Badania nad kefirami warszawskimi

(Récherches sur les kéfirs varsoviens)

napisała
E. KORNBLUM.
(wpłynęło 6. VII. 1932)

WSTĘP.

Celem mojej pracy było zbadanie mikroflory kefirów wyrabianych w Warszawie, a w szczególności stwierdzenie o ile skład mikroorganizmów kefirowych różni się od podawanego w literaturze.

Kefir jest to napój sporządzony z mleka — napój narodowy górali kaukaskich. Rozpowszechnił się w Europie dzięki swym wybitnym własnościom odżywczym, djetetycznym i leczniczym. Jako środek odżywczy i lekko strawny bywa zalecany przy wyczerpaniu organizmu i chorobach płuc (analogicznie do kumysu), zaś jako środek djetetyczno-leczniczy przy niedomaganiach żołądkowych. Nowsze badania jednak wykazały, że w tym ostatnim wypadku działanie kefiru jest bardziej indywidualne, niż to przypuszczano dotychczas. (H e n n e b e r g) (8)

Sporządza się kefir z tak zwanych „ziarn“ lub „grzybków“ kefirowych, które są wynikiem symbiozy mikroorganizmów czynnych w procesie powstawania kefiru.

Powstawanie to polega na dwóch obok siebie przebiegających procesach:

1) fermentacji mlecznej czyli zamianie cukru mlekowego na kwas mlekowy według równania:

2) fermentacji alkoholowej czyli zamianie tegoż cukru na alkohol etylowy i dwutlenek węgla według równania:

Kwestja, czy zachodzi również peptonizacja kazeiny jest sporna. Według Biel'a (4) zachodzi, zaś według Hammarstena (7). nie. Kwestja ta będzie jeszcze poruszona niżej.

STRESZCZENIE DOTYCHCZASOWYCH BADAŃ.

Pierwsze badania nad kefirem prowadził Kern (11).

Wnioski jego dadzą się streścić jak następuje:

1) „Ziarna“ kefirowe, które czerpał wprost ze źródła, czyli od plemion tubylczych Kaukazu, stanowią ciekawy przykład symbiozy drożdży i bakteryj.

2) Drożdże występujące w ziarnach stanowią normalne drożdże piwne.

3) Bakterje w stadium wegetatywnem przypominają bardzo *Bacillus subtilis*, kształtem i sposobem układania się w równoległe łańcuszki.

4) Kern (11) nazwał te pałeczki *Dispora caucasica* ze względu na to, że zauważył na końcach pałeczek po dwa punkty, silnie łamiące światło, które uważał za spory.

Pogląd ten jednak był błędny, jak to wykazały spostrzeżenia innych badaczy.

5) Młode komórki *Dispora caucasica* są ruchliwe i urzęsione monotrichialnie.

6) Komórki *Dispora caucasica*, zwłaszcza zawarte w ziarnach czyli w symbiozie z drożdżami, są b. odporne na warunki zewnętrzne. Kern (11) używał tylko pożywek płynnych, nie otrzymał też czystych kultur i nie udało mu się otrzymać z nich kefiru.

Następny badacz K r a n h a l s (12) (1884) interesuje się metodami przyrządzania i znaczeniem terapeutycznym kefiru.

Przy badaniach bakterjologicznych stosował pożywkę płynną Kerna (11) 2% extr. Liebiga z dodatkiem 4—5% cukru mlekowego i pożywkę mineralną o następującym składzie:

MgSO ₄	5 cz.
KH ₂ PO ₄	5 cz.
NaCL	0.5 cz.
(C ₄ H ₅ O ₆)NH ₄	9 cz.
Laktozy	44,5 cz.
H ₂ O dest.	1000 cz.

Używał również pożywek stałych, żelatynowych, a do obserwacji i rozwoju stosował komory wilgotne.

Według badań K r a n h a l s a (12) mikroflora kefiru przedstawia się jak następuje:

Rozróżnia aż 10 różnych form w preparacie z ziarn pod mikroskopem.

1) Pałeczki walcowate dł. 3,5 — 8 μ , 0,8 μ , śr. ze zgrubieniami na końcach, które identyfikuje z *Dispora caucasica* K e r n (11), a oprócz nich pałeczki z prostopadle obciętemi końcami, pałeczki spłaszczone, łańcuszki pałeczek sporowych i długie nici, których końce odcinają się w postaci tworów kulistych. Obserwował pałeczki ruchliwe, spory i ich kiełkowanie.

Drożdże wyizolowane przez K r a n h a l s'a (12) były: 1) okrągłe o śr. 3,2 — 6,4 i 2) owalne o dł. 3 — 9 i śr. 3 — 6,5 μ .

Występują pojedynczo lub jako formy pączkujące. Spor nie wytwarzały. Obserwował również *Oidium lactis* i uważał je za zanieczyszczenie. Nie mówi nic o zachowaniu się poszczególnych organizmów w czystych kulturach.

Nie próbował sporządzać z nich kefiru, ani też sztucznych ziarn kefirowych. Podaje porównawczą analizę chemiczną mleka świeżego i kefiru.

w 1000 cm ³	Mleka	Kefiru
Białko	48	38,000
Tłuszcz	38	20,000
Laktoza	41	20,05
Kw mlekowy	—	9,000
Alkohol	—	8,000
Woda i sole	73,0.	904,975

Z danych tych wynikałoby, że tłuszcz i białko również ulegają przemianie. K r a n h a l s stwierdził coprawda w kefirze ślady kwasu masłowego, ale ślady te nie odpowiadałyby tak dużej ilości brakującego tłuszczu.

Wyczerpujące badania nad kefirem prowadził B e i j e r i n c k (3). Obserwował przekroje ziarn kefirowych (które czerpał z oddziału farmaceutycznego Tow. pld.-wschodniego w Kijowie). Wyróżniał w nich grupy pałeczek i drożdży ułożone warstwami.

Drożdże wyizolował z łatwością na żelatynie z mlekiem. Kolonie ich były bezbarwne, b. podobne do kolonii *Saccharomyces cerevisiae* z tą różnicą, że miały brzeg wcinany i były od tam-

tych mniejsze. Komórki były owalne, mniejsze od drożdży piwnych 3—6 μ dł., gdy piwne 5—10 μ . Nigdy nie obserwowano spor.

Pod względem fizjologicznym charakteryzowały się zdolnością fermentacji cukru mlekowego, który przedtem hydrolizują za pomocą wydzielanej laktazy.

Zdolność tę stwierdził metodą biologiczną za pomocą bakterij świetlnych, które nie świecą w obecności laktozy jako jedyne go źródła węgla, a zaczynają świecić po dodaniu drożdży kefirowych. Drożdże bardzo powoli rozrzedzają żelatynę, lecz nie peptonizują kazeiny. B e i j e r i n c k (3) nazwał je *Saccharomyces Kefir*. Wyizolował on też drugi gatunek drożdży *Saccharomyces thyrocola* o b. małych okrągłych komórkach, które występują również w sere edamskim.

Duże trudności nastęrczała izolacja pałeczek. Używał pożywek żelatynowych i agarowych na serwatce obojętnej lub słabo kwaśnej. Szczepił skraweczkami ziarn kefirowych. Kolonie pałeczek, które nazwał *Lactobacillus caucasicus* wyrastały b. późno, najwcześniej po 3-ch tygodniach i były bardzo drobne. W temperaturze wyższej 40° C. rosły nieco lepiej. Nigdy nie obserwował ruchu ani spor.

Wysiłki B e i j e r i n c k a (3) w celu otrzymania syntetycznych ziarn kefirowych nie dały pozytywnego wyniku, udało się jednak otrzymać pewne zlepki z drożdży i pałeczek. Próbuje on tłumaczyć symbiozę drożdży z pałeczkami kw. mlekowego tem, że ten kwas jest środowiskiem dogodnem dla rozwoju drożdży, zaś te ostatnie miałyby bakterjom dostarczać związków azotowych (peptonów). Próbował też wytwarzać kefir z czystych kultur. Jeżeli stosował same drożdże, otrzymywał silną fermentację alkoholową, ciecz nie była kwaśna, lecz silnie musująca. Z samych pałeczek otrzymywał mleko kwaśne (nie zaznacza czy ścięte), lecz z min. zawartością CO₂. Szczepiąc bakterje i drożdże otrzymywał dobry kefir.

A d a m e t z (2) wyizolował tylko zwykłe ruchliwe bakterje oraz 3 gatunki drożdży, nie rozkładających cukru mlekowego.

E s s a u ł o w (5) wyizolował z ziarn kefirowych *Bac. subtilis*, *Bac. acidi lactici* oraz *Saccharomyces*. *Bac. subtilis* odgrywa wg. niego rolę tylko przy wytwarzaniu ziarn, a pozostałe dwa mikroorganizmy wywołują proces powstawania kefiru.

Bardzo szczegółowe badania nad ziarnami kefirowymi oraz kefirem gotowym przeprowadził F r e u d e n r e i c h (6). Ob-

serwował ziarna kefirowe w kropli wiszącej i w preparatach barwionych. Widział pod mikroskopem długie zakrzywione pałeczki, krótkie pałeczki, kokki oraz komórki drożdżowe. Długie pałeczki, które w starych kulturach barwią się tylko na końcach (czemu przypominają obrazy widziane przez Kerna (11), nazwał *Bacillus caucasicus*. Do izolacji używał ziarn kefirowych, i gdy to nie dawało wyniku, bo rozwijały się głównie zanieczyszczające bakterie sporowe — gotowego kefiru.

Preparaty barwione z kefiru sporządzał po uprzednim utrwaleniu w ogniu i odtłuszczeniu chloroformem. Obserwował w nich pałeczki, kokki i drożdże. Kokki i drożdże dawały się izolować bardzo łatwo, natomiast hodowla *Bac. caucasicus* była b. mozolna, gdyż otrzymywał stale kultury mieszane, a następnie izolował stopniowo zapomocą szalek mazanych.

Drożdże wydzielone przez Freudenreicha (6) nie fermentowały laktazy. Były owalne dł. 3—5 μ . śr. 2—3 μ . Spor nie obserwował. Brzeczke fermentowały słabiej od innych. Na warunki zewnętrzne były mało odporne. Nazwał je również *Saccharomyces kefir*.

Z pośród wydzielonych przez siebie kokków rozróżnia Freudenreich (6) 2 typy: *Streptococcus a* i *Str. b*.

