



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	UNTERSUCHUNGEN UEBER DIE HYOCHI-BAZILLEN IM SAKE
Author(s)	OTANI, Yoshio
Citation	Journal of the Faculty of Agriculture, Hokkaido Imperial University, 39(2), 49-142
Issue Date	1936-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/12714
Type	departmental bulletin paper
File Information	39(2)_p49-142.pdf



UNTERSUCHUNGEN UEBER DIE HYOCHI-BAZILLEN IM SAKE

VON

YOSHIO OTANI

[Mit 6 Textfiguren u. Tafel II]

Inhaltsübersicht

Einleitung	51
Frühere Untersuchungen über die Hyochi-Bazillen	51
Betrachtungen über die Verhütung und Vorausbestimmung der Sakefäulnis	52
L. Wachstumsfördernde Substanzen für die Hyochi-Bazillen	53
A. Sammlung der Proben und Festsetzung des Standard-Stamms	55
B. Einige vorläufige Versuche für Erforschung wachstumsfördernder Substanzen	56
1. Auswahl eines geeigneten Nährbodens	56
2. Die das Wachstum der Hyochi-Bazillen gestattenden Bestandteile im Sake	57
3. Einfluss der Vorkultur und der Impfungsmenge	59
C. Ueber den wachstumsfördernden Einfluss der verschiedenen Stoffe	60
1. Herstellung der Nährböden	60
2. Der Einfluss der verschiedenen Stoffe auf die wachstumsförderung	61
D. Physikalische und chemische Eigenschaften der wachstumsfördernden Substanzen	63
1. Adsorptionsfähigkeit	63
2. Einfluss der chemischen Reaktion und der Temperatur	63
3. Permeabilität bei Dialyse	65
4. Einfluss der Lösungsmittel	66
5. Einfluss der Niederschlagsmittel	67
6. Vergleichende Zusammenstellung der Eigenschaften der wachstumsfördernden Substanzen	71
E. Vergleichende Gegenüberstellung der Eigenschaften der wachstumsfördernden Substanzen von Hyochi-Bazillen und Hefen	72
1. Versuchsmethode	74
2. Einfluss der Fraktionsflüssigkeit	74
3. Der Einfluss der Konzentration von Vitamin B ₁ und B ₂	79
4. Unterschiede in den Eigenschaften der das Wachstum von Hyochi-Bazillen und desjenigen von Hefe fördernden Substanzen	82
F. Lassen sich die wachstumsfördernden Substanzen der Hyochi-Bazillen durch Aminosäuren und Peptide ersetzen?	82
1. Der Einfluss von verschiedenen Aminosäuren und Peptiden	83

	2. Der Einfluss der Menge von Aminosäuren und Peptiden	84
G.	Der Einfluss der Zuckerarten auf das Wachstum der Hyochi-Bazillen	85
	1. Der Einfluss von verschiedenen Zuckerarten	85
	2. Einfluss der benutzten Zuckermenge	86
H.	Schlussbetrachtung und Zusammenfassung	87
II.	Einfluss exogener Bedingungen auf das Wachstum der Hyochi-Bazillen ...	88
	A. Temperaturverhältnisse	88
	1. Wachstumstemperatur	89
	2. Tötungstemperatur	91
	3. Zusammenfassung	94
	B. Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration	94
	1. Versuchsmethode	95
	2. Versuchsergebnisse	95
	3. Schlussbetrachtung und Zusammenfassung	102
	C. Der Einfluss verschiedener Säuren	103
	1. Versuchsmethode	104
	2. Angewandte Säuremenge	104
	3. Versuchsergebnisse	105
	D. Einfluss der Qualität des Sake	112
	1. Versuchsmethode	112
	2. Versuchsergebnisse	113
	3. Schlussbetrachtung und Zusammenfassung	117
	E. Zusammenfassung	117
III.	Die Veränderungen der chemischen Bestandteile des Sake bei der Entwicklung der Hyochi-Bazillen	118
	A. Veränderungen der allgemeinen chemischen Bestandteile	119
	B. Veränderungen der stickstoffhaltigen Substanzen	119
	C. Veränderungen der Zuckermenge	122
	D. Veränderungen der Säuren	124
	1. Veränderungen der Gesamt-, flüchtigen und nichtflüchtigen Säuren	124
	2. Isolierung der nichtflüchtigen Säuren in Normal- und Fäulnis-Sake	125
	3. Veränderungen der Bernstein- und Milchsäure	128
	E. Zusammenfassung	129
IV.	Systematische Untersuchung der Hyochi-Bazillen	130
	A. Isolierung	131
	B. Identifikation	131
	C. Beschreibung der isolierten Bakterien	132
	<i>Lactobacillus Hyochi</i> n. sp.	132
	<i>Lactobacillus Hyochi</i> var. 1	134
	<i>Lactobacillus Hyochi</i> var. 2	134
	<i>Lactobacillus filamentosus</i> n. sp.	134
	<i>Lactobacillus alcoholophilus</i> n. sp.	135
	<i>Lactobacillus saprogenes</i> n. sp.	136
	D. Schlussbetrachtung	137
	E. Zusammenfassung	138
Schluss	139
Literatur	140
Erklärung der Abbildungen		

EINLEITUNG

Der japanische Sake (Reiswein oder Reissbier) erleidet zuweilen bei längerer Aufbewahrung gewisse Veränderungen wobei Trübung, Säuerung oder ein eigenartiger, unangenehmer Geruch auftreten. Da diese Entartungserscheinungen in Japan gewöhnlich als „Hyochi“ (Verfaulen) bezeichnet werden, hat man die sie hervorrufenden Bakterien „Hyochi-Bazillen“ genannt. Die Menge des alljährlich durch Einwirkung von diesen Bazillen entartenden Sake ist recht beträchtlich. Deshalb hat man schon seit langem versucht, eine Methode zur vollständigen Beseitigung dieses Schädlings zu ermitteln, jedoch bisher ohne einen Erfolg zu zeigen.

Um die Entwicklung der Hyochi-Bazillen wirksam bekämpfen zu können, ist es zunächst notwendig, die Entstehungsursache und das Wesen dieser Bazillen klar zu stellen. So habe ich mit diesem Ziel in Auge die vorliegende Arbeit ausgeführt.

Frühere Untersuchungen über die Hyochi-Bazillen.

Die Tatsache der Sakefäulnis war in Japan schon seit langen Jahren bekannt. Es wurden folgende wissenschaftlichen Erklärungen dafür gegeben. ATKINSON (1) erwähnte zuerst in seinem im Mai 1881 erschienenen Buche über die Sake-Brauerei einige lange stäbchenförmige Bakterien als die Erreger der Sakefäulnis. K. OTANI (2) isolierte aus Fäulnis-Sake einige Arten aerobischer Bakterien und äußerte die Ansicht, daß diese die Urheber der Sakefäulnis seien, jedoch fand später TORII (3) anaerobische Bakterien als eigentliche Erreger der Sakefäulnis. TAKAHASHI (4) berichtete, daß außer diesen Bakterien noch eine Art von Kahlhefe bei dem Auftreten der Sakefäulnis eine Rolle spielt. Derselbe Autor (5) isolierte dann verschiedene Arten von Sakefäulnis hervorrufenden Bakterien und bezeichnete den eigentlichen Fäulniserreger als „*Bacillus saprogenes Saké*“. Von demselben unterschied er einzelne Varietäten, welche entweder im Hefewasser Wachstum zeigten oder verschiedene Grade der Zuckerassimilation erkennen ließen. Die Eigenschaften der einzelnen Varietäten wurden genau untersucht. Er isolierte verschiedene Organismen von Milchsäurebakterien, Essigsäurebakterien und Kahlhefearten, die mit der Sakefäulnis in Beziehung stehen. Weiter untersuchte er (6) die verschiedenen Einflüsse auf das Wachstum dieser Organismen. YEDA (7) fand in einem während des Sommers gebrautem verdorbenen Sake einen Milchsäurebazillus. Dieser entwickelt sich während des Brauprozesses und verbreitet einen üblen Geruch.

Sowohl ZENTA (8) als auch TAKAHASHI (9) (10) führten noch weitere derartige Untersuchungen aus.

1913 stellte TAKAHASHI (11) fest, daß bei Sake-Fäulnis der Gehalt an Aminosäuren erhöht wird. Daraufhin bestimmte er von lagerndem Sake in gewissen Zeit-Abständen den Aminosäuregehalt, um auf diese Weise das Fortschreiten der Bakterienentwicklung zu bemessen. KURONO (12) verglich chemische Bestandteile von einwandfreiem und von Fäulnis-Sake und fand, daß in dem ersteren mehr Lysin, in dem letzteren dagegen mehr Kadaverin und Histamin enthalten ist. Dieser Autor (13) beschrieb zusammen mit MUROMOTO die Widerstandsfähigkeit der verschiedenen Alkoholsorten gegen Bakterien und teilte mit, daß die Sterilisationsfähigkeit der Alkohole umso stärker ist, je größer die Zahl der C-Atome (Kohlenstoff-Atome) im Molekül seiner Verbindung ist. Vor kurzem führte YAMAZAKI (14-15) einige Versuche mit dem Hyochi-Bazillus durch. Dabei studierte er insbesondere die Beziehungen zwischen Wasserstoffionenkonzentration des Sake und dem Wachstum des Bazillus. Weiter untersuchte er die wachstumsfördernde Wirkung von Leberstückchen auf diesen Bazillus.

Betrachtungen über die Verhütung und Vorausbestimmung der Sakefäulnis

Es gibt verschiedene Bekämpfungsmittel, von denen jedoch nur eines nämlich die Salicylsäure, nach den amtlichen japanischen Nahrungsmittelvorschriften zugelassen ist. Auch die Anwendung dieser ist Beschränkungen unterworfen, u. zw. ist es erlaubt auf ein Koku Sake (180.39 Liter) bis auf 10 Momme Salicylsäure (37.5 g) zuzusetzen, was etwa 0.02 % entspricht. Jedoch reicht diese Menge Salicylsäure nicht im entferntesten aus, um den Sake vor Fäulnis und mancherlei Veränderungen zu bewahren. Auch vom hygienischen Standpunkte aus kann man die Anwendung von Salicylsäure keineswegs befürworten.

Die Wärmesterilisation, das heißt die Pasteurisierung, des Sake findet vielfach Verwendung und wird in Japan als „Hiire“ bezeichnet. Der Hyochi-Bazillus wird da er sporenlos ist schon bei einer etwa 20 Minuten langen Aufbewahrung in einer Temperatur von 55° bis 60°C getötet. Die wichtigsten Nachteile dieser Pasteurisationsmethode sind folgende: Wenn die Pasteurisation zu lange dauert, verändern sich Eigenschaften des Sake, ist sie dagegen von zu kurzer Dauer, so sind die Bakterien noch nicht vollständig getötet; öffnet man ein Gefäß pasteurisierten Sakes so ist man genötigt diesen sofort zu benutzen oder aber die Pasteurisation zu wieder-

holen. Dies verursacht jedoch erhebliche Kosten, verringert zudem die Sakemenge durch Verdampfen und beeinträchtigt schließlich auch die Qualität.

Falls es gelingen sollte, die Sakefäulnis vollständig zu verhindern, so würde sich ja von selbst jede Vorausbestimmung derselben erübrigen. Nach dem augenblicklichen Stande der Forschung ist es jedoch noch immer unerlässlich den lagernden Sake dann und wenn auf eventuelle beginnende Fäulniserscheinungen zu untersuchen. TAKAHASHI (11) gibt hierfür als eine Methode an, den Gehalt des Sake an Aminosäure zu bestimmen durch deren zu hohen Gehalt man zur rechten Zeit gewarnt werden könne. Weiter führt er eine Methode (5) an, bei der eine aus einem Stammgefäß entnommene Probe Sake mit bakterienfreiem Wasser verdünnt wird, so daß eine Abschwächung der bakterienfeindlichen Substanzen, z. B. Alkohol, erfolgt wodurch bewirkt wird, daß selbst eine geringe Menge von Bakterien sich rasch und ungehindert vermehren können. Aus einem positiven Ergebnis der Probe kann man auf eine für den Sake im Stammgefäß bestehende Fäulnisgefahr schließen, und ist noch bei Zeiten im Stande die nötigen Maßnahmen zu treffen. Vor kurzem veröffentlichte YAMAZAKI (15) eine noch bessere Methode zur Vorausbestimmung der Fäulnis. Hierbei werden einzelne Stücke von Tierleber zu dem mit Wasser verdünnten Sake hinzugefügt, worauf eine bedeutend stärkere Bazillenentwicklung eintritt als bei der einfachen Verdünnungsmethode ohne Leberstückchen. Diese Methode hat jedoch den grossen Nachteil, daß der ziemlich starke Lebergeruch den sonst so charakteristischen Hyochi-Geruch völlig übertönt und nicht zur Geltung kommen läßt.

I. WACHSTUMSFOERDERNDE SUBSTANZEN FUER DIE HYOCHI-BAZILLEN

Schon seit langer Zeit ist die Existenz einiger das Wachstum von Mikroorganismen fördernden Substanzen bekannt. Im Folgenden gebe ich einige diesbezügliche Arbeiten wieder.

Im Jahre 1901 stellte WILDIERS (16) fest, daß Hefe in einem bestimmten Medium, welches er wählte, kaum imstande war, sich zu entwickeln. Dagegen konnte er beobachten, daß solche Hefe, welcher Malz- oder Hefeextrakt zugesetzt war, sich gut entwickelte. Den dafür verantwortlichen Entwicklungsfaktor bezeichnete er als "Bios". Auch KOSSOWICZ (17) konnte dieselben Beobachtungen wie WILDIERS machen. Lange Zeit später wurde dann 1911 von SUZUKI (18) und FUNK (19)

unabhängig voneinander das „Vitamin“ entdeckt, welches zunächst als ein Mittel gegen Nervenentzündung aus Reiskleie gewonnen wurde. Diese Substanz wurde von SUZUKI als „Oryzanin“ und von FUNK als „Vitamin“ (jetzt Vitamin B Komplex) bezeichnet. Seitdem folgten in schneller Reihenfolge vielerlei Vitaminversuche.

Da sich Bios und Vitamin B meist in den selben Substanzen vorkamen und man damals noch keine genaue Unterscheidungsmethode kannte, wußte man auch noch nicht, ob es sich bei den beiden etwa um die gleiche Substanz handelte oder nicht.

Im Jahre 1919 veröffentlichte WILLIAMS (20) eine Arbeit, in der er behauptete, daß es sich bei Bios und Vitamin B um ein und dieselbe Substanz handle. Deshalb benutzte man damals vielfach die Bestimmung der Hefe-Wachstumsfähigkeit als Beweis für das Vorhandensein von Vitamin B (21-23).

Jedoch beweisen FUNK und DUBIN (24) daß keinerlei Zusammenhang zwischen Vitamin B und Hefewachstum besteht, indem sie Vitamin B in 10 %iger Natronlauge kochten wonach sich zeigte, daß obwohl das Vitamin B seine Wirkung verlor, dennoch die Hefe in ihrem Wachstum nicht gehindert wurde. Auch andere Autoren (25-30) vertraten in jener Zeit die Ansicht, daß es sich bei Vitamin B und Bios um zwei verschiedene Substanzen handele.

Auf dem Gebiete der Bakterien war es BERTRAND (31) der im Jahre 1904 feststellte, daß das Wachstum von Kulturen des *Bacterium xylinum* durch Zusatz von Hefeextrakt gefördert wird. NOGUCHI (32) beobachtete, daß sich eine Spirochaetenkultur auf Stierhoden gut entwickelte. Weiterhin wurden zunächst von PANICI und RUSSEL (33) und später von anderen vielerlei Arbeiten (34-42) über die Einwirkung von Vitamin B oder ähnlichen Substanzen auf die Bakterienentwicklung veröffentlicht. Das dazu verwendete Material wurde im allgemeinen aus Rohvitaminen, Tierlebern, Pflanzenteilen, Pflanzensäften, Blutalkoholextrakten oder Zitronensaft hergestellt. Auch sonst finden sich in neuerer Zeit vielerlei Veröffentlichungen über Versuche zur Förderung des Bakterienwachstums. Kürzlich veröffentlichten HOSOYA und KUROYA (43) eine Arbeit, in der sie die Bakterien, je nachdem dieselben auf eine ihr Wachstum fördernde Substanz reagieren, in 4 verschiedene Gruppen einteilten. Ich erwähnte schon früher, daß YAMASAKI (15) das Wachstum von Hyochi-Bazillen durch Zusatz von Tierleber förderte.

Im folgenden Abschnitt möchte ich die verschiedenen Stoffe, die für die Hyochi-Bazillen wachstumsanregend wirken aufzählen, sowie ihren

Charakter und ihre Eigenschaften beschreiben und endlich versuchen die verschiedenen Faktoren, die hierbei mitspielen, klarzulegen.

A. Sammlung der Proben und Festsetzung des Standard-Stamms

Vor Beginn meiner Untersuchungen sammelte ich verschiedenerlei Proben von Fäulnis-Sake, und zwar sowohl von solchem der sich in Tonnen und Fässern, wie auch solchem der sich in Flaschen befunden hatte. Das Stadium und der Grad der Fäulnis waren bei den einzelnen Proben verschieden. Unter den Proben befand sich eine Anzahl, die starke Trübung zeigten, bei anderen war ein Bodensatz zu bemerken wieder andere wiesen einen Hyochi- oder einen Fäulnisgeruch, weitere einen Essigester Geruch auf. Einzelne Proben rochen verbrannt, während sich bei einer Anzahl anderer überhaupt kein besonder Geruch zeigte.

Mittels mikroskopischer Beobachtung konnten in allen Proben Bakterien gefunden werden. Die Gestalt derselben war teils lang, teils kurz, jedoch handelte es sich immer um Stäbchenbazillen, die sich bewegungslos zeigten. Andere Mikroorganismen ließen sich nicht feststellen.

Als Weiteres setzte ich den Standard-Stamm fest. Dabei benutzte ich Milchflaschen, die ein Fassungsvermögen von 200 ccm hatten. In diese füllte ich 150 ccm des mit 20 % sterilisiertem Wasser verdünntem Sake ein. Dazu fügte ich 0.1 ccm von jeder Hyochi-Probe. Die Flaschen wurden dann verkorkt und solange bei einer Temperatur von 30° C aufbewahrt, bis die Bakterien eine lebhafte Entwicklung zeigten. Dann entnahm ich mit einer Kapillarröhre einen Tropfen aus der Flasche und impfte damit einen neuen, gleichartigen Nährboden. Dieses wiederholte ich einige Male in derselben Weise. Dieselbe Uebertragung wurde noch einige Male bei Anwendung von unverdünntem Sake vorgenommen. Die Bazillen, die sämtliche Studien durchlaufen hatten, wurden dann schließlich für die weiteren Versuche verwendet. Sie wiesen den charakteristischen Hyochi-Geruch auf, zeigten sich ziemlich widerstandsfähig und ließen sich unter dem Mikroskop leicht als Stäbchenbazillen erkennen.

Ich benutzte einen solchen Standard-Stamm, da es keinen eigentlichen Hyochi-Bazillus als besondere Bakterienart gibt und weil isolierte Hyochi-Bazillen auf verschiedenen Nährböden allmählich in ihrer Entwicklungsfähigkeit geschwächt werden (9). Um den Zweck unserer Versuche auch wirklich erreichen zu können, ist es außerdem unerlässlich über einen Stamm besonders kräftiger und entwicklungsfähiger Bazillen zu verfügen.

In der Absicht auch die Entwicklungsfähigkeit der Bazillen konstant zu halten und zu standardisieren benutzte ich einen Stamm, der aus einer Suspension in einem 10 Tage bei 30°C aufbewahrtem Sake hervorgegangen war.

B. Einige vorläufige Versuche für Erforschung wachstumsfördernder Substanzen

In Bezug auf die wachstumsfördernden Substanzen habe ich zunächst einige Hauptfaktoren berücksichtigt und möchte im folgenden kurz über diese Untersuchungen berichten.

(1) Auswahl eines geeigneten Nährbodens

Um einen geeigneten Nährboden zu finden, probierte ich verschiedene Nährflüssigkeiten durch, wie Sake, Koji-Extrakt, Malzwürze, Hefewasser und Nährouillon.

Die Nährflüssigkeiten (mit Ausnahme des Sake) wurden nach der allgemein gebräuchlichen Methode hergestellt, indem sie 3 Tage lang täglich je 30 Minuten in strömendem Dampf sterilisiert wurden. Bei den alkoholhaltigen Nährböden erfolgte der Zusatz des Alkohols stets erst nach der eben beschriebenen Sterilisation wobei der Alkoholgehalt auf ungefähr 13 % eingestellt wurde. Die Nährflüssigkeiten wurden immer daraufhin kontrolliert, eine ganz schwach saure Reaktion zu zeigen. Den Sake filtrierte ich mit Entkeimungsschichten der Seitz-Werke ohne dabei Erhitzung anzuwenden. Zu meinen Versuchen benutzte ich Reagensgläser, die ich mit je 15 ccm der betreffenden Nährflüssigkeit füllte. In diese wurde sodann mit einer Kapillarröhre ein Tropfen des Hyochi-Bazillen enthaltendes Sake eintropfen lassen. Das Bazillenwachstum wurde durch die Trübung oder den Bodensatz in der betreffenden Nährflüssigkeit gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle I niedergelegt.

Wie aus Tabelle I hervorgeht, entwickeln sich die Bazillen bei weitem am besten in Sake, dann folgt Hefewasser. Im Koji-Extrakt findet nur eine geringe Entwicklung statt während die anderen Nährflüssigkeiten überhaupt keine solche erkennen lassen. In Nährsubstanzen, die in zwei Variationen einmal ohne Alkohol und einmal mit Alkohol, zur Verwendung gelangten zeigte sich die Bazillenentwicklung in der letzteren Variation als lebhafter, jedoch kann man nicht mit absoluter Sicherheit behaupten, daß stets die letztere Variation einen besseren Nährboden bilde. Ver-

TABELLE I

Versuchsdauer (Tage)	3		8	
	Trübung	Bodensatz	Trübung	Bodensatz
Sake	±	+	++	++
Sake mit 20 % wasser	+	+	++	++
Koji-Extrakt	-	-	-	±
Koji-Extrakt mit Alkohol	±	±	+	±
Malzwürze	-	-	-	-
Malzwürze mit Alkohol	-	-	-	-
Hefewasser	±	±	+	+
Hefewasser mit Alkohol	±	±	+	+
Nährbouillon	-	-	-	-
Nährbouillon mit Alkohol	-	-	-	-

Bemerkung: - kein, ± Spur, + Die Stärke der Entwicklung durch die Anzahl der + wiedergegeben.

gleicht man die Erscheinungen in dem mit Wasser verdünnten Sake mit demjenigen ohne Wasserzusatz, so zeigt sich, daß der erstere anfänglich eine größere Bazillen-Wachstumsgeschwindigkeit aufweist.

(2) Die das Wachstum der Hyochi-Bazillen gestattenden Bestandteile im Sake

Um festzustellen, welche Bestandteile des Sake der Entwicklung unserer Bazillen besonders günstig sind, wurde der Sake in seine Bestandteile zerlegt und die folgenden Versuche vorgenommen.

300 ccm Sake wurden bei niedriger Temperatur in einer Destillationsflasche bei erniedrigtem Druck solange destilliert bis die Menge nur noch ein zehntel des ursprünglichen Volums betrug. Weiterhin wurde die Hälfte dieses Destillationsrückstandes in einen Scheidetrichter gefüllt und die dreifache Menge Aether zugesetzt. Dieses Gemisch nach öfterem schütteln, 2 Tage lang stehen lassen und schließlich getrennt, wobei eine ätherische Lösung von kolloidartigen Substanzen und eine wässrige Lösung solcher erhalten wurde. Zu dem ätherlöslichen Teil wurden 15 ccm destilliertes Wasser zugesetzt und der Aether auf dem Wasserbade verdampfen lassen. Auch der nicht in Aether lösliche Teil wurde über dem Wasserbade erwärmt und auf diese Weise der gelöste Aether entfernt.

So hatte ich schließlich 3 Sorten von Sake-Konzentrationsrückständen getrennt, nämlich den ursprünglichen Destillationsrückstand, den ätherlöslichen Teil und ätherunlöslichen Teil. Außer diesen benutzte ich noch Koji-Extrakt, Hefewasser, Fleischextrakt, eine synthetische Nährlösung (Asparagin 0.5 %, KH_2PO_4 0.2 %, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 %, Glukose 10%), Alkohol (bei Alkoholzusatz wurde der Alkoholgehalt der betreffenden Nährlösung auf etwa 13 % eingestellt) und Leitungswasser. Ich stellte aus allen diesen Substanzen durch vielerlei Kombinationen verschiedene Nährflüssigkeiten her. Die Ausführung der Versuche mit diesen Substanzen war im einzelnen dieselbe wie bei den früheren Experimenten.

Die Zusammenhänge zwischen den verschiedenen Nährflüssigkeiten und der Wachstumsfähigkeit der Bazillen sind aus der folgenden Tabelle ersichtlich:

TABELLE II

Kulturdauer (Tage)	7	
	Trübung	Bodensatz
Nährflüssigkeiten		
Sake	++	++
Sake mit 30 % Wasser	++	++
Destillationsrückstand 1: Destillate 9	+++	++
Aetherunlöslicher Teil 1: Destilliertes Wasser 9	+++	+++
Aetherunlöslicher Teil 1: Alkohol 9	++	++
Aetherunlöslicher Teil 1: Leitungswasser 9	++	+
Koji-Extrakt 5: Destillate 5	+	±
Hefewasser 5: Destillate 5	+	±
Fleischextrakt 5: Destillate 5	±	±
Aetherlöslicher Teil 1: Destillate 9	—	—
Aetherlöslicher Teil 1: Synthetische Nährlösung 4: Destillate 5	—	—
Aetherlöslicher Teil (Neutralisiert) 1: Destillate 9	—	—
Aetherlöslicher Teil 1: Synthetische Nährlösung 4: Destillate 5	—	—
Aetherlöslicher Teil 1: Koji-Extrakt 4: Leitungswasser 5	—	—
Aetherlöslicher Teil 1: Hefewasser 4: Leitungswasser 5	—	—
Aetherlöslicher Teil 1: Fleischextrakt 4: Leitungswasser 5	—	—

Wie man aus der obigen Tabelle ersehen kann, sind zweifellos die Entwicklung der Hyochi-Bazillen fördernde Bestandteile in dem Konzentrationsrückstand des Sake enthalten, u. zw. in dem in Aether unlöslichen Anteilen des Sake-Destillationsrückstandes. Bei den Sake-Destillaten und anderen Nährflüssigkeiten mit Alkoholzusatz tritt ein Bazillenwachstum lebhafter auf als bei Nährlösungen mit Wasserzusatz. Bei Verwendung

des ätherlöslichen Teil der Sake-Destillierungsrückstände ist fast keine Bazillenentwicklung zu bemerken.

(3) Einfluss der Vorkultur und der Impfungsmenge

Je nach der Vorkultur weist die Entwicklung der nächsten Generation der Bakterien verschiedene Varianten auf. Da mit der Einimpfung der Bakterien zugleich etwas von der früheren Nährflüssigkeit in die neue gelangt, ist es selbstverständlich, daß auf diese Weise die erstere auch einen gewissen Einfluß auf die Bazillenentwicklung in der letzteren hat. Außerdem spielt natürlich auch noch die Impfmenge eine große Rolle bei der Bazillenentwicklung. Um diese Beziehungen aufzuklären, machte ich die im folgenden beschriebenen Versuche.

Als Nährboden für die Vorkultur verwendete ich Sake, dem 20 % keimfreies Wasser zugesetzt wurde, weiterhin einen mit ebensoviel sterilisiertem Wasser verdünnten Sake unter Zusatz von gekochten Azuki-Bohnen und endlich die gleiche Flüssigkeit, zu der nur statt der Bohnen Tierleber hinzugefügt wurde. In diese Nährflüssigkeiten wurden nun Hyochi-Bazillen eingepflegt und die Kulturen 10 Tage lang bei 30°C aufbewahrt. Als Nährlösung für die nächste Generation verwendete ich außer den oben angeführten drei Flüssigkeiten noch mit 20 % Wasser verdünnten Sake, dem einmal Oryzanin und das andere Mal Hefewasser zugesetzt wurde, sodaß sich die Zahl der Nährflüssigkeiten auf fünf erhöhte. Die Impfmenge, die beim Zusatz in die zweite Kultur verwendet wurde, kam in drei Serien zur Anwendung. Bei der einen Reihe wurde eine Platinöse, bei der nächsten ein Tropfen aus einer Kapillarröhre und bei der dritten wurden drei Tropfen aus einer Kapillarröhre zugesetzt. Falls sich bei der Vorkultur ein starkes Wachstum zeigte, ließ sich auch nach der Einimpfung in die zweite Kultur ein schnelles Fortschreiten der Bazillenentwicklung beobachten. Ebenso ging das Bazillenwachstum lebhafter vor sich, wenn die eingepflegte Menge eine größere war. Nach längerer Zeit vermindert sich jedoch der Einfluß der Vorkultur und der Impfungsmenge und das Wachstum wird hauptsächlich von dem nächsten Kulturzustand beeinflusst. Um einen Einfluß der Vorkultur auf die nächste Generation möglichst auszuschalten, bewahrte ich den Stamm in Sake bei einer Temperatur von 30°C 10 Tage lang auf und impfte dann eine Platinöse dieser Vorkultur in die neue Nährflüssigkeit ein.

