

PIOTR ŻELAZOWSKI, MONIKA WSZOŁEK, MAGDA FILIPCZAK-FIUTAK

JAKOŚĆ KUMYSU Z MLEKA OŚLEGO

Streszczenie

Niniejsza praca miała na celu wyprodukowanie i ocenę jakości kumysu z mleka oślego. Przed przystąpieniem do produkcji oznaczono podstawowy skład surowca, czyli zawartość białka, tłuszczu i laktozy, zmierzono pH i kwasowość potencjalną mleka oraz oznaczono ogólną liczbę drobnoustrojów, liczbę psychrotrofów i drożdży w mleku surowym. W kumysie zmierzono pH i oznaczono kwasowość, zawartość laktozy i alkoholu. Oznaczono także liczbę *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lb. acidophilus* oraz drożdży podczas dojrzewania kumysu. Wykonano rozdział elektroforetyczny białek surowca i kumysu w celu oceny proteolizy białek mleka podczas fermentacji i w czasie dojrzewania.

Mleko ośle charakteryzowało się zawartością białka na poziomie 1,29 %, tłuszczu – 1,17 % oraz laktozy – 7,20 %. Ogólna liczba drobnoustrojów w mleku surowym wynosiła $5,6 \times 10^2$ jtk/ml. Wyniki analiz wskazywały na wysoką jakość kumysu. Podczas fermentacji i dojrzewania 30 % laktozy zostało przefermentowane przez użytą do procesu mikroflorę. W 14. dniu dojrzewania liczba *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* wynosiła $2,29 \times 10^7$ jtk/ml, *L. acidophilus* – $4,37 \times 10^7$ jtk/ml, natomiast drożdży – $1,12 \times 10^7$ jtk/ml. Zawartość etanolu w produkcie nie osiągnęła rekomendowanej przez Codex Alimentarius zawartości (nie mniej niż 0,5 %). Kumys charakteryzował się wysoką jakością mikrobiologiczną. Wyniki badań elektroforetycznych pozwoliły na oszacowanie zawartości lizozymu w mleku oślim oraz zmian frakcji kazeinowych podczas dojrzewania. Stwierdzono zmniejszenie udziału białek kazeinowych w ogólnej zawartości białek. Mała zawartość alkoholu etylowego w kumysie z mleka oślego mogła być spowodowana obecnością tylko jednego gatunku drożdży. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że mleko ośle może stanowić dobry surowiec do produkcji napojów fermentowanych o cechach funkcjonalnych.

Słowa kluczowe: kumys, mleko ośle, jakość, elektroforeza SDS-PAGE

Wprowadzenie

Kumys (zwany winem mlecznym) to tradycyjny, fermentowany napój mleczny pochodzący z terenów Centralnej Azji i Rosji. Znany jest na terenach Kazachstanu, jak również Kirgistanu. Według tradycyjnej receptury do jego produkcji stosowano mleko

Mgr inż. P. Żelazowski, dr hab. inż. M. Wszolek, prof. nadzw., mgr inż. M. Filipczak-Fiutak, Katedra Przetwórstwa Produktów Zwierzęcych, Wydz. Technologii Żywności, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, ul. Balicka 122, 30-149 Kraków. Kontakt: zelazowski@gmail.com

klaczy zaszczepiane kumysem. Ostateczny skład, a także charakterystyczny smak tego napoju kształtował się na skutek działalności bakterii fermentacji mlekowej i drożdży. Spożycie kumysu jest w znacznej mierze ograniczone przez czynniki geograficzne i nie zostało spopularyzowane w Europie. W regionie Azji Środkowej kumysowi przypisuje się właściwości prozdrowotne, poprawiające metabolizm, usprawniające prace systemu nerwowego i nerek. Ze względu na surowiec (mleko klaczy), z którego jest produkowany, kumys o małej zawartości alkoholu stanowi bezpieczny produkt spożywczy dla dzieci obarczonych alergiami pokarmowymi. Istnieje możliwość wykorzystania do produkcji kumysu mleka oślego i wielbłądziego, jak również mleka krowiego o zmodyfikowanym składzie [10].

Kumys to rodzaj mleka fermentowanego, którego walory sensoryczne, skład chemiczny i właściwości są wynikiem działania bakterii fermentacji mlekowej oraz prowadzonej przez drożdże fermentacji alkoholowej [4]. Według Codex Alimentarius [29] mleko fermentowane powinno zawierać nie więcej niż 10 % tłuszczu mlekowego, minimum 0,7 % kwasu mlekowego oraz, tylko w odniesieniu do kumysu, 0,5 % (v/m) etanolu. Standard ten wskazuje również, że w składzie charakterystycznej mikroflory kumysu powinny znajdować się pałeczki *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* oraz drożdże *Kluyveromyces marxianus*. Inni autorzy [26, 31] podają szerszą grupę drobnoustrojów wchodzących w skład tego napoju:

- bakterie z rodzaju *Lactobacillus* (*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. acidophilus*),
- drożdże fermentujące laktozę z rodzaju *Saccharomyces* spp., *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* i *Candida koumiss*,
- drożdże niefermentujące laktozy, m.in. z gatunku *Saccharomyces cartilaginosus*,
- drożdże niefermentujące cukrów z rodzaju *Mycoderma* spp.

W ciągu ostatnich lat wzrosło zainteresowanie poszukiwaniem mleka, które mogłoby stanowić alternatywę dla mleka kobycego, a jednocześnie charakteryzowałoby się podobnym składem chemicznym i właściwościami. Spośród różnych gatunków mleka duże zainteresowanie wzbudza mleko ośle ze względu na wyjątkowe właściwości immunologiczne oraz skład chemiczny najbardziej zbliżony do mleka kobycego. Skład mleka oślego znacząco odbiega od mleka krowiego. Mleko to zawiera mniej suchej masy, białka i tłuszczu. Ponadto charakteryzuje się większą zawartością laktozy. Cechy tego mleka wpływają na jego właściwości i zastosowanie [30].

Niniejsza praca miała na celu wyprodukowanie i ocenę jakości kumysu z mleka oślego.

