

KARL FREUDENBERG, JOHN M. HARKIN, MARTIN REICHERT und  
TOSHIO FUKUZUMI\*)

## Die an der Verholzung beteiligten Enzyme. Die Dehydrierung des Sinapinalkohols

Aus dem Chemischen Institut der Universität und dem Forschungsinstitut für die Chemie des  
Holzes und der Polysaccharide, Heidelberg

(Eingegangen am 9. Dezember 1957)

Zur Dehydrierung der *p*-Hydroxy-zimtalkohole *in vitro* dient ein Enzymgemisch aus Pilzen (*Psalliotia*), in dem Laccase der wichtigste Bestandteil ist. Laccase spielt auch die Hauptrolle bei der Dehydrierung des Coniferylalkohols in der Fichte. Die Anreicherung und Wirkung dieser Enzyme wird beschrieben. Kupfersulfat und Sauerstoff sowie Sauerstoff allein bilden aus *p*-Hydroxy-zimtalkoholen dieselben Dehydrierungsprodukte wie die Enzyme, wenn auch bedeutend langsamer. Sinapinalkohol wird mit hoher Ausbeute zu Syringaresinol dehydriert.

Die wichtigste Phase der Ligninbildung wird durch die enzymatische Dehydrierung von *p*-Hydroxy-zimtalkoholen eingeleitet. Der Angriff erfolgt am Phenolhydroxyl, dem der Wasserstoff entzogen wird. Die entstandenen Radikale stabilisieren sich, hauptsächlich durch Dimerisation, zu zahlreichen Zwischenprodukten der Ligninbildung, den sekundären Bausteinen. In diesen ist ein Teil der Phenolgruppen zurückgebildet; sie können erneut dehydriert werden und dann weiter reagieren. Die Tätigkeit der Enzyme beschränkt sich auf die Dehydrierung; die übrigen Reaktionen laufen automatisch ab. Daher sind alle Produkte optisch inaktiv.

Es ist nicht überraschend, daß die Reaktion unspezifisch, d. h. von der Art des Dehydrierungsmittels weitgehend unabhängig ist. In den Coniferen wird die Reaktion von Laccase und Peroxydase getragen, im Pilzenzym von Laccase<sup>1)</sup> allein. Tyrosinase wirkt nicht auf den Coniferylalkohol. Peroxydase allein ist wirksam in Gegenwart von Wasserstoffperoxyd. Schließlich zeigte sich, daß Kupfersulfat und Sauerstoff allein, wenn auch langsam, auf Coniferylalkohol wie die Enzyme wirken. Zusätze geringer Mengen von anderen Metallionen, wie Eisen oder Mangan, beschleunigen die Reaktion. Sogar in Wasser ohne Zusätze (Spuren von Schwermetall sind nicht ausgeschlossen) entstehen bei der Belüftung sehr langsam die gleichen Umwandlungsprodukte des Coniferylalkohols.

Der Phenolwasserstoff wird von der Peroxydase auf Hydroperoxyd, von der Laccase und von Kupfersalzen auf Luftsauerstoff übertragen. In allen Fällen wird der Coniferylalkohol in dieselben zahlreichen Zwischenprodukte der Ligninbildung verwandelt, die ausführlich, aber noch keineswegs erschöpfend, bearbeitet sind.

\*) Wir danken der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT für die Überlassung von Mitteln. Der ALEXANDER-VON-HUMBOLDT-STIFTUNG danke ich für die Gewährung eines Stipendiums. T. FUKUZUMI.

<sup>1)</sup> K. FREUDENBERG, Ruzicka-Festschrift, Croat. chem. Acta 29, 189 [1957].

## PILZENZYME

Zur Dehydrierung des Isoeugenols haben H. COUSIN und H. HÉRISSEY<sup>2)</sup> 1908 den Extrakt des Pilzes *Russula delica* verwendet. Seit Beginn ihrer Studien über die enzymatische Phenoldehydrierung benutzten K. FREUDENBERG und H. RICHTZENHAIN<sup>2a)</sup> die Enzyme des im Großen gezüchteten Speisechampignons *Psalliota campestris*. G. LEGRAND<sup>3)</sup> hat ausgesprochen, daß das Enzym wahrscheinlich Laccase sei. Wir können diese Auffassung bestätigen und haben die Pilzlaccase näher gekennzeichnet. Die bisherige Vorschrift zur Darstellung des Enzyms<sup>4)</sup> wird weiter unten durch eine neue ersetzt. Anfänglich beigemischte Tyrosinase verschwindet völlig während der Aufarbeitung. Das Endprodukt ist auch frei von Peroxydase und Katalase, enthält aber geringe Mengen von  $\beta$ -Glucosidase. Die maximale Aktivität gegenüber der Dihydroferulasäure liegt bei etwa 35°, das  $p_H$ -Optimum zwischen 6.1 und 6.7. Bei  $p_H$  4 und  $p_H$  8 ist die Wirksamkeit sehr gering. Bei  $p_H$  2 und  $p_H$  10 wird das Enzym in kurzer Zeit zerstört. Zusatz von 20 % Methanol zur wäßrigen Lösung setzt die Aktivität nicht herab. Das Enzym katalysiert die Dehydrierung von Mono- und Polyphenolen sowie von aromatischen Diaminen in Gegenwart von Luftsauerstoff. Am besten werden *p*-Phenylendiamin und Pyrogallol dehydriert. Hydrochinon<sup>5)</sup> und Coniferylalkohol werden anfänglich ungefähr gleich schnell dehydriert, später unterscheiden sich die Kurven. Dihydroferulasäure wird langsamer angegriffen, Ascorbinsäure wird rasch dehydriert<sup>6)</sup>. Zusatz von Spuren von *p*-Phenylendiamin zur Ascorbinsäure erhöht die Geschwindigkeit, die dann derjenigen der Dehydrierung des *p*-Phenylendiamins gleichkommt. Brenzcatechin wird ungefähr halb so schnell wie *p*-Phenylendiamin dehydriert. Während der Reaktion wird keine Inaktivierung des Enzyms beobachtet. *p*-Kresol und besonders Resorcin werden langsam dehydriert, das erste unter Bildung eines weißen Niederschlags. Polyphenoloxydase (Tyrosinase) oxydiert dagegen das *p*-Kresol zu dunkelgefärbten, löslichen Produkten. Dihydroxyphenylalanin (Dopa) wird von unserem Pilzenzym in Melanine verwandelt, nicht aber Tyrosin, auch nicht nach Zusatz von Brenzcatechin.