C. Ueber den wachstumsfördernden Einfluss der verschiedenen Stoffe

Bei meinen Untersuchungen über die Hyochi-Bazillen benutzte ich zuerst Tierleber zur Wachstumsbeförderung. In der Folge achtete ich jedoch auch bei anderen Stoffen darauf, ob vielleicht die eine oder die andere ebenfalls wachstumsfördernd wirkt. Zu diesem Zwecke verwendete ich verschiedene Tierorgane und Tier- oder Pflanzengewebe sowie Vitaminpräparate und deren Wasserlösungen als Zusatz zu Sake und beobachtete ihren wachstumsfördernden Einfluß.

(1) Herstellung der Nährböden

Verschiedene die Entwicklung der Hyochi-Bazillen fördernde Substanzen wurden ausgewählt und Nährböden hergestellt. Die Herstellungsweise möchte ich im folgenden ausführlich beschreiben.

- a. Sake gelangte in folgenden Formen zur Anwendung:
Sake in reiner Form.
Sake, mit 20 % Wasser verdünnt.
Mit Tierkohle behandelter Sake.
- b. Getreide wurde etwa im Gewicht von 1 g verwendet, Wasser zugesetzt und gekocht.
- c. Bohnen wurden ebenfalls mit Wasserzusatz versehen und gekocht. Es gelangten jeweils 3-5 Stücke zur Verwendung.
- d. Gemüse wurde gewaschen, in Würfel zerschnitten und gekocht.
- e. Zitronenschalen wurden in 3 Formen angewendet:
Zitronenschalen, ungetrocknet.
Getrocknete Zitronenschalen mit oder ohne Wasserzusatz.
- f. Tierorgane und -Gewebe wurden in 10 %igem Salzwasser aufgekocht und dann gewaschen. Das Weiß und das Dotter des Eies wurden jedoch lediglich gekocht.
- g. Andere feste Stoffe wurden im Gewicht von 1 g verwendet, 100 ccm Wasser zugesetzt, dann aufgekocht und die Wasserlösung benutzt.
- h. Stoffe von anderer Löslichkeit wurden in geeigneter Weise mit Wasser verdünnt.

Alle Flüssigkeiten außer a wurden mit Sake verdünnt und auf dieselbe Konzentration gebracht wie der Sake mit 20 % Wasserzusatz. Die Menge

der verwendeten Flüssigkeit betrug jeweils etwa 20 ccm und gelangte in Reagensgläsern zur Anwendung.

(2) Der Einfluss der verschiedenen Stoffe auf die Wachstumsbeförderung

Die Hyochi-Bazillenentwicklung tritt beim Zusatz verschiedener Stoffe schnell zu Tage, jedoch ist der Grad der Entwicklung von der Beschaffenheit des Zusatzmaterials abhängig. Bei dem Zusatz verschiedener Stoffe stellte es sich heraus, daß die Bazillenentwicklung bei denjenigen am lebhaftesten war, von denen man annimmt, daß ihr Gehalt an Vitamin B groß ist.

Deswegen habe ich in der folgenden Tabelle III den Ergebnissen meiner Versuche noch den Vitamin B-Gehalt (gemäß den Angaben verschiedener Forscher) der einzelnen Stoffe hinzugefügt.

TABELLE III

Versuchsdauer (Tage)	3		8		Vitamin B-Gehalt
Art des Zusatzes	Trübung	Bodensatz	Trübung	Bodensatz	
Sake	—	—	++	+	
Sake mit Wasser	—	—	++	+	
mit Tierkohle behandelter Sake	—	—	—	—	
55 %iger Polierreis*	±	—	++	+	
Gewöhnlicher Polierreis	+	±	+++	++	
Gewöhnlicher Reis	+	±	+++	++	++
Roggen	+	±	+++	++	
Gepresster Roggen	+	±	+++	++	
Gerste	+	±	+++	++	++
Soyabohne	+	±	++++	+++	+++
Azuki-Bohne	±	—	++++	+++	+++
Saubohne	±	—	++++	+++	+++
Erbse	++	+	++++	+++	+++
Sasage-Bohne	+	±	+++	++	
Ingen-Bohne	+	±	+++	++	+++
Schwarze Soyabohne	+	±	+++	++	
Weisse Bohne	+	±	++	+	+
Kartoffel	+	±	+++	++	++
Möhre	+	±	+++	++	+
Rettich	+	±	++	+	?
Schwarzwurzel	+	±	+++	++	

Versuchsdauer (Tage)	3		8		Vitamin B. Gehalt
	Trübung	Bodensatz	Trübung	Bodensatz	
Batate	+	±	+++	++	++
Weisskohl	+	±	+++	++	++
Lattich	+	±	++++	+++	++
Zitronenschale	-	-	+	+	
Zitronenschale, getrocknet	+	±	+++	++	
Zitronenschale, getrocknet mit Wasserzusatz	-	-	++	+	
Rindfleisch	+	±	+++	++	+ ?
Rindsleber	++	+	++++	+++	+++
Hühnerfleisch	+	±	+++	++	
Hühnerleber	++	+	++++	+++	+++
Schweinefleisch	+	±	+++	++	
Eiweiss	-	-	±	±	-
Eidotter	+	±	+++	++	++
Sardinenfleisch	+	±	+++	++	
Azi-Fischfleisch	+	±	+++	++	+++
Reisembryowasser	++	+	++++	+++	+++
Hefewasser	++	+	++++	+++	
Fleischextrakt	±	-	++	+	-
Taurocholsaures Natrium	±	-	++	+	
Peptonwasser	+	±	++	+	
Sakedestillationsrückstand	+	±	+++	+++	
Koji-Extrakt	+	±	++	+	
Malzwürze	+	±	+++	++	
Sperson-Lösung	++	+	++++	+++	+++
Oryzanin-Lösung	++	+	++++	+++	+++

* bis auf 55 % des früheren Volumens absolvierte Reiskörner.

Bei Betrachtung der Tabelle III erkennt man, daß je nach der Art der zugesetzten Stoffe Unterschiede in der Bazillenentwicklung bestehen. Weiter zeigt es sich, daß im allgemeinen diejenige Stoffe, die reich an Vitamin B sind, zugleich auch ein stärkeres Bazillenwachstum aufweisen. Aus der Tabelle geht auch hervor, daß nicht nur Tierleber einen wachstumsbefördernden Einfluß auf die Hyochi-Bazillen ausübt, sondern, daß die gleichen Resultate auch durch den Zusatz von anderen Stoffen erreicht werden können. Nach Beendigung meiner Untersuchungen erschien von TAKAHASHI und SUZUKI (44) eine neue Veröffentlichung, worin verschiedene den meinigen ähnliche Versuche enthalten sind.

D. Physikalische und chemische Eigenschaften der wachstumsfördernden Substanzen

Um die physikalischen und chemischen Eigenschaften der wachstumsfördernden Substanzen zu bestimmen möchte ich weiter die folgenden Versuche. Ich benutzte als Material für meine Untersuchungen Reisembryo- und Hefewasser, da diese beiden Flüssigkeiten in mancherlei Beziehungen zur Sake-Brauerei stehen und ihre Herstellung sehr einfach ist. Ich stellte den Charakter dieser Substanzen fest, indem ich ihre Adsorptionsfähigkeit, Widerstandsfähigkeit gegen Temperatureinflüsse, Stabilität gegen Einwirkung von Säure oder Alkali, Permeabilität und die Einflüsse verschiedener Lösungs- und Niederschlagsmittel untersuchte.

(1) Adsorptionsfähigkeit

Zu Proben, die in geeigneter Weise verdünnt worden waren, setzte ich alternativ von 0.03 bis zu 3.0 % Norit oder FULLERSche Erde zu, und ließ deren adsorbierende Wirkung stattfinden. Die auf diese Weise behandelten Proben vermengte ich daraufhin mit Sake, sodaß deren Anteil 20 % der Lösungen betrug. In diese impfte ich Hyochi-Bazillen und beobachtete deren weitere Entwicklung. Dabei stellte es sich heraus, daß die Entwicklung umso schlechter ist je mehr Adsorptionsmittel hinzugefügt worden sind. Daraus läßt sich schließen, daß die das Wachstum der Bazillen fördernden Substanzen durch die Adsorptionsmittel adsorbiert worden waren. Die adsorbierende Wirkung des Norit erwies sich als bedeutend stärker wie diejenige von FULLERScher Erde.

(2) Einfluss der chemischen Reaktion und der Temperatur

Die beiden Proben wurden in verschiedener Weise einerseits mit Säuren, andererseits mit Alkali sowie ferner mit Neutralsalz behandelt und hohen Temperaturen ausgesetzt. Dabei wurde geprüft, welcher Einfluß auf die wachstumsfördernden Substanzen ausgeübt wurde. Im folgenden beschreibe ich ausführlich die Behandlungsweise der Proben.

- a—Reihe (mit Säure) 10 ccm der Proben + 5 ccm N/5 HCl
- b—Reihe (mit Alkali) 10 ccm der Proben + 5 ccm N/5 NaCl
- c—Reihe (mit Neutralsalz) ... 5 ccm N/5 HCl + 5 ccm N/5 NaCl
+ 10 ccm der Proben.

Von jeder Reihe wurde sodann je eine Probe verschiedenen Temperaturen (100°, 116°, 122° und 134°C) ausgesetzt. Nach Abkühlung wurde

die Proben der a-Reihe mit Natronlauge, die der b-Reihe mit Salzsäure versetzt und auf diese Weise neutralisiert. Dann wurden die Proben beider Reihen in allgemein üblicher Art sterilisiert.

Von den auf diese Weise erhaltenen Proben wurden nun je 3 ccm zu 15 ccm Sake in einem Reagensglas hinzugefügt und Hyochi-Bazillen eingepft.

Die Proben der c-Reihe, die ich mit Neutralsalz behandelte, führte

TABELLE IV

Proben	Reaktion in Lösung:	Temperatur und Zeit		3 Tage		8 Tage	
				Trübung	Bodensatz	Trübung	Bodensatz
Hefewasser	Neutral	(°C)	(Min.)				
		100	30	+	±	++++	++
"	"	116	"	+	±	++++	++
"	"	122	"	+	±	++++	++
"	"	134	"	+	±	++++	++
"	Säure	100	"	+	±	++++	++
"	"	116	"	+	±	++++	++
"	"	122	"	+	±	++++	++
"	"	134	"	+	±	++++	++
"	Alkali	100	"	-	-	++	+
"	"	116	"	-	-	++	+
"	"	122	"	-	-	++	+
"	"	134	"	-	-	++	+
"	nicht behandelt			+	±	++++	++
Reisembryo-	Neutral	100	30	+	±	++++	++
wasser	"	116	"	+	±	++++	++
"	"	122	"	+	±	++++	++
"	"	134	"	+	±	++++	++
"	Säure	100	"	+	±	++++	++
"	"	116	"	+	±	++++	++
"	"	122	"	+	±	++++	++
"	"	134	"	+	±	++++	++
"	Alkali	100	"	-	-	++	+
"	"	116	"	-	-	++	+
"	"	122	"	-	-	++	+
"	"	134	"	-	-	++	+
"	nicht behandelt			+	±	++++	++
Kontrolle (Sake mit 20% Wasser)				-	-	++	+

ich deswegen ein, weil sich bei der Neutralisierung der a- und b-Reihe NaCl bildet, weshalb die c-Reihe als Kontroll-Versuche von Wert sind. Die Ergebnisse der Versuche habe ich in der Tabelle IV gelegt.

Wie aus der obigen Tabelle hervorgeht, werden die wachstumsfördernden Substanzen durch Säure und Neutralsalz in keiner Weise beeinträchtigt, während Basen einen zerstörenden Einfluß auf dieselben ausüben. Bei 30 Minuten dauernder Erhitzung auf höhere Temperaturen, ja selbst bis zur Maximaltemperatur meiner Versuche (134°C), zeigte sich nicht die geringste Beeinträchtigung.

(3) Permeabilität bei Dialyse

Von beiden Proben, die in derselben Weise, wie in den anderen Fällen vorbehandelt waren, entnahm ich je 50 ccm und füllte sie in Schwimmblasen einer Haifischart ein. Diese Blasen brachte ich in Gefäße die mit je 300 ccm Wasser gefüllt waren. 48 Stunden lang setzte ich nun die Proben der Dialyse aus. In der Folge wurde sowohl die Flüssigkeit innerhalb wie diejenige außerhalb der Membran auf je ein Volumen von 50 ccm konzentriert. Sodann setzte ich je 3 ccm der so erhaltenen Flüssigkeiten zu je 15 ccm Sake zu. Zur Kontrolle verwendete ich außerdem in der gleichen Weise Proben als Zusatz, die keiner Dialyse unterworfen worden waren. In alle so erhaltenen Lösungen wurden Hyochi-Bazillen eingepf. Die Resultate dieser Versuche sind in der folgenden Tabelle V niedergelegt.

TABELLE V

Proben	Membran	3 Tage		8 Tage	
		Trübung	Bodensatz	Trübung	Bodensatz
Hefewasser	unbehandelt	+	±	++++	++
"	innerhalb	+	±	++++	++
"	ausserhalb	-	-	++++	++
Reisembryo- wasser	unbehandelt	+	±	++++	++
"	innerhalb	+	±	++++	++
"	ausserhalb	-	-	++	+
Kontrolle (Sake mit 20% Wasser)		-	-	++	+

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß nach der Dialyse sich sowohl in den Flüssigkeiten innerhalb wie außerhalb der Membran das Bazillenwachstum fördernde Substanzen befinden. Auch im Vergleich zu den Proben, die der Dialyse nicht unterworfen waren, zeigte sich fast kein Unterschied in Bezug auf das Bazillenwachstum. Hieraus läßt sich schließen, daß die wachstumsfördernden Substanzen sowohl kolloiden wie kristalloiden Charakter besitzen können.

(4) Einfluss der Lösungsmittel

Die Herauslösung dieser wachstumsfördernden Substanzen versuchte ich mit allgemein gebräuchlichen Reagenzien. Es gelangten dieselben Proben, wie in den obigen Versuchen, zur Verwendung.

Aether. 10 ccm der Proben wurden in einem Scheidetrichter zu 20 ccm Aether hinzugesetzt, und 2 Tage lang unter häufigem Schütteln stehen lassen. Dabei bildete sich eine gelatineartige Substanz zwischen Aether- und Proben-Schicht. Ich trennte die mit Aether extrahierte gefärbte Schicht ab. Die Aetherlösung vermengte ich mit etwas Wasser. Dann ließ ich über dem Wasserbade den Aether verdampfen und ergänzte die Flüssigkeitsmenge durch Wasserzusatz auf 10 ccm.

Benzin. 50 ccm Benzin wurden zusammen mit 10 ccm der Proben in einen Scheidetrichter gebracht, und 2 Tage hindurch oft geschüttelt. Die extrahierte Schicht wurde abgezogen, die Aetherlösung mit Wasser verdünnt, in der gleichen Weise wie vorher verdampft und durch Wasserbeimengung auf 10 ccm gebracht.

Aethylacetat. 50 ccm Aethylacetat wurden zusammen mit 10 ccm der Proben in der gleichen Weise behandelt wie in vorhergehenden Fällen und der verdampfte Rückstand mit Wasser auf 10 ccm verdünnt.

Alkohol. 10 ccm der Proben wurden zusammen mit 50 ccm 95 %igen Alkohol in einen Erlenmeyerkolben gefüllt, an einen Rückflußkühler angesetzt und das ganze zum Sieden gebracht. Nach Abkühlung wurde der ausgeschiedene Niederschlag abfiltriert und mit Alkohol ausgewaschen, das Filtrat und die Waschlösung vereinigt, mit Wasser verdünnt und bis auf 10 ccm verdampft.

Aceton. Von den Proben wurden 10 ccm mit 50 ccm Aceton vermengt. Nach zweitägigem Stehenlassen setzte sich ein Niederschlag ab, der mittels einer Zentrifuge abgetrennt wurde. Der Extrakt wurde mit Wasser versetzt, verdampft und auf 10 ccm gebracht. Das Aceton war durch diese Operation vollständig verdampft worden.

Von den verschiedenen auf diese Weise hergestellten Proben setzte ich je 3 ccm zu je 15 ccm Sake zu, der in Reagensgläsern enthalten war. Zur Kontrolle verwandte ich in gleichen Mengen einerseits Proben, die keinerlei derartige Behandlung erfahren hatten und andererseits einen nur mit Wasser verdünnten Sake. In alle diese Nährflüssigkeiten impfte ich auf die schon früher erwähnte Weise Hyochi-Bazillen ein.

TABELLE VI

Proben	Behandelt mit	3 Tage		8 Tage	
		Trübung	Bodensatz	Trübung	Bodensatz
Hefewasser	Aether	±	—	+++	+
"	Benzin	±	—	+++	+
"	Aethylacetat	±	—	+++	+
"	Alkohol	+	+	++++	++
"	Aceton	+	+	+++	++
"	nicht behandelt	+	+	++++	++
Reisembryo-	Aether	±	—	++	+
wasser	Benzin	±	—	++	+
"	Aethylacetat	±	—	+++	+
"	Alkohol	+	+	++++	++
"	Aceton	+	+	+++	++
"	nicht behandelt	+	+	++++	++
Kontrolle (Sake mit 20 % Wasser)		—	—	++	+

Aus der obigen Tabelle VI ist ersichtlich, daß das Bakterienwachstum in Alkoholextrakten bei weitem am lebhaftesten vor sich geht. Am nächstgünstigsten war die Bazillenentwicklung bei der Kontroll-Nährflüssigkeit einer nicht behandelten Probe. Dann folgte Aceton-Extrakt. Auch bei allen anderen Extrakten zeigte sich immerhin noch eine bessere Bakterienentwicklung als bei dem nur mit Wasser verdünnten Sake.

(5) Einfluss der Niederschlagsmittel

Unter Anwendung der zur Isolierung der organischen Basen gebräuchlichen wichtigsten Niederschlagsmittel behandelte ich die beiden Proben in der folgenden Weise.

Bariumhydroxyd. Eine kalt-gesättigte Bariumhydroxyd-Lösung wurde je 10 ccm der Proben zugesetzt. Nachdem sich der Niederschlag voll-

ständig abgesetzt hatte, wurde er abfiltriert und mit Bariumhydroxyd-Lösung ausgewaschen. Das Filtrat wurde mit verdünnter Schwefelsäure von Barium befreit, und durch Abdampfen bei niedrigerem Druck bis auf 10 ccm konzentriert.

Silber-Barium. 10 ccm der Proben wurden mit einer etwas reichlichen Menge von 10 %iger Silbernitrat-Lösung versetzt (als Indikator wurde hierbei Bariumhydroxyd verwendet). Dieser Lösung wurde gesättigte Bariumhydroxyd-Lösung solange zugesetzt, bis sich mit Lackmus-Papier deutlich alkalische Reaktion erkennen ließ. Der Niederschlag wurde sodann mit verdünnter Bariumhydroxydlösung gewaschen und das Filtrat durch Ansäuern mit verdünnter Schwefelsäure vom Barium befreit. Das Silber wurde durch Schwefelwasserstoff niedergeschlagen und nach der Filtration das Filtrat auf 10 ccm konzentriert.

Der Silbernitrat und Bariumhydroxyd erhaltene Niederschlag wurde mit Wasser gereinigt durch schwache Ansäuern mit Schwefelsäure Barium als Sulfat abgeschieden und durch Schwefelwasserstoff das Silber als Sulfid niedergeschlagen. Das Filtrat wurde auf 10 ccm gebracht.

Mercurisulfid. Eine 5 %ige Mercurisulfidlösung wurde zu 10 ccm der Proben in etwas reichlicher Menge zugesetzt, der auf diese Weise erhaltene Niederschlag abfiltriert, und mit 5 %iger Schwefelsäure gewaschen. Mittels Schwefelwasserstoff wurde das Quecksilber vollständig auf dem Filtrat ausgeschieden, das Sulfid abfiltriert und dessen Filtrat schließlich auf 10 ccm konzentriert.

Phosphorwolframsäure. Zu 10 ccm der Proben wurde eine 30 %ige Phosphorwolframsäure-Lösung (in 5 %iger Schwefelsäure gelöst) in reichlicher Menge zugesetzt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und mit 5 %iger Schwefelsäure gewaschen. Das Filtrat wurde durch Zusatz von Bariumhydroxyd-Pulver schwach alkalisch gemacht. Auf diese Weise wurde die enthaltene Phosphorwolframsäure und Schwefelsäure ausgeschieden und beseitigt. Die Lösung wurde wieder mit verdünnter Schwefelsäure versetzt und so von dem überschüssigen Barium befreit. Schließlich wurde das Filtrat auf 10 ccm gebracht.

Der Phosphorwolframsäure-Niederschlag wurde mit Wasser versetzt. Hierzu wurde Bariumhydroxyd-Pulver zugefügt und abfiltriert. Dem Filtrat wurde solange verdünnte Schwefelsäure zugesetzt, bis sich eine schwach saure Reaktion zeigte. Das hierbei ausgeschiedene Bariumsulfat wurde abfiltriert und das Filtrat auf 10 ccm konzentriert.

Bleiazetat. Eine Lösung von neutralem Bleiazetat wurde zu 10 ccm der Proben zugesetzt, der entstehende Niederschlag filtriert, und das Filtrat

schwach angesäuert. Durch Schwefelwasserstoff wurde das überschüssige Blei als Sulphid ausgefällt. Das Filtrat desselben wurde neutralisiert und auf 10 ccm eingedampft. Der durch den Zusatz von Bleiazetat ausgeschiedene Niederschlag wurde mit Wasser ausgewaschen. Durch Zusatz von Bariumhydroxyd-Pulver alkalisch gemacht, und dann filtriert. Durch verdünnte Schwefelsäure wurde das Filtrat angesäuert. Mittels Schwefelwasserstoff wurde die Lösung von dem noch enthaltenden Blei befreit und schließlich auf 10 ccm gebracht.

Goldchlorid. 10 ccm der Proben wurden etwas reichlich mit 10 %iger Goldchlorid-Lösung versetzt. Die Lösung wurde einen Tag lang aufbewahrt und sodann der ausgeschiedene Niederschlag abfiltriert und mit verdünnter Salzsäure gut gewaschen. Das Filtrat wurde ebenfalls mittels Schwefelwasserstoff von Gold befreit. Endlich wurde die Lösung zu 10 ccm konzentriert.

Der durch das Goldchlorid ausgeschiedene Niederschlag wurde mit verdünnter Salzsäure gewaschen, durch Schwefelwasserstoff vom Gold getrennt und das Filtrat auf 10 ccm gebracht.

Platinchlorid. 5 % Platinchlorid wurden in 50 %igem Alkohol gelöst und zu 10 ccm den Proben zugesetzt. Hierbei zeigte sich zwar kein Niederschlag, aber die Lösung begann sich zu trüben. Durch weiteren Zusatz von 95 %igem Alkohol wurde sodann ein Niederschlag erzeugt. Die Lösung wurde nach 24 Stunden filtriert und mit 95 %igem Alkohol ausgewaschen. Das Filtrat wurde durch Schwefelwasserstoff vom Platin befreit und auf 10 ccm eingedampft. Der durch das Platinchlorid ausgeschiedene Niederschlag wurde in verdünnter Salzsäure suspendiert und so lange mit Schwefelwasserstoff behandelt, bis die Lösung gänzlich von Platin befreit war. Das Filtrat desselben wurde auf 10 ccm eingedampft.

Mercurichlorid. Zu 10 ccm der Proben wurde solange kalte gesättigte Mercurichlorid-Lösung hinzugesetzt, bis sich ein deutlicher Niederschlag zeigte. Dieser wurde abfiltriert und mit Mercurichlorid-Lösung gut gewaschen. Das Filtrat wurde mittels Schwefelsäure schwach angesäuert und solange mit Schwefelwasserstoff behandelt bis sich alles Quecksilber als Sulfid ausgeschieden war. Das Filtrat wurde neutralisiert und bis auf eine kleine Menge eingedampft. Hierzu wurde Alkohol zugesetzt und die alkoholunlöslichen Substanzen abfiltriert. Schließlich wurde das Filtrat auf 10 ccm gebracht.

Pikrinsäure. Eine kalte gesättigte Pikrinsäure-Lösung wurde im Ueberschuß zu 10 ccm der Proben zugesetzt, wobei sich ein schwerer Niederschlag bildete. Durch eintägige Aufbewahrung im Eisschranke

wurde der Niederschlag möglichst vollständig zum Absitzen gebracht. Dann wurde durch die Lösung Zentrifugieren vom Niederschlag völlig getrennt. Die so separierte Lösung wurde durch Behandlung mit verdünnter Schwefelsäure schwach angesäuert. Endlich wurde die Pikrinsäure mittels Aethers

TABELLE VII

Proben	bei	3 Tage		8 Tage	
		Trübung	Bodensatz	Trübung	Bodensatz
Hefewasser	Bariumhydroxyd-Filtrat	+	±	+++	++
"	Silber-Barium-Filtrat	-	-	+	-
"	" " -Niederschlag	±	-	++	±
"	Mercurisulfid-Filtrat	+	±	+++	++
"	Phosphorwolframsäure-Filtrat	-	-	++	±
"	" " -Niederschlag	+	±	+++	++
"	Bleiazetat-Filtrat	+	±	+++	++
"	" " -Niederschlag	-	-	+	-
"	Goldchlorid-Filtrat	-	-	++	±
"	" " -Niederschlag	-	-	+	-
"	Platinchlorid-Filtrat	-	-	++	±
"	" " -Niederschlag	-	-	+	-
"	Mercurichlorid-Filtrat	-	-	+	-
"	Pikrinsäure-Filtrat	+	-	+++	++
"	nicht behandelt	+	±	++++	++
Reisembryo- wasser	Bariumhydroxyd-Filtrat	+	±	+++	++
"	Silber-Barium-Filtrat	-	-	++	+
"	" " -Niederschlag	+	±	+++	++
"	Mercurisulfid-Filtrat	+	-	+++	++
"	Phosphorwolframsäure-Filtrat	-	-	++	-
"	" " -Niederschlag	+	-	+++	++
"	Bleiazetat-Filtrat	±	-	+++	++
"	" " -Niederschlag	-	-	+	-
"	Goldchlorid-Filtrat	-	-	++	±
"	" " -Niederschlag	-	-	+	-
"	Platinchlorid-Filtrat	-	-	++	±
"	" " -Niederschlag	-	-	+	-
"	Mercurichlorid-Filtrat	-	-	+	-
"	Pikrinsäure-Filtrat	+	-	+++	++
"	nicht behandelt	+	±	++++	++++
	Kontrolle (Sake mit 20 % Wasser)	-	-	++	±

entfernt und die restierende Lösung auf 10 ccm konzentriert.

Von den auf diese Weise behandelten verschiedenen Lösungen setzte ich je 3 ccm zu 15 ccm Sake zu. Zur Kontrolle wurde einerseits Sake benutzt, der in gleichen Verhältnis mit nicht vorbehandelten Proben versetzt war, sowie andererseits ein mit bakterienfreiem Wasser verdünnter Sake. Hier hinein wurden sodann Hyochi-Bazillen eingepflegt und auf diese Weise Kulturen angelegt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in der Tabelle VII niedergelegt.

Wie aus der obigen Tabelle ersichtlich ist, zeigen sich im den bei der Behandlung der Proben mit Phosphorwolframsäure und Silberbarium erhaltenen Niederschlägen am häufigsten Teile der wachstumsfördernden Substanzen. Bei Behandlung mit Bariumhydroxyd, Mercurisulfid, Bleiazetat und Pikrinsäure fanden sich die wachstumsbefördernden Substanzen nicht im Niederschlag, sondern im Filtrat.

Weiterhin ließ sich bei Goldchlorid, Platinchlorid und Mercurichlorid weder im Niederschlag noch im Filtrat eine wesentliche Menge der wachstumsfördernden Substanzen feststellen. Aus diesen Tatsachen möchte ich das Folgende schließen: Auch bei den Versuchen mit Vitamin B-Fractionen von TSUKIE (45) sowie solchen mit Fleischextrakt von HUGHES (46), bei denen er die Wachstumselemente der Staphylococci festzustellen bemüht war, zeigten sich ähnliche Resultate wie bei meinen Versuchen. Deshalb glaube ich, ebenso wie bei beiden genannten Autoren, diese Tatsache ist darauf zurückzuführen, daß in diesen Fällen Metallsalze Verwendung fanden und Schwefelwasserstoff durchgeleitet wurde. Wahrscheinlich werden dabei die wachstumsfördernden Substanzen durch die entstandene Schwefelmetallverbindung adsorbiert. Ich möchte jedoch darauf hinweisen daß, obwohl sich in manchen Fällen beträchtliche Mengen der wachstumsfördernden Substanzen im Niederschlag oder Filtrat zeigten, dennoch der Prozentsatz der wachstumsfördernden Substanzen stets bei den Kontrollen ein höherer ist als bei den mit Metallsalzen behandelten Lösungen.