Streptococcus a rośnie w postaci drobnych kolonii białawych o strukturze ziarnistej. W kulturze kłutej rozwija się lepiej na powierzchni. Barwi się dobrze met. Grama i barwnikami anilinowymi. Posiada wymiary $1,1\frac{1}{4}$ — $1,1\frac{1}{2}$ μ . i ok. 1 μ . śr. Na buljonie tworzy długie łańcuszki. Mleko ścina po 4-ch dniach. Stopień zakwaszenia oznaczał Freudenreich (6) przez miareczkowanie $\frac{1}{4}$ norm NaOH przy użyciu fenolftaleiny jako indykatora.

1	dz.	4,5	cm ³	NaOH	—	0.10125	gr. kw. mlekowego
2	"	6.0	"	"	—	0.1350	" "
3	"	6,5	"	"	—	0.1460	" " "
4	"	8,5	"	"	—	0.1912	" " "
5	"	8,5	"	"	—	0.1912	" " "
6	"	8,5	"	"	—	0.1912	" " "

Badał również, czy wytwarza gaz zap. ap. Schaffera. Ilość gazu badał w eudiometrze (danych nie podaje).

Streptococcus b. daje kolonie mniejsze i bardziej drobnoziarniste i rośnie lepiej w wyższej temperaturze, kom. są również

mniejsze średn. ok. 0.8 dł. 1.0 γ . Barwi się met. Grama i barwn. anilinowemi. Jest bardzo wytrzymały na trucizny i temperaturę.

Mleka nie ścina, choć wytwarza dużo kwasu.

St	zakwaszenia					Wytw. gaz
2	dn. —	4,5	cm ³ .	NaOH —	0,1012 gr.	2 cm ³
3	" —	8,5	"	" —	0.1812 "	3 "
4	" —	10	"	" —	0.2250 "	7,5 "
5	" —	10	"	" —	0.2250 "	8,5 "
6	"					9,5 "
7	"					10,0 "

Wydziela laktazę, gdyż drożdże, które same przez się nie fermentują cukru mlekowego w obecności *Str. b* fermentują bardzo intensywnie. Tem to *Freudenreich* (6) tłumaczy ich symbiozę.

Bacillus caucasicus otrzymał po wielokrotnem oczyszczaniu kultur mieszanych.

Jest to prosta pałeczka (na płynnej pożywce) z zaokrąglonymi końcami, które silnie łamią światło. Nie są to jednak spory, jak przypuszczał *Kern* (11), gdyż barwi się jednolicie cała pałeczka. Jest Gram dodatnia.

Mleka nie ścina, lecz silnie zakwasza, nadając mu specyficzny smak, podobny jak *Streptococcus b. Bac. caucasicus* w przeciwieństwie do tego, co twierdzi *Kern* (11) bardzo słabo znosi wysuszanie.

Oprócz wyżej wspomnianych mikroorganizmów typowych dla kefiru, spotykał *Freudenreich* (6) *Oidium lactis* i *Bac. Schafferi*.

Próbował sporządzać kefir z czystych kultur, wydzielonych przez siebie bakterij.

Na początku twierdzi, że zapomocą *Streptococcus a* lub *b* i drożdży nie otrzymał prawdziwego kefiru, jak również z *Bac. caucasicus* i drożdży. Do wytworzenia kefiru niezbędne są 4 mikroorganizmy, przytem kokki mogą być różne, a pałeczka i drożdże stale te same.

We wnioskach zaś ostatecznych twierdzi, że z drożdży i obydwu streptokoków otrzymał zupełnie dobry kefir, i że wobec tego niezrozumiała jest rola *Bac. caucasicus*.

Do sporządzenia kefiru używa kultur agarowych i buljonowych (z laktozą). Próbuje pocz. po dwóch tygodniach, później po 6 dniach. Nie podaje temperatury sporządzania.

Produkt powstały cechuje jako kwaśne mleko, „niezbyt dobry kefir“ i „dobry kefir“. Ten ostatni otrzymał dopiero po kilkakrotnych przeszczepianiach z butelki do butelki i to nie zawsze.

Po dość długiej przerwie, bo w roku 1907, przystępuje do badań nad kefirem N i k o ł a j e w a (16).

Obserwuje przekroje ziarn kefirowych i stwierdza, że ich część wewnętrzna składa się z pałeczek *Bacterium caucasicum*, a część korowa z drożdży. Analiza kefiru wykazała obecność trzech form 1) *Bacterium caucasicum* — cienkie długie pałeczki o średnicy 0,4 — 0,5 μ , nieruchliwe, wytrwarzające duże ilości kw. mlekowego. Gazu nie wytwarzały. Na żelatynie z buljonem i peptonem nie rosły prawie wcale, lepiej na żelatynie z cukrem, a najlepiej na pożywkach z serwatka.

2) Drożdże, których N i k o ł a j e w a (16) wyróżniła 2 gatunki były 1) mniej więcej okrągłe 3 — 4 μ średnicy, dobrze rosnące na wszystkich podłożach, na kartoflu ciemno-różowo. Fermentują glikozę, sacharozę i laktozę. Spor nie wytwarzają i dlatego nazwała je N i k o ł a j e w a (16) *Torula Kefir*. 2) *Torula ellipsoidea* różni się od poprzednich kształtem owalnym, brakiem zdolności fermentacji cukru mlekowego. Mają one długość 6 — 9 μ i średnicę 2 — 4,5 μ .

3) *Bacterium Güntheri* lub formy pokrewne.

Są to krótkie pałeczki na końcach zaostrome, występujące parami. Mają wymiary 1,4 μ dł. i 0,7 μ sz. Gazu nie wytwarzają, mleka nie ścinają, chociaż wytwarzają dużo kwasu. (Zgodnie z danymi F r e u d e n r e i c h a co do *Strept. b*). Przy wytwarzaniu kefiru nie odgrywają istotnej roli.

Z czystych kultur wyżej podanych mikroorganizmów udało się autorce przyrządzić dobry kefir.

Niezbędnymi czynnikami przy tworzeniu kefiru są *Bacterium caucasicum* i *Torula Kefir*.

Od czasu badań N i k o ł a j e w e j następuje długa przerwa w badaniach nad kefirem. W 1925 roku H e n n e b e r g (8) w części szczegółowej swego podręcznika bakterjologii fermentacyjnej podaje streszczenie własnych badań nad kefirem. Ziarna kefirowe, które nazywa Kefirknollen, czerpał z mleczarni miejskiej (nie podaje jakiego miasta) oraz różnych zakładów kefirowych. Jako stałe składniki mikroflory kefiru podaje:

- 1) Drożdże należące do rodzaju *Torula* i *Saccharomyces*.
- 2) *Streptococcus lactis*.

3) Krótkie pałeczki *Betabacterium caucasicum* (wg. klasyfikacji Ö r l a J e n s e n a (5)).

4) Długie skręcone pałeczki, które nazywa Kefir - *Bacillus* i uważa za przystosowaną do mleka, niesporującą odmianę *Bac. subtilis*; udało mu się bowiem wyhodować z ziarn kefirowych normalne sporowe i ruchliwe pałeczki tej bakterji.

Stwierdził on również jak wielu poprzedników, że organizmy kefirowe są bardzo wrażliwe na wysuszenie i przy 40° zamierają.

Z wysuszonych ziarn kefirowych nie udało się autorowi otrzymać kefiru. Mleko ulegało zakwaszeniu oraz fermentacji masłowej (2 wypadki ciężkiego zatrucia), nie ulegało natomiast fermentacji alkoholowej. Jako zanieczyszczenia występują *Bacterium Coli*, bakterje octowe i ze sporowych, bakterje masłowe i *Bac. mesentericus*.

Na tem kończę przegląd literatury oryginalnej. Wzmianki o kefirach w nowszych podręcznikach mikrobiologii ogólnej (C o n n i L i e s k e) oraz specjalnie mleczarskiej, jak W e i g m a n n'a (18) 1924 r. oraz tegoż autora z 1931 r. opierają się na literaturze dawniejszej i nie wnoszą nic nowego do wyżej powiedzianego. W e i g m a n n w nowszym podręczniku podkreśla niestałość mikroflory kefiru.

Badania wyżej podanych autorów dają się streścić jak następuje: 1) Powstanie kefiru jest wynikiem współdziałania (symbiozy) bakteryj z drożdżami, przytem bakterjom przypada rola w procesie zakwaszenia mleka, a drożdżom w fermentacji alkoholowej mleka.

Bakterjami czynnymi są wg. K e r n a (11), *Dispora caucasica* Kern, wg. B e i j e r i n c k a (3) *Lactobacillus caucasicus* (Beij.), F r e u d e n r e i c h (6) podkreśla rolę kokków (obok *Bac. caucasicus*) wreszcie N i k o ł a j e w a przypisuje kokkom (*Bac. Güntheri*) rolę podrzędną, a główną pałeczkom *Bact. caucasicum* indentycznym z pałeczkami wydz. przez B e i j e r i n c k a (3) i F r e u d e n r e i c h a (6).

Drożdże kefirowe należą wg. K e r n a (11) do zwykłych drożdży piwnych, inni autorzy uważają je za specyficzne dla kefiru. Naogół należą do drożdży bezsporowych *Torula*, lecz J ö r g e n s e n (10) i H e n n e b e r g (8) wydzielili również drożdże sporowe (*Saccharomyces*). Różnią się również dane w sprawie bezpośredniej fermentacji laktozy. Wg. B e i j e r i n c k a (3) drożdże kefirowe posiadają tę zdolność, zaś wg. F r e u d e n r e i c h a (6) nie mają jej.

Porównanie danych literatury z danymi doświadczeń własnych przeprowadzę niżej.

BADANIA WŁASNE.

Badałam kefir trzech firm warszawskich: Sigalina, Kasiński i Frankfurt. Nr. Nr. 1, 2 i 3.

1. Zbadałam mikroflorę kefirów.
2. Określiłam zawartość tłuszczu, alkoholu i kw. mlekowego.
3. Z wyizolowanych czystych kultur próbowałam wytwarzać kefir.

MIKROFLORA KEFIRU.

Do izolacji stosowałam pożywkę stałą agarową i żelatynową przygotowaną zamiast na wodzie — na słodkiej serwatce czyli żętycy. Żętyca jest to ciecz otrzymana z mleka słodkiego po strąceniu sernika zapomocą podpuszczki czyli chymozyny.

Enzym ten, otrzymywany z żołądka cielęcego, stosowałam w postaci gotowego preparatu f-my Moritz Blumenthal.

Żętycę przygotowywałam w następujący sposób: mleko od-tłuszczone ogrzewałam na łaźni wodnej do temperatury 37° C., dodawałam enzymu rozpuszczonego w zimnej wodzie (preparat handlowy ma postać proszku) i umieszczałam w temperaturze 37° C. na 2 godz.

