

Untersuchungen über das Verhalten der in Nahrungs- und Futtermitteln enthaltenen Kohlehydrate zu den Verdauungsfermenten.

Von

A. Stutzer (Ref.) und A. Isbert.

(Mittheilung der landwirthschaftlichen Versuchsstation Bonn.)
(Der Redaction zugegangen am 12. August 1887.)

Nachdem die in dieser Zeitschrift wiederholt besprochenen Versuche des Ref. über die Einwirkung der Verdauungsfermente auf Proteinstoffe im Wesentlichen beendigt sind, haben wir versucht, das Princip dieser Methode bei einer anderen Stoffgruppe in Anwendung zu bringen, indem wir über den Einfluss diastatischer Fermente auf die N-fr. Stoffe der Nahrungs- und Futtermittel nähere Untersuchungen ausführten. Nachstehend theilen wir die Resultate unserer bisherigen Arbeiten mit.

Zunächst handelte es sich um die Frage: Lassen sich durch successive Einwirkung diastatischer Fermente auf Nahrungs- und Futtermittel die stickstofffreien Stoffe (excl. Fett) in einen verdaulichen und unverdaulichen Theil in der Weise zerlegen, dass dies Verfahren zu einer **quantitativen** Bestimmung der verdaulichen N-fr. Stoffe dienen kann?

Die verdaulichen Kohlehydrate werden theils durch das diastatische Ferment der verschiedenen Speichelflüssigkeiten des Mundes, theils durch dasjenige der Bauchspeicheldrüse in lösliche Verbindungen übergeführt, sofern sie nicht schon an und für sich löslich sind. Die Cellulose kann ebenfalls theil-

weise im thierischen Organismus gelöst werden, indess beruht diese Umwandlung nicht auf der Wirkung eines Drüsensecretes, sondern sie erfolgt durch einen durch Bakterien und andere niedere Organismen veranlassten Gährungs- und Fäulnissprocess¹⁾. Ueber den Werth der im Körper gelösten Cellulose gehen die Ansichten sehr weit auseinander. Während man früher die verdaute Cellulose mit den sonstigen verdaulichen Kohlehydraten gleichwerthig hielt und sogar auch noch jetzt bei Futterberechnungen die gelöste Cellulose als vollwerthigen Nährstoff in Anrechnung zu bringen pflegt, wurde vor einigen Jahren von verschiedenen Seiten der Werth der Cellulose für die Ernährung stark in Zweifel gezogen, ja sogar die Frage, ob Cellulose ein Nährstoff sei, direkt verneint (Tappeiner, Weiske). Nach unserer Ansicht sind die diesbezüglichen Versuche noch nicht als abgeschlossen zu betrachten und lässt sich nur mit Sicherheit annehmen, dass die Cellulose mindestens einen wesentlich geringeren Werth besitzt wie Stärkmehl, Zucker, Dextrin und andere N-fr. Stoffe. Ellenberger und Hofmeister sagen hierüber Folgendes:

«Die Cellulose geht bei der Verdauung wahrscheinlich zunächst in eine zuckerähnliche lösliche Modification über, welche theilweise resorbirt wird und theilweise der Sumpfgasgährung verfällt. Die Resorptionskraft des Darmkanals entscheidet darüber, ob viel oder wenig Cellulose zu Sumpfgas wird, wie sie auch darüber entscheidet, ob viel oder wenig Eiweiss verfault. Alles Organische im Darminhalt verfällt der Gährung und Fäulniss, wenn es nicht rasch genug resorbirt wird.» —

Die Ergebnisse neuerer Forschungen, durch welche der im Organismus gelösten Cellulose ein anderer Werth beizulegen ist, als bisher angenommen wurde, lassen es nun als wünschenswerth erscheinen, dass man die Menge der in der

1) Man vergleiche die diesbezüglichen Arbeiten von Ellenberger und Hofmeister (Landw. Jahrbücher, 16. Bd., S. 276), von Tappeiner und Anderen.

Nahrung gegebenen, durch Verdauungsfermente unlöslichen N-fr. Stoffe genau ermitteln kann. Es ist dies nur dadurch möglich, dass die Nahrungs- und Futtermittel ausserhalb des thierischen Organismus der Wirkung von Verdauungsfermenten ausgesetzt werden. Der Versuch mit lebenden Thieren vermag uns in dieser Beziehung keinen Aufschluss zu geben, weil im lebenden Organismus stets eine theilweise Lösung der Cellulose durch Fäulnissprocesse gleichzeitig stattfindet. Demnach können die Resultate der « künstlichen Verdauung » mit denjenigen « der natürlichen Verdauung der Kohlehydrate » niemals übereinstimmen. Zur Werthschätzung der Nahrungs- und Futtermittel würde einem « künstlichen » Verfahren, bei dem die Lösung der Cellulose vermieden wird, der Vorzug gegeben werden müssen.

