

ÜBER DIE LACCASE DES JAPANISCHEN LACKS. II. ÜBER
DIE REAGIERBARKEIT DER LACCASE GEGEN
POLYPHENOLE UND DIAMINE.⁽¹⁾

Von Kunihiko SUMINOKURA.

Eingegangen am 26. November 1935. Ausgegeben am 28. März 1936.

Von den Polyphenole und Diamine oxydieren durch molekularen Sauerstoff bei Anwesenheit von Laccase nur diejenigen leicht, bei welchen die OH- oder NH₂-Gruppen in Ortho- oder Para-Stellung stehen, während dies die Meta-Verbindungen nur schwer tun, was früher bereits Bertrand⁽²⁾ mitgeteilt hat und später von verschiedenen Autoren als richtig bestätigt wurde.

Ich behandelte 48 Phenole und Amine mit der Laccase des japanischen Lacks und Sauerstoffgas. Die bei meinen Versuchen gewonnenen Resultate finden sich in Tabelle 1. Am leichtesten oxydieren bei Anwesenheit der Laccase die *p*-Phenylendiamine (Dimethyl-*p*-phenylendiamin, *p*-Phenylendiamin), dann kommen die *o*-Dioxyphenole (Urushiol, Oxyhydrochinon, Brenzcatechin), die *o*-Phenylendiamine (*o*-Phenylendiamin, Adrenalin, Diamidophenol) und die Benzole mit einer Hydroxyl- plus einer Methoxyl-Gruppe. Die Meta-Verbindungen (Resorcin, Orcin, Phloroglucin, *m*-Phenylendiamin), die Benzole mit zwei Äthoxylgruppen (Hydrochinondiäthyläther) und die Benzole mit einer Hydroxyl- plus verschiedenen anderen Gruppen (Tyrosin, Tyramin, Thymol, Salicylaldehyd) oxydieren nicht. Obgleich Alizarin, Protocatechusäure und Dioxyphenylalanin Ortho-Dihydroxyl besitzen, oxydieren diese Verbindungen doch nicht. Hydrourushiol oxydiert nur schwer. Ebenso oxydieren das Methylenoxyd des Safrols und die aliphatischen Diamine gar nicht. Merkwürdig sind die Kresole; die, obgleich sie nur eine Hydroxyl-Gruppe besitzen, oxydieren sie doch etwas bei Anwesenheit der Laccase. Hier auch oxydieren nur Ortho- und Meta-Kresole, aber die Para-Verbindung nicht.

(1) I. Mitteilung, *Biochem. Z.*, **224** (1930), 292-321.

(2) G. Bertrand, *Compt. rend.*, **122** (1896), 1132.

Tabelle 1.

Substanz	Konstitution	Oxyd. mit Laccase
Ortho-Verbindungen		
Brenzcatechin	$\text{C}_6\text{H}_4 \begin{cases} \text{OH (1)} \\ \text{OH (2)} \end{cases}$	+
Pyrogallol	$\text{C}_6\text{H}_3 \begin{cases} \text{OH (1)} \\ \text{OH (2)} \\ \text{OH (3)} \end{cases}$	+
Urushiol	$\text{C}_6\text{H}_3 \begin{cases} \text{OH (1)} \\ \text{OH (2)} \\ \text{C}_{15}\text{H}_{27} \text{ (3)} \end{cases}$	+
Hydrourushiol	$\text{C}_6\text{H}_3 \begin{cases} \text{OH (1)} \\ \text{OH (2)} \\ \text{C}_{15}\text{H}_{31} \text{ (3)} \end{cases}$	+ (wenig)
Guajacol	$\text{C}_6\text{H}_4 \begin{cases} \text{OH (1)} \\ \text{OCH}_3 \text{ (2)} \end{cases}$	+
Eugenol	$\text{C}_6\text{H}_3 \begin{cases} \text{OH (1)} \\ \text{OCH}_3 \text{ (2)} \\ \text{CH}_2\text{CH:CH}_2 \text{ (4)} \end{cases}$	+
Adrenalin	$\text{C}_6\text{H}_3 \begin{cases} \text{CH(OH)CH}_2\text{NHCH}_3 \text{ (1)} \\ \text{OH (3)} \\ \text{OH (4)} \end{cases}$	+
<i>o</i> -Kresol	$\text{C}_6\text{H}_4 \begin{cases} \text{OH (1)} \\ \text{CH}_3 \text{ (2)} \end{cases}$	+ (wenig)
<i>o</i> -Phenylendiamin	$\text{C}_6\text{H}_4 \begin{cases} \text{NH}_2 \text{ (1)} \\ \text{NH}_2 \text{ (2)} \end{cases}$	+
3-Methoxy-4-oxy-phenyläthyl-methyl-ke-ton		+
„ -octenyl-ke-ton		+
„ -heptenyl-ke-ton		+ (wenig)
„ -pentadecyl-ke-ton		—
„ -nonyl-ke-ton		—
„ -octyl-ke-ton		—
„ -heptyl-ke-ton		—
„ -hexyl-ke-ton		—
Protocatechusäure	$\text{C}_6\text{H}_3 \begin{cases} \text{COOH (1)} \\ \text{OH (3)} \\ \text{OH (4)} \end{cases}$	—