(6) Vergleichende Zusammenstellung der Eigenschaften der wachstumsfördernden Substanzen

Die Eigenschaften der das Wachstum von Mikroorganismen fördernden Substanzen wurden bisher durch folgende Autoren eingehender behandelt: von HUGHES (46) bei Staphylococci, von HOSOYA und KUROYA (43) bei Bakterien und Hefen in vergleichender Weise, von NARAYANAN (47) für Bios, den Wachstumsstoff der Hefe. Im Folgenden möchte ich die Er-

gebnisse meiner Hyochi-Bazillen-Versuche mit denjenigen der oben aufgeführten Autoren vergleichen. Die Resultate sind in Tabelle VIII niedergelegt. Leider ließen sich für Hyochi-Versuche keinerlei synthetische Nährlösungen verwenden, sodaß ich auf Sake angewiesen war. Weil im Sake unbekannte Substanzen enthalten zu sein scheinen, wurde mit größter Sorgfalt und Vorsicht bei Durchführung mehrere Kontrollversuche verfahren.

Aus der Tabelle VIII ist ersichtlich, daß je nach dem Autor der zur Verwendung gelangten Organismen oder der verwendeten Proben die Ergebnisse verschieden sind. Der Hauptunterschied besteht jedoch darin, daß die das Bakterienwachstum fördernden Substanzen gegen Basen nicht widerstandsfähig sind, von FULLERSche Erde leicht adsorbiert wurden und bei der Behandlung mit Silbernitrat sich leicht niederschlagen, während die das Hefewachstum fördernden Substanzen das entgegengesetzte Verhalten zeigen. Die Unterschiede im Verhalten der das Wachstum dieser beiden Gruppen von Organismen fördernden Substanzen möchte ich in dem folgenden Abschnitt ausführlicher behandeln.

E. Vergleichende Gegenüberstellung der Eigenschaften der wachstumsfördernden Substanzen von Hyochi-Bazillen und Hefe

Eine unbestreitbare Tatsache ist es, daß die Entwicklung von Mikroorganismen durch den Zusatz gewisser organischer Substanzen wesentlich gefördert wird. Hierbei handelt es sich um Tierorgane und Tier- oder Pflanzengewebe, Hefemasse oder Wasserlösungen dieser Substanzen, wobei sich die Stärke der Entwicklung nach dem Vitamin-B-Gehalt richtet. Unter den Arbeiten früherer Autoren befinden sich auch solche, in denen behauptet wird, daß die Wachstumselemente der Mikroorganismen, besonders von Hefe, mit Vitamin B identisch seien. Da ich schon einmal über diese Arbeiten berichtete, möchte ich an dieser Stelle nicht näher auf ihren Inhalt eingehen.

In Tage der jetzigen, fortgeschrittenen Vitaminchemie unterscheidet man bei Vitamin B die Vitamin B₁, B₂ und andere, jedoch beziehen sich diese Klassifikationen nur auf eine Wirkung im Tierorganismus.

Eine vergleichende Studie über die Eigenschaften der wachstumsfördernden Substanzen verschiedener Mikroorganismen bildet die Arbeit von HOSOYA und KUROYA (43). Zu diesen Versuchen wurde TSUKIESches Vitamin-B-Präparat auf verschiedene Weise behandelt und dann der Einwirkung von einigen Hefen und Streptokokken ausgesetzt. Die Ergebnisse

TABELLE VIII

Autoren	OTANI	HUGHES	HOSOYA u. KUROYA		NARAYANAN	WILDERS, DELVSO
Mikroorganismen	Hyochi-Bazillen	Staphylococci	Streptococci	Hefe	Bierhefe	Hefe
Proben	Hefewasser oder Reis-embryowasser	Fleisch-extrakt	TSUKIESche Vitamin B		Hefewasser	
Adsorptionsfähigkeit						
Tier-o. Pflanzenkohle	positiv		positiv	positiv		
FULLERSche Erde	positiv		positiv	negativ		
Stabilität						
Höhere Temperatur	stabil	stabil	stabil	stabil		
Säure	stabil	stabil		stabil		
Alkali	labil	labil	labil	stabil		
Permeabilität	positiv	positiv				
Löslichkeit						
Wasser	löslich	löslich			löslich	löslich
Aether	schwer lösl.	unlöslich			unlöslich	unlöslich
Benzin	schwer lösl.	unlöslich				
Aethylacetat	schwer lösl.	unlöslich			löslich	löslich
Alkohol	löslich	löslich			unlöslich	
Aceton	löslich ?	löslich				
Niederschlagsmittel						
Bariumhydroxyd	ohne Niederschlag	ohne Niederschlag				
Silber-Barium	Niederschlag	Niederschlag			ohne Niederschlag	ohne Niederschlag
Meicurisulfid	ohne Niederschlag	ohne Niederschlag			ohne Niederschlag	ohne Niederschlag
Phosphorwolfram-säure	Niederschlag	Niederschlag			Niederschlag	ohne Niederschlag
Bleiazetat	ohne Niederschlag				ohne Niederschlag	ohne Niederschlag
Goldchlorid	ohne Niederschlag	ohne Niederschlag			ohne Niederschlag	ohne Niederschlag
Platinchlorid	ohne Niederschlag	ohne Niederschlag			ohne Niederschlag	ohne Niederschlag
Mercurichlorid	ohne Niederschlag?	ohne Niederschlag			ohne Niederschlag?	ohne Niederschlag
Pikrinsäure	ohne Niederschlag	ohne Niederschlag			ohne Niederschlag	ohne Niederschlag

dieser Versuche sind in Tabelle VIII wiedergegeben. Ueber Hyochi-Bazillen ist mir jedoch noch keine derartige Untersuchung bekannt geworden. Bei meinen diesbezüglichen Arbeiten verwendete ich eine der kürzlich von NARAYANAN veröffentlichten Biosfraktionsmethode ähnelnde Methode, wobei ich aus Reisembryowasser und Hefewasser fraktionierte. Außerdem stellte ich konzentrierte Lösungen von Vitamin B₁ und Vitamin B₂ her. Alle diese Lösungen behandelte ich in vergleichenden Untersuchungen getrennt mit Säure, Alkali oder FULLERScher Erde.

(1) Versuchsmethode

a. Organismenstämme. Zur Durchführung dieser Versuche verwendete ich außer dem Standard Stamm von Hyochi-Bazillen noch *Saccharomyces cerevisiae*, eine Hefeart. Diese gehört zu jener Gruppe von Hefepilzen, deren Wachstum durch die Einwirkung von Bios befördert wird (48).

b. Impfungsmethode. Wie schon früher erwähnt wurde, ist es von größter Wichtigkeit, eine möglichst kleine Impfungsmenge zu verwenden. Platinöse die mittels einer zu fassenden Menge eines Hyochi-Stammes, der 10 Tage lang in Sake kultiviert worden war, wurde in eine weitere Nährflüssigkeit eingimpft. Von einer Hefe, deren Züchtung auf Koji-Agar erfolgt war, wurde zunächst eine Platinöse voll in HAYDUCKScher Lösung suspendiert und dann von dießer Suspension wieder je einen Platinöse voll entnommen und den folgenden Nährflüssigkeiten zugesetzt.

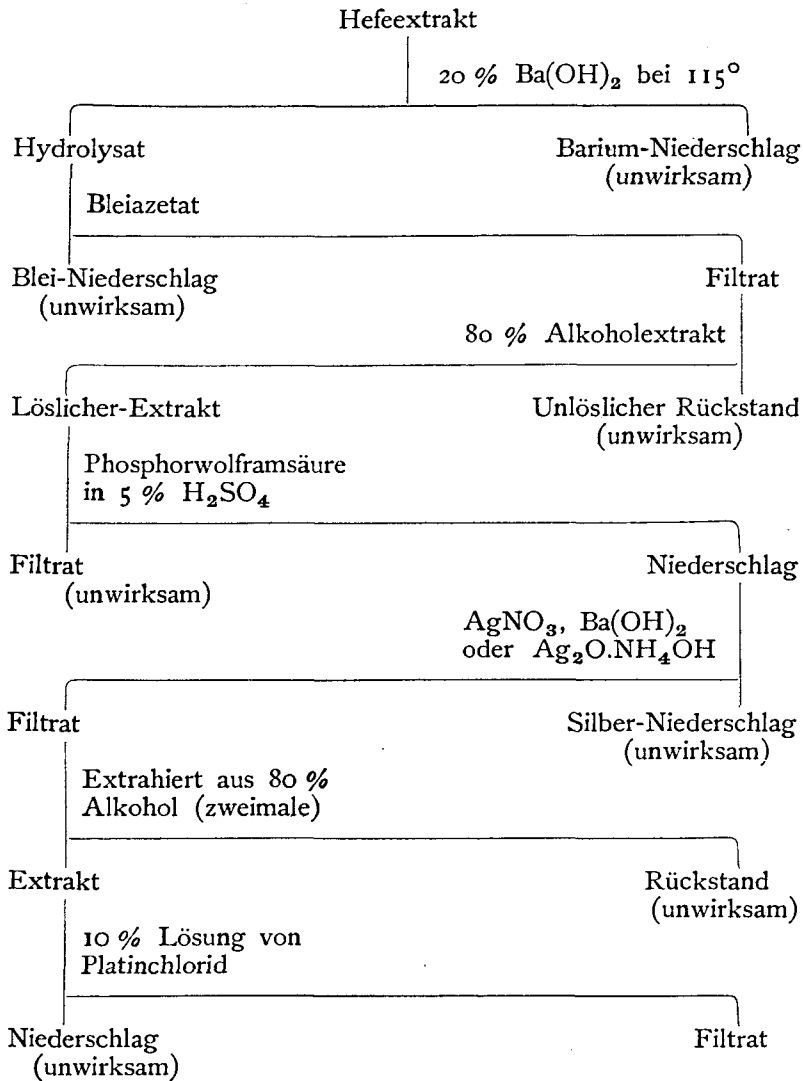
c. Nährflüssigkeiten. Für die Hyochi-Bazillen verwendete ich 20 ccm Sake, in ein Reagensglas für Hefe brachte ich HAYDUCKSche Lösung, von der ich je 20 ccm in ein Reagensglas goß, zur Anwendung und ließ den verwendeten Rohrzucker rekristallisieren. Weiter benutzte ich andere von der Firma Schering-Kahlbaum bezogene garantiert reine Chemikalien.

d. Wachstumsfördernde Substanzen. Aus den Proben von Reisembryowasser und Hefewasser entnahm ich auf verschiedene Weise wachstumsfördernde Substanzen. Die Methoden werden im folgenden bei verschiedenen Gelegenheiten beschrieben.

(2) Einfluss der Fraktionsflüssigkeit

a. Herstellungsmethode der Fraktionsflüssigkeit

Eine Methode zur Herstellung einer Fraktionsflüssigkeit von Bios gab kürzlich NARAYANAN an. Ich verwendete die Hauptprinzipien seiner Methode, welche ich im folgenden kurz beschreiben möchte.



Bei dieser Methode handelt es sich darum das Hefewachstum fördernde Bios zu fraktionieren. Da jedoch wie schon früher erwähnt wurde, die das Bakterienwachstum fördernden Substanzen durch Behandlung mit Silberbarium niedergeschlagen werden, ergab sich zur Verfolgung unserer Zwecke die Notwendigkeit nach der Silberbariumbehandlung getrennte Versuche für die Lösungen und die Niederschläge durchzuführen. Nachdem ich die vorbereitenden Versuche mit Silberbarium durchgeführt hatte, be-

handelte ich die Lösung als Fraktion A, und den Niederschlag, als Fraktion B, getrennt mit chemischen Reagenzien.

i. Vorbereitende Versuche. Zu 400 g der Proben wurde 50 %iger Alkohol zugesetzt, das Gemisch erwärmt, extrahiert und filtriert. Der Rückstand wurde zweimal mit 50 %igem Alkohol versetzt und in derselben Weise wie die ursprünglichen Proben behandelt. Die Filtrate wurden zusammengemischt, bei Niederdruck konzentriert und auf eine kleine Menge reduziert. Zu dieser wurde nach und nach 20 % einer Bariumhydroxydlösung zugesetzt, und das Gemisch 2 bis 3 Stunden lang mit Dampf erhitzt. Nach dem Erkalten wurde durch Zusatz von Schwefelsäure, das Barium entfernt und die Lösung alsdann konzentriert, das Konzentrat mit einem Ueberschuss von neutralem Bleiazetat versetzt, einen Tag stehengelassen und dann filtriert.

Im Filtrat wurde das Blei mit Schwefelwasserstoff entfernt, hierauf konzentriert, mit der fünffachen Menge von 80 %igem warmen Alkohol versetzt und dreimal extrahiert. Der Alkohol dieses Extrakt wurde im Vacuum verdampft und die resultierende Lösung auf eine kleine Menge reduziert. Diese wurde in 5 %iger Schwefelsäure gelöst, mit einem Ueberschuß von gesättigter Phosphorwolframsäure versetzt und einen Tag lang in einem dunkeln Raume stehen gelassen, wobei sich ein Niederschlag absetzte. Dann wurde filtriert und der auf dem Filter zurückgebliebene Niederschlag mit einer kleinen Menge Wasser in einem gesonderten Gefäß gewaschen. Dieses Waschwasser sowie das erste Filtrat wurden getrennt mit etwas Bariumhydroxydpulver behandelt. Der ausgeschiedene Niederschlag wurde entfernt. Dann wurden die beiden Lösungen vermengt und mit Schwefelsäure versetzt, wobei sich Bariumsulfat ausschied. Wegen des Säuregehalt dieser Lösung wurde ihr schließlich ein Ueberschuß von Silbernitratlösung und gesättigte Bariumhydroxydlösung solange zugesetzt, bis die Reaktion alkalisch war. Der hierbei gebildete Niederschlag wurde abfiltriert. Das Filtrat wurde als Fraktion A und der Niederschlag als Fraktion B bezeichnet.

ii. Fraktion A. Zu dem bei den vorbereitenden Versuchen erhaltenen Filtrat wurde verdünnte Schwefelsäure zugesetzt und auf diese Weise das Barium ausgeschieden. Mittels Durchleitens von Schwefelwasserstoff wurde die Lösung vom Silber befreit. Nach erfolgter Konzentration mit 80 %igem Alkohol versetzt und die alkoholunlöslichen Mineralsalze entfernt. Zu der Lösung wurde 10 % Platinchlorid (Alkohollösung) hinzugesetzt und der sich bildende rotbraune Niederschlag durch Filtrieren abgetrennt. Endlich

wurde das Filtrat mit Schwefelwasserstoff vom Platin befreit und auf 10 ccm konzentriert.

Die so erhaltene Lösung stellt die Biosfraktion von NARAYANAN dar und enthält nach ihm die Hefewachstumsstoffe.

iii. Fraktion B. Der durch Silberbarium erhaltene Niederschlag wurde mit Wasser ausgewaschen. Hierzu wurde sehr verdünnte Schwefelsäure zugesetzt und das Barium als Bariumsulfid entfernt. Mittels Durchleiten von Schwefelwasserstoff wurde die Lösung vom Silber befreit, und alsdann durch Eindampfen auf eine kleine Menge gebracht. Die Behandlung mit 80 %igen Alkohol und 10 %iger Platinchloridlösung erfolgte in derselben Weise, wie bei Fraktion A. Schließlich wurde die Lösung auf 10 ccm konzentriert.

b. Versuche mit Fraktionsflüssigkeiten.

Die Flüssigkeiten von Fraktion A und Fraktion B wurden getrennt

TABELLE IX

Proben	Zusatzmenge	Hyochi-Bazillen	Hefe
Reisembryowasser, Fraktion A	0.1	++	++
" "	0.5	++	++
" "	1.5	+++	+++
" "	3.0	+++	++++
" Fraktion B	0.1	++	++
" "	0.5	+++	++
" "	1.5	+++	++
" "	3.0	++++	++
Hefewasser, Fraktion A	0.1	++	++
" "	0.5	++	+++
" "	1.5	++	+++
" "	3.0	+++	++++
" Fraktion B	0.1	++	++
" "	0.5	++	++
" "	1.5	+++	++
" "	3.0	+++	++
Kontrolle (Wasser)	0.1	±	+
" "	0.5	+	+
" "	1.5	+	+
" "	3.0	+	+

beide auf das 10-fache verdünnt und von jeder der beiden Fraktionsflüssigkeiten je 0.1, 0.5, 1.5 und 3 ccm der Nährflüssigkeit in den Reagensgläsern zugesetzt. Außerdem wurden zur Kontrolle dieselben Nährflüssigkeiten mit Wasser versetzt. Die Entwicklung der beiden Organismenarten ist aus der obigen Tabelle IX ersichtlich.

Aus der obigen Tabelle geht hervor, daß bei Zusatz von Reisembryowasser oder Hefewasser die Entwicklung der Mikroorganismen in allen Fällen größer war als bei der Kontrolle mit Wasserzusatz. Außerdem wird aus den Versuchen klar, daß die Bazillenwachstum fördernden und die das Hefewachstum fördernden Fraktionen verschieden sind. Bei der das Wachstum der Hyochi-Bazillen fördernden Fraktion handelt es sich um die mit Silber-Barium niederschlagenen Teile, d. h. Fraktion B, während die Hefeentwicklung auf Fraktion A, d. h. die bei Silber-Barium nicht niederschlagenen Teil, zurückzuführen ist.

Durch dieses Ergebnis wird bewiesen, daß die Biosfraktionsmethode von NARAYANAN und meine früheren Versuche richtig sind.

c. Veränderungen der wachstumsfördernden Wirkung
der Fraktions flüssigkeiten bei Behandlung
mit Säure, Alkali oder FULLERScher Erde

Zu je 2 ccm Fraktionsflüssigkeit von Reisembryowasser oder Hefewasser wurden 2 ccm N/5 Salzsäure zugesetzt. Nach einer zweistündigen Erhitzung und darauf folgender Neutralisation wurde die Flüssigkeit durch Verdünnung mit destilliertem Wasser auf das 10-fache des ursprünglichen Volumens gebracht. Außerdem wurde in demselben Verhältnis N/5 Natronlauge den Fraktionsflüssigkeiten zugesetzt, zum Kochen erhitzt, neutralisiert und schließlich auf das 10-fache des anfänglichen Volumens verdünnt. Bei der Behandlung mit FULLERScher Erde wurden die Fraktionsflüssigkeiten zunächst auf das 10-fache verdünnt, dann mit 10 % FULLERScher Erde versetzt und adsorbieren lassen. Das Filtrat wurde für die Versuche zur Anwendung gebracht. Je 2 ccm dieser Flüssigkeiten wurden den Nährflüssigkeiten zugesetzt, worauf die Untersuchungen begannen. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in der folgenden Tabelle X niedergelegt.

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß die das Wachstum der Hyochi-Bazillen fördernde Fraktion durch Alkali zersetzt und durch FULLERSche Erde adsorbiert wird, während Säuren keinerlei Einfluß auf sie ausüben. Die das Hefewachstum befördernde Fraktion wurde jedoch weder von Säure, noch von Alkali, noch von FULLERScher Erde beeinflusst. Hieraus glaube ich ersehen zu können, daß die Eigenschaften der das Wachstum der

TABELLE X

Proben	Behandelt mit	Hyochi-Bazillen	Hefe
Reisembryowasser, Fraktion A	Säure	++	+++
" "	Alkali	+	+++
" "	FULLERSche Erde	+	+++
" "	nicht behandelt	++	+++
" Fraktion B	Säure	+++	+
" "	Alkali	++	+
" "	FULLERSche Erde	++	+
" "	nicht behandelt	+++	+
Hefewasser, Fraktion A	Säure	++	+++
" "	Alkali	+	+++
" "	FULLERSche Erde	+	+++
" "	nicht behandelt	++	+++
" Fraktion B	Säure	+++	+
" "	Alkali	++	+
" "	FULLERSche Erde	++	+
" "	nicht behandelt	+++	+
Kontrolle (Wasser)		+	+

Hyochi-Bazillen fördernden Substanz und der das Wachstum der hämolytischen Streptokokken befördernden Substanz (nach den Versuchen von HOSOYA und KUROYA) einander sehr ähnlich sind.

3. Der Einfluss Konzentrate von Vitamin B₁ und B₂

a. Herstellung der Konzentrate von Vitamin B₁ und B₂.

Zur Herstellung des Konzentrates von Vitamin B₁ verwendete ich die KINNERSLAY und PETERS'sche Methode (49), während ich für dasjenige von Vitamin B₂ die SHERMAN und AXTMAYER'sche Methode (50) zur Anwendung brachte.

i. Vitamin B₁-Konzentrat. 100 g Reiskleie wurden mit etwas durch Essigsäure schwach angesäuertem Wasser (500 ccm) vermengt, einen Tag stehen gelassen und dann extrahiert. Dann wurde filtriert und das klare Filtrat bei einer Temperatur von unter 50°C und im Vacuum konzentriert. Diese Lösung wurde erst neutralisiert, dann schwach angesäuert, und durch mehrmaliges Extrahieren mit Aether schließlich die öligen Substanzen

entfernt. Dann wurde Bleiazetat zugesetzt und Eiweiß sowie Vitamin B₂ ausgefällt und filtriert. Das Blei wurde mittels Schwefelwasserstoffs aus dem Filtrat ausgeschieden. Die resultierende Lösung wurde im Vacuum bis auf 25 ccm verdampft.

Schließlich wurde eine gleiche Menge von 95 %igem Alkohol zugesetzt.

ii. *Vitamin B₂-Konzentrat.* 100 g Reiskleie wurden mit 200 ccm Wasser vermischt und bei einer Temperatur von 120°C vier Stunden lang mit Hochdruckdampf durchströmt und das Vitamin B₁ zur Zersetzung gebracht. Dann wurden 200 ccm Wasser zugefügt und das Gemisch einen Tag lang stehen gelassen. Dann wurde filtriert und das Filtrat von den ätherlöslichen Substanzen befreit. Schließlich wurde im Vacuum konzentriert, das Volumen auf 25 ccm gebracht und dieselbe Menge von 95 %igem Alkohol zugesetzt.

b. Versuche mit den Konzentraten von Vitamin B₁ und B₂

Ausser den Konzentraten von Vitamin B₁ und B₂ verwendete ich für meine Versuche auch die im Handel erhältliche Oryzanin-Lösung. Ich setzte zu den Nährflüssigkeiten je 0.1, 0.5, 1.0 und 3.0 ccm der drei Lösungen getrennt zu. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle XI wiedergegeben.

TABELLE XI

Proben	Zusatzmenge	Hyoehi-Bazillen	Hefe
Vitamin B ₁ -Konzentrat	0.1	++	++
"	0.5	+++	+++
"	1.0	+++	+++
"	3.0	++++	++++
Vitamin B ₂ -Konzentrat	0.1	++	++
"	0.5	+++	+++
"	1.0	+++	+++
"	3.0	++++	++++
Oryzanin-Lösung	0.1	++	++
"	0.5	+++	+++
"	1.0	+++	+++
"	3.0	+++	+++
Kontrolle (Wasser)	0.1	±	+
"	0.5	+	+
"	1.0	+	+
"	3.0	+	+

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, üben die Konzentrate von Vitamin B₁ und B₂ sowie Oryzanin-Lösung sowohl einen das Wachstum von Hyochi-Bazillen wie von Hefe fördernden Einfluß aus. Hieraus konnte ich schließen, daß alle drei Flüssigkeiten ein Gemisch aus der wachstumsfördernden Substanz für unsere Bakterien and Bios darstellen.

c. Veränderungen der wachstumsfördernden Wirkung der Konzentrate von Vitamin B₁ und B₂ bei Behandlung mit Säure, Alkali oder FULLERSche Erde

Den Konzentraten von Vitamin B₁ und B₂ entnahm ich getrennt je zwei Proben von je 2 ccm. Das eine Probenpaar behandelte ich mit N/5 Salzsäure und das andere mit N/5 Natronlauge in derselben Weise wie früher die Fraktionsflüssigkeiten. Ein neues Paar von Vitamin B₁- und B₂-Konzentraten ließ ich durch FULLERSche Erde adsorbieren. Indem ich diese drei Probenpaare benutzte, verglich ich ihren wachstumsfördernden Einfluß auf die zwei verschiedenen Organismenarten.

Die Ergebnisse sind in der folgender Tabelle XII niedergelegt.

TABELLE XII

Proben	Behandelt mit	Hyochi-Bazillen	Hefe
Vitamin B ₁ -Konzentraten	Säure	++++	++++
"	Alkali	+++	++++
"	FULLERSche Erde	+++	++++
"	nicht behandelt	++++	++++
Vitamin B ₂ -Konzentraten	Säure	++++	++++
"	Alkali	+++	++++
"	FULLERSche Erde	+++	++++
"	nicht behandelt	++++	++++
Kontrolle (Wasser)		++	+

Aus der obigen Tabelle geht hervor, daß einerseits Alkali die das Wachstum der Hyochi-Bazillen fördernden Teile zerstört und andererseits diese von FULLERScher Erde adsorbiert werden, während sich keinerlei Wirkung in Bezug auf die zur Hefeentwicklung beitragenden Teile zeigt. Dieses Ergebnis stimmt mit demjenigen überein durch welches Fraktionsflüssigkeiten erzielt wurden.

(4) **Unterschiede in den Eigenschaften der das Wachstum von Hyochi-Bazillen und desjenigen von Hefe fördernden Substanzen**

Ich führte vergleichende Studien über die Eigenschaften der wachstumsfördernden Substanzen von Hyochi-Bazillen und von Hefe aus. Als Proben hierfür stellte ich die Fraktionsflüssigkeiten aus Reisembryo- und Hefewasser sowie Konzentrate von Vitamin B₁ und B₂ her. Mit den Flüssigkeiten führte ich verschiedene vergleichende Untersuchungen in Bezug auf diese beiden Organismenarten aus.

Nach diesen Untersuchungen ergab es sich, daß drei wesentliche Unterschiede in den Eigenschaften der wachstumsfördernden Substanzen bestehen. Diese möchte ich kurze in folgender Tabelle niederlegen.

TABELLE XIII

bei	Hyochi-Bazillen	Hefe
Silber-Barium	Niederschlag	ohne Niederschlag
Alkali	labil	stabil
FULLERSche Erde	positiv	negativ

F. Lassen sich die wachstumsfördernden Substanzen der Hyochi-Bazillen durch Aminosäuren und Peptide ersetzen?

Obwohl die chemische Zusammensetzung der wachstumsfördernden Substanzen der Mikroorganismen bis jetzt noch unbekannt ist, läßt sich dennoch schließen, daß es sich bei denselben wahrscheinlich um stickstoffhaltige organische Verbindungen handelt. Deshalb benutzte ich solche Aminosäuren und Peptide, deren chemischer Aufbau bekannt ist, um festzustellen, ob diese eine Veränderung der wachstumsfördernden Substanzen herbeizuführen imstande sind.

Gelegentlich aller früheren Versuche mit Aminosäuren zeigte sich keinerlei Einfluß derselben auf die wachstumsfördernde Wirkung der Bazillen, wie z. B. von DABIS und FERRY (51) für Diphtheriebazillen und von HOSOYA und KUROYA (43) für einige Krankheitsbazillen nachgewiesen wurde. Auch TAKAHASHI (11) berichtet, daß der Prozentgehalt der Aminosäuren im Sake sich bei der Hyochi-Bazillen-Entwicklung vermehrt.

Ueber die Einwirkung von Peptiden auf die Bazillenentwicklung ließ sich keinerlei Literatur auffinden, jedoch wird berichtet, daß für Schimmelpilze oder Hefen keine Beeinflussung zu bemerken sei (52-53).

(1) Der Einfluss von verschiedenen Aminosäuren und Peptiden

Für diese Untersuchungen wurden verschiedene Aminosäuren und Peptiden verwendet, so Glykokoll, α -Alanin, Leucin, Phenyl- α -alanin, Phenyl- β -alanin, Tyrosin, Cystin, Asparaginsäure, Asparagin, d-Glutaminsäure, d-Lysinidihydrochlorid, Histidinmonochlorid, l-Tryptophan, Leucylglycin und Glycylglycin.

Diese Chemikalien wurde zu je 0.02 g in 10 ccm Wasser gelöst und mit 10 ccm Sake vermischt, so daß die Konzentration 0.1 % der Flüssigkeit betrug. Die in Wasser schwer löslichen Aminosäuren wurden zunächst einmal in Säure oder Alkali gelöst, dann zu Sake zugesetzt und kontrolliert. Jede Lösung wurde mit Hyochi-Bazillen geimpft. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle XIV niedergelegt.