Als Laccase ist das Enzym des weiteren gekennzeichnet durch seine Fähigkeit, Pyrogallol in Gegenwart von Sauerstoff in Purpurogallin zu verwandeln, sowie durch seine Unempfindlichkeit gegenüber Kohlenoxyd. Es zeigte sich, daß Mischungen von 19 Voll. Kohlenoxyd oder Stickstoff mit 1 Vol. Sauerstoff gleich schnell reagieren, ebenso Gemische von 4 Voll. Kohlenoxyd oder Stickstoff mit 1 Vol. Sauerstoff. Das Pilzenzym wirkt nur in Anwesenheit von Sauerstoff; Methylenblau ist als Acceptor unwirksam. Anthocyane werden entfärbt und wie die hydroxylreichen Flavane in braune Massen verwandelt.

2) C. R. hebd. Séances Acad. Sci. **147**, 247 [1908].

2a) Ber. dtsh. chem. Ges. **76**, 997 [1943].

3) C. R. hebd. Séances Acad. Sci. **240**, 249 [1955].

4) K. FREUDENBERG, Angew. Chem. **68**, 508 [1956].

5) J. B. SUMNER und K. MYRBÄCK, The Enzymes Vol. II, Part 1, S. 456, Academic Press Inc., New York 1951.

6) D. KEILIN und T. MANN, Nature [London] **143**, 23 [1939] und **145**, 304 [1940], finden bei Laccase aus *Rhus succedanea* keine Wirkung auf Ascorbinsäure, während Z. YAKUSHIJI, Proc. Imp. Acad. [Tokyo] **16**, 39 [1940], an Laccase aus derselben Pflanze Wirkung feststellt.

Die Laccase wird irreversibel gehemmt durch Salze des Bleis, Chroms, Quecksilbers und anderer Schwermetalle. Sogar das kaum dissoziierte Phenylquecksilberacetat stört deutlich. Reversibel hemmen Natriumazid, Natriumcyanid, Schwefelwasserstoff, Diäthyl-dithiocarbamat, Thioharnstoff und Diphenylthioharnstoff, also Substanzen, die Komplexe mit Kupfer bilden. Die Wirkung kann durch Zusatz von Kupfer(II)-Salzen wieder hergestellt werden. Durch Elektrodialyse wird das Enzym inaktiviert.  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -Salz stellt die Aktivität wieder her. Ni, Zn, Co,  $\text{Fe}^{\text{II}}$ ,  $\text{Mn}^{\text{II}}$  usw. sind unwirksam.

#### ENZYME DES FICHTENHOLZES

Die früheren Versuche<sup>7)</sup> wurden erweitert. Bei Verarbeitung großer Mengen frischen Wachstumsgewebes der Fichte zeigte sich, daß der Hauptteil der dehydrierenden Enzyme in Wasser löslich ist und ein kleinerer Teil im Gewebe haftet. In der Lösung wurden gefunden: Laccase, Peroxydase, Katalase und  $\beta$ -Glucosidase. Die Anwesenheit der letzteren wurde festgestellt durch Indican oder durch Einwirkung des Saftes auf Amygdalin und Messung der Blausäure im Destillat der mit Hydrogencarbonat versetzten Lösung. Der rohe Cambialsaft oxydiert zwar Dopa, er ist aber ohne Wirkung auf Tyrosin. Die früher der Tyrosinase zugesprochene Aktivität ist also auf Laccase zurückzuführen. Tyrosinase haben wir im Cambialgebiet der Fichte überhaupt nicht angetroffen. Pyrogallol wird durch Luftsauerstoff in Purpurogallin umgewandelt. Hierdurch sowie durch sein Verhalten gegen Hydrochinon und gegen Kohlenoxyd gibt sich das Enzym als Laccase zu erkennen. Zur Kennzeichnung der Peroxydase wurde Äthylhydroperoxyd nach A. RIECHE<sup>8)</sup> verwendet, das außerordentlich langsam durch Katalase gespalten, aber von Peroxydase fast so schnell wie Wasserstoffperoxyd angegriffen wird. Die Peroxydase-Wirkung wurde mit diesem Acceptor anaerob geprüft; sie ist unbedeutend im Verhältnis zur Laccase-Wirkung (aerobe Bildung von Purpurogallin). Die gemeinsame Wirkung von Laccase und Katalase, die sehr leicht mit Peroxydase-Wirkung verwechselt werden kann, ist bedeutend größer. Die Laccase des Fichtenholzes konnte auf dieselbe Weise wie die des Pilzes angereichert werden. Sie ist wenig haltbar.

