

### 390. Yasuhiko Asahina und Takeo Higuti: Untersuchungen über Flechtenstoffe, XXXIII. Mitteil.\*): Über die enzymatische Spaltung der Flechten-Depside und verwandter Verbindungen.

[Aus d. Pharmazeut. Institut d. Universität Tokyo.]

(Eingegangen am 20. November 1933.)

Bei der hydrolytischen Spaltung der Flechten-Depside mittels Alkalis oder durch Erhitzen mit Alkoholen werden im allgemeinen die zu erwartenden Phenol-carbonsäuren, teilweise unter Kohlensäure-Abspaltung, zersetzt. Um diese Nebenreaktion zu unterbinden, erschien es vorteilhaft, die Hydrolyse enzymatisch zu bewerkstelligen. In neuerer Zeit haben wir einige solche Experimente in Angriff genommen und dies kurz mitgeteilt<sup>1)</sup>. Obwohl unsere Arbeit noch nicht ganz abgeschlossen ist, hat doch die vor kurzem erschienene Abhandlung von Koller und Pfeiffer<sup>2)</sup> uns veranlaßt, schon jetzt unsere Ergebnisse zu publizieren. Die genannten Forscher haben gezeigt, daß einige Flechten ein Enzym enthalten, welches befähigt ist, die Depside vom Lecanorsäure-Typus bis zu den entsprechenden Phenolen abzubauen. Wir haben gefunden, daß die Tannase aus *Aspergillus niger* und das Enzym aus *Aspergillus Oryzae* die meisten Flechten-Depside in Phenol-carbonsäuren spalten. Als besonders zweckmäßig hat sich die im Handel befindliche Taka-Diastase (aus *Aspergillus Oryzae*)<sup>3)</sup> erwiesen, da man sich hierdurch die ziemlich mühsame Bereitung der Tannase<sup>4)</sup> erspart.

Zur Ausführung der Versuche werden die Alkalisalze der Depside in Wasser gelöst und die  $p_H$ -Werte der mit Taka-Diastase versetzten Lösungen auf 7.0—8.5 eingestellt; dann wird bei 37° stehen gelassen. Sobald Spaltung eingetreten ist, trüben sich die Lösungen und werden die  $p_H$ -Werte merklich vermindert, während die Kontroll-Lösungen ohne Enzym unverändert bleiben. Die ausgeschiedene Substanz besteht in der Regel aus der abgespaltenen, einfachen Phenol-carbonsäure und dem ursprünglichen Depsid, welches letzteres wegen seiner schwächeren Acidität durch die Säuren in Freiheit gesetzt wird. Man stellt nun den  $p_H$ -Wert wieder wie ursprünglich ein und setzt die Operation unter Zusatz von neuer Taka-Diastase fort, bis die Lösungen durch weiteren Enzym-Zusatz nicht mehr merklich verändert werden. Säuert man dann die Lösungen an und äthert aus, so erhält man ein Gemisch von Phenol-carbonsäuren und dem unangegriffen gebliebenen Rest der Depside. Diese sind im allgemeinen viel schwerer löslich als die einfachen Phenol-carbonsäuren und lassen sich ohne besondere Mühe beseitigen. Dagegen stößt man bei der Trennung der einzelnen Phenol-carbonsäuren, wie auch bei der alkalischen Hydrolyse, auf erhebliche Schwierigkeiten, die aber durch einen Kunstgriff behoben werden können. Da die Methylester der Phenol-carbonsäuren durch die Taka-Diastase viel schwerer als die Depside selbst hydrolysiert werden, so läßt man das Enzym nicht direkt auf die Depside, sondern auf deren Methylester einwirken. Das Reaktionsprodukt besteht dann aus Säure und Ester, die sich leicht von einander trennen lassen.

\*) XXXII. Mitteil.: B 66, 1910 [1933].

<sup>1)</sup> Journ. Soc. chem. Ind. Japan 36, 1084 (Juli-Nummer, japanisch).

<sup>2)</sup> Monatsh. Chem. 62, 359 [5/6. Heft, 1933].

<sup>3)</sup> Ein von Sakyo & Co. (Tokyo) besonders hergestelltes, wirksames Präparat, nicht aber die gewöhnlichen Pharmakopoe-Präparate.

