(Aus dem thierphysiol. Institut der kgl. landwirthschaftl. Hochschule zu Berlin.)

Ein Beitrag zur Frage der Celluloseverdauung im Darmcanale.

Von

Dr. **Erich Müller.**

Im Jahre 1897 hat K. Knauthe¹⁾ in einer Publication, welche sich mit Untersuchungen über Verdauung und Stoffwechsel bei Fischen beschäftigte, über ein Cellulose auflösendes und Zucker bildendes Enzym im Hepatopankreas und Dünndarminhalt des Karpfens berichtet. Da die damals angestellten Versuche nicht sehr zahlreich waren und andererseits ein derartiges Enzym etwas Aussergewöhnliches war, traten allmählig doch Bedenken und Zweifel auf, ob dieses Enzym wirklich ein constanter Bestandtheil des Hepatopankreas des Karpfens wäre, oder ob nicht damals besondere Verhältnisse vorgelegen hätten, welche diese enzymatische Wirkung hervorgerufen oder begünstigt hatten. Ich kam desshalb gern dem Wunsche meines hochverehrten Lehrers, Herrn Professor Dr. Zuntz, nach und unterzog den Befund von Knauthe einer Nachprüfung.

Inzwischen hatten W. Biedermann und P. Moritz²⁾ ein Cellulose auflösendes und Zucker bildendes Enzym bei einem wirbellosen Thiere — der *Helix pomatia* — gefunden und darüber ausgezeichnete Untersuchungen veröffentlicht. Es lag nahe, auch diese Versuche zu wiederholen, und ich füge das Resultat den vorher Erwähnten bei.

Diese Berichte von Knauthe und „Biedermann und Moritz“ stehen insofern gesondert da, als die Forschungen über die Celluloseverdauung bei Pflanzenfressern, besonders die vorzüglichen und

1) K. Knauthe, Untersuchungen über Verdauung und Stoffwechsel bei Fischen. Zeitschr. f. Fischerei 5. Jahrg. S. 189. Herausg. von C. Weigelt. 1897.

2) W. Biedermann und P. Moritz, Ueber ein Cellulose lösendes Enzym im Lebersecret der Schnecke. Pflüger's Archiv für die gesammte Physiologie Bd. 73 S. 219. 1898.

sehr eingehenden Untersuchungen von H. Tappeiner¹⁾, uns immer mehr dahin geführt haben, bei den Pflanzenfressern eine Auflösung der Cellulose durch Gärungsvorgänge, also durch Bakterienwirkung anzunehmen. Die Producte dieser Celluloseauflösung sind Fettsäuren und Gase, also Körper, welche für den Stoffwechsel theils ganz verloren gehen, theils weniger werthvoll als Zucker sind. Im Verlaufe meiner eigenen Versuche bin ich auch noch dieser Frage näher getreten und habe untersucht, ob nicht vielleicht beim Pflanzenfresser — mein Versuchsthier war eine Ziege — vorübergehend bei der Celluloseverdauung Zucker entsteht, welcher ja später der Bakterienwirkung der Gärungsvorgänge wieder anheimfallen kann.

Ich möchte zunächst ganz kurz hier das Resultat der W. Biedermann und P. Moritz'schen Untersuchungen berichten. Diese beiden Forscher fanden das Cellulose auflösende Enzym nur im obersten Dünndarminhalt der Schnecke. Dieser stellt eine klare, braungelbe Flüssigkeit dar. Feine Schnitte von Mais, Reis, Kartoffeln und anderen Früchten wurden mit dem Inhalte des obersten Dünndarms einer Schnecke beschickt, längere Zeit sich selbst überlassen und dann unter dem Mikroskope die Einwirkung untersucht. Nach einigen Stunden war das feine Cellulosenetz dieser Schnitte deutlich angefressen, und nach längerem Verweilen erfolgte eine völlige Auflösung der Cellulose. Dieses celluloselösende Enzym war jedoch nur wirksam für frische, unpräparierte Cellulose, ohne Einfluss jedoch für chemisch behandelte Cellulose, wie Fliesspapier. Gleichfalls interessant war die Thatsache, dass die Lebersubstanz selbst oder ein Extract aus derselben unwirksam war. Biedermann schliesst daraus, dass das hypothetische Enzym sich erst bei der Secretion bilde und deshalb erst im Dünndarm zu finden sei.

