

Beiträge zur Kenntniss der invertirenden Fermente.

Von

Dr. O. Kellner (Ref.), **Y. Mori** und **M. Nagaoka**.

Der Redaction zugegangen am 22. October 1896.

Bei der Bereitung des Reisweins und Alkohols, sowie mehrerer gegohrener Nahrungs- und Genussmittel benützt man in Japan und China eine eigenthümliche stärkeumbildende Substanz, das Koji¹⁾, welches besteht aus gedämpftem, von der Kleie befreitem Reis, auf welchem durch künstliche Aussaat von Sporen eines bisher noch nicht genügend characterisirten Pilzes ein schneeweisses, die einzelnen Körner stark verfilzendes Mycel zur Entwicklung gebracht wird. Die Darstellung des Koji, über welche wir bereits Beschreibungen von Hoffmann²⁾ und O. Korschelt³⁾ besitzen, geschieht in folgender Weise:

Der geschälte und gewasste Reis wird zunächst zur Entfernung der noch anhaftenden Kleie gewaschen, darauf etwa 12 Stunden eingequellt und gedämpft, indem man das Korn in eine Tonne auf einen Siebboden schüttet, der mit einem Tuch bedeckt ist und auf einem eisernen Kessel ruht. In letzterem wird Wasser zum Sieden erhitzt und die Dämpfe so lange durch das Korn streichen gelassen, bis die Stärke verkleistert ist. Wenn die Körner beim Zerdrücken ein

¹⁾ Sprich Ko-dschü.

²⁾ Mittheilungen d. deutsch. Gesellschaft f. Natur- u. Völkerkunde Ostasiens, 1. Bd., 6. Heft.

³⁾ Ebendasselbst, 2. Bd., 1878, S. 240.

homogenes Aussehen zeigen und in ihrem Inneren ein weisser Kern nicht mehr zu beobachten ist, dann wird das Dämpfen unterbrochen und der Reis zum Abkühlen auf Strohmatten ausgebreitet. Nachdem die Temperatur der gedämpften Masse auf 28—35° C. gesunken ist, wird eine kleine Menge derselben mit den gelblich-braunen Sporen des Pilzes gut vermischt und unter das ganze übrige Material vertheilt; auf 100 Liter Reis werden 1—2 cbcm. Sporen verwendet; nach dem Beginn der Saison wird aber gewöhnlich fertiges Koji anstatt der Sporen benützt. Die Matten werden demnächst in den vorderen Theil einer Art Keller gebracht, der entweder einfach in die Erde geschnitten, oder oberirdisch errichtet und mit dicken Erdmauern umgeben ist. Nach 18—20 Stunden hat sich bereits Mycel entwickelt und die Temperatur erheblich gesteigert. Um diese Zeit werden die Körner mit den Händen durchgearbeitet und auf kleine, mit Randleisten versehene Bretchen in dünnen Lagen vertheilt und in dem inneren wärmeren Theil des Kellers niedergelegt. Wiederum nach 20—22 Stunden werden die nunmehr bereits stark verfilzten Körner durchgearbeitet und zur Abkühlung und Anfeuchtung mit etwas Wasser besprengt. Nach etwa 10 Stunden wird dies wiederholt und nach weiteren 14—16 Stunden ist das Koji fertig. Der ganze Process, von der Aussaat der Sporen an gerechnet, dauert also etwa 2 $\frac{1}{2}$ Tage.

Das so dargestellte Koji ist mit einem rein weissen Mycel überzogen, welches die Körner so fest mit einander verbindet, dass dieselben fest auf den Bretchen haften. An einem kühlen luftigen Ort aufbewahrt hält sich das Koji auf den Bretchen einige Monate in gutem Zustande. Lässt man es länger in dem warmen Keller, so tritt nach 1—2 Tagen Sporenbildung ein. — Nach Untersuchungen von Ahlburg¹⁾ gehört der Pilz zu dem Genus *Eurotium* Link und bildet eine eigene Species, welcher der Genannte den Namen *Eurotium Oryzae* gab.

¹⁾ Mittheilungen d. deutsch. Gesellschaft f. Natur- u. Völkerkunde Ostasiens. II. Bd., 1878. S. 253.

Für manche Zwecke, so zur Bereitung von Alkohol, wird Gerste an Stelle des Reises verwendet¹⁾).

Da über die quantitativen Veränderungen, welche durch die Entwicklung eines Mycels in dem Substrat hervorgerufen werden, nur erst wenig bekannt ist und insbesondere Untersuchungen über die Beziehungen zwischen dem fertigen Koji und dem zu dessen Bereitung benützten Rohmaterial überhaupt noch nicht vorliegen, so haben wir diesen Gegenstand in Angriff genommen und später auch die invertirenden Eigenschaften des Koji des Näheren studirt. In einer grösseren Anlage, in welcher man täglich Koji bereitete, wurde von dem gedämpften und mit Sporen eben gemischtem Korn so viel abgewogen, als zur Füllung von 4 Bretchen reichte, und gesondert unter Vermeidung jeglichen Verlustes zu Koji verarbeitet. Ueber die Intensität der Entwicklung des Pilzes geben einige Temperaturbeobachtungen Aufschluss, welche wir bei dieser Gelegenheit vorgenommen hatten:

In dem Versuch mit Reis zeigte die gedämpfte Masse nach der Vermischung mit Sporen 28° C., nach dem Ausbreiten auf den Bretchen 26°, nach ferneren 22 Stunden 40—42°, wonach die Masse durchgeknetet wurde und sich um 2—4° abkühlte; nach weiteren 8 Stunden hatte sie sich wiederum auf 38—41° erwärmt.

