

Über die Temperaturempfindlichkeit des rohrzuckerspaltenden Enzyms des menschlichen Jejunums.

Von

H. v. Euler und Karl Myrbäck.

Mit 1 Figur im Text.

(Aus dem biochemischen Laboratorium der Universität Stockholm.)
(Der Redaktion zugegangen am 29. März 1921.)

Der menschliche Dünndarm enthält ein rohrzuckerspaltendes Enzym, dessen Aciditätsverhältnisse stark von den für Hefensaccharase festgestellten abweichen¹⁾. Die Unterschiede der beiden Enzyme sind in dieser Hinsicht so groß, daß man annehmen darf, es handelt sich um zwei, möglicherweise zwar homologe, aber immerhin verschiedene Substanzen mit individuellen, charakteristischen Eigenschaften.

Als eine derjenigen Eigenschaften, welche sich verhältnismäßig leicht quantitativ feststellen lassen, wurde die Temperaturempfindlichkeit des genannten Darmentzyms auf Grund seiner Saccharasewirkung untersucht.

Wie aus den Messungen von Euler und Laurin²⁾ hervorgeht, ist die Konstante der Temperaturempfindlichkeit k_C , unter gegebenen Temperatur-, Zeit- und Aciditätsbedingungen gut reproduzierbar; diejenige Temperatur, bei welcher das Enzym bei optimalem p_H in einer Stunde auf die Hälfte seiner Wirksamkeit inaktiviert wird, läßt sich leicht auf 1 ° C genau feststellen.

Angaben über die Temperaturempfindlichkeit des in Rede stehenden Enzyms liegen in der früheren Literatur ebensowenig vor wie über sonstige Eigenschaften der Darmsaccharase.

¹⁾ Euler und Svanberg, Diese Zeitschrift Bd. 114 (1921).

²⁾ Euler und Laurin, Diese Zeitschrift Bd. 108, S. 64 (1919); Bd. 110, S. 55 (1920).

Material und Methodik.

Als Enzymmaterial verwendeten wir den in der zitierten Arbeit von Euler und Svanberg erwähnten Wasserextrakt der alkoholischen Fällung des aus dem Jejunum gewonnenen Saftes. Um auch hier die Inversionsfähigkeit unserer Enzymlösung zu charakterisieren, geben wir aus der erwähnten Arbeit von Euler und Svanberg die folgenden Zahlen an:

Zusammensetzung der Lösung (60 ccm):

- 25 ccm Enzymlösung Sbg,
- 10 ccm Phosphatpufferlösung,
- 25 ccm Wasser,
- 4,8 g Rohrzucker.

| Stunden | Drehung | k |
|---------|---------|--------|
| 17 | + 2,14 | 0,0039 |
| 51 | + 1,53 | 0,0032 |

Zu unseren Versuchen haben wir die von Svanberg benutzte Enzymlösung Sbg im Verhältnis 67 : 100 verdünnt. Es war hiernach bei gleicher Methodik eine Konstante $k = 0,0023$ zu erwarten.

Nachdem sich in der vorhergehenden Arbeit gezeigt hat, daß das Optimum der Wirksamkeit (18°) um $p_H = 6$ liegt, wurden alle Erhitzungsversuche bei dieser Acidität ausgeführt. Es ist zwar keine Forderung der Theorie, daß die Acidität der optimalen Wirksamkeit mit der Acidität der maximalen Stabilität zusammenfällt, indessen weichen die p_H -Werte für optimale Wirksamkeit und Stabilität erfahrungsgemäß wenig voneinander ab. So beträgt z. B. nach Versuchen von Laurin an Hefensaccharase p_H in beiden Fällen ziemlich übereinstimmend 4,5; etwas größer ist die Differenz bei Malzamylyase, wie neue Versuche ergeben haben, die Herr Adjunkt E. Ernström in einiger Zeit mitteilen wird.

Die Erhitzungsdauer war bei unseren Versuchen durchweg 60 Minuten.

Die Erhitzung der Enzymlösungen geschah unter den von Laurin angegebenen Vorsichtsmaßregeln. Unmittelbar nach

der Abkühlung der Enzymlösung wurde dieselbe mit der Lösung von 4,8 g Rohrzucker in 25 ccm Wasser vermischt.

Die Inversion ging immer bei genau 30° vor sich, und zwar in Rücksicht auf die langen Versuchszeiten, in Gegenwart von Toluol.

