

## Ueber ein proteolytisches Enzym in der Milz.

Von

S. G. Hedin und S. Rowland.

(Der Redaction zugegangen am 11. März 1901.)

Schon mehrmals ist die Milz mit der Darmdigestion in Verbindung gestellt worden und zwar in der Weise, dass dieselbe die Pankreasverdauung verstärken soll. Nach Schiff soll die Milz von der 4. bis 7. Stunde der Magenverdauung einen Stoff enthalten, der, durch das Blut dem Pankreas zugeführt, die Bildung des Trypsins verursacht.<sup>1)</sup> Herzen fand, dass Pankreasinfus, mit Milzinfus versetzt, Fibrin rascher verdaut, als ohne Milzinfus. Diese Wirkung schreibt er einer Substanz zu, die das Zymogen des Pankreas in Trypsin verwandelt.<sup>2)</sup> Der Schiff-Herzen'schen Lehre von der Beeinflussung des Pankreas durch die Milz schliessen sich Gachet und Pachon auf Grund eigener Versuche an,<sup>3)</sup> während Lusanna und Schindeler, sowie auch Ewald<sup>4)</sup> die volle Wirksamkeit des Pankreas von entmilzten Hunden behaupten, was auch in der letzten Zeit von Popelski unter gewissen Bedingungen constatirt wurde.<sup>5)</sup>

1) Maly's Jahresber., Bd. 7. S. 320.

2) Pflüger's Archiv, Bd. 30. S. 295 und Bd. 84. S. 126.

3) Arch. de physiol., Bd. 30. S. 363.

4) Maly's Jahresber., Bd. 10. S. 322.

5) Maly's Jahresber., Bd. 29. S. 353.

Bei unseren Untersuchungen sind wir in der Weise verfahren, dass die Milz so frisch als möglich vom Schlachthause geholt, zerkleinert, mit Sand vermischt und in einem besonderen von S. Rowland construirten Apparate 2—3 Stunden lang behandelt wurde, wodurch die Zellen gequetscht und das Ganze in eine breiähnliche Masse verwandelt wurde. Darauf wurde mit Kieselguhr vermischt und mittelst einer hydraulischen Presse der Milzsaft ausgepresst. Diese Behandlung wurde von S. Rowland ausgeführt, während die chemischen Arbeiten von S. G. Hedin herrühren.

Der Presssaft war von Hämoglobin roth gefärbt und die Reaction war immer stark sauer. Um zu prüfen, ob der Saft möglicher Weise ein eiweissverdauendes Enzym enthält, wurde derselbe zunächst zur Autolyse bei Körpertemperatur in Gegenwart von Toluol hingestellt. Der durch Gerbsäure nicht fällbare Antheil des Stickstoffes wurde vor und nach der Digestion ermittelt. Für die Fällung wurde eine 7%ige, mit etwas Essigsäure versetzte Lösung gebraucht, und zwar wurde ein Volum Milzsaft mit dem gleichen Volumen Gerbsäurelösung versetzt, was für vollständige Ausfällung völlig ausreichte. In 5 cem. des Filtrats wurde der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt.

#### Versuch 1 (Rindermilz).

Die Acidität des Milzsaftes entsprach etwa 25 cem.  $\frac{1}{10}$ N-NaOH in 100 cem. Saft. Der Saft wurde theils ohne irgend einen Zusatz, theils mit Essigsäure (0,25%) digerirt. Die Resultate sind aus folgender Tabelle ersichtlich.

Die Ziffern geben die Anzahl Cubikcentimeter  $\frac{1}{10}$ N-Säure an, welche dem Stickstoff von 5 cem. unverdünntem Saft entsprechen.

Der ganze Stickstoffgehalt von 5 cem. Saft entsprach 42,7 cem. Säure.

	Vor der Digestion	Nach 16 Stunden	Nach 22 Stunden	Nach 40 Stunden
Ohne Zusatz . . . . .	7,4	7,4	16,4	16,4
Mit Essigsäure . . . . .	—	30,0	33,8	34,2

Eine Probe wurde auf dem Wasserbade erhitzt und mit Gerbsäure gefällt. Der nicht fällbare Stickstoff entsprach 7,6 ccm. Säure.