#### ENZYME DES BAMBUS

Inzwischen hat T. HIGUCHI<sup>9)</sup> das an der Ligninbildung beteiligte Enzymssystem von Bambusschößlingen untersucht und auch hier Laccase festgestellt. Er findet jedoch, daß die Dehydrierung des Brenzcatechins durch Kohlenmonoxyd herabgesetzt wird. Diese Erscheinung ist wahrscheinlich auf die Beimischung von Tyrosinase zurückzuführen. Diese ist anwesend, weil Higuchi den gesamten Bambustrieb als Ausgangssubstanz verwendet und das Enzym durch Ammoniumsulfatfällung anreichert. Wir haben gefunden, daß Fraktionierung mit Ammoniumsulfat nicht zur Trennung von Laccase und Tyrosinase führt.

<sup>7)</sup> K. FREUDENBERG, H. REZNIK, H. BOESENBERG und D. RASENACK, Chem. Ber. **85**, 641 [1952].

<sup>8)</sup> A. RIECHE, Akylperoxyde und Ozonide, Verlag Th. Steinkopf, Dresden und Leipzig, 1931, S. 23.

<sup>9)</sup> Physiologia plantarum **10**, 356 [1957].

## PEROXYDASE

Gereinigte Peroxydase aus Meerrettich zeigt mit Wasserstoffperoxyd dieselbe Wirkung wie das Laccase-Sauerstoff-System. Mit Coniferylalkohol entstehen dieselben Zwischenprodukte wie bei der Dehydrierung mit Laccase. Das Peroxyd darf allerdings nur so schnell zugegeben werden, wie es verarbeitet wird, da Peroxyd allein unabhängig von der DHP-Bildung den Coniferylalkohol verändert.

## SUBSTRATE

Für die Versuche mit Coniferylalkohol diente ursprünglich ein Präparat, das durch enzymatische Spaltung von Coniferin gewonnen wurde<sup>10</sup>). Später wurde der Coniferylalkohol aus Coniferylbenzoat (Lubanolbenzoat aus Siambenzoe) zugänglich gemacht<sup>11</sup>). Bald darauf wurde er aus Ferulasäureester mit Lithiumaluminiumhydrid im Anschluß an die Vorschrift von D. H. F. ALLEN und J. F. BYERS hergestellt<sup>12</sup>), die ausgearbeitet wurde<sup>13</sup>). Für die Bereitung des Sinapinalkohols diente zunächst sein Glucosid, das Syringin, später<sup>13</sup>) wurde er synthetisch hergestellt. Weiter unten wird eine Ergänzung der älteren Vorschrift mitgeteilt.

## DEHYDRIERUNG DES CONFERYLALKOHOLS

Der Verbrauch von Sauerstoff verringert sich stark, wenn etwa 0.6 Grammatome Wasserstoff pro Mol Coniferylalkohol entfernt sind. Dasselbe hat H. Lyr<sup>14</sup>) gefunden. Er konnte im Warburg-Gerät nach zwei Stunden nur einen Wasserstoffverbrauch von 0.5–0.6 Grammatomen feststellen. Mit wenig Coniferylalkohol und hochaktiver Laccase konnten wir unter gleichen Bedingungen einen Sauerstoffverbrauch beobachten, der der Entnahme von 1.3 Grammatomen Wasserstoff pro Mol Coniferylalkohol entspricht. Die Kurve der Sauerstoffaufnahme zeigt einen typischen Knick nach Wegnahme von 0.65 Grammatomen H. Danach geht der Verbrauch regelmäßig, aber viel langsamer weiter. K. FREUDENBERG und H. RICHTZENHAIN<sup>2a</sup>) haben bei  $p_H$  8 denselben Knick nach Wegnahme von 0.7–0.8 Grammatomen H gefunden. Auch bei größeren Ansätzen, die mit 2–3 g Coniferylalkohol ausgeführt waren, wurde die Verlangsamung nach Entzug von 0.6–0.7 Grammatomen H pro Mol Coniferylalkohol gefunden. Das Enzym wurde dabei jedoch nicht inaktiviert, da zugegebenes Hydrochinon oder Brenzcatechin mit der für die vorhandene Menge Enzym richtigen Geschwindigkeit oxydiert wurden und mit mehr Enzym keine bedeutende *Beschleunigung* der Reaktion erreicht wurde. Als die Reaktion 15–20 Tage durchgeführt wurde, entsprach der Sauerstoffverbrauch der Wegnahme von 1.5 Grammatomen H pro Mol Coniferylalkohol. Dieses ist der Wert, der auch der Oxydationsstufe<sup>15</sup>) des Dehydrierungspolymerisats (DHP) und des MW-(milled wood)-Lignins nach BJÖRKMANN entspricht. Durch Zusatz von Desinfektions-

10) K. FREUDENBERG, F. SOHNS, W. DÜRR und CHR. NIEMANN, *Cellulosechemie* **12**, 2631 [1931] und folgende Arbeiten.

11) K. FREUDENBERG und F. BITTNER, *Chem. Ber.* **83**, 600 [1950].

12) J. Amer. chem. Soc. **71**, 2683 [1949].

