

10. M. Büsgen: *Aspergillus Oryzae*.

Eingegangen am 26. September 1885.

Seit mindestens 2600 Jahren wird in Japan bei der Herstellung des dort beliebtesten alkoholischen Getränkes, des Sake, eine Pflanze benutzt, welche erst im Jahre 1878 einen Namen, bisher aber noch keine eingehendere Bearbeitung gefunden hat. Ahlburg (Dingler's polytechn. Journal. 1878. Bd. 230. p. 330 und Mitth. d. Deutschen Ges. f. Natur- und Völkerkunde Ostasiens. 1878. 16. Heft), der erste, welcher sie näher untersuchte, lieferte eine ziemlich unverständliche Beschreibung derselben, aus welcher die in Saccardos Sylloge (I. p. 27) und in Rabenhorst's Kryptogamenflora (II. Aufl. Bd. 1. p. 61) enthaltenen Diagnosen hergeleitet sind. Im letztgenannten Buche heisst es: „*Eurotium Oryzae* Ahlburg. Perithezien gelb, dem fleckigen — soll heissen flockigen — weissen, septierten Mycel aufsitzend, zahlreiche Schläuche enthaltend.“ Dagegen erwähnt Cohn (61. Jahresbericht d. schlesischen Ges. f. vaterl. Cultur. 1883. p. 227) den bei der Sakebereitung benutzten Pilz als den „durch grünlich gelbe Gonidienketten ausgezeichneten *Aspergillus Oryzae*.“ Es gelang ihm, denselben im Grossen zu züchten und zur Herstellung von Sake zu verwenden. Leider sind die Angaben Cohn's sehr kurz. Sie ermöglichen es weder den *Aspergillus* scharf von seinen Verwandten zu unterscheiden, noch auch die Rolle, welche er bei der Sakefabrication spielt, mit Sicherheit zu beurtheilen. Beide Punkte machten neue Untersuchungen wünschenswerth, deren Resultat im Folgenden mitgetheilt wird.

Die ausführlichsten, nicht japanischen Nachrichten über den Sake stammen von Korschelt (Dingler's polyt. Journal. l. c.) und Atkinson (Memoirs of the science department Tokio Daigaku [university of Tokio] No. 6. 1881. p. 1—73). Namentlich der letzteren Arbeit entnehme ich die zum Verständniss nothwendigen Angaben über die technische und chemische Seite der Sakefabrication.

Als Ausgangsmaterial dienen Reiskörner, welche der Samenschale und des Embryo durch Stampfen beraubt und hierauf gedämpft werden. Die gedämpften Körner versetzt man mit etwa dem gleichen Volum Wasser und circa $\frac{1}{4}$ Volum des sogenannten Koji. Es sind dies ebenfalls geschälte und gedämpfte Reiskörner, welche aber von einem dichten Gewebe von Pilzfäden überzogen werden. Sie wirken ähnlich wie unser Malz, indem sie die theilweise Verwandlung der Stärke des ge-

dämpften Reises in Zucker veranlassen. In einem bei Atkinson (l. c. p. 37) angeführten Falle enthielt die Masse am 5. Tage nach dem Kojizusatz 12,25 pCt. Dextrose und 5,69 pCt. Dextrin, während der angewandte Reis nur 3,91 pCt. dieser Substanzen aufgewiesen hatte. Gäh- rung tritt in den ersten Tagen nicht, oder nur in geringem Grade auf, da die Masse zunächst bei niedriger Temperatur gehalten wird. Vom 5. Tage an — die Zeitangaben sind übrigens in den verschiedenen Brauereien verschieden — wird sie auf 20—35° C. erwärmt. Nun be- ginnt — ohne, dass, wie bei der Bierbrauerei, eine besondere Hefe zu- gesetzt wird — eine lebhafte Gäh- rung, während welcher, ebenfalls nach einem Atkinson'schen Beispiele (l. c. p. 40), Dextrin ganz, Dextrose bis auf 0,2 pCt. verschwinden und dafür 10,5 pCt. Alkohol auftreten. Die so erhaltene Masse heisst Moto. Sie stellt, mit einer neuen Portion gedämpften Reises und Koji gemengt, die Maische dar, welche nun im „Hauptprocess“ zum eigentlichen Sake vergährt.