In einem zweiten Versuch mit Gerste, welche in ganz derselben Weise bearbeitet wurde, wie der Reis, betrug die Temperatur der gedämpften Masse nach der Aussaat der Sporen 35° C., nach 26stündigem Verweilen auf der Matte 37—39°, welcher Wärmegrad auch nach dem zweimaligen Durchkneten stets nach einigen Stunden wieder erreicht wurde.

In beiden Versuchen schwankte die Temperatur in dem inneren Theile des Kellers zwischen 25—27° C. Demnach hatte in Folge der Lebensäusserungen des Pilzes eine Erwärmung des gedämpften Kornes um 13—17° C. stattgefunden.

¹⁾ Dieser Thatsache gegenüber fällt es auf, dass nach Ahlburg die Sporen nur auf Reis zur Keimung und Entwicklung gelangen sollen.

Von dem frisch mit Sporen besäten Material, sowie von dem fertigen Koji wurden nach sorgfältiger Durchmischung Proben zur Untersuchung genommen und weitere Veränderungen durch den Pilz oder durch etwa secernirte Fermente durch rasches Erhitzen der Proben auf 100° C. unterbrochen. Nur von dem Koji und in diesem Falle nur zur Bestimmung des gesammten und Eiweiss-Stickstoffs, des Ammoniaks und Alkohols, der freien Säuren und der Löslichkeit wurde frisches Material benützt und in allen den Fällen mit geglühtem Bimstein fein zerrieben, in welchen Extraktionen vorzunehmen waren. Die gesammte Löslichkeit, freien Säuren, das Ammoniak und der Alkohol wurde nach 12stündiger Digestion des zerriebenen Koji in Wasser bestimmt; der Eiweiss-Stickstoff wurde ermittelt in einem mit 40procentigem Alkohol hergestellten Decoct, zu welchem man eine Lösung von Kupfersulfat nebst etwas Kupferacetat und so viel verdünnte Natronlauge zufügte, dass noch eine deutliche Spur Kupfer in Lösung blieb. Die übrigen Bestimmungen wurden mit getrocknetem, fein pulverisirtem Material nach allgemein üblichen Methoden ausgeführt; der Stickstoff wurde nach Kjeldahl, die Zuckerarten nach wiederholtem Auskochen mit 80procentigem Alkohol unter Beobachtung der Soxhlet'schen Vorschriften bestimmt. Schwierigkeiten entstanden nur bei der Ermittlung der Feuchtigkeit im frischen Koji, indem selbst nach 40stündigem Trocknen bei 100° noch merkliche Gewichtsverluste stattfanden, die sich nach besonderen Versuchen auf eine Verflüchtigung saurer Dämpfe (wahrscheinlich Buttersäure) zurückführen liessen; für die Berechnung des Gehaltes an Trockensubstanz legten wir deshalb das nach 6stündigem Trocknen erhaltene Gewicht zu Grunde, da fein pulverisirte vegetabilische Substanzen im Allgemeinen nach dieser Zeit ein constantes Gewicht zeigen.

Von der mit Sporen besäten gedämpften Masse waren in dem Versuch mit Reis 3457 gr., in dem mit Gerste 3519,3 gr. der quantitativen Behandlung unterworfen und in ersterem Falle 2673 gr., in letzterem 2530 gr. Koji erhalten worden. Die procentische Zusammensetzung der angewandten Substanz und des daraus bereiteten Koji war folgende:

	Reis.		Gerste.	
	Gedämpfter Reis und Sporen.	Koji.	Gedämpfte Gerste und Sporen.	Koji.
Feuchtigkeit	39.16	31.77	49.01	42.71
In der Trockensubstanz:				
Rohprotein	7.81	8.97	10.79	12.92
Aetherextract	2.23	7.21	1.19	4.74
Rohfaser	1.05	1.60	1.52	4.53
Stärke, Dextrin etc. ¹⁾	87.97	70.97	84.63	64.62
Maltose	—	6.05	—	11.03
Glucose	Spur	4.07	0.68	0.22
Asche	0.94	1.13	1.19	1.94
Gesamt-Stickstoff	1.249	1.436	1.726	2.067
Eiweiss-Stickstoff	1.227	1.246	1.621	1.768
Nicht-Eiweiss-Stickstoff	0.022	0.190	0.105	0.299
Löslich in kaltem Wasser	3.63	38.52	6.50	37.92
Ammoniak	—	0.020	—	0.024
Flüchtige Säure (als Essig- säure)	—	0.079	—	0.063
Nicht flüchtige Säure (als Milchsäure)	—	0.351	—	0.516
Alkohol	—	0	—	Spur

In der Trockensubstanz des Koji finden wir hiernach eine relative Zunahme an allen Bestandtheilen, mit Ausnahme der Kohlehydrate, die theilweise eine Zerstörung erlitten zu haben scheinen. Die Gegenwart beträchtlicher Mengen von Maltose und Glucose im Koji deutet an, dass das von dem Pilze erzeugte Ferment bereits auf das feuchte Korn zu wirken beginnt, indessen ist der Gehalt an diesen Zuckerarten weit geringer, als man nach Analysen von Atkinson²⁾ hätte erwarten sollen. Letzterer fand nur Glucose, aber in Mengen

¹⁾ Aus der Differenz berechnet.

²⁾ Memoirs of the Science Departement, Tokio Daigaku (University of Tokio), Nr. 6, 1881, S. 5.

von 25,0 bzw. 58,1% der Trockensubstanz. Da er zur Zuckerbestimmung das frische Koji eine längere Zeit mit kaltem Wasser ausgelaugt zu haben scheint, so dürften seine Resultate wohl kaum die wirkliche Zusammensetzung jener Substanz angeben, sondern eine bedeutende Menge von Zucker einschliessen, der sich erst während der Extraction gebildet hat. In unseren Analysen war dieser Fehler dadurch vermieden worden, dass das frische Koji in kleinen Mengen nach einander in einen auf 105° C. erhitzten Trockenschrank eingetragen wurde.