<sup>4)</sup> Freudenberg, B. 53, 232 [1920].

Durch Taka-Diastase leicht spaltbar sind: Lecanorsäure, Gyrophorsäure, Everssäure, Olivetorsäure, Sekikasäure, Divaricatsäure, Squamatsäure, Atranorin, Salicyl-salicylsäure und das Tannin aus chinesischen Galläpfeln. Etwas schwerer spaltbar erweisen sich: DiffRACTsäure, Benzoyl-salicylsäure, *p'*-Oxybenzoyl-*p*-oxybenzoessäure, sowie die Methyl ester der Gallussäure und Salicylsäure.

Es scheint also, daß diejenigen Depside, die ein zur an der Depsid-Bindung beteiligten Carboxylgruppe *o*- oder *m*-ständiges, freies Hydroxyl besitzen, durch Taka-Diastase leichter gespalten werden.

### Beschreibung der Versuche.

Spaltung der Lecanorsäure durch Taka-Diastase.

Um zuerst den Einfluß des  $p_H$ -Wertes zu ermitteln, haben wir folgende Versuche angestellt: 1 g Lecanorsäure wurde mit  $1/10$ -n. Kalilauge neutralisiert, mit Wasser auf 160 ccm verdünnt und auf 4 Kölbchen gleichmäßig verteilt. Zu jeder Lösung wurde je 0.3 g Taka-Diastase hinzugefügt und durch Zusatz von Phosphat-Puffer der  $p_H$ -Wert auf 8.5, 8.0, 7.0, 6.3 eingestellt. Nach 30-stdg. Stehen im Brutofen ( $37^0$ ) wurden folgende Veränderungen beobachtet:

	$p_H$		Beschaffenheit der Lösungen:
	ursprünglich	nach Enzym-Wirkung	
I.	8.5	7.1	stark getrübt, Flockenbildung
II.	8.0	7.2	stark getrübt
III.	7.0	6.6	getrübt
IV.	6.3	5.8	schwache Trübung

Dann haben wir auf die Wirksamkeit der Taka-Diastase geprüft. Dazu werden je 0.4 g Lecanorsäure als Natriumsalz in 80 ccm Wasser gelöst und mit 0.05 (I), 0.10 (II), 0.15 (III) und 0.20 g (IV) Enzym versetzt; nach Einstellung des  $p_H$ -Wertes aller Lösungen auf 8 wurde dann 24 Stdn. bei  $37^0$  stehen gelassen. Die veränderten  $p_H$ -Werte der einzelnen Proben und die Mengen  $1/10$ -n. KOH, die zum Neutralisieren erforderlich waren, ergibt folgende Tabelle:

	$p_H$	0.1-n. KOH	Depsid-Spaltung
	nach 24 Stdn.	in ccm	in %
I.	5.6	3.21	25.6
II.	5.4	5.30	42.2
III.	5.2	5.81	46.2
IV.	5.2	5.81	46.2

(1 ccm 0.1-n. KOH entspricht 0.0168 g Orsellinsäure)

Äthert man die mit dem Enzym behandelten Lösungen nach dem Ansäuern aus und verdampft den Äther, so erhält man ein Gemisch von Lecanorsäure und Orsellinsäure, aus dem man die letztere mit warmem Wasser ( $50^0$ ) herauslösen kann. Aus Äther umkrystallisiert, schmilzt sie bei  $176^0$ ; ihre Lösung färbt sich mit Eisenchlorid violett, mit Chlorkalk blutrot.

Spaltung der Lecanorsäure durch Tannase.

0.3 g Lecanorsäure wurden, als Natriumsalz in 60 ccm Wasser gelöst, mit 0.1 g Tannase<sup>4)</sup> versetzt und die Lösung (eingestellt auf  $p_H$  7.4) bei  $35^0$  aufbewahrt. Nach 24 Stdn. wurde die Lösung ( $p_H$  5.2) ausgeäthert, wobei 0.053 g Orsellinsäure erhalten wurden.

In allen Fällen blieben die Kontroll-Lösungen ohne Enzym völlig unverändert.