Eine andere Probe wurde erhitzt und 16 Stunden lang mit Essigsäure bei 37° digerirt. Der nicht fällbare Stickstoff entsprach 7,4 ccm. Säure.

### Versuch 2 (Rindermilz).

In diesem Falle wurden verschiedene Proben ohne Zusatz, mit Essigsäure (0,25%), mit Salzsäure (0,1%) und mit Natriumcarbonat (0,37%) digerirt. Der ganze Stickstoffgehalt entsprach für 5 ccm. 35,1 ccm. Säure.

	Vor der Digestion	Nach 16 Stunden	Nach 22 Stunden	Nach 40 Stunden
Ohne Zusatz . . . . .	7,2	17,4	17,6	19,8
Mit Essigsäure . . . . .		26,7	27,8	30,0
Mit HCl . . . . .		25,0	27,8	30,2
Mit Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> . . . . .		9,6	9,4	10,8

Eine erhitzte und sofort gefällte Probe ergab die Ziffer 7,4; eine erhitzte und mit Essigsäure (0,25%) 16 Stunden lang digerirte Probe ergab die Zahl 7,6.

### Versuch 3 (Rindermilz).

Verschiedene Proben wurden mit Essigsäure (0,25%) und mit Milchsäure (0,25%) digerirt. Die Lösungen wurden theils mit Gerbsäure wie zuvor, theils mit einer Lösung von 40%iger Phosphorwolframsäure und 10%iger Schwefelsäure gefällt. Da die Gerbsäure im Ueberschuss das Pepton nicht fällt, die Phosphorwolframsäure aber ausser dem Eiweiss auch Pepton und möglicher Weise vorhandene Basen fällt, wird der Unterschied zwischen dem Stickstoffgehalt des Phosphorwolframsäurefiltrats und des Gerbsäurefiltrats ein ungefähres Maass von Pepton und Basen repräsentiren. Die Ziffern der Tabellen haben dieselbe Bedeutung wie vorher. Der ganze Stickstoffgehalt entsprach 38,7 ccm. Säure.

### Digestion mit Essigsäure.

	Vor der Digestion	Nach 40 Stunden	Nach 110 Stunden
Gefällt mit Gerbsäure . . . . .	8,4	34,6	34,5
Gefällt mit Phosphorwolframsäure . .	5,4	17,8	20,0

### Digestion mit Milchsäure.

	Vor der Digestion	Nach 40 Stunden	Nach 110 Stunden
Gefällt mit Gerbsäure . . . . .	8,4	34,8	34,5
Gefällt mit Phosphorwolframsäure . .	5,4	17,6	20,4

Eine Probe, digerirt mit Milchsäure 150 Stunden lang, ergab, mit Phosphorwolframsäure gefällt, ganz dasselbe Resultat, wie nach 110 Stunden.

### Versuch 4 (Rindermilz).

Die Acidität des Saftes entsprach für 100 cem. 40 cem. 1/10-n-Lauge.

Für die Fällung wurde in verschiedenen Proben Gerbsäure, Phosphorwolframsäure, sowie in einigen Fällen Sättigung mit Zinksulfat in schwefelsaurer Lösung benutzt. Da nach den Angaben von Baumann und Bömer das Zinksulfat Eiweiss und Albumosen, nicht aber Pepton ausfällt, darf man erwarten, dass die Gerbsäure und das Zinksulfat dieselben Resultate ergeben werden. Die folgenden Ziffern bestätigen dies. Die Digestion wurde in mit wasserfreiem Natriumcarbonat neutralisierter Lösung, in saurer Lösung ohne irgend einen Zusatz, in mit Essigsäure (0,25<sup>0/0</sup>) und mit Salzsäure (0,1<sup>0/0</sup>) versetzter Lösung vorgenommen.

Der gesammte Stickstoffgehalt entsprach 39,6 cem. Säure.

