

Über das Vorkommen von einem Nucleinsäure spaltenden Fermente in *Cortinellus edodes*.¹⁾

Von
Dr. T. Kikkōji.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Universität zu Kyoto.)
(Der Redaktion zugegangen am 9. Februar 1907.)

Durch die neueren Forschungen²⁾ ist es außer Zweifel gestellt, daß in verschiedenen Geweben des Tierkörpers ein Stoff vorkommt, welcher die Fähigkeit besitzt, die Nucleinsäuren in ihre Komponenten zu spalten. Dieser Stoff wird für ein spezifisches Ferment gehalten und als Nuclease bezeichnet.

Daß Nuclease auch in Pflanzenzellen enthalten sein kann, geht schon aus den bekannten Tatsachen hervor, daß bei der Selbstverdauung der Bierhefe³⁾ freie Purinbasen und Phosphorsäure sich bilden und daß in den keimenden Samen⁴⁾ die ersteren stets in nachweisbarer Menge vorhanden sind.

Es kommt aber Iwanoff⁵⁾ das Verdienst zu, Nuclease in der Pflanzenwelt mit Sicherheit nachgewiesen zu haben. Iwanoff brachte *Penicillium glaucum* oder *Aspergillus niger* in eine Kulturflüssigkeit, die aus Thymusnucleinsäure, Salzen, Saccharose und Wasser bestand, und fand, daß bei der Entwicklung der genannten Pilzarten die Nucleinsäure eine weitgehende Zersetzung bis zum Auftreten der Phosphorsäure und der Purinbasen erfuhr; er stellte ferner fest, daß diese tiefe Spaltung durch die von den beiden Schimmelpilzen produzierte Nuclease bewirkt wurde, welche von der Zellsubstanz durch deren Zertrümmerung zu trennen war und welche thermolabil war. Im Anschluß an die Beobachtung von Iwanoff konnte

¹⁾ Syn. *Armillaria edodes*.

²⁾ Sachs, Diese Zeitschrift, Bd. XLVI, S. 337.

³⁾ A. Kossel, Diese Zeitschrift, Bd. IV, S. 294.

⁴⁾ Schulze, Diese Zeitschrift, Bd. IX, S. 420.

⁵⁾ Iwanoff, Diese Zeitschrift, Bd. XXXIX, S. 31.

Plenge¹⁾ mitteilen, daß in den Bakterien wahrscheinlich ein besonderes auf Nucleinsäure abgestimmtes Ferment vorhanden ist, denn bei einem Vergleich von 27 verschiedenen Kulturen ergab sich, daß bei ihnen die Fähigkeit, Gelatine und a-nucleinsaures Natron zu verflüssigen, nicht stets parallel geht.

Ich möchte hier noch erwähnen, daß bei der Spaltung der Hefenucleinsäure durch Bakterien A. Schittenhelm und F. Schröter²⁾ Phosphorsäure, Alkohol, Ameisensäure, Oxalsäure, Ammoniak, Hypoxanthin und Xanthin erhielten.

Die nachstehenden Untersuchungen zeigen nun, daß in Matsudake, *Cortinellus edodes*, P. Henn, ein Nucleinsäure spaltendes Ferment zu finden ist, welches wahrscheinlich mit der Nuclease aus den Schimmelpilzen und Bakterien identisch ist.

Cortinellus edodes, P. Henn, gehört zu den in Japan einheimischen Hutpilzen. Er erreicht oft eine beträchtliche Größe und findet sich in Fichtenwäldern von Anfang Oktober bei warmer Witterung bis in den November hinein. Er bildet ein in Japan beliebtes Gericht und wird als Würze bei der Zubereitung von Speisen und Saucen gebraucht.

Für meine Untersuchungen bediente ich mich stets des Preßsaftes des *Cortinellus edodes*. Zur Bereitung des Preßsaftes wurde der frische Pilz gründlich mit Wasser gewaschen, durch Abkratzen von den fest anhaftenden Verunreinigungen befreit, zerkleinert und unter einem starken Drucke ausgepreßt. Der so erhaltene Preßsaft reagierte schwach sauer oder neutral und erwies sich als sehr wirksam.

Als Untersuchungsmaterial stellte Herr Professor Katsuji Inouye mir nucleinsaures Natron zur Verfügung, welches er aus der Schleimhaut des Dünndarms vom Rinde nach der Vorschrift von Neumann dargestellt hatte; dafür sage ich ihm meinen wärmsten Dank.

