. M. 2011. An incredible scientific journey. The evolutionary tale of the lactic acid bacteria. In: Ledeboer A, Hugenholtz J, Kok J, Konings W, Wouters J (eds) *The 10th LAB symposium. Thirty years of research on lactic acid bacteria.* 24 Media Labs. 1-11.
- Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., Reuter, G. 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* 4. 103-125.
- Krejsek, J., Kudlová, M., Koláčková, M., Novosad, J. 2007. Nutrice, probiotika a imunitní systém, II. část: Nutrice, přirozená slizniční mikroflóra a individuální imunitní reaktivita. *Pediatric pro praxi.* 3. 156-162.
- Kuliev, K. 1959. 'The utilisation of camels' milk'. *Mol. Promyslenn* 20 (28). cited in R. Yagil, 1982. *Camels and Camel milk.* FAO animal production and health paper. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
- Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*, c2012. 4th ed. Editor Sampo LAHTINEN. Boca Raton: CRC Press. ISBN 978-1-4398-3677-4.
- Lee, Ch., Lo, W., Lai, S., Chen, Y., Tang, Ch., Lyu, P. 2012. Metabolic classification of microbial genomes using functional probes. *BMC genomics.* 13. 157.
- Liu, S. Q. 2016. Lactic Acid Bacteria: *Leuconostoc* spp. Reference Module in Food Science. 10. 1016.
- Liu, C., Gelius, E., Liu, G., Steiner, H., & Dziarski, R. 2000. Mammalian peptidoglycan recognition protein binds peptidoglycan with high affinity, is expressed in neutrophils, and inhibits bacterial growth. *Journal of Biological Chemistry.* 275. 24490-24499.
- Lore, A. T., Mbugua, K. S., Wango, H. J. 2005. Enumeration and identification of microflora in suusac, a Kenyan traditional fermented camel milk product. *Lebensm- Wiss. u.- Technol.* 38. 125-130.
- Madhu, R., Kanika, S., Poonam, K. 2012. Isolation of lipase producing strain of enterococcus hirae from camel milk, *Novel Sci. Int. J. Med. Sci.* 1. 2012 (6). 208-214.
- Mati, A., Ghezali, Ch. et al. 2017. Dromedary camel milk proteins, a source of peptides having biological activities. *International Dairy Journal.* 2017 (73). 25-37.
- Maurad, K., Meriem, K. H. 2008. Probiotic characteristics of *Lactobacillus plantarum*

- strains from traditional butter made from camel milk in arid regions (Sahara) of Algeria, *Grasas y aceites* 59. 2008 (3). 218-224.
- Mattarelli, P., Sgorbati, B. 2018. Chemotaxonomic Features in the Bifidobacteriaceae Family - Chapter 5. The Bifidobacteria and Related Organisms. Academic Press. 2018. 99-114. ISBN 9780128050606.
- Maxa, V., Rada, V. 1996. Význam bifidobakterií a bakterií mléčného kvašení pro výživu a zdraví. UZPI. Praha. 42 s. ISBN: 8085120577.
- Mekadim, Ch., Kouřimská, L. 2017. Velbloudí mléko. Chemické složení a nutriční hodnota mléka velblouda jednohrbého chovaného v Alžírsku. *Potravinářská Revue*. 2017 (5). 22-23.
- Mitsuoka, Tomotari. 1984. Taxonomy and Ecology of Bifidobacteria. *Bifidobacteria and Microflora*. 3. 11-28.
- Mokoena, M. P. 2017. Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review. *Molecules*. 2017. 22 (8). 1255.
- Neugebauer, J.M. 1990. Detergents: An Overview. *Methods in Enzymology*. 182. 239-253.
- Ogier, J. C., Casalta, E., Farrokh, C., A. Saïhi. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The genus, *International Journal of Food Microbiology*. 2008. 126 (3). 286-290.
- Oliveira, L. C., Saraiva, T. D. L., Silva, W. M., Pereira, U. P., Campos, B. C., Benevides, L. J., et al. 2017. Analyses of the probiotic property and stress resistance-related genes of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 2118 through comparative genomics and *in vitro* assays. 12 (4).
- Osserman, E. F., Lawlor, D. P. 1966. Serum and urinary lysozyme (muramidase) in monocytic and monomyelocytic leukemia. *Journal of Experimental Medicine*. 124. 921-952.
- Orla-Jensen, M. 1924. La Classification des bactéries lactiques. Le Lait, INRA Editions. 1924. 4 (36). 468-474.
- Othman, A. S. 2016. Detection of bactericidal activity of camel's milk compared with raw and processed cow's milk against pathogenic bacteria. *Egypt Pharmaceut J*. 2016. 15. 31-7.
- Porto, M. C. W., Kuniyoshi, T. M., Azevedo, P. O. S., Vitolo, M., Oliveira, R. P. S. 2017. An important genus of lactic acid bacteria and pediocin producers, *Biotechnology Advances*. 2017. 35 (3). 361-374.
- Pokusaeva, K., Fitzgerald, G. F., van Sinderen, D. 2011. Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria. *Genes & Nutrition*. 2011. 6 (3). 285-306.