### Neutralisirter Saft.

	Vor der Digestion	Nach 40 Stunden	Nach 90 Stunden
Gefällt mit Gerbsäure . . . . .	13,9	19,1	20,4
Gefällt mit PWo-Säure . . . . .	6,5	—	10,9

Saurer Saft ohne Zusatz.

	Vor der Digestion.	Nach 10 Stunden	Nach 90 Stunden
Gefällt mit Gerbsäure . . . . .	13.9	32.8	32.4
Gefällt mit PWo-Säure . . . . .	6.5	—	20.8
Mit Essigsäure.			
Gefällt mit Gerbsäure . . . . .	13.9	33.0	33.5
Gefällt mit PWo-Säure . . . . .	6.5	17.4	18.0
Gefällt mit ZnSO <sub>4</sub> . . . . .	13.9	32.3	—
Mit Salzsäure.			
Gefällt mit Gerbsäure . . . . .	13.9	32.8	33.6
Gefällt mit PWo-Säure . . . . .	6.5	17.4	19.6

Eine Portion wurde auf dem Wasserbade erhitzt, mit Essigsäure wie vorher versetzt, 16 Stunden lang autolysirt und mit Gerbsäure gefällt; 5 cem. unverdünnter Saft entsprachen 15.2 cem. Säure. Unter denselben Verhältnissen, nur ohne Aufkochen, wurde die Ziffer 31,4 erhalten.

Versuch 5 (Rindermilz).

Fällung mit Gerbsäure. Die Digestion wurde in mit Essigsäure (0,25 %) versetzter, in neutralisirter und in alkalischer Lösung (0,2 % Soda) ausgeführt. Der Gesamtgehalt an Stickstoff entsprach für 5 cem. Saft 30,2 cem. Säure.

	Vor der Digestion	Nach 16 Stunden	Nach 40 Stunden
Mit Essigsäure . . . . .	11.8	25.6	26.7
Neutral . . . . .	—	14.2	17.5
Mit Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> . . . . .	—	13.6	15.2

Versuch 6 (Pferdemilz).

Die Acidität entsprach für 100 cem. 35 cem. 1/10 n-Lauge.

Die Analysen wurden alle mit Gerbsäure ausgeführt. Der gesammte Stickstoffgehalt entsprach für 5 cem. Saft 51 cem. Säure.

	Vor der Digestion	Nach 16 Stunden	Nach 40 Stunden
Mit Essigsäure . . . . .	5.2	30.7	31.8
Ohne Zusatz . . . . .	—	13.6	20.6
Mit Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> . . . . .	—	8.1	8.2

Versuch 7 (Schafmilz).

100 ccm. Saft wurden neutralisirt durch etwa 20 ccm. <sup>1</sup>/<sub>10</sub> N-Lauge. Fällung mit Gerbsäure. Der Stickstoff in 5 ccm. entsprach 29,3 ccm. Säure.

	Vor der Digestion	Nach 16 Stunden	Nach 40 Stunden
Mit Essigsäure (0.25%) . . . . .	6.6	24.8	26.2
Ohne Zusatz . . . . .	—	17.2	22.5
Neutral . . . . .	—	8.2	9.0
Mit Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0.2%) . . . . .	—	7.7	8.3

Nach Erhitzen auf dem Wasserbade und Fällung mit Gerbsäure wurde in 5 ccm. unverdünnten Saftes Stickstoff, entsprechend 8,9 ccm. Säure, gefunden. Da ohne Erhitzen die Ziffer 6,6 erhalten wurde (siehe die Tabelle), hat offenbar das Erhitzen einen kleinen Antheil des Eiweisses in durch Gerbsäure nicht fällbare Form übergeführt. Nach Erhitzen und Digeriren mit Essigsäure (0,25%), 16 Stunden lang, wurde die Ziffer 9,1 und nach 40 Stunden die Zahl 9,2 erhalten.

Versuch 8 (Schweinemilz).

Die Reaction des Saftes entsprach für 100 ccm. 14 ccm. <sup>1</sup>/<sub>10</sub> N-Säure. Fällung mit Gerbsäure. Der Gesamtstickstoff von 5 ccm. Saft entsprach 28,3 ccm. Säure.