Bevor wir auf die Untersuchungen näher eingehen, theilen wir zunächst über die Herstellung der Fermentlösungen Nachstehendes mit:

1. Lösung von Ptyalin. Die Herstellung grösserer Mengen einer Lösung von wirksamem Speichelferment ist mit gewissen Umständen verknüpft, zumal diese Fermentlösung sehr schnell zu Zersetzungen neigt. Wir wendeten uns daher an die bekannte Firma E. Merck in Darmstadt mit dem Ersuchen, uns aus den Speicheldrüsen der Schweine, welche bekanntlich besonders reich an diastatischem Ferment sind, ein wirksames und haltbares Präparat herzustellen. Bei Vorversuchen liessen wir den frischen Speichel mit Glycerin mischen und verwendeten die filtrirte Glycerinmischung, später ist bei den Hauptversuchen ausschliesslich ein trockenes Präparat bezogen, welches von E. Merck unter der Bezeichnung Ptyalin. activ. abgegeben wird. Von diesem Präparat wurden je 100 gr. mit einer Lösung von 1 gr. wasserfreiem Na^2CO_3 in 2 Liter Wasser übergossen, 1 Stunde lang auf $+ 40^\circ \text{C}$. erwärmt und dann filtrirt. Dieser Zusatz von $\frac{1}{2}$ pro Mille kohlensaurem Natron erwies sich als nothwendig, weil die wässrige Lösung des käuflichen Ptyalins nicht neutral, sondern sehr schwach sauer reagirte. Die saure wässrige Lösung hatte eine erheblich geringe Wirk-

samkeit. Ein Zusatz von mehr als 0,05% Na^2CO_3 erwies sich als unnöthig, ja sogar weniger wirksam.

2. Lösung von Malzdiastase. Wir hielten es für wünschenswerth, über den Wirkungswerth der Malzdiastase im Vergleich zum diastatischen Speichelferment vergleichende Versuche auszuführen, um zu ermitteln, ob die überall leicht zu beschaffende Malzdiastase bei diesen Versuchen einen Ersatz für Speichelferment zu bieten vermag. Die Malzlösung wurde in folgender Weise bereitet: 1 Kilo zerstampftes Grünmalz wird mit $1\frac{1}{2}$ Liter Glycerin und $1\frac{1}{2}$ Liter Wasser gemischt, die Mischung 8 Tage lang unter bisweiligem Umrühren bei Zimmertemperatur stehen gelassen, dann ausgepresst und filtrirt.

3. Die Pepsinlösung, sowie die pankreatische Fermentlösung ist nach den in dieser Zeitschrift, Bd. XI, S. 208, 210, 226 angegebenen Vorschriften hergestellt.

Qualitative Versuche über die Wirkung diastatischer Fermente auf stärkmehlhaltige Stoffe.

Um über die Wirkung der diastatischen Fermente auf stärkmehlhaltige Stoffe im Allgemeinen orientirt zu sein, führten wir folgende Versuche aus: 5 gr. Weizenmehl wurde mit Wasser verkleistert, die Flüssigkeit zu 1 Liter verdünnt, je 50 ccm. der Lösung mit diastatischem Ferment versetzt und von Zeit zu Zeit mittelst Jodlösung auf Stärkmehl geprüft. Hierbei ergab sich Folgendes:

1. Ptyalinlösung bei 40° C. und Malzdiastase bei 60° wirken beide sehr schnell.
2. Malzdiastase wirkt bei 40° erheblich langsamer.
3. Pankreasflüssigkeit ist in Gegenwart von freien organischen Säuren scheinbar unwirksam. Neutrale Pankreasflüssigkeit wirkt energischer auf die Umwandlung von Stärkmehl ein, wie alkalische.

Wir gelangen nun zur Besprechung der Haupt-Versuche, welche mit Weizenmehl, Kleeheu, Blätter von Kleeheu und Weissbrod ausgeführt wurden. Im Weizenmehl hatten wir eine Substanz mit hohem Gehalt an Stärkmehl, geringerem Gehalt an zarter, fein vertheilter Cellulose. Das Umgekehrte war der Fall beim Heu (bestehend aus einer Mischung von *Trifolium pratense* und *Lolium perenne*). Endlich wählten wir Weissbrod als Repräsentant eines Nahrungsmittels, welches einer besonderen Zubereitung (Backproceß) unterworfen gewesen ist. Das Weissbrod wurde, um ein gleichartiges Untersuchungsmaterial zu haben, getrocknet und dann fein gemahlen. Gelang es bei diesen 3 Versuchsobjekten, die vorhandenen N-fr. Stoffe durch successive Einwirkung von Verdauungsfermenten in einen verdaulichen und unverdaulichen Theil in der Weise zu zerlegen, dass diese Umsetzung bei Controlversuchen und bei verschiedenem Fermentgehalt der Flüssigkeiten stets in gleichen Gewichtsverhältnissen, also quantitativ erfolgte, so durften wir annehmen, dass eine solche Methode auch bei allen übrigen Nahrungs- und Futtermitteln sich anwenden lässt, dass auch bei anderen Nahrungs- und Futtermitteln die N-fr. Stoffe in einen durch ungeformte Fermente verdaulichen und unverdaulichen Theil quantitativ sich trennen lassen. — Bei nachstehenden Versuchen handelte es sich zunächst um die Frage, unter welchen Verhältnissen das Optimum der Verdauung erreicht wird. Da das anzuwendende Verfahren zur Bestimmung der Kohlehydrate ein indirektes war und bei indirekten Methoden die vorkommenden Beobachtungsfehler und Verluste sich in weit höherem Grade multipliciren, wie bei einem direkten analytischen Bestimmungsverfahren, glaubten wir bei Controlversuchen, die unter gleichen Bedingungen ausgeführt wurden, eine Abweichung vom Durchschnittsresultat von $\pm 0,2\%$ als zulässig annehmen zu sollen. Diese Latitude ist nicht so gross, dass hierdurch der praktische Werth der Methode zur Beurtheilung von Nahrungs- und Futtermitteln beeinträchtigt werden könnte. Bei Fütterungsversuchen pflegen bezüglich der N-fr. organischen Substanz die Differenzen der Controlversuche in der Regel viel grösser zu sein.