Meine Nachprüfung der Biedermann-Moritz'schen Versuche ergab Folgendes. Der oberste Abschnitt des Dünndarms von Gartenschnecken wurde in der von Biedermann²⁾ beschriebenen Weise an beiden Enden abgebunden, geöffnet und der Inhalt in einem Porzellanschälchen gesammelt. Nach Hinzufügung einer Spur Thymol wurden feine Schnitte von Kartoffeln hineingethan und zur

1) H. Tappeiner, Untersuchungen über die Gärung der Cellulose, insbesondere über deren Lösung im Darmcanale. Zeitschrift für Biologie Bd. 19 S. 228. 1883.

2) l. c. S. 238.

Controle andere Schnitte derselben Kartoffel in mit Thymol versetztem Wasser aufbewahrt. Die Wirkung war deutlich. Es zeigte sich unter dem Mikroskope, dass die bekannten glänzenden Fasern des Cellulosenetzes nach wenigen — etwa 6 — Stunden angenagt aussahen; nach 24 Stunden war das ganze Netz aufgelöst; an seiner Stelle befand sich eine braungelbe, structurlose Masse, in welcher die fast unverletzten Stärkekörner sehr gut zu erkennen waren. Ein weiterer Versuch zeigte die Bildung von Zucker aus frischer Kartoffelcellulose unter der Einwirkung des Dünndarminhaltes der Schnecke. Es wurden Kartoffeln fein zerrieben, und der Kartoffelbrei einer mehrstündigen Verdauung durch Rinderpankreas und im Anschluss daran der Einwirkung von Ptyalinum siccum — Merck — ausgesetzt. Auf diese Weise gelang es, aus dem Kartoffelbrei die Stärke zu entfernen, und durch häufig wiederholtes Auswaschen eine reine Cellulose zu erhalten. Die Ausspülung wurde so lange fortgesetzt, bis das Spülwasser keine Zuckerreaction mehr zeigte. Nun wurde der Dünndarminhalt einer Schnecke mit etwas Thymol und Sodalösung versetzt und eine Portion dieser Mischung mit einer kleinen Menge der vorbereiteten Cellulose versetzt, eine andere sich selbst überlassen. Die Prüfung auf Zucker wurde nur qualitativ ausgeführt, sie fiel in der Probe mit Cellulose deutlich positiv, in dem Controlversuch deutlich negativ aus.

Die Angabe von Biedermann über die Fähigkeit des Dünndarminhaltes der Schnecke, Cellulose aufzulösen, und zwar unter Bildung von Zucker, bestätigt sich danach. Auch die Annahme, dass es sich hierbei um die Wirkung eines unorganisirten Enzyms handelt, scheint zu Recht zu bestehen; denn das Thymol hatte eine Fäulniss oder eine wesentliche Entwicklung von Bakterien nicht zu Stande kommen lassen. Ich komme nun zu meinen Untersuchungen über das Enzym im Hepatopankreas und Dünndarm des Karpfens. Knauth hatte gefunden, dass bei der Filtration von Hepatopankreasextract und Dünndarminhalt von Karpfen das Filtrirpapier zum Theil aufgelöst wurde. Er nahm desshalb an, dass das Hepatopankreas des Karpfens einen Körper, ein Enzym enthalte, welches im Stande wäre, Cellulose aufzulösen und dabei Zucker zu bilden. Die Versuche von Knauth wurden im Sommer angestellt, also zu einer Zeit, wo der Stoffwechsel der Fische ein reger ist.

