

# Über den Einfluß einiger anorganischen Salze auf die Wirkung der Pankreaslipase.

Von

C. A. Pekelharing.

(Der Redaktion zugegangen am 20. September 1912.)

Die Spaltung von Fett durch Pankreaslipase kann bekanntlich sowohl durch mehrere anorganische Salze als durch Gallensäuren gefördert werden. Daraus geht aber noch nicht hervor, daß man das Recht hat, diese Wirkung immer derselben Ursache, einer sogenannten Aktivierung des Enzyms zuzuschreiben.

Daß die erhöhte Wirksamkeit der Pankreaslipase bei Anwesenheit von Galle hauptsächlich von den darin enthaltenen gallensauren Salzen bedingt wird, ist schon in 1891 von Rachford<sup>1)</sup> nachgewiesen worden. Er fand, daß die Fettsplaltung mittels Pankreassaft des Kaninchens durch Zusatz einer Lösung von Natriumglykocholat beinahe ebensoviel verstärkt wurde als durch Zusatz von Galle. Spätere Forscher, insbesondere Terroine, haben es wahrscheinlich gemacht, daß die Wirkung der Gallensäuren in einem unmittelbaren Einfluß auf das Enzym gelegen ist, daß hier also von einem Aktivator *stricto sensu* gesprochen werden darf.<sup>2)</sup>

Pottevin,<sup>3)</sup> und besonders Terroine,<sup>4)</sup> neuerdings auch Minami,<sup>5)</sup> haben nachgewiesen, daß auch mehrere Elektrolyte die Hydrolyse von Fetten durch Lipase zu fördern imstande sind. Die Art und Weise aber, in welcher die Elektrolyte ihren Einfluß dabei geltend machen, ist, wie Terroine nachdrücklich hervorgehoben hat, völlig unbekannt geblieben.

<sup>1)</sup> Journ. of Physiol. Vol. XII, S. 88.

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr., Bd. XXIII, S. 457.

<sup>3)</sup> Compt. rend. Acad. d. Sc. T. CXXXVI, S. 767.

<sup>4)</sup> l. c. S. 440.

<sup>5)</sup> Biochem. Zeitschr., Bd. XXXIX, S. 392.

Die genannten Forscher haben für ihre Versuche Pankreassaft, oder Glycerinextrakte von Pankreas gebraucht, Flüssigkeiten, welche, außer Lipase, noch eine Menge anderer, in erster Linie eiweißartiger Stoffe und zudem schon mehrere Elektrolyte enthalten. Terroine hat versucht, die Elektrolyte aus dem Pankreassaft mittels Dialyse zu entfernen, erreichte aber damit seinen Zweck nicht, da der Saft infolge der Dialyse seine lipolytische Wirksamkeit verlor.

Der Grund dieses Verlustes liegt, wie Rosenheim gefunden hat,<sup>1)</sup> nicht in Zerstörung des Enzyms bei der Dialyse, oder in Diffusion der Lipase durch die Dialysatorwand hindurch, sondern in der Entfernung eines Coenzym, welches leicht diffundiert, hitzebeständig und in verdünntem Alkohol löslich ist. Wird das Diffusat eingeeengt und wieder dem Dialysatorinhalt hinzugesetzt, so spaltet derselbe das Fett wieder ebenso kräftig wie zuvor. Nicht nur mittels Dialyse kann das Coenzym von der Lipase getrennt werden, sondern auch, wie Rosenheim fand, durch Verdünnen des Glycerinextraktes des Pankreas mit Wasser. Es bildet sich dann ein das Enzym enthaltender Niederschlag, während das Coenzym im Wasser gelöst bleibt.