Die allgemeine Analyse der benutzten Untersuchungsobjekte ergab Folgendes:

	1. Blätter von Kleeheu.	2. Weizen- mehl.	3. Kleeheu (<i>Lolium</i> perenne und <i>Trifolium</i> pratense).	4. Weissbrod.
Fett (Aether-Extrakt).	4,60	1,54	3,66	0,22
Protein	15,33	10,15	9,69	11,88
Wasser	4,22	13,89	6,74	8,82
Mineralstoffe	8,58	0,68	6,98	2,12
N-fr. organ. Stoffe. . .	67,27	73,74	72,93	76,96

Allgemeines über die Ausführung der Versuche.

Bei Bestimmung der Kohlehydrate bzw. der N-fr. Substanz glaubten wir uns, wie allgemein üblich, der indirekten Methode bedienen zu sollen. Es wird in dem Nahrungsmittel der Gehalt an Protein, Fett, Wasser, Asche (frei von Kohlen-säure) ermittelt und das bei der procentischen Zusammenstellung der Analyse von 100 Fehlende als N-fr. Substanz in Anrechnung gebracht. In gleicher Weise geschieht die Untersuchung der Substanz nach der künstlichen Verdauung. Die Differenz der beiden Analysen ergibt die durch Fermente gelösten N-fr. Stoffe.

Die Untersuchungsobjekte wurden nur im völlig entfetteten Zustande der künstlichen Verdauung unterworfen, weil einerseits das Fett die Filtration erschweren und bei Anwendung von pankreatischen Fermenten ein Theil des Fettes gelöst und dadurch die indirekte Methode zur Bestimmung der Kohlehydrate ungenau werden würde. Die zu extrahirende Substanz wurde in eine aus glattem, dichten Filtrirpapier gefertigte, auf einer Seite mit Bindfaden zugebundene Hülse gebracht, nach geschehener Extraktion die Hülse geöffnet und mittelst einer Federfahne die Substanz in ein Becherglas geschüttet. Bei fast allen Untersuchungsobjekten kann man glattes Filtrirpapier bei der Extraktion verwenden,

ohne befürchten zu müssen, dass eine Verunreinigung der Substanz durch Papierfaser stattfindet, und hat die Benutzung eines Asbestfilters, statt des Filtrirpapiers, mit seltenen Ausnahmen als unnöthig sich erwiesen.

Die anzuwendenden Fermente wirken selbstverständlich auch auf Proteinstoffe ein, ganz abgesehen davon, dass von den Proteinstoffen schon allein durch wässrige Flüssigkeiten mehr oder weniger löslich werden kann. Es musste daher unser Bestreben sein, die Proteinstoffe bei der Verdauung möglichst zu entfernen, ohne gleichzeitig die Verdauung der Kohlehydrate zu beeinträchtigen. Keineswegs erschien es nöthig, die verdaulichen Proteinstoffe vollständig zu entfernen, und war es genügend, dass unter gleichen Versuchsbedingungen eine stets gleiche Menge N-h. Substanz neben den unverdaulichen Kohlehydraten unlöslich zurück blieb und von den letzteren in Abrechnung gebracht werden konnte. Der Eine von uns hat zu diesem Zwecke das Verhalten der Proteinstoffe zu den Verdauungsfermenten unter verschiedenen Verhältnissen nochmals geprüft und einen besonderen Bericht hierüber erstattet¹⁾.

Die Herstellung einer kohlensäurefreien Asche geschah bei den Untersuchungen einfach in der Weise, dass die Asche mit wenig Salpetersäure befeuchtet und dann längere Zeit bis zur Zersetzung der Nitate erhitzt wurde. Das Gewicht der Reinasche musste selbstverständlich schliesslich constant bleiben. Bei allen Versuchen wurden stets genau 2 gr. von der zu untersuchenden Substanz abgewogen, entfettet, dann in ein Becherglas gebracht, mit 100 cbcm. Wasser übergossen, zum Sieden erhitzt, und nachdem die Flüssigkeit halb erkaltet war, die Fermentlösung hinzugefügt.

a) Ptyalinlösung. Verwendete Menge = 200 cbcm.
Erwärmungsdauer = 2 Stunden lang auf 37—40° C.

b) Diastaselösung. Verwendete Menge = 25 cbcm.
Erwärmungsdauer = 2 Stunden lang auf 60—65° C.

1) Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XI, S. 529.

c) Pepsinlösung. Bei vielen Versuchen ist nach Einwirkung von Ptyalin oder Diastase noch 400 ccm. Pepsinlösung hinzugefügt, um die Proteinstoffe löslich zu machen. War Ptyalin in der Flüssigkeit enthalten, so wurde vor dem Zusatz von Pepsin die Flüssigkeit durch ausgeglühten Asbest filtrirt und der Rückstand ausgewaschen; bei den Diastase-Versuchen konnte die Flüssigkeit direkt mit saurer Pepsinlösung versetzt werden, weil bei diesen die mit dem Pepsin verbundene Salzsäure keine Ausscheidung veranlasste, während in der Ptyalinlösung beim Ansäuern ein flockiger Niederschlag sich bildete.

d) Pankreas-Flüssigkeit. In allen Fällen, in denen nach Behandlung mit den vorhin genannten Fermenten noch eine Einwirkung von Pankreasferment stattfinden sollte, wurde die Flüssigkeit wieder zuvor durch Asbest filtrirt, das Unlösliche mit Wasser ausgewaschen, der Rückstand nebst dem Asbest mittelst wenig Wasser in ein Becherglas gebracht, mit 100 ccm. Pankreasflüssigkeit übergossen und 3 Stunden lang auf $+ 37-40^{\circ}$ C. erwärmt.

