

**Untersuchungen über die niederen Organismen  
welche sich bei der Zubereitung des alkoholischen  
Getränkes „Awamori“ betheiligen.**

VON

**T. Inui, *Rigakushi.***

---

*Mit Tafel XXII.*

---

Ein stark alkoholhaltiges, dem Whisky ähnliches Getränk „Awamori“<sup>1)</sup> wird schon seit vielen Jahren auf den Luchu Inseln<sup>2)</sup> hergestellt, wo dasselbe einen wichtigen Handelsartikel bildet. Obgleich eine authentische Angabe über die Zeit fehlt, in welcher dieses Getränk zum ersten Male dort gebraut wurde, so ist doch wahrscheinlich, dass man die Braumethode vor ca. 500 Jahren von Chinesen lernte und bei Izumisaki, einer Abtheilung der Stadt Nawa, die Herstellung versucht wurde. Gegenwärtig bildet die Stadt Shuri den Hauptsitz der Awamorifabrikation.

---

1) „Awamori“ bedeutet Schaumwein.

2) Luchu ist eine Insel-Gruppe welche zwischen Formosa und den Kiushu-Inseln liegt.

### Braumethode.

Die Braumethode des „Awamori“ besteht aus drei Operationen :

- 1) Die Bereitung des „Koji.“
- 2) Die Darstellung des „Moromi.“
- 3) Die Destillation.

1) Die Bereitung des „Koji.“—Ebenso wie beim „Sake“ so ist auch beim „Awamori“ Koji eine durch Vegetation eines Pilzes auf gekochtem Reis gebildete Masse. Der im Awamori-Koji befindliche Fadenpilz ist aber von demjenigen des Sake-Koji verschieden und besonders durch seine schwarzen Sporen ausgezeichnet.

Die Technik der Kojizubereitung ist folgende : man wäscht zunächst 82 Liter geschälten Reises, lässt ihn 12–15 Stunden in Wasser liegen, wäscht noch mehrere Male und dämpft ihm dann 3–4 Stunden, worauf er in eine Kojihütte gebracht, und auf Strohmatte ausgebreitet wird. Sodann nimmt man eine kleine Menge dieser Reismasse, mischt sie, wenn sie sich bis 60°–70°C<sup>1)</sup> abgekühlt hat, mit 2 Deciliter Tanekoji<sup>2)</sup> und dieses wieder mit dem übrigen Reis.

Wenn der gekochte Reis sich abkühlt und eine Temperatur von ca 30°C erreicht, bedeckt man ihn mit Strohmatte, um ihn von weiterer Abkühlung zu schützen und ihn möglichst feucht zu halten. Nach 12 Stunden ist die Mycelentwicklung zu sehen und

---

1) Obgleich diese Temperatur der Erhaltung des Lebens der Sporen ungünstig zu sein scheint, überleben doch in Wirklichkeit die meisten Sporen da der gekochte Reis sehr rasch sich abkühlt. Experimentell habe ich sogar gefunden, dass die Sporen dieses Pilzes gegen die Wärme sehr resistent sind. Darüber wird bald die Rede sein.

2) „Tane-koji“ ist nicht anders als auf Hirse kultiviertes Sporen tragendes Mycel.

die Temperatur steigt bis 29°C (bei 27°C Lufttemperatur). Nach Verlauf des ersten Tages steigt die Temperatur des Koji bis 32°C und einige schwärzlichen Sporangien werden sichtbar. Am dritten Tage ist der Höhepunkt der Pilzentwicklung erreicht und die Temperatur des Koji ist ca 34°C. Dann nimmt man die Matten fort und lässt die Temperatur nicht weiter steigen, was für die Beschaffenheit des Koji schädlich wäre. Am 4ten Tage werden die Hyphen gänzlich reif, die Oberfläche des Koji bedeckt sich mit schwarzen Sporen und die einzelnen Reiskörner werden nun von den Hyphen mit einander zu zahlreichen Klümpchen verbunden.

Die Entwicklung der Hyphen auf Awamori-Koji ist nicht so üppig wie beim Sake-koji, da die dort benützten Räumlichkeiten viel Feuchtigkeit entweichen lassen. Sinkt die Lufttemperatur bis zu 12°–13°C, so entwickeln sich die Hyphen nur langsam und das Koji wird erst nach 15–16 Tagen fertig.