Den Anweisungen Rosenheims folgend, habe ich für meine Versuche eine in folgender Weise bereitete Lipase gebraucht. Frisches, gut feingehacktes Schweinspankreas wurde mit zwei Gewichtsteilen Glycerin angerührt und nach 24stündigem Stehen koliert. Aus diesem Extrakt kann, mittels Filtrieren durch zusammengepreßten Brei von Filtrierpapier, eine nur wenig opalescente Lösung erhalten werden, welche aber im lipolytischen Vermögen beim ursprünglichen Extrakt weit zurücksteht. Sie liefert zwar, nach Verdünnen mit Wasser, einen Lipase enthaltenden Niederschlag, aber in viel geringerer Menge, als der unfiltrierte Extrakt. Deshalb wurde für die Bereitung des Enzyms das nur durch ein feines Tuch kolierte, stark opalescente, aber auch bei längerem Stehen keinen, oder einen sehr unbedeutenden Bodensatz liefernde Extrakt ge-

<sup>1)</sup> Proc. Physiol. Soc., Febr. 19., 1910, S. XIV, Journ. of Physiol. Vol. XL.

braucht. Ein Teil hiervon, gewöhnlich 30 ccm, wurde mit der 10fachen Menge destillierten Wassers vermischt. Die Flüssigkeit ist dann stark trübe, der Niederschlag setzt sich aber nicht immer gut ab. Dafür ist eine sehr schwach saure Reaktion nötig, welche durch Zusatz von ein paar Tropfen verdünnter Essigsäure hergestellt werden kann. Es genügt, daß die Flüssigkeit empfindliches blaues Lackmuspapier schwach rot färbt. Bei stärker sauren Reaktionen werden auch Trypsin und Trypsinogen in nicht unbeträchtlicher Menge mitgefällt. Am folgenden Tag wird die jetzt vollkommen klare Flüssigkeit vom weißen Niederschlag abgehebert oder abgegossen und von 300 ccm Wasser, wenn nötig nochmals unter Zusatz von sehr wenig Essigsäure ersetzt. Nach einiger Zeit wird wieder dekantiert und die übrigbleibende Flüssigkeit mit dem Niederschlag auf gehärtetem Papier abgenutscht und auf dem Filter noch einige Male mit destilliertem Wasser ausgewaschen. Der Niederschlag, eine grauweiße Substanz, welche sich, wenn scharf abgesogen ist, leicht vom Filter nehmen läßt, ist jetzt genügend von Elektrolyten befreit. Ich fand nach Verbrennen der bei 110° C. getrockneten Substanz:

von 0,1521 g 0,0004 g Asche und  
 » 0,2761 g 0,0010 g »

Diese Asche löste sich in kochender Salzsäure mit leicht gelber Farbe, welche beim Verdünnen mit Wasser verschwand. Die Lösung wurde stark rot mit Rhodankalium und gab gar keine Kalkreaktion. Die Asche bestand also wohl zum größten Teil aus Eisenphosphat, das nicht von vornherein vorhanden, sondern erst bei der Verbrennung gebildet worden war.

Der durch Verdünnen des Glycerinextraktes mit Wasser entstandene Niederschlag ist in sehr verdünntem Alkali löslich. Derselbe löst sich aber auch ohne Alkali in Glycerin. Der vom Filter genommene Niederschlag wurde in einer kleinen Reibschale mit reinem Glycerin zerrieben. Man erhält so eine trübe, dennoch praktisch homogene Lösung, welche lange Zeit aufbewahrt werden kann, ohne ihre Wirksamkeit einzubüßen. Mittels Filtrieren kann diese Lösung ganz klar gemacht werden; sie wird dadurch aber viel weniger wirksam. Ich verwendete

deshalb für meine Versuche die nicht filtrierte Lösung. Zur Lösung des Niederschlages aus 30 ccm Pankreasextrakt wurden 20 ccm Glycerin gebraucht, sodaß die Konzentration des Enzyms — mit Rücksicht auf den unvermeidlichen Substanzverlust bei der Bereitung — ungefähr gleich gemacht wurde derjenigen des ursprünglichen Extraktes.

Das proteolytische und das amylolytische Enzym sind beim Auswaschen so gut wie völlig entfernt. Die Glycerinlösung greift Fibrin und gekochte Stärke kaum merkbar an, auch nach Zusatz von ein wenig Chlorcalcium. An Lipase aber ist sie reich. Dennoch, ohne Zusatz von anderen Stoffen, hat das Enzym nur eine äußerst schwache Wirkung.