Nun haben wir die Flüssigkeit nochmals durch Asbest filtrirt (unter Anwendung eines in den Trichter gelegten Conus von feinem Messingdrahtgewebe), den Rückstand mit Wasser ausgewaschen, in eine Platinschale gebracht, bei 100° getrocknet, bis das Gewicht von Schale + Inhalt constant blieb, den Inhalt der Schale verascht, die Kohlensäure mit Salpetersäure ausgetrieben und nochmals geglüht, bis keine Gewichtsabnahme mehr stattfand. Die Differenz zwischen beiden Wägungen gab die unverdaute organische Substanz an, welche, da die Untersuchungsprobe vorher entfettet war, nur aus N-h. Substanz und unlöslichen Kohlehydraten (Cellulose etc.) bestehen konnte. Um den Gehalt an Kohlehydraten (frei von N-h. Substanz) zu finden, wurden gleiche Versuche ausgeführt, die unverdaut gebliebenen Stoffe jedoch nicht verascht, sondern zur Stickstoffbestimmung benutzt, der gefundene Stickstoff mit dem üblichen Faktor 6,25 multiplicirt, dadurch auf Protein berechnet, und letzteres von den unlöslichen Kohlehydraten in Abzug gebracht.

Erste Versuchsreihe.

Wirkung von Ptyalin und Malzdiastase, theils mit, theils ohne nachfolgende Wirkung von Pepsin.

a) Versuche mit Blätter von Kleeheu. Die Untersuchungsprobe bestand aus gemahlenem Heu von Raigras und Rothklee, von dem durch Absieben die größeren Stengeltheile entfernt waren.

Das Nähere ist aus folgender Tabelle ersichtlich:

No.	Verwendete Menge der Lösung von			a)		b)		c)	
	Ptyalin chem.	Diastase chem.	Pepsin chem.	Ungelöst gebliebene organische Trockensubstanz		Gehalt der unlöslichen Trockensubstanz an Protein			Unlösliche Kohlehydrate (a - b = c) o/o
				gr.	o/o	N o/o	o/o		
1	100 (saurewässrige Lösung)	—	400	1,1130	55,65	0,838	5,27	50,38	
2	100 (do.)	—	400	1,1170	55,35	0,850		50,58	
3	200 (do.)	—	400	1,1348	56,74	1,063		50,10	
4	200 (do.)	—	400	1,1370	56,85	1,063	6,64	50,21	
5	300 (do.)	—	400	1,1960	59,80	1,369	8,55	51,25	
6	300 (do.)	—	400	1,1930	59,65	1,369		51,10	
7	—	15	400	1,1000	55,00	0,966	6,63	48,97	
8	—	25	400	1,1100	55,50	0,992	6,20	49,30	
9	—	25	400	1,1025	55,12	0,992		48,92	
10	—	50	400	1,1420	57,10	1,056	6,60	50,50	
11	—	50	400	1,1338	56,69	1,056		50,09	
12	200 (neutrale Lösung)	—	400	1,0330	51,65	0,560	3,45	48,20	
13	200 (do.)	—	400	1,0310	51,55	0,545		48,10	

b) Versuche mit Weizenmehl.

No.	Verwendete Menge der Lösung von		a)		b)		c)
	Ptyalin chem.	Diastase chem.	Ungelöst gebliebene organische Trockensubstanz gr.	Trockensubstanz %	Gehalt der unlöslichen Trockensubstanz an N %	Protein %	
14	200 (saure wässrige Lösung)	—	0,1190	5,95	0,08	0,50	5,45
15	200 (do.)	—	0,1140	5,70	0,08	—	5,20
16	300 (do.)	—	0,1190	5,95	0,20	1,25	4,70
17	300 (do.)	—	0,1206	6,03	0,20	—	4,78
18	400 (do.)	—	0,1310	6,55	0,209	1,25	5,25
19	100 (neutral)	—	0,0940	4,70	0,198	—	3,42
20	100 (do.)	—	0,0944	4,72	0,213	1,28	3,44
26	200 (neutral)	—	0,0610	3,05	0,113	0,70	2,35
27	200 (do.)	—	0,0590	2,95	—	—	2,25
28	200 (do.)	—	0,0620	3,10	0,130	0,82	2,39
29	200 (do.)	—	0,0600	3,00	—	—	2,29
30	300 (neutral)	—	0,0640	3,20	0,113	0,70	2,50
31	300 (do.)	—	0,0656	3,28	0,113	—	2,58

b) Versuche mit Weizenmehl. (Fortsetzung.)

No.	Verwendete Menge der Lösung von		Ungelöst gebliebene organische Trockensubstanz		Gehalt der unlöslichen Trockensubstanz an		Unlösliche Kohlehydrate (a - b - c) %
	Ptyalin cbcm.	Diastase cbcm.	Pepsin cbcm.	gr.	%	N %	
32	200 (do.)	25	--	0,0610	3,05	0,114	2,34
33	200 (do.)	25	--	0,0620	3,10		2,39
21	100 (schwach) 1)	--	400	0,1054	5,27	0,198 0,205	4,00
22	200 (schwach) 1)	--	400	0,0840	4,20	0,031	4,00
23	200 (do.)	--	400	0,0810	4,05	0,031	3,85
24	200 (deutlich) 1)	--	400	0,1020	5,10	0,016	5,00
25	200 (do.)	--	400	0,1000	5,00		4,90

1) Bei Versuch 21—23 ist die Menge des zugesetzten Na_2CO_3 verdoppelt ($\approx 0,10\%$), bei Versuch 24 und 25 dreifach ($\approx 0,15\%$) worden, um die Einwirkung von Alkali zu verfolgen. Die erste Flüssigkeit reagierte sehr schwach, die letztere deutlich alkalisch. Bei allen sonstigen Versuchen ist auf 1 Liter Wasser, welches zur Extraktion des trockenen Ptyalin-Präparates diente, 0,5 gr. Na_2CO_3 ($\approx 0,05\%$) verwendet und genügt dies, um die in dem Präparat enthaltene Säure genau zu neutralisieren. Der geringe N-Gehalt bei Versuch 24 und 25 ist nach unserer Ansicht nicht auf die verbleibende Wirkung des Ptyalins, sondern einfach auf die lösende Wirkung grösserer Mengen von Soda zurückzuführen.

b) Versuche mit Weizenmehl. (Fortsetzung.)