Zu jeder Polarisation wurden der Versuchsmischung 10 ccm entnommen und in 10 ccm 5%iger Sodalösung einpipettiert. Die Polarisation geschah bei Zimmertemperatur im 10 cm-Rohr.

Versuche.

Versuch 1.

Erhitzung 1 Stunde auf 45°.

| Stunden | Drehung | k · 10 ⁴ |
|---------|---------|---------------------|
| 0 | + 2°,54 | — |
| 24 | + 2°,07 | 24 |
| 46 | + 1°,77 | 23 |
| 70 | + 1°,51 | 21 |
| 92 | + 1°,18 | 23 |

Versuch 2.

Erhitzung 1 Stunde auf 50°.

| Stunden | Drehung | k · 10 ⁴ |
|---------|---------|---------------------|
| 0 | + 2°,54 | — |
| 21 | + 2°,19 | 22 |
| 44 | + 2°,07 | 15 |
| 71 | + 1°,92 | 12 |
| 95,5 | + 1°,78 | 11,5 |
| 112,5 | + 1°,66 | 11,5 |

Versuch 3.

Erhitzung 1 Stunde auf 52°.

| Stunden | Drehung | k · 10 ⁴ |
|---------|---------|---------------------|
| 0 | + 2°,55 | — |
| 21 | + 2°,39 | 9,7 |
| 48 | + 2°,28 | 7 |
| 72,5 | + 2°,23 | 6 |

Versuch 4.

Erhitzung 1 Stunde auf 55°.

Keine Inversion. Das Enzym ist vollständig unwirksam.

Versuche mit Hefensaccharase.

Bei früheren Versuchen hatte es sich gezeigt, daß die Temperaturempfindlichkeit der Hefensaccharase von der Verdünnung des Enzyms nicht ganz unabhängig ist. Da wir nun hier mit Enzymlösungen gearbeitet haben, deren Wirksamkeit außerordentlich (etwa 100 000 māl) geringer war als die früher von Laurin studierten, haben wir es für erforderlich gehalten, die Hefensaccharase, welche zum Vergleich herangezogen werden sollte, in einer entsprechenden Verdünnung zu untersuchen.

Zu diesem Zweck wurde die früher beschriebene Enzymlösung $3 \Delta \alpha$ im Verhältnis 1 : 10^5 verdünnt.

Hier mußte natürlich die Erhitzung bei der für Hefensaccharase geltenden optimalen Acidität $p_H = 4,5$ geschehen.

Im übrigen war die Methodik genau dieselbe wie oben erwähnt.

Versuch 1b.

Nicht erhitzte Hefensaccharaselösung.

| Stunden | Drehung | $k \cdot 10^4$ |
|---------|---------|----------------|
| 0 | + 2°,55 | — |
| 26 | + 2°,26 | 13 |
| 44 | + 2°,11 | 13 |

Versuch 2b.

Erhitzung 1 Stunde auf 50°.

| Stunden | Drehung | $k \cdot 10^4$ |
|---------|---------|----------------|
| 0 | + 2°,55 | — |
| 25,5 | + 2°,27 | 13 |
| 43 | + 2°,12 | 13 |
| 66 | + 2°,00 | 11 |

Versuch 3b.

Erhitzung 1 Stunde auf 55°.

| Stunden | Drehung | $k \cdot 10^4$ |
|---------|---------|----------------|
| 0 | + 2°,55 | — |
| 24,5 | + 2°,30 | 13 |
| 38 | + 2°,25 | 9 |
| 66 | + 2°,15 | 8 |

Versuch 4b.

Erhitzung 1 Stunde auf 58°.

| Stunden | Drehung | $k \cdot 10^4$ |
|---------|---------|----------------|
| 0 | + 2°,55 | — |
| 24 | + 2°,40 | 8 |
| 47 | + 2°,26 | 8 |
| 68,6 | + 2°,22 | 6 |

Versuch 5b.

Erhitzung 1 Stunde auf 60,5°.

| Stunden | Drehung | $k \cdot 10^4$ |
|---------|---------|----------------|
| 0 | + 2°,55 | — |
| 25,5 | + 2°,52 | 1,5 |
| 47 | + 2°,50 | 1,4 |

Berechnung und Besprechung.