Wie Rosenheim fand, wird es wirksam nach Vermischung mit dem, vom Niederschlag getrennten, durch Einengen konzentrierten Waschwasser, auch dann, wenn das Einengen bei hoher Temperatur stattgefunden hat. Während ich Rosenheims Mitteilungen auch in diesem Punkt vollkommen bestätigen konnte, weicht mein Befund in einer Hinsicht von demjenigen Rosenheims ab, daß ich nämlich das Vermögen, die Lipolyse zu fördern, auch nach Verbrennung nicht verloren gegangen fand. Es ist dann aber nötig, die Asche in kochender Salzsäure zu lösen. Mit der neutralisierten Lösung versetzt, zeigt die Glycerinlösung des Enzyms — welche ich in der Folge der Kürze halber einfach Lipase nennen werde — kräftige Lipolyse.

Es ist, wenn nicht ausschließlich, dennoch an erster Stelle der in der Asche vorhandene Kalk, welcher die Wirksamkeit des Enzyms erhöht. Es ist leicht, sich von dem Einfluß sehr geringer Kalkmengen auf die Lipolyse zu überzeugen. Einige Tropfen käufliches Olivenöl werden mit stark verdünnter Soda-lösung und einem Tropfen Lipase vermischt. Nach gutem Vermischen, damit das Enzym, das in der schwach alkalischen Flüssigkeit gelöst bleibt, gleichmäßig verteilt werde, und nach Zusatz von ein wenig Phenolphthalein werden in zwei Röhren gleiche Mengen der Emulsion gebracht. Dem einen Röhren wird Kalk, z. B. auf 5 ccm Flüssigkeit 1 Tropfen  $\text{CaCl}_2$  1%, hinzugesetzt. Die rote Earbe, welche dadurch viel schwächer

wird, oder sogar verschwindet, wird durch sehr vorsichtigen Zusatz von Soda wieder derjenigen des anderen Röhrchens gleich gemacht. Wenn jetzt die beiden Röhrchen auf Körpertemperatur gebracht werden, sieht man, daß das Kalk enthaltende alsbald die rote Farbe verliert und allmählich saurer wird, während das andere im Lauf einer Stunde nicht oder kaum abblaßt. Es muß dafür gesorgt werden, daß die Reaktion nur sehr schwach alkalisch gemacht wird, da das Enzym, zumal bei Körpertemperatur, gegen Alkali sehr wenig widerstandsfähig ist.

Es stellte sich also heraus, daß zur „Aktivierung“ der nicht mehr Salz als ein wenig Natriumcarbonat enthaltenden Enzymlösung nicht das Gemenge der aus dem Pankreasextrakt in Wasser gelösten Stoffe zugesetzt zu werden braucht, sondern daß Zusatz von Chlorcalcium dazu genügt. Für das genauere Studium der Lipolyse verfuhr ich folgendermaßen.

3 bis 4 ccm Lipase wurden mit etwa dem doppelten Volumen 0,2%iger Natriumcarbonatlösung vermischt, unter Zusatz von Phenolphthalein mit Wasser bis zu 200 ccm verdünnt und über 4 Flaschen von 150 ccm Inhalt gleichmäßig verteilt. Der leicht opaleszenten, kaum rot gefärbten Flüssigkeit wurde auf jede Portion von 50 ccm je 1 ccm neutrales Olivenöl (käufliches Olivenöl, durch Ausschütteln der ätherischen Lösung mit Natronlauge und Auswaschen mit Wasser von Fettsäuren befreit) zugesetzt. Zuvor waren die Flaschen mit der Substanz, deren Einwirkung auf die Lipase untersucht werden sollte, beschickt. Wenn durch die Substanz OH-Ionen gebunden wurden, wurde die leicht rosa Farbe durch Sodazusatz in allen vier Flaschen wieder gleich gemacht. Die Flaschen wurden jetzt mit Korkstopfen gut verschlossen, in einem auf 38° C. erwärmten Thermostaten befestigt und darin gewöhnlich 6 Stunden lang um eine horizontale Achse langsam gedreht, sodaß eine anhaltend gleichmäßige Mischung gesichert war. Dann wurde der Säuregehalt mit  $\frac{1}{4}$ -NaHO, nachdem jeder Flasche 50 ccm 92%igen Alkohols hinzugesetzt war, titriert.