Die Veränderungen, welche in dem gedämpften Korn durch den Pilz hervorgerufen worden, lassen sich am besten erkennen, wenn man berechnet, wie viel der einzelnen Koji-Bestandtheile aus 100 Theilen angewandter Trockensubstanz erhalten wurden. Die nachstehende Tabelle giebt hierüber Aufschluss:

	Reis - Koji.		Gersten - Koji.	
	Von 100 Th. Trocken- substanz des gedämpften mit Sporen ver- mischten Korn- s ging in das Koji über:	Mehr (-) oder weniger (-) als angewandt:	Von 100 Th. Trocken- substanz des gedämpften mit Sporen ver- mischten Korn- s ging in das Koji über:	Mehr (-) oder weniger (-) als angewandt:
Trockensubstanz	86,71	- 13,29	80,72	- 19,28
Rohprotein	7,78	- 0,03	10,43	- 0,36
Aetherextract	6,25	+ 4,02	3,81	+ 2,62
Rohfaser	1,39	+ 0,34	3,66	+ 2,14
Stärke, Dextrin etc.	61,54	- 26,43	52,17	- 32,46
Maltose	5,24	+ 5,24	8,90	+ 8,90
Glucose	3,53	+ 3,53	0,18	- 0,50
Asche	0,98	+ 0,04	1,57	+ 0,38
Gesamt-Stickstoff	1,245	- 0,004	1,668	- 0,058
Eiweiss-Stickstoff	1,080	- 0,147	1,427	- 0,194
Nicht-Eiweiss-Stickstoff	0,165	+ 0,143	0,241	+ 0,136

Der von dem Pilz verursachte Verlust an wasserfreier Substanz beläuft sich hiernach beim Reis auf 13,3, bei der Gerste auf 19,3% der gesammten angewandten Menge, welche

Zahlen indessen um ein Geringes zu niedrig sind, da bei der Umwandlung von Stärke und Dextrin in Maltose und Glucose, und vielleicht auch bei andern Vorgängen im Koji Wasser in die Constitution der Endproducte eintritt und so die Trockensubstanz etwas erhöht. An dem obigen Verlust theiligen sich in geringem Umfange gewiss auch die Eiweissstoffe, von denen nach unseren Analysen etwa 12% in einfachere Verbindungen, worunter etwas Ammoniak, zerlegt worden sind. — Die Menge des gebundenen Stickstoffs scheint sich nicht verändert zu haben, da die geringe Abnahme in dem Reis-Koji innerhalb der zulässigen Fehlergrenzen liegt und beim Gersten-Koji eher der mechanischen Bearbeitung als einer Verdampfung von Ammoniak oder Entbindung elementaren Stickstoffs zugeschrieben werden kann. — Das Aetherextract (Rohfett) weist, wie in allen gährenden oder sich zersetzenden organischen Substanzen eine beträchtliche Vermehrung auf, die zum Theil auf Rechnung neugebildeter organischer Säuren zu setzen ist. — Auch etwas Cellulose scheint neu entstanden und wohl für die Membranbildung verwandt worden zu sein. — Die kleine Zunahme an Asche ist auf die Zufuhr von Brunnenwasser zurückzuführen, welche während der Bereitung des Koji zweimal stattgefunden hatte.

Die Zersetzung betrifft hauptsächlich die Kohlehydrate, von denen im Ganzen aus dem Reis 17,66, aus der Gerste 24,06% verschwunden sind und ein anderer recht beträchtlicher Theil in Maltose, eine geringere Menge in Glucose übergeführt worden ist. Die letzteren Vorgänge bedingen auch die hohe Löslichkeit des Koji in Wasser, für welche unsere Analysen indessen nur relative Zahlen liefern konnten, da wir bei der Extraction Fermentwirkungen absichtlich nicht ausgeschlossen hatten.

Was nun die wirksamen Eigenschaften des Koji anbelangt, so ist es hier zu Lande seit Langem bekannt, dass diese Substanz Stärke in gährungsfähigen Zucker überführt, genauere

Untersuchungen hierüber wurden aber erst von R. W. Atkinson¹⁾ angestellt. Der Genannte scheint denn auch mit genügender Zuverlässigkeit festgestellt zu haben, dass das Koji ein in Wasser lösliches Ferment enthält, welches Rohrzucker invertirt und Maltose, Dextrin und Stärkekleister in Dextrose überführt. Gegen die Methoden Atkinson's, in welchen vorwiegend optische Hilfsmittel benützt worden sind, liesse sich nur anführen, dass er die frischen wässrigen Koji-Auszüge, welche noch viel Dextrin enthalten, nur vor ihrer Vermischung und Erwärmung mit den Lösungen der untersuchten Kohlehydrate gesondert chemisch prüfte und nicht, wie es wohl erforderlich gewesen wäre, Parallelversuche mit den reinen Koji-Auszügen ohne Zusatz veränderlicher Kohlehydrate ausführte, da in den gemischten Lösungen beim Erwärmen ja nicht blos die zugesetzten, sondern auch die im Koji-Extract vorhandenen Kohlehydrate (Dextrin, Maltose) von der Wirkung des Fermentes betroffen werden können. In den meisten Versuchen waren allerdings die Veränderungen des optischen Rotationsvermögens der gemischten Lösungen derartig bedeutend, dass sich dieselben nicht auf die Inversion der Bestandtheile der Koji-Auszüge allein zurückführen lassen. Gewichtigere Einwände müssen gegen die Versuche Atkinson's erhoben werden, durch die er festgestellt zu haben glaubt, dass Maltose unter den Producten der Einwirkung des Koji-Fermentes auf verkleisterte Stärke auftritt. Er bestimmte nämlich sowohl in dem frischen Koji-Extract, als in einer längere Zeit auf 40° C. erwärmten Mischung von Stärkekleister und obigem Extract das optische Drehungsvermögen und den Gehalt an festen Stoffen, letzteren durch das specifische Gewicht mit Hülfe des Divisors 3,86; ferner ermittelte er die reducirende Wirkung auf Fehling'sche Lösung und berechnete dann aus der Menge des reducirten Kupferoxydhydrats und dem Gehalt der Flüssigkeiten an Trockensubstanz (« starchy products») die Menge von Maltose und Dextrin