	Vor der Digestion	Nach 16 Stunden	Nach 40 Stunden
Mit Essigsäure (0.25%) . . . . .	6.4	21.6	23.3
Ohne Zusatz . . . . .	—	13.5	16
Neutral . . . . .	—	9.6	11.4
Mit Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0.2%) . . . . .	—	7.6	7.6

Auf dem Wasserbade erhitzter Saft ergab sogleich gefällt die Zahl 7,2 und nach Digeriren mit Essigsäure 40 Stunden lang die Ziffer 8,2.

Aus den erwähnten Versuchen geht zur Genüge hervor:

1. Der durch Gerbsäure nicht fällbare Stickstoff des erhitzten Milzsafts wird während der Digestion mit 0,25%iger Essigsäure bei Körpertemperatur nicht wesentlich geändert (Versuch 1, 2, 4, 7, 8).

2. Der mit Gerbsäure, Phosphorwolframsäure oder Zinksulfat nicht fällbare Antheil des Stickstoffes nimmt während Aufbewahrens des frischen Milzsaftes bei Körpertemperatur in Gegenwart von Toluol zu. Diese Veränderung des Eiweisses ist eine sehr schwache oder bleibt ganz aus in alkalischer, etwas stärker in neutraler und am stärksten in saurer Lösung. Bisweilen ist die Acidität des Presssaftes eine so starke, dass eine zugegebene Säure keinen weiteren Einfluss hat (Versuch 4).

3. Der mit Phosphorwolframsäure nicht fällbare Stickstoff erreicht nicht die Grösse des durch Gerbsäure nicht fällbaren. Indessen können wir aus den Versuchen 3 und 4 ersehen, dass die mit Phosphorwolframsäure fällbaren Substanzen eine Veränderung erfahren zu einer Zeit, wenn die mit Gerbsäure nachweisbaren Veränderungen schon zum Stillstand gekommen sind, was nach etwa 40 Stunden stattfindet.

Wir glauben auf Grund des Gesagten folgern zu können, dass die Milz von Rind, Pferd, Schaf und Schwein ein proteolytisches Enzym enthält, das am stärksten in saurer Lösung wirkt.

Ob das Enzym in Form von einem Zymogen vorhanden ist, das durch die Säure gespalten wird unter Freiwerden des Enzyms, oder ob die Säure für die Wirkung des freien Enzyms von Bedeutung ist, muss bis auf Weiteres dahingestellt bleiben.

In den bereits erwähnten Versuchen haben wir die Wirkung des Milzenzyms auf die im frischen Milzsaft vorhandenen Eiweisskörper untersucht: ausserdem haben wir auch die Frage in Angriff genommen, ob der Milzpresssaft auch zugesetzte Eiweisskörper zu digeriren im Stande sei.

Zu dem Zweck haben wir zunächst geprüft, ob eine mässige Verdünnung irgend einen Einfluss auf die Autolyse ausübt. Milzsaft wurde theils unverdünnt, theils mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt zur Digestion mit Essig-

säure hingestellt und nach 16 Stunden mit Gerbsäure gefällt. Im ersten Falle wurde für 5 ccm. des unverdünnten Safts Stickstoff, entsprechend 33 ccm. Säure, gefunden und im zweiten Falle entsprechend 32,8 ccm.

#### Versuch 9.

Durch diesen Versuch beabsichtigten wir die Einwirkung von Milzsaft (vom Rind) auf die Eiweisskörper des defibrinirten Blutes, sowie auf das Fibrin zu erforschen. Der Stickstoff von 5 ccm. Saft entsprach 34 ccm. 1/10n-Säure.

Der durch Gerbsäure nicht fällbare Stickstoff entsprach für 5 ccm. unverdünnten Saftes nach Digestion mit Essigsäure (0,25%) 40 Stunden lang 27,5 ccm. Säure.

10 ccm. defibrinirtes Blut + 10 ccm. Wasser wurden mit Essigsäure 40 Stunden lang digerirt. Der durch 20 ccm. Gerbsäurelösung nicht fällbare Antheil des Stickstoffs entsprach für 5 ccm. des Filtrats 0,7 ccm. Säure.