Ich lasse nun meine eigenen Versuche folgen. Das Hepatopankreas eines Karpfens, welcher längere Zeit in einem gut durch-

lüfteten Wasserbassin gefüttert war, wurde vorsichtig vom Darm gelöst und von dem anhaftenden Fett befreit. Darauf wurde es mit einer Scheere fein zerschnitten, in einem Porzellanmörser zu einem möglichst feinen Brei verrührt und schliesslich durch eine 3fach zusammengelegte Mullschicht durchgepresst. Der so vorbereitete Hepatopankreasextract stellte eine rothbraune, dickflüssige und fast gleichmässige Masse dar. In gleicher Weise wurde die vorsichtig vom obersten Dünndarm abgekratzte Schleimhaut zum eigentlichen Versuche hergerichtet. Es wurden nun von beiden breiförmigen Flüssigkeiten etwa gleiche Portionen genau abgewogen, mit etwas Thymol zur Verhütung der Fäulniss und mit je 40—60 ccm einer 0,5%igen Sodalösung versetzt. Je einer Portion wurde Fliesspapier, welches auf constantes Gewicht gebracht und genau abgewogen war, hinzugefügt, während die andere zur Controle ohne Fliesspapier blieb. Diese Proben wurden dann im Wärmeschränk bei 24° C. 3—6 Stunden unter öfterem Umschütteln stehen gelassen, danach nach schwacher Ansäuerung mit Essigsäure abgekocht, durch Asbest filtrirt und quantitativ auf ihren Zuckergehalt — Titration nach Fehling — geprüft.

Versuch I am 4. Juni 1899.

Versuch a.

Angewandter Hepatopankreasextract	4,15 g
Papiermenge	1,312 g
Sodalösung	50,0 ccm

Diese Mischung wird sechs Stunden im Wärmeschränk gehalten, dann abgekocht, filtrirt, auf 250 ccm aufgefüllt und titirt.

Es werden davon 33,35 ccm für 20 ccm Fehling'scher Lösung zur Titration verbraucht.

In 33,35 ccm sind also 50 mg Zucker, im ganzen Filtrat 0,3748 g Zucker enthalten.

Versuch b (Controle.)

Hepatopankreasextract	4,19 g
Sodalösung	50,0 ccm

Von dem auf 250 ccm aufgefüllten Filtrat entsprechen 33,02 ccm 20 ccm Fehling'scher Lösung. Im ganzen Filtrat sind also 0,3786 g Zucker enthalten.

Berechnet man nach Versuch b die für Versuch a zu fordernde Zuckermenge, so ergeben sich 0,3749 g gegenüber der gefundenen Menge von 0,3748 g Zucker; eine Zuckerbildung aus Cellulose hat nicht stattgefunden.

Das wieder gesammelte Papier wog: 1,315 g.

Versuch II am 20. Juni 1899.

Versuch a.

Angewandter Hepatopankreasextract	5,12 g
Papiermenge	1,2709 g
Sodalösung	60,0 ccm

Das Filtrat wird auf 300 ccm aufgefüllt. In 63,9 ccm sind 50 mg Zucker enthalten (20 ccm Fehling'sche Lösung), im ganzen Filtrat 0,2347 g Zucker.

Versuch b (Controle).

Hepatopankreasextract	5,39 g
Sodalösung	60,0 ccm

Das Filtrat wird auf 250 ccm aufgefüllt. In 49,05 ccm sind 50 mg Zucker enthalten, im ganzen Filtrat 0,2548 g Zucker. Die für Versuch a zu fordernde Zuckermenge ist 0,2422 g Zucker gegenüber der gefundenen von 0,2347 g.

Das wieder gesammelte Papier wog: 1,2689 g.

Versuch III am 15. Juli 1900.

Versuch a.

Hepatopankreasextract	3,16 g
Papier	1,3462 g
Sodalösung	40 ccm

Das Filtrat wird auf 500 ccm gebracht. In 129,12 ccm sind 50 mg Zucker (20 ccm Fehling'sche Lösung) enthalten, im ganzen Filtrat 0,1936 g Zucker.

Versuch b (Controle).

Hepatopankreasextract	3,49 g
Sodalösung	40,0 ccm

Das Filtrat wird auf 500 ccm gebracht.