13) K. FREUDENBERG und H. HÜBNER, *Chem. Ber.* **85**, 1181 [1952].

14) *Naturwissenschaften* **44**, 235 [1957].

15) K. FREUDENBERG, *Fortschr. Chem. org. Naturstoffe*, **XI**, S. 43, Springer Verlag, Wien 1954.

mittel<sup>16)</sup> wurden störende Infektionen verhindert. Wird weiteres Enzym in Abständen zugegeben, so übersteigt nach genügend langer Zeit der Entzug von Wasserstoff 1.5 Grammatom. Auch MW-Lignin wird weiter dehydriert. Auch bei der Dehydrierung des Coniferylalkohols mit Sauerstoff und Kupfersulfat wurde dieselbe Verzögerung nach Wegnahme von 0.6 Grammatomen Wasserstoff wahrgenommen. Hierbei ist folgendes beobachtet worden: Während sich die früher beschriebenen, mit Diazobenzol-sulfonsäure rot, orange und gelb kuppelnden Zwischenprodukte bilden, erscheinen zugleich kräftig rotviolett kuppelnde, bisher nicht beachtete Zwischenprodukte<sup>17)</sup>, die sich leicht in gelb kuppelnde, noch nicht identifizierte Stoffe verwandeln. Das gleiche zeigt sich, wenn Coniferylalkohol mit Enzymen in Gegenwart begrenzter Mengen von Acceptoren dehydriert wird. Mit dieser Erscheinung hängt wohl die Beobachtung zusammen, daß bei der enzymatischen Dehydrierung der Coniferylalkohol aus der Lösung im Anfang schneller verschwindet, als dem Wasserstoffentzug entspricht. Demnach wird ein Teil des Coniferylalkohols eingebaut ohne dehydriert zu werden.

#### DEHYDRIERUNG DES SINAPINALKOHOLS

Früher wurde beobachtet, daß bei der Spaltung des Glucosids Syringin mit Emulsin vorwiegend Syringaresinol (III) entsteht. Mit gereinigter Glucosidase des Emulsins wurde weniger Syringaresinol und mehr Sinapinalkohol erhalten. Wird der Sauerstoff ausgeschlossen, so findet sich Sinapinalkohol, aber kein Syringaresinol. Wir haben zur Erklärung angenommen, daß der Glucosidase des Emulsins eine Phenoldehydrase beigemischt sei<sup>18, 19)</sup>.

Es mag sein, daß im rohen Emulsin ein Metallkatalysator vorkommt, aber ein eigenes dehydrierendes Enzym braucht nicht angenommen zu werden. Denn es hat sich gezeigt, daß zur Umwandlung des Sinapinalkohols in Syringaresinol Belüftung in Gegenwart von Kupfersulfat genügt. Dabei werden 0.5 Grammatome Sauerstoff für 1 Mol Sinapinalkohol verbraucht. Die Geschwindigkeit der Reaktion ist der Konzentration an Kupfersalz proportional, es wirkt demnach als Katalysator. Die Ausbeute an Syringaresinol beträgt 88%. Wird mehr Sauerstoff verwendet, so verschwindet das zunächst ausgeschiedene Syringaresinol wieder. Unter den Reaktionsprodukten wird neben verschiedenen chromatographisch wahrnehmbaren Stoffen 3.5-Dimethoxy-chinon festgestellt. Die Reaktion, die zur Bildung des Syringaresinols führt, verläuft etwa 10 mal schneller als seine weitere Oxydation.

Wenn Syringaresinol in Gegenwart von Kupfersulfat mit Sauerstoff oxydiert wird, so läßt sich die Ausbeute an Dimethoxychinon bis auf 60% steigern. Zugleich entstehen dieselben chromatographisch nachweisbaren Nebenprodukte wie bei dem Versuch mit Sinapinalkohol. Damit ist bestätigt, daß Sinapinalkohol für sich allein nicht der Bildung von Dehydrierungs-Polymerisaten fähig ist. Daß er in Gegenwart des Coniferylalkohols in ausgezeichneter Weise Dehydrierungs-Mischpolymerisate bildet, wurde früher festgestellt und steht mit den neuen Befunden im Einklang.

16) „BT 234“ von E. Merck, frei von Phenolgruppen und Schwermetall.