#### Spaltung der Gyrophorsäure durch Taka-Diastase.

0.5 g Substanz wurden mit  $\frac{1}{10}$ -n. Kalilauge neutralisiert, auf 150 ccm verdünnt, mit 0.03 g Taka-Diastase versetzt, durch Phosphat-Puffer der  $p_H$ -Wert auf 8.2 g gebracht und bei 37° stehen gelassen. Alle 24 Stdn. wurde die gespaltene Säure neutralisiert und dann von neuem je 0.03 g Enzym hinzugefügt, wobei folgende Zahlen erhalten wurden:

	nach 1 Tag	2 Tagen	3 Tagen	4 Tagen	5 Tagen	6 Tagen
$p_H$ .....	6.4	6.7	7.0	7.2	7.6	—
Verbrauch an 0.1-n. KOH in ccm ....	5.55	4.20	3.45	3.0	1.8	—
Ausbeute an Orsellinsäure in % .....	26.2	19.8	16.2	14.0	8.5	—

Im ganzen wurde also die Orsellinsäure mit einer Ausbeute von 84.7% erhalten.

#### Spaltung der Eversensäure durch Taka-Diastase.

Die Eversensäure wird durch Taka-Diastase ebenso leicht wie die Lecanorsäure gespalten, jedoch bietet die Trennung der dabei auftretenden Everninsäure und Orsellinsäure Schwierigkeiten. Um die Methode präparativ anwendbar zu gestalten, haben wir sie wie folgt ausgeführt: 0.7 g Eversensäuremethylester (Schmp. 148°) wurden in 80 ccm Aceton und 55 ccm Wasser gelöst, mit 5 ccm  $\frac{1}{10}$ -n. Kalilauge neutralisiert und unter Zusatz von 0.4 g Taka-Diastase bei 37° aufbewahrt. Nach 40 Stdn. war der  $p_H$ -Wert der Lösung von 7.6 auf 5.8 verschoben, und die Lösung färbte sich mit Eisenchlorid violett, mit Chlorkalk blutrot. Nach dem Verjagen des Acetons wurde die Lösung angesäuert, mit Äther extrahiert und der Äther-Auszug mit Bicarbonat-Lösung (A) geschüttelt. Beim Verdampfen des Äthers blieb ein farbloser Rückstand (0.26 g) zurück, der beim Umlösen aus verd. Alkohol farblose Nadeln vom Schmp. 136° bildete und sich als identisch mit Orsellinsäuremethylester erwies. Die Bicarbonat-Lösung (A) lieferte beim Ansäuern und darauffolgenden Extrahieren mit Äther eine Substanz (0.23 g), die sich beim Umlösen aus Benzol in farblose Nadeln vom Schmp. 168° (Everninsäure) verwandelte; ihre alkohol. Lösung wurde von Eisenchlorid violett, von Chlorkalk nicht gefärbt.

#### Spaltung der Divaricatsäure durch Taka-Diastase.

1 g Divaricatsäuremethylester<sup>5)</sup> wurde in einem Gemisch von 90 ccm Aceton und 70 ccm Wasser gelöst, mit 0.5 g Taka-Diastase versetzt, durch Zusatz von 4 ccm  $\frac{1}{10}$ -n. Lauge der  $p_H$ -Wert auf 7.6 eingestellt und 40 Stdn. bei 39° stehen gelassen. Eine Probe der so erhaltenen Lösung ( $p_H$  6.2) färbte sich mit Chlorkalk deutlich rot. Dann wurden 2 ccm  $\frac{1}{10}$ -n. Lauge zugesetzt und bei 39° noch 10 Stdn. aufbewahrt. Schließlich wurde die Lösung durch Destillation von Aceton befreit, mit verd. Salzsäure stark angesäuert, ausgeäthert und der Äther-Auszug mit Bicarbonat-Lösung (A) ge-

<sup>5)</sup> B. 65, 1666 [1932].

schüttelt. Der beim Verdampfen der Äther-Lösung zurückbleibende Rückstand bildete beim Umkrystallisieren aus verd. Alkohol farblose, seiden-glänzende Nadeln vom Schmp.  $71^{\circ}$ , die durch ihre rote Chlorkalk-Reaktion und den Methoxyl-Gehalt mit Divarsäure-methylester identifiziert wurden.

0.03601 g Sbst.: 0.0388 g AgJ (nach Zeisel).