Material i metody badań

Material doświadczalny stanowiło mleko ośle pochodzące od oślic z hodowli z okolic Wrocławia. Do produkcji kumysu przeznaczono mleko pasteryzowane w temp. 72 °C przez 15 s, które schładzano i zaszczepiano trzema gatunkami drobnoustrojów: drożdżami *Kluyveromyces marxianus*, kulturą liofilizowaną LaF 4, zgodnie z zaleceniami producenta (10 U na 1000 litrów mleka), pałeczkami mlekowymi *Lactobacillus acidophilus* z termofilnej szczepionki LA-5, w której liczba komórek odpowiadała 1×10^{12} jtk/g (obie z firmy Christian Hansen, Polska) oraz *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (mrożona kultura firmy Danisco, Dania), z której sporządzano zakwas roboczy i dodawano w ilości 3 % do mleka przerobowego. Fermentacja kumysu przebiegała w temp. 25 °C do osiągnięcia pH poniżej 4,6, co trwało 3 doby. Dojrzewanie kumysu prowadzono w temp. 10 °C przez 14 dni.

W surowym mleku oślim przeznaczonym do produkcji oznaczano za pomocą aparatu MilcoScanTM FT 120 (firmy Foss, Dania) zawartość białka, tłuszczu i laktozy, jak również pH i kwasowość miareczkową. Charakterystykę mikrobiologiczną z wykorzystaniem metod posiewów wgłębnych przeprowadzono w kierunku ogólnej liczby drobnoustrojów wg PN-EN ISO 4833-1:2013-12 [19], liczby drożdży i pleśni wg PN-EN ISO 6611:2007 [20] oraz bakterii psychrotrofowych wg normy PN-ISO 6730:2008 [21]. Kumys analizowano w 1., 7. i 14. dniu dojrzewania. W napoju oznaczano: kwasowość czynną (przy użyciu pH-metru firmy Elmetron CP-411, Polska) i miareczkową, zawartość laktozy – metodą polarymetryczną (przy użyciu polarymetru półcieniowego Polax-2L firmy Atago, Japonia), alkoholu – testem enzymatycznym Boehringer Mannheim (firmy R-Biopharm, Niemcy). Wykonywano również posiewy mikrobiologiczne w celu określenia liczby drożdży i pleśni [19], pałeczek mlekowych z gatunku *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* wg PN-EN 7889:2007 [18] i pałeczek *Lb. acidophilus* zgodnie ze standardem FIL- IDF 149A:1997 [6] na podłożu MRS (BIOCORP, Polska) z maltozą zamiast glukozy [25]. W celu oceny proteolizy białek po procesie fermentacji i w czasie dojrzewania dokonywano rozdziału białek mleka oślego i kumysu na żelu poliakrylamidowym techniką SDS-PAGE wg metodyki podanej przez Laemmliego [13]. W celu porównania wykonywano elektroforetyczny rozdziel białek mleka krowiego.

Doświadczenie wykonano w trzech niezależnych powtórzeniach. Otrzymane wyniki opracowano statystycznie w programie Statistica 10. Przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji. Istotność różnic między wartościami średnimi szacowano testem Duncana ($p \leq 0,05$ i $p \leq 0,01$).

Wyniki i dyskusja

Skład i właściwości mleka oślego

Skład i właściwości fizykochemiczne mleka oślego przedstawiono w tab. 1.

Tabela 1. Skład i właściwości fizykochemiczne mleka oślego
Table 1. Composition and physical-chemical properties of donkey's milk

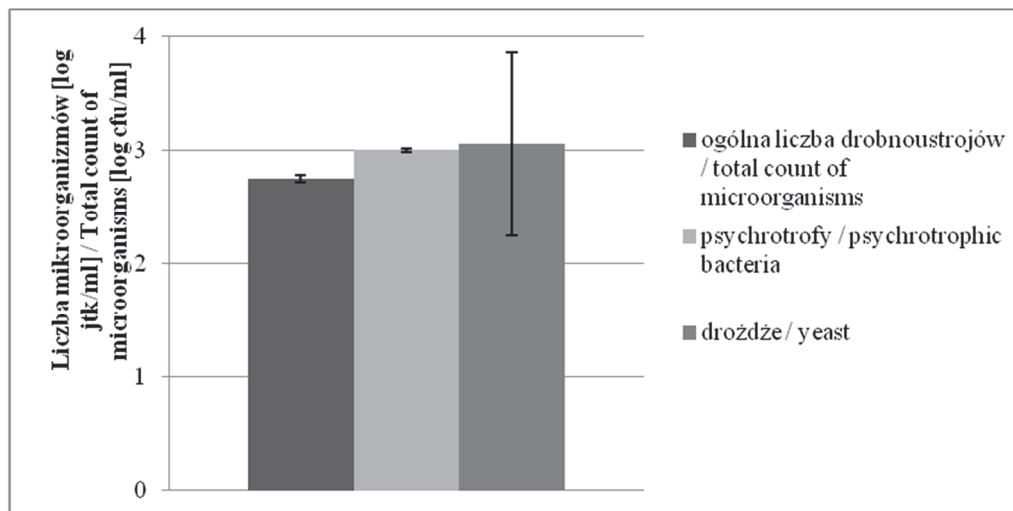
Składnik lub cecha Component or feature	$\bar{x} \pm SE$
Gęstość / Density [g/cm^3]	$1,037 \pm 0,33$
Zawartość białka / Protein content [%]	$1,29 \pm 0,02$
Zawartość tłuszczu / Fat content [%]	$1,17 \pm 0,07$
Zawartość suchej masy / Dry matter content [%]	$10,13 \pm 0,15$
Zawartość laktozy / Lactose content [%]	$7,20 \pm 0,02$
pH / pH	$7,39 \pm 0,08$
Kwasowość / Acidity [$^{\circ}SH$]	$1,27 \pm 0,18$

Objaśnienia / Explanatory notes:

\bar{x} – wartość średnia / mean value; SE – błąd standardowy / standard error; n = 3.