Uns interessirt specieller das Koji. Seine Wirkungsweise beruht darauf, dass es eine sehr kräftige Diastase enthält, welche sich, wie unten näher zu begründen sein wird, in vielen Punkten von der Malz- diastase unterscheidet. Ihre Anwesenheit lässt sich leicht darthun durch Zusammenbringen eines wässrigen Auszugs aus Kojikörnern mit Stärkekleister. Beispielsweise hatte ein solcher Auszug aus 10 g Koji bei einer Temperatur von nur 4—10° C. mit 11,43 g verkleisterter Stärke nach 48 Stunden 9,714 g löslicher Substanzen, Dextrose und Dextrin, gebildet (Atkinson, l. c. p. 29). Maltose tritt in der Regel nicht auf, weil sie durch die Diastase in Dextrose übergeführt wird. Um die Herkunft dieser Diastase zu verstehen, müssen wir einen Blick auf die Herstellungsweise des Koji werfen. Ein gewisses Volum ge- dämpften Reises wird mit einer kleinen Menge — auf 72 Liter Reis 3 ccm (Atkinson, l. c. p. 7) — Tane Koji, eines äusserst feinen grün- lich gelben Pulvers, gemengt und dann in unterirdischen Kammern mit nahezu constanter Temperatur und geeigneter Lüftung ausgebreitet. Die Mittheilungen Cohn's, der Verlauf der hier beschriebenen Processe und endlich meine Erfahrungen lassen keinen Zweifel darüber, dass das Tane Koji aus den Gonidien des *Aspergillus Oryzae* besteht. Es gelang auch mir, mit aus japanischem Koji gezogenen Gonidien selbst Koji und mittelst des letzteren ein wenigstens Sake-ähnliches Getränk herzustellen.

Der mit Tane Koji inficirte Reis bedeckt sich in den Kammern alsbald mit einem weissen Mycel, welches durch wiederholtes Durch- arbeiten der Masse mit den Händen dazu veranlasst wird, jedes einzelne Reiskorn allseitig zu umspinnen. Nach einigen Tagen beginnt die Bildung von Gonidienträgern; ehe dieselbe aber recht in Gang kommt, nimmt man den Reis aus den Kammern und lässt ihn an der Luft ausgebreitet trocknen. Damit ist die Kojifabrikation beendet. Soll

Tani Koji dargestellt werden, so lässt man den auf kleine Brettchen vertheilten Reis etwas länger in der Kammer verweilen. Es bilden sich dann reichlich Gonidien, welche durch Abklopfen der Brettchen gesammelt werden. In gewissen Gegenden soll Koji mit Hülfe spontaner Infection des gedämpften Reises mit dem *Aspergillus* dargestellt werden; doch sind die Mittheilungen darüber nicht ganz Vertrauen erweckend (s. Korschelt, l. c. p. 80).

Schnitte durch Kojikörner zeigen, dass das Pilzmycel in mehr oder minder dicker Schicht deren Oberfläche überzieht. Mitunter stellen die Körner vollständige Pseudomorphosen des Mycels dar, meist jedoch enthalten sie einen centralen, mit gequollenen Stärkekörnern vollgepfropften Kern, in welchen nur zerstreute Pilzfäden eindringen. In den äusseren Schichten des Kornes weisen Reagentien keine Stärke mehr, aber Proteinstoffe und Zucker nach. Zwei von Atkinson (l. c. p. 5 und 12) angegebene Analysen mögen ein Bild der chemischen Veränderungen geben, welche der Reis während des Wachstums des *Aspergillus* erlitten hat.

		In Wasser löslich	
		I. Geschälter Reis bei 100° getrocknet	II. Koji bei 100° getrocknet
Dextrose	}	1,91	{ 25,02
Dextrin			{ 3,88
Asche		0,63	0,52
Albuminoide		1,95	8,34

		In Wasser unlöslich	
		I. Geschälter Reis bei 100° getrocknet	II. Koji bei 100° getrocknet
Stärke		82,27	56,00
Cellulose		4,79	4,20
Asche		0,46	0,09
Albuminoide		7,50	1,50
Fett		0,49	0,43

Wie man sieht, ist an Stelle eines grossen Theils der Stärke Dextrose getreten, und der grösste Theil der unlöslichen Proteinsubstanzen durch lösliche ersetzt worden.

Nach allem Mitgetheilten ist es a priori wahrscheinlich, dass das Mycelium des *Aspergillus Oryzae* während seines Wachstums die Diastase des Koji erzeuge. Ob es dieselbe ausscheidet oder auf irgend eine Weise vorhandene Eiweisskörper zu Diastase umwandelt, muss dahingestellt bleiben; doch ist ersteres wohl wahrscheinlicher. Die Möglichkeit, dass die Diastase als solche aus dem Reis selbst stamme, ist ausgeschlossen, da sie zwischen 60 und 70° C. sich zersetzt und also das Dämpfen keinesfalls hätte überdauern können. Trotzdem ist ein direkter Nachweis des diastasebildenden Vermögens bei dem *Aspergillus* nicht überflüssig, sowohl seines allgemeinen Interesses wegen, als mit Rücksicht darauf, dass auf den Kojikörnern — dem einzigen Material,