$C_{11}H_{14}O_4$ . Ber.  $CH_3O$  14.76. Gef.  $CH_3O$  14.21.

Die Bicarbonat-Lösung (A) wurde angesäuert, ausgeäthert und der Äther verdampft. Der Rückstand (0.3 g) lieferte beim Umlösen aus verd. Alkohol farblose Nadeln vom Schmp.  $145^{\circ}$ , deren alkohol. Lösung sich mit Eisenchlorid violett, mit Chlorkalk nicht färbte (Divaricatinsäure).

#### Spaltung der Olivetorsäure durch Taka-Diastase.

1 g Substanz wurde in 22 ccm 0.1-n. KOH gelöst, auf 200 ccm verdünnt, mit 0.5 g Taka-Diastase versetzt, der  $p_H$ -Wert auf 8.1 gebracht und bei  $37^{\circ}$  50 Stdn. aufbewahrt. Aus der Reaktionsflüssigkeit, deren  $p_H$  nunmehr auf 7.5 gesunken war, schieden sich nadelförmige Krystalle ab, die mit Äther extrahiert wurden. Beim Verdampfen des Äther-Extraktes blieben 0.257 g einer Substanz zurück, die, aus Benzol umkrystallisiert, farblose Nadeln vom Schmp.  $110^{\circ}$  bildete und sich als identisch mit Olivetonid<sup>6)</sup> erwies. Da die vom Olivetonid befreite Lösung nach weiterem 30-stdg. Aufbewahren von Taka-Diastase nicht merklich verändert worden war, wurde sie angesäuert, ausgeäthert und der Äther-Auszug mit Bicarbonat-Lösung geschüttelt. Dann wurde die Bicarbonat-Lösung angesäuert und ausgeäthert. Beim Verdampfen der ätherischen Lösung wurden rein weiße Nadeln (0.042 g) vom Schmp.  $145^{\circ}$  erhalten. Durch direkten Vergleich überzeugten wir uns von ihrer Identität mit Olivetol-carbonsäure<sup>7)</sup>.

#### Spaltung der Sekikasäure<sup>8)</sup> und Squamatsäure<sup>9)</sup> durch Taka-Diastase.

0.5 g Sekikasäure wurden mit  $\frac{1}{10}$ -n. Kalilauge neutralisiert, mit Wasser auf 100 ccm verdünnt, mit 0.1 g Taka-Diastase versetzt und im Brutfen bei  $37^{\circ}$  aufbewahrt. Innerhalb 40 Stdn. sank der anfängliche  $p_H$ -Wert 8.2 auf 7.0, und eine Probe färbte sich mit Chlorkalk ultramarinblau, wodurch die Bildung von Oxy-divaricatinsäure bewiesen war.

0.3 g Squamatsäure wurden mit  $\frac{1}{10}$ -n. Kalilauge neutralisiert, mit Wasser auf 90 ccm verdünnt, mit 0.1 g Taka-Diastase versetzt und bei  $37^{\circ}$  stehen gelassen. Nach 24 Stdn. war der ursprüngliche  $p_H$ -Wert 8.0 auf 6.4 gesunken und wurden 2.34 ccm  $\frac{1}{10}$ -n. KOH zum Neutralisieren verbraucht. Die präparative Spaltung der beiden Depside soll später ausführlich mitgeteilt werden.

#### Spaltung des Atranorins durch Taka-Diastase.

1 g Atranorin wurde in 170 ccm Aceton gelöst, mit 2 ccm  $\frac{1}{10}$ -n. Kalilauge und 30 ccm Wasser versetzt und unter Zusatz von 0.4 g Taka-Diastase im Brutfen bei  $37^{\circ}$  aufbewahrt. Nach 3 Tagen hatten sich gelbliche Flocken

<sup>6)</sup> B. 65, 479 [1932].

<sup>7)</sup> B. 65, 481 [1932].

<sup>8)</sup> B. 66, 30 [1933].