Versuch 1.

a) 0,2 g nucleinsauren Natrons wurden in 10 ccm heißen Wassers gelöst, nach dem Erkalten mit 10 ccm frischen Preß-

¹⁾ Plenge, Diese Zeitschrift, Bd. XXXIX, S. 190.

²⁾ A. Schittenhelm u. F. Schroeter, Diese Zeitschrift, Bd. XLI, S. 284.

saftes versetzt und unter Zusatz von Toluol bei Bruttemperatur stehen gelassen. 48 Stunden darauf war das Auftreten von Phosphorsäure in der Lösung mit der Magnesiamischung nachzuweisen.

b) 10 ccm gekochten Preßsaftes wurden der Lösung des nucleinsauren Natrons in gleicher Menge zugefügt und unter gleicher Bedingung in den Brutschrank gestellt. Nach 48stündiger Digestion war die Probe auf Phosphorsäure völlig negativ.

Versuch 2.

Eine gelatinöse Masse, welche aus 0,5 g nucleinsauren Natrons und 4 ccm Wasser bestand, wurde mit 2 ccm frischen Preßsaftes versetzt, mittels eines durch Glühen gereinigten Platindrahtes gut durchgemischt und unter Zusatz von Toluol bei Bruttemperatur digeriert. Nach 16 Stunden war die Masse vollständig verflüssigt. Diese Lösung gab nach der Verdünnung mit Wasser einen reichlichen Niederschlag mit Magnesiamischung.

Versuch 3.

2,5 g nucleinsauren Natrons wurden in 150 ccm siedenden Wassers gelöst, nach dem Erkalten mit 25 ccm frischen Preßsaftes versetzt und unter Zusatz von Toluol in den Brutschrank gestellt.

Alle 24 Stunden wurden 20 ccm von der Lösung herausgenommen und auf Phosphorsäure verarbeitet. Die gewonnenen Resultate sind in folgender Tabelle zusammengestellt:

Tabelle I.

Dauer der Digestion in Stunden	Zur Analyse verwendete Lösung in g	Gefundene $Mg_2P_2O_7$ in g	Aus der gefundenen $Mg_2P_2O_7$ berechnete P_2O_5 in g
24	20	0,0221	0,0141
48	20	0,0323	0,0206
72	20	0,0393	0,0251
96	20	0,0433	0,0276
120	20	0,0450	0,0287

Versuch 4.

4 g nucleinsauren Natrons wurden in 250 ccm Wasser gelöst, mit 35 ccm frischen Preßsaftes versetzt, gut durchgemischt und unter Zusatz von Toluol 6 Tage lang bei 37—39° C. digeriert.

Um die freien Purinbasen in der digerierten Lösung nachzuweisen, verfuhr ich wie folgt: Die Lösung wurde nach der Filtration mit Schwefelsäure angesäuert, filtriert und das Filtrat mit Phosphorwolframsäure ausgefällt. Die Phosphorwolframsäurefällung wurde abgesaugt, mit 5%iger Schwefelsäure ausgewaschen und nach der bekannten Methode mit Hilfe von Baryt von Phosphorwolframsäure befreit. Die von Phosphorwolframsäure befreite Lösung wurde vorsichtig auf dem Wasserbade eingeeengt und mit ammoniakalischer Silberlösung ausgefällt. Die Bearbeitung dieser Silberfällung geschah genau nach der in Thierfelders Handbuch¹⁾ angegebenen Methode.

Es wurden erhalten: Guanin? und Adenin.

1. Guanin? Die durch Ammoniak ausgeschiedene Substanz wurde in Sulfat übergeführt, dessen Krystallformen völlig mit denjenigen des Guaninsulfats übereinstimmten. Leider stand mir zur Ausführung der Analyse keine genügende Menge der Substanz zu Gebote.

2. Adenin. Das Pikrat krystallisierte in gelben Nadeln und zersetzte sich gegen 280° C.

0,1652 g Substanz gaben 42,5 ccm feuchten Stickstoffs bei 9° C. und 761 mm B., entsprechend 30,99% N.

Berechnet für $C_6H_5N_5 \cdot C_6H_3N_3O_7$:

N = 30,82%

Gefunden:

30,99%

Versuch 5.