2) Die Darstellung des „Moromi.“—Man giebt 82 Liter Koji in einem Bottich mit 73 Liter Wasser und 4 Deciliter „Tane-Moromi“ (schon in Gärung begriffene Kojimasse) und bedeckt diese Mischung mit einem grossen Deckel. Nach 3 Stunden zeigt sich bereits die Gärung durch CO<sub>2</sub>-Gas Entwicklung an. Jetzt steigt die Temperatur im Bottich allmählich und übertrifft die der Luft. Am dritten Tage erreicht die Gärung den höchsten Punkt, wobei die Temperatur der Gärmasse manchmal 34°C erreicht. Nun sinkt die Temperatur wieder, und am 8 ten Tage hat sie gleiche Höhe wie die der umgebenden Luft. Bei allzu niedriger Temperatur verläuft der Gärungsvorgang nur langsam und die Reife des Moromi braucht eine lange Zeit.

Folgende zwei Tabellen entnehme ich aus meinen Beobacht-

ungen, um die täglichen Schwankungen der Temperatur im Bottiche zu veranschaulichen.

Tabelle I.

(Bei 27°C Lufttemperatur.)

1 sten Tag	28° C.	11 ten Tag	23°.5 C.
2 ten Tag	29° „	12 „ „	24°.0 „
3 „ „	32° „	13 „ „	23°.5 „
4 „ „	30° „	14 „ „	23°.8 „
5 „ „	29° „	15 „ „	23°.5 „
7 „ „	27° „	16 „ „	23°.5 „
6 „ „	27° „	17 „ „	23°.8 „
8 „ „	24° „	18 „ „	23°.8 „
9 „ „	24° „	19 „ „	23°.5 „
10 „ „	23° „	20 „ „	23°.5 „

Tabelle II.

(Bei 21°C Lufttemperatur.)

1 sten Tag	22° C.	11 ten Tag	17°.8 C.
2 ten Tag	24° „	12 „ „	17°.5 „
3 „ „	24°.5 „	13 „ „	17°.5 „
4 „ „	24°.0 „	14 „ „	17°.8 „
5 „ „	23°.0 „	15 „ „	17°.8 „
6 „ „	23°.0 „	16 „ „	17°.5 „
7 „ „	21°.5 „	17 „ „	17°.8 „
8 „ „	18°.5 „	18 „ „	17°.5 „
9 „ „	18°.0 „	19 „ „	17°.0 „
10 „ „	17°.5 „	20 „ „	17°.0 „

Erst nach 17 oder 18 Tagen im Sommer und nach 30 Tagen im Winter unterwirft man den Bottich-Inhalt der Destillation.

3) Die Destillation.—Die Destillation wird sehr einfach ausgeführt und braucht hier nicht geschildert zu werden. Zu dem Destillate setzt man nun geröstete Hirse, welche man lange Zeit darin liegen lässt, wodurch bewirkt wird, dass der „Awamori“

beim Ausgiessen eine lebhafte Schaumbildung zeigt, was eine Eigenthümlichkeit des Getränkes ist.

## 2. Die Fadenpilze im Awamori-Koji.

### 1) *Aspergillus luchuensis* nov. sp.

Dies ist der wichtige Fadenpilz, durch dessen schwarze Sporen dem Koji sein charakteristisches Aussehen verliehen wird. Er ist in reinem Koji stets vorhanden und bedingt die Verzuckerung bei der Herstellung des „Moromi.“ Alle anderen Fadenpilze, die sich oft in Koji vorfinden, sind nur zufällige Vorkommnisse.