¹⁾ Loc. cit., S. 14, auch Transactions of the Chemical Society (London), 1881.

in dem Gemisch unter der Voraussetzung, dass diese die einzigen Producte der Fermentwirkung sind. «Wenn andere Stoffe nicht gebildet werden, dann muss, wie er annimmt, das spezifische Drehungsvermögen, welches sich aus dem so gefundenen Gehalt der Flüssigkeiten an Dextrin und Maltose berechnet, zusammenfallen mit der wirklich beobachteten Rotation.» Dieser indirecten Methode gegenüber ist einzuwenden, 1. dass die Bestimmungen der Kohlehydrate durch das spezifische Gewicht ihrer Lösungen, die ausserdem noch Asche und Stickstoffverbindungen enthalten, nicht zuverlässig sind: Koji-Auszüge enthalten in ihrer Trockensubstanz nach Atkinson bis zu 27% Rohprotein ($N \times 6,25$); 2. dass Koji-Auszüge selbst ihr Rotationsvermögen ändern, wenn sie erwärmt werden; 3. dass das spezifische Drehungsvermögen der Dextrine kein constantes ist, oder dass bis jetzt hierüber zuverlässige Zahlen, die sich zu quantitativen Bestimmungen verwerthen lassen, bis jetzt nicht vorliegen (Atkinson nimmt bei seinen Berechnungen für die Dextrine 216° für weisses Licht an); 4. dass das Koji-Ferment sehr energisch auf Maltose wirkt und deshalb auch Dextrose unter den Producten der Wirkung dieses Ferments auf Stärke zu erwarten ist. — Nach solchen schwer wiegenden Einwüfen kann man trotz der bewunderungswerthen Uebereinstimmung der wirklich beobachteten und auf obigem Wege berechneten Ergebnisse Atkinson's dessen Schluss, dass unter Umständen ausser Dextrin nur Maltose, und letztere überhaupt von dem Koji-Ferment aus Stärke gebildet wird, nicht zustimmen.

Wir haben deshalb die Wirkungsweise dieses Ferments von Neuem studirt und verschiedene Kohlehydrate in den Bereich unserer Untersuchungen gezogen. Hierbei schlugen wir im Allgemeinen folgenden Weg ein:

Die Lösungen der einzelnen Kohlehydrate wurden mit einem Extract vermischt, das bereitet wurde durch Digestion von 100 gr. frischem Koji mit 500 cbem. kaltem Wasser. Gewöhnlich wurden auf 200 cbem. ersterer Lösungen 100 cbem. frischer filtrirter Auszug verwendet. Diese Mischungen, nebst

einer ausreichenden Menge frischen Extracts wurden in verschlossenen Flaschen 2—3 Stunden lang auf 40—50° C. erwärmt und dann auf 22—23° C. abgekühlt. Vor und nach dem Erwärmen wurde das Rotationsvermögen der Flüssigkeiten bei gleicher Temperatur (22—23° C.) mit Hilfe eines Wild'schen Polaristrobometers von Hermann & Pfister ermittelt, wobei stets 200 Millimeter-Röhren und Natronlicht in Anwendung kamen. Die Lösungen derjenigen Kohlehydrate, welche Halb- oder Birotation zeigen, wurden erst nach 24stündigem Stehen zu den Versuchen benützt. Folgendes waren die Ergebnisse:

I. Rohrzucker, 150 ccm. mit 100 ccm. Koji-Extract.
Optische Drehungen:

Rohrzuckerlösung	+ 13,7°
Koji-Extract, frisch	+ 11,7°
» » nach dem Erwärmen	+ 11,5°
Mischung, nach dem Erwärmen	+ 5,5°

Hätte der Koji-Auszug auf den Rohrzucker nicht gewirkt, so hätte die Mischung nach dem Erwärmen eine Drehung von 12,8° zeigen müssen, wogegen 5,5° wirklich beobachtet wurden. Es hatte demnach Inversion stattgefunden, und wenn man annimmt, dass Dextrose und Lävulose in dem gewöhnlichen Verhältniss entstanden sind, so würde sich nach H. Landolt's¹⁾ Gleichung berechnen, dass etwa 70% des angewandten Rohrzuckers invertirt worden sind.

II. Milchzucker, 200 ccm. und 100 ccm. Koji-Extract. Optische Drehungen:

Milchzuckerlösung	+ 12,7°
Koji-Extract, frisch	+ 10,3°
» » nach dem Erwärmen	+ 9,9°
Mischung, nach dem Erwärmen	+ 11,9°

Unter der Annahme, dass das Ferment auf den Milchzucker nicht eingewirkt habe, würde sich die optische Rotation

¹⁾ Berichte der Königl. Preuss. Akademie der Wissenschaften. 1887. 2. Halbbd., S. 980.

der Mischung nach dem Erwärmen auf $11,8^{\circ}$ berechnen, was in der That mit der wirklichen Beobachtung fast genau zusammenfällt.

III. Maltose, mit Koji-Extract in demselben Verhältniss gemischt, wie unter No. II. Optische Drehungen:

Maltoselösung	+ 13,0°.
Koji-Extract, frisch	+ 10,3°.
» nach dem Erwärmen	+ 9,9°.
Mischung, nach dem Erwärmen	+ 8,4°.

