

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŽIVILSKA TEHNOLOGIJA

BIOTEHNOLOŠKA PROIZVODNJA KUMISA*

Ksenja DAVID, Lidija DOMJAN, Nataša DRGANC

(študentke tretjega letnika študija Živilske tehnologije)

prof. dr. Peter Raspor in asist. dr. Maja Paš (mentorja)

Ljubljana, 2003

*Seminarska naloga pri predmetu Biotehnologija

- **POVZETEK:**

Kumis (mongol. koo-mihs) je kislo, kefiru podobno kobilje ali velblodje mleko. Je vrsta fermentirane mlečne pijače pri azijskih nomadih. Uvrščamo ga med mlečnokislinske in alkoholne napitke. Največ kumisa proizvedejo v Rusiji. Lahko ga izdelujemo tudi iz kravjega mleka, vendar ga moramo ustrezno obdelati, da dobimo mleko podobno kobiljemu. Za proizvodnjo kumisa uporabljamo mešano kulturo, ki vsebuje pretežno *Lactobacillus bulgaricus* in *Lactobacillus acidophilus* ter kvasovke rodu *Torulopsis*. Kobilje mleko je v primerjavi s kravjim veliko bolj zdravo, saj vsebuje veliko manj maščob in kar 5 do 7 krat več vitamina C. Kumis zato priporočajo pri zdravljenju tuberkuloze, želodčnih in prebavnih težav, obolenj srca in ožilja, obolenj jeter in ledvic ter nekaterih avitaminoz.

- **SUMMARY:**

Koumiss (mongol. koo-mihs) is a sour drink made of mare's milk similar to kefir and it is made as a result of acid and alcoholic fermentation. It was a traditional drink of Asian nomads. The biggest production of koumiss is in Russia. It can be made also from cow's milk, but the milk has to be properly treated, so that we get a milk similar to mare's. For production of koumiss we use mixed culture-startar culture which contain mostly *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* and yeasts generation of *Torulopsis*. Mare's milk is compared to cow's milk much more healthier, because it contains a lot less of fat and 5 to 7 times much vitamin C. Because of koumiss is recommended to cure tuberculosis, functions of kidneys, nervous system, blood forming organs, endocrine glands and it also improves the immunity.

KAZALO

POVZETEK	2
SUMMARY	2
1. UVOD	5
1.1. Kaj je kumis?.....	5
1.2. Fermentacija.....	5
1.3. Starterska kultura.....	6
2. ZGODOVINA BIOPROCESA	6
2.1. Uvod.....	6
2.2. Zgodovina kumisa.....	6
3. MIKROBIOLOŠKE OSNOVE BIOPROCESA	7
3.1. Uvod.....	7
3.2. Mikroflora pri kumisu.....	7
3.3. Bakterije.....	8
3.3.1. Rod <i>Lactobacillus</i>	8
3.3.1.1. <i>Lactobacillus acidophilus</i>	8
3.3.1.2. <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	9
3.3.2. Rod <i>Streptococcus</i>	10
3.4. Kvasovke.....	10
3.4.1. Rod <i>Saccharomyces</i>	10
3.4.2. Rod <i>Kluyveromyces</i>	11
3.4.3. Rod <i>Candida utilis</i>	11
3.5. Fermentirani mlečni proizvodi.....	12
4. BIOKEMIJSKE OSNOVE BIOPROCESA	12
4.1. Fermentacija pri kumisu.....	12
4.2. Alkoholna fermentacija.....	13
4.3. Mlečnokislinska fermentacija.....	13
5. BIOINŽENIRSKÉ OSNOVE BIOPROCESA	15
5.1. Pripravljalni postopki.....	15
5.1.1. Priprava mleka.....	15
5.1.2. Kobilje mleko.....	16
5.2. Potek bioprocasa.....	17
5.2.1. Kumis.....	17
5.2.2. Domači recept.....	18

5.3. Zaključni postopek.....	18
5.3.1. Shematski prikaz poteka priprave kumisa.....	19
6. EKOLOŠKI ASPEKT BIOPROCESA.....	20
7. UPORABA BIOPROIZVODOV V PREHRANI.....	20
8. REFERENCE.....	21

1. UVOD

1.1. Kaj je kumis?

Ime kumis izvira iz imena plemena Kumanes, ki so živeli ob reki Kumane v azijski stepi. Kumis ali airiku, kot mu pravijo azijski nomadi, je kislo kobilje mleko oziroma vrsta fermentirane alkoholne pijače iz kobiljega mleka. Najbolj je razširjen na Vzhodu (Mongolija, Rusija...). Prvotno je bil kumis pijača azijskih nomadskih ljudstev, danes pa ga cenijo tudi v mestih. Počasi, a vztrajno prodira tudi na evropski trg, nekateri mu pripisujejo celo boljši uspeh, kot ga ima jogurt. To slednje predvsem zaradi nekaterih terapevtskih učinkov, ki mu jih pripisujejo.

1.2. Fermentacija

Proizvodnja fermentirane hrane in pijače spremlja človeka že od samega začetka in je del tradicije nekaterih narodov. Le-ti so osnovne postopke priprave ohranili vse do danes, ne da bi sploh vedeli, kaj se med fermentacijo sploh dogaja.

Zanimanje za fermentirane proizvode v svetu narašča, zato se klasični postopki priprave prenašajo v industrijsko. K hitrejši proizvodnji fermentiranih izdelkov pripomore tehnološki razvoj (najboljši pogoji za fermentacijo, novi in boljši mikroorganizmi, dobre senzorične lastnosti...).

Procese med samo fermentacijo lahko razdelimo v dve skupini:

- najprej poteka hidroliza z encimi plesni, nato pa sledi fermentacija s kvasovkami ali bakterijami. Sem uvrščamo tekoče proizvode (kumis, kefir).
- v tej skupini nastajajo trdi proizvodi (tempeh, ontjom, nekateri siri, kot so: Cheddar, Edamec, Tilsit...). Delci, na katere deluje plesen so povezani z micelijem plesni.

Mleko je najboljša surovina za fermentacijo. Poznamo zelo veliko vrst mleka (kravje, kobilje, kozje, ovčje, kamelje, bizonovo...) in izdelkov iz mleka (sir, jogurt, kefir, kumis...). (Ahčin s sod, 2002)

Mikrobiološka cepiva ali starter kulture so pripravki tehnološko koristnih mikroorganizmov, ki v nadzorovanem procesu fermentacije povzročijo različne spremembe v mleku. Starter kulture so pomemben dodatek pri izdelovanju fermentiranih mlečnih izdelkov iz toplotno obdelanega mleka, saj se zaradi te obdelave skoraj v celoti uniči naravna mikroflora mleka.

Sama fermentacija izboljša okus ter prehransko vrednost, podaljša pa se tudi obstojnost izdelka. Raznolikost fermentiranega mleka je posledica delovanja množice različnih mikroorganizmov v različnih vrstah mleka.

Vrste fermentiranega mleka so: jogurt, kislo mleko, acidofilno mleko, kisli pinjenec, bifidogeno mleko, bikys (Češka), kefir (Kavkaz), taetmjolk ali sluzasta mleka (Skandinavija), kumis (azijski del nekdanje Sovjetske zveze), ymer (Danska), gioddu (Sardinija)...

(Oberman, 1985)

1.3. Starterska kultura

Glavne naloge starterske kulture so:

- nastajanje mlečne kisline, ki daje izdelkom prijeten in osvežujoč kiselkast vonj in okus, pri izdelovanju sirov pa je pomembna za usirjanje in kasneje za zorenje
- lipolitično in proteolitično delovanje, kar je zaželeno predvsem pri zorenju nekaterih vrst sira (siri s plesnijo, siri z rdečo mažo...)
- nastajanje plinov, kar omogoči oblikovanje očes v sirih
- nastajanje hlapnih snovi, ki dajejo izdelkom značilno aromo
- sprememba videza mleka oziroma mlečnega izdelka
- nastajanje nekaterih značilnih spojin, kot je npr. alkohol pri kumis in kefirju
- znižanje pH vrednosti zaradi nastale mlečne kisline
- nastajanje nekaterih drugih zaviralnih snovi (hlapne kisline, vodikov peroksid, antibiotikom podobne snovi – bakteriocini, nizin, D-leucin), kar vse skupaj preprečuje rast in delovanje patogenih ter drugih tehnološko škodljivih mikroorganizmov.