In 118,09 ccm sind 50 mg Zucker (20 ccm Fehling'sche Lösung) enthalten, im ganzen Filtrat 0,2117 g Zucker.

Die für Versuch a zu fordernde Zuckermenge ist 0,1917 g Zucker gegenüber der wirklich gefundenen von 0,1936 g.

Das wieder gesammelte Papier wog: 1,3522 g.

Diese Versuche wurden noch häufig wiederholt, das Resultat war stets das gleiche: eine Zuckerbildung aus Cellulose oder ein Verlust von Papier konnte unter diesen Versuchsbedingungen niemals festgestellt werden. In den Proben mit Hepatopankreas fand sich immer Zucker, jedoch im Verhältniss zur angewandten Substanz die gleiche Menge, ob der Probe Papier zugefügt war oder nicht. Die mit Dünndarminhalt angestellten Versuche waren stets negativ, es fanden sich niemals quantitativ nachweisbare Mengen von Zucker.

Auf Grund des oben erwähnten Befundes von Biedermann, welcher nur eine Einwirkung auf frische, chemisch nicht präparirte

Cellulose bei seinen Versuchen gefunden hatte, wurden neuere Versuche in entsprechender Weise modificirt. An Stelle des Fliesspapieres wurde Heu, welches in der Pulvermühle fein pulverisirt war, verwandt. Das Ergebniss war unter sonst gleichen Versuchsbedingungen das gleiche; es liess sich weder eine Auflösung der Cellulose noch eine Zuckerbildung nachweisen. Dann wurden dünne Schnitte von rohen Kartoffeln, welche mit dem Rasiermesser hergestellt waren, einestheils mit Hepatopankreasextract, andererseits mit Dünndarminhalt, um vielleicht das in diesen abgesonderte Enzym nachweisen zu können, beschickt und längere Zeit, 6—24 Stunden, sich selbst überlassen. Zur Controle wurden Schnitte derselben Kartoffel den gleichen Zeitraum in Wasser aufbewahrt. Die Einwirkung wurde unter dem Mikroskope von Zeit zu Zeit geprüft. Es fand sich jedoch auch hier keine Auflösung der Cellulose; das feine, glänzende Cellulosenetz der Kartoffel zeigte sich auch nach vierundzwanzigstündiger Einwirkung unversehrt. Schliesslich wurden, um die Versuchsbedingungen von Knauth genau nachzuahmen, Hepatopankreasextract und Dünndarminhalt durch gewöhnliches Filtrirpapier in der Weise hindurchfiltrirt, dass das Filtrat Stunden lang immer von Neuem auf das Filter gegossen wurde und das Filter so wiederholt passirte. Der Erfolg blieb auch hier aus. Das Filtrirpapier zeigte sich in jeder Beziehung unverletzt und unbeschädigt.

Diese Versuche zeigen, dass entweder die Beobachtung von Knauth auf einem Irrthum beruht, oder dass es uns, trotzdem unsere Versuche durch Herrn K. Knauth controlirt wurden, nicht geglückt ist, die Versuchsbedingungen wiederzufinden, unter welchen das Hepatopankreas des Karpfens seine Cellulose auflösende und Zucker bildende Kraft entwickelt.

Ich gehe jetzt zu den Eingangs erwähnten Untersuchungen über, welche sich mit dem Nachweis von Zucker als einem vielleicht intermediären Stoffwechselproduct der Celluloseverdauung bei Pflanzenfressern beschäftigen sollten.

