

Über Enzyme der Flechten und über die Konstitution der Umbilikarsäure

Von

GEORG KOLLER und GERHARD PFEIFFER

Aus dem II. Chemischen Laboratorium der Universität in Wien

(Vorgelegt in der Sitzung am 18. Mai 1933)

Die merkwürdigen symbiotischen pflanzlichen Gebilde, welche sich aus Algen und Pilzen aufbauen, die sogenannten Flechten, erzeugen durch eine Wechselwirkung der Pilz- und der Agenkomponente charakteristische organische Verbindungen, die sogenannten Flechtenstoffe. Wenn wir uns bemühen, diese Gebilde nach chemischen Gesichtspunkten einer gewissen, nicht zu eng gefaßten Einteilung zu unterwerfen, so erscheint es zweckmäßig, folgende Hauptgruppen zu unterscheiden. Die *aliphatischen Flechtenstoffe*, welche sowohl indifferenten, wie saurer Natur sein können, wie die von ASAHINA geklärte Protolichesterinsäure (I) ¹. Die meisten dieser Stoffe sind nicht näher untersucht. Bei weitem reicher an Individuen ist die Schar der aromatischen Flechtenstoffe. Bausteine dieser Verbindungen sind meist Orzin oder *b*-Orzinkerne, welche neben Karboxylgruppen oftmals Aldehydreste tragen; diese Kerne können weiterhin zu Gebilden höherer Ordnung zusammentreten, einerseits durch eine laktonartige Verhängung einer Karboxylgruppe mit einer der phenolischen Hydroxylgruppen eines zweiten Phenolkarbonsäurerestes zu den sogenannten Depsiden, wie die Lekanorsäure (II), die Gyrophorsäure (III) ², die Evernsäure (IV), die Umbilikarsäure (V) ³, das von PFAU ⁴ in seiner Konstitution erkannte Atranorin (VI), die von ASAHINA ⁵ untersuchte Thamnolsäure (VII) u. a. Andererseits werden die primären Phenolkarbonsäuren in Verbindungen von kondensierten

¹ Journ. Pharmac. Soc. Jap. 539, 1927, S. 1.

² Y. ASAHINA, Journ. Pharmac. Soc. Jap. 519, 1925; Ber. D. ch. G. 63, 1930, S. 3044; G. KOLLER, Monatsh. Chem. 61, 1932, S. 147, bzw. Sitzb. Ak. Wiss. Wien (II b) 141, 1932, S. 515.

³ G. KOLLER und G. PFEIFFER Monatsh. Chem. 62, 1933, S. 241, bzw. Sitzb. Ak. Wiss. Wien (II b) 142, 1933, S. 47.

⁴ St. PFAU, Helv. chim. Acta 9, 1926, S. 650.

⁵ Ber. D. ch. G. 62, 1929, S. 1196.

siertem Typ übergeführt, so der Cetrarsäure (VIII oder IX) ⁶, der Kaprarsäure und anderen verwandten Verbindungen. Als einzig geklärter Vertreter einer kleineren Gruppe ist die merkwürdige Usninsäure (X) ⁷, ferner die Vulpinsäure (XI) ⁸ und Pinastrinsäure (XII) ⁹ bemerkenswert. Außerdem sind einige gefärbte Verbindungen bekannt, wie die Chrysophansäure, welche der Anthrazenreihe anzugehören scheinen. Wenn wir uns nun die Frage vorlegen, welcher der Symbioten in der Flechte für die Entstehung dieser Stofftypen verantwortlich zu machen ist, so scheinen die Flechtenstoffe aliphatischer Natur wohl beiden Flechtenkomponenten ihre Entstehung zu verdanken. Eine eingehende Experimentaluntersuchung liegt über diesen Punkt nicht vor. Reichliches Tatsachenmaterial jedoch wurde über die örtliche Entstehung des Orzingebildes in der Flechte gesammelt. Es ließ sich nämlich feststellen, daß die Orzinabkömmlinge und ferner die Flechtensäuren selbst an den Pilzhypen und dem Pilze zugehörigen Zellen abgeschieden werden, so daß wohl kein Zweifel darüber herrscht, daß der Flechtenpilz als alleiniger Erzeuger der phenolischen Komplexe in Betracht kommt. Es sind nun auch in vitro gewisse Anhaltspunkte gewonnen worden, auf welche Weise der Pilz diese Orzinsynthese bewirken könnte. So gelang es H. CORNELIUS und H. v. PECHMANN ¹⁰ Azetondikarbonsäureester zu einem Orzintrikarbonsäureester (XIII) zu kondensieren, welcher allerdings eine der Karboxylgruppen in der Methylseitenkette trägt, an einer Stelle also, an welcher in keiner Flechtensäure bisher eine Karboxylgruppe angetroffen wurde.