Ausnahmslos stellte es sich heraus, daß auch in den nichts mehr als Lipase, ein wenig Soda, Wasser und Öl enthaltenden

Flaschen Säure frei geworden war. Die Menge war bei verschiedenen Präparaten des Enzyms wechselnd, bei demselben Präparat aber an verschiedenen Tagen dieselbe. Es ist nicht gut anzunehmen, daß die Lipolyse in diesem Fall nicht von der Pankreaslipase, sondern von Bakterien herrührte. Sie zeigte sich auch, wenn der Flüssigkeit 10 ccm Toluol hinzugesetzt worden waren, und sie kam, auch ohne Toluol, schon bei einem sehr geringen Säuregehalt zum Stillstand. Dieser betrug in zahlreichen Versuchen immer noch weniger als  $\frac{1}{200}$ -normal, während Söhngen<sup>1)</sup> fand, daß Bakterienlipase erst bei  $\frac{1}{50}$ -n-Milchsäure zu wirken aufhört.

Rosenheim sucht die Erklärung der, wenn auch sehr geringen Wirkung der Pankreaslipase ohne Zusatz von Coenzym in ungenügender Reinigung des Präparates. In Betracht ziehend, daß aber die von mir bereitete Lipase so gut wie ganz von Elektrolyten befreit war und daß es eben die Elektrolyten, insbesondere die Kalksalze des Pankreasextraktes sind, welche die Wirkung der Lipase erhöhen, habe ich die Möglichkeit einer anderen Erklärung erwogen.

Nachdem von mehreren Forschern nachgewiesen worden ist, daß Lipase, auch diejenige des Pankreas, nicht nur zur Fettspaltung, sondern auch zur Synthese von Fett aus Fettsäure und Glycerin imstande ist, darf die Hypothese gestellt werden, daß die Wirkung dieses Enzyms auf Förderung einer Gleichgewichtsreaktion beruht — eine Hypothese, welche insbesondere durch die ausführliche Arbeit von Dietz<sup>2)</sup> gestützt worden ist. Wenn nun Lipase Öl spaltet bei Anwesenheit von Kalksalz, ist immer eine auffallende Eigentümlichkeit zu beobachten, daß nämlich beim Drehen der Flaschen im Thermostaten immer eine beträchtliche Menge von Kalkseife sich teilweise als ein fester Belag gegen die Wand der Flasche, teilweise auch als gallertige Klumpen in der Flüssigkeit ausscheidet. Dadurch drängte sich mir die Vermutung auf, daß die Fettspaltung schon, sobald eine geringe Menge von Fettsäure frei geworden ist, zum Stillstand kommt, daß infolgedessen die

<sup>1)</sup> Folia microbiologica, I, S. 199.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 52, S. 279.

Lipolyse in der salzfreien Lösung zwar nicht ausbleibt, aber bald aufhört und daß also die Wirkung des Kalksalzes darin bestehen würde, daß durch dasselbe die Fettsäure, je nachdem sie frei kommt, in unlöslicher Form aus der Lösung ausgeschieden wird.

Aus folgenden Beispielen geht der Einfluß von  $\text{CaCl}_2$  hervor. Jedes Fläschchen enthielt 1 ccm Lipase in 50 ccm Wasser mit Phenolphthalein und soviel Soda, daß die Flüssigkeit eben merkbar rosa gefärbt war. Nach 6 Stunden Schütteln im Thermostaten bei  $38^\circ \text{C}$ . wurde bei der Titration gefunden:

I	ohne Zusatz	0,2 ccm $\frac{n}{4}$ -NaHO
	mit 2 ccm $\text{CaCl}_2$ 1%	1,5 » »
II	ohne Zusatz	0,6 » »
	mit 10 mg $\text{CaCl}_2$	1,1 » »
	» 25 » »	1,4 » »
III	ohne Zusatz	0,9 » »
	mit 10 mg $\text{CaCl}_2$	2,0 » »
IV	ohne Zusatz	0,6 » »
	mit 100 mg $\text{CaCl}_2$	1,6 » »
	» 200 » »	1,7 » »
	» 400 » »	2,2 » »

Daß der Umfang der Lipolyse nicht proportional der Vermehrung des Gehaltes an Kalksalz, ja nicht einmal regelmäßig zunahm, konnte nicht wundernehmen, nachdem der gallerartige Seifenniederschlag bald mehr bald weniger Fett einschließt und dasselbe so in wechselnder Masse der Einwirkung des Enzyms entzieht. Auch wird freie Fettsäure in dem Niederschlag eingeschlossen. Es stellte sich nämlich heraus, daß beim Tritrieren die Flüssigkeit tüchtig geschüttelt werden mußte. Dabei zerfiel die zähe Kalkseife und wurde in einen grobflockigen Niederschlag verändert, welcher sich beim ruhigen Stehen an der Oberfläche der alkoholischen Flüssigkeit sammelte. Beim Zerfallen der Seifenklumpen wurde, wie aus dem Verschwinden der roten Farbe beim Schütteln hervorging, Alkali gebunden.