Das Versuchsthier war eine Ziege. Es war von vornherein anzunehmen, dass, falls sich Zucker bildete, dieser im Pansen zuerst zu finden sein müsste. Von dieser Ueberlegung ausgehend legten wir der Ziege eine Pansenfistel an. Die Operation wurde in zwei Perioden ausgeführt. Das erste Mal wurde durch einen etwa 10 cm langen Schnitt, der anatomischen Lage des Pansens entsprechend,

die Bauchhöhle eröffnet, der Pansen hervorgeholt und nach vorsichtiger Anfrischung mit dem parietalen Bauchfell vernäht. Die Bauchwunde wurde durch Tampons offen gehalten. Nach etwa 13 Tagen war die Verwachsung des Pansens mit dem Bauchfell vollendet. Nun wurde der Pansen in einer zweiten Operation eröffnet und die Communication nach aussen durch eine gläserne, verschlossene Dauercanüle offen gehalten. Es gelang, nach weiteren acht Tagen, nachdem die Wunde einige Tage geeitert hatte, die Wundflächen zur Heilung zu bringen, und es war nun leicht, reichliche Mengen Panseninhalt ohne jede Beimischung zu gewinnen. Das Thier befand sich dabei wohl und gab reichlich Milch. Die Nahrung bestand aus Wiesenheu und Hafer.

Die Versuchsanordnung war die folgende: Der Panseninhalt wurde in der Weise gewonnen, dass der Verschluss der Canüle geöffnet wurde; es floss dann ohne jede weitere Manipulation eine reichliche Menge — 300—500 ccm — in Form einer gelben, schwerflüssigen Masse, in welcher Heufasern herumschwammen, heraus. Von dieser Flüssigkeit wurden 50—100 ccm (je nach der gewonnenen Menge) leicht angesäuert — die ursprüngliche Reaction war zumeist neutral oder nur ganz schwach sauer —, abgekocht und auf den eventuellen Zuckergehalt geprüft. Eine zweite, gleichgrosse Probe wurde abgekocht, mit menschlichem Speichel oder mit Ptyalinum siccum von Merck versetzt, im Brutschrank sechs Stunden bei 39° C. unter häufigem Umschütteln gehalten, filtrirt und gleichfalls auf Zucker untersucht. Dieser Versuch sollte die Frage entscheiden, ob im Panseninhalt Stoffe vorhanden sind, welche durch ein diastatisches Ferment verzuckert werden können. Es ergab sich, dass der Panseninhalt zur Zeit der Probenahme immer sowohl von Zucker als auch von Stärke und ähnlichen, mit Speichel Zucker bildenden Substanzen frei war. Die dritte Probe endlich wurde unter den natürlichen Verhältnissen möglichst entsprechenden Bedingungen einer Nachgärung unterworfen.

Wenn man bei solchen Nachgärungen, wie sie ja namentlich Tappeiner in vielfach variirter Form ausgeführt hat, zwar Auflösung der Cellulose, aber keine Bildung von Zucker, sondern nur solche von niederen Fettsäuren, Methan und Kohlensäure beobachtet, so kann dies darin seinen Grund haben, dass der anfänglich gebildete Zucker alsbald von den Spaltpilzen weiter verändert wird. Es erschien desshalb nicht aussichtslos, in der Art zu ver-

fahren, dass man den diffusibeln Zucker in dem Maasse, wie er etwa gebildet wurde, aus dem Bereich der Gärungserreger entfernte, in analoger Weise, wie es im Darmcanal durch die Resorption geschehen dürfte. Wir erstrebten dies durch folgende Einrichtung, welche zugleich gestattete, die Probe einmal bei einer der Körperwärme des Versuchstieres entsprechenden constanten Temperatur und unter Abschluss der atmosphärischen Luft zu halten, dann die sich voraussichtlich bei der Nachgärung entwickelnden Gase in geeigneter Weise abzuführen.