Sernik ulegał strąceniu w postaci jednolitej masy, a pozostała żółto - zielonkawa ciecz nadawała się do przygotowania pożywki, przyczem ulegała w tym celu rozcieńczeniu do połowy wodą wodociągową.

Świeżo przygotowana żętyca ma odczyn obojętny i zawiera cukier mlekowy, białka, laktalbuminę i laktglobulinę oraz sole mineralne, jest więc pożywką bardzo dogodną dla bakterij mleka. Nie wymaga żadnych dodatkowych subst. pokarmowych.

Izolacja.

Izolowałam zawsze z kefiru kupionego w dzień rozlewania szalek oraz z trzymanego przez dobę w temperaturze 30—35° C.

Przeszczepiałam również wprost kefir na sterylizowane mleko, trzymałam je w temperaturze 40—45° C. i z niego dopiero wylewałam na szalki. Świeży kefir i trzymany w temp. 30—35° C. wylewałam na szalki żelatynowe i agarowe, mleko z 40—45° na agarowe.

Do 1 próbki brałam 1 małe oczko kefiru, do 2-ej 1 oczko normalne z 1-ej, a do 3, — 4 oczka z 2-ej.

Szalki trzymałam w temperaturach 17—20° C., 30—35° i 40° do 45°.

Dla powierzchniowej orientacji co do składu mikroflory danego kefiru przyrządzałam z niego preparaty barwione w następujący sposób: na szkiełku przedmiotowym rozpościerałam możliwie cienką warstwę kefiru i po utrwaleniu w ogniu umieszczałam na 2 doby w ksylole dla rozpuszczenia tłuszczu. Po spłókanii ksylole wymywałam preparat $\frac{1}{20}$ n ługiem, dla usunięcia sernika, płókałam wodą i barwiłam zwykłymi metodami. (F r e u d e n r e i c h (6) stosował chloroform zamiast ksylole i nie usuwał sernika).

Naogół 1-e szalki były gęsto zarośnięte grzybem *Oidium lactis* oraz bakterjami rozpuszczającymi węglan wapnia, jak również w mniejszej ilości koloniami drożdży.

2-e szalki zawierały najwyżej kilka kolonij *Oidium*, kolonie bakt. rozpuszczających CaCO_3 , drożdży, oraz innych nietypowych dla kefiru mikroorganizmów (*Actinomyces*, *B. coli*, b. sporowe).

3-e wreszcie szalki zawierały kilka dobrze rozwiniętych kolonij bakterij rozpuszczających CaCO_3 oraz 1-ą lub 2 kolonie drożdży.

Czyste kultury szczepiłam na agar i żelatynę na serwatce (patrz wyżej), a po sprawdzeniu czystości na mleko odtłuszczone i sterylizowane, oraz na przesączoną (klarowną) żętycę.

Trzymałam kultury w temperaturach 17—19° C. (temperatura, w której się przygotowuje kefir), 30—35° C. oraz 40—45° C.

Sporządzałam preparaty barwione metodą Grama, stosując ją jako kryterjum, gdyż bakterje mleczne należą naogół do gram-pozytywnych oraz barwiłam błękitem metylenowym i fiol. gencjany dla utrwalenia bakterij i obserwacji.

Wymiary bakterij oznaczałam na materiale żywym w kropli wiszącej.

Mikroorganizmy gazujące szczepiłam do kolbek fermentacyjnych, zawierających serwatkę sterylizowaną lub też pożywkę z 0,5% i 2% jednego z cukrów: glikozy, fruktozy, laktozy, sacharozy, galaktozy i maltozy. Po 24, 48 i t. d. godzinach oznaczałam objętość gazu w zamkniętej części kolbki fermentacyjnej i w ten sposób oznaczałam zdolność fermentacyjną w stosunku do danego cukru.

Dla stwierdzenia, czy wyizolowane przezemnie drożdże wytwarzają spory, szczepiłam je na bloczki gipsowe.

Wyniki badań są następujące:

1) W preparatach barwionych, sporządzonych wprost z kefiru spotykałam stale 1) kokki mleczne, należące do gatunku zbiorowego *Streptococcus lacticus* K r u s e (13). Pod mikroskopem rozróżniałam 2 typy: mniejsze i większe 1) dł. ok. 1 μ . śr. 0,7 μ . i 2) dł. 1,2 μ — 1,5 μ . i śr. ok. 0,9 — 1 μ . Występowały formy pojedyncze, podwójne i krótsze lub dłuższe łańcuszki.

2) Komórki drożdżowe w niewielkiej ilości, również w stanie pączkowania. Komórki te były stale otoczone wieńcem kokków, co można byłoby uważać za dowód symbiozy. Pałeczki występowały tylko w niewielu preparatach i to w znikomej ilości 3—4 w całym preparacie.

3) Strzępki i konidja *Oidium lactis*.

F r e u d e n r e i c h (6) w analogicznych preparatach z kefiru obserwuje stale pałeczki, kokki i drożdże.

Mikroorganizmy kefirowe izolowałam metodą rozlewania szalek, F r e u d e n r e i c h (6) stosuje również szalki „mazane”. Badałam po kilka butelek kefiru każdego typu (słabego, średniego, mocnego N. 1, 2 i 3, każdej z trzech firm).

Skład kefirów nie jest całkowicie jednolity, niema jednak zasadniczych różnic między kefirami N. 1, 2 i 3, natomiast występują pewne różnice między wytworami różnych firm.

Na niejednorodność flory kefiru zwraca uwagę W e i g m a n n (18) w swym najnowszym podręczniku.

a. Mikroorganizmy występujące stale.

Najczęściej spotykanym składnikiem mikroflory kefiru są kokki typu *Streptococcus lacticus* K r u s e (13). Z pośród bardzo wielu wyizolowanych przezemnie daje się wyróżnić kilka typów:

Jako kryterjum wyróżnienia stosowałam rozmiary (cecha morfologiczna) i czas ścinania mleka (cecha fizjologiczna). Wzrostem na żelatynie, agarze i t. d. nie różnią się wcale.

Typ A. Tworzy kolonie drobne (do 1 mm) bezbarwne o nierównym brzegu. Są to kokki nieco owalne o średnicy 0,8 μ . dł. 1 — 1,2 μ , występujące w postaci kom. pojedynczych, diplococów oraz krótkich łańcuszków. Barwią się dobrze metodą Grama. Na żelatynie rosną słabiej, również bezbarwnie. Na kartoflu nie

rosną. Na serwatce wytwarzają słaby osad i zakwaszają ją do Ph—4,1. Mleko ścinają po 1-ym najwyżej 2-ch dniach.

Typ B. Tworzy kolonie okrągłe, bezbarwne o brzegu gładkim. Komórki są większe od poprzednich śr. 1 μ , dł. 1 — 1,5 μ , zaostrome na końcach. Występują w postaci diplo-i streptococców.

Na żelatynie i agarze rosną zupełnie podobnie do poprzednich. Barwią się metodą Grama. Mleko ścinają po 1-ym dniu. Występują w kefirach wszystkich 3-ch firm, ale w małych ilościach.

Typ C. Kokki zlekka owalne śr. 0,6 — 0,8 μ , dł. 0,8 — 0,9 μ tworzą kolonie bezbarwne o ziarnistej strukturze i zlekka falistym brzegu. Na żelatynie rosną bezbarwnie wzdłuż nakłucia, na agarze w postaci drobnych kolonij. Na kartoflu nie rosną. Na serwatce podobnie jak poprzednie. Mleko ścinają w ciągu 3—6 dni.

Wreszcie wyróżniony poprzednio przezemnie typ C₂ różniący się od typu C₁ tem, że kwasiał lecz nie ścinał mleka, po następnych przeszczepieniach ścinał mleko po 3—6 dniach, a więc daje się zidentyfikować z typem C₁. Z badaczy kefiru baczna uwagę na kokki zwrócił F r e u d e n r e i c h (6), który wyróżnia 2 typy: *Streptococcus a*, który odpowiada wyszczególnionemu przeze mnie typowi A oraz *Streptococcus b*, który wykazuje cechy analogiczne do podanego przezemnie typu C₂. Różni się tylko tem, że nie ścina mleka. Jest mało prawdopodobne, aby pod wpływem dużych ilości kwasu wytwarzanego przez bakterje, kazeina nie uległa strąceniu. F r e u d e n r e i c h (6) nie podaje próby tłumaczenia tego zjawiska. B e i j e r i n c k (3) tłumaczy swoiste drobnokłaczkowate wypadanie kazeiny w kefirze działalnością specjalnego enzymu, podpuszczki, który nazywa enzyme de pré-sure. N i k o ł a j e w a (16) zaś uważa kokki mleczne za składnik niestały i zbędny kefiru.

Z wyróżnionych typów — typ B jest najbardziej zbliżony do zwykłych *Str. lactis* zsiadłego mleka, typ C napewno jest specyficzny dla kefiru, gdyż ścina mleko, dając nie ciało stałe, lecz płyn gęsty, jednolity o konsystencji śmietany i swoistym smaku.

Drugim stałym składnikiem kefiru są drożdże.

Wydzieliłam 2 typy.

Typ 1-y. Tworzą kolonie okrągłe, błyszczące, wypukłe o brzegu zlekka wcinanym. Komórki są owalne, dł. ok. 5 μ średnicy ok. 2 μ , pączkujące. Spor nie wytwarzają.

Na żelatynie rosną obficie, biało-kremowo, silnie gazują, rozsadzając pożywkę. Na agarze rosną obficie biało-kremowo,

wypukło, błyszczaco, z wody kondensacyjnej tworzą obfitą pianę. Mleka nie ścinają lecz lekko zakwaszają i silnie fermentują. Z cukrów fermentują najlepiej laktozę, słabiej glikozę, sacharozę i galaktozę, nie fermentują maltozy i lewulozy.

Typ 2 różni się od poprzedniego tem, że ma kolonie o brzegu głęboko wcinanym. Komórki są bardziej wydłużone. Spor również nie wytwarzają. Kultury na żelatynie i agarze wykazują odgałęzienia.

Pod względem fizjologicznym charakteryzują się większem od poprzednich przystosowaniem do bytowania w mleku, gdyż nie fermentują prawie wcale glikozy i sacharozy, wcale nie fermentują maltozy i fruktozy, słabo galaktozę, a b. silnie cukier mleczny, jak to wynika z tablicy 1 (zob. str. 434).

Doświadczenie w kolbkach fermentacyjnych.

Pożywka: H_2O + 0.5% peptonu i 2% cukru.