10 ccm. Milzsaft + 10 ccm. Blut wurden mit Essigsäure 40 Stunden digerirt und mit 20 ccm. Gerbsäurelösung gefällt. Der Stickstoff in 5 ccm. Filtrat entsprach 15,6 ccm. Säure. Wenn von dem Bluteiweiss nichts verändert worden wäre, hätte die Stickstoffmenge  $\frac{27,5}{4} + 0,7 = 7,6$  entsprechen sollen.

Derselbe Milzsaft wurde mit frischbereitetem Fibrin und Essigsäure versetzt (250 g handgepresstes Fibrin auf 450 ccm. Milzsaft). Nach einer Nacht war das Fibrin aufgelöst unter Hinterlassen eines feinen Pulvers und nach 40 Stunden wurde analysirt. Mit Berücksichtigung der durch das feuchte Fibrin verursachten Vermehrung des Flüssigkeitsvolumens wurde der durch Gerbsäure nicht fällbare Stickstoff in 5 ccm. unverdünnten Saftes, 57,4 ccm. Säure entsprechend, gefunden. Eine Kontrollprobe ohne Fibrin ergab 27,5 ccm.

#### Versuch 10.

10 ccm. Milzsaft wurden mit Essigsäure (0,25%) und gekochtem Fibrin 40 Stunden lang digerirt. Dann wurde auf 20 ccm. verdünnt und mit 20 ccm. Gerbsäurelösung gefällt. Der Stickstoffgehalt von 5 ccm. nichtverdünnter Lösung entsprach 67,8 ccm. Säure. Eine Kontrollprobe ohne Fibrin ergab 32,8 ccm.



Wie ersichtlich, besitzt der Milzsaft das Vermögen, die Eiweisskörper des Blutes zu digeriren; besonders leicht wird das Blutfibrin von dem Saft aufgelöst. In der That scheint die Wirkung des Milzsaftes in saurer Lösung mit der des Trypsins verglichen werden zu können. Zum Vergleichen haben wir auch mit Pankreassaft, der in derselben Weise bereitet worden war wie der Milzsaft, Versuche über die Autodigestion in saurer, neutraler und alkalischer Lösung vorgenommen. Der Saft reagirte sauer, und die Acidität entsprach für 100 ccm. etwa 33 ccm.  $\frac{1}{10}$ n-Lauge. Der gesammte Eiweissgehalt von 5 ccm. entsprach 61,7 ccm.  $\frac{1}{10}$ n-Säure. Die übrigen Resultate sind aus folgender Tabelle ersichtlich. Die Ziffern geben wie vorher die Anzahl  $\frac{1}{10}$ n-Säure an, welche dem in 5 ccm. vorhandenen Stickstoff entsprechen, der nicht durch Gerbsäure gefällt wird.

	Vor der Digestion	Nach 16 Stunden
Mit Essigsäure (0,25 <sup>o</sup> %) . . . . .	20,7	50,0
Ohne Zusatz . . . . .	—	53,0
Neutralisirt . . . . .	—	55,2
Mit Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,2 <sup>o</sup> %) . . . . .	—	55,5

Aus diesem Versuche ist ersichtlich, dass die Einwirkung der Säure gerade entgegengesetzt der bei dem Milzsaft ist. Die Digestion in essigsaurer Lösung ist zwar eine sehr starke, aber immerhin schwächer als in neutraler und alkalischer, während das Milzenzym in neutraler und alkalischer Lösung entweder keinen oder nur einen schwachen Einfluss auf das Eiweiss ausübt. Wir glauben daraus folgern zu müssen, dass das Milzenzym nicht mit dem Trypsin identisch ist.

Arbeiten über die bei der Einwirkung des Milzsafts auf Eiweisskörper entstandenen Produkte, sowie über andere naheliegende Fragen sind schon im hiesigen pathologisch-chemischen Laboratorium im Gange.

London, Jenner Institute of preventive Medicine, den 8. März 1901.