Ähnlich ist es uns gelungen, Azetondikarbonsäureester mit Azetessigestern zu einem asymmetrischen Orzindikarbonsäureester (XIV) ¹¹ zu kondensieren, der von einer Orzindikarbonsäure deriviert, welche bereits verschiedentlich als Baustein depsidischer Flechtensäuren angetroffen wurde. Es ist deshalb sehr wahr-

⁶ G. KOLLER und E. KRAKAUER, *Monatsh. Chem.* 53/54, 1929, S. 931, bzw. *Sitzb. Ak. Wiss. Wien (IIb)*, Suppl. 1929, S. 931; Y. ASAHINA, *Ber. D. ch. G.* 66, 1933, S. 700.

⁷ C. SCHÖPF, *Liebigs Ann.* 459, 1927, S. 233.

⁸ ZOPF, „Die Flechtenstoffe“, 1907, S. 72.

⁹ G. KOLLER und G. PFEIFFER, *Monatsh. Chem.* 62, 1933, S. 160, bzw. *Sitzb. Ak. Wiss. Wien (IIb)* 141, 1932, S. 922.

¹⁰ H. CORNELIUS und H. v. PECHMANN, *Ber. D. ch. G.* 19, 1868, S. 1446.

¹¹ G. KOLLER und E. KRAKAUER, *Monatsh. Chem.* 53/54, 1929, S. 931, bzw. *Sitzb. Ak. Wiss. Wien (IIb)*, Suppl. 1929, S. 931.

scheinlich, daß die Orzinkerne im Flechtenorganismus mit Hilfe von Azetessigsäure und Azetondikarbonsäure, welche infolge ihres nahen Zusammenhanges mit der Zitronensäure den pflanzlichen Organismen leicht zur Verfügung steht, aufgebaut werden. Hiefür spricht auch die Tatsache, daß der Orzinkern niemals in freier Form in Erscheinung tritt, sondern immer in der Gestalt von Orzin-mono- oder Dikarbonsäuren. Es wäre allerdings auch möglich, daß der Orzinring ähnliche genetische Beziehungen zu den Zuckern aufweist, wie die Hexosen zu den Oxybenzolen. Es käme dann eine Methylhexose als Stammsubstanz für das Orzin in Betracht. Diese Annahme erscheint jedoch bis heute ohne jeden experimentellen Anhaltspunkt als nicht sehr wahrscheinlich.

Die so gebildeten Orzinkarbonsäuren müssen in den Flechten nun eine sehr rasche Veränderung in Wasser schwerlöslichen Verbindungen erleiden, da einkernige Orzinabkömmlinge bisher in den Flechten nicht nachgewiesen wurden und wenn, dann nur in sehr geringer Menge vorhanden sein dürften. Diese Umwandlungen bestehen einmal in einer laktonartigen Verknüpfung der primär gebildeten Orzinkarbonsäuren, welche zu den Flechtenstoffen von Depsidcharakter führt, anderseits dürften unter dem Einflusse eines anderen chemischen, sehr reaktionsfähigen Agens, des von der grünen Alge als erstes Assimilationsprodukt gewonnenen Formaldehyds eine Reihe von Veränderungen einsetzen, welche Formylierungen, also Einführung von Aldehydresten und Kernkondensationen, ferner Bildung von phenolisch gebundenem und esterartigem Methoxyl nach sich ziehen.