Drożdże wyizolowane przezemnie odpowiadają *Saccharomyces Kefir Beije r i n c k'a* (3), które również charakteryzują się owalnym kształtem, brakiem spor, zdolnością bezpośredniej fermentacji cukru mlekowego i wycinanym brzegiem kolonij. *Saccharomyces kefir Beij.* jest identyczny z *Saccharomyces (Torula) lactis Adame t z* (2).

F r e u d e n r e i c h (6), jak podałam wyżej, wyizolował drożdże, nie wytwarzające spor, ale pozbawione zdolności samodzielnego fermentowania laktozy, zaś J ö r g e n s e n (10) wydzielił z kefiru *Saccharomyces fragilis* — drożdże, fermentujące laktozę, lecz wytwarzające spory. Charakteryzują się one cienkimi i mało odpornymi (schwaches Winderstandsvermögen) ściankami.

Ponieważ drożdże kefirowe bytują w środowisku kwaśnem, badałam wpływ stężenia wodorodonów na ich wzrost.

Jako pożywki użyłam serwatki dokładnie przesączonej i przezroczystej. Do zakwaszania używałam kwasu mlekowego.

W pierwszym doświadczeniu orjentacyjnem stosowałam metodę kolorymetryczną oznaczania Ph. Mierzyłam Ph na pocz. dośw., biorąc próby z kolbek kontrolnych, sterylizowanych wraz z doświadczalnymi i zawierającymi te same ilości kwasu, oraz na końcu z kolb szczepionych. (Ph kolb kontrolnych nieszczepionych pozostało bez zmiany).

Obfitość wzrostu oceniałam na oko i oznaczałam krzyżykami od — do + + + +. Maksymalne stężenie jonów wodorowych,

TABLICA 1.

NN.	Rodzaj cukru	Ilość gazu w zamkniętej odnodze kolbki						
		24 godz.	48 godz.	72 godz.	96 godz.	120 godz.		
1	Laktoza	Nie ferm.	Ferm.	3cm. ³ gazu	Ferm.	10cm. ³ gazu	Ferm.	15cm. ³ gazu
	Sacharoza	" "	" "	" "	" "	5 "	" "	5 "
	Glukoza	" "	" "	1 "	" "	4 "	" "	4 "
	Maltoza	" "	Nie ferm.		Nie ferm.		Nie ferm.	
	Lewuloza	" "	" "		" "		" "	" "
	Galaktoza	" "	Ferm.	1cm. ³ gazu		5cm. ³ gazu		6cm. ³ gazu
2	Laktoza	" "	Silnie ferm.	10cm. ³ gazu	Silnie ferm.	19 "	Silnie ferm.	19 "
	Sacharoza	" "	Nie ferm.		Nie ferm.		Nie ferm.	
	Glukoza	" "	" "		" "		" "	
	Galaktoza	" "	" "		Ferm.	3cm. ³ gazu	Ferm.	
	Lewuloza	" "	" "		Nie ferm.		Nie ferm.	
	Maltoza	" "	" "		" "		" "	
3	Laktoza	" "	Ferm.	2cm. ³ gazu	Ferm.	8 cm. ³ gazu	Ferm.	10 cm. ³ gazu
	Glukoza	" "	" "	1 pęcz.	" "	1 " "	" "	2 " "
	Galaktoza	" "	" "	1cm. ³ gazu	" "	1 " "	" "	3 " "
	Sacharoza	" "	Nie ferm.		" "		" "	2 " "
	Lewuloza	" "	" "		Nie ferm.		Nie ferm.	
	Maltoza	" "	" "		" "		" "	

przy którym wzrost był możliwy wyrażało się wskaźnikiem Ph — 3,64. Pożywka ulegała zakwaszeniu tylko w kolbach bez dodatku kwasu mlekowego.

Wpływ Ph na wzrost drożdży.

Rodz. pożywki: Serwatka sączona i 3 razy sterylizowana.

Ilość pożywki: 25 cm³ w kolbce.

Okres wzrostu 72 godz.

TABLICA 2.

Ilość kw. mlek.	Ph. pocz.	Ph. końc.	Ocena	Wzrost	Kontr. nieszcz.
0	5,58	4,79	++++	Obf. wzrost ferm.	0
1 %	3,99—4,04	3,99	++	Wzrost sr. nie ferm.	"
2 %	3,63	3,64	+	Wzrost sł. nie ferm.	"
4 %	3,47	3,47	0	Nie rośnie i nie ferm	"
6 %	3,31—3,47	3,31	"	" "	"
8 %	3,17—3,31	3,17—3,31	"	" "	"

Doświadczenie szczegółowe wykonałam przy zastosowaniu metody potencjometrycznej oznaczania Ph.

Wpływ Ph na wzrost drożdży.

Rodz. poż.: Serwatka sączona i 3 razy sterylizowana.

Ilość poż.: 25 cm³ w kolbce.

Okres wzrostu: 72 godziny.

Wyniki tego doświadczenia są nieco inne niż poprzedniego. Do Ph 4,5 wzrost jest optymalny, do 3,6 — dobry, do 3,4 — średni, do 2,7 — słaby, a dopiero przy Ph równym 2,5 drożdże nie rosną wcale. Ma to również związek ze stanem rozproszenia koloïdów serwatki, gdyż w obrębie Ph optymalnego nie strąca się żaden osad przy dodawaniu kwasu; dla Ph, w obrębie którego wzrost jest dobry, strąca się w tych warunkach biały kłaczkowaty osad. Dla stężenia H jonów wywołującego słaby wzrost osad co-prawda początkowo powstaje, lecz się potem (w miarę dodawania kwasu) całkowicie rozpuszcza. Wyniki zob. tabl. (str. 436).

TABLICA 3.

Ilość kw. %.	Ph pocz.	Ph. kontrolne	Ph. końcowe	Ocena wzrost.	Uwagi
0,4 %	5,52	5,72 Średnio 5,73 5,73 5,74	4,92 4,94 4,95 4,98	+++++	Po dod. Osad kw I nie powst.
0,8 „	5,29	5,45 5,48 5,47 5,48	4,82 4,85 4,84 4,86	+++++	„ 1 „ „ 1 „
1,2 „	5 10	5,28 5,32 5,29 5 28	4,80 4,79 4,80 4,80	+++++	„ 1 „ „ 1 „
1,6 „	4,70	4,88 4,86 4,88 4,81	4,52 4,50 4,51 4,52	+++++	„ 1 „ „ 1 „
3,2 „	4,38	4,51 4,54 4,52 4,50	4,28 4,32 4,31 4,32	++++	„ 1 St. „ 1 osad
4	3,98	4,08 4,04 4,05 4,04	4,01 4,02 4,01 4,00	++++	„ 1 Obf. „ 1 osad
6	3,64	3,78 3,80 3,79 3,80	3,76 3,84 3,78 3,74	++++	„ 1 „ „ 1 „
8	3,48	3,68 3,64 3,67 3,68	3,60 3,60 3,61 3,62	++++	„ 1 „ „ 1 „
12	3,45	3,60 3,60 3,62 3,66	3,54 3,46 3,52 3,56	+++	„ 1 Osad. „ 1 cz.się rozp.
13	3,18	3,36 3,40 3,39 3,42	3,36 3,42 3,40 3,41	+++	„ 1 Osad. „ 1 zn.cz. „ 1 się rozp.
14	2,78	2,95 2,94 2,97 3,04	3 00 2,95 2,97 2,96	++	„ 1 Osad „ 1 całk.się rozp.
18	2,72	2,84 2,82 2,83 2,84	2,86 2,82 2,84 2,84	++	„ 1 „ „ 1 „
20	2,69	2,78 2,78 2,77 2,75	2,72 2,70 2,71 2,70	++	„ 1 „ „ 1 „
24	2,64	2,70 2,71 2,71 2,72	2,72 2,70 2,71 2,70	+	„ 1 „ „ 1 „
27	2,57	2,58 2,68 2,59 2,50	2,62 2,59 2,59 2,56	0	„ 1 „ „ 1 „

Dla dopełnienia obrazu wpływu stężenia H jonów na wzrost drożdży wykonałam analogiczne doświadczenie dla odczynów alkalicznych, dodając n/10 ługu sodowego. (zob. tabl. 4).

Wpływ Ph na wzrost drożdży.

Poż.: 25 cm³ serwatki sączonej i sterylizowanej + r /10 NaOH.

Okres wzrostu: 72 godziny.

TABLICA 4.

Ilość dodanego $\frac{n}{10}$ Na OH	Ph pocz.	Ph kontrolne	Ph końcowe	Ocena wzrostu
0 cm. ³	6,12	6,10 6,10 6,14 średnio 6,11	5,08 5,08 5,10 5,14	+++++
0,2 "	6,38	6,32 6,26 6,32 6,30	5,22 5,25 5,23 5,22	+++++
0,5 "	6,62	6,44 6,42 6,40	5,44 5,38 5,43 5,44	+++++
0,7 "	6,86	6,44 6,40 6,40 6,41	5,40 5,38 5,41 5,44	+++++
1,0 "	7,40	7,00 6,98 6,99 7,00	5,44 5,44 5,46 5,52	+++++
2,0 "	8,10	7,64 7,64 7,64	5,82 5,88 5,88 5,94	+++++
2,5 "	8,64	7,88 7,82 7,82 7,78	6,22 6,18 6,19 6,18	++++
3,0 "	8,96	7,98 7,98 8,04 8,08	6,24 6,32 6,27 6,26	+++
4,0 "	9,24	8,38 8,38 8,37 8,36	6,34 6,32 6,31 6,28	++
5,0 "	9,44	8,56 8,52 8,54 8,52	8,54 8,48 8,53 8,58	0

Z danych doświadczenia wynika, że odczyn pożywki ulega znacznemu zakwaszeniu, przyczem optimum dla wzrostu wynosi 5,1 do 5,9, zaś łącznie z danymi doświadczenia poprzedniego można stwierdzić szerokie optimum Ph od 4,5 do 6,0. Maksimum wynosi 8,5.

Pozatem stałym składnikiem badanych kefirów jest grzyb *Oidium lactis*.

Pokrywa on gęsto wszystkie 1-sze szalki. Tworzy bezbarwne kolonie promienisto rozgałęzione, złożone ze strzępków o średnicy 3,4 μ , zaopatrzonych w przegrody komórkowe i rozpadających się na walcowate konidja. Strzępki są rozgałęzione.

Na żelatynie rośnie wzdłuż nakłucia, tworząc poziome odgałęzienia.

Żelatynę rozrzedza bardzo powoli. Na agarze rośnie w postaci bezbarwnych pojedynczych kolonij. Mleka nie ścina, lecz tworzy na niem kożuszek, a po dłuższym czasie zamienia je na przezroczystą galaretowatą masę.

b. Mikroorganizmy występujące niestale.