Zawartość poszczególnych składników suchej masy mleka oślego była zgodna z wartościami, które podają Guo i wsp. [9]. Różnią się one jednak od uzyskanych przez innych autorów. Mleko ośle, które analizowali Salimei i Fantuz [23] charakteryzowało się mniejszą zawartością laktozy, a większą ilością białka i tłuszczu. Podobnie podają Chiavari i wsp. [1]. Różnice te mogą wynikać ze specyfiki regionu, w którym chowane były zwierzęta, rasy, a także z odmiennego sposobu żywienia oraz fazy laktacji. Oznaczone średnie wartości kwasowości czynnej (pH = 7,39) i miareczkowej ($1,27 \pm 0,18$ °SH) porównano z danymi literaturowymi. Salimei i wsp. [23] oznaczyli pH mleka oślego na poziomie 7,18 i kwasowość – 2,72 °SH. Wysokie pH i niska kwasowość miareczkowa mleka surowego tego gatunku zwierząt mogą wynikać z małej zawartości frakcji kazeiny, a tym samym z ilości grup fosforanowych [28].

Jakość mikrobiologiczną mleka oślego przedstawiono na rys. 1. Ogólna liczba drobnoustrojów w mleku wynosiła $5,6 \times 10^2$ jtk/ml. Za niską liczbę drobnoustrojów mógł odpowiadać obecny w mleku oślim lizozym, który charakteryzuje się właściwościami bakteriobójczymi i bakteriostatycznymi. Wielu autorów prowadzących badania dotyczące mleka oślego zwraca uwagę na inhibicyjne właściwości lizozymu [2, 23, 24, 32]. Zhang i wsp. [32] potwierdzają, że duża zawartość tego enzymu w mleku oślim ogranicza rozwój wielu patogenów, w tym *Salmonella choleraesuis* czy *Shigella dysenteriae*. Duże odchylenie standardowe dotyczące liczby drożdży w surowcu świadczy o zróżnicowanej jakości surowca, jak i o małej wrażliwości drożdży na lizozym.



Objaśnienia / Explanatory notes:

Na rysunku przedstawiono wartości średnie (w postaci słupków) i błędy standardowe (w postaci odcinków) / Figure shows mean values (bars) and standard errors (line segments); n = 3.

Rys. 1. Jakość mikrobiologiczna surowego mleka oślego

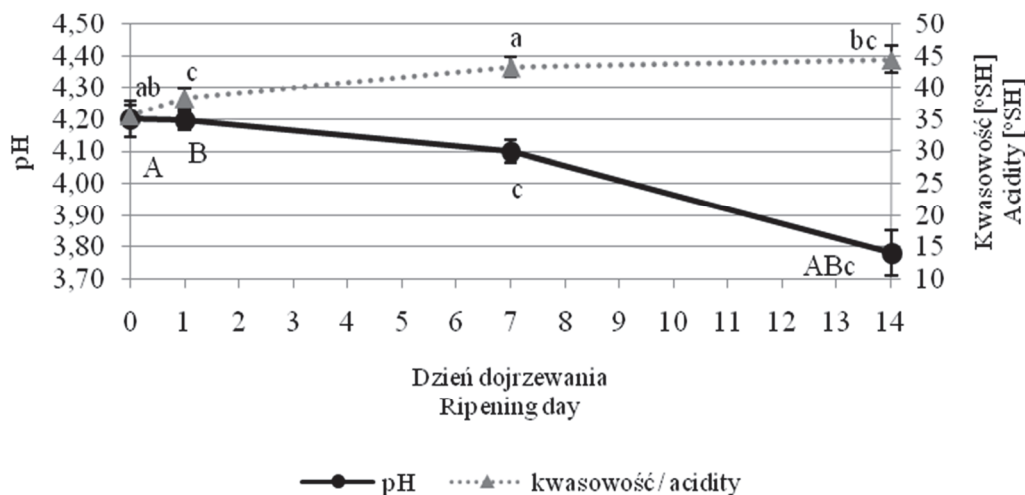
Fig. 1. Microbiological quality of raw donkey's milk

Cechy fizykochemiczne i mikrobiologiczne kumysu

Na rys. 2. przedstawiono wartości pH i kwasowość miareczkową kumysu z mleka oślego oznaczone po ukończeniu procesu ukwaszania, czyli po osiągnięciu pH < 4,6 oraz podczas dojrzewania w temp. 10 °C.

Mleko ośle zaszczerpione kulturą kumysową uzyskało wymagane pH dopiero po 72 h fermentacji (początek dojrzewania – dzień 0). W mleku tym obserwowano znacznie dłużej trwającą lag fazę niż w mleku krowim. Danków i wsp. [4] w badaniach nad kumysem z mleka kobyłego zauważyli również, że produkt ten wymaga dłuższego czasu fermentacji w porównaniu z fermentowanym modyfikowanym mlekiem krowim. Różnice te mogą wynikać z nieporównywalnie większej zawartości lizozymu w mleku kłaczy i oślic, jak również z dużych różnic pod względem zawartości i struktury białek w tych surowcach. Podczas dojrzewania kumysu z mleka oślego następowało stopniowe obniżanie pH produktu i statystycznie istotny ($p \leq 0,05$) wzrost kwasowości na skutek aktywnie rozwijającej się mikroflory kumysu. W wyniku działania mikroflory obecnej w szczepionce kumysowej (*Lb. acidophilus*, *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Kluyveromyces marxianus*) laktoza została częściowo przefermentowana do kwasu mlekowego, na co wskazuje wzrastająca kwasowość produktu podczas dojrzewania.

Bakterie fermentacji mlekowej prowadzą hydrolizę laktozy do glukozy i galaktozy. Następnie wskutek homofermentacji powstała glukoza jest przekształcana do kwasu mlekowego zgodnie ze szlakiem EMP (Embdena-Meyerhofa-Parnasa), tak samo jak powstała galaktoza po przekształceniu w formę ufosforylowanej glukozy – w szlaku Leloir'a. Mikroflora zawarta w kulturze kumysowej jest zdolna do produkcji maksymalnie 1,5 % kwasu mlekowego, podczas gdy gatunki termofilne, takie jak *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* – nawet do 3 % [14]. Badania dotyczące zdolności ukwaszających bakterii mlekowych prowadzone są do maksymalnego poziomu tego metabolitu, natomiast w produkcji mleka fermentowanego – do poziomu akceptowalnego do spożycia, stąd wyniki niniejszych badań są niższe i wynoszą w przeliczeniu na kwas mlekowy około 1 %.