Bei den Versuchen 2 und 3 mit Darmsaccharase nahmen die Inversionskonstanten aus einem noch nicht aufgeklärten Grund ab. Berechnen wir trotzdem Mittelwerte aus jedem Versuch, so ergibt sich folgende Zusammenstellung:

| Erhitzungstemperatur | Inversionskonstante $k \cdot 10^4$ |
|----------------------|---------------------------------------|
| 18° | 23 |
| 45° | 23 |
| 50° | 15 |
| 52° | 7 |
| 55° | 0 |

Berechnet man hieraus den Inaktivierungskoeffizienten $k_C \cdot 10^4$ nach der Formel

$$k_C = \frac{1}{t} \log \frac{k_a}{k_t}$$

so erhält man

| Erhitzungstemperatur | Inaktivierungskoeffizient $k_C \cdot 10^4$ (t in Minuten berechnet) |
|----------------------|--|
| 18° | 0 |
| 45° | 0 |
| 50° | 31 |
| 52° | 86 |
| 55° | ∞ |

Berechnet man hingegen die mit Hefensaccharase ange-
stellten Inversionsversuche, so erhält man folgende Werte:

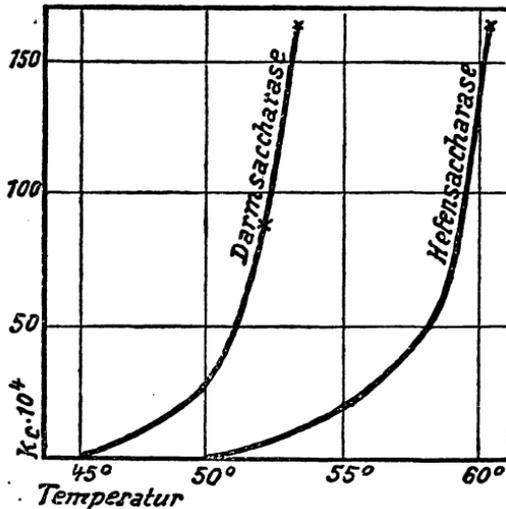
| Erhitzungstemperatur | Inversionskonstante $k \cdot 10^4$ | Inaktivierungskoeffizient $k_C \cdot 10^4$ |
|----------------------|---------------------------------------|--|
| 18° | 13 | 0 |
| 50° | 13 | 0 |
| 55° | 10 | 19 |
| 58° | 7 | 45 |
| 60,5° | 1,4 | 161 |

Aus dieser Tabelle zeigt sich zunächst, daß die Temperaturempfindlichkeit unserer stark verdünnten Hefensaccharase sich von der in stärkeren Konzentrationen bestimmten nicht wesentlich unterscheidet. Die Temperatur der halben Inaktivierung bei 1stündiger Erhitzung kann aus obigen Messungen zu 58,3° interpoliert werden. Aus den früheren Versuchen von Laurin wird 58,7° gefunden.

Die große Verschiedenheit in der Temperaturempfindlichkeit des Darmentzyms und des Hefenzyms geht am deutlichsten aus der graphischen Darstellung der Inaktivierungskoeffizienten k_C hervor (Figur).

Es ergibt sich also, daß das rohrzuckerspaltende Darmenzym bei der Acidität seiner optimalen Wirksamkeit bedeutend temperaturempfindlicher ist als die Hefensaccharase. Die Tem-

peratur der halben Inaktivierung liegt beim Darmenzym etwa 7 Temperaturgrade tiefer als beim Hefenzym. Wenn auch bei einzelnen Hefenrassen diesbezügliche Verschiedenheiten vorkommen¹⁾, so sind dieselben doch in keinem Falle so groß gefunden worden, wie zwischen den hier verglichenen Enzymen.



Was die Verschiedenheiten der beiden Enzyme hinsichtlich der optimalen Acidität betrifft, so wird man annehmen, daß es sich um eine Anpassung an die Acidität des Darmes handelt, welche von Auerbach und Pick²⁾ zu $p_H = 8,2$ gefunden worden ist. Diese Anpassung an die Acidität des Mediums entspricht ganz den für Esterasen gefundenen Verhältnissen. Hier sind durch die Untersuchungen von Michaelis, Rona und Davidsohn zwei deutlich verschiedene Enzymgruppen nachgewiesen worden, von welchen die eine, die Magenlipase, ihr Optimum in saurer Lösung ($p_H = 5-3$), die andere, die Pankreas- und Darmlipase (zu welcher Gruppe auch die Serumlipase gehört), ihr Optimum in schwach alkalischer Lösung ($p_H = 8,5$) besitzen. Leider liegen über diese beiden Enzym-

¹⁾ Vgl. hierzu auch Euler und Laurin, *Biochem. Zeitschr.* Bd. 97, S. 156 (1919) und Bd. 102, S. 258 (1920).