Auf Grund dieser Zahlen lässt sich berechnen, dass über 70% der angewandten Maltose in Dextrose übergeführt worden sind.

IV. Inulin, mit Koji-Extract in demselben Verhältniss gemischt, wie unter No. II. Optische Drehungen:

Inulinlösung	- 2,8°.
Koji-Extract, frisch	+ 8,2°.
» nach dem Erwärmen	+ 7,7°.
Mischung, nach dem Erwärmen	+ 0,5°.

Wenn man die optische Drehung abzieht, welche das Koji allein nach dem Erwärmen in der Mischung verursacht, so findet man für das Inulin vor der Einwirkung des Ferments $-1,9^{\circ}$, nach derselben $-2,1^{\circ}$. Da der Unterschied zwischen diesen beiden Zahlen innerhalb der zulässigen Beobachtungsfehler liegt, so darf man schliessen, dass das Inulin von dem Koji-Ferment sehr wahrscheinlich nicht verändert wird.

V. Stärke. In diesem Versuch wurden 100 gr. reine Stärke in 1,5 l. Wasser verkleistert, auf 40° C. abgekühlt und mit 500 cbcm. eines aus 25 gr. frischem Koji bereiteten Auszuges, der auf die gleiche Temperatur erwärmt worden war, vermischt. Nachdem das Gemisch 25 Minuten auf 40° gehalten worden war, wurde es rasch zum Sieden erhitzt und darauf zu einem dicken Syrup eingedampft, welcher zur Abscheidung des Dextrins und der unveränderten Stärke mit starkem Weingeist extrahirt wurde. Das Extract wurde vom

Weingeist befreit, nochmals mit starkem (95%) Alkohol ausgezogen und die Lösung zum Syrup eingedampft, welcher dann in Wasser gelöst, mit Thierkohle entfärbt, auf ein kleines Volumen gebracht und zur Krystallisation aufgestellt wurde. Da der Syrup aber selbst nach mehreren Wochen unverändert blieb, so wurde derselbe direct untersucht. Wir bestimmten in einer 10procentigen Lösung das optische Drehungsvermögen und die reducirende Wirkung auf Fehling'sche Lösung vor und nach der Inversion mit Salzsäure unter Einhaltung der von Soxhlet gegebenen Vorschriften. Hierbei wurden folgende Zahlen erhalten:

	Vor der Inversion:	Nach der Inversion:
Reducirender Zucker, als Dextrose berechnet	4,04%	7,46%
Optische Drehung	20,9"	8,4"

Wenn man annimmt, dass die reducirende Wirkung vor der Inversion nur der Gegenwart von Maltose zuzuschreiben ist, so hätten nach der Inversion 6,97% Dextrose gefunden werden müssen, wogegen 7,46%, also ein Plus von 0,49%, wirklich ermittelt wurden. Dieser Umstand lässt erkennen, dass in dem ursprünglichen Syrup noch eine Substanz vorhanden war, die eine geringere Wirkung auf die Kupferlösung ausübte als Maltose. Wahrscheinlich enthielt der Syrup also noch etwas Dextrin, und unter der Annahme, dass die 0,49% Dextrose aus Dextrin gebildet worden sind, würden sich für die Zusammensetzung der Syrup-Lösung folgende Werthe berechnen:

	Vor der Inversion:	Nach der Inversion:
6,62% Maltose, mit einer Rotation von . . .	18,3"	} 7,9"
0,45% Dextrin.	1,8"	
Zusammen	20,1"	
Wirklich beobachtet	20,9"	8,8"

Die nahe Uebereinstimmung zwischen dem berechneten und wirklich gefundenen Drehungsvermögen der Lösung unterstützt in der That die Annahme, dass der Syrup neben etwas Dextrin hauptsächlich Maltose enthielt; der Unterschied

der Drehungen lag sowohl vor als nach der Inversion in derselben Höhe ($0,8—0,9''$) und scheint verursacht worden zu sein durch eine optisch active nicht reducirende Substanz, die durch Salzsäure nicht verändert wurde. Glucose war in dem Syrup anscheinend nicht vorhanden.

Obwohl der eben beschriebene Versuch mit grosser Wahrscheinlichkeit andeutet, dass das Koji-Ferment Maltose aus Stärke zu bilden vermag, schien uns derselbe doch nicht genügende Beweiskraft zu besitzen. Wir wiederholten denselben deshalb mit gereinigtem Ferment, das dargestellt wurde aus 500 gr. frischem Koji durch Extraction mit Glycerin und Fällung mit absolutem Alkohol, dem etwas Aether zugesetzt war. Nach wiederholtem Auflösen in Wasser und Fällen mit Alkohol stellte das Ferment eine nahezu weisse, gelatinöse Masse dar, welche Eiweissreaction zeigte und auf Stärkekleister kräftig einwirkte. Die wässrige Lösung dieses Ferments wurde vorsichtig auf 40° C. erwärmt und vermischt mit Stärkekleister von derselben Temperatur, der aus 250 gr. reiner Stärke und 4 l. Wasser bereitet war. Die Mischung wurde während 3 Stunden auf $40—50^{\circ}$ C. erhalten und dann bis zum nächsten Tage stehen gelassen. Sie wurde dann zum Syrup verdunstet, noch warm mit dem 9fachen Volumen absoluten Alkohols vermischt, decantirt und wiederholt mit Alkohol derselben Stärke ausgekocht. Die vereinigten Extracte wurden vom Alkohol befreit, auf ein kleines Volumen gebracht und in der Kälte zweimal mit 95 procentigem Weingeist ausgezogen. Der Rückstand wurde in Wasser gelöst, mit gereinigter Thierkohle entfärbt, verdunstet, mit etwas starkem Weingeist versetzt und zur Krystallisation aufgestellt. Nach einigen Wochen hatte sich der Syrup in rein weisse harte krystallinische Krusten verwandelt, deren Menge (etwa 50 gr.) leider so gering war, dass es nicht rathsam erschien, dieselbe umzukrystallisiren. Wir ermittelten deshalb wiederum in einer 7,5 procentigen Lösung der krystallinischen Masse die reducirende Wirkung auf Kupferlösung und die optische Drehung vor und nach der Inversion mit Salzsäure. Folgendes waren die Resultate:

	Vor der Inversion:	Nach der Inversion:
Reducirender Zucker, als Dextrose berechnet	5,008 %	7,318 %
Optische Drehung	17,1"	8,0"

Unter der Annahme, dass nur Maltose und Dextrose vorhanden waren, berechnet sich der Gehalt der Lösung und die Rotation, wie folgt:

	Vor der Inversion:	Nach der Inversion:
Maltose 5,214 % mit einer Drehung von	15,2"	7,7"
Dextrose 1,827 %	1,9"	
Zusammen	17,1"	7,7"
Wirklich beobachtet	16,9"	8,0"

In dieser nahen Uebereinstimmung zwischen dem aus der Analyse berechneten und dem wirklich beobachteten Drehungsvermögen liegt ein zuverlässiger Beweis dafür, dass das Ferment des Koji aus verkleisterter Stärke Maltose und Dextrose zu bilden vermag.

Das Verhalten unseres krystallinischen Products zu salzsaurem Phenylhydrazin und essigsaurem Natron lieferte eine weitere Stütze für obigen Schluss: Von den Hydrazinverbindungen, welche nach den Vorschriften von E. Fischer dargestellt worden waren, löste sich ein Theil leicht in heissem Wasser und schied sich beim Erkalten wieder aus, wogegen ein anderer Theil von Wasser nur schwer, leicht aber von 90procentigem Alkohol aufgenommen wurde.

Da das Ferment des Koji, wie wir oben gezeigt haben, auch Maltose in Dextrose überzuführen im Stande ist, so lässt sich erwarten, dass bei längerer Einwirkung und grossem Ueberschuss des Ferments Maltose unter den aus Stärke erzeugten Zuckerarten nicht mehr aufzufinden sein wird.

Aus unseren Untersuchungen kann man schliessen, dass das Koji ein kräftig invertirendes Ferment enthält, welches Rohrzucker in Dextrose und Lävulose, Maltose in Dextrose, und Stärke in Dextrin, Maltose und Dextrose verwandelt, wogegen Milchzucker und wahrscheinlich auch Inulin von dem-

selben nicht verändert werden. Von der Diastase des Malzes ist somit das Koji-Ferment gänzlich verschieden und wahrscheinlich auch von dem Invertin der Bierhefe, welches zwar Rohrzucker mit Leichtigkeit invertirt, auf Dextrin und Maltose indessen nach M. J. Kjeldahl¹⁾ keine Wirkung äussert. Da aber die invertirenden Eigenschaften des Invertins meines Wissens bis jetzt einer einheitlichen Untersuchung noch nicht unterworfen und zumeist nur bei niederen Temperaturen studirt worden sind, so haben wir es von Interesse gehalten, die Wirksamkeit desselben, in Vergleich zu der des Koji-Ferments, auf verschiedene Kohlehydrate zu verfolgen.

Zu diesem Zweck wurden etwa 300 gr. frische, sehr reine Unterhefe mit Glasstücken zerrieben, mit Wasser extrahirt und die Auszüge durch Asbest filtrirt. Die Gesamtmenge des Extracts betrug $\frac{1}{2}$ Liter. Dasselbe wurde sofort zu den Versuchen benutzt, indem auf 2 Volumtheile der Lösung eines jeden Kohlehydrats 1 Volumtheil Hefeextract angewandt und die Mischungen drei Stunden auf 40—50° C. erwärmt wurden. Sämmtliche Versuche wurden gleichzeitig ausgeführt. Das Hefeextract zeigte vor dem Erwärmen +1,6°, nach demselben +1,0° im 200 Millimeter-Rohr. Die einzelnen Versuche waren folgende:

1. Rohrzucker. Optisches Rotationsvermögen:

Zuckerlösung allein	+ 12,9°
Gemisch von Zuckerlösung und Hefeextract, erwärmt	— 2,4°

In Uebereinstimmung mit den Ergebnissen F. Hoppe-Seyler's²⁾ und M. Barth's³⁾ zeigte das Invertin eine sehr kräftige Wirkung. In unserem Versuch war der ganze Rohrzucker invertirt worden.

¹⁾ Biedermann's Centralbl. f. Agriculturchemie, 11. Bd., 1882, S. 791.

²⁾ Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch., 4. Bd., S. 810.

³⁾ Ebendasselbst, 11. Bd., S. 474.

III. Milchzucker. Optische Drehung:

Zuckerlösung allein	+ 12,7°.
Zuckerlösung und Hefeextract, nach dem Erwärmen	+ 9,0°.

Bei völliger Wirkungslosigkeit des Hefeextracts auf den Milchzucker war nach dem Erwärmen eine Drehung von + 8,8° zu erwarten, welche mit der beobachteten Rotation (+ 9,0°) so nahe zusammenfällt, dass dem Invertin eine Wirkung auf den Milchzucker abgesprochen werden muss.

III. Maltose. Optische Drehung:

Maltose allein	+ 13,0°.
Maltose und Hefeextract, nach dem Erwärmen	9,2°.

Auch hier blieb das Invertin wirkungslos, indem 9,0°, statt der wirklich beobachteten 9,2°, hätten gefunden werden sollen, wenn die Maltose nicht verändert wurde.