(http://www.bfro.uni-lj.si/zoo-publikacije/zbornik/suplementi/arhivsup/sup24/izvs24_f.htm)

2. ZGODOVINA BIOPROCESA

2.1. Uvod

Zgodovinski viri dokazujejo, da so fermentirane vrste mleka najstarejše oblike mlečnih izdelkov, saj o tem obstajajo dokumenti, ki se omenjajo nekaj stoletij pred našim štetjem. Te oblike mleka so poznali predvsem nomadski narodi Mezopotamije in Azije. Ker so ta kontinentalna področja vroča, se je mleko, ki so ga hranili, skisalo. Ko je do te spremembe prišlo, so dobili mlečni napitek, ki je bilo prijetnega okusa, zato so začeli mleko namerno kisati. Tedaj še niso vedeli, da te procese v mleku povzročajo različni mikroorganizmi. Ugotovili pa so, da lahko ohranjajo stalno kakovost tako, da v sveže mleko dodajo malo starega mleka prejšnjega dne. (<http://www.iskalec.com/isci.php>)

2.2. Zgodovina kumisa

Kumis je zelo stara pijača, katero omenjata že Herodot (5. stol. p.n.š.) in kasneje tudi veliki popotnik Marco Polo. Njegovo poreklo je Azija, največ pa ga proizvedejo v Rusiji.

Izvor je povezan z nomadsko tradicijo ljudstev iz step Centralne Azije. Ker so ta kontinentalna področja skoraj puščavnata ali prerijska, so prisilila nomadska ljudstva, da so se vedno znova preseljevala. Pri tem so si predvsem pomagali s konji. Prav zaradi tega je bil prvotno kumis le iz kobiljega mleka. Ljudje so hranili kobilje mleko v mehavih dalj časa, da je fermentiralo, nato pa so to pijačo (kumis) pili tako kot danes pijemo pivo. Pri fermentaciji kobiljega mleka nastane tudi majhna količina alkohola.

V preteklosti so kumis izdelovali predvsem manjši rejci, sedaj pa ga proizvajajo že industrijsko. (Montanari s sod., 1997)

Danes pa je pomanjkanje kobiljega mleka, zato tudi kumis izdelujejo iz kravjega mleka, ki pa ga je treba predhodno obdelati, da dobimo mleko podobno kobiljemu.

Toda kumis je še vedno zelo cenjeno živilo. Ljudje v Centralni Aziji ga uživajo tudi v kavarnah, prodajajo pa ga tudi na tržnicah. Proizvajajo ga predvsem v Sibiriji, Mongoliji, Kazahstanu, Kirgizistanu, Rusiji in drugih Centralno azijskih državah.

Kumisu pripisujejo tudi terapevtske učinke. V južnih predelih bivše Sovjetske zveze, kjer odrasli in otroci pogosto uživajo kobilje mleko in kumis, so opazili, da ljudje redko zbolijo za rakom prebavnega trakta in pljuč. V bolnišnicah dajejo kobilje mleko prezgodaj rojenim dojenčkom in bolnikom po operacijah, kumis pa uporabljajo pri bolnikih s hepatitisom, kroničnimi razjedami prebavil in tuberkulozo. (Solaroli s sod., 1993).

3. MIKROBIOLOŠKE OSNOVE BIOPROCESA

3.1. Uvod

Pretvorbo rastlinskih in živalskih surovin z mikroorganizmi uvrščamo med najstarejše postopke podaljševanja obstojnosti in izboljševanja senzoričnih in prehranskih lastnosti, tako pa hkrati dosegamo tudi varovalni učinek hrane. Polimerne sestavine hrane kot so proteini, ogljikovi hidrati in maščobe so same po sebi neokusne. Njihovi razgradni produkti, npr. peptidi, aminokisliline, sladkorji, kisliline in proizvodi njihovih medsebojnih interakcij, pa dajejo hrani prijeten vonj in okus. Fermentacija hrane izboljša okus hrane, njeno biološko in prehransko vrednost.

V vsakem geografskem okolju je zaradi ekoloških razmer sestava avtohtone mikroflore specifična. Pri pripravi hrane so vključene predvsem kvasovke in bakterije, v manjši meri plesni. S tehnološkim razvojem so bili izolirani ključni mikroorganizmi in določeni bioproceni parametri, ki omogočajo hitrejšo in bolj uniformirano pripravo fermentiranih jedi. Uporabljati se je začelo starterske kulture posameznih izolatov, ki omogočajo, da je priprava fermentirane hrane tudi bolj učinkovita in varna. Starter pomeni, da se del že fermentiranega kakovostnega proizvoda prenese v novo šaržo kot inokulum s selekcionirano pozitivno mikrofloro.

Med pripravo fermentirane hrane pa je potrebno misliti tudi na parametre kultivacije, ki morajo biti ustrezni, če želimo, da bomo pri proizvodnji določenega produkta uspešni. Ti so odvisni od vrste substrata, ekoloških pogojev delovanja biokulture, tipa proizvoda. Med ekološke pogoje vključujemo temperaturo, pH, ozmotske pogoje, svetlobo in čas delovanja kulture oziroma encimov. (Raspor s sod. 1999)

3.2. Mikroflora pri kumisu

Kultura za proizvodnjo kumisa je sestavljena predvsem iz: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, kvasovke *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* ali var. *lactis*. Mikroflora ni dovolj definirana, ampak vsebuje v glavnem termofilne laktobacile: *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* in *Lactobacillus acidophilus*, nato kvasovke, ki fermentirajo laktozo: *Saccharomyces lactis* in *Torula koumiss*, ter kvasovke, ki ne fermentirajo laktoze: *Saccharomyces cartilaginosus*. (Law, 1997)

Termofilne mlečnokislinske bakterije imajo optimalno temperaturo pri 40-50°C. Terapevtske mlečnokislinske bakterije, kot je *Lactobacillus acidophilus*, pa pri 37°C.

Fermentiranim mlečnim izdelkom daje značilne lastnosti njihova bakterijska kultura. Kvasovke kot sta *Saccharomyces* in *Torula* proizvajata alkohol, oziroma sodelujeta pri mlečnokislinski fermentaciji.

Kumis vsebuje približno 2,5% alkohola in 1,1% kislin.

Najbolj zastopani mikroorganizmi so bakterije mlečne kisline, ki dodane v mleko kot čista kultura, vodijo pomembno vlogo v proizvodnji mlečne kisline in pri fermentaciji laktoze. Mlečne kisline so odgovorne za svež kisel okus, ki ga ima kumis. Kvasovke so skupaj z mlečnimi kislinami enako pomembne pri proizvodnji alkoholne fermentirane pijače-kumisa. (Hughes, 1995)

3.3. Bakterije

Bakterije so zelo heterogena skupina prokariotskih mikroorganizmov. Premer bakterijske celice je samo 1 μm , vendar ima zaradi majhnosti ta organizem prednost v boju za obstanek. Razmerje med površino in volumnom je visoko, kot posledica pa je visoka tudi metabolična aktivnost, kratek generacijski čas in prilagodljivost na okolje.