Tabelle 1. (Fortsetzung.)

Substanz	Konstitution	Oxyd. mit Laccase
Dioxyphenylalanin	$\begin{array}{l} \text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH} \text{ (1)} \\ \text{C}_6\text{H}_3 \begin{array}{l} \diagup \text{OH} \text{ (3)} \\ \diagdown \text{OH} \text{ (4)} \end{array} \end{array}$	—
Alizarin	$\begin{array}{l} \text{CO} \text{ (1)} \\ \text{C}_6\text{H}_4 \begin{array}{l} \diagup \text{C}_6\text{H}_2 \begin{array}{l} \diagup \text{OH} \text{ (1)} \\ \diagdown \text{OH} \text{ (2)} \end{array} \\ \diagdown \text{CO} \end{array} \end{array}$	—
Veratrol	$\begin{array}{l} \text{OCH}_3 \text{ (1)} \\ \text{C}_6\text{H}_4 \begin{array}{l} \diagup \text{OCH}_3 \text{ (2)} \end{array} \end{array}$	—
Thymol	$\begin{array}{l} \text{OH} \text{ (1)} \\ \text{C}_6\text{H}_4 \begin{array}{l} \diagdown \text{CH}(\text{CH}_3)_2 \text{ (2)} \end{array} \end{array}$	—
Salicylaldehyd	$\begin{array}{l} \text{OH} \text{ (1)} \\ \text{C}_6\text{H}_4 \begin{array}{l} \diagdown \text{CHO} \text{ (2)} \end{array} \end{array}$	—
Saligenin	$\begin{array}{l} \text{OH} \text{ (1)} \\ \text{C}_6\text{H}_4 \begin{array}{l} \diagdown \text{CH}_2\text{OH} \text{ (2)} \end{array} \end{array}$	—
Meta-Verbindungen		
Resorcin	$\begin{array}{l} \text{OH} \text{ (1)} \\ \text{C}_6\text{H}_4 \begin{array}{l} \diagdown \text{OH} \text{ (3)} \end{array} \end{array}$	—
Orcin	$\begin{array}{l} \text{OH} \text{ (1)} \\ \text{C}_6\text{H}_3 \begin{array}{l} \diagdown \text{OH} \text{ (3)} \\ \diagdown \text{CH}_3 \text{ (5)} \end{array} \end{array}$	—
Phloroglucin	$\begin{array}{l} \text{OH} \text{ (1)} \\ \text{C}_6\text{H}_3 \begin{array}{l} \diagdown \text{OH} \text{ (3)} \\ \diagdown \text{OH} \text{ (5)} \end{array} \end{array}$	—
Dioxybenzoesäure	$\begin{array}{l} \text{COOH} \text{ (1)} \\ \text{C}_6\text{H}_3 \begin{array}{l} \diagdown \text{OH} \text{ (2)} \\ \diagdown \text{OH} \text{ (4)} \end{array} \end{array}$	—
Dioxybenzaldehyd	$\begin{array}{l} \text{CHO} \text{ (1)} \\ \text{C}_6\text{H}_3 \begin{array}{l} \diagdown \text{OH} \text{ (2)} \\ \diagdown \text{OH} \text{ (4)} \end{array} \end{array}$	—
<i>m</i> -Phenylendiamin	$\begin{array}{l} \text{NH}_2 \text{ (1)} \\ \text{C}_6\text{H}_4 \begin{array}{l} \diagdown \text{NH}_2 \text{ (3)} \end{array} \end{array}$	—
Xylenol	$\begin{array}{l} \text{OH} \text{ (1)} \\ \text{C}_6\text{H}_3 \begin{array}{l} \diagdown \text{CH}_3 \text{ (3)} \\ \diagdown \text{CH}_3 \text{ (4)} \end{array} \end{array}$	—
<i>m</i> -Kresol	$\begin{array}{l} \text{OH} \text{ (1)} \\ \text{C}_6\text{H}_4 \begin{array}{l} \diagdown \text{CH}_3 \text{ (3)} \end{array} \end{array}$	+ (wenig)