Nach dieser kurzen, zum Großteile hypothetischen Betrachtung der Flechtenstoffe möchten wir uns der Frage zuwenden, welche Bedeutung die Anhäufung von Flechtensäuren haben könnte. Die über diesen Punkt bisher geäußerten Meinungen sind wohl recht unbefriedigender Natur. Die Annahme, daß es sich in den oft stark giftigen Flechtensäuren um Schutzstoffe gegen Tierfraß handeln könne, wurde bereits durch Untersuchungen ZOPF⁸ sehr unwahrscheinlich gemacht¹². Ebenso hinfällig scheint die Behauptung, daß die Abscheidung der Flechtenstoffe einen gewissen Schutz gegen zu große Wasserverluste bilde. Andere Flechtenforscher vertraten die Ansicht, daß es sich in den Flechtenstoffen um Exkrete handle, also Auswurfstoffe, welche den Lebenszwecken des Flechtenorganismus nicht mehr dienstbar ge-

¹² ZOPF, „Die Flechtenstoffe“, 1907, S. 366.

macht werden können. Wenn diese Hypothese nun auch eventuell in manchen Fällen in Berücksichtigung zu ziehen ist, da eine gewisse Zufälligkeit des phytochemischen Geschehens in der Pflanze nach rein chemischen Reaktionsmöglichkeiten nicht gänzlich von der Hand zu weisen ist, so wäre es doch merkwürdig, daß die Flechte die von den ausgebeuteten Algenzellen mühsam aufbauten, einfachen Kohlenstoffverbindungen in für sie fernerhin wertlose Flechtensäuren überführen sollte.

Wir hofften nun, der Frage nach dem Zwecke der Flechtensstoffe, allerdings bisher unter Beschränkung auf die depsidischen Flechtensstoffe von Lekaronsäuretyp, auf experimentellem Wege näherzukommen.

Wir machten die Annahme, daß die depsidischen Stoffe in den Flechten die Rolle von Reservestoffen spielen, welche bei mangelnder Assimilation durch die Algenzellen den Pilzbestandteilen als Nahrungsreserve dienen.

Entsprach diese Annahme den tatsächlichen Verhältnissen, so war es zu erwarten, daß die Flechtenpilze unter gewissen Vegetationsbedingungen enzymatische Stoffe in Aktion treten lassen müßten, welche die wasserunlöslichen Depside zu hydrolysieren vermögen und so die wasserlöslichen einfachen Orzin- und *b*-Orzinabkömmlinge zur Dessimilation bereitstellen. Betrachten wir das Vorkommen der Enzyme in der pflanzlichen und tierischen Welt, so finden wir, daß die Enzyme nicht planlos in den Organismen entstehen, sondern ganz spezifischen Zwecken dienen. Wir schöpfen daraus die wohl nicht anzuzweifelnde Berechtigung, aus dem Auftreten eines Enzyms überhaupt den Rückschluß zu ziehen, daß die Reaktion, welche durch eben jenes Enzym ausgelöst und katalysiert wird, auch tatsächlich in dem betreffenden Organismus vor sich geht und zu den notwendigen Lebensvorgängen zu zählen ist. Waren demnach in den Flechten enzymatische Stoffe nachzuweisen, welche imstande sind, Depside zu hydrolysieren oder sonst auf irgendeine Weise abzubauen, so war wohl die Annahme zu rechtfertigen, daß es sich in den Depsiden um Reservestoffe der Flechten handeln dürfte. Flechten mit depsidischen Inhaltsstoffen haben wir auch deshalb vor allen anderen in Untersuchung gezogen, da zu erwarten war, daß sich in diesen Flechten ein enzymatischer Abbau am ehesten nachweisen lassen werde. Denn das erste Stadium dieses Abbaues mußte in diesem Falle eine Hydrolyse sein, welche sich an relativ