welches bis jetzt den Studien über den *Aspergillus* zum Ausgangspunkt gedient hat — neben diesem Pilze eine ganze Menge anderer Organismen zu finden sind. Lassen wir die auf feucht gelegten Kojikörnern aufgetretenen Sprosspilze und eine noch unbenannte *Syncephalis*, ihrer geringen Ausdehnung wegen, bei Seite, so bleiben noch *Eurotium repens* und die unvermeidlichen Bakterien zu berücksichtigen. Das *Furotium* muss indess erst später, nachdem die Zuckerbildung schon vorgeschritten war, sich auf dem Koji angesiedelt haben, da es weder auf Stärkekleister noch auf gedämpftem Reis verschiedener Sorten zu kräftiger Entwicklung zu bringen war; die Bakterien dagegen hätten wohl Diastase geliefert haben können.

Tane koji stand mir, wie oben angedeutet, nicht zu Gebot; aber es gelang leicht, auf feucht gelegten Kojikörnern Gonidienträger des *Aspergillus Oryzae* zu erhalten und von ihnen aus Reinkulturen anzulegen. Der Pilz wuchs weniger gut auf gekochten Pflaumen, besser auf einer 5prozentigen Lösung von Traubenzucker mit einem Fleischextraktzusatz; sehr üppig aber auf gedämpftem Reis und mit Fleischextrakt versetztem Stärkekleister. Besonders rasch gedieh er bei 28 bis 30° und darüber, welche Temperatur in den Kammern der Kojifabriken nach einmaligem Anwärmen durch die bei dem Wachsthum des Mycels frei werdende Wärme hervorgebracht wird.

Das Mycelium des Pilzes besteht aus verzweigten und septirten Fäden, welche eine Dicke von 7 μ erreichen. Die bis über 1 mm langen Gonidienträger stellen entweder sofort durch ihre Derbwandigkeit und Dicke (— 23 μ) kenntliche Seitenzweige dar, oder geradlinige Fortsetzungen gewöhnlicher Myceläste, welche nach ihrer Spitze zu allmählich die Eigenschaften jener annehmen. Die Köpfchen gleichen denen des *Aspergillus repens*. Sie tragen unverzweigte Sterigmen mit Ketten meist kugelrunder, bei der Reife meist feinwarziger, grünlich gelber Gonidien, von 5—7 μ Durchmesser. Die ganze Pflanze hat eine gewisse Aehnlichkeit mit *Aspergillus flavescens* Lichtheim, der auf denselben Substraten und bei derselben hohen Temperatur üppig gedeiht; doch bieten der Habitus reiner Kulturen und die Gonidien hinreichende Unterschiede. Die Letzteren sind bei *Aspergillus flavescens* meist etwas länglich und ausserdem kleiner und intensiver gefärbt als die der anderen Spezies. Die Perithezien sind unbekannt. *Eurotium Oryzae* muss bei Rabenhorst und Saccardo gestrichen werden. Ahlborg hat ohne Zweifel mit Sterigmen besetzte *Aspergillusköpfe*, deren Gonidien abgefallen waren, zu seiner Beschreibung verwandt. Dieselbe lautet (l. c.): „Das Sporangium hat eine entschieden gelbliche Färbung. Dasselbe trägt nach allen Seiten hin auseinander gehende Sporenschläuche. Die Sporen sind nicht kettenförmig angeordnet“. Man merkt, dass Ahlborg versucht hat, den Pilz nach Leunis Synopsis zu bestimmen.

Kurz erwähnt sei hier, dass Korschelt (l. c. p. 333) die Ansicht ausspricht, das Mycelium des *Aspergillus Oryzae* zerfalle in gährungsfähigen Flüssigkeiten in Gemmen, welche, wie die des *Mucor racemosus*, Alkoholbildung veranlassen. Der Pilz würde danach bei der Sakebereitung auch die Hefe liefern können. Dies ist jedoch nicht der Fall. Korschelts Meinung stützt sich nicht auf direkte Beobachtung. Der *Aspergillus* verändert in gährungsfähigen Lösungen weder sein Mycel, noch leitet er eine merkliche Gährung ein. Die Hefe des Sake muss aus der Luft stammen.