TABELLE XIV

Versuchsdauer (Tage)		4		9	
Chemikalien		Trübung	Bodensatz	Trübung	Bodensatz
Aminosäuren	Glykokoll	±	-	++	+
	α -Alanin	±	-	++	+
	Leucin	±	-	++	+
	Phenyl- α -alanin	±	-	++	+
	Phenyl- β -alanin	±	-	++	+
	Tyrosin	+	±	++±	+
	Cystin	+	±	++±	+
	Asparaginsäure	±	-	++	+
	Asparagin	±	-	++	+
	d-Glutaminsäure	±	-	++	+
	d-Lysinidihydrochlorid	±	-	++	+
	Histidinmonochlorid	±	-	++	+
	l-Tryptophan	±	-	++	+
Peptid	Leucylglycin	±	-	++	+
	Glycylglycin	±	-	++	+
Positive Kontrolle (Reisembryowasser)		++	+	++++	+++
Negative Kontrolle (Wasser)		±	-	++	+

Bemerkung: ++± besser Entwicklung als bei ++

Bei Betrachtung dieser Tabelle kann man wohl kaum annehmen, daß Aminosäuren oder Peptide in ihren Wirkungen die das Bazillenwachstum fördernden Substanzen vertreten können, sondern es ist lediglich zu ersehen, daß beim Zusatz von Tyrosin und Cystin eine gewisse Wachstumsbeförderung eintritt.

Das Bazillenwachstum war zwar bei diesen beiden Fällen stärker als bei den übrigen Aminosäuren und Peptiden, jedoch bei weitem schwächer als beim Zusatz von Reisembryowasser.

(2) Der Einfluss der Menge von Aminosäuren und Peptiden

Zur Feststellung des Einflusses bestimmter Mengen von Aminosäuren und Peptiden auf das Wachstum der Hyochi-Bazillen verwendete ich Tyrosin, Leucin und Leucylglycin, in einer Konzentration von je 0.05, 0.1, 0.3 und 0.5 %. Die folgende Tabelle XV zeigt die Resultate der Impfversuche.

TABELLE XV

Chemikalien	Zusatzmenge %	4 Tage		9 Tage	
		Trübung	Bodensatz	Trübung	Bodensatz
Tyrosin	0.05	±	—	++	+
"	0.10	±	—	+++	+
Leucin	0.05	±	—	++	+
"	0.10	±	—	++	+
"	0.30	±	—	+++	+
"	0.50	+	±	+++	+
Leucylglycin	0.05	±	—	++	+
"	0.10	±	—	++	+
"	0.30	±	—	+++	+
"	0.50	±	—	+++	+
Positive Kontrolle (Reisembryowasser)		++	+	++++	+++
Negative Kontrolle (Wasser)		+	—	++	+

Wie man aus der Tabelle ersieht, wird die Bazillenentwicklung durch die Menge der zugesetzten Substanzen nicht wesentlich verändert.

G. Der Einfluss der Zuckerarten auf das Wachstum der Hyochi-Bazillen

Wenn auch schon einige Angaben darüber vorliegen, daß gewisse Zuckerarten leicht von Hyochi-Bazillen assimiliert werden (6) (54), so ist doch über ihre wachstumsfördernde Wirkung nichts bekannt.

Auch ließen sich bisher keinerlei Berichte auffinden, welche eine das Bazillenwachstum fördernde Wirkung gewisser Zuckerarten behandeln. AYERS und MUDZE (55) stellten zwar fest, daß sich in den Extraktionsflüssigkeiten von Hefe und Kohl Substanzen befinden, welche das Bazillenwachstum fördern, und behaupteten, daß es sich hierbei um den darin enthaltenen Zucker handelte, jedoch erbrachten sie keinen Beweis unter Verwendung von reinen Zuckerarten.

(1) Der Einfluss von verschiedenen Zuckerarten

Für diese Versuche verwendete ich die folgenden Zuckerarten: Dextrin, Raffinose, Milchzucker, Rohrzucker, Maltose, Traubenzucker, Fruktose, Mannose, Galaktose, Xylose und Arabinose. Von diesen Zuckerarten wurden je 0.2 g in einem Gemisch von 10 ccm Wasser und 10 ccm Sake

TABELLE XVI

Versuchsdauer (Tage)	4		9	
	Trübung	Bodensatz	Trübung	Bodensatz
Chemikalien				
Dextrin	+	±	+++	+
Raffinose	±	-	++	+
Milchzucker	±	-	++	+
Rohrzucker	±	-	++	+
Maltose	+	±	+++	+
Traubenzucker	±	-	++	+
Fruktose	±	-	++	+
Mannose	±	-	++	+
Galaktose	+	±	+++	+
Xylose	±	-	++	+
Arabinose	±	-	++	+
Positive Kontrolle (Reisembryowasser)	++	+	++++	+++
Negative Kontrolle (Wasser)	±	+	++	+

gelöst verwendet. Die Lösungen enthielten also je 1 % Zucker. Die Resultate über den Einfluß auf die Hyochi-Bazillen sind in der vorliegenden Tabelle XVI gelegt.

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, beschleunigt der zugesetzte Zucker das Bazillenwachstum nur wenig. Diese anregende Wirkung ist besonders bei Dextrin, Maltose und Galaktose zu bemerken, aber im Vergleich mit Reisembryowasser viel schwächer. Man kann daraus schließen, daß Zucker nicht Wachstumsfördernde Substanz, sondern lediglich Nährstoff für die Bazillen ist.

(2) Einfluss der benutzten Zuckermenge

Da der Reis das Ausgangsmaterial der Sakebereitung ist, und bei seiner Zersetzung unter anderem verschiedene Zuckerarten (Dextrin, Maltose, Traubenzucker und Arabinose) gebildet werden, setzte ich je 0.5, 1.0, 3.0 und 5.0 % von einzelnen Zuckerarten dem Sake zu und beobachtete den Einfluß auf das Bazillenwachstum. Tabelle XVII gibt die Ergebnisse wieder.

TABELLE XVII

Chemikalien	Zusatzmenge %	4 Tage		9 Tage	
		Trübung	Bodensatz	Trübung	Bodensatz
Dextrin	0.5	±	—	++	+
"	1.0	+	—	++	+
"	3.0	+	±	+++	++
"	5.0	+	±	+++	++
Maltose	0.5	±	—	++	+
"	1.0	±	—	++	+
"	3.0	+	±	+++	++
"	5.0	+	±	+++	++
Traubenzucker	0.5	±	—	++	+
"	1.0	±	—	++	+
"	3.0	±	—	++	+
"	5.0	+	±	++	+
Arabinose	0.5	±	—	++	+
"	1.0	±	—	++	+
"	3.0	±	—	++	+
"	5.0	+	±	++	+
Positive Kontrolle (Reisembryowasser)		++	+	++++	+++
Negative Kontrolle (Wasser)		±	—	++	+

Aus der Tabelle ergibt sich, daß sich bei den Zuckerarten mit schwacher Wirkung, wie z. B. Traubenzucker und Arabinose, auch bei verschiedener Zusatzmenge kein Unterschied in der Wachstumsförderung zeigt. Bei Dextrin und Maltose, den leicht resorbierbaren Zuckerarten, wird das Bazillenwachstum umso mehr gefördert, je konzentrierter die Lösung ist (unter Berücksichtigung eines Maximums von 5 %).

H. Schlussbetrachtung und Zusammenfassung

Aus den Resultaten meiner Versuche läßt sich erkennen, daß, ähnlich wie bei den meisten Mikroorganismen, beim Zusatz von wachstumsfördernden Substanzen die Entwicklung der Hyochi-Bazillen schneller und lebhafter vor sich geht.

Ueber die Natur der wachstumsfördernden Substanzen finden sich bei Bakterien ziemlich genaue und zuverlässige Untersuchungen, so z. B. in den oben erwähnten Abhandlungen von HOSOYA und KUROYA sowie von HUGHES. Auch meine Versuche konnten dazu beitragen den Charakter dieser Substanzen aufzuklären. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle VIII und XIII wiedergegeben.

Bei den Untersuchungen mit Hyochi-Bazillen hielt ich es für wichtig, die Beschaffenheit des Nährbodens und die Aktivität der Bazillen konstant zu halten, sowie stets von einer einheitlichen Vorkultur eine möglichst kleine Bazillenmenge zu impfen.

Im folgenden fasse ich die wichtigsten Ergebnisse meiner Versuche über die für Hyochi-Bazillen wachstumsfördernden Substanzen zusammen.

1. Die das Wachstum der Hyochi-Bazillen fördernden Substanzen befinden sich in Tierorganen, Tier- und Pflanzengewebe, Vitaminpräparaten sowie in deren Wasserextrakten. Die fördernde Wirkung geht fast parallel mit dem Gehalt an Vitamin-B.

2. Die charakteristischen Eigenschaften dieser Substanzen sind: leichte Adsorbierbarkeit durch aktive Kohle oder FULLERSche Erde, Stabilität gegen Säure, jedoch Labilität gegenüber Alkali, Festigkeit auch bei höheren Temperaturen (z. B. 134°C). Bei der Dialyse besitzen die Substanzen Permeabilität. Sie sind leicht löslich in Wasser und Alkali, wenig in Aceton, und schwer in Aether, Benzin und Aethylacetat. Mit Phosphorwolframsäure und Silberbarium werden die Substanzen vollständig niedergeschlagen, jedoch nicht mit Bariumhydroxyd, Mercurisulfid, Bleiazetat, Pikrinsäure, Goldchlorid, Platinchlorid und Mercurichlorid.

3. Bei dem Vergleiche des Einflusses der wachstumsfördernden Sub-

stanzen auf diese Bazillen mit demjenigen auf Hefe ließen sich drei wichtige Unterschiedungsmerkmale feststellen.

Die das Wachstum der Hyochi-Bazillen fördernden Substanzen werden mit Silber-Barium niedergeschlagen, bei Alkalizusatz zersetzt und von FULLERScher Erde gut adsorbiert, während die das Hefewachstum anregenden Substanzen sich dabei ganz entgegengesetzt verhalten.

4. Unter den zur Untersuchung herangezogenen Körpern: 13 Aminosäuren (Glykokoll, α -Alanin, Leucin, Phenyl- α -alanin, Phenyl- β -alanin, Tyrosin, Cystin, Asparaginsäure, Asparagin, d-Glutaminsäure, d-Lysin-dihydrochlorid, Histidinmonochlorid und l-Tryptophan) und 2 Peptiden (Leucylglycin und Glycylglycin) befindet sich keiner der imstande wäre, die das Wachstum der Hyochi-Bazillen fördernden Substanzen zu ersetzen.

5. Bei Gegenwart von Zuckerarten gedeihen die Bazillen zwar mit Dextrin, Maltose und Galaktose etwas lebhafter als ohne Zucker, von einer wirklichen Wachstumsbeförderung kann jedoch keine Rede sein. Die lebhafte Entwicklung der Bazillen dürfte wohl darauf zurückzuführen sein, daß diese Zuckerarten wegen ihrer leichten Assimilierbarkeit auf die Bazillen nährend wirken.

II. EINFLUSS EXOGENER BEDINGUNGEN AUF DAS WACHSTUM DER HYOCHI-BAZILLEN

A. Temperaturverhältnisse

Für das Wachstum der Hyochi-Bazillen bilden die Temperaturverhältnisse eine wichtige Grundlage. Für die Untersuchung des Einflusses der Temperatur halte ich es für notwendig, auf die folgenden zwei Fragen hinzuweisen. Bei der ersten handelt es sich um die Temperatur, die auf das Hyochi-Bazillen-Wachstum einen Einfluß ausübt. Besonders ist es von Interesse festzustellen, bis zu welchen Kältegraden herab sich noch eine Bazillenentwicklung nachweisen läßt, da man gegenwärtig den Sake meistens in Kühlräumen aufbewahrt. Die zweite Frage ist die des Einflusses der Temperatur auf den Tod dieser Bazillen, d. h. welche Beziehungen Temperatur und Zeitdauer bei der Pasteurisierung zueinander haben.

Auf dem Gebiete des Einflusses der Temperatur auf den Sake existieren bis jetzt Arbeiten von TORII (3), TAKAHASHI (5) sowie von YEDA (7). Bei diesen Autoren handelte es sich jedoch nur um die Bestimmung des Schicksals einzelner Bakterien unter dem Einflusse der Temperatur.

Im übrigen finden sich noch die Versuche von NAGAO (56) über die

Pasteurisierungstemperatur des Sake. YAMAZAKI (57) führte bei einigen Stämmen von Hyochi-Bazillen Untersuchungen in Bezug auf die Tötungstemperatur durch.

Für meine Versuche benutzte ich den Standard-Stamm der Hyochi-Bazillen und legte genau den Einfluß der Temperatur auf denselben fest. Im folgenden möchte ich darüber genaueres berichten.

(1) Wachstumstemperatur

a. Versuchsmethode

i. Kultivierungsmethode. Als Nährflüssigkeiten wurde je 20 ccm von Sake oder Sake mit Reisembryowasser, in sterilisierte Reagensgläser gefüllt. Hier hinein wurde je eine Platinöse des Standard-Stammes eingimpft und diese Kulturen dann verschiedenen Temperaturen ausgesetzt.

ii. Wachstum. Täglich wurden die Kulturen besichtigt und festgestellt, nach wieviel Tagen (t) die Flüssigkeiten Trübung, Bodensatz oder andere Veränderungen zeigten. Die Wachstumsgeschwindigkeit bezeichnet ich als $1/t$.

iii. Wasserstoffionenkonzentration. Die Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration erfolgte durch die Quinhydrin-Methode mittels des K-Type-Potentiometers von LEEDS und NORTHRUP.

iv. Säuremenge. Die Differenz zwischen dem Säuregehalt der Flüssigkeit zum Beginn und am Ende der Kultur wurde als Milchsäure berechnet.

b. Versuchsergebnisse

Aus der Tabelle XVIII und XIX läßt sich ersehen, daß die Hyochi-Bazillen bei einer Temperatur von 30°C am stärksten wachsen und am lebhaftesten gedeihen. Sowohl bei einem Ansteigen über diesen Wärmergrad als auch bei einem Herabsinken unter denselben ließ sich eine Schwächung des Wachstums feststellen.

Bei Temperaturen über 40°C und um $4.5-6^{\circ}\text{C}$ zeigte sich 15 bis 16 Tage lang keinerlei Wachstum. Wenn man nach Ablauf dieser Kulturen diese im Thermostat auf einer Temperatur von 30°C hielt, so zeigte es sich, daß die Kultur von über 40°C zwar keine Bazillenentwicklung mehr zeigte, diejenige von $4.4-5^{\circ}\text{C}$ dagegen noch ein Bazillenwachstum aufweisen konnte. Hieraus ließ sich erkennen, daß die Kultur von $4.5-6^{\circ}\text{C}$ immer noch gewisse Lebenskräfte in sich trägt.

TABELLE XVIII

Sakekultur.

Temperatur (°C)	Wachstum		pH			Produzierte Säuremenge %
	Tage (t)	Geschwindig- keit (1/t)	Anfangs-pH	End-pH	pH- Veränderung	
45~6	—	—	4.04	—	—	—
8~11	14	0.071	"	4.04	0	0
13~15	10	0.100	"	"	"	"
16~20	8	0.125	"	"	"	"
22~23	6	0.167	"	4.02	0.02	"
26	5	0.200	"	3.79	0.29	"
30	4	0.250	"	3.69	0.35	"
36	5	0.200	"	3.67	0.37	"
40	—	—	"	—	—	—

TABELLE XIX

Sake mit Reisembryowasserkultur.

Temperatur (°C)	Wachstum		pH			Produzierte Säuremenge %
	Tage (t)	Geschwindig- keit (1/t)	Anfangs-pH	End-pH	pH- Veränderung	
45~6	—	—	4.01	—	—	—
8~11	12	0.083	"	4.01	0	0
13~15	8	0.125	"	4.00	0.01	"
18~20	6	0.167	"	3.94	0.07	0.018
22~23	4	0.250	"	3.66	0.35	0.216
26	3	0.333	"	3.14	0.87	1.130
30	2	0.500	"	3.10	0.91	1.413
36	3	0.333	"	3.21	0.80	1.085
40	—	—	"	—	—	—

Was den Einfluß des Hyochi-Bazillen-Wachstums auf die Wasserstoffionenkonzentration und die Säuremenge der Nährflüssigkeit betrifft, so bemerkt man bei starkem Wachstum eine Abnahme des pH und ein Ansteigen der Säuremenge.

Bei sehr schwacher Bazillentwicklung ließ sich kein solcher Einfluß auf pH und Säuremenge der Nährflüssigkeit feststellen. Vergleicht man den Sake mit Reisembryowasser-Zusatz mit demjenigen ohne einen solchen, so zeigt es sich, daß der Einfluß auf Wasserstoffionenkonzentration und Säuremenge bei den Verschiedenen Temperaturen beim Zusatz von Reisembryowasser bedeutend stärker ist. Auch läßt sich erkennen, daß in der Nähe des Wachstumsoptimums die Veränderungen in der Nährflüssigkeit am auffälligsten sind, während sich um das Minimum herum kein starker Einfluß mehr bemerken läßt. Diese Tatsache dürfte wohl darauf zurückzuführen sein, daß die Veränderungen von pH und Säuremenge auf Stoffwechselprodukte der Hyochi-Bazillen zurückzuführen sind, die natürlich im Entwicklungsoptimum am stärksten abgesondert werden.

(2) Tötungstemperatur

a. Versuchsmethode

Je 15 ccm von Sake mit Reisembryowasser wurden in sterilisierte Reagensgläser gefüllt und 3 Tropfen des Standard-Stammes der Hyochi-Bazillen mit einer Kapillarröhre eingepft. Die Flüssigkeit wurde sodann verschieden lange Zeit verschiedenen Temperaturen ausgesetzt und dann plötzlich mit kaltem Wasser abgekühlt und 20 Tage lang bei einer Temperatur von 30°C im Thermostat aufbewahrt, wobei die Entwicklung der Bazillen genau verfolgt wurde.

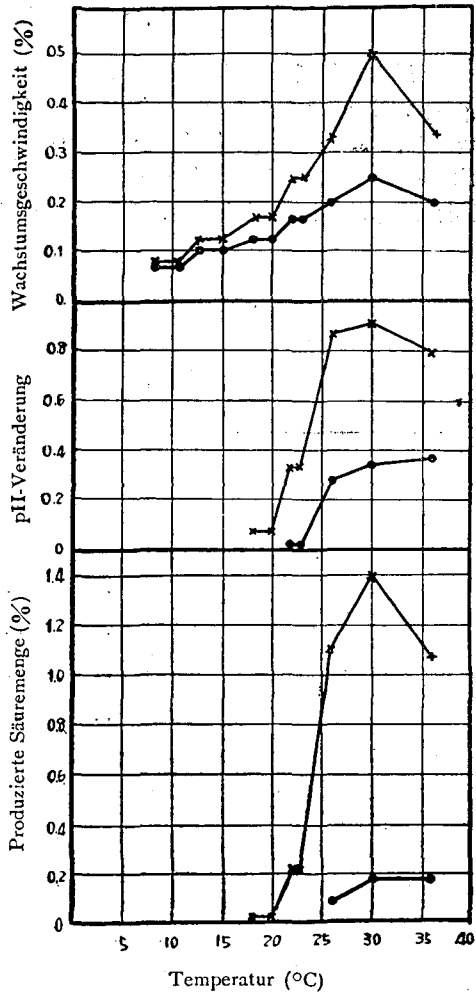


Fig. 1

- x Sake mit Reisembryowasser-Kultur
- Sake-Kultur

b. Versuchsergebnisse

Versuch I. Die Proben wurden im Wasserbad Temperaturen von 40–70°C ausgesetzt, wobei immer in Abständen von je 5°C gemessen wurde. Die Versuchsdauer erstreckte sich von 10 Minuten bis zu einer Stunde. Hierbei wurden die Messungen aller 10 Minuten vorgenommen. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle XX wiedergegeben.

TABELLE XX

Temperatur (°C)	Zeit (Min.)					
	10	20	30	40	50	60
40				+	+	+
45			+	+	+	+
50	+	+	–	–	–	–
55	–	–	–	–	–	–
60	–	–	–	–		
65	–	–	–			
70	–	–				

Bemerkung: + = positiv, – = negativ

Wie aus der obigen Tabelle ersichtlich ist gehen die Hyochi-Bazillen bei einer Temperatur von 45°C oder weniger noch nicht zu Grunde. Bei 50°C zeigen die Bazillen nach 20 Minuten noch Lebensfähigkeit, jedoch nach 30 Minuten nicht mehr. Bei 55°C oder noch höheren Temperaturen hat sich schon nach 10 Minuten der Tod der Hyochi-Bazillen eingestellt.

Versuch II. Diese Untersuchung wurde unternommen, um die beim Versuch I zu Tage getretenen Verhältnisse in ihren Einzelheiten genauer klarzustellen.

Bei Temperaturen von 45°C oder weniger zeigte sich auch nach 5 Stunden noch kein Aufhören der Lebensfähigkeit der Bazillen.

Bei Temperaturen von 50°C sind die Bazillen nach 35 Minuten zu Grunde gegangen.

Bei 55°C wurden die Bazillen nach 5 Minuten getötet, während sie bei 60°C schon nach 3 Minuten ihre Lebensfähigkeit einbüßten.

TABELLE XXI

Bei 40°C und 45°C.

Temperatur (°C) \ Zeit (Std.)	2	3	4	5
40	+	+	+	+
45	+	+	+	+

TABELLE XXII

Bei 50°C.

Temperatur (°C) \ Zeit (Min.)	15	20	25	30	35	40
50	+	+	+	+	-	-

TABELLE XXIII

Bei 55°C und 60°C.

Temperatur (°C) \ Zeit (Min.)	3	5	10
55	+	-	-
60	-	-	-

c. Allgemeines über die Tötungstemperatur

Temperaturen unter 45°C reichten auch bei langer Zeitdauer nicht zur Pasteurisierung aus. Bei 50°C läßt sich schon in genügender Weise ein Aufhören der Lebensfähigkeit der Hyochi-Bazillen feststellen. Bei 55°C lebten die Bazillen noch nach 3 Minuten, während sie nach 5 Minuten bereits zu Grunde gegangen waren. Bei Temperaturen von über 60°C wird der Zweck der Pasteurisierung schon nach 3 Minuten erreicht.

(3) Zusammenfassung

Zusammenfassend läßt sich zu dem Versuche über die Temperaturverhältnisse folgendes sagen.

1. Die Optimaltemperatur für die Hyochi-Bazillen-Entwicklung liegt bei 30°C.
2. Bei Temperaturen über 40°C um 4.5–6.0°C zeigt sich keine Entwicklung mehr, jedoch besitzen die Bazillen bei den letzteren, niedrigen Temperaturgraden immer noch ihre Lebensfähigkeit.
3. Beim stärksten Wachstum der Hyochi-Bazillen zeigten sich in der Nährflüssigkeit (Sake) beträchtliche Schwankungen des pH- und der Säuremenge, die sich jedoch bei schwächerem Bazillen-Wachstum nicht bemerken ließen.
4. Die Tötungstemperatur für Hyochi-Bazillen ist verschieden je nach dem Verhältnis zwischen Temperatur und Zeit. Bei Temperaturen von weniger als 45°C zeigt sich auch nach 5 Stunden noch keinerlei Einfluß, bei 50°C ist der Bazillentod nach etwa 20 Minuten, bei 55°C schon nach 5 Minuten eingetreten.
5. Daher scheint mir der Zweck der Pasteurisierung bei einer Temperatur von 50°C nach einer Stunde, bei 55°C nach 10 bis 20 Minuten erfüllt zu sein.

B. Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration

Bei der Entwicklung der Hyochi-Bazillen im Sake zeigt sich bald eine Säuerung dieser Flüssigkeit zugleich mit einem Ansteigen der Wasserstoffionenkonzentration. Es ist leicht ersichtlich, daß dieses Phänomen durch die Stoffwechselprodukte der Hyochi-Bazillen hervorgerufen wird. Wenn die Wasserstoffionenkonzentration jedoch zu hoch ansteigt, so scheint dadurch auch eine weitere Bazillenentwicklung in der Flüssigkeit unmöglich zu werden.

Ebenso wie bei anderen Bakterienarten halte ich das Minimum und Maximum sowie das Optimum der Wasserstoffionenkonzentration für charakteristische Bestimmungsmerkmale auch der Hyochi-Bazillen.

Im allgemeinen soll bei Anwesenheit von Salzen in der Nährflüssigkeit eine optimaler Anstieg der Wasserstoffionenkonzentration erfolgen (58). Nach den Versuchen von WOLF und SCHUNK (59) soll unter verschiedenen Säuren (Salzsäure, Schwefelsäure, Essigsäure, Zitronensäure, Bernsteinsäure, Äpfelsäure, Fumarsäure) nur Fumarsäure-Nährflüssigkeit bei einer Wasserstoffionenkonzentration von pH 4.8 auf pflanzenparasitische Bakterien

wachstumsanregend gewirkt haben.

Im folgenden möchte ich nun den Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Entwicklung der Hyochi-Bazillen klarzustellen versuchen. Ich setzte dem Sake verschiedene Pufferlösungen zu, stellte einige Nährlösungen mit verschiedenem pH her, impfte Hyochi-Bazillen ein und begann dann mit den Versuchen.

(1) Versuchsmethode

a. *Nährflüssigkeiten*: Zunächst stellte ich eine Grund-Sakelösung her, die folgenden Bestandteile enthielt.

Sake	60 ccm
Reisembryowasser	5 "
Destilliertes Wasser	5 "
<hr/>	
insgesamt	70 ccm

Zu dieser Lösung setzte ich eine Pufferlösung hinzu und regulierte so das pH.

b. *Pufferlösungen*: Die Pufferlösungen wurden aus Phosphorsäure, Essigsäure, Weinsäure und Milchsäure sowie ihren Salzen, schließlich auch aus Salzsäure und Natronlauge hergestellt.

c. *Die Feststellung des Hyochi-Bazillen-Wachstums sowie die Bestimmungsmethode der Wasserstoffionenkonzentration* habe ich oben schon ausführlich beschrieben.

d. *Kulturmethode*: In ein Reagensglas, in das vorher 15 ccm sterilisierter Nährflüssigkeit gefüllt worden waren, wurde der Standard-Stamm der Hyochi-Bazillen eingimpft. Dann wurde das Glas in einen Thermostaten von 30°C gebracht.

(2) Versuchsergebnisse

a. Mit Phosphorsäure- und Kaliumphosphat-Puffer

Versuch I.

Kulturlösung:

Grund-Sakelösung	70	70	70	70	70	70	70	70	70
H ₃ PO ₄ (M/2)	5.5	2.0							
KH ₂ PO ₄ (M/2)	19.5	23.0	25.0	23.5	20.5	12.0	6.0	2.5	
K ₂ HPO ₄ (M/2)				1.5	4.5	13.0	19.0	22.5	25.0
Destilliertes Wasser	5	5	5	5	5	5	5	5	5
pH	3.07	3.62	4.14	4.69	5.62	6.53	6.96	7.24	7.50

Auf die obige Nährflüssigkeit wurde der Standard-Stamm übertragen. Nach einer Kulturdauer von 15 Tagen wurden die Resultate erzielt, welche in Tabelle XXIV und Figur 2 niedergelegt sind.

TABELLE XXIV

pH			Wachstum	
Anfangs-pH	End-pH	pH-Veränderung	Tage (t)	Geschwindigkeit (1/t)
3.07	—	—	—	—
3.62	3.51	0.11	7	0.143
4.14	3.43	0.71	4	0.250
4.69	3.44	1.25	2	0.500
5.62	5.61	0.01	6	0.167
6.53	—	—	—	—
6.96	—	—	—	—
7.24	—	—	—	—
7.50	—	—	—	—

Versuch II.

Kulturlösung:

Grund-Sakelösung	70	70	70	70	70	70	70	70
H ₃ PO ₄ (M/2)	4.0	1.5						
KH ₂ PO ₄ (M/2)	21.0	23.5	24.5	24.0	22.5	18.0	15.0	12.5
K ₂ HPO ₄ (M/2)			0.5	1.0	2.5	7.0	10.0	12.5
Destilliertes Wasser	5	5	5	5	5	5	5	5
pH	3.28	3.75	4.31	4.49	5.10	6.06	6.36	6.57

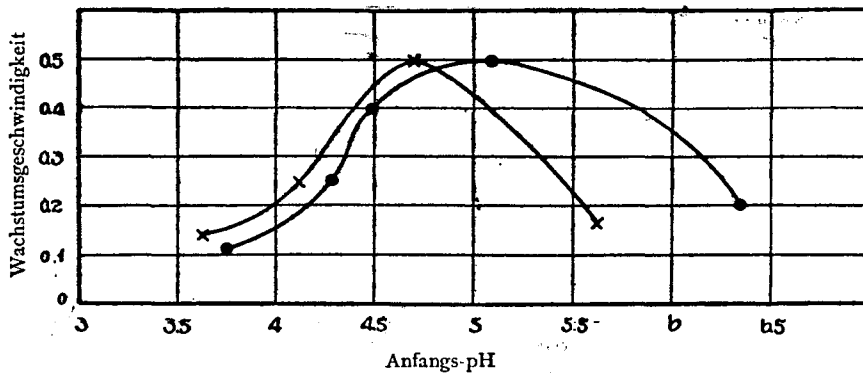
Hierbei dauerte die Kultur 17 Tage lang. Die Ergebnisse sind in Tabelle XXV und Figur 2 wiedergegeben.