Ze składników niestałych wyizolowałam jeden raz z kefiru trzymanego w temperaturze wyższej (34° C.) pałeczki o długości 3,5 μ do 4,5 μ i śr. 1 μ , ruchliwe. Tworzyły kolonie, płaskie rozgałęzione, na żelatynie rosły słabo, bezbarwnie, tworząc boczne rozgałęzienia. Na agarze nie wyrosły wcale. Mleko ścięły po 8 dniach na półpłynną masę. Można byłoby przypuścić, że bakterja ta należy do *Bac. caucasicus* F r e u d e n r e i c h a (6) lecz średnica komórki nie odpowiada podawanej w literaturze (0,4 — do 0,5). Za tem przypuszczeniem przemawiałby tylko fakt bardzo trudnej izolacji i hodowli wyżej opisanej pałeczki. Kultura, ta, mimo usilnego przeszczepiania na mleko i pożywki stałe, szybko zamierała.

Pozatem spotkałam w dwóch butelkach *Actinomycety*.

Stare ich kolonie są pokryte białym puszkciem. Żelatyny nie rozrzedzają. Na agarze skośnym rozrastają się na całej jego powierzchni. Dwa gatunki wydzielają barwniki: 1-szy brązowo-fioletowy, a 2-gi brązowy. Mleka nie ścinają. Wydają silny zapach ziemi. (*Actinomyces odorifer*). Rosną o wiele lepiej w temperaturze 37° C. niż w 20° C.

Wyróżniłam również kokki owalne o średnicy ok. 0,6—0,7 μ , występujące w formach pojedynczych i podwójnych. Na agarze i żelatynie rosną tak samo jak kokki mleczne, lecz nie kwaszą i nie ścinają mleka, nie rozpuszczają CaCO_3 i nie barwią się wg. Grama.

Dwa razy napotkałam ruchliwe sporowe pałeczki dł. ok. 3 — 4,5 μ , śr. ok. 1 μ , rozrzedzające żelatynę i peptonizujące mleko, a dwa razy pałeczki krótkie niesporowe, ruchliwe dł. ok. 1,5 — 2,5 μ , śr. 0,7—0,8 μ , nie zmieniające mleka.

Pozatem raz pałeczki krótkie o śr. 0,8 μ , dł. 1,5—2 μ , bardzo ruchliwe i ścinające mleko po trzech dniach. Tworzą kolonie drobne, białe, o promienistej strukturze wewnętrznej. Na agarze i żelatynie rosną obficie, biało. Przypominają *B. Coli*.

Dwa razy b. duże kokki o śr. 1,5, tworzące formy podw. i czworacze. Kolonie były wypukłe zlekka kremowe. Żelatynę rozrzedzają. Na agarze wzrost obfity, wypukły. Mleka nie kwaszą i nie ścinają.

BADANIA CHEMICZNE KEFIRU.

Oznaczanie ilościowe tłuszczu metodą G o t t l i e b a — R ö s e g o.

Metoda polega na rozpuszczaniu białek mleka w amonjaku i ekstrakcji tłuszczu mieszaniną eteru i eteru naftowego. Po odpędzeniu eteru i wysuszeniu, tłuszcz określa się wagowo. Metoda używana bywa specjalnie do określania tłuszczu w mleku. (T e i c h e r t (17), A b d e r h a l d e n (1)).

Oznaczenia próbne.

Do oznaczeń próbnych użyłam masła przetopionego i przesączonego, zakładając, że w ten sposób przyrządzone jest tłuszczem 100%.

TABLICA 5.

NN próby	Masa subst. przed anal.	Masa subst. po analizie	Niedomiar	%
I	1.084 gr.	1.044 gr.	0.040 gr.	4.2 %
II	1.0045 „	1.0011 „	0.0034 „	0.34 „
III	0.9900 „	0.9681 „	0.0219 „	2.2 „

Zawartość tłuszczu w kefirach firm warszawskich:

Kasiński — I, Sigalina — II, Frankfurt III.

Wyniki zawiera tabl. 6.

TABLICA 6.

I	II	III
2.12 %	1.932 %	3.05 %
2.22 „	1.945 „	3.011 „
2.30 „	1.935 „	3.020 „
średnio 2.21 „	średnio 1.937 „	średnio 3.027 „

Oznaczenie ilościowe alkoholu w kefirze metodą *Martina*.

Metoda polega na utlenieniu alkoholu na kwas octowy za pomocą mieszaniny chromowej. Z różnicy między ilościami siarczanu żelazowo - amonowego, zużytego do redukcji mieszaniny chromowej przed i po reakcji z alkoholem wyznacza się miareczkowo ilość alkoholu w badanej substancji. Ten ostatni oddestylowuje się z określonej ilości substancji badanej do odmierzonej ilości mieszaniny chromowej. Metoda *Martina* bywa używana do oznaczania alkoholu w kulturach drożdżowych na brzeczce i pożywce mineralnej z cukrem. Specjalnej metody do oznaczania alkoholu w mleku nie znalazłam, gdyż badacze podają tylko wyniki badań, nie podają natomiast metody oznaczania.

Oznaczenia próbne.

Wykonałam je dla alkoholu 2% i wykazały one (jak to wynika z poniższej tablicy 7) dużą dokładność metody w zastosowaniu do wodnych roztworów alkoholu.

TABLICA 7

NN próby	ilość zuż. soli N=Mohra przed reakcją	miano M=K ₂ Cr ₂ O ₇	ilość soli Mohra zuż. P=po reakcji	odp. P ilość — mies. M hrom.	$R = \frac{20 - M}{P}$ ilość K ₂ Cr ₂ O ₇ zuż. na utl. alk.	Zawart. alk.	Nied. w %
1	75,6 cm. ³	3,78	16, cm. ³	4,23 cm. ³	15,77 cm. ³	0,199 cm. ³	0,65 %
2	72,0 „	3,60	15,2 „	4,22 „	15,78 „	0,199 cm. ³	0,60 „
3	76,8 „	3,94	16,8 „	4,26 „	15,74 „	0,198 cm. ³	0,85 „

Zawartość alkoholu w kefirach firm warszawskich:

Kasiński — I, Sigalina — II, Frankfurt — III.

Wyniki podaje tabl. 8.

TABLICA 8.

NN próby	ilość N= zuż. soli Mochra przed reakcją	M=mlano K ₂ Cr ₂ O ₇	ilość P= soli Moh- ra zuż. po reakcji	odp. P ilość — M mieszan- chrom.	P R= 20- M ilość K ₂ Cr ₂ O ₇	Zawartość alkoholu w 10 cm. ³ kef.	% zawar- tości alkoholu
1	78,4 cm. ³	3,92	74,1 cm. ³	18,90 cm. ³	1,10 cm. ³	0,0138 cm. ³	0,138 %
2	76,0 "	3,80	71,8 "	18,89 "	1,11 "	0,0140 "	0,140 "
3	76,0 "	3,80	72,0 "	18,90 "	1,10 "	0,0138 "	0,138 "
1	74,0 "	3,70	59,1 "	15,90 "	4,10 "	0,0510 "	0,510 "
2	76,1 "	3,805	61,1 "	16,10 "	3,90 "	0,0491 "	0,491 "
3	76,1 "	3,805	61,2 "	16,09 "	3,91 "	0,0492 "	0,492 "
1	75,8 "	3,78	72,2 "	19,10 "	0,90 "	0,0113 "	0,113 "
2	75,8 "	3,78	72,0 "	19,05 "	0,95 "	0,0119 "	0,119 "
3	75,8 "	3,78	72,2 "	19,10 "	0,90 "	0,0113 "	0,113 "

Możliwe, że dane analiz powyższych są zbyt niskie, gdyż alkohol nie daje się cał. oddestylować z kefiru. (Zawartości alkoh. podawane w literaturze wahają się od 0,2 — 0,8% (K r a n h a l s (12), H a m m a r s t e n (7), W e i g m a n n (18)).

Oznaczenie stopnia kwasowości

i

stężenia jonów wodorowych.

Stopień kwasowości oznaczałam miereczkowo zapomocą $\frac{1}{10}$ NaOH przy użyciu fenolftaleiny jako indykatora.

Odpowiada to metodzie M o r r e s'a (14) i K u r t a T e i c h e r't'a (17). Inne metody używane w mleczarstwie różnią się tem, że stosują $\frac{1}{4}$ norm. NaOH, przytem określone jednostki objętości zużytego ługu oznaczają jako stopień kwasowości (Säuregrad), przytem według S o x h l e t - H e n k l a jednostką tą jest 1 cm³ = 10 S. H., zaś według T h o r n e r'a 0,1 cm³ $\frac{1}{4}$ norm. NaOH.

Do oznaczeń próbnych stosowałam wodę destylowaną i gotowaną celem usunięcia CO₂ (o Ph = 6,72) z odpowiednim dodatkiem kwasu mlekowego, oraz mleko świeże, do którego również dodawałam różne ilości kwasu mlekowego.

Stężenie jonów wodorowych czyli tak zwaną kwasowość aktualną oznaczałam potencjometrycznie (zob. tabl. 9).

Oznaczenia próbne dla kw. mlekowego rozcieńczonego wodą.

TABLICA 9.

Ilość dołączonego kw. mlek. w gr.	Ilość zużytego $\frac{n}{10}$ NaOH w cm. ³	Odp. obliczona ilość kwasu mlekowego w gr	Błąd w %	PH.
0,0302	3,34 3,34 3,34	0,0303 0,0303 0,0303	0,033 % 0,033 „ 0,033 „	2,60 2,60 2,60
0,0605	6,74 6,74 6,74	0,0606 0,0606 0,0606	0,0165 % 0,017 „ 0,017 „	2,56 2,55 2,56
0,0906	10,00 10,00 10,00	0,090 0,090 0,090	0,099 % 0,099 „ 0,099 „	2,44 2,44 2,44
0,121	13,32 13,37 13,48	0,120 0,120 0,121	0,057 „ 0,057 „ 0,00 „	2,36 2,37 2,38
0,151	16,89 16,74 16,74	0,152 0,151 0,151	0,39 % 0,00 „ 0,00 „	2,28 2,27 2,27
0,211	21,63 21,63 21,63	0,209 0,209 0,209	0,094 „ 0,094 „ 0,094 „	2,22 2,22 2,21
0,242	26,52 26,52 26,52	0,238 0,238 0,238	0,161 % 0,161 „ 0,161 „	2,18 2,18 2,18

Oznaczenia próbne dla kwasu dodanego do mleka.