Daß tatsächlich  $\text{CaCl}_2$  durch die Fettsäure zersetzt wurde, folgt auch aus der Zunahme des Gehaltes der Flüssigkeit an H-Ionen, dessen Bestimmung Herr Dr. Ringer die Güte hatte auszuführen.

Eine Lösung von 4 ccm Lipase mit ein wenig Natriumcarbonat in 400 ccm wurde über 4 Flaschen verteilt. Jede Flasche wurde mit 1 ccm Öl beschickt. Nach 6 stündiger Digestion wurden jeder Flasche mittels der Pipette 50 ccm behufs der  $\text{C}_H$ -Bestimmung entnommen. Die übrigen 50 ccm, worin sich nahezu alle Kalkseife befand, wurden in gewöhnlicher Weise titriert.

a) ohne Zusatz	0,6 ccm $\frac{n}{4}$ -NaHO,	$\text{C}_H$ $8,1 \times 10^{-8}$
b) mit 10 mg $\text{CaCl}_2$	1,0 » » »	$6,6 \times 10^{-7}$
c) » 25 » »	1,4 » » »	
d) » 50 » »	1,6 » » »	$2,6 \times 10^{-6}$

Der Apparat ließ nur zu, mit drei H-Elektroden zugleich zu arbeiten. Deshalb wurde die  $\text{C}_H$ -Bestimmung von c) unterlassen.

Während der größte Teil der titrierbaren Säure in den Flaschen geblieben war, zeigte dennoch die abpipettierte Flüssigkeit von b) und d) eine sehr deutliche, mit dem Gehalt an  $\text{CaCl}_2$  zunehmende Acidität. Die Lösung enthielt also eine stark dissoziierte Säure, welche in diesem Fall nichts anderes als Salzsäure sein konnte.

Die Verstärkung der Lipolyse wird auch von sehr schwerlöslichen Kalksalzen hervorgerufen.

4 ccm Lipase, nach Zusatz von 6 ccm 0,2% iger  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , mit Wasser auf 200 ccm verdünnt, über 4 Flaschen verteilt. a) wurde nur mit 1 ccm Öl versetzt, b) außerdem mit 2 ccm 1% iger  $\text{CaCl}_2$ , c) mit 2 ccm 1% iger  $\text{CaCl}_2$  und mit 3 ccm einer damit äquivalenten Kaliumoxalatlösung und d) mit dem zentrifugierten und mit Wasser ausgewaschenen Niederschlag durch Vermischung von 2 ccm 1% iger  $\text{CaCl}_2$ -Lösung mit 3 ccm der genannten Kaliumoxalatlösung erhalten. Nach 6 stündiger Digestion wurde gefunden:

a)	verbraucht	0,2 ccm	$n/4$ -NaHO
b)	»	2,0 »	»
c)	»	0,9 »	»
d)	»	1,0 »	»

Calciumcarbonat wirkt in derselben Weise. Hierbei konnte außerdem nachgewiesen werden, daß während der Digestion  $\text{CO}_2$  freigestellt wird.

200 ccm Lösung von 4 ccm Lipase mit ein wenig Soda. In 4 Flaschen, a), b), c) und d), je 50 ccm. In c) und d) war zuvor je  $\pm$  200 mg frisch gefälltes Calciumcarbonat gebracht (300 mg  $\text{CaCl}_2$  in Wasser gelöst und mit Natriumcarbonat gefällt; der Niederschlag wiederholt auf der Zentrifuge mit Wasser gewaschen). Die Flüssigkeiten, je mit 1 ccm Öl, 6 Stunden digeriert. Dann wurden a) und c) sofort titriert. Durch b) und d) wurde bei  $25^\circ \text{C}$ . eine Stunde lang ein  $\text{CO}_2$ -freier Luftstrom hindurchgeführt, welcher dann je 50 ccm  $n/50$ -Barytwasser passierte. Danach wurden auch b) und d) titriert. Das Barytwasser von d) war stark, dasjenige von b) kaum getrübt. Nach dem Absetzen des gebildeten Baryumcarbonats wurden je 40 ccm der klaren Lösung mit  $n/5$ -HCl titriert.