Bei Versuch I war der Umfang des pH so groß, daß eine genaue Festlegung des optimalen und der extremen pH bei der Bazillenentwicklung nicht möglich war, jedoch ließ sich ohne weiteres erkennen, daß die Bazillenentwicklung nur auf der Säureseite stattfindet. Es zeigt sich, daß bei einem pH von weniger als 3.70 oder über 6.50 kein Bazillenwachstum mehr auftritt. Das optimale pH ist 4.69. Bei Versuch II trat das Verhältnis des pH noch bedeutend klarer hervor als beim vorigen Versuche. Wenn man diese beiden Versuche zusammenfasst, so gelangt man zu dem Ergebnis,

TABELLE XXV

pH			Wachstum	
Anfangs-pH	End-pH	pH-Veränderung	Tage (t)	Geschwindigkeit (1/t)
3.28	—	—	—	—
3.75	3.73	0.02	9	0.111
4.31	3.35	0.96	4	0.250
4.49	3.34	1.15	2.5	0.400
5.10	3.43	1.67	2	0.500
6.06	3.69	2.37	3	0.333
6.36	3.85	2.51	5	0.200
6.57	—	—	—	—

Fig. 2



daß bei diesem Puffer die Bazillenentwicklung etwa von pH 3.62 bis 6.36 stattfindet und ihr Maximum etwa bei 4.7 bis 5.1 erreicht.

b. Mit Essigsäure- und essigsaurem Natrium-Puffer

Kulturlösung:

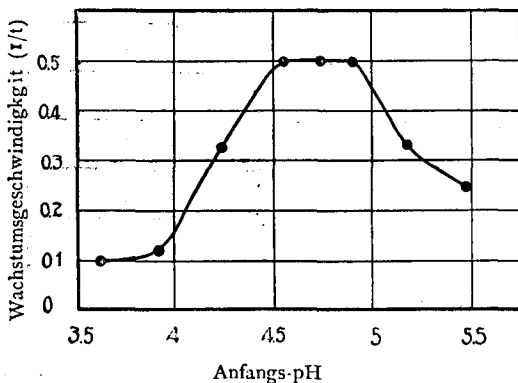
Grund-Sakelösung	70	70	70	70	70	70	70	70
Essigsäure (M/2)	23.0	20.5	17.0	12.5	9.5	6.5	3.0	0.5
Na-Acetat (M/2)	2.0	4.5	8.0	12.5	15.5	18.5	22.0	24.5
Destilliertes Wasser	5	5	5	5	5	5	5	5
pH	3.62	3.92	4.23	4.53	4.73	4.91	5.15	5.46

Die Kulturdauer betrug 15 Tage. Die Resultate sind aus Tabelle XXVI und Figur 3 ersichtlich.

TABELLE XXVI

pH			Wachstum	
Anfangs-pH	End-pH	pH-Veränderung	Tage (t)	Geschwindigkeit (1/t)
3.62	3.39	0.23	10	0.100
3.92	3.39	0.53	9	0.111
4.23	3.51	0.72	3	0.333
4.53	3.72	0.81	2	0.500
4.73	3.86	0.87	2	0.500
4.91	3.99	0.92	2	0.500
5.16	4.07	1.09	3	0.333
5.46	4.21	1.25	4	0.250

Fig. 3



Bei diesem Versuche lag das Optimum der Bazillenentwicklung um pH 4.43 bis 4.91 und diese wurde bei darunter und darüber liegenden Wasserstoffionenkonzentrationen allmählich schwächer. Da sich bei diesem Puffer das pH nur von 3.62 bis 5.46 regulieren läßt und da innerhalb dieser Wasserstoffionenkonzentrationen sich immer ein mehr oder minder

starkes Wachstum zeigt, ließen sich keine extremen pH feststellen.

c. Mit Weinsäure- und weinsaurem Kaliumsalz-Puffer

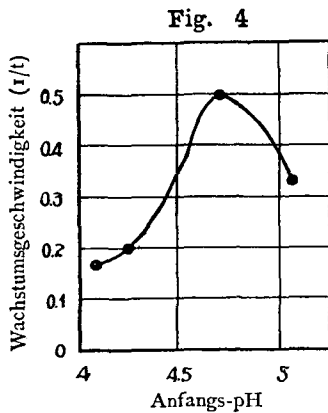
Kulturlösung:

Grund-Sakelösung	70	70	70	70	70	70	70	70	70
Weinsäure (M/2)	12.5	3.5							
K(Mono)-Tartrat(M/2)	12.5	21.5	24.5	21.5	17.5	12.5	9.0	4.0	
K(Di)-Tartrat			0.5	3.5	7.5	12.5	16.0	21.0	25.0
Destilliertes Wasser	5	5	5	5	5	5	5	5	5
pH	3.07	3.42	3.58	3.73	4.02	4.08	4.26	4.59	5.09

Die Bazillen wurden 16 Tage in diesen Flüssigkeiten gelassen. Die Ergebnisse sind in Tabelle XXVII und Figur 4 zusammengefaßt.

TABELLE XXVII

pH			Wachstum	
Anfangs-pH	End-pH	pH-Veränderung	Tage (t)	Geschwindigkeit (1/t)
3.07	—	—	—	—
3.42	—	—	—	—
3.58	—	—	—	—
3.73	—	—	—	—
4.02	—	—	—	—
4.08	4.05	0.03	6	0.167
4.26	4.17	0.09	5	0.200
4.69	4.14	0.55	2	0.500
5.06	4.58	0.48	3	0.333



Hierbei lag das Wachstumsoptimum der Bazillen bei einem pH von 4.69 und -Minimum bei 4.08. Bei Wasserstoffionenkonzentrationen von unter 4.02 kam keinerlei Bazillenentwicklung mehr zustande.

d. Mit Milchsäure- und milchsaurem Natrium-Puffer

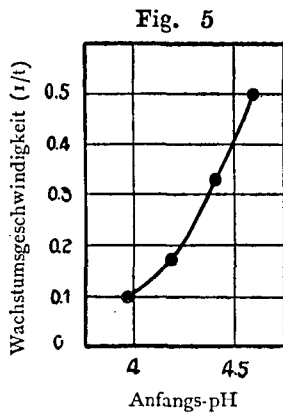
Die Bakterien wurden nach der Einimpfung 15 Tage lang kultiviert. Die Resultate dieses Versuchs finden sich in Tabelle XXVIII und Figur 5.

Kulturlösung :

Grund-Sakelösung	70	70	70	70	70	70	70	70
Milchsäure (M/2)	24.5	20.5	16.0	12.5	11.0	8.0	5.0	2.5
Na-Lactat (M/2)	0.5	4.5	9.0	12.5	14.0	17.0	20.0	22.5
Destilliertes Wasser	5	5	5	5	5	5	5	5
pH	3.04	3.36	3.67	3.88	3.93	4.18	4.40	4.60

TABELLE XXVIII

pH			Wachstum	
Anfangs-pH	End-pH	pH-Veränderung	Tage (t)	Geschwindigkeit (1/t)
3.04	—	—	—	—
3.36	—	—	—	—
3.69	—	—	—	—
3.88	—	—	—	—
3.98	3.87	0.11	10	0.100
4.18	3.57	0.61	6	0.167
4.40	3.69	0.71	3	0.333
4.60	3.75	0.85	2	0.500



Wie aus diesen Ergebnissen ersichtlich ist zeigen die Bazillen bei diesem Puffer bei einem pH, welches unter 3.88 liegt, keinerlei Entwicklung mehr. Zwischen pH 3.98 und 4.60 belebte sich die Bazillenentwicklung parallel mit dem Aussteigen des pH. Eine Erzeugung von noch höherem pH war mir bei diesem Puffer nicht möglich. Ich glaube annehmen zu können, daß bei diesem Puffer das Optimum das Bakterienwachstum entweder bei pH 4.60 oder noch etwas höher liegt.

e. Mit Salzsäure- und Natronlauge-Puffer

Versuch I.

Kulturlösung:

Grund-Sakelösung	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70
HCl (M/10)	24.5	23.0	18.5	17.0	15.0	12.5	9.5	7.5	5.0	2.5
NaOH (M/10)	0.5	2.0	6.5	8.0	10.0	12.5	15.5	17.5	20.0	22.5
NaCl (M/5)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
pH	2.63	2.76	3.22	3.49	3.70	4.07	4.52	5.16	6.19	7.06

Die Kulturdauer betrug 15 Tage. Die Ergebnisse sind aus Tabelle XXIX und Figur 6 zu ersehen.

TABELLE XXIX

pH			Wachstum	
Anfangs-pH	End-pH	pH-Veränderung	Tage (t)	Geschwindigkeit (I/t)
2.63	—	—	—	—
2.76	—	—	—	—
3.22	—	—	—	—
3.46	—	—	—	—
3.70	3.66	0.04	10	0.100
4.07	3.28	0.79	4	0.250
4.52	3.30	1.22	2	0.500
5.16	3.99	1.17	3	0.333
6.19	3.76	2.43	8	0.125
7.06	—	—	—	—

Versuch II.

Um die pH-Verhältnisse noch genauer als im vorigen Versuche klarzustellen, führte ich den Versuch II durch.

Kulturlösung:

Grund-Sakelösung	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70
HCl (M/10)	18.5	18.0	16.0	13.0	10.0	7.5	6.0	5.0	4.5	4.0
NaOH (M/10)	6.5	7.0	9.0	12.0	15.0	17.5	19.0	20.0	20.5	21.0
NaCl (M/5)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
pH	3.22	3.27	3.51	3.90	4.42	5.07	5.61	6.08	6.33	6.52

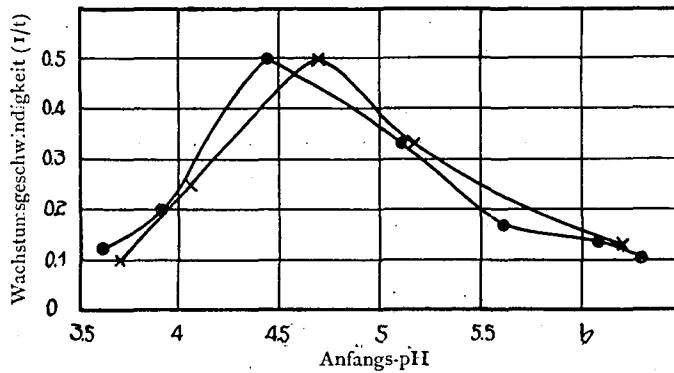
Die Kulturdauer war dieselbe wie beim vorigen Versuche. Die Resultate sind in Tabelle XXX und Figur 6 wiedergegeben.

Bei dem ersten dieser Versuche betrug das optimale pH 4.52, das minimale 3.70 und das maximale 6.19, während das Optimum beim zweiten Versuche bei 4.43, das Minimum bei 3.51 und das Maximum bei 6.33 lag. Wenn man den Einfluß des pH auf die Bazillenentwicklung bei diesen Puffern betrachtet, so findet man, daß eine Bazillenentwicklung nur zwischen pH 3.5 und 6.3 stattfinden kann und das Wachstumsoptimum mit pH 4.5 zusammenfällt.

TABELLE XXX

pH			Wachstum	
Anfangs-pH	End-pH	pH-Veränderung	Tage (t)	Geschwindigkeit (1/t)
3.22	—	—	—	—
3.27	—	—	—	—
3.51	3.46	0.05	8	0.125
3.90	3.17	0.73	5	0.200
4.42	3.17	1.35	2	0.500
5.07	3.22	1.85	3	0.333
5.61	3.30	2.31	6	0.169
6.08	3.37	2.71	7	0.143
6.33	3.64	2.69	9	0.111
6.52	—	—	—	—

Fig. 6



(3) Schlussbetrachtung und Zusammenfassung

Da die Hyochi-Bazillen-Entwicklung nur auf der Säureseite stattfindet, lag auch das optimale pH stets auf der Säureseite. YAMAZAKI (54) studierte ebenfalls die Beziehungen zwischen der Entwicklung einiger von ihm isolierter Hyochi-Bazillen und der Wasserstoffionenkonzentration u. zw. unter Zuhilfenahme von Milchsäure als Regulierungsmittel (durch Zusatz in Sake). Auch er fand das optimale pH bei 4.5–5.0. Er sagte, daß bei pH 4.5 anionische Säure von Salzsäure, Phosphorsäure, Essigsäure und Milchsäure auf die Hyochi-Bazillen-Entwicklung keinerlei Einfluß ausüben. Bei meiner

Untersuchung konnte ich feststellen, daß zwar in der Gegend des optimalen pH kaum ein Unterschied je nach verschiedenen Puffermaterialien zeigte, aber solcher mehr und mehr hervortrat, wenn sich das pH den Extremen näherte. In dieser Beziehung stimmten meiner Resultate mit denen von WOLF und SHUNK (59) sowie denen von TAKAHASHI und ZENTA (4) überein.

Im folgenden gebe ich eine kurze Zusammenfassung dieser Ergebnisse.

1. Die Hyochi-Bazillen entwickeln sich nur auf der Säureseite, dagegen nicht auf der alkalischen Seite oder im neutralen Gebiet.

2. Das Wachstum dieser Bakterien findet zwischen pH 3.5 und 6.4 statt, das Optimum liegt etwa zwischen 4.5 und 5.0.

3. In der Gegend des optimalen pH ist nur ein geringer Unterschied zwischen dem Einfluß der verschiedenen Puffermaterialien zu vermerken, während sich in der Nähe der Extreme vielerlei merkliche Unterschiede zeigen.

4. Das minimale pH lag bei den einzelnen Pufferreihen am tiefsten bei Salzsäure, dann folgten Essigsäure, Phosphorsäure und Milchsäure, während das Minimum bei Weinsäure am höchsten stand.

C. Der Einfluss verschiedener Säuren

Die meisten Säuren haben einen besondern physiologischen Einfluß auf die Bakterienentwicklung. Unter ihnen finden sich einige, die das Bazillenwachstum ausgesprochen hemmen, mit sogenannter baktericider Wirkung. Ueber die Art des Einflusses bestehen verschiedenerlei Ansichten, im allgemeinen denkt man an die folgenden drei Möglichkeiten: (a) Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration, (b) der charakteristische Anionen und (c) der undissoziierten Moleküle.

Unter den bisherigen Arbeiten über die verschiedenen Einflüsse auf das Bakterienwachstum befindet sich eine ziemlich beträchtliche Anzahl, welche den der Säuren zum Gegenstand hat. Schon vor langer Zeit erklärten KRÖNIG und PAUL (60), daß pH den Haupteinfluß ausübe, obwohl auch die Anionen und die undissoziierten Moleküle ebenfalls in gewissem Grade einwirken würden. Später führten auch PAUS (61), PAUL, BIRSTEIN und RAUSS (62), SHIMOGAWA (63), TETSUMOTO (64) sowie JANKE und BERAN (65) bei verschiedenen Bakterien Versuche mit einigen Säuren über die baktericide Wirkung derselben aus. Den Einfluß von einigen Säuren auf die Entwicklung der Hyochi-Bazillen behandelten lediglich TAKAHASHI und ZENTA (6) sowie den von Caprinsäure FUKAI und NAKASHIMA (66).

Ich selbst benutzte eine große Anzahl von Säuren und untersuchte den Einfluß einer jeden Einzelnen auf das Bazillenwachstum.

(1) Versuchsmethode

Mit den Säuren stellte ich Sakelösungen von 0.001, 0.004, 0.01, 0.02, 0.03 und 0.05 % her, die ich in Reagenzgläser abfüllte. Hier hinein impfte ich die Bazillen. Dann wurde die Lösung in einen Thermostaten von 30°C gebracht und täglich das Bazillenwachstum beobachtet.

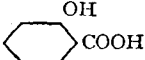
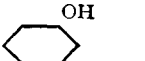
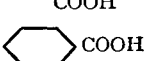
Die Wasserstoffionenkonzentration wurde nach der von mir bisher schon immer angewendeten Methode gemessen und die titrierbare Säuremenge auf die folgende Weise bestimmt: von jeder Lösung wurden 5 ccm entnommen, diesen Rosolsäure als Indikator zugesetzt, mit N/10 NaOH die Titration durchgeführt und der Ausfall nach der Menge der Natronlauge bestimmt.

(2) Angewendte Säurearten

Die Zahl der in diesen Versuchen zur Verwendung gelangten Säurearten betrug 31, worunter sich 12 gesättigte Monocarbonsäuren, 4 gesättigte mehrbasische Carbonsäuren, 4 ungesättigte mehrbasische Carbonsäuren, 4 Oxy-carbonsäuren, 3 Oxybenzoesäuren und 4 Mineralsäuren befanden. Ueber diese Säuren gibt die Tabelle XXXI Aufschluß.

TABELLE XXXI

Säureart	Formel	Zahl des Kohlenstoffes	Mol. Gew.	Bemerkung	
Gesättigte Monocarbonsäure	Ameisensäure	H·COOH	1	46.02	in Wasser gelöst
	Essigsäure	CH ₃ ·COOH	2	60.06	
	Propionsäure	CH ₃ CH ₂ COOH	3	74.05	
	n-Buttersäure	CH ₃ (CH ₂) ₂ COOH	4	88.06	
	Isobuttersäure	(CH ₃) ₂ CH·COOH	4	88.06	in 50%igem Alkohol gelöst
	Isovaleriansäure	(CH ₃) ₂ CH·CH ₂ COOH	5	102.08	
	Capronsäure	CH ₃ (CH ₂) ₄ COOH	6	116.10	
	Isocapronsäure	(CH ₃) ₂ CH(CH ₂) ₂ COOH	6	116.10	
	Oenanthsäure	CH ₃ (CH ₂) ₅ COOH	7	130.11	
	Caprylsäure	CH ₃ (CH ₂) ₆ COOH	8	144.13	
	Pelargonsäure	CH ₃ (CH ₂) ₇ COOH	9	158.14	
	Caprinsäure	CH ₃ (CH ₂) ₈ COOH	10	172.16	

Säureart	Formel	Zahl des Kohlenstoffes	Mol. Gew.	Bemerkung		
Mehrbasische gesättigte Carbonsäure	Oxalsäure	$\text{HOOC}\cdot\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O}$	2	126.05	} in Wasser gelöst	
	Bernsteinsäure	$\text{HOOC}(\text{CH}_2)_2\cdot\text{COOH}$	4	118.05		
	Glutarsäure	$\text{HOOC}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$	5	132.06		
	Aconitsäure	$\text{HOOC}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{C}(\text{COOH})\cdot\text{CH}\cdot\text{COOH}$	6	174.05		
	Fumarsäure	$\text{HOOC}\cdot\text{C}\cdot\text{H}$ $\text{H}\cdot\text{C}\cdot\text{COOH}$	4	116.03		
Mehrbasische ungesättigte Carbonsäure	Maleinsäure	$\text{H}\cdot\text{C}\cdot\text{COOH}$ $\text{H}\cdot\text{C}\cdot\text{COOH}$	4	116.03		
	Mesaconsäure	$\text{HOOC}\cdot\text{C}\cdot\text{CH}_3$ $\text{H}\cdot\text{C}\cdot\text{COOH}$	5	130.048		
	Itaconsäure	$\text{CH}_2\cdot\text{C}(\text{COOH})\cdot\text{CH}_2\cdot\text{COOH}$	5	130.048		
Oxycarbonensäure	Milchsäure	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\cdot\text{COOH}$	3	90.05		
	Äpfelsäure	$\text{HOOC}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CH}(\text{OH})\cdot\text{COOH}$	4	134.05		
	Weinsäure	$\text{HOOC}\cdot\text{CH}(\text{OH})\cdot\text{CH}(\text{OH})\cdot\text{COOH}$	4	150.05		
	Citronensäure	$\text{HOOC}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{C}(\text{OH})(\text{COOH})\cdot\text{CH}_2\cdot\text{COOH}$	6	210.08		
Oxybenzoesäure	Salicylsäure		7	138.05		} in 50% igem Alkohol gelöst
	m-Oxybenzoesäure		7	138.05		
	p-Oxybenzoesäure		7	138.05		
Anorganischen-säure	Salzsäure	HCl		36.47	} in Wasser gelöst	
	Salpetersäure	HNO_3		63.02		
	Schwefelsäure	H_2SO_4		98.09		
	Phosphorsäure	H_3PO_4		98.06		

(3) Versuchsergebnisse

Der Einfluß der einzelnen Säuren auf das Wachstum der Bazillen wird durch die folgende Tabelle XXXII veranschaulicht.

TABELLE XXXII

Säureart	Konzentration (%)	pH	Titrations-säuremenge	Wachstum		Bakterien-menge	
				Tage (t)	Geschwindig-keit (I/t)		
Gesättigte Mono-carbonsäure	0.001	3.84	1.35	4	0.250	++	
	0.005	3.79	1.35	9	0.111	+	
	Ameisensäure	0.01	3.77	1.43	—	—	—
		0.02	3.72	1.51	—	—	—
		0.03	3.69	1.60	—	—	—
		0.04	3.62	1.68	—	—	—
Essigsäure	0.001	3.87	1.30	4	0.250	+++	
	0.005	3.84	1.35	4	0.250	+++	
	0.01	3.84	1.38	4	0.250	++	
	0.02	3.82	1.45	4	0.250	++	
	0.03	3.80	1.53	4	0.250	++	
	0.04	3.80	1.63	4	0.250	++	
Propionsäure	0.001	3.82	1.27	4	0.250	++	
	0.005	3.82	1.25	4	0.250	++	
	0.01	3.84	1.31	4	0.250	++	
	0.02	3.79	1.31	4	0.250	+	
	0.03	3.77	1.38	4	0.250	+	
	0.04	3.79	1.40	6	0.169	+	
n-Buttersäure	0.001	3.82	1.27	4	0.250	+	
	0.005	3.82	1.25	4	0.250	++	
	0.01	3.82	1.31	4	0.250	++	
	0.02	3.79	1.31	4.5	0.222	++	
	0.03	3.77	1.38	5	0.200	++	
	0.04	3.77	1.40	6	0.169	++	
Isobuttersäure	0.001	3.84	1.25	4	0.250	++	
	0.005	3.84	1.25	4	0.250	++	
	0.01	3.82	1.27	4	0.250	++	
	0.02	3.80	1.38	4.5	0.222	++	
	0.03	3.79	1.36	5	0.200	++	
	0.04	3.77	1.40	5	0.200	++	
Isovaleriansäure	0.001	3.84	1.28	4	0.250	+++	
	0.005	3.79	1.25	4	0.250	+++	
	0.01	3.80	1.26	4	0.250	+++	
	0.02	3.79	1.35	4.5	0.222	++	
	0.03	3.77	1.35	5	0.200	++	
	0.04	3.75	1.38	5	0.200	++	

Säureart	Konzentration (%)	pH	Titrations-säuremenge	Wachstum		Bakterien-menge
				Tage (t)	Geschwindigkeit (1/t)	
Capronsäure	0.001	3.84	1.22	4	0.250	++
	0.005	3.82	1.25	5	0.200	++
	0.01	3.82	1.25	7	0.143	++
	0.02	3.80	1.30	10	0.100	++
	0.03	3.89	1.30	—	—	—
	0.04	3.82	1.37	—	—	—
Isocapronsäure	0.001	3.84	1.30	4	0.250	++
	0.005	3.82	1.26	4	0.250	++
	0.01	3.82	1.26	4.5	0.222	++
	0.02	3.82	1.30	5	0.200	++
	0.03	3.80	1.32	5	0.200	++
	0.04	3.77	1.34	6	0.169	++
Oenanthensäure	0.001	3.84	1.25	4	0.250	++
	0.005	3.79	1.27	6	0.169	++
	0.01	3.80	1.24	8	0.125	++
	0.02	3.79	1.27	10	0.100	+
	0.03	3.80	1.30	—	—	—
	0.04	3.79	1.35	—	—	—
Caprylsäure	0.001	3.82	1.25	5	0.200	++
	0.005	3.84	1.25	6	0.169	++
	0.01	3.80	1.25	9	0.111	++
	0.02	3.80	1.25	—	—	—
	0.03	3.82	1.32	—	—	—
	0.04	3.84	1.30	—	—	—
Pelargonsäure	0.001	3.37	1.27	5	0.200	++
	0.005	3.86	1.33	6	0.169	++
	0.01	3.86	1.30	—	—	—
	0.02	3.86	1.35	—	—	—
	0.03	3.84	1.35	—	—	—
	0.04	3.84	1.35	—	—	—
Caprinsäure	0.001	3.82	1.21	7	0.143	+
	0.005	3.82	1.25	—	—	—
	0.01	3.82	1.25	—	—	—
	0.02	3.84	1.23	—	—	—
	0.03	3.82	1.21	—	—	—
	0.04	3.84	1.20	—	—	—
Mehrbasische gesättigte Carbonsäure						

Säureart	Konzentration (%)	pH	Titrations-säuremenge	Wachstum		Bakterien-menge
				Tage (t)	Geschwindigkeit (1/t)	
Oxalsäure	0.001	3.86	1.30	4	0.250	++
	0.005	3.84	1.35	4	0.250	++
	0.01	3.80	1.35	4	0.250	++
	0.02	3.73	1.43	4	0.250	++
	0.03	3.67	1.51	4	0.250	++
Bernsteinsäure	0.04	3.62	1.55	4	0.250	++
	0.001	3.84	1.32	4	0.250	++
	0.005	3.84	1.32	4	0.250	++
	0.01	3.82	1.35	4	0.250	++
	0.02	3.84	1.47	4	0.250	++
Glutarsäure	0.03	3.79	1.53	4	0.250	++
	0.04	3.77	1.60	5	0.200	++
	0.001	3.89	1.25	4	0.250	++
	0.005	3.86	1.27	4	0.250	++
	0.01	3.86	1.30	4	0.250	++
Aconitsäure	0.02	3.86	1.34	5	0.200	++
	0.03	3.84	1.46	5	0.200	++
	0.04	3.82	1.50	6	0.169	+
	0.001	3.86	1.33	4	0.250	++
	0.005	3.86	1.34	4	0.250	++
Mehrbasische ungesättigte Carbonsäure	0.01	3.84	1.36	5	0.200	++
	0.02	3.79	1.45	6	0.169	++
	0.03	3.75	1.52	7	0.143	++
	0.04	3.70	1.58	8	0.125	++
	Fumarsäure	0.001	3.86	1.21	4	0.250
0.005		3.82	1.20	4	0.250	++
0.01		3.80	1.25	6	0.169	++
0.02		3.73	1.30	7	0.143	++
0.03		3.67	1.36	9	0.111	++
Maleinsäure	0.04	3.63	1.45	11	0.091	++
	0.001	3.84	1.20	4	0.250	++
	0.005	3.80	1.28	4	0.250	++
	0.01	3.77	1.25	6	0.169	++
	0.02	3.73	1.30	7	0.143	++
	0.03	3.65	1.35	8	0.125	++
	0.04	3.62	1.45	9	0.111	++

Säureart	Konzentration (%)	pH	Titrations-säuremenge	Wachstum		Bakterien-menge
				Tage (t)	Gesch-windig-keit (1/t)	
Mesaconsäure	0.001	3.89	1.27	4	0.250	++
	0.005	3.87	1.30	4	0.250	++
	0.01	3.86	1.40	5	0.200	++
	0.02	3.80	1.43	7	0.143	++
	0.03	3.77	1.49	9	0.111	++
	0.04	3.72	1.60	11	0.091	++
Itaconsäure	0.001	3.93	1.29	4	0.250	++
	0.005	3.89	1.30	4	0.250	++
	0.01	3.87	1.35	5	0.200	++
	0.02	3.84	1.40	6	0.169	++
	0.03	3.80	1.47	9	0.111	++
Oxycarbonsäure	0.04	3.79	1.55	11	0.091	++
Milchsäure	0.001	3.85	1.19	4	0.250	++
	0.005	3.84	1.21	4	0.250	++
	0.01	3.79	1.24	4	0.250	++
	0.02	3.73	1.25	5	0.200	++
	0.03	3.72	1.32	6	0.169	++
	0.04	3.69	1.35	7	0.143	++
Äpfelsäure	0.001	3.86	1.18	4	0.250	++
	0.005	3.87	1.18	4	0.250	++
	0.01	3.86	1.33	4	0.250	++
	0.02	3.82	1.40	5	0.200	++
	0.03	3.79	1.47	5	0.200	++
Weinsäure	0.04	3.77	1.53	7	0.143	++
	0.001	3.83	1.18	4	0.250	++
	0.005	3.80	1.20	4	0.250	++
	0.01	3.77	1.20	4	0.250	++
	0.02	3.72	1.28	6	0.169	++
Citronensäure	0.03	3.67	1.35	7	0.143	++
	0.04	3.62	1.37	7	0.143	++
	0.001	3.86	1.19	4	0.250	++
	0.005	3.89	1.20	4	0.250	++
	0.01	3.86	1.30	4	0.250	++
Citronensäure	0.02	3.82	1.37	4	0.250	++
	0.03	3.79	1.40	4	0.250	++
	0.04	3.77	1.44	4	0.250	++

Säureart	Konzentration (%)	pH	Titrations-säuremenge	Wachstum		Bakterien-menge
				Tage (t)	Geschwindigkeit (1/t)	
Oxybenzoesäure	0.001	3.84	1.23	4	0.250	++
Salicylsäure	0.005	3.84	1.25	4	0.250	++
	0.01	3.82	1.28	5	0.200	++
	0.02	3.77	1.28	9	0.111	+
	0.03	3.73	1.32	—	—	—
	0.04	3.70	1.33	—	—	—
m-Oxybenzoesäure	0.001	3.84	1.18	4	0.250	++
	0.005	3.82	1.20	4	0.250	++
	0.01	3.82	1.20	4	0.250	++
	0.02	3.79	1.22	4	0.250	++
	0.03	3.79	1.27	4	0.250	++
p-Oxybenzoesäure	0.04	3.79	1.30	4	0.250	++
	0.001	3.87	1.22	4	0.250	++
	0.005	3.84	1.20	4	0.250	++
	0.01	3.84	1.21	4	0.250	++
	0.02	3.84	1.26	4	0.250	++
Anorganische Säure	0.03	3.82	1.26	4	0.250	++
	0.04	3.80	1.30	4	0.250	++
	0.001	3.84	1.21	4	0.250	++
Salzsäure	0.005	3.75	1.25	4	0.250	++
	0.01	3.67	1.31	4	0.250	++
	0.02	3.53	1.43	5	0.200	++
	0.03	3.37	1.58	—	—	—
	0.04	3.24	1.69	—	—	—
Salpetersäure	0.001	3.84	1.20	4	0.250	++
	0.005	3.79	1.25	4	0.250	++
	0.01	3.75	1.25	4	0.250	++
	0.02	3.65	1.32	5	0.200	++
	0.03	3.58	1.38	8	0.125	++
Schwefelsäure	0.04	3.49	1.47	10	0.100	++
	0.001	3.84	1.18	4	0.250	++
	0.005	3.80	1.22	4	0.250	++
	0.01	3.75	1.28	4	0.250	++
	0.02	3.63	1.38	7	0.143	++
	0.03	3.49	1.46	9	0.111	++
	0.04	3.39	1.55	—	—	—

Säureart	Konzentration (%)	pH	Titrations-säuremenge	Wachstum		Bakterien-menge
				Tage (t)	Geschwindigkeit (1/t)	
Phosphorsäure	0.001	3.84	1.19	4	0.250	++
	0.005	3.84	1.20	4	0.250	++
	0.01	3.80	1.21	4	0.250	++
	0.02	3.73	1.30	4	0.250	++
	0.03	3.67	1.35	5	0.200	++
	0.04	3.62	1.40	6	0.169	++
Kontrolle						
Wasser	0.001	3.86	1.18	4	0.250	+
	0.005	3.86	1.19	4	0.250	++
	0.01	3.86	1.18	5	0.200	+
	0.02	3.86	1.18	4	0.250	++
	0.03	3.86	1.17	4	0.250	+
	0.04	3.84	1.16	4	0.250	+

Wie aus der obigen Tabelle ersichtlich ist, zeigen sich bei den Bazillen je nach den einzelnen Säurearten verschiedene Beeinflussungen des Wachstums. Im folgenden möchte ich die Ergebnisse dieser Versuche zusammenfassen.