Bakterijska celica je po svoji strukturi zelo enostavna. Ima celično steno, citoplazmo, citoplazemsko membrano, ribosome, jedrni material in razne celične vključke, nekatere pa še kapsule, bičke, fimbrije in spore. (Adamlje s sod., 2001)

3.3.1. Rod *Lactobacillus*

V splošnem velja, da so predstavniki rodu *Lactobacillus* nepatogeni. Pomembno vlogo igrajo v proizvodnji jogurtov. Dominantna sestavina arome jogurta je acetaldehid, ki nastane iz treonina s pomočjo specifične aldolaze *Lactobacillus bulgaricus*. Laktobacili so prav tako pomembni pri proizvodnji kefirja in kumisa, ter klasičnih trdih sirov (Ementalec, Parmezan, Grana, Gruyere...). Pomembno vlogo imajo tudi pri proizvodnji nekaterih pijač (vino, pivo, jabolčnik...), saj lahko vodijo zeželeno pa tudi nezaželeno fermentacijo.

Predstavnike rodu *Lactobacillus* razvrščamo v tri fiziološke kategorije:

- obligatno homofermentativne: več kot 85% mlečne kisline se tvori po Embden-Meyerhofovi poti; pentoze in glukonat se ne fermentirajo zaradi pomanjkanja encima fosfoketolaze
- Obligatno heterofermentativne: tvorba ekvimolarnih količin CO_2 , mlečne kisline, očetne kisline in/ali etanola
- Fakultativno heterofermentativne: 85% mlečne kisline se tvori s fermentacijo glukoze po Embden-Meyerhofovi poti; pentoze in glukonat se fermentirajo po pentoza-fosfatni poti.

(Gaber s sod., 2000)

3.3.1.1. *Lactobacillus acidophilus*

Prisotna je v naravni mikroflori človeških prebavil, od tam so jo tudi izolirali. Tej bakterijo pravimo tudi probiotična bakterija (pro-za, bios-življenje).

Lahko raste v mleku in tvori mlečno kislino, vendar potrebuje določen čas, da se navadi na življenje v tem mediju. Njena terapevtska ali probiotična sposobnost je, da preživi vso pot skozi prebavila, kjer tvori mlečno kislino. Ta kislina zavira delovanje gnilobnih bakterij,

kar ugodno vpliva na posameznikovo pravilno prebavo in s tem na njegovo počutje. V telesu je ta bakterija zaželjena, saj vzdržuje ravnotežje normalne črevesne mikroflore. *Lactobacillus acidophilus* pripomore k zniževanju holesterola v krvi in stimulira imunski sistem. Vzpodbuja nastajanje šibkega antibiotika coliciina, ki ugodno deluje na odpornost organizma. Sodeluje tudi v sintezi vitaminov B kompleksa in preprečuje nastanek črevesnega raka. (Skočir s sod., 2001)

Tabela 1: Probiotična in terapevtska vloga *Lactobacillus acidophilus* (Varnam in Sutberland, 1996)

KARAKTERISTIČNE LASTNOSTI IN FUNKCIJA	UČINEK
normalna intestinalna mikrobnna populacija	tvorba inhibitorja
lažja prebavljivost laktoze	zmanjšana količina laktoze v proizvodu razgradnja laktoze z β galaktozidazo
antikarcenogena dejavnost	stimulacija imunskega sistema
boljša prebavljivost hrane	povečanje absorpcije kalcija

3.3.1.2. *Lactobacillus delbrueckii*

Bakterija *Lactobacillus delbrueckii* spada v tisto skupino predstavnikov rodu *Lactobacillus*, za katero je značilna homofermentativna razgradnja sladkorja, to pomeni, da je glavni produkt metabolizma glukoze (preko 85%) mlečna kislina.

Celice bakterije so paličaste, dolge 2-9 μm , nastopajo pa posamezno ali v verižicah. Kolonije so normalno hrapave in nepigmentirane, ne rastejo pri 15°C, marveč je rast zaznavna šele pri 45°C, običajno pa pri 50-52°C, čeprav je optimum rasti med 40 in 44°C. Sveže izolirana kultura običajno dobro fermentira maltozo, medtem ko je razgradnja dekstroze znatno slabša. Zato jih moramo počasi prilagajati na zeleno fermentiranje in prav te faza prilagajanja običajno ni tako enostavna, kot navaja literatura. Uspe pa jih vzgojiti v dobro industrijsko kulturo, ki razgrajuje dekstrozo tako, da maltozni raztopini dnevno dodajamo dekstrozo. Normalno pa je, da so določeni sevi *Lactobacillus delbrueckii* primernejši za tako prilagajanje, kajti lahko se zgodi, da z drugimi sevi sploh ne uspemo doseči zaželenega efekta.

Celične stene *Lactobacillus* vsebujejo glicerol, tehoično kislino, peptidoglikan pa je L-lizin-D-aspartat. Serološke grupe niso zaznavne. Vsebujejo kalcijev pantotenat, niacin in riboflavin, medtem ko niso odkrili tiamina, piridoksala, folne kisline in vitamina B₁₂. Za produkcijo mlečne kisline v industrijskem obsegu je potrebno izbrati tak sev *Lactobacillus delbrueckii*, ki dobro raste na melasi in ga je mogoče gojiti s serijskimi precepljanji na različna melasna gojišča z dodatkom fosfata in krede. (Macarol, 1980)

3.3.2. Rod *Streptococcus*

Te bakterije so v močni povezavi s človeškim organizmom, veliko je patogenih. Izjema je *Streptococcus thermophilus*, ki se uporablja v proizvodnji jogurtov in sirov. Vsi streptokoki so homofermentativni in v glavnem proizvajajo mlečno kislino. So manj odporni na kisline kot laktobacili. Mnogi fermentacije ne preživijo in to zaradi mlečne kisline, ki jo med postopkom sami ustvarijo. (Gaber s sod., 2000)

Tabela 2: Mlečnokislinske bakterije prisotne v kumisu (Montanari s sod. 1997)

SKUPINA BAKTERIJ	VRSTA BAKTERIJ
Homofermentativni obligati	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> susp. <i>bulgaricus</i>
	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> susp. <i>lactis</i>
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
	<i>Streptococcus thermophilus</i>
	<i>Streptococcus lactis</i>
	<i>Streptococcus diacetylactis</i>
	<i>Streptococcus cremoris</i>
Heterofermentativni fakultativi	<i>Lactobacillus casei</i>
Heterofermentativni obligati	<i>Lactobacillus kefir</i>

3.4. Kvasovke

Poznamo več kot 70.000 vrst gliv, od teh 500 vrst priznavamo za kvasovke. Kvasovke torej predstavljajo le majhen del v kraljestvu gliv.

Enostavno definirati kvasovke je skoraj nemogoče, saj vemo, da ima veliko neceličnih oblik kompleksne življenjske cikle. V splošnem pa lahko kvasovke opišemo kot mikroskopsko majhne, enocelične prave glive, od 2-8 µm široke in od 10-30µm dolge. So močno razširjene v naravi, imajo dobro razvito jedro s kromosomi in obdano z jedrno membrano. So torej evkarionti.

Kvasne celice so lahko ovalne, okrogle, cilindrične, srpaste, tudi limonaste oblike. Rastejo kot saprofiti ali paraziti, razmnožujejo pa se običajno vegetativno z brstenjem oziroma nekatere s cepljenjem. Večina kvasovk se razmnožuje tudi generativno ali spolno in jih tako razvrščamo med askomicete in bazidiomicete. Redke izjeme so lahko tudi patogene. Na splošno lahko rastejo in učinkovito fermentirajo pri pH od 3,5 do 6 in temperaturah od 28 do 35°C. (Barnett s sod., 1983)

3.4.1. Rod *Saccharomyces*

Tehnološko je rod *Saccharomyces* najpomembnejši pri fermentaciji različnih substratov, zato je tudi najbolj raziskan. Z genetskega in biokemijskega stališča pa ima nekaj slabih strani, kot so: omejena sekrecija produktov in izkoriščanje ogljikovih hidratov, nizka toleranca alkohola in koncentracije substrata. V tekočem gojišču tvorijo usedlino, motnost

in obroč; na trdnem gojišču pa so kolonije krem bele barve z gladko površino, na sredini imajo krater, rob kolonij pa je gladek. Celice so okrogle, ovalne ali cilindrične oblike in multipolarno brstijo. Pseudomicelija ne tvorijo, lahko se pojavijo posamezne hife. Fermentirajo glukozo, ne tvorijo ekstracelularnih škrobu podobnih snovi in nimajo ureaze. (Jeršek, 2001)

3.4.2. Rod *Kluyveromyces*:

Pri rodu *Kluyveromyces* so askospore podobne ledvici ali luninemu krajcu. Vrste tega rodu najdemo v tleh, v rečnem mulju, morski vodi, v govejem črevesju, v mehkem siru in drugod. *Kluyveromyces lactis* raste v kisljih mlečnih izdelkih.