Tabelle 1. (Fortsetzung.)

Substanz	Konstitution	Oxyd. mit Laccase
Para-Verbindungen		
Hydrochinon	$\text{C}_6\text{H}_4 \begin{cases} \text{OH} (1) \\ \text{OH} (4) \end{cases}$	+
Oxyhydrochinon-triacetat	$\text{C}_6\text{H}_3 \begin{cases} \text{OOCCH}_3 (1) \\ \text{OOCCH}_3 (2) \\ \text{OOCCH}_3 (4) \end{cases}$	+
Hydrochinonmonomethyläther	$\text{C}_6\text{H}_4 \begin{cases} \text{OH} (1) \\ \text{OCH}_3 (4) \end{cases}$	+
Hydrochinondimethyläther	$\text{C}_6\text{H}_4 \begin{cases} \text{OCH}_3 (1) \\ \text{OCH}_3 (4) \end{cases}$	—
Hydrochinondiäthyläther	$\text{C}_6\text{H}_4 \begin{cases} \text{OC}_2\text{H}_5 (1) \\ \text{OC}_2\text{H}_5 (4) \end{cases}$	—
Diamidophenol-hydrochlorid	$\text{C}_6\text{H}_3 \begin{cases} \text{OH} (1) \\ \text{NH}_2\text{-HCl} (2) \\ \text{NH}_2\text{-HCl} (4) \end{cases}$	+
<i>p</i> -Phenylendiamin	$\text{C}_6\text{H}_4 \begin{cases} \text{NH}_2 (1) \\ \text{NH}_2 (4) \end{cases}$	+
Dimethyl- <i>p</i> -phenylendiamin	$\text{C}_6\text{H}_4 \begin{cases} \text{NH}_2 (1) \\ \text{N}(\text{CH}_3)_2 (4) \end{cases}$	+
„ -hydrochlorid	$\text{C}_6\text{H}_4 \begin{cases} \text{NH}_2\text{-HCl} (1) \\ \text{N}(\text{CH}_3)_2 (4) \end{cases}$	—
<i>p</i> -Kresol	$\text{C}_6\text{H}_4 \begin{cases} \text{OH} (1) \\ \text{CH}_3 (4) \end{cases}$	—
Tyrosin	$\text{C}_6\text{H}_4 \begin{cases} \text{OH} (1) \\ \text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH} (4) \end{cases}$	—
Tyramin	$\text{C}_6\text{H}_4 \begin{cases} \text{OH} (1) \\ \text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2 (4) \end{cases}$	—
Methylenoxyd-Verbindung		
Safrol	$\text{CH}_2 \begin{matrix} \diagup \text{O} \diagdown \\ \diagdown \text{O} \diagup \end{matrix} \text{C}_6\text{H}_3\text{CH}_2\text{CH}:\text{CH}_2$	—
Aliphatische Amine		
Äthylendiamin	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$	—
Putrescin-dihydrochlorid	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2\text{-2HCl}$	—
Cadaverin-dihydrochlorid	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2\text{-2HCl}$	—

Experimenteller Teil.