Das Ergebnis war:

a)	verbraucht	0,6 ccm	$n/4$ -NaHO	
b)	»	0,6 »	»	und liefert 0,14 ccm $n/4$ - $\text{CO}_2$
c)	»	4,2 »	»	
d)	»	3,7 »	»	» 1,18 »

Aus dem Calciumcarbonat war also eine nicht unbedeutende Menge von Kohlensäure in Freiheit gestellt. Die gesamte Acidität von d) betrug 4,88 ccm  $n/4$  gegen diejenige von c) 4,2. Wenn nun auch beim Titrieren der digerierten, trüben Flüssigkeit Fehler von 0,1, vielleicht sogar von 0,2 ccm nicht mit Sicherheit auszuschließen sind, der hier gefundene Unterschied ist ohne Zweifel außerhalb der Fehlergrenzen gelegen. Die Erklärung liegt aber auf der Hand. Während der Luftdurchführung wurde die Flüssigkeit zur Erleichterung der  $\text{CO}_2$ -Aus-treibung auf  $25^\circ \text{C}$ . erwärmt. Infolgedessen konnte nun, weil eben durch das Entweichen der Kohlensäure das Gleichgewicht

wieder aufgehoben wurde, die Lipolyse aufs neue fortschreiten. Jetzt konnte wieder Fettsäure durch das in Überschuß vorhandene Calciumcarbonat festgelegt werden.

Meine Befunde in bezug auf den Einfluß von Kalksalzen sind mit denjenigen von Terroine nicht übereinstimmend. Dieser Forscher konnte keine, oder wenigstens keine nennenswerte Vermehrung der Lipolyse unter dem Einflusse von Kalksalzen beobachten. Die Verhältnisse waren aber in Terroines Versuchen anders als in den meinigen. Terroine digerierte 5 ccm Pankreassaft des Hundes mit 5 ccm Olivenöl. Hier enthielt also das Gemisch schon ohne irgend einen Zusatz Kalk und dabei andere Elektrolyte, kolloide Bestandteile in großer Menge und relativ wenig Wasser, während in meinen Versuchen die Lipase von den anderen Bestandteilen des Pankreasextraktes, besonders von den Elektrolyten, so gut wie möglich getrennt und, in Glycerin gelöst, mit viel Wasser verdünnt wurde. In dieser Weise war, wie ich glaube, die Wirkung der Elektrolyten mit größerer Sicherheit nachzuforschen. \*

Wohl fand Terroine die Fettspaltung erhöht nach Zusatz von Magnesium- und von Baryumchlorid. Das ist im Einklang mit der Hypothese, daß die Enzymwirkung gefördert wird durch das Festlegen der freigewordenen Fettsäuren.

In dieser Hinsicht stimmte nun auch meine Erfahrung mit derjenigen von Terroine überein, wie aus den folgenden Beispielen hervorgeht.

Jedesmal wurden wieder 4 ccm Lipase mit Hilfe von wenig Natriumcarbonat in Wasser zu einem Volumen von 200 ccm gelöst und in 4 Portionen, je 50 ccm, geteilt. Zu drei davon wurde  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{BaCl}_2$  oder  $\text{MgCl}_2$  in äquivalenten Mengen hinzugesetzt. Die schwach rosa Farbe, welche durch alle diese Salze zum Verschwinden gebracht wurde, wurde mittels ein wenig Soda wieder hervorgerufen. Nach 6 stündiger Digestion wurde verbraucht:

I	ohne Zusatz		0,6 ccm $\frac{n}{4}$ -NaHO
	mit 100 mg	$\text{CaCl}_2$	1,4 » »
	» 220 »	$\text{BaCl}_2$	1,3 » »
	» 185 »	$\text{MgCl}_2$	2,7 » »