Za rast izkoriščajo cenene ogljikohidratne substrate odpadnih vod različnih industrij. Imajo visoko hitrost rasti in izkoristke, ki znižujejo ceno proizvodnji mikrobnih proteinov. (Maček s sod., 2000)

3.4.3. Rod *Candida utilis*

Ima dva imena, starejšega in novejšega. *Torulopsis utilis* je bila uspešno vključena v odstranjevanje onesnaženja odpadnih vod papirne industrije. V 80.-ih je ta kvasovka dobila tudi oznako GRAS- generally recognised as safe, kar jo uvršča med varne vire naravnih proteinov. V živilstvu se »Torula« kvasna biomasa uporablja kot nosilec arome in v nekaterih primerih tudi kot povezovalac v hrani. V farmacevtski industriji se uporablja kot rastni faktor v biokemijsko sestavljenih kultivacijskih medijih. Gojili so jo na sulfatni lužini in kvas uporabljali kot proteinski koncentrat za krmljenje živali.

Pred uporabo je kvasovka pasterizirana in posušena. Bogata je s proteini in vitamini. V medicini se uporablja kot dodatek.. (Maček s sod., 2000)

Tabela 3: Kvasovke prisotne v kumisu (Montanari s sod., 1997)

SKUPINA KVASOVK	VRSTA KVASOVK
Fermentirajo laktozo	<i>Torula kefir</i> (<i>K. fragilis</i> , <i>K. marxianus</i> var. <i>marxianus</i>)
	<i>Saccharomyces lactis</i> (<i>K. marxianus</i> var. <i>lactis</i>)
	<i>Candida kefir</i> (<i>Torulopsis kefir</i>)
	<i>Candida kefir</i> var. <i>kumis</i> (<i>Torulopsis kefir</i> var. <i>kumis</i>)
	<i>Torula kumys</i>
	<i>Torulopsis sphaerica</i>
Ne fermentirajo laktoze	<i>Saccharomyces cartilaginosus</i> (<i>Saccharomyces ceravisiae</i>)
	<i>Saccharomyces unisporus</i>
	<i>Candida pseudotropicalis</i>
	<i>Torulopsis lactiscondeci</i>
Sploh ne fermentira	<i>Mycoderma</i> ssp.

3.5. Fermentirani mlečni proizvodi

Tabela 4: Primerjava različnih fermentiranih izdelkov iz mleka (Oberman, 1985)

tradicionalno ime	država izvora	tipi mleka in pogoji fermentacije	mikroflora
PROKISH	Azija, Afrika, Evropa	fermentacija v bombažnih culah	mešanica mlečnokislinskih bakterij
PROSTOKVASHA	srednja Azija, Balkan	Fermentacija v ilovnatih kadeh	<i>Streptococcus thermophilus</i> , včasih z <i>L. bulgaricus</i>
KEFIR	Kavkaz	ovčje, kravje, kozje ali mešano mleko fermentirano v lesenih sodih ali v mehovih iz kože	<i>Str. lactis</i> , <i>Leuconostoc</i> spp., <i>L. caucasicus</i> , <i>Saccharomyces kefir</i> , <i>Torula kefir</i>
KUMIS	Azijske stepe	kobilje, kamelje mleko fermentirano v mehovih iz kože	<i>L. bulgaricus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>Torula koumiss</i> , <i>Saccharomyces lactis</i>
BRANO	Bolgarija	ovčje ali kravje mleko	<i>L. bulgaricus</i> , <i>Str. thermophilus</i> , kvasovke, ki fermentirajo laktozo
VIIILIA (FIILIA)	Finska	kravje mleko	<i>Str. lactis</i> , <i>Str. cremoris</i> , <i>Geotrichum candidum</i>
SKYR	Islandija	kravje mleko, sirotka	<i>L. bulgaricus</i> , <i>Str. thermophilus</i> , <i>L. casei</i>
SØS-TEJ	Madžarska	ovčje mleko, delno sušena sirotka	Mešana, nedefinirana mikroflora

4. BIOKEMIJSKE OSNOVE BIOPROCESA

4.1. Fermentacija pri kumisu

Pri kumisu poteka mlečnokislinska in alkoholna fermentacija. Glede na raziskave, ki so jih izvedli različni kazahstanski mikrobiologi, mlečna mikroflora ni homogena, ker je sestavljena iz streptokokov, laktokokov, laktobacilov.

Med homofermentativnimi laktobacili prevladuje *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. Med heterofermentativnimi bakterijami pa je zelo visoka prisotnost *Lactobacillus kefir*. V kumisu pa so našli tudi prisotnost različnih kvasovk, katerim pripisujejo odgovornost za alkoholno fermentacijo. Kvasovke, ki so tipične za mlečne proizvode, so bile v kumisu najdene le v sledovih. Najbolj odgovorna kvasovka za alkoholno fermentacijo pri kumisu je prav gotovo *Saccharomyces unisporus*, ki se zelo lahko razmnožuje v mleku. Porablja le glukozo. (Rheim, 1996)

Tabela 5: Biokemijska sestava kumisa v % (Ernoić s sod. 2000)

SESTAVA	SREDNJE MOČAN KUMIS	MOČAN KUMIS
Maščobe	1,90	1,90
Skupni proteini	2,20	2,20
Kazein	1,30	1,30
Skupni dušik	0,34	0,34
Albumini	0,32	0,29
Proteinski dušik	0,25	0,24
Peptonski dušik aminokislina	0,02	0,02
Alkohol	1,05	1,40
Mlečni sladkor	2,00	2,20

4.2. Alkoholna fermentacija

Kemijska enačba za alkoholno fermentacijo:



Alkoholna fermentacija je znana kot zapleten proces transformacije sladkorja v etilni alkohol in CO_2 , pri katerem nastaja cela vrsta prehodnih in stranskih proizvodov, ki so značilni in pomembni za kvaliteto alkoholnih pijač.

Alkoholna fermentacija poteka zaradi prisotnosti kvasovk, ki s pomočjo svojih encimov porabljajo sladkorje. Alkoholna fermentacija poteka pri temperaturi med 30 in 32°C, zaključena pa je v 48 do 72. urah.

Razgradnja glukoze v anaerobnih pogojih je veriga povezanih kemijskih reakcij, katere potekajo pod vplivom encimov oziroma fermentov.

V prvi fazi poteka fosforilacija glukoze do glukoze-6-fosfata. To omogoča encim heksokinaza. Sledi nastanek fruktoze-6-fosfata s pomočjo encima glukoza-6-fosfat izomeraze. V nadaljevanju se fruktoza-6-fosfat združi še z enim ostankom fosforne kisline s pomočjo encima fosfofruktokinaza in ATP v fruktozo 1,6-bifosfat.

Fruktoza 1,6-bifosfat se pod vplivom aldolaze razcepi v dve triozi: gliceraldehid-3-fosfat in dihidroksi aceton fosfat, ki se v nadaljnjem procesu izomeracije spremeni v gliceraldehid-3-fosfat.