No.	Verwendete Menge der Lösung von		a)		b)		c)	
	Ptyalin chem.	Diastase chem.	Pepsin chem.	Ungelöst gebliebene organische Trockensubstanz gr.	%	Gehalt der unlöslichen Trockensubstanz an N %		Protein %
34	—	25	400	0,0630	3,15	0,112	0,75	2,40
35	—	25	400	0,0610	3,05	0,128	—	2,30
36	—	25 ¹⁾	400	0,0640	3,20	0,120	—	2,45
37	—	25	400	0,0630	3,15	—	0,75	2,35
38	—	15	400	0,0640	3,20	0,120	—	2,45
39	—	15	400	0,0600	3,00	—	0,75	2,25
40	—	50	400	0,0690	3,45	0,160	—	2,45
41	—	50	400	0,0690	3,45	0,160	1,00	2,45
42	—	25 ²⁾	400	0,1100	5,50	0,122	—	2,74
43	—	25	400	0,1044	5,22	0,122	0,76	4,46
44	—	25	—	0,2350	11,75	1,143	—	4,60
45	—	25	—	0,2290	11,45	1,143	7,15	4,30

1) Die zu diesem Versuch verwendete Diastaselösung war bereits 1 1/2 Jahr alt. Es sollte ermittelt werden, ob die Diastaselösung längere Zeit ihre Wirksamkeit behält.

2) Die Untersuchungsprobe wurde mit der Diastaselösung nur auf 37—40° und nicht, wie sonst bei den Diastase-Versuchen geschehen, auf 60—65° erwärmt.

c) Versuche mit Klecheu.

No.	Verwendete Menge der Lösung von		Pepsin chem.	a) Ungelöst gebliebene organische Trockensubstanz		b) Gehalt der unlöslichen Trockensubstanz an Protein		c) Unlösliche Kohlehydrate (a-b=c)
	Ptyalin chem.	Diastase chem.		gr.	o/o	N o/o	o/o	
46	100 (neutral)	—	—	1,1510	57,55	0,792	—	52,60
47	100 (do.)	—	—	1,1530	57,65	0,792	—	52,70
48	50 (do.)	—	—	1,1500	57,50	0,792	—	52,55
49	50 (do.)	—	—	1,1510	57,55	—	—	52,60
50	100 (do.)	—	400	1,1097	54,85	—	—	50,79
51	100 (do.)	—	400	1,1010	55,05	—	—	50,99
52	—	25	400	1,1680	58,40	0,885	—	52,78
53	—	25	400	1,1590	57,95	0,917	—	52,33

d) Versuche mit Weissbrod.

54	200 (neutral)	—	—	0,0740	3,70	0,110	—	3,02
55	200 (do.)	—	—	0,0750	3,75	0,110	—	3,07
56	200 (do.)	—	400	0,0670	3,35	0,080	—	2,95
57	200 (do.)	—	400	0,0640	3,20	0,065	—	2,75
58	—	25	400	0,1285	6,40	0,394	—	3,94
59	—	25	400	0,1240	6,20	0,394	—	3,74

Diese Versuche veranlassen uns zu nachfolgenden Schlussfolgerungen:

1. Neutrale Ptyalinlösung hat eine bessere Wirkung auf das Lösungsvermögen der Kohlehydrate, wie die schwach saure Fermentflüssigkeit (Versuche 12, 13, 19, 20), auch übertraf die erstere in dieser Eigenschaft eine schwach alkalisch gemachte Ptyalinlösung (Versuche 21—25).

Wir möchten diese von uns gemachte Erfahrung bezüglich der neutralen Ptyalinlösung zunächst nur auf das von uns benutzte Präparat bezogen haben. Es liegen bisher keine Versuche vor, aus denen zu ersehen ist, ob durch ganz frischen gemischten Mundspeichel bei neutraler Reaction das Optimum der Wirkung früher erreicht wird, wie bei alkalischer Reaction. Die nachtheilige Wirkung von Säuren auf Ptyalin ist bereits von Ellenberger und Hofmeister nachgewiesen (Landw. Jahrbücher, 16. Bd., S. 237). Dieselben fanden, dass schon 0,02—0,03% Salzsäure die Speichelwirkung aufhebt, Milchsäure aber erst bei 0,4—0,6%.

2. Für Substanzen, die reich an verdaulichen Kohlehydraten sind (Weizenmehl), genügen bei 2 gr. der Untersuchungssubstanz = 200 ccm. der von uns benutzten neutralen Ptyalinlösung, um das Optimum der Wirkung zu erzielen. Bei Untersuchungsobjekten, welche relativ arm an verdaulichen Kohlehydraten sind (Heu), wird das Optimum der Wirkung schon durch 50—100 ccm. Ptyalinlösung erreicht (Versuche 19, 20, 26—33, 46—49).