Dass *Aspergillus Oryzae* Diastase erzeuge, war schon daraus zu entnehmen, dass er auf Kleister von Reisstärke wachsend, diesen in kurzer Zeit in eine klare Flüssigkeit verwandelte. In letzterer liess sich aber auch unschwer freie Diastase nachweisen, indem man sie mit löslicher Stärke in Wasser zusammenbrachte. (Vgl. Wortmann, Untersuchungen über das diastatische Ferment der Bakterien. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. VI.) / Schon nach einer halben Stunde trat in schwachen Lösungen mit wässriger Jodlösung keine Stärkereaktion mehr ein. Dieselbe Wirkung auf lösliche Stärke übten 5 prozentige Lösungen von Traubenzucker mit Fleischextrakt aus, auf welchen der *Aspergillus* dicke Häute gebildet hatte. Wenn es sich bei derartigen Versuchen darum handelt, den Nachweis zu führen, dass die Stärke wirklich verschwunden sei, so darf man nicht zu wenig Jod anwenden. Duclaux (Chimie biologique p. 190) macht darauf aufmerksam, dass kleine Quantitäten Jod durch Diastase der Stärke gegenüber unwirksam gemacht werden können. Wenn der erste Tropfen Jodlösung in einer diastasehaltigen Flüssigkeit keine Reaktion hervorruft, so darf man also daraus noch nicht schliessen, dass dieselbe keine Stärke mehr enthalte.

Dass keine Bakterien bei den beschriebenen Versuchen im Spiel waren, ergab sich aus der fortwährenden völligen Klarheit der gehörig sterilisirten Flüssigkeiten und aus der mikroskopischen Untersuchung. Zum Ueberfluss wurde mit einigen Tropfen der diastasehaltigen Traubenzuckerlösung ein Kölbchen mit Pflaumendecoct infiziert. Auch hier trat keine Bakterienentwicklung ein. Uebrigens produzierten die von Wortmann untersuchten Bakterien nur dann Diastase, wenn ihnen keine andere Kohlenstoffquelle als Stärke zu Gebote stand (l. c. p. 316). Das Verhalten des *Aspergillus* im Gegensatz zu dem jener Bakterien erinnert an die Beobachtungen Baranetzki's (Die stärkeumbildenden Fermente in den Pflanzen, Leipzig 1878.) über die Diastasebildung bei Phanerogamen. Auch hier wird nicht nur in Correlation mit vorhandener Stärke Diastase gebildet. Dieselbe fand sich auch in den keine oder nur äusserst wenig Stärke enthaltenden austreibenden Rüben von *Daucus Carota* und *Brassica napus*.

Auch der wässrige Auszug einer auf Traubenzucker-Fleischextraktlösung gewachsenen zerriebenen *Aspergillus*haut enthielt Diastase.

Cohn (l. c. p. 228) schloss aus einer ähnlichen Beobachtung, dass dieselbe im Innern der *Aspergillus*fäden enthalten gewesen sei; es dürfte indess schwer sein, die eventuell zwischen den Fäden einer grösseren Mycelmasse enthaltene Diastase soweit auszuwaschen, dass jener Schluss zwingend sei.

Die Eigenschaften der Diastase des Koji behandelt Atkinson sehr ausführlich in seinem citirten Aufsätze. Freilich studirt er sie nur an wässerigen Kojiauszügen. Es ist also nicht ausgeschlossen, dass er mit Gemengen mehrerer gleichzeitig von dem *Aspergillus* ausgeschiedener Fermente zu thun gehabt hat. Nach ihm verwandelt der Kojiextrakt Rohrzucker in Traubenzucker und Maltose in Dextrose. Wir begnügen uns damit, hervorzuheben, dass er noch bei 0° diastatisch wirkt, bei 50° das Optimum seiner Wirksamkeit erreicht und zwischen 60 und 70° zerstört wird. Die Diastase des Gerstenmalzes hat ihr Optimum bekanntlich bei 65° und verliert ihre Wirkung erst bei 70 bis 80° C.

Zum Schlusse sei bemerkt, dass *Aspergillus Oryzae* nicht der einzige Vertreter seiner Verwandtschaft ist, bei welchem man Diastaseausscheidung beobachtet hat. Duclaux (Chimie biologique p. 193, 195, 220) citirt eine solche auch für *Aspergillus glaucus*, *niger* und *Penicillium glaucum*. Speziell für *Aspergillus niger* wird (pag. 220) hervorgehoben, dass er, wie *Aspergillus Oryzae*, auch wenn er nur Zucker als Kohlenstoffquelle hat, doch Diastase (Amylase Duclaux) bildet. Dass die Ausscheidungen der genannten Pilze, wie der Kojiextrakt, auch Rohrzucker invertiren, veranlasst Duclaux zu der Annahme, dass es sich auch hier um Gemenge mehrerer Fermente handelt.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft](#)

Jahr/Year: 1885

Band/Volume: [3](#)

Autor(en)/Author(s): Büsgen Moritz

Artikel/Article: [Aspergillus Oryzae. LXVI-LXXI](#)