<sup>9)</sup> B. 66, 36 [1933].

in reichlicher Menge ausgeschieden, und eine Probe der Lösung färbte sich mit Eisenchlorid dunkelviolett. Dann wurde das Aceton abdestilliert, die Lösung angesäuert und ausgeäthert. Der Äther-Auszug wurde mit Bicarbonat-Lösung (B) geschüttelt und der Äther verdampft. Der Rückstand bildete beim Umlösen aus heißem Wasser farblose, seidenglänzende Nadeln vom Schmp. 143° ( $\beta$ -Orcin-carbonsäure-methylester). Schließlich wurde die Bicarbonat-Lösung (B) angesäuert, ausgeäthert und der Äther verdampft. Der Rückstand (0.2 g) ergab beim Umlösen aus 40-proz. Alkohol farblose Blättchen vom Schmp. 167–168° (Haematomsäure)<sup>10</sup>.

#### Spaltung der Diffractasäure durch Taka-Diastase.

0.8 g Diffractasäure wurden in 25 ccm  $\frac{1}{10}$ -n. KOH gelöst, mit 35 ccm Aceton versetzt und unter Zusatz von 50 ccm Phosphat-Puffer und 65 ccm Wasser auf 170 ccm verdünnt. Nach Zugabe von 0.8 g Taka-Diastase und 0.1 g Kochsalz wurde dann 50 Stdn. bei 37° aufbewahrt. Zum Neutralisieren der Lösung ( $p_H$  7.6) bis zum ursprünglichen  $p_H$  8.0 wurden 3.91 ccm  $\frac{1}{10}$ -n. Kalilauge verbraucht. Bei erneuter Einwirkung von 0.2 g Taka-Diastase wurden nach 50 Stdn. noch 2.72 ccm  $\frac{1}{10}$ -n. KOH verbraucht. Im ersten Fall wurden also etwa 18.0, im zweiten etwa 13.6% Depsid gespalten.

#### Spaltung der Salicyl-salicylsäure und des Salicylsäure-methylesters durch Taka-Diastase.

1 g Salicyl-salicylsäure (Schmp. 147°) wurde mit  $\frac{1}{10}$ -n. Kalilauge neutralisiert, mit Wasser auf 200 ccm verdünnt, mit 0.5 g Taka-Diastase versetzt und auf  $p_H$  8.2 eingestellt. Nach 50-stdg. Aufbewahren im Brutofen bei 37° wurde die Lösung ( $p_H$  7.0) mit Äther extrahiert und der Äther verdampft. Der Rückstand (0.143 g) bildete nach dem Umkrystallisieren aus Wasser farblose Nadeln vom Schmp. 156° (Salicylsäure).

1.2 g Salicylsäure-methylester wurden in 30 ccm Aceton und 170 ccm Wasser gelöst, mit etwa 1 ccm  $\frac{1}{10}$ -n. Kalilauge versetzt ( $p_H$  8.2) und unter Zusatz von 0.6 g Taka-Diastase 30 Stdn. bei 37° stehen gelassen. Zum Neutralisieren der Reaktionsflüssigkeit ( $p_H$  6.4) bis zum ursprünglichen  $p_H$  8.2 wurden 8.4 ccm  $\frac{1}{10}$ -n. KOH verbraucht. Die so erhaltene Lösung wurde nochmals mit 0.2 g Taka-Diastase versetzt und 24 Stdn. bei 37° aufbewahrt. Der  $p_H$ -Wert war dann auf 6.8 gesunken und die Lösung verbrauchte 7.2 ccm  $\frac{1}{10}$ -n. KOH zum Neutralisieren. Im ersten Fall wurden also etwa 10, im zweiten etwa 9% Depsid gespalten.

#### Spaltung der Benzoyl-salicylsäure durch Taka-Diastase.

1 g Benzoyl-salicylsäure wurde in 55 ccm Aceton gelöst; nach Zusatz von 52 ccm  $\frac{1}{10}$ -n. Kalilauge und 70 ccm Phosphat-Puffer ( $p_H$  8.04) wurde auf 180 ccm verdünnt, mit 0.7 g Taka-Diastase und 0.1 g Kochsalz vermischt und 50 Stdn. bei 37° stehen gelassen. Zum Neutralisieren der so gewonnenen Lösung ( $p_H$  7.7) bis zum ursprünglichen  $p_H$  8.0 wurden 4.63 ccm  $\frac{1}{10}$ -n. KOH verbraucht. Dann wurde nochmals Enzym (0.2 g) hinzugefügt und unter Zusatz von 20 ccm Phosphat-Puffer ( $p_H$  8.04) 50 Stdn. bei 37° aufbewahrt. Zum Neutralisieren des Gemisches ( $p_H$  7.8) wurden nunmehr 3.51 ccm  $\frac{1}{10}$ -n. KOH verbraucht. Im ganzen waren mithin 20% des Depsids gespalten worden.