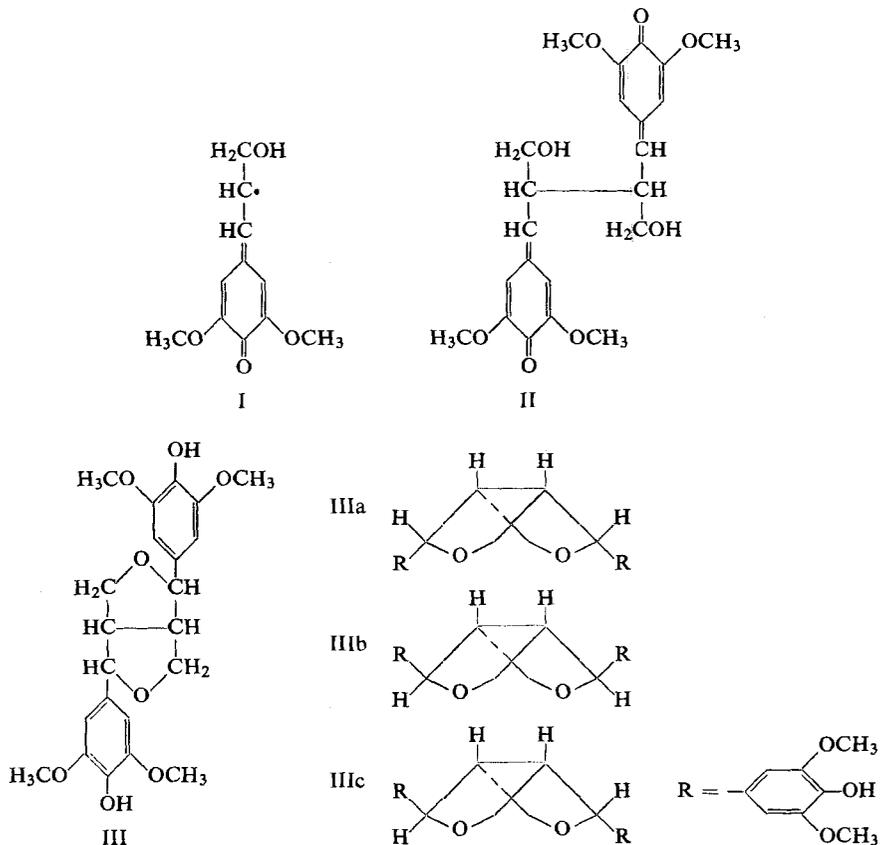
17) Zuerst beobachtet von ERICH FISCHER.

18) K. FREUDENBERG, R. KRAFT und W. HEIMBERGER, Chem. Ber. 84, 472 [1951].

19) K. FREUDENBERG und H. DIETRICH, Chem. Ber. 86, 4 [1953].

Statt Kupfersulfat können Laccase und Sauerstoff oder Peroxydase und Wasserstoffperoxyd verwendet werden. Diese Enzyme beschleunigen die Reaktion mehr als Kupfersulfat. Ob die Reaktion beim Syringaresinol stehenbleibt oder weitergeht, hängt nur von der Menge des Wasserstoff-Acceptors ab. Ausbeute und Nebenprodukte sind dieselben wie bei Verwendung von Kupfersulfat. Auch Syringaresinol wird durch die Enzyme, wie oben beschrieben, angegriffen.

Während das Radikal des dehydrierten Coniferylalkohols in Gestalt mehrerer Grenzformen reagieren kann, scheint sich bei dem dehydrierten Sinapinalkohol vor allem die Chinonmethidform I an der weiteren Reaktion zu beteiligen. Sie stabilisiert



sich zum Syringaresinol (III). Die anzunehmende Zwischenstufe II ist eine racemoide Form; wäre sie eine mesoide, so könnte sie nur *einen* Tetrahydrofuranring schließen, weil der andere wegen Transstellung der Hydroxymethyl-Gruppe nicht geschlossen werden könnte. Das zunächst flache Radikal I wird im Augenblick der Reaktion asymmetrisch und reagiert mit seinesgleichen wie ein asymmetrisches Molekül, und zwar so, daß stets zwei (+)-Formen und stets zwei (-)-Formen zusammentreten, nicht aber eine (+)- mit einer (-)-Form. Mit anderen Worten: Von den beiden möglichen

Racematen von II bildet sich nur jenes, das des doppelten Ringschlusses fähig ist. Daß von zwei möglichen Racematen während einer Reaktion nur oder fast nur eines entsteht, kommt auch sonst vor.

Das aus dem racemoiden Zwischenprodukt II entstehende Syringaresinol III kann wegen der Ausbildung neuer Asymmetriezentren drei Racemate bilden (IIIa, b, c), von denen wir nur einem begegnet sind.

Daß das Radikal I und seine mesomeren Formen mit sich selbst vorzugsweise unter Bildung von Syringaresinol reagieren, ist wohl mit sterischer Hinderung zu erklären. Dagegen besteht kein Grund gegen die Annahme, daß Radikal I mit allen mesomeren Formen des Coniferylalkohols reagiert und daß unter den Produkten auch solche sind, die bei der Alkohololyse Hibberts Ketone der Syringareihe ergeben.

Es ist jetzt zu verstehen, warum aus Syringin allein — ohne Coniferin oder Glucosido-*p*-cumaralkohol — kein Lignin entstehen kann.

## BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

### *Reinigung der Laccase aus Psalliota*

Unsere Bemühung ist nicht auf die Isolierung des reinen Enzyms gerichtet. Es sollte nur soweit angereichert werden, daß die anfängliche Färbung stark herabgesetzt ist und nach der Reaktion mit Coniferylalkohol dem gebildeten biosynthetischen Lignin möglichst wenig Eiweiß anhaftet.