Ilość ługu zużyta do zobojętnienia czystego mleka była odejmowana od ilości ługu zużytej każdorazowo do zobojętnienia mleka z dodatkiem kwasu. (zob. tabl. 10).

Z tablic powyższych wynika, że dla kwasu rozcieńczonego wodą błąd jest mały (poniżej 1%), natomiast dla kwasu w mleku wynosi średnio ok. 10%.

Również dla Ph widzimy zmienną różnicę między wynikami dla kwasu w wodzie i w mleku. W wodzie brak białkowych układów buforowych, które działają w mleku i dlatego przy tej samej ilości dodanego kwasu, stężenie wolnych jonów wodorowych jest znacznie wyższe, a Ph mniejsze.

TABLICA 10.

Ilość dodanego kwasu mle- kowego w gr.	Ilość zużytego $\frac{n}{10}$ Na OH w cm. ³	Odp. obli- czona ilość kw. mleka w gr.	Błąd w %	PH.
0	5,20 5,20 5,20			6,36 6,36 6,36
0,0302	3,04 3,04 3,05	0,028 0,028 0,028	9,27 9,27 9,27	6,80 6,82 6,80
0,0605	5,99 5,99 5,87	0,054 0,054 0,054	11,04 11,04 11,7	5,56 5,56 5,56
0,091	9,13 9,13 9,13	0,082 0,082 0,082	9,8 9,8 9,8	5,19 5,18 5,20
0,121	11,96 12,07 11,96	0,108 0,109 0,108	10,74 10,24 10,24	4,94 4,93 4,93
0,151	15,53 15,24 15,53	0,138 0,137 0,138	9,00 9,20 9,00	4,41 4,42 4,41
0,211	21,20 21,20 21,20	0,190 0,190 0,190	11,91 11,91 11,91	4,31 4,32 4,32
0,242	24,46 24,46 24,46	0,220 0,220 0,220	9,09 9,09 9,09	4,22 4,21 4,21

Zawartość kwasu mlekowego w kefirach warszawskich. (Säuregrad).

Ilość kefiru = 25 cm³. I — kef. f-my Kasiński, II — Sigalina, III — Frankfurt (Tab. 11, str. 444).

PRÓBY SPORZĄDZANIA KEFIRU Z CZYSTYCH KULTUR WYDZIELONYCH BAKTERYJ.

Do sporządzania kefiru używałam zwykłego rynkowego mleka; przytem w dwóch serjach użyłam w stanie rodzimym, a w jednej rozcieńczone do połowy mlekiem odtłuszczonem. Stosowałam zwykłe butelki monopolowe na 100cm³ i korki korkowe. Przed każdą sterylizacją obluźniałam je, a po niej znowu szczelnie wypychałam. Po zaszczepieniu butelki lakowałam. Do sporządzenia kefirów wybrałam po jednej kulturze z każdego z wyizolowanych typów, a więc 2 typy kokków A i C oraz 2 typy drożdży I i II i kulturę *Oidium lactis*.

TABLICA 11

Rodzaj kefru	N	$\frac{n}{10}$ ilość zużytego Na OH w cm ³ .	Zawartość kwasu mlekowego w gramach.	Procentow a zawartość kwasu	PH.
I	1	24,79	0,223	0,736	4,32
		25,00	0,225	0,740	4,30
		25,00	0,225	0,740	4,30
	2	25,76	0,231	0,764	4,20
		25,98	0,233	0,768	4,20
		25,98	0,233	0,768	4,20
	3	26,47	0,237	0,780	4,20
		26,41	0,237	0,780	4,20
		26,41	0,237	0,780	4,20
II	1	21,96	0,197	0,648	4,55
		22,07	0,197	0,652	4,55
		22,07	0,197	0,652	4,54
	2	23,15	0,208	0,684	4,50
		23,15	0,208	0,684	4,50
		23,15	0,208	0,684	4,50
	3	24,02	0,216	0,712	4,44
		23,94	0,215	0,708	4,44
		24,02	0,215	0,712	4,44
III	1	22,94	0,206	0,681	4,52
		22,94	0,206	0,681	4,53
		23,03	0,207	0,684	4,51
	2	24,02	0,216	0,712	4,46
		24,02	0,216	0,712	4,45
		24,02	0,216	0,712	4,46
	3	25,00	0,225	0,744	4,32
		24,88	0,224	0,740	4,34
		25,00	0,225	0,744	4,33

Stosowałam je w rozmaitych kombinacjach. Z czystych kultur agarowych lub żelatynowych szczepiłam odpowiednie zespoły na mleko sterylizowane w próbkach i dopiero, gdy to uległo fermentacji szczepiłam zeń na mleko w butelkach. 24 lub 48-godz. trzymałam w temperaturze 17-19° a później w temp. 6-8° C. Próbowałam napój po 1-ym, 2, 3 dniach, starając się określić jego smak, zapach, konsystencję oraz oznaczałam kwasowość potencjometrycznie. W wyniku prób otrzymałam napój, który różnił się smakiem i konsystencją w zależności od użytej kombinacji mikroorganizmów. Najlepszy wynik dawała kombinacja kultur A, C, czyli 2 typów kokków i drożdży, przyczem 1°: Typ A jest głównym czynnikiem kwaszącym, gdyż zespoły pozbawione go dawały napój mniej kwaśny, Typ C wpływał na jednolitą gęsto-płynną konsystencję. (Możliwość wydzielania podpuszczki, wpływającej na

drobno - kłaczkowate strącenie kazeiny. (B e i j e r i n c k (3)) i powoduje specyf. smak. (F r e u d e n r e i c h (6)).

Drożdże wreszcie powodują lekkie musowanie płynu. Użyte w zbyt dużej ilości hamują fermentację mleczną i powodują silne musowanie płynu o smaku i zapachu drożdży. *O i d i u m l a c t i s* po krótkim czasie nie wpływa na smak napoju, po dłuższym powoduje częściowy rozkład tłuszczu (smak zjełczały).

DOŚWIADCZENIE I.

Mleko nieodtłuszczone, sterylizowane 3 razy z korkami korkowemi. Po zaszczepieniu lakowane. Trzymane 24 godziny w temperaturze 22^o, a nast. w 8^o C.

N. 1 Typ A: drożdże I; Nr. 2. Typ A kokków, drożdże I!, i *Oidium Lactis*; Nr. 3. Typ A i drożdże II; Nr. 4 Typ C kokków: drożdże II; Nr. 5 Typ C kokków i drożdże I, wreszcie Nr. 6 kontrolne nieszczepione. Wynik podaje tabl. 12, str. 446.

DOŚWIADCZENIE II.

Mleko pełne sterylizowane 3 razy z korkami z waty, a po zaszczepieniu zatkanie korkowemi, uprzednio sterylizowanemi i zalakowane. Szczepione pipetą. Trzymane 24 godz. w temp. 22^o C. a następnie w 8^o C. Oznaczenia takie same, jak w poprzedniej tablicy. Wynik podaje tabl. 13, str. 447.

DOŚWIADCZENIE III.

Mleko w połowie odtłuszczone, a w połowie tłuste. Sterylizowane z korkami korkowemi. Po zaszczepieniu lakowane. Trzymane 24 godz. w temp. 19^o C. a nast. w 8 — 10^o C.

Oznaczenia:

N 1 = mieszanka złożona z Typów A i C kokków oraz drożdży II.

N 2 = Typy A i C kokków, drożdże II i *Oidium lactis*.

N. 3 = Typy A i C oraz drożdże I.

N. 4 = Typ A kokków i drożdże II.

N. 5 = Typ C i drożdże II.

N. 6 = kontrolne nieszczepione mleko.

Wynik podaje tabl. 14, str. 448.

TABLICA 12

Wiek	Ocena	N. 1	N. 2	N. 3	N. 4	N. 5	N. 6
24 godz.	Gaz	Obecny	Obecny	Obecny	Obecny	Podobne do	Brak
	Konsyst.	B. gęsty ale płynny	B. gęsty	Gęsty, kazeina ścięta w post. drobnych kłaczków	Gęsty zawieszisty	Nr. 4	Normalnego sterylizowanego mleka
	Smak	B. kwaśny	Kwaśny b. lekko zjełczały	Kwaśny	Mniej kwaśny od poprzedniego.	4,78	6,48
48 godz.	Ph.	4,30	4,32	4,50	4,79		
	Gaz	W dużej ilości	W b. dużej ilości	Występuje	Występuje	Podobne do	Brak
	Konsyst.	B. gęsty, kazeina strącona w post. drobnych kłaczków.	Gęsty lecz płynny	Kazeina ścięta w postaci większych kłaczków	Gęsty lecz płynny	Nr. 4	Normalnego sterylizowanego mleka.
72 godz.	Smak	B. kwaśny ściągający.	B. kwaśny	Kwaśny i ściągający	Słabo kwaśny zawieszisty.	4,78	6,49
	Ph.	4,30	4,28	4,34	4,76	4,78	
	Gaz	Obecny w dużej ilości	Obecny w dużej ilości	Obecny	Obecny	Podobne do	Brak
	Konsyst.	B. gęsty	Gęsty lecz płynny	Każ. ścięta w postaci nieco większych kłaczków.	Gęsty lecz płynny	Nr. 4	Normalnego sterylizowanego mleka.
	Smak	Kwaśny, ściągający	Gorzko — kwaśny	B. kwaśny	Słabo kwaśny zawieszisty.	4,78	6,47
	Ph.	4,30	4,29	4,33			

TABLICA 13

Wiek	Ocena	N. 1	N. 2	N. 3	N. 4	N. 5	N. 6
24 godz.	Gaz	Nieobecny	Nieobecny	Podobne do Nr. 1	Nieobecny	Zupełnie po- dobne do Nr. 4	Normalnego sterylizowanego mleka
	Konsyst.	Gęsto-płynny, kaz- strącona w posta- ci drobn. kłaczków	Bardzo gęsty		Dość rzadki bar- dzo jednolity		
	Smak	Kwaśny z lekką ściągający. nadm. tłuszczu 4,42	Kwaśny, b. lekko zjęłczały, nadm. tłuszczu 4,30	4,38	Mniej kwaśny od poprzedniego	4,99	6,52
	Ph.				5,01		
48 godz.	Gaz	Obecny	W małej ilości	W dość dużej ilości	Obecny		
	Konsyst.	Gęsto płynny	Stały, nieco wy- dzielonej serwatki	Gęsto—płynny	Zawiesisty, bardzo jednolity	Zupełnie po- dobne do Nr. 4	Normalnego sterylizowanego mleka
	Smak	Kwaśny	Kwaśny, lekko zjęłczały	Kwaśny	Mniej kwaśny od poprzedniego	4,96	6,51
	Ph.	4,38	4,30	4,37	4,98		
72 godz.	Gaz	W dużej ilości	W małej ilości		W dość dużej ilości		
	Konsyst.	Gęsty	Kazeina strącona w post. większych kłaczków	Podobne do Nr. 1	Dość rzadki, bar- dzo jednolity	Zupełnie po- dobne do Nr. 4	Normalnego sterylizowanego mleka
	Smak	Kwaśny	Bardziej kwaśny od poprzedniego		Mniej kwaśny od- poprzedniego		
	Ph.	4,36	4,30	4,35	4,94	4,94	6,51