<sup>10</sup>) Pfau, Helv. chim. Acta 16, 285.

Spaltung der *p'*-Oxybenzoyl-*p*-oxybenzoesäure durch  
Taka-Diastase.

0.8 g Depsid wurden in 33 ccm  $1/10$ -*n*. Kalilauge gelöst, mit 40 ccm Aceton versetzt und unter Zugabe von 90 ccm Phosphat-Puffer ( $p_H$  8.04) und 17 ccm Wasser auf 180 ccm verdünnt. Hiernach wurden 0.5 g Taka-Diastase und 0.1 g Kochsalz zugegeben. Zum Neutralisieren der nach 50-stdg. Stehen bei  $37^0$  gewonnenen Lösung ( $p_H$  7.8) bis zum ursprünglichen  $p_H$  8.0 wurden 7.74 ccm  $1/10$ -*n*. Kalilauge verbraucht. Dann wurde noch 0.2 g Taka-Diastase zugesetzt und nach 50-stdg. Stehen bei  $37^0$  mit  $1/10$ -*n*. Kalilauge neutralisiert, wobei 5.58 ccm  $1/10$ -*n*. Lauge verbraucht wurden. Da 0.0138 g *p*-Oxy-benzoesäure 1 ccm 0.1-*n*. KOH neutralisieren, waren ungefähr 22 % des Depsids gespalten worden.

Spaltung des Gallussäure-methylesters durch Taka-Diastase.

4.32 g des Esters wurden in 700 ccm Wasser gelöst; durch Zusatz von  $1/10$ -*n*. Kalilauge wurde dann der  $p_H$ -Wert auf 8.1 eingestellt und mit Wasser auf 800 ccm verdünnt. Die Lösung wurde auf 8 Kolben gleichmäßig verteilt, mit verschiedenen Mengen Enzym versetzt und 40 Stdn. bei  $37^0$  aufbewahrt. Die veränderten  $p_H$ -Werte und die Menge der  $1/10$ -*n*. Kalilauge, die zum Neutralisieren verbraucht wurde, ergibt nachstehende Tabelle:

0.54 g Sbst.	Enzym- Menge	$p_H$ nach Enzym-Wirk.	0.1- <i>n</i> . KOH	Spaltung in %
I.	0.01 g	8.1	0	0
II.	0.05 g	8.0	2.1	6.6
III.	0.10 g	7.9	2.3	7.2
IV.	0.25 g	7.9	2.5	7.8
V.	0.50 g	7.6	3.2	10.0
VI.	0.75 g	7.6	5.3	16.7
VII.	1.00 g	7.2	9.2	28.8
VIII.	1.25 g	7.2	9.4	29.4

Spaltung des Galläpfel-Tannins durch Taka-Diastase.

1.5 g scharf getrocknetes Tannin (Ph. Jap. V.) wurden in 350 ccm Wasser gelöst, mit 0.3 g Taka-Diastase versetzt, um den  $p_H$ -Wert der Lösung auf 8.0 einzustellen, 40 ccm  $1/10$ -*n*. Kalilauge zugefügt, mit Toluol überschichtet und bei  $37^0$  aufbewahrt. Alle 24 Stdn wurde die Lösung bis zum ursprünglichen  $p_H$ -Wert 8.0 neutralisiert, wobei nach 5 Tagen keine Veränderung des  $p_H$ -Wertes mehr beobachtet wurde. An  $1/10$ -*n*. KOH wurden verbraucht: I. 20, II. 10, III. 8, IV. 5 ccm. Wenn man 40 ccm der von Anfang an zugesetzten  $1/10$ -*n*. Lauge mitrechnet, wurden aus 1.5 g Tannin etwa 1.1 g Gallussäure abgespalten (1 ccm 0.1-*n*. KOH entspricht 0.017 g Gallussäure).