2 kg frische junge Pilze werden mit wenig Phosphatpuffer ( $pH$  6.5, 0.05 molar) homogenisiert, dann mit 800 g Seesand vermischt und unter 450 at durch ein Nesseltuch ausgepreßt. Der Rückstand wird 2 mal mit je 250 ccm Pufferlösung angerieben und ausgepreßt. Zu dem rasch auf 0° abgekühlten Saft läßt man unter schnellem Rühren im Laufe von 2 Stdn. stark gekühltes Methanol zutropfen, bis das Vol.-Verhältnis Wasser: Methanol = 3:2 ist. Der unwirksame Niederschlag wird rasch abzentrifugiert. Der Abguß wird bei -10° im Laufe von 2 Stdn. mit soviel kaltem Methanol versetzt, daß das Vol.-Verhältnis Wasser: Methanol = 1:3 beträgt. Der graue Niederschlag wird von der unwirksamen Lösung abzentrifugiert und in einer Flasche aus Polyäthylen mit 200 ccm gut gekühlter Pufferlösung gemischt und bei 0° 1 Stde. stark geschüttelt. Zugesezte Glasperlen dienen zur Aufteilung klebriger Abscheidungen. Die Suspension wird in der Kälte zentrifugiert und der Bodensatz ein zweites Mal in derselben Weise extrahiert. Zu den vereinigten gekühlten Lösungen läßt man, wie oben beschrieben, Methanol zutropfen bis zum Mischungsverhältnis Wasser: Methanol = 3:2. Nach Entfernung des wenig wirksamen Niederschlags wird das Mischungsverhältnis 1:3 hergestellt. Der hellgraue Niederschlag wird, wie oben beschrieben, zweimal mit je 200 ccm Pufferlösung ausgeschüttelt. Wenn der Extrakt noch stark gefärbt ist, muß der gesamte Vorgang wiederholt werden. Dieser Fall tritt ein, wenn die Pilze nach der Zerkleinerung nicht sofort ausgepreßt und die Extrakte nicht schleunigst mit Methanol gefällt werden. Die Enzymlösung wird bei -25° aufbewahrt. Der eingefrorene Saft ist bei dieser Temperatur ohne Verminderung der Aktivität sehr lange haltbar. Die Ausbeute beträgt 25—35% der im Rohsaft vorhandenen Aktivität. Pro kg Pilze werden gewonnen 1500—3000 Dihydroferulasäure-Einheiten<sup>4)</sup> oder 4500—9000 Hydrochinon-Einheiten nach D. C. GREGG und W. H. MILLER<sup>20)</sup>. Die Messung wird nach A. TISSIÈRES<sup>21)</sup> ausgeführt. Die Einheiten werden weiter unten definiert. Die aufgetaute Lösung ist hellbraun und frei von Tyrosinase. Die Ausbeute steigt nicht

<sup>20)</sup> J. Amer. chem. Soc. **62**, 1374 [1940].

<sup>21)</sup> Nature [London] **162**, 340 [1948].

an, wenn Äthanol statt Methanol verwendet wird. Mit Aceton als Fällungsmittel ist sie bedeutend geringer. Ammoniumsulfat ist als Anreicherungsmittel ungeeignet, weil die Tyrosinase mitgefällt und die Gesamtausbeute geringer wird. Das von D. C. GREGG und W. H. MILLER<sup>20)</sup> für den Pilz *Russula foetens* ausgearbeitete Verfahren erwies sich an unserem Material als unzweckmäßig.

In diesem Zustand ist die Enzymlösung für die Zwecke der Biosynthese des Lignins verwendbar. Dennoch wurde versucht, das Enzym weiter zu reinigen. Mehrere Ansätze der obigen Art wurden vereinigt und gegen dest. Wasser dialysiert, bis die Lösungen phosphatfrei waren. Kleine Proben wurden mit verschiedenen Mengen einer Lösung von basischem Bleiacetat unter Rühren versetzt. Durch Messung der Aktivität der überstehenden Lösung wurde ermittelt, wieviel Bleiacetat zuzugeben ist, um die Lösung zu entfärben und dennoch möglichst wenig der aktiven Substanz niederzuschlagen. Jetzt wurde zu der Lösung die ermittelte Menge basisches Bleiacetat unter gutem Rühren zugegeben, einen Tag im Eisschrank aufbewahrt und vom Niederschlag getrennt. Zu dieser Lösung wurde soviel Calciumtriphosphat-Gel<sup>22)</sup> oder Aluminiumhydroxyd-Gel nach WILLSTÄTTER gegeben, bis die Lösung frei von aktiver Substanz war. Das Adsorbat wurde abzentrifugiert, mit wenig Wasser gewaschen und sofort mit 0.5 Mol Phosphatpuffer  $p_H$  6.5 eluiert, bis die weiteren Extrakte schwach aktiv waren. Hierbei gingen etwa zwei Drittel der Aktivität verloren, aber die spezifische Aktivität wurde auf das Fünffache gesteigert. Dieses Präparat war frei von Peroxydase und Katalase, enthielt jedoch noch wenig  $\beta$ -Glucosidase. Die hellgelbe Enzymlösung hatte jetzt die im allgemeinen Teil beschriebenen Eigenschaften. Der Sauerstoffquotient  $QO_2$  war = 20000 [cmm verbrauchter  $O_2$  pro Stde. und mg Enzym ( $25^\circ$ , Hydrochinon,  $p_H$  6.5)].

#### *Die Enzyme des Cambialsaftes der Fichte*

Der frühere Versuch<sup>7)</sup> wurde in vergrößertem Maßstabe wiederholt. Ende Mai wurden drei 25jährige Fichten geschlagen und in 1 Meter lange Stücke zersägt. Die Rinde wurde abgehoben und das am Holz haftende Gewebe abgeschabt. Die Stämme wurden mit verdünnter Pufferlösung von  $p_H$  6.7 abgespült, die abgekratzten Holzzellen mit der Spülflüssigkeit auf einem Nesseltuch ausgewaschen und mit der Hand abgepreßt. Der Saft (15 l) wurde in Polyäthylenflaschen eingefroren, das Zellmaterial bei 250 at ausgepreßt und nochmals ausgewaschen. Die Flüssigkeiten wurden den ersten zugefügt. Das Enzym wurde mit Methanol angereichert, nachdem durch das Gefrieren unlöslich gewordene Anteile abfiltriert waren.  $QO_2 = 5000$  (Hydrochinon). Der Gehalt an Peroxydase war sehr gering.