1. Bei den gesättigten Monocarbonsäuren von C_1 - C_{10} zeigt es sich, daß, abgesehen von der Ameisensäure (C_1), daß, je größer die Zahl der C wird, umso mehr das Bazillenwachstum gehemmt wird. Bei der Ameisensäure ist die baktericide Wirkung unabhängig von der C-Zahl.

Vergleich man die Normalform und die Isoform einer Säure mit gleicher C-Zahl, so ist stets der Einfluß der Ersteren der stärkere.

2. Bei den gesättigten mehrbasischen Carbonsäuren und den ungesättigten mehrbasischen Carbonsäuren wurden solche von C_2 bis C_6 benutzt. Darunter war stets der Einfluß der ungesättigten stärker als der gesättigten. Außerdem ließ sich bei den Säuren mit hoher C-Zahl ein etwas größerer Einfluß feststellen als bei den mit niedrigerer C-Zahl.

3. Unter den Oxycarbonsäuren war der Einfluß der Milchsäure, Apfelsäure und Weinsäure fast derselbe. Bei Zitronensäure mit 3 Radikalen ist der Einfluß am geringsten.

4. Unter den Oxybenzoesäuren übt die Salicylsäure (Ortho-Form) einen stark hemmenden Einfluß auf die Bazillenenwicklung aus, während die Meta- oder Paraoxybenzoesäure keinerlei Einfluß zeigen.

5. Bei den oben genannten aliphatischen Carbonsäuren und Oxybenzoesäuren läßt sich nach meinen Versuchen keinerlei Einfluß der pH-Zahl und der Titrationssäuremenge dieser Säuren auf die Bazillenentwicklung konstatieren..

6. Bei den anorganischen Säuren, wie Salzsäure, Salpetersäure, Schwefelsäure und Phosphorsäure konnte ich einen Einfluß des pH auf die Bazillenentwicklung feststellen, während sich ein solcher der Titrationsmenge nicht bemerken ließ.

D. Einfluss der Qualität des Sake

Je nach der Natur der einzelnen Rohmaterialien, aus denen der Sake hergestellt wird, wie z. B. Reis, Koji und Wasser sowie seiner Herstellungsweise zeigen sich verschiedene Unterschiede in der Qualität des Sake.

Im allgemeinen nimmt man an, daß auch das Faulen des Sake je nach der Sakequalität verschieden leicht vor sich geht, jedoch sind bisher hierüber noch keine genaueren Tatsachen bekannt. YAMADA (67) nahm an, daß ein bestimmtes Verhältnis zwischen Aldehyden und der Fäulnis Verhütung bestände, YASUDA (68) dagegen wies auf einen Zusammenhang mit der pH-Zahl hin. Kürzlich veröffentlichte jedoch TOKUOKA (69) eine Arbeit, in der er meint, daß eine Beziehung zu den Aldehyden nicht bestehe, während bei hohem Prozentsatz des Gesamtstickstoffs und der Aminosäuren ein Faulen des Sake leichter eintrete ebenso bei einer höheren pH-Zahl.

Diesmal bestimmte ich unter Benutzung einer großen Menge von Sake-Proben (ohne Sterilisationsmittel) deren pH, Acidität, Farbenintensität, Stickstoffgehalt (Gesamtstickstoff und Aminostickstoff) und Zucker und untersuchte die Beziehungen zwischen dieser Prozentsätzen und der Hyochi-Bazillen-Entwicklung.

(1) Versuchsmethode

Von den für diese Versuche als Proben verwendeten verschiedenen Sakesorten wurden je 15 ccm in Reagensgläser eingefüllt. Hierin wurde je ein Tropfen von dem Hyochi-Bazillen-Stamm, der mit einer Kapillarröhre entnommen worden war, eingepflegt. Die Reagensgläser wurden in einem Thermostaten bei 30°C gehalten und die Bazillenentwicklung täglich beobachtet.

Bei den einzelnen Sakesorten bestimmte ich pH, Säuremenge, Farbe, Stickstoffgehalt und Zuckermenge. Die Bestimmung von Wasserstoffionen-konzentration und Säuremenge erfolgten nach der schon früher beschriebenen

Méthode. Der Gesamtstickstoff wurde nach dem Verfahren von Kjeldahl festgestellt und die Bestimmung des Aminostickstoff nach der Formol-Titrationsmethode. Nach der Methode von Bertrand wurde der reduzierte Zucker bestimmt.

(2) Versuchsergebnisse

a. Wasserstoffionenkonzentration

Die Beziehungen zwischen dem pH der verschiedenen Sakesorten und der Schnelligkeit der Bazillenentwicklung sind aus der folgenden Tabelle ersichtlich.

TABELLE XXXIII

Nr.	pH		Wachstum	
	pH-Wert	Messungstemp. (°C)	Tage (t)	Geschwindigkeit (1/t)
1	4.06	14	4	0.250
2	4.01	"	9	0.111
3	4.03	"	5	0.200
4	3.97	"	7	0.143
5	3.96	"	4	0.250
6	4.04	"	7	0.143
7	4.05	"	—	—
8	4.02	"	7	0.143
9	3.88	"	6	0.169
10	3.99	"	5	0.200
11	3.97	"	6	0.169
12	3.98	"	5	0.200
13	3.95	"	8	0.125
14	4.01	"	4	0.250
15	3.97	13	6	0.169
16	3.93	"	6	0.169
17	3.97	"	4	0.250
18	3.94	"	7	0.143
19	3.93	"	9	0.111
20	3.97	"	—	—

Bemerkung: — negativ

Wie aus der obigen Tabelle hervorgeht, beträgt die pH-Zahl des Sake 3.8-4.05. Zwischen diesen beiden Grenzzahlen ist stets eine starke Entwicklung der Hyochi-Bazillen zu bemerken.

b. Titrationsazidität

Die folgende Tabelle zeigt den Einfluß der Titrationsazidität auf die Hyochi-Bazillen-Entwicklung.

TABELLE XXXIV

Nr.	Titrationssäuremenge		Wachstum	
	N/10 NaOH-Menge (ccm)	als Bernsteinsäure %	Tage (t)	Geschwindigkeit (1/t)
1	1.28	0.148	5	0.200
2	1.32	0.153	9	0.111
3	1.14	0.131	6	0.169
4	1.19	0.138	6	0.169
5	1.24	0.143	4	0.250
6	1.25	0.145	4	0.250
7	1.28	0.148	4	0.250
8	1.30	0.150	11	0.091
9	1.34	0.155	—	—
10	1.31	0.152	8	0.125
11	1.39	0.161	7	0.143
12	1.25	0.145	5	0.200
13	1.29	0.149	7	0.143
14	1.30	0.151	7	0.143
15	1.36	0.157	—	—
16	1.19	0.138	5	0.200
17	1.28	0.148	7	0.143
18	1.30	0.150	—	—

Aus der obigen Tabelle ersieht man, daß die Säuremenge bei 10 ccm Sake 5-7 ccm N/10 NaOH beträgt, sodaß sie als Bernsteinsäure 0.1-0.2 % im Sake ausmacht.

Es ergibt sich, daß die Azidität keinen wesentlichen Einfluß auf die Entwicklung der Hyochi-Bazillen besitzt.

c. Farbe

Tabelle XXXV gibt die Farbenintensität der einzelnen Sakesorten und ihre Beziehungen zum Bazillenwachstum wieder.

TABELLE XXXV

Nr.	Farbenintensität	Wachstum	
		Tage (t)	Geschwindigkeit (1/t)
1	+	4	0.250
2	++	9	0.111
3	+	5	0.200
4	+++	10	0.100
5	±	4	0.250
6	+++	—	—
7	++	6	0.169
8	±	4	0.250
9	+	6	0.169
10	+	5	0.200

Bemerkung: Bei der Farbenintensität bedeutet ± Spur, + schwach, ++ mittelstark, +++ stark.

Es zeigt sich, daß kräftig gefärbter Sake eine gewisse das Bazillenwachstum hemmende Tendenz aufweist.

d. Stickstoffgehalt

Bei diesem Versuche bestimmte ich den Gesamtstickstoff sowie den Aminostickstoff. Das Verhältnis zwischen der Bazillenentwicklung und dem Stickstoffgehalt im Sake geht aus der folgenden Tabelle XXXVI hervor.

Die Schwankungen des Gesamtstickstoffes und des Aminostickstoffes verlaufen demnach meistens parallel. Die Bazillenentwicklung scheint in Sake mit hohem Stickstoffgehalt leichter vor sich zu gehen.

e. Zuckermenge

Die reduzierte Gesamtzuckermenge im Sake und ihr Einfluß auf das Bazillenwachstum sind in Tabelle XXXVII wiedergegeben.

TABELLE XXXVI

Nr.	Stickstoff			Wachstum	
	Gesamt-N (a) %	Amino-N (b) %	a-b	Tage (t)	Geschwindigkeit (1/t)
1	0.119	0.041	0.078	7	0.143
2	0.180	0.054	0.126	4	0.250
3	0.128	0.042	0.086	6	0.169
4	0.173	0.052	0.121	4	0.250
5	0.124	0.044	0.080	7	0.143
6	0.152	0.047	0.105	5	0.200
7	0.143	0.050	0.093	8	0.125
8	0.119	0.048	0.071	—	—
9	0.112	0.039	0.073	10	0.100
10	0.165	0.057	0.108	4	0.250
11	0.124	0.034	0.090	8	0.125
12	0.147	0.040	0.107	6	0.169
13	0.131	0.039	0.092	8	0.125
14	0.144	0.041	0.103	5	0.200
15	0.114	0.039	0.075	9	0.111

TABELLE XXXVII

Nr.	Reduzierter Zucker (Glukose) %	Wachstum	
		Tage (t)	Geschwindigkeit (1/t)
1	3.857	5	0.200
2	4.832	4	0.250
3	2.064	9	0.111
4	2.945	7	0.143
5	3.634	6	0.169
6	4.521	5	0.200
7	2.753	7	0.143
8	3.452	8	0.125
9	2.155	—	—
10	3.715	4	0.250

Man ersieht hieraus, daß die Bazillenentwicklung in zuckerreichem Sake eine lebhaftere und reichlichere ist.

(3) Schlussbetrachtung und Zusammenfassung

Bei meinen zahlreichen Untersuchungen über die Beziehungen zwischen der Qualität des Sake und der Hyochi-Bazillen-Entwicklung kam ich immer wieder zu dem Ergebnis, daß es infolge der komplizierten Zusammensetzung des Sake und den großen Unterschieden in Bezug auf Herstellungsweise und Qualität desselben sehr schwierig ist, die Verschiedenheiten der Bazillenentwicklung allein einem Faktor zuzuschreiben.

Bei einem Vergleich meiner Versuchsergebnisse mit denen anderer Autoren, zeigt sich, daß sie in Bezug auf das Verhältnis zwischen Wasserstoffionenkonzentration und Bazillenentwicklung mit denen von YASUDA (68) sowie TOKUOKA (69) nicht übereinstimmen. Die Untersuchungen über die Beziehungen zum Stickstoffgehalt dagegen zeigen bei mir das gleiche Resultat wie bei TOKUOKA (69)

Faßt man die Hauptergebnisse meiner Versuche zusammen, so läßt sich folgendes sagen:

1. Wasserstoffionenkonzentration und Titrationsazidität im Sake wiesen zu geringe Schwankungen auf, um einen Einfluß auf die Hyochi-Bazillen-Entwicklung bemerken zu können.
2. Bei intensivem Farbton des Sake scheint die Bazillenentwicklung gehemmt zu sein.
3. Bei Sake mit hohem Stickstoff und Zuckergehalt geht das Bazillenwachstum lebhafter vor sich.

E. Zusammenfassung

Die Ergebnisse meiner Untersuchungen über die exogenen Einflüsse, d. h. Temperatur, Wasserstoffionenkonzentration und Säuren sowie Qualität des Sake möchte in ihren wichtigsten Punkten im folgenden zusammenfassen:

1. Das Optimum der Hyochi-Bazillen-Entwicklung im Sake liegt bei 30°C, das Minimum beträgt 4.5°C, während auch bei Temperaturen von über 50°C keine Bazillenentwicklung mehr stattfindet.
2. Als Pasteurierungszeit genügen bei einer Temperatur von 50°C 30 Minuten, bei 55°C 5 Minuten und bei 60°C und höheren Temperaturen ein Moment.

3. Die Hyochi-Bazillen-Entwicklung findet ausschließlich auf der Säureseite statt.

4. Für die Hyochi-Bazillen-Entwicklung liegt das minimale pH bei 3.5, das maximale bei 6.4 und das Optimum etwa zwischen 4.5 und 5.0.

5. Auf die Hyochi-Bazillen-Entwicklung üben organische Säuren den folgenden Einfluß aus:

a. Durch gesättigte Monocarbonsäure wird (wenn man von der besonders stark hemmend wirkenden Ameisensäure absieht) die Hyochi-Bazillen-Entwicklung umso mehr behindert, je größer die C-Zahl ist.

b. Bei der mehrbasischen Carbonsäure ist der das Bazillenwachstum hemmende Einfluß der ungesättigten Säuren stärker als der gesättigten.

c. Bei der Oxybenzoesäure behindert lediglich die Ortho-Form (Salicylsäure) das Bazillenwachstum, während die anderen Formen keinen Einfluß ausüben.

6. Es läßt sich ein hemmender Einfluß der Mineralsäuren auf die Bazillenentwicklung bemerken.

7. Die Schwankungen des pH und der Titrationsazidität waren zu niedrig, um dadurch bedingte Veränderungen des Bazillenwachstums feststellen zu können.

8. Während die Bazillenentwicklung bei Sake mit intensiverer Farbe gehemmt wird, ist sie bei hohem Stickstoff- und Zuckergehalt angeregter.

III. DIE VERAENDERUNGEN DER CHEMISCHEN BESTANDTEILE DES SAKE BEI DER ENTWICKLUNG DER HYOCHI-BAZILLEN

Bei der Entwicklung der Hyochi-Bazillen im Sake treten durch den mit ihren Lebensfunktionen verbundenen Stoffwechsel Veränderungen der chemischen Bestandteile des Sake ein. Hierbei handelt es sich um Hyochi-Sake, dessen Eigengeruch und -Geschmack mit dem Fortschreiten der Bazillenentwicklung so unangenehm werden, daß sie das Getränk völlig ungenießbar machen.

Nach TAKAHASHI (5) produzieren die Hyochi-Bazillen: Essigsäure, Ameisensäure, Buttersäure, Milchsäure, milchsaures Methyl, Fuselöl und Isopropylalkohol. Vor kurzem veröffentlichte TOMIYASU (70) eine Arbeit über den Geruch des Hyochi-Sake, in der er mitteilte, daß es sich hierbei um den Geruch von Diacetyl handle.

Im Jahre 1921 führte KURONO (12) Versuche über die Differenz der

organischen Basen in gesundem und in verfaultem Sake aus. Nach ihm tritt bei der Sake-Fäulnis im Gegensatz zu den gewöhnlichen Fäulnisprozessen keine Veränderung des Cholin ein wobei der Lysingehalt abnimmt und der des Cadaverins ansteigt, während bei gesundem Sake der Lysin-gehalt ein hoher ist. Hieraus wird geschlossen, daß wahrscheinlich das Lysin durch die Einwirkung der Hyochi-Bazillen in Cadaverin verwandelt wird.

Alle diese bisherigen Versuche haben jedoch lediglich einige durch die Sakefäulnis erzeugte Bestandteile oder einzelne Vergleiche zum Gegenstand, während eine umfassende Uebersicht über die Veränderungen der chemischen Bestandteile durch die Entwicklung der Bazillen bisher noch fehlt.

Deshalb möchte ich im folgenden die Ergebnisse meiner zusammenfassenden Untersuchungen auf diesem Gebiete mitteilen.

A. Veränderungen der allgemeinen chemischen Bestandteile

Als die wichtigste Frage erschien mir, welche Bestandteile des Sake bei der Hyochi-Bazillen-Entwicklung am stärksten von Veränderungen betroffen würden. Um dieses Problem zu lösen, untersuchte ich die Zusammensetzung desselben Sake vor der Impfung mit Hyochi-Bazillen (Normal-Sake) und nach fortgeschrittener Fäulnis (Fäulnis-Sake).

Wie aus der Tabelle XXXVIII ersichtlich ist, sinkt im Sake durch Entwicklung der Hyochi-Bazillen meist der Zucker, dagegen steigt der Säuregehalt am stärksten. Auch hieraus geht hervor, daß die Hyochi-Bazillen zweifellos die Fähigkeit besitzen, Zucker in Säure zu verwandeln. Da trotz des fast unveränderten Gesamtstickstoffgehaltes eine starke Vermehrung der Aminosäuren zu verzeichnen ist, läßt sich vermuten, daß die Bazillen durch Verdauung einer zwischen Roheiweiß und Aminosäuren liegenden Umwandlungsform des Eiweißes Aminosäuren zu bilden imstande sind.

B. Veränderungen der stickstoffhaltigen Substanzen

Auch TAKAHASHI (11) wies schon auf die Verwandlung von Stickstoff Aminosäuren bei der Sakefäulnis hin, wobei er jedoch leider keinerlei genauen Angaben über die Frage machte, aus welchen stickstoffhaltigen Substanzen diese Aminosäuren hervorgehen. Diese Frage konnte ich durch meine unten beschriebenen Versuche klarstellen.

TABELLE XXXVIII

Nr.	Bestandteile	Normal-Sake	Fäulnis-Sake
1	Spez. Gew. (15°C)	1.0037	1.0029
	Alkohol (Vol.)	14.39 %	14.39 %
	Extrakt	5.37 "	5.11 "
	Rohzucker (= Glukose)	2.757 "	2.134 "
	Dextrin	1.395 "	1.402 "
	Gesamtsäure (= Bernsteinsäure)	0.141 "	0.459 "
	Flüchtige Säure (= Essigsäure)	0.013 "	0.041 "
	Nichtflüchtige Säure (= Bernsteinsäure)	0.128 "	0.418 "
	Rohprotein	0.906 "	0.900 "
	Aminosäure (= Glykokol)	0.311 "	0.252 "
	Asch	0.0366 "	0.0376 "
2	Spez. Gew. (15°C)	1.0070	1.0062 "
	Alkohol (Vol.)	16.17 %	16.14 %
	Extrakt	6.67 "	6.46 "
	Rohzucker (= Glukose)	3.441 "	3.029 "
	Dextrin	1.940 "	1.918 "
	Gesamtsäure (= Bernsteinsäure)	0.145 "	0.388 "
	Flüchtige Säure (= Essigsäure)	0.009 "	0.026 "
	Nichtflüchtige Säure (= Bernsteinsäure)	0.136 "	0.362 "
	Rohprotein	0.775 "	0.763 "
	Aminosäure (= Glykokol)	0.236 "	0.284 "
Asch	0.0324 "	0.0266 "	

(1) Analytische Methode

Zur Analyse der verschiedenen Stickstoffformen benutzte ich meistens das AYAI'sche Verfahren (71). Die Methode war die folgende:

a. *Gesamtstickstoff*. 1 ccm der Proben wurde nach der Mikro-Kjeldahl-Methode bestimmt.

b. *Reinprotein-Stickstoff*. 5 ccm der Proben wurden neutralisiert, erwärmt, mit STUTZER-Reagens vermengt und filtriert. Der zurückgebliebene Stickstoff wurde dann gemessen.

c. *Koagulierender Proteinstickstoff*. 50 ccm der Proben wurden neutralisiert, hierzu wurden einige Tropfen 30 %iger Essigsäure hinzugefügt und die Proben 2 Minuten lang erhitzt. Der in dem sich ausscheidenden Niederschlag enthaltene Stickstoff wurde dann bestimmt.

d. Albumose-Stickstoff. Das beim Niederschlag des koagulierenden Proteinstickstoffs abgetrennte Filtrat wurde konzentriert. Dann wurde es mit Bleisulfat versetzt und einen Tag lang stehen gelassen. Der sich ausscheidende Stickstoff wurde gemessen.

e. Peptid-Stickstoff. Das beim Niederschlag des Albumose-Stickstoffs isolierte Filtrat wurde evaporiert. Es wurde ihm dann Phosphorwolframsäure zugesetzt. Die in dem sich bildenden Niederschlag enthaltene Stickstoffmenge wurde errechnet.

f. Aminostickstoff. Mittels SÖRENSENScher Formol-Titrations Methode.

g. Amid-Stickstoff. Dieser wurde dadurch berechnet, daß die verschiedenen Stickstoffmengen vom Gesamtstickstoff abgezogen wurden.

(2) Versuchsergebnisse

TABELLE XXXIX

Nr.	Stickstoff	Normal-Sake (%)	Fäulnis-Sake (%)
1	Gesamt-N	0.170	0.170
	Reinprotein-N	0.008	0.008
	Koagulierender Protein-N	0	0
	Albumose-N	0.002	0.002
	Peptid-N	0.049	0.037
	Amino-N	0.053	0.065
	Amid-N	0.058	0.058
2	Gesamt-N	0.130	0.130
	Reinprotein-N	0.006	0.006
	Koagulierender-Protein-N	0	0
	Albumose-N	0.002	0.001
	Peptid-N	0.046	0.037
	Amino-N	0.049	0.058
3	Amid-N	0.027	0.028
	Gesamt-N	0.136	0.136
	Reinprotein-N	0.009	0.009
	Koagulierender Protein-N	0	0
	Albumose-N	0.002	0.002
	Peptid-N	0.053	0.040
Amino-N	0.043	0.056	
	Amid-N	0.029	0.029

Die bei der Sake-Fäulnis auftretenden Veränderungen des Gehaltes an den oben aufgeführten Stickstoffformen sind in der obigen Tabelle XXXIX niedergelegt.

Wie sich aus den obigen Ergebnissen ersehen läßt, handelt es sich offenbar bei den durch die Entwicklung der Hyochi-Bazillen veränderten stickstoffhaltigen Substanzen um Entartungsformen von Eiweiß d. h. die Peptide werden bei weitem am meisten und Albumose schwach verdaut. Bei Reinprotein zeigt sich jedoch keinerlei Veränderung.

Als Endprodukte der Verdauung sind offenbar die Aminostickstoff stark vermehrt.

C. Veränderungen der Zuckermenge

Nach der allgemeinen Analyse läßt sich klar ersehen, daß der Zuckergehalt des Sake nach dem Verfaulen stark abnimmt. Deshalb führte ich die im folgenden aufgeführten Versuche über die Ab- und Zunahme des Gesamtzuckers, reduzierten Zuckers, Dextrins und der Pentose aus.

(1) Analytische methode

a. Gesamtzucker. 50 ccm der Proben wurden mit verdünnter Ammoniaklösung neutralisiert, bis auf ein Drittel ihrer Menge evaporiert und dann genau auf 100 ccm gebracht. Davon wurden 50 ccm entnommen, mit 6 ccm 25 %iger Salzsäure versetzt und 3 Stunden lang über dem Wasserbade erhitzt. Nach Erkalten wurde die Lösung mit Natronlauge neutralisiert und genau auf 500 ccm gebracht. Davon wurden 20 ccm entnommen und nach der BERTRANDSchen Methode als Glukose bestimmt.

b. Reduzierter Zucker. Von den Proben wurden 10 ccm neutralisiert. Der Alkohol wurde über dem Wasserbade verdampfen lassen und die Menge dann genau auf 100 ccm gebracht. Hieraus wurden 20 ccm nach der BERTRANDSchen Methode auf den Zucker hin untersucht. Das Ergebnis wurde in der Form von Glukose erhalten.

c. Dextrin. Der Dextringehalt wurde dadurch errechnet, daß die Menge des reduzierten Zuckers von der des Gesamtzuckers abgezogen wurde und das Resultat mit dem Faktor 0.9 multipliziert wurde.

d. Pentose. 100 ccm Proben wurden bis auf etwa 50 ccm evaporiert. Hierzu wurden 333 ccm Salzsäure mit dem spez. Gewicht 1.18, und 16.6 ccm Wasser hinzugefügt. Dann wurde auf die gewöhnliche Weise destilliert bis das Destillat 400 ccm betrug. Diesem wurde eine Salzsäurelösung von reinem Phloroglucin zugefügt und so das Phloroglucin gefällt und als Arabinose gemessen.

TABELLE XL

Nr.	Zucker	Normal-Sake (%)	Fäulnis-Sake (%)
1	Gesamtzucker	4.310	3.537
	Reduzierter Zucker	2.671	2.153
	Dextrin	1.475	1.239
	Pentose	0.131	0.123
2	Gesamtzucker	6.708	5.840
	Reduzierter Zucker	3.537	3.275
	Dextrin	2.854	2.759
	Pentose	0.277	0.234
3	Gesamtzucker	6.108	5.954
	Reduzierter Zucker	4.136	3.953
	Dextrin	1.775	1.801
	Pentose	0.171	0.164
4	Gesamtzucker	6.644	6.414
	Reduzierter Zucker	5.281	5.062
	Dextrin	1.227	1.217
	Pentose	0.197	0.176
5	Gesamtzucker	6.402	6.314
	Reduzierter Zucker	5.221	5.030
	Dextrin	1.068	1.065
	Pentose	0.176	0.168
6	Gesamtzucker	4.570	4.293
	Reduzierter Zucker	3.146	2.961
	Dextrin	1.282	1.256
	Pentose	0.193	0.175
7	Gesamtzucker	5.271	4.953
	Reduzierter Zucker	4.228	4.013
	Dextrin	1.035	1.028
	Pentose	0.179	0.156
8	Gesamtzucker	5.943	5.634
	Reduzierter Zucker	4.525	4.342
	Dextrin	1.276	1.263
	Pentose	0.156	0.148
9	Gesamtzucker	4.451	4.236
	Reduzierter Zucker	3.249	3.076
	Dextrin	1.082	1.080
	Pentose	0.171	0.165

Versuchsergebnisse

Aus der Tabelle XL ist ersichtlich, wie weit der Zucker von den Hyochi-Bazillen verdaut wird.