V drugi del glikolize, kjer potekajo oksidacijsko-redukcijske reakcije, vstopata dve molekuli gliceraldehid-3-fosfata, ki se s pomočjo gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze pretvori v 1,3 difosfoglicerat, ki je energetsko bogata spojina in se pod vplivom fosfoglicerokinaze pretvori v 3-fosfoglicerat, ta pa naprej v 2-fosfoglicerat pod vplivom encima fosfoglicero mutaze. Enolaza odcepi vodo in nastane fosfoenol piruvat (PEP), ki je energetsko bogata spojina. S pomočjo piruvat kinaze se pretvori v piruvat.

Sledi dekarboksilacija piruvata s piruvat dekarboksilazo (odcep CO_2) v acetaldehid in na koncu nastane etilni alkohol ob redukciji acetaldehida s pomočjo encima alkohol dehidrogenaze.

Etanol in CO_2 sta glavna produkta alkoholne fermentacije, nista pa edina. Poleg njiju nastaja še cela vrsta drugih spojin, ki s svojo prisotnostjo vplivajo na aromo in okus (npr. pri kumisu). Te ostale spojine predstavljajo stranske produkte alkoholnega vrenja.

(Blatnik s sod., 2000)

4.3. Mlečnokislinska fermentacija

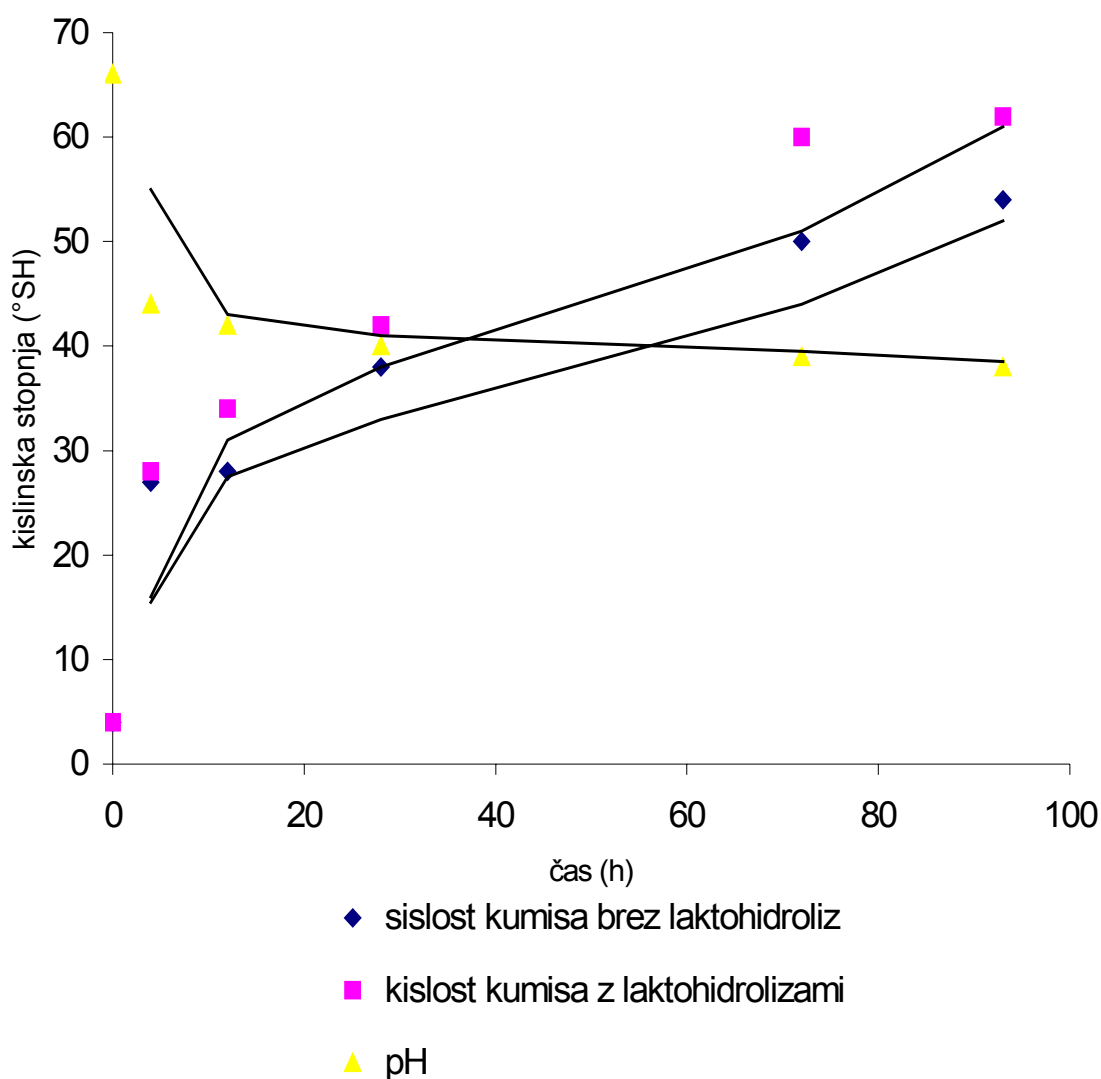
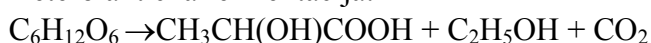
Fermentacija mlečne kisline je anaerobna in submerzna. Iz melase (surovina) se sladkor pretvarja v mlečno kislino zaradi delovanja encimskega kompleksa bakterije *Lactobacillus delbrueckii*. Ta bakterija ima podoben encimski sestav kot kvasovke, zato je mlečnokislinska fermentacija podobna kvasnemi. Do kopičenja mlečne kisline pa prihaja zaradi tega, ker *Lactobacillus* nima karboksilaze, ki jo kvasovke imajo in se metabolična pot ustavi pri mlečni kislini. (Skočir s sod., 2001)

Poznamo heterilaktično in homolaktično mlečnokislinsko fermentacijo.

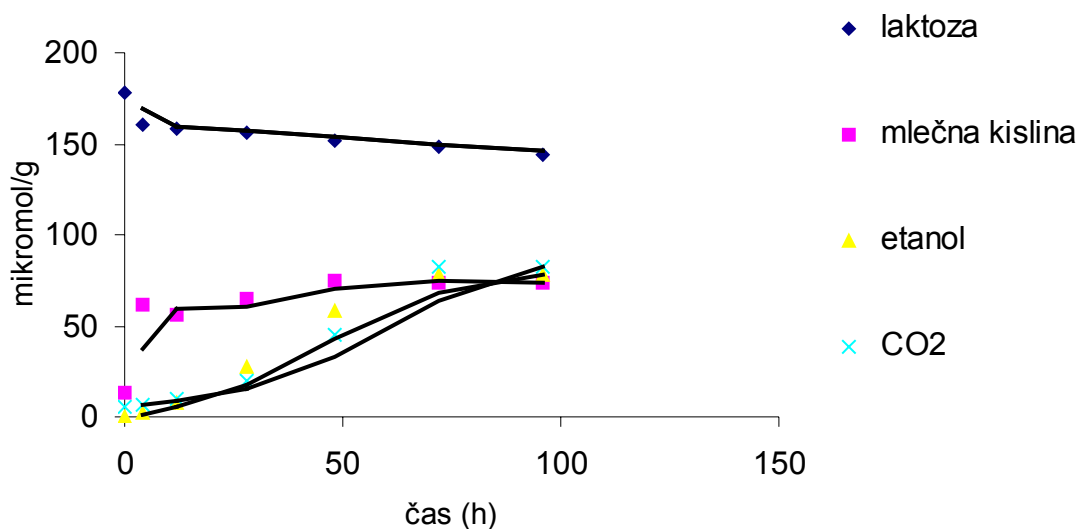
Homolaktična fermentacija:



Heterolaktična fermentacija:



Slika 1: Tvorba kislosti pri kumisu in vpliv na pH (Gallmann in Puhan, 1986)



Slika 2: Presnovni produkti v kumisu med vrenjem in skladiščenjem (Gallmann in Puhan, 1986)

5. BIOINŽINIRSKÉ OSNOVE BIOPROCESA

5.1. Pripravljalni postopki

5.1.1. Priprava mleka

Mleko je zelo hitro pokvarljivo živilo, zato je potrebno z njim pravilno ravnati že ob molži in takoj po njej. Obdelavi mleka takoj po molži pravimo tudi primarna obdelava, s katero že na začetku prispevajo k ohranjanju kakovosti mleka in podaljšanju njegove obstojnosti. Primarna obdelava mleka vključuje naslednje postopke:

- čiščenje mleka po molži
- hlajenja mleka po molži
- skladiščenje mleka

S čiščenjem odstranjujemo iz mleka mehansko nečistočo, kot na primer: prašne delce, koščke krme in stelje, dlake, mrčes itd. Pri tem si pomagajo s:

- cedili (pri ročni molži)
- filtri (pri strojni molži – filtri so nameščeni v molznem stroju)
- separatorji, ki jih imenujemo tudi klarifikatorji (pri veliki količini strojno molženega mleka)

Cilj hlajenja je znižati temperaturo mleka, da se zaustavi ali pa upočasni razvoj mikroorganizmov. Mleko ima po molži približno 35°C, kar je optimalna temperatura za

večino mikroorganizmov, ki bi zelo hitro začeli s kvarnim delovanjem. Da bi to preprečili, je potrebno mleko ohladiti na čim nižje temperature (pod 6°C).

Učinkovitost hlajenja je odvisna od naslednjih dejavnikov:

- začetne okužbe mleka (števila mikroorganizmov)
- časa med molžo in začetkom hlajenja
- temperature in hitrosti hlajenja
- bakteriostatičnih lastnosti mleka

Osnovni cilj sekundarne obdelave mleka je podaljšati mu obstojnost, kar dosežemo z naslednjimi postopki: sprejem mleka, posnemanje in tipiziranje mleka, homogenizacija mleka in toplotna obdelava mleka (pasterizacija).

Mlečna maščoba je v mleku v obliki maščobnih kroglic zelo različnih velikosti (od 0,1 do 20 µm). Njena specifična gostota je manjša od vode, zato se maščobne kroglice dvigujejo na površino mleka. Posledica tega pojava je plast mlečne maščobe na površini mlečnih izdelkov iz nehomogeniziranega mleka. Ta pojav lahko preprečujemo s homogenizacijo, ki jo izvajamo v homogenizatorju. Bistvo postopka je mehanično razbijanje velikih maščobnih kroglic na manjše, ki imajo premer do velikosti 1 µm. Na ta način preprečimo, oziroma upočasnimo dvigovanje maščobnih kroglic na površino. Prednost homogeniziranega mleka: lepši izgled, lažja prebavljivost in polnejši okus. Pomankljivosti homogeniziranega mleka: dražji izdelek in mlečna maščoba se hitreje kvari.

(<http://www.s-bts.kr.edus.si/htm/MIMI/miizdelki/oseko.htm>)

5.1.2. Kobilje mleko

Kobilje mleko je po zaznavnih lastnostih precej drugačno od kravjega mleka. Je manj belo, bolj prosojno in bolj sladkega okusa, kar je posledica višje vsebnosti laktoze in manjšega deleža kazeinov. Okus kobiljega mleka spominja na kokosovo aromo. V fizikalnih lastnostih med kobiljim in kravjim mlekom ni bistvenih razlik; imata podobno gostoto, ozmotski tlak in zmrzišče. Ima višji pH kot kravje mleko. (Lenasi s sod. 2002)

Tabela 6: Primerjava sestave kobiljega, kravjega in človeškega mleka. (Lenasi s sod. 2002)

Vsebnost (g/100g mleka)	kobilje mleko	kravje mleko	človeško mleko
Suha snov	9,3-11,6	12,5-13,0	11,7-12,9
Maščobe	0,5-2,0	3,5-3,9	3,5-4,0
Proteini	1,5-2,8	3,1-3,8	0,9-1,7
Kazeini	0,72-1,68	2,40-3,00	0,25-0,70
Proteini seruma	0,50-1,30	0,50-0,60	0,50-1,00
Lizocin	0,04-0,10	sledovi	0,004-0,050
Laktoza	5,8-7,0	4,4-4,8	6,3-7,0
Minerali	0,3-0,5	0,7-0,8	0,2-0,3
Kalorije (kcal/kg mleka)	390-550	650-660	650-700

Kobilje mleko poznamo že zelo dolgo časa (8.stol.p n.š.). Kobile lahko, odvisno od pasme in telesne teže, proizvedejo od 2-3,5 kg mleka na 100 kg žive teže. Hladnokrvne kobile dnevno proizvedejo približno 17,07 kg, toplokrvne pa 14,3 kg mleka. (Hanser, 1988)

V prehrani in medicini se kobilje mleko uporablja sveže, globoko zamrznjeno, v prahu ali pa kot fermentiran izdelek – kumis. V kozmetiki se uporablja v pripravi krem, losionov, šamponov, mil... Za fermentacijo pa se uporablja v obliki prahu, kapsul in emulzij. Kobilje mleko ima manj triacilglicerolov (78-80 %) in več prostih maščobnih kislin (9-10 %), ter fosfolipidov (5-19 %), kot človeško in kravje mleko. Proste maščobne kisline in fosfolipidi imajo visoko hranilno vrednost. Zaradi večjega deleža nenasičenih maščobnih kislin prihaja do hitrejše absorbcije maščob, kar je za prebavo ugodno. Visoka vsebnost kazeinov v kravjem mleku namreč v želodcu zaradi koagulacije povzroči nastanek čvrstih skupkov, katerih prebavljanje traja 3-5 ur. V nasprotju pa micele kobiljega in človeškega mleka tvorijo bolj rahel koagulum, ki se zadrži v želodcu le 2 uri. Še ena prednost kobiljega mleka je visoka vsebnost vitamina C (145-200 mg/l), kravje in človeško mleko pa ga vsebujeta le 43-50 oz. 20 mg/l. Kazeini konja so najbolj podobni kazeinom kamele in prašiča, sledijo kazeini človeka in šele nato kazeini goveda, ovac in koz. (Lenasi s sod. 2002)

5.2 Potek bioprocesa

5.2.1.Kumis

Kumis uvrščamo med mlečnokislinske in alkoholne napitke, podoben je kefirju. Poreklo je Azija, največ mleka, ki ima povprečno 1,5% maščobe, 1,2% kazeina in 6,5% mlečnega sladkorja, mlečne kisline pa vsebuje 2,0 do 2,8° SH. Ker je danes pomanjkanje kobiljega mleka večje, ga proizvajamo iz kravjega mleka, ki ga je treba predhodno obdelati, da dobimo mleko podobno kobiljemu.