- Priyadarshini, S., Kansal, V. K. 2002. Lysozyme Activity in Buffalo Milk: Effect of Lactation Period, Parity, Mastitis, Season in India, pH and Milk Processing Heat Treatment Asian-Australas J Anim Sci. 2002. 15 (6). 895-899.
- Rahman, I. Dirar, H. 2009. Microbiological and biochemical changes and sensory evaluation of camel milk fermented by selected bacterial starter cultures. African Journal of Food Science. 3 (12). 398-405.
- Rahman, N., Xiaohong, C., Meiqin, F., & Mingsheng, D. 2009. Characterization of the dominant microflora in naturally fermented camel milk Shubat. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 25 (11). 1941-1946.
- Rodriguez, J. M., Martinez, M. I., Horn, N., & Dodd, H. M. 2003. Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology. 80 (2). 101-116.
- Rowe, R. C., Sheskey, P. J., Quinn, M. E. 2009. Handbook of Pharmaceutical Excipients 6th edition Pharmaceutical Press, London, England. 2009. 551.
- Salveti, E., Torriani, S., Felis, G. 2012. The Genus *Lactobacillus*: A Taxonomic Update. Probiotics and Antimicrobial Proteins. 4.
- Sermon, J., Vanoirbeek, K., De Spiegeleer, P., Van Houdt, R., Aertsen, A., & Michiels, C. W. 2005. Unique stress response to the lactoperoxidase thiocyanate enzyme system in *Escherichia coli*. Research in Microbiology. 156. 225-232.
- Shabo, Y. et al. 2005. Camel Milk for Food Allergies in Children. Immunology and Allergies. 2005 (7).
- Sharafi, H., Maleki, H., Ahmadian, G., Shahbani Zahiri, H., Sajedinejad, N., Houshmand, B., et al. 2013. Antibacterial activity and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* HKN01: a new insight into the morphological changes of antibacterial compound-treated *Escherichia coli* by electron microscopy. Journal of Microbiology and Biotechnology. 23 (2). 225-236.
- Sharma, P., Dube, D., Singh, A., Mishra, B., Singh, N., Sinha, M., et al. 2011. Structural basis of recognition of pathogen-associated molecular patterns and inhibition of proinflammatory cytokines by camel peptidoglycan recognition protein. Journal of Biological Chemistry. 286. 16208-16217.
- Shori, A. B. 2012. Comparative study of chemical composition, isolation and identification of microflora in traditional fermented camel milk products: Gariss, Suusac, and Shubat. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences. 11 (2). 79-88.
- Shori, A. B. 2015. Camel milk as a potential therapy for controlling diabetes and its complications: A review of in vivo studies. Journal of Food and Drug Analysis. 23(4). 609-618.
- Shori, A. B. 2017. Camel milk and its fermented products as a source of potential probiotic strains and novel food cultures: A mini review, In PharmaNutrition. 2017. 5 (3). 84-88.

- Schleifer, K. H., Kraus, J., Dvorak, C., Kilpper-Balz, R., Collins, M. D., Fischer, W. 1985. "Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov". *Syst. Appl. Microbiol.* 6. 183-195.
- Singh, S. B., Davis, A. S. et al. 2006. Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. *Science.* 2006. 313. 1438-1441.
- Song, A. A., In, L.L.A., Lim, S.H.E. et al. 2017. *Microb Cell Fact.* 2017. 16. 139.
- Stiles, E. M., Wilhelm H. H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology.* Department of Food Science and Nutrition, University of Alberta, Edmonton, Alberta T6G 2P5, Canada. 1997. 36(1). 1-29.
- Teuber, M. 2001. Lactic Acid Bacteria. *Biotechnology Set, Second Edition* (eds H.-J. Rehm and G. Reed), Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany. ISBN: 9783527257621.
- Temmerman, R., Pot, B., Huys, G., Swings, J. 2002. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *International Journal of Food Microbiology.* 81. 1-10.
- Tissier, M. H. 1900. Recherches sur la flore intestinale normale et pathologique du nourrisson. Thesis. University of Paris, Paris, France.
- Todorov, S. D., Rachman, C., Fourrier, A., Dicks, L. M., van Reenen, C. A., Prevost, H., et al. 2011. Characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* R1333 isolated from smoked salmon. *Anaerobe.* 17 (1). 23-31.
- Todorov, S. D. 2009. Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* - Production genetic organization. *Braz. J. Microbiol.* 2009. 40. 209-221.
- Touch, V., Hayakawa, S., Yamada, S., Kaneko, S. 2004. Effects of a lactoperoxidase-thiocyanate/hydrogen peroxide system on *Salmonella enteritidis* in animal or vegetable foods. *International Journal of Food Microbiology.* 93. 175-183.
- van Tieghem. 1878. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30. 315.
- Varaldo, P. E., Valisena, S., Mingari, M. C., Satta, G. 1989. Lysozyme-induced inhibition of the lymphocyte response to mitogenic lectins. *Proceed. Soc. Exp. Biol. Med.* 190. 4-62.
- Weiss, N. 1991. The genera *Pediococcus* and *Aerococcus*. *The Prokaryotes* (Balows, A., Truper, H. G., Dworkin, Harder, W., & Schleifer, K.-H. Eds. 2 (2). 1502-1507.
- Yateem, A., Balba, M. T., Al-Surrayai, T., Al-Mutairi, B., Al-Daher R. 2008. Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potential from camel milk, *Int. J. Dairy Sci.* 2008. 3 (4). 194-199.