II	ohne Zusatz		0,5 ccm $n/4$ -NaHO		
	mit 200 mg	CaCl <sub>2</sub>	2,0	»	»
	» 440 »	BaCl <sub>2</sub>	1,6	»	»
	» 370 »	MgCl <sub>2</sub>	3,7	»	»
III	ohne Zusatz		0,5	»	»
	mit 100 mg	CaCl <sub>2</sub>	0,9	»	»
	» 220 »	BaCl <sub>2</sub>	1,1	»	»
	» 185 »	MgCl <sub>2</sub>	2,5	»	»

Die Magnesiumseife setzte sich nicht als eine so zähe, gallertige Masse ab, wie die Baryum- und Calciumseifen und konnte also nicht soviel Öl einschließen und der Einwirkung des Enzyms entziehen. Daran glaube ich die kräftigere Wirkung des Magnesiumsalzes zuschreiben zu dürfen.

Bekanntlich kann die Fettspaltung auch von Natriumsalzen verstärkt werden. Auch hier beruht, meiner Auffassung nach, die Wirkung auf die Ausscheidung von Fettsäuren als unlösliche Seifen. Natriumoleat wird von Lösungen verschiedener Natriumsalze in genügender Konzentration gefällt, während es in sehr schwachen Salzlösungen, ebenso wie in Wasser mit Opalescenz gelöst wird.

In der Absicht, annähernd über die Löslichkeit urteilen zu können, habe ich mir eine Lösung von Natriumoleat hergestellt durch Versetzen einer alkoholischen Lösung von reiner Ölsäure mit Natronlauge bis zur deutlich alkalischen Reaktion. Von dieser Lösung wurden je 5 Tropfen gemischt mit 20 ccm Salzlösung. Dann wurde sofort filtriert. Je nachdem die Fällung vollständiger war, wurde das Filtrat weniger trübe gefunden.

NaCl	4 0/0	Filtrat	klar
»	2 0/0	»	schwach opalescent
NaBr	6 0/0	»	klar
»	4 0/0	»	schwach opalescent
»	2 0/0	»	trübe
NaJ	7,6 0/0	»	klar
»	3,8 0/0	»	trübe

NaF	3%	Filtrat klar
»	1,5%	» trübe
CaCl <sub>2</sub>	0,2%	» klar
»	0,1%	» klar
»	0,05%	» stark trübe
MgCl <sub>2</sub>	0,4%	» klar
»	0,2%	» klar
»	0,1%	» klar
KCl	4%	» trübe
»	2%	» stark getrübt

Der fördernde Einfluß dieser Salze (NaJ und NaF ausgenommen) auf die Lipolyse war mit diesen Befunden in Einklang, KCl, welches Seife viel weniger gut fällt als Natriumsalze, hatte auch auf die Fettspaltung einen viel schwächeren Einfluß.

Die Versuche wurden in der gewöhnlichen Weise angestellt. Jedesmal wurde 50 ccm Lipase-Ölgemisch, mit oder ohne Salzzusatz, 6 Stunden digeriert und dann titriert.

I	ohne Zusatz,	verbraucht	0,8 ccm	$\frac{n}{4}$ -NaHO
	mit 2 g NaCl	»	2,4	»
	» 4 »	»	4,6	»
	» 6 »	»	4,4	»
II	ohne Zusatz	»	0,8	»
	mit 2 g KCl	»	0,5	»
	» 4 »	»	1,3	»
	» 6 »	»	2,0	»
III	ohne Zusatz	»	0,5	»
	mit 2 g NaCl	»	1,3	»
	» 6 » NaBr	»	1,6	»
	» 3,8 g NaJ	»	0,9	»
IV	ohne Zusatz	»	0,5	»
	mit 3 g NaCl	»	2,3	»
	» 9 » NaBr	»	3,5	»
	» 11,4 g NaJ	»	0,8	»

Wenn die Flüssigkeit NaJ enthielt, nahm sie während der Digestion eine gelbliche Farbe an. Daß dann die Fettspaltung

jedesmal sehr unbedeutend war, wird wohl dem Freiwerden von Jodium zuzuschreiben sein. NaF vermehrte die Spaltung ein wenig, in viel geringerem Maße aber als NaCl, NaBr.

Noch in anderer Weise wurde die aus den beschriebenen Versuchen abgeleitete Folgerung geprüft, daß die untersuchten Elektrolyte die Lipolyse nicht durch Einwirkung auf das Enzym selbst fördern, sondern durch das Unschädlichmachen einer der Spaltungsprodukte der Fettsäure.