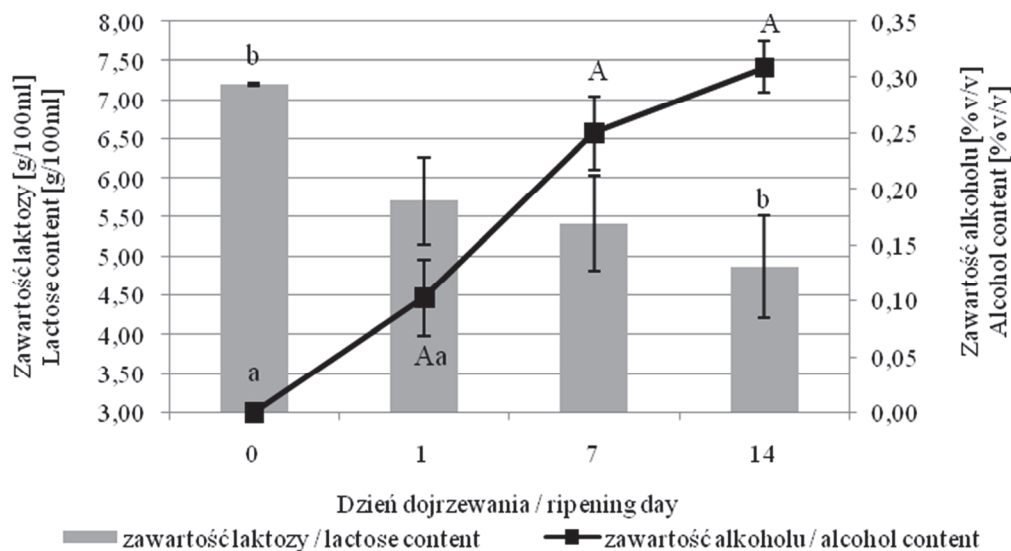
Objaśnienia / Explanatory notes:

A, B, C – wartości średnie oznaczone takimi samymi literami, w obrębie jednego parametru, różnią się statystycznie istotnie na poziomie $p \leq 0,01$ / mean values within one parameter and denoted by the same letters differ statistically significantly at $p \leq 0.01$;

a, b, c – wartości średnie oznaczone takimi samymi literami, w obrębie jednego parametru, różnią się statystycznie istotnie na poziomie $p \leq 0,05$ / mean values within one parameter and denoted by the same letters differ statistically significantly at $p \leq 0.05$;

Rys. 2. Kwasowość czynna (pH) i miareczkowa kumysu przed dojrzewaniem oraz w 1., 7. i 14. dniu dojrzewania w temp. 10 °C

Fig. 2. Active acidity and pH of koumiss prior to ripening and on the 1st, 7th, and 14th day of ripening at 10 °C



Objaśnienia / Explanatory notes:

Na rysunku przedstawiono wartości średnie (w postaci słupków) i odchylenia standardowe (w postaci odcinków) / Figure shows mean values (bars) and standard deviations (line segments); $n = 3$.

A – wartości średnie oznaczone taką samą literą, w obrębie jednego parametru, różnią się statystycznie istotnie na poziomie $p \leq 0,01$ / mean values within one parameter and denoted by the same letter differ statistically significantly at $p \leq 0.01$;

a, b, – wartości średnie oznaczone takimi samymi literami, w obrębie jednego parametru, różnią się statystycznie istotnie na poziomie $p \leq 0,05$ / mean values within one parameter and denoted by the same letter differ statistically significantly at $p \leq 0.05$.

Rys. 3. Zawartość laktozy i alkoholu etylowego w kumysie przed dojrzewaniem i w 1., 7. i 14. dniu dojrzewania w temp. 10 °C

Fig. 3. Contents of lactose and ethyl alcohol in koumiss prior to ripening and on the 1st, 7th, and 14th day of ripening at 10 °C

Kúčúkcetin i wsp. [12], w badaniach nad upodobnieniem mleka krowiego do mleka kobyłego i produkcji kumysu z tak przygotowanego surowca, wykazali wpływ aktywności drożdży i pałeczek mlekowych na zawartość laktozy w mleku. Wymienieni autorzy stwierdzili zmniejszenie stężenia laktozy w mleku kobyłym z 6,7 do 4,98 % podczas 15 dni przechowywania kumysu w temp. 4 °C. Wyniki uzyskane w badaniach własnych również potwierdziły wysoką aktywność bakterii obecnych w kumysie. Na skutek metabolizmu drobnoustrojów podczas 14 dni dojrzewania ponad 30 % laktozy zostało przefermentowane, czyli o ponad 5 % więcej niż w cytowanych badaniach, co może wynikać z wyższej temperatury dojrzewania (rys. 3).

Obecność alkoholu etylowego w kumysie związana jest z działaniem drożdży, które w warunkach względnie beztlenowych i w sprzyjającej temperaturze zdolne są

do wytwarzania tego związku. Zgodnie ze standardem Codex Alimentarius FAO/WHO [29] kumys powinien zawierać minimum 0,5 % (v/m) etanolu. Wyprodukowany w badaniach własnych napój charakteryzował się mniejszym stężeniem tego związku (rys. 3). Podobną tendencję można zauważyć w badaniach Kűcűkćetina i wsp. [12], w których pomimo 15 dni przechowywania kumysu z mleka kobyłego również nie stwierdzono rekomendowanej zawartości tego alkoholu. Jego obecność w kumysie jest wynikiem beztlenowej fermentacji prowadzonej przez drożdże. W aspekcie fermentacji alkoholowej drożdże dzielą się na bezwzględne tlenowce, do których należą drożdże niezdolne do fermentacji alkoholowej oraz względne tlenowce, zdolne do tej fermentacji. W grupie tej występują drożdże Crabtree-dodatnie, np. niektóre szczepy *Saccharomyces cerevisiae* prowadzące proces fermentacji alkoholowej w warunkach tlenowych przy dużych stężeniach glukozy, ponieważ to stężenie hamuje aktywność enzymów oddechowych i w związku z tym zachodzi fermentacja alkoholowa. Zjawisko to wykorzystywane jest przez Mongołów przy produkcji kumysu z mleka kobyłego poprzez napowietrzanie mieszańcem ukwaszanego w drewnianym naczyniu mleka kobyłego, aby w jak największym stopniu zaszła fermentacja alkoholowa. Drugą grupą drożdży zdolnych do fermentacji alkoholowej są drożdże Crabtree-ujemne o niskiej aktywności fermentacyjnej, które metabolizują sacharydy do etanolu w warunkach ograniczonego dostępu tlenu [11, 31]. W kulturach stosowanych do produkcji kumysu obecne były drożdże z gatunku *Kluyveromyces marxianus* fermentujące laktozę, o małych uzdolnieniach do fermentacji alkoholowej [11]. Przepuszczalnie było to główną przyczyną małej zawartości alkoholu etylowego.