IV. Inulin. Optische Drehung:

Inulinlösung allein	- 2,8°.
Inulinlösung und Hefeextract, nach dem Erwärmen	- 1,5°.

Das Inulin war ebenfalls unverändert geblieben, da die beobachtete Drehung (- 1,5°) sich mit der unter der Annahme der Wirkungslosigkeit des Ferments berechneten Rotation zufällig genau deckt¹⁾.

V. Stärke. Hierzu wurde das Invertin aus dem Hefeextract durch starken Alkohol niedergeschlagen und durch wiederholtes Auflösen in Wasser und Fällen mit Alkohol von etwa anhaftenden reducirenden Zuckerarten befreit. Die wässrige Lösung des so gereinigten Ferments gab mit Fehling'scher Lösung zwar eine geringe Menge eines flockigen Niederschlages, reducirte aber keine Spur des Kupferoxyd-

¹⁾ Zu demselben Ergebniss gelangte Kiliani (Chem. Centralbl., 1882, S. 414).

hydrats. Auch die Stärke wurde vor ihrer Verkleisterung von etwa beigemengtem Zucker durch Auskochen mit starkem Alkohol befreit. Nach mehrstündigem Erhitzen der Gemische von Stärkekleister und Fermentlösung auf 45° C. zeigte sich bei wiederholten Versuchen niemals eine Reduction der Fehling'schen Lösung, sondern nur flockige Ausscheidungen, und auch den eingedampften Gemischen konnten wir durch Auskochen mit 60procentigem Alkohol keine bemerkbare Spur einer reducirenden Substanz entziehen. Das Invertin übt demnach auf verkleisterte Stärke keine Wirkung aus.

Die beiden der Untersuchung unterworfenen Fermente stimmen also hinsichtlich ihrer Wirkung auf Rohrzucker überein. Milchzucker, Inulin, Maltose und Stärke bleiben unter dem Einflusse des Invertins unverändert, während die beiden letzteren Kohlehydrate von dem Ferment des Koji hydratisirt werden. Unter den bis jetzt bekannten invertirenden Fermenten scheint also das des Koji die kräftigste Wirkung zu äussern. Wir wollen dasselbe vorläufig mit dem Namen «Invertase» bezeichnen, müssen aber einstweilen dahingestellt sein lassen, ob dasselbe ein einheitlicher Körper ist oder etwa aus mehreren Fermenten besteht. Auch wollen wir nicht behaupten, dass die Invertase nur von *Eurotium Oryzae* Ahlbg. erzeugt wird, sondern neigen zu der Ansicht, dass auch andere Pilze derselben oder verwandter Ordnungen jenes Ferment zu bilden vermögen.

Wenn das Koji in Räumen mit mangelhafter Ventilation oder in grösseren Haufen aufbewahrt wird, dann verliert die Invertase theilweise oder ganz ihre Wirksamkeit, wahrscheinlich in Folge von Säurebildung. Da dieser Umstand nun für praktische Verhältnisse von Bedeutung ist, so haben wir, nachdem von uns die Anhäufung von Milchsäure in schlecht gelüftetem Koji nachgewiesen worden war, einige Untersuchungen über den Einfluss dieser Säure auf die Inversion des Rohrzuckers durch das genannte Ferment angestellt.

Gleiche Volumina einer 10procentigen Rohrzuckerlösung (je 100 cbcm.) wurden mit verschiedenen Mengen Milchsäure, die auf gleiche Raumtheile (je 50 cbcm.) verdünnt waren, versetzt und darauf frisches Koji-Extract (je 50 cbcm.) zugefügt. Die Mischungen wurden 2 Stunden lang in ein Wasserbad von 40—45° eingesenkt, darauf auf gleiche Temperatur abgekühlt und im Polaristrobometer in 200 mm. langen Röhren untersucht, wobei nachstehende Ergebnisse erlangt wurden:

Mischungen in „	0	0,25	0,50	0,75	1,0.
Optische Drehung nach dem Erwärmen. „ Wild	6,6°	8,2°	8,5°	8,7°	8,7°.

In 4 anderen Mischungen mit 1,25 — 1,5 — 2,0 und 2,5% Milchsäure betrug die Drehung überall 8,7°.

Nach vorstehenden Zahlen hatte schon die geringste von uns angewandte Säuremenge (0,25%) ausgereicht, die Wirkung des Ferments abzuschwächen, und ein Gehalt von 0,75% Säure hob die Inversion wahrscheinlich ganz auf. Indessen äusserte sich die Invertase vielleicht in Folge zu kurzer Extractionsdauer bei der Bereitung des Auszuges überhaupt nur sehr schwach, weshalb wir eine zweite Reihe von Versuchen mit frisch dargestellten Koji-Extracten ausführten. Folgende Mischungen wurden dazu benützt:

1. 50 cbcm. Koji-Extract + 150 cbcm. Wasser;
2. 50 cbcm. Koji-Extract + 50 cbcm. Milchsäure-Lösung + 50 cbcm. Wasser;
3. 100 cbcm. Zuckerlösung + 100 cbcm. Wasser;
4. 100 cbcm. Zuckerlösung + 50 cbcm. Wasser + 50 cbcm. Milchsäure-Lösung;
5. 100 cbcm. Zuckerlösung + 50 cbcm. Wasser + 50 cbcm. Koji-Extract;
- 6—14. 100 cbcm. Zuckerlösung + 50 cbcm. Milchsäure + 50 cbcm. Koji-Extract.

1) Auch in dieser Reihe war die Fermentlösung den Mischungen stets zuletzt einverleibt worden.