Von einer die Lipase im wahren Sinne des Wortes aktivierenden Substanz muß erwartet werden, daß sie ihren Einfluß sowohl bei der Synthese von Fett aus Fettsäure und Glycerin, als bei der Spaltung geltend machen wird. Das ist dann auch, wie Hamsik nachgewiesen hat,<sup>1)</sup> in bezug auf die Gallensäuren tatsächlich der Fall. Wenn aber die anorganischen Salze nur ihre Bedeutung der Fällung von Seifen entlehnen, so können sie die Synthese nicht fördern, sondern muß vielmehr eine Hemmung davon erwartet werden.

Ich verfuhr folgenderweise:

Glycerin wurde mit Ölsäure und Lipase bei 38° C. im Thermostaten unter anhaltendem, langsamem Schütteln digeriert und zwar jetzt, da die Versuche gewöhnlich 24 Stunden oder noch länger dauerten, unter Zusatz von Toluol. Am Anfang versuchte ich die Aciditätsbestimmung beim Beginn des Versuches mittels Titration eines sofort nach der Mischung der Flüssigkeit entnommenen, abgemessenen Teils. Dabei wurden aber grobe Fehler gemacht, da es mir nicht gelang, die Flüssigkeit, auch nach tüchtigem Schütteln, während des Abpipettierens in gleichmäßiger Mischung zu erhalten. Darum wurden jedesmal Mischungen von Glycerin und Ölsäure, genau so wie die, welche digeriert werden sollten, hergestellt und zwar in der Absicht, über die beim Abmessen der Ölsäure gemachten Fehler urteilen zu können, in duplo. Diese beiden Proben wurden dann sofort titriert.

In allen Versuchen wurde gebraucht: 10 ccm Glycerin, 2 ccm Ölsäure, 2 ccm Lipase und 3 ccm Toluol, mit oder ohne Salzzusatz.

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr., Bd. 65, S. 232.

Ich gebe hier einige Resultate.

Zusatz	ccm $\frac{n}{4}$ -NaHO		
	Sofort	nach 24 Std.	nach 48 Std.
I 0	23,9	17,2	13,9
	23,6		
200 mg CaCl <sub>2</sub>	23,0	23,1	23,4
	23,5		
II 0	23,0	18	19,5
	23,5		
100 mg CaCl <sub>2</sub>	23,5	23,3	23,0
	23,6		
III 0	23,5	16,9	
	23,6		
	10 mg CaCl <sub>2</sub>		
	30 „ „		
IV 0	23,5	19,3	
	23,6		
	50 „ „		
	100 „ „		
10 mg BaCl <sub>2</sub>	23,6	17,2	
	23,6		
	50 „ „		
	100 „ „		
10 mg BaCl <sub>2</sub>	23,6	18,8	
	23,6		
	50 „ „		
	100 „ „		
50 „ „	23,6	22,0	
	23,6		
	50 „ „		
	100 „ „		
100 „ „	23,6	23,7	
	23,6		
	50 „ „		
	100 „ „		

Es wurde also nicht nur keine Erhöhung der Synthese, sondern sogar eine starke Hemmung gefunden, in scharfem Gegensatz zu den Beobachtungen nach Zusatz von aus Rindsgalle bereiteten Plattnerschen Kristallen.

Zusatz	Sofort	nach 10 Std.	nach 24 Std.	nach 48 Std.
I 0	23,3		15,1	14,9
	23,6			
100 mg gallens. S.	23,2	19,8	10,4	9,5
	23,5			
II 0	23,2	14,2	16,7	
	23,5			
100 mg gallens. S.	23,2	11,2		
	23,5			

Es ist also nicht zu bezweifeln, daß bei der Lipasewirkung Calcium-, Baryum-, Magnesium- und Natriumsalze eine ganz andere Rolle spielen als die Gallensäuren. Die Rolle der genannten Salze besteht, wie ich aus dem Mitgeteilten glaube folgern zu dürfen, darin, daß dieselben Fettsäure als Seife ausscheiden und so aus den bei der Reaktion beteiligten Stoffen ausschalten und in dieser Weise das Enzym zur weiteren Spaltung des Fettes instand setzen.