Morphologie:—Auf festen sowie in flüssigen Substraten bildet unser Pilz einen dichten verfilzten Rasen, auf welchem schon nach einigen Tagen zahlreiche, vertical emporsteigende, kurze, weisse Konidienträger erscheinen. Bald darauf bilden sie weisse Köpfchen, die sich dann allmählich vergrössern und zugleich bräunlich färben. Nach etwa 3 Tagen werden sie schwarzbraun und die Konidienträger verlängern sich bis 2–2.5 cm, deren dickwandige, feste, farblose Stiele noch ganz glatte, kugelige, schwarzbraune Köpfchen tragen. Später nimmt die Oberfläche des Köpfchens ein durch massenhaftes Anwachsen der Sporenmenge bedingtes unregelmässiges Aussehen an. Der junge Konidienträger wird sehr leicht mit blossem Auge in seiner Form erkannt, wie es auch bei *Aspergillus Wentii*,<sup>1)</sup> und *Aspergillus glaucus* der Fall ist. Auf geköchotem Reis gedeihen die Hyphen üppig und erzeugen reichlich Mycel. Man findet aber darin nicht die langen, verzweigten, aufsteigenden Hyphen, wie man sie beim *Asp. Wentii* sieht. Der Mycelfaden erreicht manchmal 8  $\mu$  Dicke, die Wand ist dünn,

1) Wehmer, Centralbl. f. Bakt. Bd. II. p. 140.

verzweigt sich an verschiedenen Stellen und zeigt mehrmals Querteilung.

Die Hyphen, welche über zwei Monate lang auf festen Substraten gehalten wurden, zeigen lokale Anschwellungen, indem das Plasma allmählich sich an gewissen Stellen ansammelt und dabei ein granuliertes Aussehen gewinnt. Hier entsteht die Scheidewand und ein kugeliges Gemma. Die Blase ist gewöhnlich kugelig, selten kolbenförmig und steht auf dem Stiele senkrecht wie bei *Asp. Wentii*. Nach dem Abfalle der Sterigmen zeigt die Blasenoberfläche vielen polygonale Vertiefungen.

Die Stielmembran ist glatt, 1–3  $\mu$  dick, farblos, nur bei alter Kultur wird sie braun. Auf der Blase stehen zahlreiche, radial ausstrahlende Sterigmen dicht an einander, und erzeugen Konidienketten an der Spitze. Die Sterigmen sind länger als bei den anderen Arten, und haben eine Länge von  $\frac{1}{2}$ – $\frac{1}{3}$  Blasendurchmesser. In Gestalt und Grösse sind alle Konidien fast gleichmässig, sie sind 4–5  $\mu$  gross, fein warzig und kugelig. Elliptische Konidien wie bei *Asp. Wentii* und bei *Asp. Oryzae* kommen hier niemals vor. Perithezien konnte ich weder auf flüssigem noch auf festem Boden beobachten.

Physiologie: –30°C–35°C ist die Optimumtemperatur für die Entwicklung der Hyphen. Bei 15°C vegetiert der Pilz sehr langsam; und bei 12°C geht keine Sprossung mehr vor sich. Der beste flüssige Nährboden scheint das Koji-Extract zu sein; gut ist auch die mit 1% Trauben- oder Rohrzucker zugesetzte Raulin'sche Nährlösung, in welcher die Konidien schon nach 24 Stunden bei 25°–28°C sprossen können. In Bierwürze gedeihen die Hyphen ebenfalls üppig und bilden Konidien erst nach 20 Tagen. Unter den festen Nährböden ist der gekochte Reis am günstigsten. Brod, Würzelatine, Fleischpeptonelatine mit Zucker, Zucker

Gelatine mit Nährsalzen sind ebenfalls gut. Auf festen Nährböden geht im Allgemeinen die Entwicklung der Hyphen sehr rasch von statten und der Konidienträger wird auch früher gebildet als in flüssigen.

In Stärkekleister, welcher ausser 2% Kartoffelstärke noch die nöthigen Salze enthält, findet Verzuckerung nur langsam statt. Die Gelatineverflüssigung ist bedeutend; bei schiefer Kultur ist die erste Verflüssigung schon nach 4 Tagen wahrnehmbar, und nach 30 Tagen vollständig.

In Bezug auf die Widerstandfähigkeit der Sporen gegen höhere Temperatur habe ich einige Versuche angestellt und gelangte zu folgendem Resultate; bei 1-stündlichem Erwärmen auf 60°C behielten die Sporen noch ihre Keimfähigkeit, während nach ebenso langen Verbleiben bei 70°C die Keimung nicht mehr stattfand. Ein kleiner Theil der Sporen zeigte aber Entwicklung, wenn dieselben bei 70°C nur eine halbe Stunde lang erhitzt worden waren. Somit besitzt unser Pilz einen hohen Grad von Resistenz gegen Wärme.