Das Zellmaterial wurde unter festem Kohlendioxyd in einem Mörser zerstampft und mehrere Min. im Starmix zerkleinert. Es wurde sofort mit 0.05 Mol Phosphatpuffer  $p_H$  6.5 aufgeschlämmt, 48 Stdn. bei  $3^\circ$  aufbewahrt und abfiltriert. Das Enzym aus diesem Saft hatte bei  $p_H$  6.5 und  $25^\circ$  einen Sauerstoffquotienten für Hydrochinon von 580. In verdünnter Pyrogallollösung suspendiert, verwandelte das extrahierte Holz das Pyrogallol bei der Belüftung nur langsam in Purpurogallin. Es enthält demnach nur wenig zellgebundene Laccase.

#### *Messung der Aktivität der Laccase*

Die Zeiten gleichen Verbrauchs von Sauerstoff durch Coniferylalkohol und durch Dihydroferulasäure sind innerhalb weiter Reinheitsgrade des Enzyms proportional, wofern nur der anfängliche Verbrauch bis 0.25 Grammatom O verglichen wird.

Zur Messung der Aktivität ist Coniferylalkohol wenig geeignet, weil er zu schwer löslich ist und der gerade Anteil der Kurve zu kurz ist. Die bisher verwendete Dihydroferulasäure<sup>4)</sup> hat diese Nachteile nicht, wird aber langsamer als Coniferylalkohol dehydriert. Deshalb wurde

<sup>22)</sup> D. KEILIN und T. MANN, Proc. Roy. Soc. [London], Ser. B, **125**, 187 [1938].

die Hydrochinon-Einheit von D. C. GREGG und W. H. MILLER<sup>20)</sup> bzw. A. TISSIÈRES<sup>21)</sup> gewählt, und zwar in der Ausführung von TISSIÈRES, jedoch mit Zusatz von Natriumsulfit. Der Ansatz besteht aus 10 mg Hydrochinon, 6 mg wasserfreiem Natriumsulfit in 2,3 ccm 0,1 *m* Phosphatpuffer von  $p_H$  6,5–6,7. Im Seitenansatz befindet sich 1 ccm der Enzymlösung, die so verdünnt ist, daß 0,5–3,0 Enzymeinheiten vorhanden sind. Bei 25° wird mit 100 oder mehr Schwingungen in der Minute geschüttelt. Von 100 Schwingungen aufwärts ist die Schwingungszahl ohne weiteren Einfluß. Eine Einheit ist die Menge Enzym, die unter diesen Bedingungen 10 cmm Sauerstoff pro Min. fixiert. Die Sauerstoffaufnahme wird alle 2 Min. abgelesen. Das Natriumsulfit hat keinen Einfluß auf die Aktivität des Enzyms. Es schützt autoxydierbare Phenole und wird nicht vom Enzym oxydiert. Die Geschwindigkeit der Reaktion ist der Aktivität des Enzyms proportional. 1 Dihydroferulasäure-Einheit = 3 Hydrochinon-Einheiten. Wir geben die bisher verwendete Dihydroferulasäure-Einheit<sup>4)</sup> auf.

### *Dehydrierung des Coniferylalkohols*

Zur Kennzeichnung der neuen rotviolett kuppelnden, vorläufig O und Q genannten Substanzen sei folgendes mitgeteilt: Der  $R_F$ -Wert bei absteigender Chromatographie (Tetrachlorkohlenstoff in Dimethylformamid, 9:2 Vol.-Tle., Papier von Schleicher & Schüll 2043 b mgI, 22°) beträgt 0,11 und 0,08. Unter gleichen Bedingungen sind die  $R_F$ -Werte für Coniferylalkohol 0,38, Dehydro-diconiferylalkohol 0,22, Guajacylglycerin-coniferyläther 0,10.

Die Dehydrierung des Coniferylalkohols mit Kupfersulfat wurde in der Warburg-Apparatur wie folgt gemessen: 2,4 mg Coniferylalkohol in 1 ccm Methanol, 50 mg  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  und 2 ccm Acetatpuffer  $p_H$  6,7 wurden zusammengegeben und bei 25° mit Sauerstoff geschüttelt. Nach 4 Stdn. waren 0,6 Grammatome Wasserstoff umgesetzt, dann verlangsamte sich die Reaktion stark; nach 27 Stdn. waren 0,92 Grammatome H umgesetzt.

Der als Zwischenprodukt der Ligninbildung auftretende früher beschriebene, noch nicht reine Dehydro-diconiferylalkohol<sup>13)</sup> vom Schmp. 156–157° wurde folgendermaßen gereinigt: Die Lösung von 1 g des Alkohols in 20 ccm 70-proz. Methanol wurde einige Min. mit Kohle gekocht, filtriert und i. Vak. vorsichtig bis zur beginnenden Trübung eingedampft. Nach einigen Stdn. wurde abfiltriert und erneut heiß mit Kohle behandelt. Dann wurde noch 3 mal aus wenig Wasser umkristallisiert. Schmp. 161–162°. Der Verlust war erheblich.