Wie aus der obigen Tabelle hervorgeht, wurde jeder Zucker von den Hyochi-Bazillen verdaut, u. zw. bei weitem am leichtesten der reduzierte Zucker, besonders der aus Maltose und Glukose stammende.

Auch Dextrin wurde verdaut, jedoch nur in sehr geringer Menge, während von der Pentose nur eine Spur aufgenommen wurde.

D. Veränderungen der Säuren

Obwohl es seit langem bekannt ist, daß mit der Entwicklung der Hyochi-Bazillen die Säuremenge im Sake steigt, führte ich zur noch genaueren Bestimmung der Säuren die folgenden Versuche aus.

(1) Veränderungen der Gesamt-, flüchtigen und nichtflüchtigen Säuren

Sowohl im Normalzustand als auch im Fäulniszustand des Sake bestimmte ich den Gehalt an den obengenannten drei Säuren.

Analytische Methode

a. Gesamtsäure. 25 ccm der Proben wurden mit einer geeigneten Menge von destilliertem Wasser vermenget. Hierzu wurden 2 bis 4 Tropfen Rosolsäure als Indikator hinzugefügt. Schließlich wurde mit N/10 Natronlauge lösung titriert. Die Titrationsmenge wurde mit dem Faktor 0.0059 multipliziert und die Gesamtsäure als Bernsteinsäure errechnet.

b. Flüchtige Säure. 25 ccm Proben wurde durch Verdampfen destilliert. Das Destillat wurde mit N/10 Natronlauge titriert. Die Titrationsmenge wurde mit dem Faktor 0.006 multipliziert und die flüchtige Säure als Essigsäure bestimmt.

c. Nichtflüchtige Säure. Durch Subtrahieren der Titrationsmenge der Gesamtsäure von der Titrationsmenge der flüchtigen Säure erhält man die Menge der nichtflüchtigen Säure als Bernsteinsäure.

Versuchsergebnisse

Die Ergebnisse der auf die oben beschriebene Weise durchgeführten Versuche sind in der folgenden Tabelle XLI niedergelegt.

TABELLE XXXXI

Nr.	Säure	Normal-Sake (%)	Fäulnis-Sake (%)
1	Gesamt-S.	0.167	0.412
	Flüchtige-S.	0.008	0.031
	Nichtflüchtige-S.	0.159	0.381
2	Gesamt-S.	0.156	0.285
	Flüchtige-S.	0.012	0.020
	Nichtflüchtige-S.	0.144	0.265
3	Gesamt-S.	0.141	0.459
	Flüchtige-S.	0.013	0.041
	Nichtflüchtige-S.	0.128	0.418
4	Gesamt-S.	0.145	0.388
	Flüchtige-S.	0.009	0.026
	Nichtflüchtige-S.	0.136	0.362
5	Gesamt-S.	0.255	0.618
	Flüchtige-S.	0.008	0.032
	Nichtflüchtige-S.	0.247	0.586
6	Gesamt-S.	0.238	0.435
	Flüchtige-S.	0.011	0.020
	Nichtflüchtige-S.	0.227	0.415

Wie sich aus der obigen Tabelle ersehen läßt, steigt der Prozentsatz aller Säuren, besonders derjenige der nichtflüchtigen, bei der Fäulnis des Sake an.

(2) Isolierung der nichtflüchtigen Säuren in Normal- und Fäulnis-Sake

Bei dem Verfaulen des Sake durch die Entwicklung der Hyochi-Bazillen steigt unter den Säuren die Menge der nichtflüchtigen bei weitem am stärksten an. Dabei ist es notwendig, festzustellen, welche von den nichtflüchtigen Säuren das größte Anwachsen zeigen. Zu diesem Zwecke führte ich die folgenden Versuche aus.

Isolierungsmethode

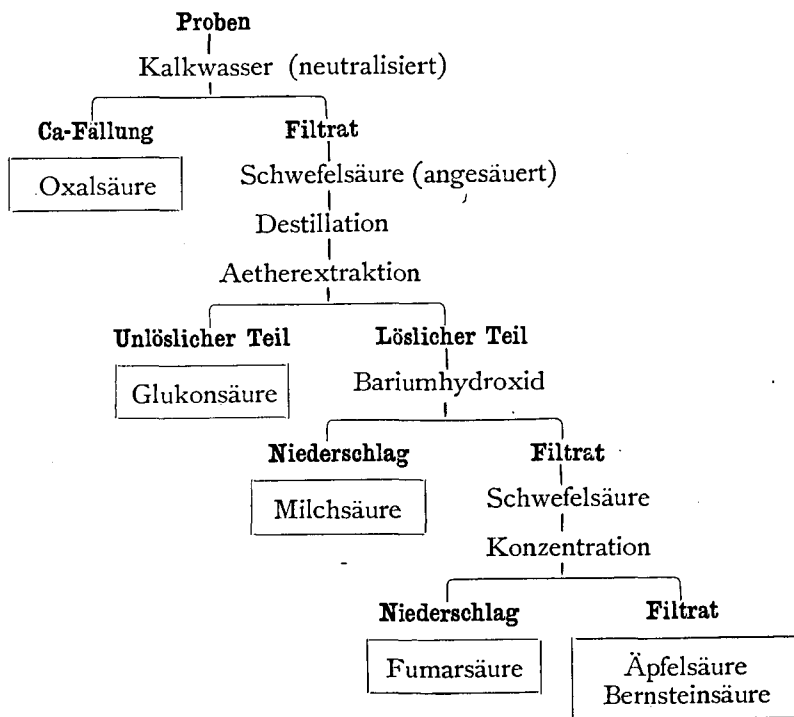
1 "Shō" (1.804 Liter) der Proben wurden mit Kalkwasser neutralisiert und das dabei gefällte Kalzium auf das Vorhandensein von Oxalsäure hin geprüft. Das bei der Ca-Fällung abgetrennte Filtrat wurde mit Schwefel-

säure angesäuert und bei Niederdruck so lange destilliert, bis die flüchtigen Säuren im Rückstand völlig verschwanden.

Den Rückstand extrahierte ich mit Aether unter Benutzung des SUDO und KUMAGAWASCHEN Apparates. Die durch Aether nicht extrahierten Bestandteilen prüfte ich mittels der Glukonsäurereaktion.

Aus dem Aetherextrakt evaporierte ich den Aether und setzte eine kleine Menge warmen Wassers zu. Hierzu wurde Bariumhydroxid hinzugefügt und dadurch neutralisiert. Der hierbei zu Tage tretende Niederschlag wurde abfiltriert. Dann wurde er auf das Vorkommen von Milchsäure hin untersucht. Das Filtrat wurde mit Schwefelsäure vermengt, konzentriert und der Niederschlag mittels der Fumarsäurereaktion geprüft. Schließlich wurde das restliche Filtrat der Aepfel- und Bernsteinsäure-Reaktion unterworfen.

Diese Untersuchungsmethode wird durch die folgende Schema veranschaulicht.



Versuchsergebnisse

Auf die oben geschilderte Weise wurden sowohl bei normalem als auch bei Fäulnis-Sake die einzelnen Säuren mit folgendem Ergebnis isoliert.

a. Aus Normal-Sake (mit Probe 1)

Es wurden lediglich Milchsäure und Bernsteinsäure gefunden, während sich andere Säuren nicht nachweisen liessen.

a. *Milchsäure.* Die Ausbeute an dieser Säure betrug als Zn-Salz in ihrer reinen Form 0.2228 g und in ihrer Rohform 0.4002 g, also insgesamt 0.6230 g. Nach den verschiedenen Versuchen, welche UFFELMANN (72), HOPKINS (72) und DÉNIGES (72) mit dem reinen Zn-Laktat ausführten, ergab dieses immer eine positive Reaktion.

Auf die folgende Weise bestimmte ich die Eigenschaften von Zn-Laktat:

1. 0.2445 g wurden bei 115° solange getrocknet, bis sie ein konstantes Gewicht erreichten. Sodann wurden sie vom Kristallwasser befreit. Die Gewichtsabnahme war die folgende:

0.2445 g Subst.	Abnahme: 1.0386 g
(C ₃ H ₅ O ₃) ₂ Zn + 2H ₂ O	Ber. H ₂ O 12.89 %
" + 3H ₂ O	Ber. H ₂ O 18.18 %
	Gef. H ₂ O 17.65 %

2. In dem vom Wasser befreiten Zn-Laktat wurde der Prozentsatz des Zinks bestimmt.

0.2445 g Subst.	ZnO	0.0667 g
(C ₃ H ₅ O ₃) ₂ Zn	Ber. Zn	26.85 %
	Gef. Zn	26.79 %

3. 0.4387 g löste ich in 50 ccm Wasser, füllte sie in eine 20 cm lange Röhre und führte mit Lichtstrahlen Drehungsversuche aus. Hierbei zeigte sich die Milchsäure als völlig *razemisch*.

b. *Bernsteinsäure.* Die Ausbeute war hierbei sehr gering. Der Schmelzpunkt lag bei 183°C (unkorrigiert). Mit Resorcin und Schwefelsäure erhielt ich eine positive Reaktion (73).

b. Aus Fäulnis-Sake (mit Probe 1 und 2)

Probe 1: Als Zn-Laktat wurde eine Ausbeute von 0.6230 g erzielt, darunter 0.228 g in der reinen Form.

In derselben Weise, wie im vorigen Versuche bestimmte ich die chemischen Eigenschaften und stellte fest, daß es sich um ein *razemisches* 3-molekürliches Zn-Laktat handelt.

Die Ausbeute an Bernsteinsäure betrug 0.1640 g. Ihr Schmelzpunkt schwankte zwischen 184,5 und 185,0°C (unkorrigiert). Auch mittels der Titrationsmethode ließ sich der Bernsteinsäure-Nachweis mit Sicherheit erbringen.

Bei der Untersuchung auf andere Säure hin erhielt ich stets negative Resultate.

Probe 2: Das Zn-Salz der Milchsäure ließ sich in einer Menge von 2.644 g finden, darunter 1.221 g in reiner Form. Auch dieses Salz erweist sich als 3-molekülilig und razemisch.

Das Gewicht der Bernsteinsäure wurde als 0.602 g in reiner Form festgestellt. Ihr Schmelzpunkt lag in der Gegend zwischen 183,5 und 185,0°C. Auf die folgenden Reaktionen (73) hin reagierte die Bernsteinsäure positiv: NEUBERGSche Pyrrol-, Resorcin-, Silbernitrat- sowie Eisenchloridreaktion. Dieser Kristall ist farblos und hat die Form eines länglichen Blättchens.

Keinerlei andere Säuren ließen sich nachweisen.

(3) Veränderungen der Bernstein- und Milchsäure

Aus den früheren Versuchen geht hervor, daß sich sowohl im normalen als auch im Fäulnis-Sake lediglich Bernstein- und Milchsäure finden ließen. Deshalb untersuchte ich das prozentuale Verhältnis dieser beiden Säuren zueinander sowohl bei normalem als auch bei Fäulnis-Sake.

Bestimmungsmethode.

150 ccm Proben wurden über dem Wasserbade evaporiert. Dann wurden sie in den SUDO und KUMAGAWASchen Apparat übertragen, mit 5 ccm verdünnter Schwefelsäure versetzt und mit Aether 48 Stunden lang extrahiert. Aus dem Extrakt wurde der Aether durch Evaporation entfernt. Die Lösung wurde dann mit Bariumhydroxid neutralisiert und ihr soviel Alkohol zugesetzt, daß der Prozentsatz desselben schließlich 80 % betrug. Hierbei scheidet sich ein Niederschlag von Bernsteinsäure-Barium aus. Der Niederschlag wurde dann abfiltriert und wiederholt mit 80 % igem Alkohol ausgewaschen.

Der Niederschlag auf dem Filtrierpapier wurde in warmem Wasser gelöst. Hierzu wurde Schwefelsäure zugesetzt, wobei sich Bariumsulfat ausschied. Das Gewicht dieses Niederschlags wurde mit dem Faktor 0.507 multipliziert. Das Resultat ergab die Menge der Bernsteinsäure.

Aus dem von der Bernsteinsäure befreiten Filtrat wurde der Alkohol durch Evaporation entfernt. Dann wurde Schwefelsäure zugesetzt und

Bariumsulfat zum Ausscheiden gebracht. Die Niederschlagsmenge ergab, mit dem Faktor 0.773 multipliziert, die Menge der Milchsäure.

Versuchsergebnisse

Die Ergebnisse der obigen Versuche sind die folgenden.

TABELLE XLII

Nr.	Säure	Normal-Sake (%)	Fäulnis-Sake (%)
1	Bernsteinsäure	0.088	0.090
	Milchsäure	0.127	0.209
2	Bernsteinsäure	0.060	0.059
	Milchsäure	0.098	0.147
3	Bernsteinsäure	0.063	0.062
	Milchsäure	0.098	0.159
4	Bernsteinsäure	0.041	0.042
	Milchsäure	0.118	0.184
5	Bernsteinsäure	0.043	0.041
	Milchsäure	0.087	0.142
6	Bernsteinsäure	0.044	0.043
	Milchsäure	0.112	0.178
7	Bernsteinsäure	0.051	0.051
	Milchsäure	0.106	0.181
8	Bernsteinsäure	0.047	0.048
	Milchsäure	0.096	0.153

Aus der obigen Tabelle ist ersichtlich, daß das Anwachsen der Säuremenge (nichtflüchtige Säuren) bei der Entwicklung der Hyochi-Bazillen sich fast ausschließlich auf die Milchsäure beschränkt, während die Bernsteinsäure kaum irgendwelche Veränderungen aufweist.

E. Zusammenfassung

1. Nach der allgemeinen Analyse des Normal- und Fäulnis-Sake wird von den Hyochi-Bazillen unter den chemischen Bestandteilen des Sake der Zucker am leichtesten verdaut, wodurch sich die organischen Säuren sowie Aminosäuren vermehren.

2. Unter den stickstoffhaltigen Substanzen nehmen die Peptid-Stick-

stoffe sehr stark ab, auch die Albumose-Stickstoffe gehen etwas zurück, die Aminostickstoffe nehmen zu und die anderen Stickstoffformen bleiben fast konstant.

3. Unter den verschiedenen Zuckerarten geht der reduzierte Zucker (im Sake enthaltene Maltose und Glukose) sehr stark zurück, auch Dextrin nimmt ein wenig ab, die Pentose dagegen bleibt unverändert.

4. Bei der Säurezunahme ist die der nichtflüchtigen viel größer als die der flüchtigen.

5. Unter den im Normal- und Fäulnis-Sake untersuchten nichtflüchtigen Säuren ließen sich nur Milchsäure und Bernsteinsäure nachweisen, während alle anderen Säurereaktionen negativ ausfielen.

6. Bei der Sakefäulnis läßt sich ein starkes Anwachsen der Milchsäure bemerken, die Bernsteinsäuremenge bleibt jedoch fast gleich.

IV. SYSTEMATISCHE UNTERSUCHUNG DER HYOCHI-BAZILLEN

Die Bezeichnung „Hyochi-Bazillen“ ist ein Sammelbegriff für alle die Sakefäulnis erregenden Bakterien. Man kann schon aus der großen Verschiedenartigkeit von Geruch, Geschmack oder Azidität der einzelnen verfaulten Sakeproben schließen, daß es sich bei den sogenannten „Hyochi-Bazillen“ kaum um eine einheitliche Bakterienart handeln dürfte. Es läßt sich erkennen, daß der Sake bei seiner Fäulnis primär und sekundär den Einflüssen einiger verschiedenen Bazillenarten ausgesetzt ist.

Der erste, der sich mit dem Studium der an dem Hyochi-Prozeß des Sake beteiligten Bazillen befaßte, war K. OTANI (2) welcher jedoch als „Hyochi-Bazillen“ lediglich gewöhnliche Bazillen, die mit Fäulnis nicht unmittelbar zu tun haben, isolieren konnte. Später gelang es TORII (3) einen Stamm wirklicher Hyochi-Bazillen zu entdecken. Wie schon früher erwähnt wurde, sammelte TAKAHASHI (5) im Jahre 1907 eine große Anzahl von Proben des Fäulnis-Sake, isolierte viele Bazillen und bezeichnete darunter diejenigen, welche den charakteristischen Hyochi-Geruch aufwiesen, als „*Bacillus saprogenes Saké*“. Kürzlich teilte YAMAZAKI (73) die aus dem Fäulnis-Sake isolierten Bazillen in drei Gruppen, A, B und C ein, und nahm bei der Gruppe A, den eigentlichen Hyochi-Bazillen wiederum eine Unterteilung in zwei Typen vor.

Schon am Anfang dieser Abhandlung berichtete ich, daß ich eine große Anzahl von aus verschiedenen Gegenden Japans stammenden Proben des Fäulnis-Sake sammelte. Dabei gelang es mir etwa 500 Stämme zu

isolieren und diese systematische in 4 Arten einzuteilen.

Hierüber möchte ich im folgenden ausführlich berichten.

A. Isolierung

Zur Isolierung der Hyochi-Bazillen verwendete ich zuerst Bouillon-, Koji-, Würze-, Hefewasser (mit 5 % Glukose)-, Sake- und Sake mit Reisebryowasser-Agar. Bei Entwicklung der Hyochi-Bazillen in den ersten vier Nährböden war sehr gering, in Sake-Agar war die Bazillenentwicklung ebenfalls nur mäßig. In Sake mit Reisebryowasser-Agar fanden sich die meisten Kolonien.

Bei sterilisiertem Sake auf einer Agar-Plattenkultur zeigt sich sehr bald das Auftreten von Bazillen-Kolonien. Da sich die Bazillen jedoch infolge des Vorhandenseins der Lösung nicht rein isolieren ließen, ersetzte ich die letztere durch Sake-Dampf, wodurch ich sofort eine reine Isolierung erreichen konnte.

Die Kulturen setzte ich sowohl unter aerobischen als auch unter anaerobischen Bedingungen verschiedenen Temperaturen aus. Es ergab sich, daß kein Unterschied zwischen den beiden Bedingungen bestand und daß eine Temperatur von 25 bis 30°C für die Entwicklung der Hyochi-Bazillen die günstigste war.

Die meisten der isolierten Bazillen wiesen den sogenannten „Hyochi-Geruch“ auf und gehörten zu den Milchsäurebakterien. Nur ein einziges Mal wurden auch Essigsäurebakterien isoliert. Bei diesem Sake handelte es sich um verdünnten Sake mit niedrigem Alkoholgehalt. Ueber diese Essigsäurebakterien möchte ich gesondert bei späterer Gelegenheit einmal ausführlich berichten. In dem Standard-Stamm für meine Versuche waren keinerlei Essigsäurebakterien enthalten.

Im folgenden gebe ich eine Beschreibung der Morphologie sowie der physiologischen Eigenschaften der einzelnen Hyochi-Bazillen-Arten.

B. Identifikation

Um die isolierten Stämme zu identifizieren, führte ich die folgenden Versuche durch.

Morphologie: Ich untersuchte die Größe, Form und Anordnung der Zellen. Weiter prüfte ich sie auf ihre Färbbarkeit, Beweglichkeit sowie ihre Sporenformen.

Besonderheiten der Kulturen: Für die Kultivierung der Stämme be-

nutzte ich bei flüssigen Nährböden Sake, Sake mit Reisembryo(Re)-Wasser, Hefewasser, Koji-Extrakt, Würze, Bouillon, Milch und HENNEBERG-sche Lösung, bei festen Nährböden Sake-Agar, Sake mit Re-Agar, Sake mit Re-Gelatine, Koji-Agar, Würze-Agar und Bouillon-Agar. Das pH wurde bei der Herstellung der Nährböden stets zwischen 4.5 bis 5.5 gehalten. Die Eigenschaften, welche die Kulturen auf diesen Nährböden zeigten, wurden sorgfältig beobachtet.

Physiologische Eigenschaften: Um die Azidisierung der verschiedenen Zuckerarten zu untersuchen setzte ich zu Normal-Sake die gleiche Menge 5 %igen Hefewassers zu und löste darin den zu prüfenden Zucker bis zu 5 % der Gesamtlösung. Hierin wurden die Bazillen-Stämme eingepflegt und 15 Tage lang kultiviert. Dann vergleiche ich sie mit den Kulturen ohne Zuckerzusatz. Die Abhängigkeit der Bakterienentwicklung von der Temperatur des Sake oder des Sake mit Re-Wasser wurde ebenfalls geprüft. Um das Verhalten gegen Äthylalkohol oder Salicylsäure festzustellen, setzte ich diese Chemikalien in verschiedener Konzentration zu Sake zu. Auch über die Notwendigkeit einer Sauerstoffzufuhr sowie über Gasbildung wurden Versuche angestellt. Als etwaige Stoffwechselprodukte wurden Indol und Nitrit gesucht.

C. Beschreibung der isolierten Bakterien

Lactobacillus Hyochi n. sp.

(Abb. 1)

Bei dieser Art handelt es sich um eine der häufigsten der im Fäulnis-Sake vorkommenden Bazillenarten. Der Hyochi-Geruch dieser Bakterien ist nicht besonders stark, die Trübung mittelmäßig, ebenso der sich bildende Bodensatz.

Die Form und Größe der Zellen ist bei den einzelnen Nährböden verschieden. So beträgt auf Sake mit Re-Agar die Zellengröße etwa 3 bis $5 \mu \times 0.4$ bis 0.8μ , die meisten Zellen massen $4.5 \mu \times 0.5 \mu$. Unter den auf Sake oder Sake mit Re-Wasser entwickelten Bazillen fanden sich auch ziemlich lange. Das Zellende ist immer abgerundet. Die Zellen kommen teils einzeln vor, teils zu zweie, teils ist eine größere Anzahl aneinander gekettet. Sie besitzen keine Geißeln oder Endosporen und reagieren auf die Zellulosereaktion negativ. Sie lassen sich gut mit der GRAMSchen Methode oder mit Fuchsin färben.

Sake oder Sake mit Re-Agar Kolonien: Das Wachstum ging nur

langsam vonstatten, die Farbe dieser Kolonien war grauweiß, ihre Form rund. Nach 3 bis 5 Tagen hatten die Kolonien etwa einen halben Millimeter Durchmesser. Die Innenkolonien besaßen keine bestimmte Form, teils waren sie zackig, teils linsenförmig.

Sake mit Re-Agar Strich: Entwicklung schlecht mit weicher Oberfläche.

Sake mit Re-Agar Stich: Gute Entwicklung auf dem Stichkanal.

Sake mit Re-Gelatine Stich: Gute Entwicklung, aber keine Verflüssigung der Gelatine.

Koji-, Würze- oder Bouillon-Agar Stich: Auf diesen Nährböden ist die Entwicklung so gering, daß ein Wachstum kaum zu bemerken ist.

Sake mit Re-Wasser: Bei 30°C nach 2 bis 3 Tagen tritt Trübung auf, später Bodensatz. Daraufhin klärt sich die Flüssigkeit ohne sich jedoch völlig von jeder Trübung zu befreien.

Sake: Nach 4 bis 5 Tagen ist die Lösung getrübt, wobei Hyochi-Geruch auftritt, der jedoch später allmählich immer schwächer wird. Keine Gasbildung.

Hefewasser: Entwicklung erst nach langer Kulturdauer.

Physiologische Eigenschaften: Diese Art zeigt keine Gasbildung, bildet kein Indol, reduziert Nitrat nicht und verhält sich zu Sauerstoff mikroaerobisch. Wurde durch Rohrzucker, Maltose, Milchzucker, Traubenzucker, Fruktose, Galaktose und Mannose angesäuert, jedoch nicht durch Dextrin, Mannit, Arabinose und Xylose.

Entwicklungstemperatur: In Sake 9–36°C, in Sake mit Re-Wasser 5–39°C, am günstigsten von 26–31°C.

Einfluss von Alkohol auf die Sake-Kultur: Bei Alkoholgehalt bis zu 20 % gute Entwicklung, bis 22 % schwache, über 24 % keine.

Einfluss der Salicylsäure: In Sake mit Salicylsäure-Zusatz bis zu 0.02 % normale Entwicklung, bei 0.03 % schwache.

Produzierte Säuremenge: Als Milchsäure bei Sake ca. 0.22 %, bei Sake mit Re-Wasser 0.9–1.3 %.

Nach BERGEY (75) ist dieser Bacillus dem *Lactobacillus listeri* (HENNEBERG) BERGEY et al. ähnlich, jedoch säuert der letztere Bacillus Mannit und Dextrin an und besitzt eine bedeutend höhere maximale Wachstumstemperatur als meine Art. *Lactobacillus pabuliacidi* BERGEY et al, dagegen ist imstande Milch zu koagulieren und seine optimale Wachstumstemperatur liegt zwischen 34° und 40°C.

***Lactobacillus Hyochi* var. 1**

(Abb. 2)

Auch diesen Bacillus bemerkt man dann und wann in Hyochi-Sake. Er ähnelt dem oben genannten Bacillus, nur die Zellen sind etwas kleiner. Die Größe der meisten Zellen beträgt 3 bis $4 \mu \times 0.6 \mu$. u. a. finden sich Zellenketten, die eine bogenförmige Gestalt aufweisen. Diese Bazillen werden von Mannose schwach angesäuert, die Widerstandsfähigkeit gegen Alkohol und Salicylsäure ist stärker als bei *L. Hyochi*, auch die produzierte Säuremenge ist größer.

***Lactobacillus Hyochi* var. 2**

(Abb. 3)

Dies sind Stäbchenbazillen. Ihre Größe ist geringer als die von *L. Hyochi*, nämlich 2.5 bis $4 \mu \times 0.4$ bis 0.7μ . Von Milchzucker werden sie entweder nur ganz schwach angesäuert oder überhaupt nicht. Hierin besteht der Unterschied gegen die obigen Bazillen. Die Widerstandsfähigkeit gegen Alkohol und Salicylsäure ist stärker als bei den beiden angeführten Bazillen.

***Lactobacillus filamentosus* n. sp.**

(Abb. 4)

Fast in allen Hyochi-Sake-Proben waren diese Bazillen sehr reichlich zu finden. Ihrer Gestalt nach sind sie meist stäbchen- oder fadenförmig. Ihre Länge beträgt im allgemeinen 3.5 bis 6 oder bis 9μ , die Breite 0.3 bis 0.6, gewöhnlich 0.5μ . Die Zellen kommen meistens einzeln vor. Einige zeigen jedoch auch Kettenbildung. Diese Bazillen sind sporenlos, unbeweglich und nach GRAM sowie mit Anilinfarbstoffen färbbar. Kolonien auf Sake-Agar oder Sake mit Re-Agar sind rund, ganzrandig, klein und grauweiß. Die Formen der Innenkolonien sind uneinheitlich.

Beim Strich auf Sake mit Re-Agar zeigen sie keine starke Entwicklung, auf Stichkultur im Stichkanal dagegen eine ziemlich gute. Beim Gelatinestich entwickeln sie sich ohne eine Verflüssigung der Gelatine herbeizuführen.

Bei der Entwicklung in Sake mit Re-Wasser ergibt sich zunächst eine Trübung, nach 7 bis 10 Tage vermehrt sich der Bodensatz von Bakterienmaße, wobei sich die Lösung wieder klärt. Beim Aufstäuben wird die Bazillenmaße wolkenartig emporgewirbelt. Auf Sake-Kultur verbreiten diese Bazillen einen schwachen Hyochi-Geruch. Auch in Hefewasser ent-

wickeln sie sich und trüben die Lösung. Dagegen zeigte sich in Würze, Koji-Extrakt und Bouillon so gut wie keine Entwicklung. Auch in Milch zeigt sich keine Veränderung.

Diese Art bildet kein Indol, weist keine Gasbildung auf, reduziert Nitrat nicht und ist fakultativ anaerobisch.

Sie wurde von Rohrzucker, Galaktose, Traubenzucker und Fructose angesäuert, dagegen nicht von Dextrin, Milchzucker, Maltose, Mannit, Arabinose und Xylose.

Bei Sake mit Re-Wasser betrug die Entwicklungstemperatur 8°C im Minimum, etwa 49°C im Maximum und etwa 25–32°C als Optimum. Diese Art ist imstande Alkohol bis zu einer Konzentration von etwa 22 % und Salicylsäure bis zu einer solchen von 0.03 % zu widerstehen. Dieser Bazillus produziert Säure, deren Prozentsatz als Milchsäure in Sake mit Re-Wasser 1.0–1.2 %, in Sake etwa 0.7 % beträgt.

In BERGEY's Handbuch (75) ist seine Affinität mit *Lactobacillus Leichmannii* BERGEY et al. und *L. Beijerinckii* (HENNEBERG) BERGEY et al. angegeben. Diese beiden Bazillen weisen jedoch die Fähigkeit auf, Milch zu koagulieren und besitzen eine bedeutende höhere Optimaltemperatur als meine Art.