Was die Sprossungsschnelligkeit der Konidien betrifft, so konnten wir keinen Unterschied zwischen der jüngeren Kultur und der über 2 Monate älteren Kultur beobachten. In Bierwürze entstehen die Hefe-Gemmen nicht und tritt keine Gärung ein.

Vergleich mit ähnlichen Arten:—*Aspergillus Wentii* Wehmer, welcher mit der vorstehenden Art viele Aehnlichkeit besitzt, unterscheidet sich dadurch, dass er bei Reagenzglaskultur aufwärts emporwächst und verzweigte Hyphen bildet, während *A. luchuensis*, wie *A. Oryzae*, auf der Kulturfläche viel kürzere Luftmycelien entwickelt. Ausserdem bleiben die Hyphen des *A. luchuensis* das ganze Entwicklungsstadium hindurch farblos.

Was die Farbe der Konidien betrifft, so verändert sie sich bei

*A. Wentii* von grüngelb zu bräunlichgelb, bei *A. luchuensis* dagegen von weiss zu dunkelbraun und schwarzbraun. *A. Wentii* produciert oft elliptische Konidien, während *A. luchuensis* nur rundliche. Hinsichtlich der Optimumtemperatur für die Hyphen-Entwicklung existiert ebenfalls ein grosser Unterschied zwischen den beiden Arten. Nach Wehmer<sup>1)</sup> wächst *A. Wentii* bei 13°–18°C am besten, trotzdem er Bewohner eines tropischen Klimas ist. Dahingegen ist 30°–35°C als die günstigste Temperatur für *A. luchuensis* erwiesen, und bei 12°–13°C findet das Wachstum überhaupt nicht statt.

#### DIAGNOSE.

Steriles Mycel weiss, mit mehreren Septen versehen, stark verzweigt und dicht verflochten. Konidienträger kurz, dicht stehend; die Stielmembran glatt, durchsichtig. Köpfchen zuerst weiss, dann hellbraun, endlich schwarzbraun. Blase glatt, kugelig, oft oval und zeigt nach dem Abfalle des Sterigmens dreieckige oder polygonale Vertiefungen auf der Oberfläche. Sterigmen lang, radial ausstrahlend. Reife Konidien kugelig, fein warzig, 4–4.5  $\mu$  in Durchmesser. Perithechien fehlend. Die Optimum-Temperatur für Hyphen-Entwicklung ist 30°–35°C. Gute Nährboden der Reihenfolge nach sind Reis, Brod, Gelatine. Gelatineverflüssigung bedeutend.

#### Grössenverhältniss.

Hyphendurchmesser	2–8 $\mu$ .
Konidienträger	1–2 mm hoch.
Stieldicke	10–15 $\mu$ .
Köpfchendurchmesser	40–80 $\mu$ .
Blasendurchmesser	20–30 $\mu$ .
Sterigmen	6 $\mu$ $\times$ 3 $\mu$ .
Konidiendurchmesser.	4–4.5 $\mu$ .

1) Wehmer, l. c. p. 141.

2) *Aspergillus perniciosus* nov. sp.

Dieser Pilz ist auch ein häufiges Vorkommniss in Awamori-Koji und zeichnet sich durch seine braungelb gefärbten Sporen aus. Obgleich er in gutem Koji nur wenig oder nicht vorhanden, gelangt er oft zu beträchtlicher Entwicklung und verdrängt *A. luchuensis*. Sein Verzuckerungsvermögen ist schwächer.

Die Hyphen sind gelbgrünlich gefärbt; die Köpfchen sind anfangs weiss, dann gelb, und schliesslich graubraun. Der Konidienträger beträgt 2.5 mm in Länge. Auf gekochten Reiskörnern entstehen niemals senkrechte, verzweigte Hyphen, ein Merkmal, welches den Pilz einerseits mit *A. luchuensis* in nähere Beziehung bringt und andererseits von *A. Wentii* unterscheidet. Das Köpfchen dieses Pilzes ist im Verhältniss zum Stiel bedeutend grösser, als es bei *A. luchuensis* der Fall ist, und in dieser Beziehung ist unser Pilz mit *A. nieger* verwandt. Sterigmen sind etwas kürzer als bei *A. luchuensis* und *A. Wentii*, und überschreiten niemals  $\frac{1}{3}$  des Blasendurchmessers. Die Konidien sind warzig, kugelig, ihr Durchmesser misst 4–5  $\mu$ . Perithezienbildung fehlend.