leicht spaltbaren Depsidbindungen vollzieht, ein Vorgang, der in begünstigten Fällen so rasch ablaufen konnte, daß die Wahrnehmung desselben auf nicht zu große Schwierigkeiten stößt. Nach etlichen vergeblichen Versuchen ist es uns nun tatsächlich geglückt, in drei Fällen depsidspaltende Enzyme zu gewinnen. Aus *Umbilicaria pustulata* und *Umbilicaria deusta* wurden wässerige Auszüge gewonnen, welche sich als sehr energisch spaltend erwiesen. Es wurden rasch abgebaut Lekanorsäure, Gyrophorsäure, Evernsäure, Diploschistessäure, u. zw. wurden wider Erwarten keine Phenolkarbonsäuren, sondern Orzin und Orzinhalbäther gewonnen. Es ist demnach neben einem Depsidbindungen lösenden Enzym eine Karboxylase vorhanden. Nicht angegriffen wurden Atranorin, Umbilikarsäure. Die vorhandene Karboxylase wirkt rasch auf Orsellinsäure (XV), Everninsäure (XVI), nicht jedoch auf Paraorsellinsäure (XVII), *b*-Resorzylsäure (XVIII), Hydrochinonkarbonsäure (XIX), Pyrogallolkarbonsäure (XX). Sie ist demnach ganz spezifisch auf Orsellinsäure eingestellt.

Ebenso energisch auf Lekanorsäure wirkte ein wässriger Auszug der *Umbilicaria deusta*.

Evernia prunastri lieferte Extrakte, welche Evernsäure sehr langsam unter Bildung von Orzinhalbäther und Orzin anzugreifen scheinen. Der Befund bei dieser Flechte scheint noch nicht ganz gesichert.

Wir haben fernerhin eine Reihe von Flechten in ähnlicher Weise auf Gehalt an einer Depsidase und einer Karboxylase untersucht. Die Ausfallerscheinungen, welche wir bisher bei anderen Flechten wahrnahmen, könnten nun wohl — abgesehen davon, daß unser Material zum Teil bereits einige Jahre alt war, ein Umstand, dessen Auswirkung wir heute nicht ganz abschätzen können — dadurch hervorgerufen werden, daß bei der Aufarbeitung mit den Enzymen auch Hemmungskörper in Aktion gesetzt werden, welche die Fermente in ihrer Wirkung behindern, oder daß Wasser nicht immer das für das Herauslösen des Enzyms erforderliche Lösungsmittel vorstellt. Diese ungünstigen Umstände scheinen bei oben-erwähnten Flechten zufälligerweise vermieden zu sein.

Wir sind uns bewußt, daß es verfrüht wäre, aus diesen kargen experimentellen Anhaltspunkten zu weitgehende Schlüsse hinsichtlich des Zweckes der Flechtenstoffe im allgemeinen ableiten zu wollen. In der Lekanorsäure, der Evernsäure, der

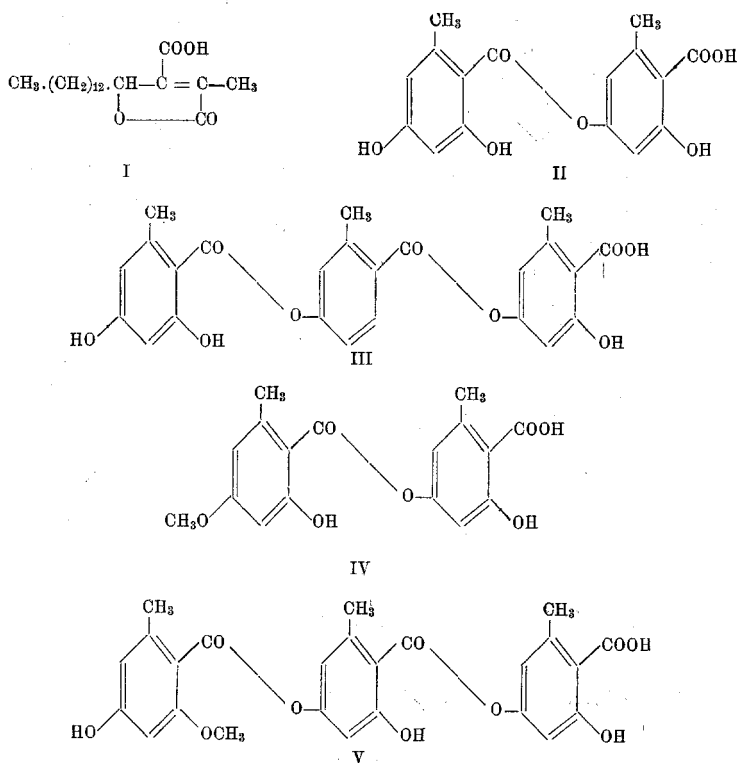
Gyrophorsäure, der Diploschistessäure und auch wahrscheinlich in der Umbilikarsäure dürfte es sich jedoch mit größter Wahrscheinlichkeit um Reservestoffe handeln. Ob die Flechtensäuren von kondensiertem Charakter, wie die Usninsäure, die Angehörigen der Vulpinsäuresippe, der Cetrarsäure und der Salazinsäuregruppe einem ähnlichen Zwecke in den sie führenden Flechten unterliegen, entzieht sich heute der Beobachtung. Es sind Vorbereitungen im Gange, sich mit diesen Problemen weiter auseinanderzusetzen. Wir möchten weiterhin nicht versäumen, darauf hinzuweisen, daß diese Flechtenenzyme infolge ihrer anscheinend spezifischen Wirkung zum Nachweis gewisser Gruppierungen herangezogen werden könnten und auch präparativ eine Methode, Depside auf äußerst schonende Weise zu spalten, an die Hand geben. Wir behalten uns vorläufig die Bearbeitung unserer enzymatisch wirksamen Lösungen vor.