Za proizvodnjo kumisa uporabljamo mešano kulturo, ki vsebuje *Lactobacillus bulgaricus* in *Lactobacillus acidophilus* in kvasovke rodu *Torulopsis*. Mleko grejemo na 95° C (368,15 K) 30 minut, ohladimo na 26 do 28° C (299,15 – 301,15 K), cepimo z 5% začetne kulture in počakamo, da fermentira 4 do 5 ur do kislosti 36 do 38° SH. Dobljeno zmes mešamo 15 minut in počakamo da fermentira 1 do 2 uri do kislosti 40 do 47° SH. Med to fermentacijo vsakih 15 do 20 minut premešamo in potem ohladimo na 4 do 5° C (277,15 – 278,15 K). Iz te kulture s podobnim postopkom proizvedemo tehnično kulturo. Za proizvodnjo kumisa vzamemo dobro sveže mleko, gostote ne nižje od 1,030, ter kislosti do 7,5° SH. Mleko se standardizira na 3,2 ali 1,5 % mlečne maščobe, doda se 1 do 1,5 % sladkorja (stopljenega v mleku) ter 1 do 2 % posnetega mleka v prahu. Mleko pasteriziramo na 72 do 74° C (345,15 – 347,15 K) v času 15 do 40 sekund, aromatiziramo in ponovno segrevamo na 90 do 95° C (363,15 – 368,15 K) 3 do 5 minut. Nato homogeniziramo pri temperaturi 70 do 74° C (343,15 – 347,15 K) pri 180 do 200 barov in ohladimo na 26 do 28° C (299,15 – 301,15 K). Pri tej temperaturi mleko cepimo z 8 do 10 % tehnične kulture in dobro premešamo 15 do 20 minut

Zorenje traja 5 do 6 ur do kislosti 30 do 36° SH. Po končani fermentaciji zmešamo z mešalom in sočasno hladimo od 16 do 20° C (289,15 – 293,15 K). To naj traja 1,5 do 2 uri. Če je zmes bolj čvrsta mešamo hitreje (20 minut). V času hlajenja in drobljenja z

mešalcem moramo zmes prezračiti, da odstranimo pline. Prezračevanje je koristno za večje oziroma močnejše razmnoževanje bakterij in kvasovk v kumisu.

5.2.2. Domači recept

Vzamemo posneto mleko (ali navadno, ampak zavreto) in dodamo sladkor. Kobilje mleko vsebuje veliko več laktoze kot kravje mleko. Nato uporabimo kvas (ne pivski) kot starter kulturo, zato da nastane kot produkt iz laktoze alkohol. To premešamo v plastičnih vrečkah, ki se uporabljajo tudi za vodo (5 litrskih, imeti moraji ročko in zamašek). Vrečko obesimo in stresamo vsake toliko časa. S tem preprečimo da bi se kumis sesiril v jogurt. Zamašek tudi občasno odpremo, da izravnamo pritisk v vrečki, ki nastaja zaradi ogljikovega dioksida, ki se sprošča pri penjenju.

Včasih so obešali vrečke s kumisom pred vstopom v šotore zato, da ko so odhajali in prihajali v šotor zraven še pretresli vrečko. Predenji so kumis začeli piti so ga malo polili na tla kot darilo reki Tengri. Ta tradicija se ohranja še danes.

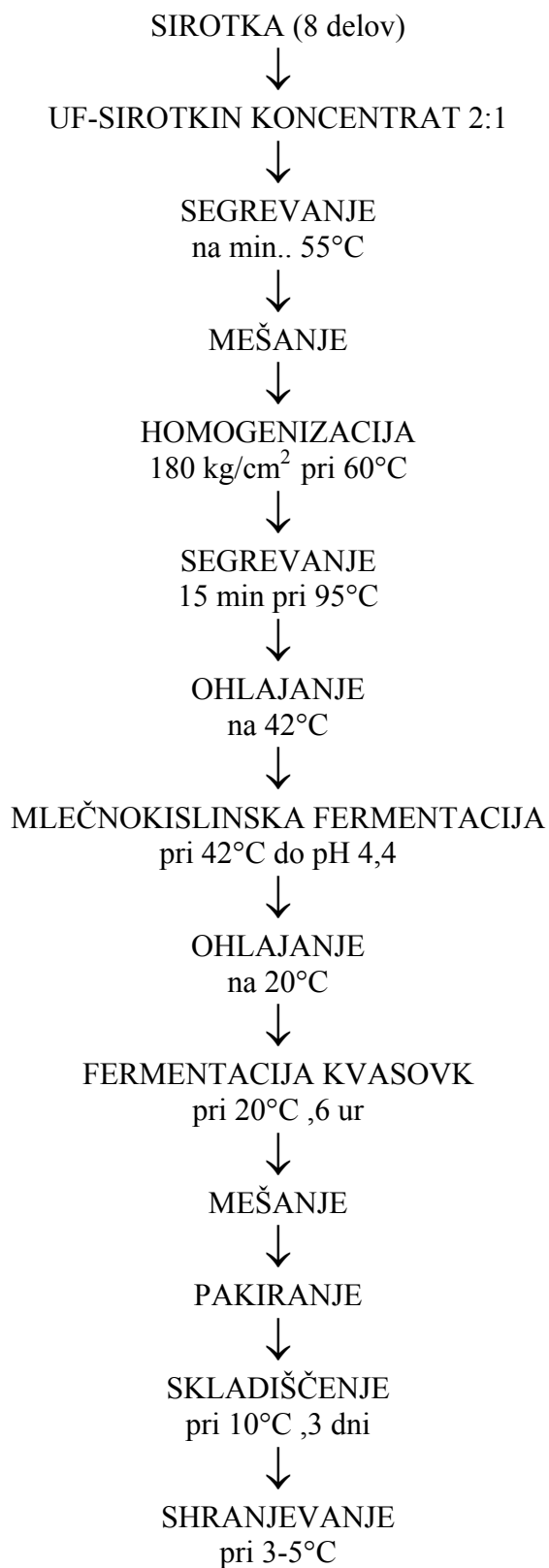
5.3. Zaključni postopki

Stisnjena masa se polni v kozarčke pri temperaturi od 16 do 20° C (289,15 – 293,15 K) in počaka še 2 uri. To je druga faza zorenja v kozarčkih, nato damo v hladilnik pri temperaturi od 4 do 8° C (277,15 – 281,15 K) in pustimo stati 12 ur.

Odvisno od kislosti in odstotka alkohola razlikujemo tri vrste kumisa :

- sladki (kislost od 24 do 32° SH in vsebnost alkohola 0,1 do 0,3 %),
- srednji (kislost 33 do 40° SH in vsebnost alkohola 0,2 do 0,4 %),
- močnejši (kislost 41 do 48° SH).

5.3.1. Shematski prikaz poteka priprave kumisa



Slika 3: Potek priprave kumisa (Gallmann in Puhan, 1986)

6. EKOLOŠKI ASPEKT BIOPROCESA:

Problemi emisije odpadkov in akumulacija sekundarnih surovin v okolje so spremljajoči problemi obstoječih tehnoloških postopkov v živilski industriji. Nastajajo v velikih količinah v postopkih predelave, procesiranja, skladiščenja, distribucije in marketinga. V preteklosti je veljalo okolje kot neskončen vir vseh dobrin, ki ga lahko izkoriščamo brez stroškov za njegovo skrb. Dvig zavesti in spoznanje, da je okolje omejen vir človeških dobrin v zadnjem obdobju vpliva na nov pristop do okolja, v katerem živimo.

Nekatere obstoječe in nove tehnologije, ki nastajajo na področju živilstva že vključujejo različne tehnološke in biotehnoške postopke zaščite okolja pred onesnaženjem. Sodobna živilska industrija je že sposobna ponuditi potrošniku svežo in procesirano hrano visoke kakovosti. Kljub sodobnim tehnološkim postopkom, ki se ta namen uporabljajo se je nemogoče izogniti nastajanju sekundarnih surovin in odpadkov ter zračnim emisijam, ki potencialno vplivajo na onesneževanje okolja. Zato je potrebno vzdrževanje in smotrno izkoriščanje naravnih virov bogastva s pomočjo reciklacije in izkoriščanjem sekundarnih surovin in odpadkov se postopki, ki zmanjšujejo obremenitev in onesnaženje okolja. Na tem področju nam bioprosesi omogočajo reševanje in vzpostavljanje porušenega ravnotežja kroženja snovi v naravi in kontrolo onesnaženja. Izdelki, ki nastajajo skozi bioprosesne aktivnosti iz sekundarnih surovin in odpadkov, se ponovno vključujejo v prehransko verigo ljudi in živali in so pogosto višjega cenovnega razreda, kot izhodiščne surovine. Uporabljajo se tudi zaradi možnosti hitrejša transformacije organskih snovi v obliko, ki je okolju prijaznejša.