3) *Monilia* sp.

Einer *Monilia*-Art begegnet man ebenfalls in Koji und ungleich der *Monilia variabilis* Lintner ändert sie ihre Form nicht bedeutend. Die Hyphen, die sich in Bierwürze von einzelnen Zellen entwickeln, bilden radiale Kolonien, deren Centrum etwas undurchsichtig wird und nach 5–6 Tagen zeigt die Oberfläche der Kolonien einen weissen staubartigen Anblick. Die Kolonien auf Fleischpepton-Gelatine zeigen jedoch nicht radiale Anordnung der Hyphen wie im obigen Falle; ihr Rand bildet ferner ganz unregelmässige Vorsprünge. Die Fäden sind mehrmals septiert, und verzweigt. Beim Abschluss der Luft werden auf der Oberfläche eine Menge kleiner ovaler Sprosse gebildet,

welche sich abtrennen, und wie Hefepilze fortpflanzen. In Bierwürze findet eine schwache Gärung statt und nach 15 Tagen sind 3% Alkohol in 1 Liter Würze entstanden. Die Hyphen verflüssigen die Gelatine.

### 3. Die Sprosspilze im Awamori-Koji.

#### 1) *Saccharomyces Awamori* nov. sp.

Die vorstehende Art ist eine gärtüchtige Hefe von Awamori und lässt sich nur in Moromi, nicht aber in Koji, auffinden. Auch in der Luft der Awamoribrauerei ist sie nicht vorhanden, wo ich sie mehrmals vergeblich gesucht habe. Ihr Ursprung ist somit unbekannt, sie findet sich immer im „Moromi,“ welches als Tane-moromi (Gärmutter) seit jeher von Bottich zu Bottich übertragen worden ist.

Auf Bierwürze-Plattenkultur haben die Kolonien einen kreisrunden, glatten Umriss und eine centrale Vertiefung. Nach 10 Tagen wird aber der Rand unregelmässig zackig, indem vom Centrum nach der Peripherie eine Anzahl von radialen Falten ausstrahlt. Die Zellen sind anfangs elliptisch und nehmen später eine rundliche Form an. Bei der Bierwürzekultur sind sie meist elliptisch, dagegen auf Zucker-Agar rundlich.

Weder bei 30° C nach Ablauf 24 Stunden noch bei 13°-15° C nach 3 Tagen tritt Sporenbildung ein.

Gegen Wärme äussert sie einen grossen Widerstand, ein dreistündiges Erwärmen auf 50° C vernichtet die Entwicklungsfähigkeit noch nicht, erst bei 60° C erfolgt dieses.

Gegen Alkohol verhält sie sich folgendermassen; die Fortpflanzung der Zellen wird nicht beeinflusst in einer 8% Alkohol-

haltigen Flüssigkeit, bei 13% Alkoholgehalt wird die Entwicklung deutlich gehindert und noch deutlicher bei 15%, und endlich bei 20% hört die Entwicklung völlig auf. In dieser Beziehung scheint diese Hefe also weniger widerstandsfähig als Sakéhefe. In Bierwürze kann sie ca 6% Alkohol in Volumen producieren.

3) Eine Form des *Saccharomyces anomalus*.

Diese Hefe ist auch in Koji reichlich vorhanden, und verleiht dem Awamori sein eigenthümliches Aroma.

Kolonien auf der Bierwürzplattenkultur erscheinen anfangs als kleine Pünktchen, welche sich nach der Peripherie hin in ziemlich langsam, nach oben aber sehr rasch, sich vergrössern, so dass sie sich endlich zu Stäbchen verändern, welche sich dann durch eigene Schwere allmählich nach unten biegen.

Die Zelle ist kurzelliptisch, 3–5  $\mu$  lang. Das durchsichtige Plasma enthält einige stark lichtbrechende Granula. Die Hautbildung ist eine träge; bei 30°C tritt sie erst nach 24 Stunden ein, und bei 14°–15°C nach 15 Tagen.