3. Von der Malzdiastase genügten 25 ccm., um eine möglichst günstige Wirkung hervorzubringen (Versuche 7—11, 34—41).

4. Die Diastaselösung kann sehr lange Zeit aufbewahrt werden, ohne an Wirkungswerth eine wesentliche Einbusse zu erleiden (Versuch 36, 37). Diastase wirkt bei 37—40° C. erheblich schwächer, als bei 60° (Versuche 34, 35, 42, 43). Diese letztere Beobachtung ist längst bekannt und nur von uns nochmals ziffermässig nachgewiesen.

5. Ptyalinlösung, allein angewendet, wirkte besser als wie Diastase (Versuche 28—31, 44, 45). Bei

nachfolgender Wirkung von Pepsin erwiesen sich dagegen Ptyalin und Diastase vollständig gleichwerthig (Versuche 26, 27, 34—41).

6. Durch successive Wirkung von Diastase und neutraler Ptyalinlösung wurde keine höhere Verdaulichkeit erzielt als durch alleinige Anwendung von Ptyalin (Versuche 28, 29, 32, 33).

7. Bei Gegenwart sehr grosser Mengen von Fermenten wird die Wirkung des letzteren in der Regel abgeschwächt¹⁾ (Versuche 3—6, 16—18, 28—31, 8—11). Eine Abschwächung wurde nicht beobachtet, als wir Diastase auf Weizenmehl einwirken liessen (Versuche 34—41).

8. Die neutrale Ptyalinlösung vermag nicht unerhebliche Mengen von Protein aufzulösen (Versuche 3, 4, 12, 13, 26—31, 46—53, 54—59) und scheint es wünschenswerth, die Einwirkung des Mundspeichels auf Proteinstoffe einer näheren Prüfung zu unterwerfen.

Zweite Versuchsreihe.

Alleinige Wirkung von Pankreasferment.

Die diesbezüglichen Versuche wurden nur mit Weizenmehl ausgeführt, welches von gleicher Beschaffenheit war, wie das bei den früheren Versuchen benutzte.

No.	Menge der Pankreasflüssigkeit.		a)		b)		c)
			Unlöslich gebliebene organische Trockensubstanz		Gehalt der unlöslichen Trockensubstanz an		
	chem.		gr.	°o	N °o	Protein °o	Unlösliche Kohlehydrate (a — b — c) °o
60	100	(neutral)	0,1480	7,40	0,080	0,50	6,90
61	100	(do.)	0,1500	7,50	0,080		7,00
62	100	(alkalisch 0,25°o Na ² CO ₃ enthaltend)	0,2570	12,85	0,032	0,20	12,65
63	100	(do.)	0,2540	12,70	0,032		12,50

1) Gleiche Beobachtungen machten Ellenberger und Hofmeister bezüglich des Pepsins bei Versuchen mit Pferden. Centralbl. f. Agriculturchemie, 1887, S. 230.

Schlussfolgerungen aus vorstehenden Versuchen:

1. 100 ccm. der von uns benutzten Pankreasflüssigkeit wirkten auf die Verdauung der Kohlehydrate erheblich schwächer ein, wie Ptyalin oder Malzdiastase.

2. Neutrale Pankreasflüssigkeit hat für die Kohlehydrate des Weizenmehls eine bessere Wirkung, als das schwach alkalisch gemachte Ferment.

3. Die Proteinstoffe des Untersuchungsobjektes wurden durch die Pankreasflüssigkeit vorzüglich gut verdaut, namentlich von der alkalischen Fermentlösung. Diese Eigenschaft des Pankreasfermentes ist bei früheren Versuchen des Ref. bereits wiederholt beobachtet¹⁾.

Dritte Versuchsreihe.

Successive Einwirkung von Ptyalin und Pankreas (ohne Pepsin) beziehungsweise von Malzdiastase und Pankreas.

a) Versuche mit Weizenmehl.

No.	Verwendete Menge der Lösung von			a) Unlöslich gebliebene organische Trockensubstanz		b) Gehalt der unlöslichen Trockensubstanz an		c) Unlösliche Kohlehydrate (a - b)
	Ptyalin ccm.	Diastase ccm.	Pankreas ccm.	gr.	%	N %	Protein %	%
64	200 (neutral)	—	100 (alkalisch)	0,0590	2,95	0,081	0,51	2,44
65	200 (do.)	—	100 (do.)	0,0580	2,90	0,081		2,39
66	—	25	100 (do.)	0,0850	4,25	0,081	0,51	3,74
67	—	25	100 (do.)	0,0840	4,20			3,69
68	200 (neutral)	—	100 (neutral)	0,0590	2,95	0,097	0,62	2,33
69	200 (do.)	—	100 (do.)	0,0570	2,85	0,113		2,23

¹⁾ Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XI, S. 534.

b) Versuche mit Kleeheu.

No.	Verwendete Menge der Lösung von			a) Unlöslich gebliebene organische Trockensubstanz		b) Gehalt der unlöslichen Trockensubstanz an		c) Unlösliche Kohlehydrate (a - b) c)
	Ptyalin chem.	Diastase chem.	Pankreas chem.	gr.	%	N %	Protein %	
70	100 (neutral)	—	100 (alkalisch)	1,0980	54,95	0,536	3,35	51,60
71	100 (do.)	—	100 (do.)	1,1060	55,30	0,536		51,95
72	100 (do.)	—	100 (neutral)	1,1280	56,40	0,764	4,77	51,63
73	100 (do.)	—	100 (do.)	1,1280				51,63

c) Versuche mit Weissbrod.