Kvasovke, plesni, bakterije in alge so mikroorganizmi, ki sodelujejo v različnih bioprosesih transformacije sekundarnih surovin in odpadkov. Zato so osnovne značilnosti sekundarnih surovin in odpadkov živilske industrije zelo pomembne za izbiro bioprosesa nadaljne obdelave in predelave.

Skupna značilnost vseh sekundarnih surovin in odpadkov živilske industrije je, da imajo večjo moč onesnaženja okolja, kot je to v primeru komunalnih odpadkov.

Več kot 30% surovin, ki se vključujejo v tehnološki proces predelave v živilski industriji postane odpadek, ki potrebuje dodatno obdelavo ali predelavo. (Skočir s sod., 2001)

Pri proizvodnji kumisa se srečamo z odpadki, vendar iz njih ne moremo proizvajati sekundarnih surovin.

7. UPORABA BIOPROIZVODOV V PREHRANI

Fermentiranemu mleku je bila vedno pripisana višja prehrabena vrednost, kot pa surovemu mleku. Prav tako je fermentirano mleko bolj prebavljivo. To velja tudi za kumis, ki je iz fermentiranega mleka. Kumisu pripisujejo tudi terapevtske lastnosti. Zato ljudem v različnih zdraviliščih in bolnicah bivše USSR poleg zdravila dajo še kumis. Uspešno ga dajejo pri terapiji proti tuberkulozi (kumis, ki ni termično obdelan se uporablja proti bacilom, ki povzročajo tuberkulozo) in drugim pljučnim infekcijam- pljučnica, pri zdravljenju čira na želodcu in dvanajstniku, infarktu, kapi, vnetju sečevoda in živcev, ter pri toleranci na antibiotike. Kumis naj bi povečal tudi pulz in kratkotrajno tudi tlak.

Kobiljemu mleku pripisujejo, da je antisklerotični agens. Njegovo uživanje naj bi izboljšalo stanje pri bolnikih obolelih s tifusom, paratifusom, hepatitisom in alergijami.

(Montanari s sod., 1997)

8. REFERENCE:

- Adamlje, U., Artnak, N., Baša, K., Bratina, B. 2001. Proizvodnja etanola, Seminarska naloga, Ljubljana, BF, oddelek za živilstvo, s. 6,8
- Bajt, N., Golc, S. 2002. Izdelava jogurta, skute in sira, Ljubljana, Kmečki glas, s. 55-57
- Barnett, J. A., Pyne, R. W., Yarrow, D. 1983. Yeasts Characteristic and Identification. Cambridge, University Press
- Batič, M., Raspor, P., Smole-Možina, S. 1999. Vpliv mikrobov na teksturne in reološke značilnosti fermentiranih živil V: Plesni v proizvodnji fermentirane hrane. 19. Bitenčevi živilski dnevi 99, Ljubljana, 10-11 jun. 1999. BF Oddelek za živilstvo, s. 120-123
- Beakley, M. 1992. Lands and people. Berteismann Lexikon Verlag GmbH, World book Inc. P. 118-119
- Blatnik, E., Boem, T., Brumen, B., Bužinel, M. 2000. Proizvodnja alkoholov, Seminarska naloga, Ljubljana, BF, oddelek za živilstvo, s. 9
- Borović, A., Gregurek, L. 1997. Mljekarske kulture mikroorganizama u proizvodnji fermentiranih mlijeka. U: Mljekarstvo. br. 2., Zagreb, s. 103-107
- Ernoić, M. 2000. Mliječnost kobilica i mogućnosti uporabe. U: Stočarstvo. br. 4., Habe, F. (ur.), Zagreb, s. 295-304
- Gaber, M., Golob, Ž., Frim, A., Horvat, J. 2000. Anaerobna produkcija mlečne kisline, Seminarska naloga, Ljubljana, BF, oddelek za živilstvo, s. 8, 9, 10, 15, 16
- Gallmann, P., Puhar, Z. 1986. Kumys – Fermentationsverfahren und Stoffwechsel Produkte. In: Chemie Mikrobiologie Technologie der Lebensmittel. Vol. 9., Munchen, s. 178-183
- Hanser, S. 1988. Grundlagen zur chemisch-physikalischen und hygienischen beschaffenheit von Osterreichischer stutenmilch sowie deren vermarktunb. Diplomarbeit, Institut fur Milchforschung und bakteriologie ander Universitat fur Bodenkultur, Wien
- Havranek, J. in sod. 1996. Prehrambene, zdravstvene i tehnološke karakteristike fermentiranih proizvoda. U: Mljekarstvo. br. 4., Zagreb, s. 266-273
- Hughes. B. D., Hoover, D. G. 1995. Viability and enzymatic activity of Bifidobacteria in milk, J. Dairy Sci. 78, p. 268-276
- Jeršek, B. 2001. Navodila in delovni zvezek za vaje iz živilske mikrobiologije, Ljubljana, BF, oddelek za živilstvo, s. 23-27
- Law, B. A. 1997. Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented milk. Blackie Academic and Professional. London

Lenasi, T., Rogelj, I., Dovč, P. 2002. Kobilje mleko. V: Sodobno kmetijstvo. št. 7-8., Zemljič, D. (ur.), ČZD Kmečki glas, d.o.o. Ljubljana, s. 342-344

Macarol, N. 1980 Optimizacija proizvodnje mlečne kisline, Tovarna organskih kislin, Ilirska Bistrica, s. 5-16

Maček, R., Madžarevič, M., Malovrh, B., Mehle, P. 2000. Biosinteza ojačevalcev arom, Seminarska naloga, Ljubljana, BF, oddelek za živilstvo, s. 5

Montanari, G., Grazia, L. 1997. Galactose – Fermenting Yeasts as Fermentation Microorganisms in Traditional Koumiss. In: Food Technology and Biotechnology. Vol.35., Macan, I. (ed.), Laser plus, Zagreb, s. 305-308

Montanari, G., Zambonelli, C., Fiori, G. 1997. Il Koumiss, Bevanda da Latte Fermentato In: Industrie Alimentari. Vol. 36., Università di Bologna, s. 5-9

Montanari, G., Zambonelli, C. 1997. Principali Caratteristiche Tecnologiche e Fermentative di Saccharomyces unisporus. In: Industrie Alimentari. Vol. 36., Università di Bologna, s. 1001-1004

Oberman, H. 1985 In Microbiology of fermented foods, Ed. B.J.B. Wood, London, Elsev. Appl. Sci. Publ., Vol. 1. P. 167-195

Raspor, P. 1992. Biotehnologija, Proizvodnja fermentirane hrane, Ljubljana, BF Oddelek za živilstvo, s. 507-527

Raspor, P. 1996. Biotehnologija osnovna znanja, BIA d.o.o. Ljubljana

Rheim, H. J., Reed, G., Puhler, A., Stadler, P. 1996. Biotechnology Second completely revised edition. Weinheim, p. 121-198

Skočir, P., Spreicer, M., Stibilj, R., Suban, D. 2001. Biotehnoška proizvodnja mlečne kisline, Seminarska naloga, Ljubljana, BF, oddelek za živilstvo, s. 7-8, 23

Solaroli, G., Pagliarini, E., Peri, C. 1993. Composition and nutritional quality of mare's milk. Hall. J. Food Sci. 1 p. 3-10

Varnam, A. H., Sutberland, J. P. 1994 Milk and milk products, Technology, Chemistry and Microbiology, Chapman 8 Hall, London

http://www.bfro.uni-lj.si/zoo-publikacije/zbornik/suplementi/arhivsup/sup24/izv_s24_f.htm 1.10.2001

<http://www.iskalec.com/isci.php> 5.12.2002

<http://www.s-bts.kr.edus.si/htm/MIMI/miizdelki/oseko.htm> 25.11.2002