***Lactobacillus alcoholphilus* n. sp.**

(Abb. 5)

Auch diese Art wird oft aus Hyochi-Sake isoliert. Diese Bazillen lassen sich infolge ihrer Kürze und dadurch, daß sie meist aus Ketten von zwei oder mehr Zellen bestehen, leicht von den Anderen unterscheiden.

Ihre Größe beträgt 1.5 bis 3 oder bis 5 $\mu \times 0.4$ bis 0.7 μ . Sie besitzen abgerundete Enden und keine Endosporen oder Geißeln. Sie sind nach GRAM und mit gewöhnlichen Anilinfarben leicht färbbar.

Die Kolonien auf Sake mit Re-Agar sind klein, rund und ganzrandig blaßgrau mit butterähnlichen Glanz. Beim Stich dieses Agars läßt sich nur eine schwache Entwicklung bemerken, dagegen beim Stich eine sehr gute. Auf Sake mit Re-Gelatine wird die Gelatine auch bei langer Kulturdauer nicht verflüssigt.

In Sake mit Re-Wasser zeigt sich nach 3–4 Tagen eine Trübung, die lange Zeit hindurch anhält. In Sake-Kultur verbreiten diese Bazillen einen starken Hyochi-Geruch. Nach langer Kulturdauer läßt sich in Hefewasser eine schwache Entwicklung erkennen, während jedoch die anderen gewöhnlichen Nährflüssigkeiten negativ Resultate zeigen.

Weiter ist diese Art nicht gasbildend, nicht Indol produzierend und nicht imstande, Nitrat in Nitrit zu verwandeln. Sie benötigt nur wenig Sauerstoff.

Sie wird angesäuert von Rohrzucker, Maltose, Traubenzucker und Fruktose, aber nicht von Dextrin, Milchzucker, Galaktose und Pentose.

Die Widerstandsfähigkeit gegen Alkohol ist die stärkste, da ihre Entwicklung selbst noch bei einem Alkoholgehalt von 26 % möglich ist. Unter den Milchsäurebazillen dürfte eine solche Widerstandsfähigkeit gegen Alkohol nur selten vorkommen.

Lactbacillus saprogenes n. sp.

(Abb. 6)

Auch dieser Bazillus läßt sich oft im Fäulnis-Sake bemerken. Er ist der am wenigsten widerstandsfähige unter den Hyochi-Bazillen. Die Zellen sind stäbchenförmig mit abgerundeten Enden. Ihre Größe beträgt 3.5 bis 6 $\mu \times 0.4$ bis 0.8 μ . Oftmals finden sich auch lange dünne Zellen. Bei einigen Zellen bemerkt man Kettenbildung.

Diese Art ist unbeweglich, nach GRAM färbbar, ohne Zellulosereaktion und ohne Endosporen.

Auf Sake mit Re-Agar Platten sind die Kolonien klein, rund und grauweiß. Die Innenkolonien zeigen kein einheitliches Bild. Auf Sake mit Re-Agar sowie Gelatine-Stich ist die Entwicklung gut, jedoch wird die Gelatine nicht verflüssigt.

In Sake mit Re-Wasser zeigt sich eine gute Entwicklung mit Trübung der Lösung, welche letztere lange anhält. Nachdem sich allmählich ein starker Bodensatz niedergeschlagen hat, wird auch die Lösung etwas klarer. In Sake weist dieser Bazillus den Hyochi-Geruch auf. In Hewewasser läßt es sich nicht mit Sicherheit feststellen, ob eine geringe Entwicklung dieses Bazillus stattfindet oder überhaupt keine. In den anderen Nährflüssigkeiten bleibt jede Entwicklung aus.

Diese Art produziert kein Indol, ist nicht gasbildend, reduziert Nitrat nicht und ist fakultativ anaerobisch.

Im Vergleich zu den anderen Hyochi-Bazillen, läßt sie sich schwerer durch Zucker ansäuern. Nur Galaktose ist hierzu in normalem Masse imstande, während Traubenzucker sowie Milchzucker eine schwache und die anderen Zuckerarten überhaupt keine Wirkung ausüben. Auch die produzierte Säuremenge ist gering. Die optimale Wachstumstemperatur liegt zwischen 25° und 30°C, das Maximum bei 33°C, das Minimum etwa bei 10°C. Die Resistenz gegen Alkohol und Salicylsäure ist mittelmässig.

Die Art, welche von TAKAHASHI (5) mit den Namen „*Bacillus saprogenes Saké* var. 1, subvar. 1 und 5“ sowie „ var. 2, subvar. 1 und 5“ bezeichnet wurde, ähnelt in ihren Eigenschaften diesem Bazillus sehr. Da ich jedoch die Klassifikation der Hyochi-Bazillen von TAKAHASHI aus den später anzuführenden Gründen nicht für zweckmässig halte, glaube ich, daß auch hier die von mir eingeführte Bezeichnung „*Lactobacillus saprogenes*“ geeigneter ist.

D. Schlussbetrachtung

Alle von mir isolierten Hyochi-Bazillen-Arten wiesen bei ihrer Entwicklung in Sake den charakteristischen Hyochi-Geruch auf. Die Stärke dieses Geruchs hing auch bei Bazillen-Stämmen der gleichen Art von den Kulturbedingungen ab. Falls man den Geruch als den von Diacetyl (70) annimmt, so könnte seine Stärke von der Menge der Brenztraubensäure (76) im Sake abhängen. Hieraus geht hervor, daß die Klassifikation der Sakefäulnis-Bazillen nach ihrem Geruch, wie sie TAKAHASHI (5) sowie YAMAZAKI (74) vornahmen, wohl kaum richtig sein dürfte. Hat doch besonders TAKAHASHI darauf hingewiesen, daß alle diese Bakterien einer Art, nämlich „*Bacillus saprogenes Saké*“, angehören müßten. Daraus ergab sich, daß nach TAKAHASHI bewegliche und unbewegliche Bazillen, sowie solche die sich mit der GRAMSchen Methode färben ließen oder nicht, alle derselben Art zugeteilt wurden. Daß jedoch gerade diese Unterschiede neuerdings allgemein als die wichtigsten Bestimmungsmerkmale für verschiedene Bazillenarten angesehen werden, geht aus den Veröffentlichungen von MIGULA (77), LEHMANN (78), MATSUSCHITA (79), HENNEBERG (80), CHESTER (81) sowie BERGEY (75) hervor. Deshalb ist es notwendig, die Art „*Bacillus saprogenes Saké*“ in mehrere Arten zu zerlegen. YAMAZAKI (74) teilte die Sakefäulnis-Bazillen in drei Gruppen ein, denen er jedoch keine besonderen Namen gab. Hierbei wurden gasbildende Bazillen und nichtgasbildende derselben Gruppe zugeteilt.

Nach BERGEY (75) stellt jedoch die Gasbildung bei den Milchsäurebazillen eines der wichtigsten Unterscheidungsmerkmale dar.

Aus dem oben angeführten ergibt sich, daß den genannten Autoren bisher eine wirklich einwandfreie Bestimmung der bacteriologischen Stellung dieser Bazillen noch nicht gelungen ist. Deshalb klassifizierte ich nach meinen Untersuchungen die Hyochi-Bazillen von neuem in 4 Arten.

Eigenartig ist es, daß sich die Zahl der Bakterienarten, die als Sakefäulnis-Erreger gefunden wurden, allmählich immer mehr abnahm. So fand

im Jahre 1901 K. OTANI (2) vielerlei gewöhnlich Bakterien im Fäulnis-Sake, 1907 fand TAKAHASHI (5) außer den Hyochi-Bazillen nur einige Milchsäure- und Essigsäurebakterien sowie Kahlmhefen. Kürzlich isolierte YAMAZAKI (74) nur noch Milchsäurebakterien. Durch meine Untersuchungen konnte ich die Hyochi-Bazillen noch enger umgrenzen, da ich nur noch nicht gasbildende Milchsäurebakterien feststellen konnte.

Ich neige der Ansicht zu, daß diese Verringerung der Artenzahl auf die neuerlichen allmählich fortschreitenden Verbesserungen in der Herstellungsweise des Sake zurückzuführen sein dürften, durch die eine Standard-Qualität erreicht wurde. Auf diese Weise nahm auch die Zahl der schädigenden Bakterien-Arten wesentlich ab.

E. Zusammenfassung

1. Diese Versuche wurden zum Zwecke einer systematischen Untersuchung der Hyochi-Bazillen durchgeführt.

2. Bei Sake mit Reisembryowasser-Agar zeigte sich eine lebhaftere Entwicklung der Hyochi-Bazillen-Kolonien als bei irgend einem anderen festen Nährboden.

3. Ich stellte fest, daß man die Bazillen einfach und sicher in bedeutend reinerer Form isolieren kann, wenn man nicht, wie bisher, auf die Agarplatte flüssigen Sake bringt, sondern diese mit Sake-Dampf beschickt.

4. Bei den isolierten Hyochi-Bazillen handelte es sich fast immer um Milchsäurebakterien. Nur ein einziges Mal konnte ich Essigsäurebakterien isolieren. Der Fäulnis-Sake, in welchem die letzteren gefunden wurden, war jedoch stark verdünnt. Ueber diese Essigsäurebakterien werde ich bei späterer Gelegenheit einmal ausführlich berichten.

5. Die etwa 500 aus dem Fäulnis-Sake isolierten Stämme wurden nach mikrobiologischen Untersuchungen in 4 Arten eingeteilt.

6. Zur Identifikation der Bakterien berücksichtigte ich deren Morphologie, die Besonderheiten ihrer Kulturen sowie ihre physiologischen Eigenschaften.

7. Sämtliche 4 Arten der Hyochi-Bazillen gehören der Gattung *Lactobacillus* an. Sie waren stets stäbchenförmig, ohne Eigenbewegung, sporenlos und ließen sich mittels der GRAMSchen Methode färben. Sie wiesen den charakteristischen Hyochi-Geruch auf. Während sie sich in Sake gut entwickeln, zeigen sie in gewöhnlichen Nährlösungen entweder ein sehr schlechtes oder überhaupt kein Wachstum.

8. Im Fäulnis-Sake fand ich bei weitem am häufigsten *Lactobacillus*

Hyochi, dann folgten *L. filamentosus* und *L. alcoholphilus*, und *L. saprogenes* ließen sich am seltensten finden.

SCHLUSS

Am Anfang dieser Arbeit erwähnte ich, daß der Hauptzweck meiner Untersuchungen war, die Entstehungsursache und des Wesen der Hyochi-Bazillen klarzustellen. Deshalb führte ich zunächst Untersuchungen aus, über den Einfluß von wachstumsfördernden Substanzen auf die Bazillenentwicklung, über einige zu derselben notwendige Bedingungen sowie über den Wechsel der Bestandteile des Sake während der Bazillenentwicklung. Schließlich legte ich die systematische Stellung dieser Bazillen fest.

Da ich die hier angeführten Themen bereits am Schlusse der betreffenden einzelnen Kapitel und Abschnitte kurz zusammengefaßt habe, würde sich eigentlich eine nochmalige Zusammenfassung erübrigen. Trotzdem möchte ich nicht verfehlen, eine kurze Schlußübersicht über meine Arbeit zu geben und diese mit einer allgemeinen Betrachtung zu verbinden.

Es gelang mir, das Vorhandensein von das Hyochi-Bazillen-Wachstum fördernden Substanzen nachzuweisen und deren physikalischen und chemische Eigenschaften klarzustellen. Ferner stellte ich fest, daß die Substanzen in Charakter von Vitamin B₁, B₂ oder Bios ganz verschieden sind. Diese Ergebnisse sind für die Voraussage der Sake-Fäulnis von größtem Wert. Ich glaube, annehmen zu dürfen, daß sich, auf diesen Resultaten aufbauend, neue Wege finden werden, um eine völlig sichere Sake-Herstellung ohne Fäulnisgefahr zu erreichen.

Bei der Untersuchung der für die Hyochi-Bazillen-Entwicklung notwendigen Bedingungen prüfte ich zunächst die Temperaturverhältnisse. Hierbei konnte ich genau die kälteste Lebenstemperatur sowie die Pasteurisierungstemperatur für diese Bakterien feststellen. Auch bestimmte ich den Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration, verschiedener Säuren und der Qualität des Sake. Wenn man alle diese Bedingungen beachtet, dürfte es gelingen, einen starken, widerstandsfähigen Sake herzustellen, der der Fäulnis zu trotzen imstande ist.

Weiter führte ich Untersuchungen aus, in welchen ich klarstellte, welche Veränderungen der Sake durch die Bazillen-Schädigung erfährt. Durch Kenntnis dieser Tatsache könnte die Möglichkeit geschaffen werden, durch geeigneten Zusatzmittel Fäulnis-Sake zu rektifizieren.

Zum Schluß gelang es mir durch systematische Untersuchungen eine genaue Klassifikation der die Sake-Fäulnis erzeugenden Bakterien durch-

zuführen. Ich nehme an, daß solch eine systematische Ordnung in Zukunft die Bestimmung von aus Fäulnis-Sake isolierten Bazillen bedeutend erleichtern wird.

Während ich in der vorliegenden Arbeit grundlegende Untersuchungen über Hyochi-Bazillen ausgeführt habe, gedenke ich bei späterer Gelegenheit noch näher auf die praktische Anwendung meiner Resultate einzugehen.

Zum Schlusse möchte ich noch Herrn Professor Dr. KENDO SAITO, Ordinarius an der kaiserlichen Universität zu Osaka für seine freundliche Anleitung sowie Herrn Professor Dr. JUN HANZAWA, Ordinarius an der kaiserlichen Hokkaido-Universität zu Sapporo für seine liebenswürdige Unterstützung meinen herzlichsten Dank aussprechen.

(Aus dem zymomykologischen Institut an der
kaiserlichen Universität zu Osaka)

LITERATUR

- (1) ATKINSON, R. W., Chemistry of Saké brewing (1881).
- (2) OTANI, K., Journ. Tokyo Chem. Soc., Vol. 22, p. 804 (1901).
- (3) TORII, G., Report Govern. Inst. Brew. Japan, No. 2, p. 30 (1904).
- (4) TAKAHASHI, T., Bull. Coll. Agricult. Imp. Univ. Tokyo, Vol. 7, p. 101 (1906).
- (5) —————, Bull. Coll. Agricult. Imp. Univ. Tokyo, Vol. 7, p. 531 (1907).
- (6) TAKAHASHI, T. and ZENTA, Y., Report Govern. Inst. Brew. Japan, No. 59, p. 1 (1915).
- (7) YEDA, K., Report Govern. Inst. Brew. Japan, No. 14, p. 5 (1907).
- (8) ZENTA, Y., Journ. Soc. Brew. Japan, Vol. 12, No. 12 (1917).
- (9) TAKAHASHI, T., Journ. Soc. Brew. Japan, Vol. 16, No. 10 (1921).
- (10) —————, Journ. Soc. Brew. Japan, Vol. 17, No. 10 (1922).
- (11) —————, Journ. Coll. Agricult. Imp. Univ. Tokyo, Vol. 5, p. 111 (1913).
- (12) KURONO, K., Journ. Sci. Agricult. Soc. Japan, No. 231, p. 727 (1917).
- (13) KURONO, K. and MUROMOTO, N., Journ. Soc. Brew. Japan, Vol. 25, p. 11 (1930).
- (14) YAMAZAKI, I., Journ. Agricult. Chem. Soc. Japan, Vol. 1, p. 475 (1925).
- (15) —————, Journ. Agricult. Chem. Soc. Japan, Vol. 5, p. 377 (1929).
- (16) WILDIERS, E., La Cellule, T. 18, p. 313 (1901).
- (17) KOSSOWICZ, A., Ztschr. landw. Versuchswesen Oesterr., Bd. 6, S. 27 (1906).
- (18) SUZUKI, U. and SHIMAMURA, T., Journ. Tokyo Chem. Soc., Vol. 32, (1911).
- (19) FUNK, C., Journ. Physiol., Vol. 43, p. 395 (1911).
- (20) WILLIAMS, R. J., Journ. Biol. Chem., Vol. 38, p. 465 (1919).
- (21) ABDERHALDEN, E. und SCHAUMAN, H., Fermentforschung, Bd. 2, S. 120 (1918).

- (22) BACHMAN, F. M., *Journ. Biol. Chem.*, Vol. 39, p. 235 (1919).
- (23) IDE, M., *Journ. Biol. Chem.*, Vol. 46, p. 521 (1921).
- (24) FUNK, C. and DUBIN., *Proc. Soc. Exper. Biol.*, Vol. 19, p. 403, (1921).
- (25) EMMETT, A. D. and STOCKHOLM, M., *Journ. Biol. Chem.*, Vol. 43, p. 278 (1920).
- (26) FULMER, E. I., NELSON, V. E. and SHERWOOD, F. F., *Journ. Amer. Chem. Soc.*, Vol. 43, p. 186 (1921).
- (27) —————, *Journ. Amer. Chem. Soc.*, Vol. 43, p. 191 (1921).
- (28) FLEMING, W. D., *Journ. Biol. Chem.*, Vol. 49, p. 119 (1921).
- (29) KINUGASA, Y. and HATTORI, Y., *Journ. Pharm. Soc. Japan*, No. 487, p. 579 (1922).
- (30) ANDO, K., *Japan. Journ. Exp. Med.*, Vol. 8, p. 19 (1924).
- (31) BERTRAND, *Ann. de Chem. Phys.* (8) T. 3, p. 121 (1904).
- (32) NOGUCHI, H., *München. med. Wochensch.*, Bd. 58, S. 1550 (1911).
- (33) PANICI, J. P. and RUSSELL, D. W., *Journ. Biol. Chem.*, Vol. 34, p. 43 (1918).
- (34) LLOYD, D. J., *Journ. Path. Bact.*, Vol. 21, p. 113 (1916).
- (35) GOLDON, M. H. and HINE, T. G. M., *Brit. Med Journ.*, Vol. 2, p. 678 (1916).
- (36) FLACK, M., *Brit. Med. Journ.*, Vol. 2, p. 682 (1916).
- (37) COLE, W. and LLOYD, D. J., *Journ. Path. Bact.*, Vol. 2, p. 267 (1916-17).
- (38) SHEARER, C., *Lancet*, I. p. 59 (1917).
- (39) —————, *Lancet*, II. p. 714 (1917).
- (40) KLIGLER, I. J., *Journ. Exp. Med.* Vol. 30, p. 31 (1919).
- (41) AGULHON, H. and LEGROUX, R., *Compt. Rend.*, T. 167, p. 597 (1918).
- (42) LEICHTENTRITT, B. und ZIELASKOWSKI, M., *Biochem. Ztschr.*, Bd. 131, S. 499 und 513 (1922).
- (43) HOSOYA, S. and KUROYA, M., *Japan. Exp. Med.*, Vol. 8, p. 101 (1924).
- (44) TAKAHASHI, T. and SUZUKI, A., *Journ. Agricult. Chem. Soc. Japan*, Vol. 8, p. 1064 (1932).
- (45) TSUKIE, S., *Biochem. Ztschr.*, Bd. 131, S. 124 (1922).
- (46) HUGHES, T. P., *Journ. Bact.*, Vol. 23, p. 437 (1932).
- (47) NARAYANAN, B. T., *Biochem. Journ.*, Vol. 24, p. 6 (1930).
- (48) YAMAMOTO, R., *Journ. Agricult. Chem. Soc. Japan*, Vol. 1, p. 1051 (1925).
- (49) KINNERSLAY, E. W. and PETERS, R. A., *Biochem. Journ.*, Vol. 21, p. 777, (1927).
- (50) SHERMAN, H. C. and AXTMAYER, J. H., *Journ. Biol. Chem.*, Vol. 75, p. 207 (1927).
- (51) DAVIS, L. and FERRY, N. S., *Journ. Bact.*, Vol. 4, p. 217, (1919).
- (52) ABDERHALDEN, E., *Z. physiol. Chem.*, Bd. 47, S. 394 (1906) und Bd. 59, S. 249 (1909).
- (53) ZELLER, H., *Biochem. Ztschr.*, Bd. 176, S. 134 (1926).
- (54) YAMAZAKI, I., *Journ. Agricult. Chem. Soc. Japan*, Vol. 8, p. 991 (1932).
- (55) AYERS, S. H. and MUDZE, C. S., *Journ. Bact.*, Vol. 7, p. 449 (1922).
- (56) NAGAO, E., *Jozogaku Zasshi*, Vol. 5, p. 266 (1927).
- (57) YAMAZAKI, I., *Journ. Agricult. Chem. Soc. Japan*, Vol. 8, p. 1111 (1932).

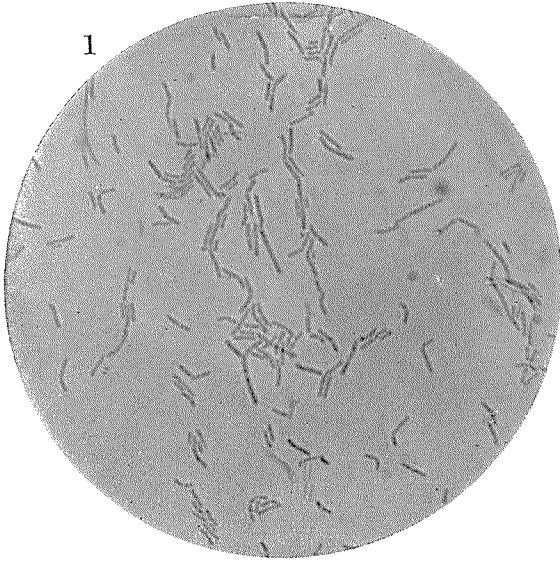
- (58) SHERMAN, J. M. and HOLM, G. E., *Journ. Bact.*, Vol. 7, p. 465 (1922).
- (59) WOLF, F. A. and SHUNK, I. V., *N. C. Agr. Expt. Sta. Tech. Bul.* Vol. 20, p. 3 (1921).
- (60) KRÖNIG, B. und PAUL, T., *Zeitschr. Hyg. u. Infekt.*, Bd. 25, S. 1, (1897).
- (61) PAUS, N. N., *Centrbl. Bakt.*, I Abt., S. 81 (1908).
- (62) PAUL, T., BIRSTEIN, G. und RAUSS, A., *Biochem. Ztschr.* Bd. 29, S. 202 u. 267 (1910).
- (63) SHIMOGAWA, S., *Kokumin Eisei*, Vol. 4, No. 2 and 3 (1926).
- (64) TETSUMOTO, S., *Journ. Agricult. Chem. Soc. Japan*, Vol. 9, P. 67, 388, 563 and 761 (1933).
- (65) JANKE, A. und BERAN, F., *Arch. Mikrobiol.*, Bd. 4, S. 54 (1933).
- (66) FUKAI, F. and NAKASHIMA, W., *Journ. Soc. Brew. Japan*, Vol. 25, No. 6 (1930).
- (67) YAMADA, M., *Journ. Soc. Brew. Japan*, Vol. 20, p. 18 (1925).
- (68) YASUDA, T., *Jozogaku Zasshi*, Vol. 10, p. 145 (1932).
- (69) TOKUOKA, Y., *Jozogaku Zasshi*, Vol. 11, p. 1054 (1933).
- (70) TOMIYASU, Y., *Jozogaku Zasshi*, Vol. 10, p. 515 (1932).
- (71) AYAI, S., *Journ. Soc. Chem. Ind. Japan*, Vol. 34, p. 173, (1931).
- (72) KLEIN, G., *Handbuch der Pflanzenanalyse*, Bd. II, Teil. 1, S. 428 (1932).
- (73) ROSENTHALER, L., *Nachweis organische Verbindungen*, 2 Aufl., S. 330 (1923).
- (74) YAMAZAKI, I., *Nippon Gakujitsu Kyokai Hokoku*, Vol. 9, p. 726 (1934).
- (75) BERGEY, D. H., *BERGEY'S manual of determinative bacteriology*. 4 Ed. (1934).
- (76) SHOJI, K., *Jozogaku Zasshi*, Vol. 11, p. 1047 (1933).
- (77) MIGULA, W., *System der Bakterien* (1879-1900).
- (78) LEHMANN, K. B. und NEUMANN, R. O., *Bakteriologie* (1927).
- (79) MATSUSCHITA, T., *Bakteriologische Diagnostik* (1902).
- (80) HENNEBERG, W., *Handbuch der Gärungsbakteriologie*. 2 Aufl., Bd. 2 (1926).
- (81) CHESTER, F. D., *A manual of determinative bacteriology*. (1901).

Erklärung der Abbildungen

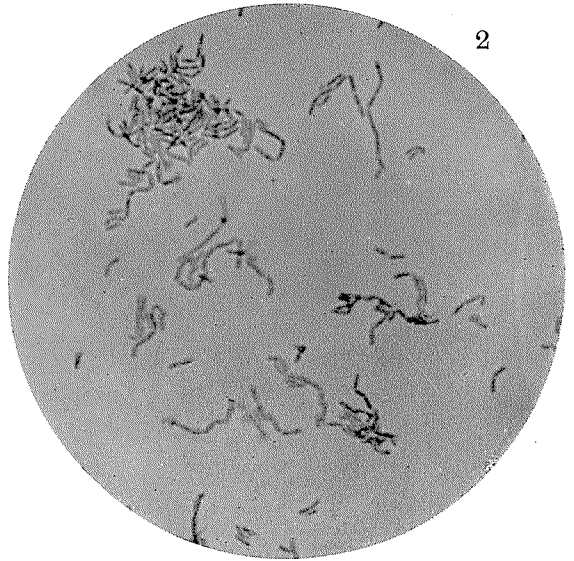
Deckglaspräparate aus einer Kultur auf Sake mit Reisembryo-Wasser-Agar. Temperatur: 30°C, Kulturdauer: 4 Tage, Färbung: mit Karbolfuchsin, Vergrößerung: ca. 650 fach.

- Abb. 1. *Lactobacillus Hyochi*
" 2. *Lactobacillus Hyochi* var. 1
" 3. *Lactobacillus Hyochi* var. 2
" 4. *Lactobacillus filamentosus*
" 5. *Lactobacillus alcoholophilus*
" 6. *Lactobacillus saprogenes*

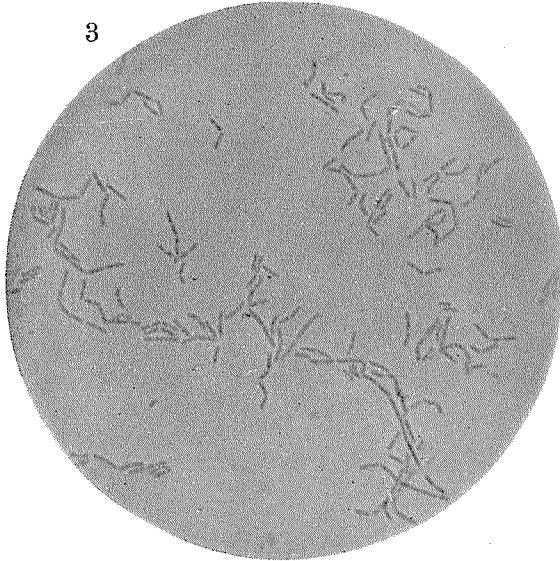
1



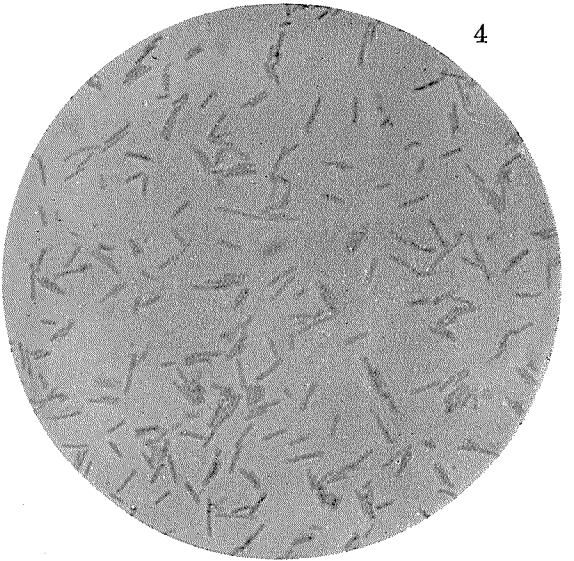
2



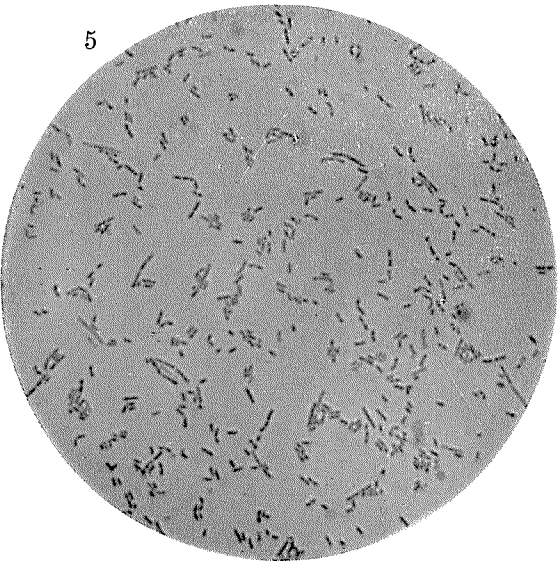
3



4



5



6