Tabela 2. Liczba drobnoustrojów w kumysie po zaszczepieniu i podczas dojrzewania
Table 2. Count of microorganisms in koumiss after inoculation and during ripening

Dzień dojrzewania Day of ripening	Liczba poszczególnych rodzajów drobnoustrojów [log jtk/ml] Count of individual microbes [log cfu/ml]		
	drożdże yeast	<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	<i>L. acidophilus</i>
0*	5,32 ^{ABC} ± 0,30	5,43 ^{ABC} ± 0,24	5,70 ^{ABC} ± 0,33
1.	6,85 ^A ± 0,18	7,02 ^A ± 0,27	6,84 ^{Aa} ± 0,17
7.	6,92 ^B ± 0,14	6,95 ^B ± 0,06	6,93 ^B ± 0,42
14.	7,05 ^C ± 0,11	7,36 ^C ± 0,12	7,64 ^{Ca} ± 0,04

Objaśnienia / Explanatory notes:

W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / Table shows mean values and standard deviations; n = 3; 0* – po zaszczepieniu / after inoculation

A, B, C – wartości średnie oznaczone takimi samymi literami w kolumnie różnią się statystycznie istotnie na poziomie $p \leq 0,01$ / mean values in column and denoted by the same letters differ statistically significantly at $p \leq 0.01$;

a – wartości średnie oznaczone taką samą literą w kolumnie różnią się statystycznie istotnie na poziomie $p \leq 0,05$ / mean values in column and denoted by this letter differ statistically significantly at $p \leq 0.05$.

Charakterystykę mikrobiologiczną kumysu z mleka oślego podczas dojrzewania przedstawiono w tab. 2. Wyniki analizy statystycznej wskazują, że pod względem populacji mikroflory kumysowej, do której w głównej mierze należą drożdże oraz bakterie fermentacji mlekowej, w mleku oślim pomimo obecności lizozymu nie stwierdzono negatywnego wpływu tego surowca na rozwój drobnoustrojów. Wprawdzie czas fermentacji był znacznie dłuższy niż w mleku krowim (dane niepublikowane), ale po przystosowaniu się do środowiska wszystkie drobnoustroje osiągnęły liczbę powyżej 10^6 jtk/ml już w pierwszym dniu po fermentacji, co zgodnie z Codex Alimentarius [29] świadczy o prawidłowej jakości mikrobiologicznej. Standard ten określa zawartość drożdży w produkcji na minimum 10^4 jtk/ml, co również stwierdzono w badaniach własnych.

Obecność drożdży w kumysie warunkuje odpowiednie walory sensoryczne oraz jakość fizykochemiczną tego produktu. Ponadto wpływa na odpowiednie pH poprzez katabolizm kwasów organicznych oraz przekształcanie ich w wyniku procesów metabolicznych do tlenku węgla(IV) [16]. Dodatkowo w wyniku metabolizmu i fermentacji laktozy drożdże zdolne są przekształcać ten disacharyd do etanolu, którego obecność poprzez tworzenie z kwasami organicznymi estrów kształtuje profil smakowy kumysu. W doświadczeniu użyto drożdży z gatunku *K. marxianus*.

Oprócz drożdży, do produkcji kumysu zastosowano bakterie z gatunku *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. Gatunek ten jest charakterystyczny dla mikroflory jogurtowej, jednak jego obecność stwierdzono również w kumysie [14, 31]. Podczas procesu fermentacji szczep ten jest odpowiedzialny za obniżanie pH i wzrost kwasowości w produkcie [7]. Podczas 14 dni dojrzewania liczba tych bakterii wzrosła o prawie 2 cykle logarytmiczne. Ze względu na swoją wysoką tolerancję na alkohol etylowy w środowisku bakterie te są zdolne do namnażania się w produktach zawierających ten związek. Powyższa zależność została stwierdzona w badaniach Mena i Aryana [15], które dotyczyły wpływu etanolu na bakterie z gatunku *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* oraz *Streptococcus thermophilus*.

Drugim gatunkiem z rodzaju *Lactobacillus* zastosowanym w doświadczalnej produkcji kumysu był *Lb. acidophilus*. Według badań, które prowadzili Gandhi i Shah [8], gatunek ten należy do grupy bakterii probiotycznych i wykazuje zmienny charakter rozwoju w zależności od pH i stężenia soli w środowisku. Najlepiej rozwija się w środowisku o pH = 6, zakwaszając przy tym środowisko do pH $4,61 \pm 0,11$ podczas 24-godzinnego okresu fermentacji. Wyniki badań cytowanych autorów dowodzą również, że największą aktywnością proteolityczną charakteryzuje się szczep hodowany w środowisku o pH = 4.

Elektroforetyczny rozdział białek mleka i kumysu

Przemiany proteolityczne będące wynikiem działania aktywnej mikroflory zawartej w mlecznych napojach fermentowanych mają kluczowe znaczenie w tworzeniu charakteru tych napojów. Stopień proteolizy zależy od rodzaju mikroflory i stężenia wolnych związków azotowych w mleku. Elektroforeza żelowa jest jedną z powszechnie stosowanych metod jakościowych, pozwalających scharakteryzować frakcje białkowe w różnych produktach. Nie jest wprawdzie metodą ilościową, ale ma zastosowanie do pełniejszej charakterystyki białek. Nie tylko obecność poszczególnych frakcji jest istotna, lecz także wzajemne proporcje między nimi, które można obliczyć dzięki analizie uzyskanych densytogramów (tab. 3). Na skutek proteolitycznego rozkładu białek frakcje kazeiny oraz białek serwatkowych zostają zhydrolizowane i wykorzystane w metabolizmie bakterii i drożdży.