TABLICA 14

Wiek	Opis	N. 1	N. 2	N. 3	N. 4	N. 5	N. 6
24 godz.	Gaz	W małej ilości	Obecny	Obecny	Obecny	W małej ilości	Brak
	Konsyst.	Gęsto-płynny kaz. strącona w post. drobnych kłaczków	Gęsto-płynny, kaz. strącona równo-miennie	Gęsto-płynny kaz. strącona równo-miennie	Gęsto-płynny, kaz. strącona mniej jednolicie	Gęsto-płynny, kaz. strącona b. jednolicie	Zupełnie rzadki
	Smak	Bardzo kwaśny ściągający	Kwaśny	Kwaśny-musujący	Kwaśny, ostry, musujący	Słabo kwaśny o spec. smaku kefiru	Słodkiego sterylizow. mleka
	Ph.	4,02	4,06	4,08	4,12	4,32	6,38
48 godz	Gaz	Obecny	Obecny	Obecny w dużej ilości	B. dużej ilości	Obecny	Brak
	Konsyst.	Gęsto-płynny, kaz. strącona równo-miennie	Gęsto-płynny, kaz. strącona równo-miennie	Gęsto-płynny kaz. strącona równo	Gęsto-płynny, kaz. strącona mniej jednolicie	Gęsto-płynny kaz. strącona jednolicie	Rzadki
	Smak	B. kwaśny	Kwaśny musujący	Kwaśny musujący	Kwaśny, ostry, musujący	Słabo kwaśny o specyficznym smaku kefiru	Słodkiego sterylizow. mleka
	Ph.	3,98	4,06	4,08	4,16	4,28	6,40
72 godz.	Gaz	Obecny w dużej ilości	Obecny	Obecny w dużej ilości	W b. dużej ilości	Obecny	Brak
	Konsyst.	Gęsto-płynny, kaz. strącona jednolicie.	Gęsto-płynny kaz. równo strącona	Gęsto-płynny	Gęsto-płynny	Gęsto-płynny, kaz. równo strącona	Zupełnie rzadki
	Smak	Silnie kwaśny, musujący, zawiesisty	Kwaśny, b. lekko zjełczały	Kwaśny, musujący	kwaśny, ostry, ściągający, musujący	Sl. kwaśny o specyf. smaku kefiru, musujący	Słodkiego sterylizow. mleka
	Ph.	3,96	4,08	4,06	4,12	4,32	6,39
96 godz	Gaz	W dużej ilości	Obecny	W b. dużej ilości	W dużej ilości	Obecny	Brak
	Konsyst.	Gęsto-płynny	Gęsto-płynny	płynny nieco rzadszy, kaz. równo strącona	Gęsto-płynny kaz. strącona niezbyt jednolicie	Gęsto-płynny, kaz. strącona b. równo	Rzadki
	Smak	Silnie kwaśny, musujący, zawiesisty	Kwaśny, bardzo lekko zjełczały	B. kwaśny musujący	B. kwaśny, ostry, ściągający musujący	Silnie kwaśny niż poprz. dnia, musujący	Sterylizow. mleka
	Ph.	3,96	4,02	4,04	4,12	4,18	6,38

TABLICA 15

Wiek	O c e n a	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
24 g.	G a z	Obecny w małej ilości	Nieobecny	Obecny w małej ilości	Obecny w dużej ilości	Nieobecny	Obecny w dużej ilości	W małej ilości	Nieobecny
	K o n s y s t	Gęsty, zawiesisty	Gęsto-płynny, kaź. równo	Gęsto-płynny, kaź. równo	B. rzadki	Niezmieniona	Rzadki	Gęsty lecz płynny	Niezmieniona
	S m a k	Słodkawo-kwaśny	Bardzo kwaśny	Kwaśny ściągający	Mniej kwaśny, silnie musujący	Słodko-kwaśny	Słodkawy, musujący	Kwaśny, ściągający	Słodkiego sterylizowanego mleka
	P h	4,26	4,16	4,26	4,30	5,74	6,07	4,24	6,40
48 g.	G a z	Obecny	Nieobecny	Obecny	W dużej ilości	Obecny	W dużej ilości	Obecny	Nieobecny
	K o n s y s t	Gęsto-płynny, kaź. równo	Gęsty, kazeinowy, kaź. równo	Kazeina dość równo	Rzadki, kazeinowy, kaź. równo	Gęsty, kaź. równo	Gęsty lecz płynny	Gęsty lecz płynny	Niezmieniona
	S m a k	Słodkawo-kwaśny	Kwaśny, ściągający	Kwaśny, ściągający	Mniej kwaśny, b. mus.	Słabo kwaśny	Słoko-kwaśny, musujący	Kwaśny, ostry ściągający	Słodkiego sterylizowanego mleka
	P h	4,24	4,16	4,24	4,28	4,71	4,66	4,20	6,41
72 g.	G a z	Obecny	W b. małej ilości	Obecny w małej ilości	W b. dużej ilości	Obecny	W b. dużej ilości	Obecny	Nieobecny
	K o n s y s t	Gęsty, zawiesisty	Gęsto-płynny	Kazeina strącona mniej równo	Rzadki, kaź. strąca nierównomiernie	Gęsto-płynny, kaź. str. równomier.	Rzadki	Gęsty lecz płynny	Niezmieniona
	S m a k	Kwaśny, musujący	Kwaśny ściągający	Dość kwaśny, lekko musujący	Smak ciasta, b. silnie musujący	Słabo kwaśny, lekko musujący	Słabo kwaśny, musujący, smak ciasta, trochę gorzki	Kwaśny, lekko musujący	Słodkiego sterylizowanego mleka
	P h	4,21	4,15	4,20	4,20	4,67	4,66	4,16	6,39

Z danych doświadczenia wynika, że w wypadku mniej tłustego mleka, użytego do sporządzania kefiru, stężenie jonów wodorowych w otrzymanych przetworach jest wyższe, niż w wyp. mleka tłustego.

DOŚWIADCZENIE IV.

Mleko nieodtłuszczone, sterylizowane 3-krotnie z korkami korkowymi. Trzymane 24 godz. w 22° C. a następnie w 8° C.

Oznaczenia:

I mieszanka — Typy A i C kokków oraz drożdże II.

II Typy A i C kokków.

III Typ A i drożdże I w małej ilości.

IV to samo, lecz dużo drożdży.

V Typ C i drożdże I w małej ilości.

VI to samo, lecz drożdże w dużej ilości.

VII Typ A i drożdże II (mało).

VIII Mleko nieszczepione.

Wynik podaje tabl. 15, str. 449.

Jak to wynika z powyższej tablicy, zachwianie stosunku między bakteriami a drożdżami na korzyść drożdży, powoduje nadmierną fermentację alkoholową z jednoczesnem zahamowaniem fermentacji mlecznej. Smak otrzymanego przetworu jest b. nieprzyjemny.

ANALIZY.

Wykonałam również analizy kefirów sporządzonych przeze mnie na zawartość tłuszczu, alkoholu i kwasu. Analizowałam kefir z różnych mieszanek. (por. tabl. 16).

TABLICA 16.

Rodzaj kefiru	I			II			III		
Rodzaj subst.	Próba 1	Próba 2	Próba 3	Próba 1	Próba 2	Próba 3	Próba 1	Próba 2	Próba 3
Tłuszcz	2,79 %	2,79 %	2 79 %	2,78 %	2,77 %	2,77 %	2,82 %	2,83 %	2,78 %
Alkohol	0,44 „	0,44 „	0,43 „	0,45 „	0,45 „	0,46 „	0,46 „	0,47 „	0,47 „
Kwas	0,76 „	0,76 „	0,76 „	0,83 „	0,84 „	0,83 „	0,85 „	0,85 „	0,85 „

Jak wynika z powyższej tablicy, skład chemiczny otrzymanego przetworu zgadza się naogół ze składem podawanym w literaturze, oraz ze składem kefirów warszawskich.

Jedynie ilości alkoholu są większe, niż znalezione przezemnie w kefirach handlowych, a mniejsze od niektórych danych literatury.

Dla porównania przytoczę dane H a m m a r s t e n a w tabelicy 17.

TABLICA 17.

Rodzaj substancji	Kefir z Göteborga			Kefir przyrządzony przez autora		
	I	II	III	I	II	III
Alkohol	0,7 %	0,66 %	0,76 %	0,23 %	0,81 %	1,10 %
Kwas mlek.	0,81 „	0,61 „	0,76 „	0,60 „	0,83 „	0,90 „
Cukier mlek.	2,78 „	2,50 „	2,37 „	3,70 „	2,24 „	1,67 „
Kazeina	2,98 „	2,74 „	2,57 „	2,57 „	2,56 „	2,56 „
Tłuszcz	2,35 „	3,10 „	3,62 „	3,62 „	3,63 „	3,63 „

WNIOSKI OGÓLNE.

1. Stałymi składnikami mikroflory kefirów warszawskich są:

a) Kokki należące do gatunku zbiorowego *Streptococcus lacticus* K r u s e (13), których wyróżniłam trzy typy. Typy A i C są charakterystyczne dla kefiru, zaś typ B ścina mleko bardzo szybko i na zupełnie stałą masę.

b) Drożdże owalne o długości 5 μ i średnicy ok. 3 μ posiadające zdolność fermentacji cukru mlekowego i nie wytwarzające spor, czem odpowiadają w zupełności *Saccharomyces Kefir* B e i j e r i n c k (3) i *Torula lactis* A d a m e t z (2). Wyróżniłam 3 typy, które różnią się nieco stopniem przystosowania do mleka jako środowiska życiowego.

c) *Oidium lactis*, które nie tylko nie jest pożyteczne, lecz nawet szkodliwe, gdyż w starszym kefirze powoduje smak gorzki i zjełczały.