²⁾ Auerbach und Pick, *Biochem. Zeitschr.* Bd. 48, S. 425 (1913).

gruppen noch keine Messungen der Temperaturrempfindlichkeit vor. Eine Saccharase von Aciditätsoptimum $p_H = 7$ haben übrigens kürzlich Avery und Glenn Cullen¹⁾ in Pneumokokken gefunden.

Der Wirkungsgrad der Saccharase im menschlichen Darm verdient übrigens in mancher Hinsicht unsere Aufmerksamkeit. Bekanntlich wird Rohrzucker, per os eingenommen, vor der Resorption gespalten, und geht als solcher erst ins Blut über, wenn sehr große Mengen eingenommen werden²⁾, für deren Spaltung also die Darmsaccharase nicht ausreicht.

Andererseits würde nach Abderhalden³⁾ die intravenöse Einführung von Rohrzucker, wenigstens beim Hund, sofort die Bildung einer Antisaccharase hervorrufen. Nun dürfen allerdings derartige beim Hund gefundene Verhältnisse nicht ohne weiteres auf den Menschen oder auf andere Säugetiere übertragen werden, aber die beiden genannten Tatsachen geben zu weiteren Prüfungen Veranlassung.

Daß das an 37° gewöhnte Enzym für höhere Temperaturen empfindlicher ist als dasjenige der Hefe, welches in der Regel bei Temperaturen zwischen 15° und 25° wirksam ist, kann auffallend erscheinen. Es hängt dies möglicherweise damit zusammen, daß das Hefenzym an größere Temperaturschwankungen angepaßt ist als das menschliche, welches stets bei sehr annähernd konstanter Temperatur tätig ist.

Die geringe Stabilität des menschlichen rohrzuckerspaltenden Enzyms erinnert übrigens, wie auch die gegen die alkalische Seite verschobene optimale Acidität, an die Verhältnisse, welche für die Hefen-Maltase gefunden worden sind⁴⁾, und es ist zu untersuchen, ob nicht das von uns hinsichtlich Rohrzuckerspaltung untersuchte Enzym auch gegenüber Mal-

¹⁾ Avery und Glenn Cullen, Journ. of exp. med. Bd. 32, S. 583 (1920).

²⁾ Siehe J. E. Johansson, Skand. Arch. für Physiol. Bd. 21 (1908).

³⁾ Abderhalden, Abwehrfermente, 4. Aufl., S. 75, und Diese Zeitschrift Bd. 69, S. 23 (1910).

⁴⁾ Michaelis und Rona, Biochem. Zeitschr. Bd. 57, S. 70 (1913). Willstätter und Steibelt, Diese Zeitschr. Bd. 111, S. 157 (1920).

tose wirksam ist. Jedenfalls zeigt unser Präparat solche Wirkungen.

Shungo Osato (Tōhoku Journ. of exp. med. Bd. 1, 1920) hat neuerdings die Verteilung der Maltase in tierischen Därmen untersucht; die Darmschleimhaut des Jejunums fand er an Maltase am reichsten, was mit den hiesigen Resultaten bezüglich Saccharase gut im Einklang steht. Siehe übrigens bezgl. Maltase auch Tebb, Journ. of Physiol. Bd. 15, S. 421 (1893).

Sehr wünschenswert für die Beurteilung der Rohrzuckerspaltung am Verdauungstraktus¹⁾ sind neue Versuche am lebenden Darm unter Zuführung von Rohrzucker, solche Versuche sind in Aussicht genommen.

Zusammenfassung.

Das rohrzuckerspaltende Enzym des menschlichen Jejunums zeigt eine erheblich größere Temperaturempfindlichkeit als das entsprechende Hefenzym; beide Temperaturempfindlichkeiten sind quantitativ verglichen worden (siehe Fig. S. 74).

Hefensaccharase und Darmsaccharase sind also verschiedene Enzyme.

¹⁾ Eine Überschlagsrechnung ergibt, daß z. B. 100 ccm einer 10prozentigen Rohrzuckerlösung per os eingenommen im Magen höchstens zu 10% invertiert wird.