Tabela 3. Udział frakcji białkowych w mleku krowim, oślim i w kumysie z mleka oślego podczas dojrzewania

Table 3. Percentage content of protein fractions in cow's milk, donkey's milk, and in koumiss from donkey's milk during ripening

Frakcja białkowa Protein fraction [%]	Produkt / Product				
	Mleko krowie Cow's milk	Mleko ośle Donkey's milk	Kumys ośli w 1. dniu dojrzewania Donkey's koumiss on the 1 st day of ripen- ing	Kumys ośli w 7. dniu dojrzewania Donkey's koumiss on the 7 th day of ripen- ing	Kumys ośli w 14. dniu dojrzewania Donkey's koumiss on the 14 th day of ripening
Immunoglobuliny Immunoglobulins	0,80 ^{DE} ± 0,00	1,49 ^{ABCD} ± 0,11	0,77 ^{BC} ± 0,06	0,25 ^{BD} ± 0,02	0,25 ^{CE} ± 0,02
Laktoferyna Lactoferrin	2,35 ^{ABCD} ± 0,17	1,29 ^{BE} ± 0,09	1,70 ^A ± 0,12	1,55 ^{Ca} ± 0,11	2,08 ^{DaE} ± 0,15
Albumina serum Serum albumin	1,39 ^A ± 0,10	1,07 ^A ± 0,08	–	–	–
Kazeiny (bez κ) Caseins (without κ)	54,22 ^{ABC} ± 4,01	37,61 ^{ADE} ± 0,45	15,27 ^{Aa} ± 1,13	16,19 ^{BDb} ± 1,20	7,60 ^{CEab} ± 0,56
κ-kazeina κ-casein	15,95 [?] ± 0,14	–	–	–	–
β-laktoglobuliny β-laktoglobulin	19,06 ^{ABC} ± 1,36	24,32 ^a ± 1,74	30,30 ^A ± 2,17	29,07 ^B ± 2,08	32,55 ^{Ca} ± 2,33
Lizozym Lysozyme	–	16,94 ^{ABa} ± 1,25	23,88 ^A ± 1,76	23,96 ^a ± 1,77	26,16 ^B ± 1,93
α-laktoalbumina α-lactoalbumin	5,71 ^{ABC} ± 0,41	17,76 ^{ABC} ± 1,27	28,40 ^A ± 2,03	29,28 ^B ± 2,09	30,88 ^C ± 1,42

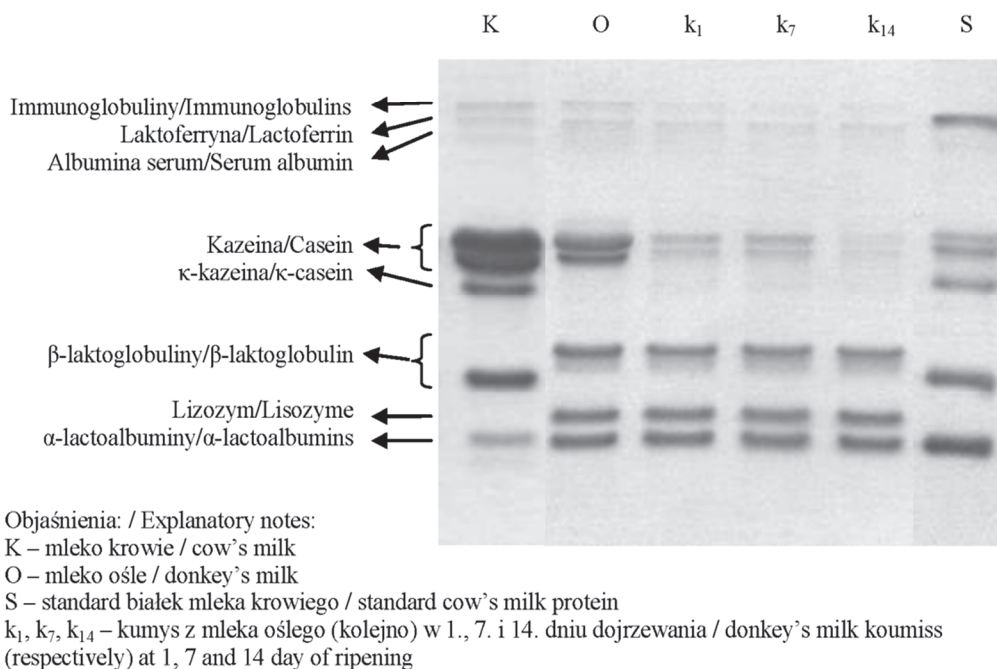
Objaśnienia: / Explanatory notes:

W tabeli przedstawiono wartości średnie \pm błędy standardowe / Table shows mean values and standard errors ; $n = 3$

A, B, C, D, E – wartości średnie oznaczone takimi samymi literami w wierszach różnią się statystycznie istotnie na poziomie $p \leq 0,01$ / mean values in rows and denoted by the same letters differ statistically significantly at $p \leq 0.01$;

a, b – wartości średnie oznaczone takimi samymi literami w wierszach różnią się statystycznie istotnie na poziomie $p \leq 0,05$ / mean values in rows and denoted by the same letters differ statistically significantly at $p \leq 0.05$.

Na rys. 4. przedstawiono elektroforetyczny rozdział białek mleka oślego i kumysu w 1., 7. i 14. dniu dojrzewania. Na podstawie użytych standardów białek mleka określono masy cząsteczkowe poszczególnych białek, a ich charakterystykę opracowano na podstawie metody Cunsolo i wsp. [3] oraz Fantuz i wsp. [5].