Nachdem Phenole bzw. Amine in einen Reaktionskolben (Abb. 1, a) aufgenommen worden, wurden einige c.c. Wasser oder Alkohol und 10 c.c. 1/3 Mol Phosphat-Puffer von pH 6.0 hinzugefügt. In der Kugel b wurde bei geschlossenem Hahn h eine Laccase-Lösung gebracht. Darauf wurde der Reaktionskolben mit der Gasbürette verbunden und in einen Thermostaten von 20.0°C. getaucht. Nachdem er evakuiert und darauf mit Sauerstoff gefüllt wurde, wurde der Hahn h geöffnet und der Reaktionskolben geschüttelt. Damit die Versuche unter konstantem Druck verlief, benützte ich die Petterson'sche Bürette.

Die meisten Substrate wurden in der Menge von 5/10000 g. Mol. verwendet, nur die Methoxylhydroxyl Ketone (Diese Ketone verdanke ich der Liebenswürdigkeit von Prof. Dr. H. Nomura.) der von 2/10000 g. Mol. Um die Reaktionsgeschwindigkeiten miteinander vergleichen zu können, wurde stets dasselbe aus dem japanischen Lack („Kiurushi“ aus Saji, Tottori) hergestellte Laccasepräparat benützt.

Die Resultate, die sich bei den gegen Laccase indifferenten Substraten ergaben, sind hier nicht mitgeteilt.

Versuch 1. Substrat: Brenzcatechin 5/10000 g. Mol. Laccase: 50 mg. Barometrischer Druck: 770.5 mm.



Tabelle 2.

Reaktionsdauer	O ₂ absorbiert	Reaktionsdauer	O ₂ absorbiert
1 Min.	1.293 mg.	90 Min.	8.508 mg.
3	1.939	115	9.259
5	2.401	180	11.502
10	3.245	240	12.728
17	4.036	300	13.546
30	4.986	420	14.404
60	7.083	495	14.694
77	8.006	ca. 22 Stdn. (nicht geschüttelt)	15.947

Versuch 2. Substrat: Guajakol 5/10000 g. Mol. Laccase: 50 mg. Barometrischer Druck: 767.4 mm.

Tabelle 3.

Reaktionsdauer	O ₂ absorbiert	Reaktionsdauer	O ₂ absorbiert
1 Min.	0.407 mg.	120 Min.	4.624 mg.
3	0.499	180	5.885
5	0.578	240	6.726
10	0.801	270	6.858
15	1.077	360	7.173
30	1.760	480	7.751
60	2.890	540	7.974
90	3.849	ca. 23 Stdn. (nicht geschüttelt)	9.511
105	4.190		

Versuch 3. Substrat: Eugenol 5/10000 g. Mol. Laccase: 50 mg. Barometrischer Druck: 767.6 mm.

Tabelle 4.

Reaktionsdauer	O ₂ absorbiert	Reaktionsdauer	O ₂ absorbiert
1 Min.	0.486 mg.	120 Min.	6.833 mg.
3	0.644	190	7.227
5	0.854	244	7.332
10	1.406	300	7.503
15	1.879	422	7.858
30	3.403	476	7.989
35	3.916	481	8.002
60	5.519	508	8.160
90	6.504	ca. 23 Stdn. (nicht geschüttelt)	11.813

Versuch 4. Substrat: Hydrochinon 5/10000 g. Mol. Laccase: 50 mg. Barometrischer Druck: 761.8 mm.

Tabelle 5.

Reaktionsdauer	O ₂ absorbiert	Reaktionsdauer	O ₂ absorbiert
1 Min.	0.547 mg.	64 Min.	7.987 mg.
3	0.912	80	8.417
5	1.290	290	8.548
10	2.046	410	8.808
25	4.222	530	8.834
30	4.886	ca. 23 Stdn. (nicht geschüttelt)	13.095
60	7.792		

Versuch 5. Substrat: Adrenalin 5/10000 g. Mol. Laccase: 50 mg. Barometrischer Druck: 759.8 mm.

Tabelle 6.