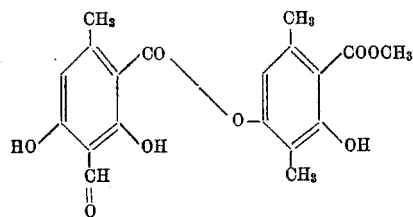
In einer vor kürzerer Zeit erschienenen Abhandlung¹³ haben wir für die Umbilikarsäure, einen Inhaltsstoff der *Umbilicaria deusta*, die Formel eines Tridepsids aufgestellt, welches sich aus einem Lekanorsäurekomplex und einem Isoeverninsäurerest (V oder XXI) aufbaut. Auf Grund des Ausbleibens einer intensiveren Chlorkalkreaktion bevorzugten wir Formel V. Es ist uns nun gelungen, für diese Annahme einen strengen Beweis zu erbringen. Es war vorauszusehen, daß die beiden depsidischen Bindungen in der Umbilikarsäure gegen spaltende Agenzien ungleiche Festigkeit zeigen würden. Bei der Spaltung mit Lauge in der Kälte hatten wir Lekanorsäure fassen können, ein Zeichen dafür, daß die laktonartige Verbindung, welche den Isoevernylrest mit dem Lekanorsäuregebilde verknüpft, gegen Lauge empfindlicher ist als die im Lekanorsäurerest vorhandene Depsidbindung. Bei der Alkoholyse liegen nun die Verhältnisse anders. Es wurden beim Erhitzen mit Methylalkohol im Rohr bei zweistündigem Erhitzen an indifferenten Stoffen Orzin, geringe Mengen Orsellinsäure-methylester (XXII) und einer Verbindung $C_{18}H_{18}O_7$ aufgefunden. Letztere kann der Analyse nach der Methylester eines Didepsids sein, welches noch den Isoevernylrest enthält und dadurch entstanden ist, daß aus der Umbilikarsäure ein Orsellinsäurerest in Form von Orzin abgespalten wurde und das neue freigelegte Karboxyl mit Methylalkohol verestert wird. Über die Konstitution

¹³ Monatsh. Chem. 62, 1933, S. 241, bzw. Sitzb. Ak. Wiss. Wien (II b) 142, 1933, S. 47.