Rys. 4. Elektroforetyczny rozdział białek mleka krowiego i oślego oraz kumysu w 1., 7. i 14. dniu dojrzewania

Fig. 4. Electropherogram of cow's and donkey's milk and koumiss on the 1st, 7th, and 14th day of ripening

Obecność frakcji lizozymu w profilu białek mleka oślego jest charakterystyczną cechą tego gatunku mleka, stwierdzoną również przez wielu autorów w badaniach elektroforetycznych [3, 5, 28]. Dzięki stosunkowo dużej zawartości tego enzymu mle-

ko to jest zabezpieczone przed rozwojem szkodliwej mikroflory. Badania Tidona i wsp. [27] potwierdzają znaczące właściwości inhibicyjne tego enzymu w stosunku do bakterii z rodzaju *Listeria*, natomiast analizy mleka oślego wskazują na jego właściwości bakteriostatyczne w stosunku do *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* i *Escherichia coli* [17]. Salimei i wsp. [23] podają, że lizozym stanowi około 21 % wszystkich białek mleka oślego, a zawartość lizozymu zależy od okresu laktacji. W badaniach własnych stwierdzono, że zawartość tej frakcji w mleku wynosiła około 17 %.

Na podstawie obrazu rozdziału elektroforetycznego białek (rys. 4) można zauważyć zmniejszający się udział frakcji kazeinowych (około 33 ÷ 35 kDa) podczas dojrzewania kumysu z mleka oślego. W surowym mleku oślim stwierdzono obecność białek o masach odpowiadających immunoglobulinom, laktoferynie i albuminie serum w ilościach odpowiednio: 1,49, 1,29 oraz 1,07 %. Zawartość frakcji kazeinowych wynosiła około 38 %, a białek serwatkowych – 62 %, co zasadniczo różni proporcje tych białek od mleka przeżuwaczy. Zawartość β -laktoglobuliny i α -laktoalbuminy wynosiła odpowiednio: 24,32 i 17,76 %. Białka o masach cząsteczkowych charakterystycznych dla białek serwatkowych (β -laktoglobulina, lizozym i α -laktoalbumina) występowały w próbkach kumysu w zbliżonych ilościach, niezależnie od długości okresu dojrzewania, a ich udział w stosunku do wszystkich białek zwiększał się. Na tej podstawie można stwierdzić, że bardzo cenny pod względem swoich właściwości lizozym nie uległ rozkładowi podczas procesu fermentacji. Zjawisko to zostało zaobserwowane również w innych badaniach, w których poddanie hydrolizie enzymatycznej (pepsyną) i chemicznej (kwasem solnym) mleka oślego również nie wpłynęło negatywnie na stężenie lizozymu [17].

Wnioski

1. Ze względu na unikatowy charakter białek, dużą zawartość laktozy i obecność lizozymu mleko ośle stanowi dobry surowiec do produkcji napojów fermentowanych o cechach funkcjonalnych.
2. Mała zawartość alkoholu etylowego w kumysie z mleka oślego mogła wynikać ze słabych właściwości drożdży *Kluyveromyces marxianus* do fermentacji alkoholowej.
3. Obecne w kumysie mikroorganizmy świadczyły o dobrej jakości mikrobiologicznej napoju.
4. Białka mleka oślego ulegają znacznej hydrolizie podczas fermentacji i dojrzewania.

Badania zrealizowano i sfinansowano z dotacji przyznanej przez MNiSW na działalność statutową – DS/3700/WTŻ w latach 2014 - 2015.

Literatura

- [1] Chiavari C., Coloretti F., Nanni M., Sorrentino E., Grazia L.: Use of donkey's milk for a fermented beverage with lactobacilli. *EDP Sci.*, 2005, **85**, 481-490.
- [2] Coppola R., Salimei E., Succi M., Sorrentino E., Nanni M., Ranieri P., Belli Blanes R., Grazia L.: Behaviour of *Lactobacillus rhamnosus* strains in ass's milk. *Ann. Microbiol.*, 2002, **52**, 55-60.
- [3] Cunsolo V., Muccilli V., Fasoli E., Saletti R., Righetti P.G., Foti S.: Poppea's bath liquor: The secret proteome of she-donkey's milk. *J. Proteomics*, 2011, **74**, 2083-2099.
- [4] Danków R., Pikul J., Teichert J., Osten-Sacken N.: Charakterystyka i właściwości kumysu. *Nauka Przyr. Technol.*, 2013, **7(3)**, #35.
- [5] Fantuz F., Vincenzetti S., Polidori P., Vita A., Polidori F., Salimei E.: Study on the protein fractions of donkey milk. *Proc. XIV Congr. Ital. Soc. Anim. Prod. (ASPA)*, Firenze 2001, pp. 635-637.
- [6] FIL-IDF Standard 149 A:1997. Dairy Starter cultures of lactic acid bacteria (LAB). Standard of identity.
- [7] Gajewska J., Błaszczak M.: Probiotyczne bakterie fermentacji mlekowej (LAB). *Post. Mikrobiol.*, 2012, **51(1)**, 55-65.
- [8] Gandhi A., Shah N.P.: Effect of salt concentration and pH on structural functional properties of *Lactobacillus acidophilus*: FT-IR spectroscopic analysis. *Int. J. Food Microbiol.*, 2014, **173**, 41-47.
- [9] Guo H.Y., Pang K., Zhang X.Y., Zhao L., Chen S.W., Dong M.L., Ren F.Z.: Composition, physicochemical properties, nitrogen fraction distribution, and amino acid profile of donkey milk. *J. Dairy Sci.*, 2007, **90 (4)**, 1635-1643.
- [10] Guzel-Seydim Z., Kok-Tas T., Greene A.: Kefir and Koumiss: Microbiology and Technology. In: *Development and Manufacture of Yogurt*. Eds. F. Yildiz, CRC Press, Boca Raton 2009, pp. 156-159.
- [11] Kręgiel D., Kunicka-Styczyńska A., Czyżowska A.: Drożdże. W: *Mikrobiologia techniczna*. Red. Z. Libudzisz, K. Kowal, Z. Żakowska, Wyd. Nauk. PWN, tom 2, Warszawa 2013, ss. 119-149.
- [12] Kúćúkcetin A., Yaygin H., Hinrichs J., Kulozik U.: Adaptation of bovine milk towards mares' milk composition by means of membrane technology for koumiss manufacture. *Int. Dairy J.*, 2003, **13**, 945-951.
- [13] Laemmli U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, **227 (5259)**, 680-685.
- [14] Libudzisz Z., Bakterie fermentacji mlekowej. W: *Mikrobiologia techniczna*. Red. Z. Libudzisz, K. Kowal, Z. Żakowska, Wyd. Nauk. PWN, tom 2, Warszawa 2013, ss. 25-58.
- [15] Mena B., Aryana K. J.: Influence of ethanol on probiotic and culture bacteria *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* within a therapeutic product. *Open J. Med. Microbiol.*, 2012, **2**, 70-76.
- [16] Mu Z., Yang X., Yuan H.: Detection and identification of wild yeast in Koumiss. *Food Microbiol.*, 2012, **31**, 301-308.
- [17] Nazzaro F., Orlando P., Fratianni F., Coppola R.: Isolation of components with antimicrobial property from the donkey milk: A preliminary study. *Open Food Sci. J.*, 2010, **4**, 43-47.
- [18] PN-ISO 7889:2007. Jogurt. Oznaczanie liczby charakterystycznych drobnoustrojów. Metoda liczenia kolonii w temperaturze 37 °C.
- [19] PN-EN ISO 4833-1:2013-12. Mikrobiologia łańcucha żywnościowego. Horyzontalna metoda oznaczania liczby drobnoustrojów. Część 1: Oznaczanie liczby metodą posiewu zalewowego w temperaturze 30 stopni C
- [20] PN-ISO 6611:2007. Mleko i przetwory mleczne. Oznaczanie liczby jednostek tworzących kolonie drożdży i/lub pleśni. Metoda płytkowa w temperaturze 25 °C.
- [21] PN-ISO 6730:2008. Mleko. Oznaczanie liczby jednostek tworzących kolonie drobnoustrojów psychrotrofowych. Metoda liczenia kolonii w temperaturze 6,5 °C.
- [22] Raimondi S., Zanni E., Amaretti A., Palleschi C., Uccelletti D., Rossi M.: Thermal adaptability of *Kluyveromyces marxianus* in recombinant protein production. *Microb. Cell Fact.*, 2013, **12**, 34.
- [23] Salimei E., Fantuz F., Coppola R., Chiofalo B., Polidori P., Varisco G.: Composition and characteristics of ass's milk. *Anim. Res.*, *EDP Sci.*, 2004, **53**, 67-78.