$\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_6$  (358,4) Ber. C 67,02 H 6,19  $\text{OCH}_3$  17,32 Gef. C 67,16 H 6,15  $\text{OCH}_3$  17,74

### *Sinapinalkohol und Syringaresinol*

Sinapinalkohol wurde nach der früheren Vorschrift<sup>13)</sup> hergestellt. Die Ausbeute ist besser, wenn der verwendete Acetylsyringensäure-äthylester mehrmals aus Äthanol umkristallisiert und das  $\text{LiAlH}_4$  jeweils aus LiH und  $\text{AlBr}_3$  frisch hergestellt wird<sup>23)</sup>. Der Sinapinalkohol wird aus seiner Lösung in trockenem Äther mit Petroläther bei 0° abgeschieden; die Mutterlauge wird abgegossen und die Kristallmasse mit trockenem Äther von –25° gewaschen. Sie wird in einem mit Schliffkappe und Hahn versehenen Rohr i. Vak. (< 1 Torr) bei –25° aufbewahrt.

Die Lösung von 1,05 g (5 mMol) Sinapinalkohol in 100 ccm Wasser von 20° wird in eine Schüttelente gebracht, in deren Hals sich ein kleines Rohr mit Kupfersulfat (5 mMol) befindet. Die Ente wird einige Male abwechselnd evakuiert und mit Stickstoff gefüllt. Jetzt wird Sauerstoff in das angeschlossene Eudiometerrohr gefüllt und durch Heben und Senken mit dem Stickstoff vermischt. Das Kupfersulfat wird durch Kippen des Rohres eingeführt und zu schütteln begonnen. Wenn überschüssiger Sauerstoff vorhanden ist, verlangsamt sich die Auf-

<sup>23)</sup> In Ampullen bezogen von RIEDEL-DE HAËN A.G., Seelze, Hannover.

nahme nach Verbrauch eines halben Grammatoms Sauerstoff auf ein Mol Sinapinalkohol. Inzwischen ist eine reichliche Menge eines hell rosa gefärbten Niederschlags ausgefallen, der sich in der anschließenden langsamen Reaktionsphase wieder auflöst. Dabei geht die hellgelbe Farbe der Lösung in Rot und Dunkelrot über. Nach Aufnahme von weiterem Sauerstoff wird die Reaktion sehr langsam. Die Lösung gibt an Butanol verschiedene Stoffe ab, unter denen das Syringaresinol fehlt. Durch Sublimation i. Vak. wird Dimethoxybenzochinon gewonnen (Schmp. im geschlossenen Rohr 255° (Zers.)).

Wenn bei sonst gleichen Versuchsbedingungen nur wenig mehr als 0.5 Grammatome Sauerstoff (0.53 Grammatome) eingelassen werden, wird er vollständig verbraucht. Der Niederschlag wird abzentrifugiert und mit kaltem Wasser gewaschen. Ausb. 88% d. Th. Daraus wird durch 3maliges Umkristallisieren aus Methanol in guter Ausbeute analysenreines Syringaresinol erhalten. Schmp. im Kofler-Apparat 169.5° (unkorr). Früher<sup>24)</sup> wurde 174° angegeben (Schmelzpunktsröhrchen). Syringaresinol kann 3 Racemate bilden (trotz seiner 4 Asymmetriezentren). Ob hierdurch die Unsicherheit des Schmelzpunktes verursacht ist, wurde nicht untersucht. Das Diacetat schmilzt, wie früher gefunden, bei 181°, das Ditosylat bei 247°.

Wenn 1.05 g reines Syringaresinol, in Methanol/Wasser (1:4 Vol.-Tle.) gelöst, in Gegenwart von Kupfersulfat mit Sauerstoff behandelt werden, so können 60% d. Th. an Dimethoxychinon gewonnen werden. Hierzu werden 180 ccm O<sub>2</sub> benötigt (= 3.25 Grammatome Sauerstoff für 1 Mol Syringaresinol). Die zwischendurch auftretenden Nebenprodukte sind dieselben, wie sie neben dem Syringaresinol bei der Darstellung aus Sinapinalkohol entstehen.

Organische Kupfersalze, wie Acetat und Formiat, wirken auch, aber nicht besser, und führen zu teilweiser Ausfällung von Cu<sub>2</sub>O. Die Reaktionsgeschwindigkeit des Kupfersulfats wird durch den Zusatz sehr geringer Mengen von Eisen- und Mangansalz erhöht. Isatin-carbonsäure-(4)<sup>25)</sup>, welche die Dehydrierung des Phenylalanins katalysiert, ist bei Sinapinalkohol unwirksam.

Zur Chromatographie wurden Eisessig/Butanol/Wasser oder Xylol/Dimethylformamid verwendet. Zur Sichtbarmachung dienten je nach Bedarf Kaliumpermanganat, Dinitrophenylhydrazin, Diazobenzol-sulfonsäure oder Phosphormolybdänsäure nach DENIS-FOLIN. Beobachtung im lang- oder kurzwelligem UV-Licht mit oder ohne Besprühung mit Fluoresceinfarbstoffen ist häufig von Nutzen. Diazobenzol-sulfonsäure färbt das Syringaresinol tiefrot und den Sinapinalkohol hellrosa.

<sup>24)</sup> K. FREUDENBERG und H. SCHRAUBE, Chem. Ber. **88**, 16 [1955].

<sup>25)</sup> A. MIX und H. W. KRAUSE, Chem. Ber. **89**, 2630 [1956].