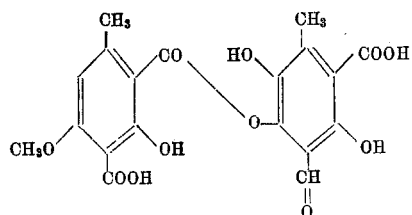
dieser dem Everssäuremethylester isomeren Verbindung gewannen wir durch eine neuerliche Alkoholyse, jedoch mit Äthylalkohol, Aufschluß. Wir isolierten nämlich hierbei neben einem Äthylester, den wir leider infolge Mangels an Isoeverninsäureäthylester nicht direkt identifizieren konnten, Orsellinsäuremethylester, womit der Nachweis erbracht ist, daß der Isoevernylrest in unserer Verbindung $C_{18}H_{18}O_7$ bei der Alkoholyse mit Äthylalkohol in Form des Äthylesters vom Orsellinsäuremethylesterkomplex abgelöst wurde. Dem Ester $C_{18}H_{18}O_7$ kommt demnach die Formel (XXIII) zu.

Es ist uns ferner gelungen, durch eine länger andauernde Alkoholyse der Umbilikarsäure mit Methylalkohol neben Orzin und Orsellinsäuremethylester den Isoverninsäuremethylester (XXIV) zu fassen, so daß kein Zweifel darüber bleibt, daß in der Umbilikarsäure selbst die freie Karboxylgruppe an einem Orzinreste hängt und daß der Isovernylrest mit seiner Karboxylgruppe depsidartig am Lekanorsäuregebilde haftet. Der einzig mögliche Formelausdruck für die Umbilikarsäure ist demach Formel V.

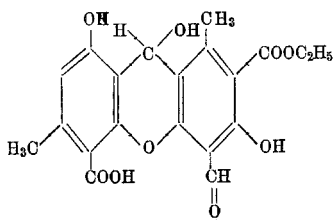




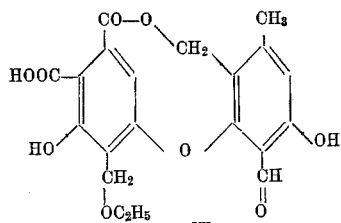
VI



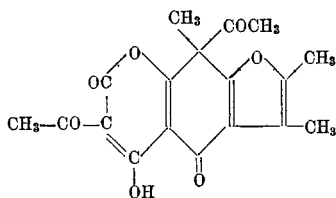
VII



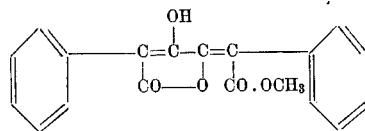
VIII



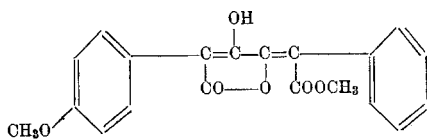
IX



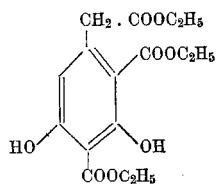
X



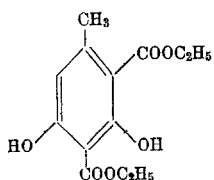
XI



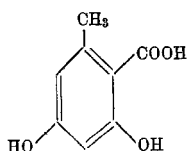
XII



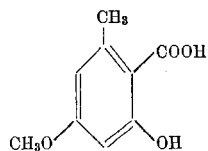
XIII



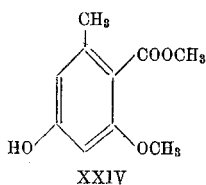
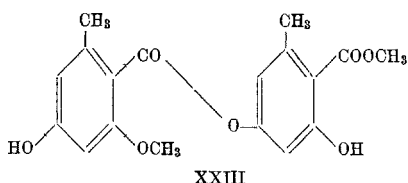
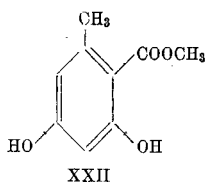
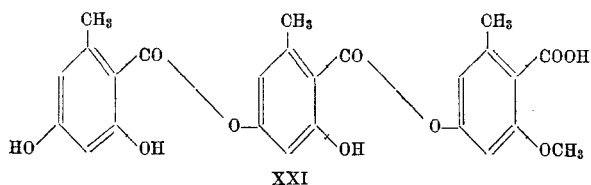
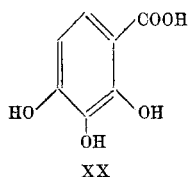
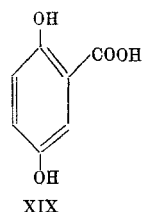
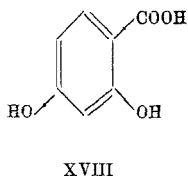
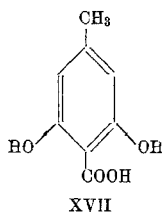
XIV



XV



XVI



Experimenteller Teil.