Dieser Versuch wurde angestellt, um den Einfluß der Reaktion der Flüssigkeit auf die Wirkung des Nucleinsäure spaltenden Fermentes zu ermitteln.

Probe a. 0,2 g nucleinsauren Natrons wurden in 5 ccm 0,75%iger Essigsäure unter Erwärmen gelöst, nach dem Er-

¹⁾ Thierfelder, Hoppe-Seylers Handbuch der physiol.-pathol.-chem. Analyse, 7. Aufl., 1903, S. 574.

kalten mit 10 ccm neutralen Preßsaftes versetzt und unter Zusatz von Toluol im Brutraum digeriert.

Nach 70 Stunden war keine Spur von Phosphorsäure in der Lösung nachzuweisen.¹⁾

Probe b. 0,2 g nucleinsauren Natrons wurden in 5 ccm 0,75%iger Sodalösung gelöst und nach dem Zusatz von 10 ccm frischen Preßsaftes auf die gleiche Weise behandelt wie bei Probe a.

Nach 70stündiger Digestion konnte ich keine Bildung von Phosphorsäure in der Lösung feststellen.

Probe c. Eine Lösung von nucleinsaurem Natron, welche aus 0,2 g nucleinsauren Natrons, 5 ccm Wasser und 10 ccm neutralen Preßsaftes bestand, wurde bei Gegenwart von Toluol im Brutschrank digeriert.

Nach 70 Stunden wurden 5 ccm von der Lösung herausgenommen und auf Phosphorsäure untersucht. Es wurden gefunden: 0,0231 g $Mg_2P_2O_7$, entsprechend 0,0147 g P_2O_5 .

Versuch 6.

Dieser Versuch zeigt, daß das Nucleinsäure spaltende Ferment durch Aussalzen mit Ammoniumsulfat gefällt wird.

Der frische Preßsaft wurde mit Ammoniumsulfat gesättigt, der entstandene Niederschlag in Wasser suspendiert, durch Dialyse vom Ammoniumsulfat befreit und filtriert. Das so bereitete Filtrat wirkte ebenso stark auf die Nucleinsäure wie der frische Preßsaft.

Ich habe auch einige Versuche angestellt, um über die Wirkung des Preßsaftes auf die Nucleinsäure aus der Rindermilz Aufschluß zu erhalten. Doch möchte ich bei der völligen Übereinstimmung der erhaltenen Resultate mit den oben geschilderten von einer Wiedergabe absehen.

Aus den mitgeteilten Versuchen ergibt sich, daß:

1. Durch das Ferment des *Cortinellus edodes* werden die Nucleinsäuren unter Bildung von freien Purinbasen und Phosphorsäure zersetzt.

¹⁾ Die Wirkung des Fermentes wird selbst durch 0,3%ige Essigsäure deutlich herabgesetzt, aber nicht ganz aufgehoben.

2. Das Ferment wird durch Erhitzen seiner Lösung vollständig zerstört.

3. Das Ferment wirkt kräftig bei neutraler oder schwach saurer Reaktion. 0,5%ige Essigsäure sowie 0,5%ige Sodalösung können die Wirkung des Ferments hemmen.

4. Das Ferment wird aus seiner neutralen Lösung durch Ammoniumsulfat ausgesalzen.

Außer dem Nucleinsäure spaltenden Fermente sind noch zwei Fermente in *Cortinellus edodes* enthalten, nämlich ein eiweißverdauendes und ein harnstoffzersetzendes.

Das eiweißverdauende Ferment wirkte nur bei neutraler oder alkalischer, nicht bei saurer Reaktion. Unter den Verdauungsprodukten ließen sich Tryptophan, Leucin und Tyrosin nachweisen. Es sei hier erwähnt, daß Johann Hjort¹⁾ bereits ein Ferment in *Agaricus ostreatus* fand, welches bei neutraler Reaktion am kräftigsten das Fibrin verdaute. Dieses Ferment aber unterscheidet sich dadurch von dem in *Cortinellus edodes* vorhandenen, daß es in alkalischer Lösung unwirksam ist.

Das harnstoffzersetzende Ferment wirkte auf die gleiche Weise auf den Harnstoff wie die Urease.

¹⁾ Johann Hjort, Malys Jahresbericht, Bd. XXVI, S. 399.