Nach 2 $\frac{1}{2}$ -stündigem Verweilen in einem Wasserbade von 40–45° C. wurden die Mischungen auf 20° C. rasch abgekühlt und im Polaristrobometer mit nachstehenden Resultaten untersucht:

Nr.	Bezeichnung der Gegenstände.	Gehalt an Milch- säure.	Optische Drehung.	Rohr- zucker inver- tirt.	Relative Wirkung. (Die inver- tirt. Menge in Versuch 5 gleich 100 gesetzt.)
		o/o	o Wild.	gr.	
1	Koji-Extract allein	—	2,05	—	—
2	Koji-Extract + Milchsäure	0,5	1,55	—	—
3	Rohrzucker allein	—	6,85	—	—
4	Rohrzucker + Milchsäure	2,0	6,8	0	—
5	Rohrzucker + Koji-Extract	—	5,5	1,94	100
6	Rohrzucker + Koji-Extract + Milchsäure	0,05	4,6	2,46	127
7	do. do.	0,10	6,3	1,485	77
8	do. do.	0,20	7,8	0,63	32
9	do. do.	0,30	7,9	0,56	29
10	do. do.	0,40	8,2	0,40	21
11	do. do.	0,50	8,2	0,40	21
12	do. do.	0,60	8,3	0,34	18
13	do. do.	0,70	8,4	0,29	15
14	do. do.	0,80	8,5	0,23	12

Da die Milchsäure in einem besonderen Versuch sich als optisch unwirksam erwies und an sich allein eine Inversion des Rohrzuckers in obigen Mischungen (vgl. Versuch 3 und 4) nicht vollzog, so lässt sich nach den Ergebnissen der Versuche 7—14 schliessen, dass die freie Milchsäure in Mengen von 0,1% und darüber die Wirkung der Invertase allmählig abschwächt. Im Gegensatz hierzu übte die geringe Menge von 0,05% im Versuch 6 einen günstigen Einfluss auf die Inversion aus, eine Erscheinung, die ein Seitenstück an einer Beobachtung Kjeldahl's¹⁾ findet, nach welcher Malzdiastase die kräftigste Wirkung in sehr schwach sauren Flüssigkeiten äussert, in stark sauren Lösungen aber wirkungs-

¹⁾ Maercker, Handb. der Spiritusfabrikation, 1880, S. 36.

los ist und auch bei neutraler Reaction Stärke kaum oder gar nicht umwandelt.

Die in obiger Tabelle in der letzten Spalte berechneten Zahlen für die relative Wirkung der Invertase sind noch einer Correctur bedürftig, insofern als nach den Versuchen 1 und 2 das Drehungsvermögen des Koji-Extracts selbst durch die Milchsäure etwas vermindert wurde. Zieht man dies in Betracht, so stellt sich heraus, dass durch die Gegenwart von 0,6—0,7% Milchsäure die Inversion des Rohrzuckers gänzlich aufgehoben wird.

In einem weiteren Versuch, in welchem Rohrzucker und Koji-Extract in einer Lösung, die 2% Milchsäure enthielt, 2½ Stunden lang auf 40—45° C. erwärmt worden war, neutralisirten wir die Flüssigkeit mit verdünnter Natronlauge bis auf eine ganz schwach saure Reaction und erwärmten nochmals in der früheren Weise. Die Invertase blieb indessen unwirksam.

Koji wird ferner häufig in Mischung mit beträchtlichen Mengen Kochsalz, gedämpften Sojabohnen und anderen Stoffen zur Darstellung eines in Japan sehr weit verbreiteten Nahrungsmittels (Miso) und einer auch in Europa bekannten Sauce (Shoyu) verwendet und scheint hierbei hauptsächlich als Träger einer sehr langsamen, oft Jahre langen Gährung zu wirken. Da nun Miso 6—12% und Shoyu 150—160 gr. Kochsalz pro Liter enthalten und dieses Salz die Wirkung löslicher Fermente hemmt, so haben wir untersucht, wie sich die Umwandlung gelöster Stärke durch Invertase in Gegenwart verschiedener Mengen Kochsalz verhält.

Lösungen von 20 gr. lufttrockener Stärke pro Liter, welche nach den Angaben von Lintner jun. dargestellt waren und Fehling'sche Flüssigkeit nicht reducirten, wurden mit Kochsalz versetzt und frisch bereitetes Koji-Extract hinzugefügt. Die Mischungen, 200 ccm. Stärkelösung und 45 ccm. Koji-Extract nebst dem zugesetzten Kochsalz auf 300 ccm. verdünnt, wurden 2 Stunden lang auf 40° C. erwärmt, ab-

gekühlt und mit Fehling'scher Lösung titirt. Zwei Versuche, die mit Koji von guter Wirksamkeit und verschiedenem Ursprung ausgeführt wurden, ergaben Folgendes:

Versuch A.

Kochsalz in ‰ der Mischung:	Reducirender Zucker, als Dextrose berechnet:	Relative Wirkung der Invertase:
0	0,612 ‰	100
2	0,357 ‰	58,3
6	0,159 ‰	26,0
12	0,024 ‰	4,0
20	0,010 ‰	1,6

Versuch B.

0	0,444 ‰	100
2	0,223 ‰	50,2
4	0,155 ‰	34,9
10	0,054 ‰	12,2
15	0,040 ‰	9,0
20	0,033 ‰	7,7

Die Invertase ist hiernach sehr empfindlich gegen Beimischungen von Kochsalz zu ihren Lösungen, aber die saccharificirende Wirkung wird selbst durch die Gegenwart von 15—20 ‰ Kochsalz nicht gänzlich aufgehoben¹⁾.

Tokio, den 12. September 1889.

¹⁾ Nach Untersuchungen von O. Nasse (Archiv f. d. ges. Physiologie, 11. Bd., 1875, S. 156) wird die Wirkung der Malzdiastase, wenn dieselbe in salzfreien Lösungen = 100 gesetzt wird, durch die Anwesenheit von 4 ‰ Kochsalz bis auf 53 vermindert.