Ein cylindrisches Glasgefäss mit einem Durchmesser von 5 cm war an seinem oberen Ende mit einem engeren Ansatzstück (Durchmesser 2 cm) verschmolzen. Die weitere — untere — Oeffnung war durch einen doppelt durchbohrten Gummistopfen, über welchen ein an seinem anderen Ende verschlossener Diffusionsschlauch gestülpt war, verschlossen. Dieser befand sich frei im Innern des Glasgefässes. Letzteres wurde mit Panseninhalt (175—200 ccm) gefüllt, welcher so den Diffusionsschlauch umspülte. Durch die doppelte Durchbohrung des unteren Gummistopfens führten zwei Glasröhren in das Innere des Schlauches; die eine, die zuführende, mündete direct unterhalb des oberen Verschlusses des Schlauches, die andere, die ableitende, direct oberhalb des unteren Gummistopfens. Die vorher erwähnte, obere und engere Oeffnung des Glasgefässes war durch einen einfach durchbohrten Gummistopfen, durch dessen Oeffnung eine dicht unter demselben endigende Glasröhre führte, verschlossen; die letztere war an ihrem freien Ende mit einem Gummischlauche versehen, welcher seinerseits in ein mit Wasser gefülltes Gefäss eintauchte. Durch diese Vorrichtung hatten einerseits die sich bei der Gärung bildenden Gase freien Abzug, andererseits war der Panseninhalt im Innern des Glasgefässes von der atmosphärischen Luft abgeschlossen. In den Diffusionsschlauch wurde angewärmte, physiologische Kochsalzlösung eingeleitet und in bestimmten Zeitabschnitten wieder abgelassen. Bildete sich bei der Gärung Zucker, so musste er in die zuckerfreie Kochsalzlösung im Diffusionschlauch überdiffundiren und konnte dem Nachweise nicht entgehen. Die Einführung der Kochsalzlösung geschah aus einer in geringer Höhe angebrachten Flasche, welche durch einen Gummischlauch mit der zuführenden Röhre des Diffusionsschlauches verbunden war, die Ableitung durch einen dritten, mit der ableitenden Röhre communicirenden Schlauch. Durch Klemmen waren die Zufuhr

und der Abfluss beliebig zu regeln. Der ganze Apparat wurde in einem Wasserbade — einem etwa 20 Liter enthaltenden Kupferkessel — bei einer constanten Temperatur von 39° – 40° C. gehalten. Die Gärung wurde im Durchschnitt sechs Stunden unterhalten, die Kochsalzlösung wurde stündlich gewechselt und in einem zur Ansäuerung mit etwas Essigsäure beschickten Glasgefässe für die spätere Zuckerbestimmung aufbewahrt. Von Zeit zu Zeit wurde der Apparat geschüttelt, um den Panseninhalt zu mischen und alle Theile mit der Oberfläche des Diffussionsschlauches in Berührung zu bringen. Es entwickelten sich thatsächlich reichlich Gase, entsprechend den Erfahrungen von Tappeiner.

Das Ergebniss war, dass sich bei keiner der verschiedenen Versuchsanordnungen Zucker fand. Die Versuche wurden mehrfach wiederholt, das Resultat war immer das gleiche, negative. Erwähnen möchte ich noch, dass ich auch nach Abschluss der Gärung den Pansenbrei aus dem Glasgefässe auf seinen Zuckergehalt prüfte. Ich konnte auch hier niemals Zucker nachweisen.

Einigermassen überraschend ist es, dass im Panseninhalt unserer Ziege bei Fütterung mit Heu und Hafer niemals Zucker nachweisbar war; es waren auch niemals Haferkörner oder Theile derselben, sondern nur Heufasern darin zu sehen. Es scheint, dass die Bestandtheile des Körnerfutters direct in den Labmagen befördert wurden. Es verdient wohl eine weitere Untersuchung, wie weit diese Art der Trennung, welche ja offenbar sehr zweckmässig ist, weil sie die Stärke des Körnerfutters den Gärungserregern im Pansen entzieht, bei der Ziege und anderen Wiederkäuern als Regel zu betrachten ist.

Die Angaben mancher früheren Autoren, dass bei der Celluloseauflösung im Darmcanal der Pflanzenfresser Zucker entsteht oder wenigstens als Zwischenproduct gebildet wird, scheinen nach diesen Versuchen — zum Mindesten für die Ziege — nicht zu Recht zu bestehen. Vielmehr scheint die Cellulose, wenigstens die der Gramineen, für den Stoffwechsel nur die Bedeutung zu haben, welche ihr Tappeiner auf Grund seiner Versuche zugesprochen hat.