74	200 (neutral)	—	100 (alkalisch)	0,0590	2,95	0,063	0,39	2,56
75	200 (do.)	—	100 (do.)	0,0600	3,00	0,063		2,61

Schlussfolgerungen:

1. Bei successiver Einwirkung genügender Mengen von neutraler Ptyalinlösung und Pankreasferment war das letztere bei Versuchen mit Weizenmehl sowohl in neutraler, wie auch in alkalischer Flüssigkeit unwirksam, indem das Optimum der Wirkung bereits durch Ptyalin allein erreicht wurde (Versuche 28, 29, 64, 65, 68, 69). Bei Kleeheu und Weissbrod war dagegen eine sehr schwache Wirkung des Pankreasfermentes bemerkbar (Versuche 46, 47, 70—73, sowie 54, 55, 74, 75).

2. Pankreasferment wirkt auf die Proteinstoffe, wie schon oft beobachtet, bei Gegenwart von Alkali energischer ein, wie bei neutraler Reaction der Flüssigkeiten (Versuche 66—69).

3. Durch Malzdiastase mit nachfolgender Einwirkung von Pankreasferment wird eine geringere Menge der Kohlehydrate verdaut, wie durch Ptyalin, beziehungsweise durch Ptyalin und Pankreasferment (Versuche 64—69, 28, 29).

Vierte Versuchsreihe.
Successive Einwirkung von Ptyalin, Pepsin und Pankreasferment, sowie von Malz-
diastase, Pepsin und Pankreasferment.

a) Versuche mit Weizenmehl.

No.	Verwendete Menge der Lösung von			a) Unlöslich ge- bliebene organische Substanz		b) Gehalt der un- löslichen Trocken- substanz an		c) Unlösliche Kohle- hydrate (a - b = c) o/o	
	Ptyalin chem.	Diastase chem.	Pepsin chem.	Pankreas chem.	gr.	o/o	N		Protein o/o
76	300 (wässrige saure Lösung)	—	400	100 (alkalisch)	0,0750	3,75	0,045	0,28	3,47
77	300 (do.)	—	400	100 (do.)	0,0700	3,50	0,045		3,22
78	300 (do.)	—	400	100 (neutral)	0,0790	3,95	0,107	0,66	3,29
79	300 (do.)	—	400	100 (do.)	0,0760	3,80			3,14
80	200 (neutral)	—	400	100 (alkalisch)	0,0560	2,80	0,065	0,41	2,39
81	200 (do.)	—	400	100 (do.)	0,0580	2,90	0,065		2,49
82		25	400	100 (do.)	0,0530	2,65	0,048	0,30	2,35
83		25	400	100 (do.)	0,0540	2,70	0,048		2,40
84		25	400	100 (neutral)	0,0590	2,95	0,097	0,61	2,34
85		25	400	100 (do.)	0,0600	3,00	0,097		2,39
86		25	400	100 (do.)	0,0580	2,90	0,097		2,29

b) Versuche mit Blättern von Kleheu.

No.	Verwendete Menge der Lösung von			Unlöslich ge- bliebene organische Substanz	b) Gehalt der un- löslichen Trocken- substanz an		c) Unlösliche Kohl- hydrate (a—b—c) %
	Ptyalin chem.	Diastase chem.	Pepsin chem.		Pankreas chem.	N %	
87	—	25	400	100 (neutral)	gr.	0/0	
88	—	25	400	100 (do.)	1,0630	53,15	48,05
89	—	25	400	100 (alkalisch)	1,0600	53,00	47,90
90	—	25	400	100 (do.) ¹⁾	0,9930	49,65	46,73
91	—	25	400	100 (do.) ¹⁾	0,9840	49,20	46,28
92	—	25	400	150 (alkalisch)	0,9870	49,35	46,43
93	—	25	400	150 (do.)	0,9900	49,50	46,58
					0,9860	49,30	46,38

¹⁾ Ausnahmsweise enthielt diese Pankreasflüssigkeit 0,5% Na²CO₃ statt 0,25%, um die Einwirkung grösserer Mengen von Alkali auf die Kohlehydrate zu beobachten.

c) Versuche mit Kleehen.

No.	Verwendete Menge der Lösung von				a) Unlöslich gebliebene organische Substanz		b) Gehalt der unlöslichen Trockensubstanz an		c) Unlösliche Kohlehydrate (a - b - c) %
	Ptyalin chem.	Diastase chem.	Pepsin chem.	Pankreas chem.	gr.	%	N %	Protein %	
94	100 (neutral)	—	400	100 (neutral)	1,0870	54,35	0,650	4,06	50,29
95	100 (do.)	—	400	100 (do.)	1,0900	54,45	0,650		50,39
96	100 (do.)	—	400	100 (alkalisch)	1,0210	51,05	0,43	2,68	48,37
97	100 (do.)	—	400	100 (do.)	1,0240	51,20			48,52
98	—	25	400	100 (do.)	1,0250	51,25	0,43	2,68	48,57
99	—	25	400	100 (do.)	1,0270	51,35	0,43		48,67

d) Versuche mit Weisbrod.

100	200 (neutral)	—	400	100 (neutral)	0,0650	3,25	0,071	0,44	2,81
101	200 (do.)	—	400	100 (do.)	0,0640	3,20	0,071		2,76
102	200 (do.)	—	400	100 (alkalisch)	0,0570	2,85	0,039	0,21	2,61
103	200 (do.)	—	400	100 (do.)	0,0570	2,85	0,039		2,61
104	—	25	400	100 (do.)	0,0560	2,80	0,031	0,21	2,59
105	—	25	400	100 (do.)	0,0580	2,90	0,039		2,69

Ergebnisse der vierten Versuchsreihe.