Reaktionsdauer	O ₂ absorbiert	Reaktionsdauer	O ₂ absorbiert
5 Min.	1.261 mg.	180 Min.	15.854 mg.
15	2.378	240	17.673
30	3.704	360	19.194
60	6.121	480	20.129
84	7.914	570	20.818
120	10.630	ca. 23 Std. (nicht geschüttelt)	22.481
135	11.838		

Versuch 6. Substrat: Urushiol (destilliert) 5/10000 g. Mol. Laccase: 50 mg. Barometrischer Druck: 765.0 mm.

Tabelle 7.

Reaktionsdauer	O ₂ absorbiert	Reaktionsdauer	O ₂ absorbiert
3 Min.	2.395 mg.	180 Min.	13.190 mg.
9	5.587	240	13.464
17	8.767	300	13.752
30	11.292	360	13.936
45	11.881	420	14.145
60	12.195	ca. 21 Std. (nicht geschüttelt)	18.254
120	12.836		

Versuch 7. Substrat: Hydrourushiol 5/10000 g. Mol. Laccase: 50 mg. Barometrischer Druck: 767.5 mm.

Tabelle 8.

Reaktionsdauer	O ₂ absorbiert	Reaktionsdauer	O ₂ absorbiert
1 Min.	0.197 mg.	240 Min.	1.603 mg.
4	0.263	300	2.299
13	0.328	390	2.639
30	0.394	ca. 25 Std. (nicht geschüttelt)	3.143
60	0.736	30 Std. (von 25 bis 30 Std. geschüttelt)	4.452
120	1.051		

Versuch 8. Substrat: *o*-Phenylendiamin 5/10000 g. Mol. Laccase: 50 mg. Barometrischer Druck: 760.8 mm.

Tabelle 9.

Reaktionsdauer	O ₂ absorbiert	Reaktionsdauer	O ₂ absorbiert
1 Min.	0.547 mg.	88 Min.	8.015 mg.
3	0.859	120	9.343
6	1.236	182	10.904
10	1.757	240	11.594
15	2.342	300	12.140
30	3.956	425	12.635
45	5.296	540	12.856
60	6.454	ca. 23 Stdn. (nicht geschüttelt)	14.639

Versuch 9. Substrat: *o*-Kresol 5/10000 g. Mol. Laccase: 50 mg. Barometrischer Druck: 766.8 mm.

Tabelle 10.

Reaktionsdauer	O ₂ absorbiert	Reaktionsdauer	O ₂ absorbiert
2 Min.	0.446 mg.	330 Min.	0.801 mg.
30	0.459	420	1.076
120	0.512	540	1.273
240	0.761		

Versuch 10. Substrat: *o*-Kresol 5/10000 g. Mol. Laccase: 200 mg. Barometrischer Druck: 765.9 mm.

Tabelle 11.

Reaktionsdauer	O ₂ absorbiert	Reaktionsdauer	O ₂ absorbiert
1 Min.	0.432 mg.	240 Min.	1.965 mg.
10	0.642	330	2.279
60	1.114	420	2.764
120	1.376	540	3.249

Versuch 11. Substrat: 3-Methoxy-4-hydroxy-phenyläthyl-methyl-keton 2/10000 g. Mol.
Laccase: 30 mg. Barometrischer Druck: 763.5 mm.

Tabelle 12.

Reaktionsdauer	O ₂ absorbiert	Reaktionsdauer	O ₂ absorbiert
1 Min.	0.326 mg.	60 Min.	2.455 mg.
10	0.744	120	3.199
15	0.901	150	3.265
31	1.750	330	3.435

Versuch 12. Substrat: 3-Methoxy-4-hydroxy-phenyläthyl-octenyl-keton 2/10000 g. Mol.
Laccase: 10 mg. Barometrischer Druck: 766.0 mm.

Tabelle 13.

Reaktionsdauer	O ₂ absorbiert	Reaktionsdauer	O ₂ absorbiert
1 Min.	0.472 mg.	120 Min.	1.547 mg.
5	0.642	240	1.927
15	0.905	300	2.045
30	0.957	360	2.596
62	1.010	420	2.570

Versuch 13. Substrat: Pyrogallol 5/10000 g. Mol. Laccase: 10 mg. Barometrischer Druck: 761.2 mm. Nur bei diesem Versuch wurde neben dem Reaktionskolben noch ein kleiner Kolben mit KOH verwendet, um das sich entwickelnde CO₂-Gas⁽³⁾ zu absorbieren.