Die Gärung in Bierwürze ist schwach mit reichlicher Bildung von Obstäther und deutlicher Säurebildung.

Sporen werden bei 30°C nach 10 Stunden gebildet, sind hutförmig; gewöhnlich drei.

### Resumé.

1) Awamorikoji wird aus Reis oder Hirse zubereitet. Die Entwicklung des Kojipilzes ist bei beiden gleich.

2) Der wesentliche Pilz in Awamorikoji ist *A. luchuensis*, der die Stärke im Koji verzuckert. Dieser Pilz ist wohl *A. Wentii* Wehmer verwandt doch unterscheidet er sich vom letzteren durch die Farbe der Sporen, der Art der Entwicklung der Blase

und die Gestalt der Sporen. Besonders bei Reagenzglaskultur zeigen die Luftmycelien einen bedeutenden Unterschied. Auch die Optimumtemperatur für die Entwicklung ist verschieden.

3) In Awamori-Koji befindet sich noch eine Art Fadenpilz, *A. perniciosus*, nov. sp., der *A. luchuensis* sehr ähnlich ist. Die Sporen dieses Pilzes haben anfangs eine grüne Farbe, wie bei *A. luchuensis*. Der vorliegende Pilz kann unter Umständen die Entwicklung des *A. luchuensis* hindern.

4) Die wichtige Hefe für die Awamorigärung ist *Saccharomyces Awamori*. Derselbe entwickelt sich lebhaft im Gärbottich und kann 6% Alkohol bilden.

Das eigentliche Aroma des Awamori beruht auf dem Vorhandensein des *Saccharomyces anomalus*.

Diese Untersuchungen wurden auf Veranlassung meines verehrten Lehrers Herrn Prof. Dr. Miyoshi während eines mehr als zwei-monatlichen Aufenthaltes (Januar bis März, 1901) in Okinawa (Luchu) an Ort und Stelle ausgeführt. Es ist mir eine angenehme Pflicht, am Schlusse dieser Arbeit ihm meinen verbindlichsten Dank auszusprechen. Herren Seminar-Direktor K. Ando und Seminar-Lehrer S. Kuroiwa in Okinawa bin ich für ihr während meiner Arbeit stets erwiesenes Wohlwollen und Interesse ebenfalls zu bestem Dank verpflichtet.

Im Juli, 1901.



TAFEL XXII.

### Tafelerklärung.

- Fig. 1. Ein reifer Konidienträger von *Aspergillus luchuensis*. Vergrößerung ca  $\times 50$ .
- Fig. 2. Derselbe im Glycerin. Optischer Durchschnitt. Verg. ca  $\times 50$ .
- Fig. 3. Derselbe in einem jüngeren Stadium. Verg. ca  $\times 200$ .
- Fig. 4. Eine kolbenförmige Blase. Verg. ca  $\times 200$ .
- Fig. 5. Dieselbe in einem jüngeren Stadium. Glycerinpräparat aus Reiskultur. Verg. ca  $\times 200$ .
- Fig. 6. Konidien, drei von ihnen mit Keimschläuchen. Verg. ca  $\times 600$ .
- Fig. 7. Gemmenbildung in angeschwollenen Hyphen. Würzelatinekultur. Verg. ca  $\times 600$ .
- Fig. 8. Reagenzglaskultur von *Aspergillus luchuensis* auf gekochotem Reis. Natürliche Grösse.
- Fig. 9–12. Konidienträger des *Aspergillus perniciosus* in verschiedenen Entwicklungsstadium. Verg. ca  $\times 200$ .
- Fig. 13–20. Verschiedene Formen von *Monilia* sp. 13. Auf Würzelatine. 14. 15. 16. 17. In Würzelösung. 18. 19. 20. Auf Würzelatine mit Luftabschluss. Verg. ca  $\times 600$ .
- Fig. 21–23. Kolonien von *Saccharomyces Awamori* auf Würzelatine, in nacheinander folgenden Stadium. 21. 3-Tage alt. 22. 8-Tage alt. 23. 15-Tage alt. Verg. ca  $\times 50$ .
- Fig. 24. Verschiedene Formen von *Saccharomyces Awamori*: Verg. ca  $\times 600$ .
- Fig. 25. *Saccharomyces anomalus*.