1. Die früher beobachtete ungünstige Wirkung von schwach saurer Ptyalinlösung im Vergleich zur neutralen trat auch bei nachfolgender Einwirkung von Pepsin und Pankreasferment (letzteres theils in neutraler, theils in alkalisch reagirender Flüssigkeit angewendet) scharf hervor (Versuche 76—81).

2. Das durch successive Anwendung von neutraler Ptyalinlösung, Pepsin und Pankreasferment erzielte Optimum der Wirkung stimmt genau mit dem durch successive Anwendung von Malzdiastase, Pepsin und Pankreasferment erzielten Optimum überein (Versuche 80—86, 96—99, 102—105).

3. In der zweiten Versuchsreihe wurde der Nachweis geliefert, dass neutrale Pankreasflüssigkeit, allein angewendet, auf die Verdauung der Kohlehydrate des Weizenmehls günstiger einwirkt, wie bei alkalischer Reaction der Verdauungsflüssigkeit. Trotzdem empfiehlt es sich, das Pankreasferment bei successiver Einwirkung der Fermente der Mundspeicheldrüsen, der Magenschleimhaut und des Bauchspeichels in schwach alkalischer Lösung einwirken zu lassen.

Es werden durch die alkalische Flüssigkeit nicht nur die Proteinstoffe vollständiger gelöst und bei Controlversuchen gleichmäßigere Resultate bezüglich des Gehaltes der Untersuchungsprobe an unverdaulicher organischer Substanz (N-fr. + N-h.) erhalten, sondern es scheint thatsächlich, wenn es sich darum handelt, nach vorhergehender Einwirkung von Ptyalin und Pankreas bzw. von Diastase und Pankreas, nur die letzten verdaulichen Antheile der Kohlehydrate zu extrahiren, die alkalische Pankreasflüssigkeit bei schwerer verdaulichen Nahrungs- und Futtermitteln günstiger auf die Lösung der Kohlehydrate einzuwirken, wie die neutrale Flüssigkeit (Versuche 87—89, 94—97). Vielleicht übt hierbei die physikalische Beschaffenheit der vegetabilischen Zellen gewisser Untersuchungsobjekte einen Einfluss aus, indem die alkalische Flüssigkeit das Diffusionsvermögen des Zellinhaltes günstig

beeinflusst, indess kann dieser Unterschied vielleicht auch nur auf chemische Ursachen zurückgeführt werden.

4. Die Menge der anzuwendenden alkalischen Pankreasflüssigkeit beträgt zweckmässig 100 ccm. Der Gehalt an $\text{Na}^2\text{CO}_3 = 0,25\%$. Diese Quantität genügt, um das Optimum der Wirkung auf Kohlehydrate und Proteinstoffe (nach vorhergehender Behandlung mit Ptyalin und Pepsin, bezw. Diastase und Pepsin) zu erreichen. Eine grössere Quantität der Pankreasflüssigkeit wird keine bessere Wirkung hervorbringen, ebenso erscheint ein grösserer Gehalt an Alkali unnütz zu sein (Versuche 89—93).

Bei Beginn unserer Arbeiten hatten wir die Frage gestellt: «Lassen sich durch successive Einwirkung diastatischer Fermente auf Nahrungs- und Futtermittel die stickstofffreien Stoffe (excl. Fett) in einen verdaulichen und unverdaulichen Theil in der Weise zerlegen, dass dies Verfahren zu einer **quantitativen** Bestimmung der verdaulichen N-fr. Stoffe dienen kann?» Auf diese und einige sich daran anknüpfende Fragen glauben wir durch unsere Versuche folgende Antworten und Resultate erhalten zu haben:

Die in Nahrungs- und Futtermitteln enthaltenen organischen N-fr. Stoffe (excl. Fett) lassen sich durch Einwirkung von Fermenten ausserhalb des lebenden Organismus in lösliche und unlösliche (verdauliche und unverdauliche) Bestandtheile quantitativ trennen. —

Die Erreichung des Optimums der Wirkung geschieht durch successive Einwirkung von Ptyalin, Pepsin und Pankreas auf die zu untersuchende Substanz.

An Stelle von Ptyalin kann Malzdiastase verwendet werden und empfiehlt sich im Allgemeinen die Benutzung von Malzdiastase, weil diese überall leicht zu beschaffen ist, während grössere Mengen Ptyalin in guter Qualität oft schwer zu erhalten sind. —

Die Resultate der künstlichen Verdauung der Kohlehydrate können mit denjenigen der natürlichen Verdauung

im lebenden Organismus nicht übereinstimmen, weil bei dem künstlichen Versuch nur die sogenannten ungeformten Fermente das Maximum ihrer Wirkung entfalten, während bei der «natürlichen» Verdauung ausserdem die im Darm enthaltenen Bakterien und sonstigen Mikroorganismen eine Lösung solcher Kohlehydrate bewirken, welche durch Einwirkung ungeformter Fermente unlöslich bleiben. —

Nachdem erwiesen ist, dass die im lebenden Körper verdaute Holzfaser (Cellulose etc.) einen erheblich geringeren Werth als Nährstoff hat, wie andere Kohlehydrate — vielleicht sogar völlig werthlos ist —, dürften durch die «künstliche» Verdauung der Kohlehydrate wichtige Anhaltspunkte zur Werthschätzung der Nahrungs- und Futtermittel zu erhalten sein und jedenfalls viel bessere, wie durch die bis jetzt übliche Bestimmung der Holzfaser. Wir gestatten uns daher den Vorschlag zu machen, in Zukunft bei Untersuchungen von Nahrungs- und Futtermitteln die Holzfaser (Rohfaser, Cellulose) nicht mehr zu bestimmen, sondern statt dessen die künstliche Verdauung der Kohlehydrate vorzunehmen.