Tabelle 14.

Reaktionsdauer	O ₂ absorbiert	Reaktionsdauer	O ₂ absorbiert
8 Min.	0.260 mg.	302 Min.	8.970 mg.
15	1.263	360	9.452
30	2.005	472	10.715
60	4.062	555	11.665
120	6.067	ca. 23 Stdn. (nicht geschüttelt)	16.443
225	8.020		

(3) R. Willstätter und H. Heiss, *Ann.*, **433** (1923), 17.

Versuch 14. Substrat: *m*-Kresol 5/10000 g. Mol. Laccase: 50 mg. Barometrischer Druck: 772.3 mm.

Tabelle 15.

Reaktionsdauer	O ₂ absorbiert	Reaktionsdauer	O ₂ absorbiert
10 Min.	0.132 mg.	180 Min.	0.397 mg.
30	0.159	300	0.568
60	0.278	420	0.648
90	0.304	540	0.833
120	0.264		

Versuch 15. Substrat: Oxyhydrochinon-triacetat 5/10000 g. Mol. Laccase: 50 mg. Barometrischer Druck: 761.6 mm.

Tabelle 16.

Reaktionsdauer	O ₂ absorbiert	Reaktionsdauer	O ₂ absorbiert
3 Min.	2.709 mg.	180 Min.	10.199 mg.
9	4.403	240	10.499
15	5.575	300	10.773
30	7.581	360	10.799
60	8.949	420	11.137
90	9.522	480	11.228
120	9.861	525	11.359

Versuch 16. Substrat: Hydrochinon-monomethyläther 5/10000 g. Mol. Laccase: 50 mg. Barometrischer Druck: 763.0 mm.

Tabelle 17.

Reaktionsdauer	O ₂ absorbiert	Reaktionsdauer	O ₂ absorbiert
15 Min.	1.853 mg.	123 Min.	6.917 mg.
31	3.184	305	7.269
47	4.463	420	7.308
61	5.129	515	7.373

Versuch 17. Substrat: Diamidophenol-hydrochlorid 5/10000 g. Mol. Laccase: 50 mg. Barometrischer Druck: 763.9 mm.

Tabelle 18.

Reaktionsdauer	O ₂ absorbiert	Reaktionsdauer	O ₂ absorbiert
3 Min.	0.483 mg.	132 Min.	7.970 mg.
9	1.163	180	9.002
15	1.803	245	9.995
30	3.214	300	10.557
45	4.416	360	11.197
60	5.278	480	12.124
120	7.669	600	12.751

Versuch 18. Substrat: *p*-Phenylendiamin 5/10000 g. Mol. Laccase: 30 mg. Barometrischer Druck: 766.4 mm.

Tabelle 19.

Reaktionsdauer	O ₂ absorbiert	Reaktionsdauer	O ₂ absorbiert
1 Min.	2.086 mg.	20 Min.	8.698 mg.
2	3.831	60	8.777
5	6.796	180	8.973
8	8.134	360	9.039
15	8.632	480	9.078

Versuch 19. Substrat: Dimethyl-*p*-phenylendiamin 5/10000 g. Mol. Laccase: 50 mg. Barometrischer Druck: 762.2 mm.

Tabelle 20.

Reaktionsdauer	O ₂ absorbiert	Reaktionsdauer	O ₂ absorbiert
2 Min.	5.006 mg.	123 Min.	11.146 mg.
5	7.717	180	11.602
7	8.108	210	12.410
10	8.473	300	13.349
30	9.151	420	14.366
60	9.660	540	14.809

Zum Schluss möchte ich den Herren T. Oshida und S. Yamane für ihre Hilfe, sowie der Keimeikai für ihre finanzielle Unterstützung bei Ausführung dieser Arbeit meinen herzlichen Dank ausdrücken.

*Biochemisches Laboratorium der Kaiserlichen
Landwirtschaftlichen Hochschule, Tottori.*