2. Najbardziej typowego mikroorganizmu kefirowego, a mianowicie: *Dispora caucasica* K e r n (11), *Lactobacillus causicus* B e i j. (3), *Bacillus causicus* F r e u d. (6), *Bacterium causicum* N i k o ł a j e w a. (16) nie stwierdziłam w preparatach barwionych z kefiru, ani nie wydzieliłam metodą szalkową.

3. Analizy chemiczne kefirów warszawskich na zawartość tłuszczu, kwasu mlekowego i alkoholu dały dla dwóch pierwszych

substancji wyniki zgodne z danymi literatury, zaś dla alkoholu zbyt niskie.

4. Próby wytwarzania kefiru z czystych kultur wyodrębnionych mikroorganizmów dały wynik dość dobry.

Otrzymany produkt, przy użyciu typu C kokków, typu A kokków oraz którychkolwiek drożdży (działanie ich było jednokowe), miał konsystencję typową dla kefiru — gęsto-płynną, jednolitą a różną od konsystencji zsiadłego mleka często wstrząsanego. Smak jego był kwaśny lub słodko kwaśny, lekko musujący. W czasie trzech dni dojrzewania ulegała nieznacznemu zwiększeniu kwasowość przetworu oraz wzrastała zawartość gazu.

a) W nieobecności typu A smak był znacznie mniej kwaśny, a Ph wyższe.

b) W nieobecności typu C smak był bardziej ostry i konsystencja nie była tak jednolita.

c) W braku drożdży napój nie zawierał gazu, zaś przy ich nadmiarze występował wadliwy smak ciasta.

d) *Oidium lactis* po 24 godzinach nie wpływało na smak napoju a po 72 godz. wywołało smak zjełczały (zwłaszcza przy użyciu tłustego mleka).

5) Stąd wynika, że niezbędne do wytworzenia napoju o cechach kefiru są typy A i C kokków oraz drożdże i że bez pałeczek *Bacillus caucasicus* można taki napój wytworzyć.

6) Analiza chemiczna otrzymanego przetworu wykazała, że zawartość tłuszczu, alkoholu i kwasu mlekowego jest analogiczna do podawanej w literaturze.

7) Gatunek surowca (mleka) wpływa bardzo wybitnie na smak kefiru. Mleko handlowe warszawskie czerpane stale z tego samego źródła było w jednym wypadku zbyt tłuste, a w innych zupełnie odpowiednie. Przy użyciu mleka odtłuszczonego otrzymany produkt był mniej smaczny i bardziej kwaśny.

Niech mi wolno będzie i na tem miejscu złożyć p. prof. Dr. K a z i m i e r z o w i B a s s a l i k o w i, kierownikowi Zakładu fizjologii roślin U. W., wyrazy głębokiego podziękowania za temat i kierownictwo niniejszą pracę.

Zakład fizjologii roślin Uniw. Warszawskiego.

BIBLIOGRAPHIE.

1. A b d e r h a l d e n. Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden. T. 5, 1911 r.
2. A d a m e t z L. Centralbl. f. Bacteriologie. II. Abt. 5, 1889 r.
3. B e i j e r i n c k, M. W. Sur le Kéfir. Verzamelde Geschriften van Beijerinck vol. II. p. 210.
4. B i e l. Pharm. Zeitung für Russland XXV Nr. 11 i 18 (cytowane wg. Freudenreich'a).
5. E s s a u l o w N. Über Kefir. Dissert. Moskau. 1895 (cyt. wg. Freudenreich'a).
6. F r e u d e n r e i c h E. Bakteriologische Untersuchung über Kefir. Centralbl. f. Bakt. II. Abt. III 1897 r.
7. H a m m a r s t e n. Über Kefir. Agrkult. Centralblatt (cyt. wg. Freudenreich'a).
8. H e n n e b e r g. Handbuch der Gärungsbakteriologie t. II.
9. O r l a J e n s e n. Hauptlinien d. natürl. Bakteriensystems. Centrbl. f. Bakt. II. Abt. t. 22. 1909.
10. J ö r g e n s e n. Die Mikroorganismen der Gärungsindustrie 1909 r.
11. K e r n Ed. Über ein neues aus d. Caucasus stammendes Kefir-Ferment. Bull. de la Societé des Naturalistes de Moscou t. 5, str. 141, 1881.
12. K r a n h a l s. Über das Kumysähnliche Getränk Kephir und über d. Kephirpilz. Deutsches Arch. f. Klinische Med. 35, 1884 r. 18.
13. K r u s e w Lafars Handbuch der techn. Mykologie II tom.
14. M o r r e s (cyt. wg. Teichert'a).
16. N i k o l a j e w a. Die Mikroorganismen des Kefir. Bull. du jardin bot. du St. Pétersbourg t. VII, 1907 r.
15. M a k r i n o w u. S t r o h b i n d e r. Morph. und biochem. Besonderheiten des Bact. Caucasicum. Centralbl. f. Bact. II. Abt. 1929 r.
17. T e i c h e r t, K u r t. Methoden zur Untersuchung der Milch und Molkereiprodukte.
18. W e i g m a n n, H. Pilzkunde der Milch. Berlin 1924 r.
19. „ Butter, Käse und Milchpräparate. 1931 r.

R E S U M É.

Le kéfir est le produit de la fermentation du lait par des levures et des bactéries, — fermentation à la fois alcoolique et lactique.

Les données sur le kéfir, que nous trouvons dans la littérature, se laissent résumer comme suit:

1) Le kéfir est produit par la coopération (symbiose) de bactéries avec des levures, les bactéries acidifiant le lait et les levures provoquant une fermentation alcoolique.

2) Les bactéries qui prennent part à cette fermentation sont, d'après Kern — *Dispora caucasica*, d'après Beijerinck —

Lactobacillus caucasicus Beij. F r e u d e n r e i c h est d'avis que les principaux agents de la fermentation sont le *Bacillus caucasicus* et deux espèces de coques qu'il dénomme *Streptococcus A* et *Streptococcus B*. Enfin N i k o ł a j e w a considère les coques comme agents accessoires et attribue le rôle principal dans l'acidification au *Bacterium caucasicum*, identique avec les bacilles de B e i j e r i n c k et de F r e u d e n r e i c h.

3) La levure du kéfir appartient d'après K e r n, au groupe des levures de bière. D'autres auteurs considèrent qu'il s'agit d'une levure spécifique au kéfir, ces levures sont d'habitude non sporulées (gen. *Torula*), mais J ö r g e n s e n et H e n n e b e r g ont isolé du kéfir des levures formant des spores (gen. *Saccharomyces*).

Nos propres recherches avaient pour but l'étude de la microflore des kéfirs qu'on vend à Varsovie, et ont été conduites dans trois directions différentes:

- 1) isolement des microorganismes du kéfir;
- 2) détermination de la quantité de graisse, d'alcool et d'acide lactique;
- 3) essais de production de kéfir par ensemencement avec les cultures pures obtenues.

Pour l'isolement des microorganismes, j'employais la gélatine ou la gélose avec du lait ou du petit lait comme substance nutritive. Le lait et le petit lait servaient aussi comme milieu de culture liquide.

L'isolement a été entrepris par la méthode des boîtes de Pétri, on ensemençait soit directement avec du kéfir, soit après passage par le lait pour avoir des cultures de 24 heures.

On a étudié les capacités fermentatives des levures sur différents sucres et leurs capacité de former des spores.

Les graisses ont été déterminées par la méthode de G o t t l i e b - R o s e, l'alcool par la méthode de M a r t i n et l'acide lactique par la titration.

Les essais de production de kéfir furent exécutés par ensemencement de lait stérilisé dans des bouteilles avec différentes combinaisons des microorganismes isolés.

Voici les principaux résultats de mes recherches:

1) Les microorganismes constants du kéfir de Varsovie sont les suivants:

- a) des coques appartenant au genre collectif *Streptococcus lacticus* K r u s e, dont j'ai isolé trois types: les types

A et C caractéristiques pour le kéfir et le type B, qui coagule le lait très rapidement en une masse tout à fait solide;

- b) des levures ovales (longueur des cellules à peu près 5 μ , largeur 3 μ) fermentant le sucre et ne formant pas de spores, en quoi elles ressemblent à *Saccharomyces Kéfir* Beij. et à *Torula lactis* Adametz; j'ai isolé trois types qui ne diffèrent que légèrement.
- c) *Oidium lactis* qui est un composant nuisible de la microflore du kéfir, provoquant un goût amer et rance dans les cultures plus âgées.

2) Dans aucun des kéfirs étudiés, je n'ai pu découvrir le microorganisme le plus caractéristique du kéfir: *Dispora caucasica* Kern ou *Lactobacillus causicus* Beij., *Bacillus causicus* Freud., *Bacterium causicum* (Nikołajewa). Ni l'isolement, ni l'étude des préparations colorées du kéfir n'ont permis de le trouver.

3) Les analyses chimiques des kéfirs de Varsovie ont donné pour les graisses et l'alcool des valeurs semblables aux données de la littérature et pour l'acide lactique des valeurs trop basses.

4) Les essais de production du kéfir par les cultures pures isolées ont donné des résultats satisfaisants. En employant les types A et C des coques, et une des trois levures, on obtenait un produit à consistance semi-liquide et très homogène, caractéristique pour le kéfir et très différent de la consistance du lait caillé. Le goût de ce produit était acide ou acide et sucré, le liquide moussait légèrement. Au cours de trois jours de fermentation l'acidification et la quantité de gaz augmentaient.

- a) En l'absence des coques type A, le goût était moins acide et le Ph plus élevé.
- b) En l'absence des coques type C, le goût acide était très prononcé et la consistance du liquide moins homogène.
- c) En l'absence de la levure, la boisson ne contenait pas de gaz; lorsque la quantité de levure était trop grande, la boisson avait un goût désagréable de pâte fraîchement levée.
- d) *Oidium lactis* n'a pas d'influence sur le goût du kéfir pendant les premières 24 heures de la fermentation, après 72 heures il lui donne un goût rance et amer très désagréable.

5) L'analyse chimique a démontré que le taux des graisses, de l'alcool et de l'acide lactique dans le produit obtenu était pareil à celui des kéfirs analysés par les autres auteurs.

6) Il s'ensuit que les coques type A et C et la levure sont indispensables pour la production du kéfir et qu'on peut obtenir une boisson ayant toutes les propriétés caractéristiques du kéfir sans l'intervention du *Bac. caucasicus*.

7) La qualité du lait a une grande influence sur le goût du kéfir. On a parfois acheté à Varsovie du lait qui contenait trop de graisse (3,2%). En employant du lait dégraissé on obtenait une boisson trop acide.

Institut de physiologie végétale de l'Université de Varsovie.