- [24] Sarno E., Santoro A., Di Palo R., Costanzo N.: Microbiological quality of raw donkey milk from Campania Region. Ital. J. Animal Sci., 2012, **11** (49), 266-269.
- [25] Shah N.P.: Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods. J. Dairy Sci., 2000, **83** (4), 900-905.
- [26] Tamime A.Y., Muir D.D., Wszolek M.: Kefir, Koumiss and Kishk. Dairy Ind. Int., 1991, **64** (5), 32-33.
- [27] Tidona F., Sekse C., Criscione A., Jacobsen M., Bordonaro S., Marletta D., Vegarud G.: Antimicrobial effect of donkeys' milk digested *in vitro* with human gastrointestinal enzymes. Int. Dairy J., 2011, **21**, 158-165.
- [28] Vincenzetti S., Polidori P., Mariani P., Cammertoni N., Fantuz F., Vita A.: Donkey's milk protein fraction characterisation. Food Chem., 2008, **106**, 640-649.
- [29] WHO/FAO: Codex standard for fermented milks, FAO&WHO, Rome 2011.
- [30] Wszolek M., Filipczak-Fiutak M., Domagała J.: Skład i właściwości mleka oślego. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2014, **1** (92), 29-40.
- [31] Wszolek M., Kupiec-Teahan B., Skov Guldager H., Tamime A. Y.: Production of kefir, koumiss and other related products. In: Fermented Milks. Eds. Adnan Y. Tamime, Oxford 2006, pp. 174-216.
- [32] Zhang X., Zhao L., Jiang L., Dong M., Ren F.: The antimicrobial activity of donkey milk and its microflora changes during storage. Food Cont., 2008, **19**, 1191-1195.

QUALITY OF KOUMISS MADE FROM DONKEY'S MILK

S u m m a r y

The objective of the research study was to produce and assess the quality of koumiss made from donkey's milk. Prior to the production, the basic composition of raw material was determined, i.e. the content of protein, fat, and lactose; also, the pH value and titratable acidity of milk were measured, and the total count of microbes was determined as were the counts of psychrotrophs and yeasts in raw milk. As for the koumiss, its pH value was measured, the acidity as well as the content of lactose and alcohol therein were determined. Also, the counts of *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lb. acidophilus*, and of yeast during the ripening of koumiss were assayed. An electrophoretic separation was performed of proteins in the raw material and in the koumiss to assess the proteolysis of milk proteins during the fermentation and ripening.

The donkey's milk was characterized by the following percent levels: the content of proteins: 1.29 %; the content of fat: 0.17 %; and the content of lactose: 7.20 %. The total count of microbes in raw milk was 5.6×10^2 CFU/ml. The results of the analysis confirmed the high quality of the koumiss analyzed. During the fermentation and ripening, 30% of lactose was fermented by the microflora used in the process. On the 14th day of ripening, the count of *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* was 2.29×10^7 CFU/ml, the count of *Lb. acidophilus*: 4.37×10^7 CFU/ml, and that of yeast: 1.12×10^7 CFU/ml. The content of ethanol in the product did not reach the content level as recommended by the Codex Alimentarius (not less than 0.5 %). The koumiss analyzed was characterized by a high microbiological quality. Based on the results of electrophoresis it was possible to estimate the content of lysozyme in the donkey's milk and the changes in the fractions of casein during ripening. A decrease was found in the content of casein proteins in the total proteins contained in the koumiss. A low content of ethanol in the studied koumiss from donkey's milk could be contributed to the fact that only one species of yeasts was present therein. Based on the results of the research, it was concluded that donkey's milk can be a good raw material to produce fermented beverages with functional features.

Key words: koumiss, donkey's milk, quality, SDS-PAGE electrophoresis 