Bereitung der Enzymlösungen aus *U. pustulata*,
U. deusta und *E. prunastri*.

U. pustulata wurde möglichst fein zerrieben und derart für alle Versuche aufbewahrt.

Vorversuchsartig wurden 30 g dieses Flechtenmaterials mit 300 cm³ Wasser in einer Stöpselflasche mehrere Tage stehen gelassen. Die Lösung wurde filtriert und ausgeäthert. Es wurden so

0.19 g eines süß schmeckenden Öles gewonnen, welches über Dibenzoylorzin mit Orzin identifiziert werden konnte. An sauren Bestandteilen konnten nur geringe Mengen fettsäureähnlicher Substanzen gewonnen werden, welche vorläufig nicht näher untersucht wurden.

Es war nun weiterhin der Nachweis zu erbringen, ob unsere Flechte nicht von vornherein freies Orzin enthalte.

30 g unseres Flechtenpulvers wurden deshalb mehrere Tage mit Äther extrahiert. Das Extrakt hinterließ ungefähr 1 g roher Gyrophorsäure, welche, um eventuell vorhandenes Orzin zu gewinnen, mit kaltem Wasser ausgelaugt wurde. Der so gewonnene wässerige Auszug wurde ausgeäthert. Es war keine Spur Orzin nachzuweisen.

Beide Versuche zeigen nun, daß in der Flechte ursprünglich kein Orzin vorhanden ist, daß jedoch die in der Flechte vorhandene Gyrophorsäure bei der Digestion mit Wasser einen Abbau zu Orzin erfährt, wobei diese Destruktion entweder durch Lebensvorgänge selbst oder durch enzymatische Einflüsse erfolgt sein konnte.

Wir stellten deshalb Versuche an, das die Gyrophorsäure spaltende Agens von der Flechtensubstanz zu trennen.

20 g Flechtenpulver wurden mit Wasser und gekochtem Sand 1½ Stunden in einer Reibschale energisch verrieben. Die Masse wurde in ein Leinensäckchen gebracht und die Flüssigkeit möglichst ausgepreßt. Der trübe Preßsaft wurde durch ein doppeltes Filter gegossen. Die so gewonnene Flüssigkeit war schwach rötlich und erwies sich gegen Lackmus neutral. In diese Lösung wurde nun 0.13 g Gyrophorsäure, welche mit wenig Wasser in einer Reibschale zu feinstem Schlamm verrieben worden war, eingetragen und die milchige Flüssigkeit 12 Stunden unter öfterem Schütteln stehen gelassen. Es war nun völlige Lösung eingetreten. Die wässerige Lösung enthielt nur Orzin, Gyrophorsäure oder Orsellinsäure waren nicht nachzuweisen.

Da unsere Enzymlösung von vornherein etwas Orzin enthielt, welches beim Bereiten des wässerigen Auszuges aus der in der Flechte vorhandenen Gyrophorsäure gebildet wird, haben wir den Versuch gemacht, das aus der eingetragenen Gyrophorsäure entstandene Orzin gewichtsmäßig nachzuweisen. 40 g des Flechtenpulvers wurden wie vorher auf wirksame Lösung verarbeitet und die so gewonnene Flüssigkeit in zwei gleiche Teile geteilt.

Die eine Hälfte (54 cm^3) wurde mit fein zerriebener Gyrophorsäure versetzt, 12 Stunden geschüttelt und ausgeäthert. Es wurde so ein Öl gewonnen, welches, im Hochvakuum destilliert, 0.1400 g kristallisiertes Orzin gewinnen ließ. Der zweite Teil der Lösung blieb für sich ebenfalls 12 Stunden sich selbst überlassen und wurde dann konform dem ersten Versuch ebenfalls auf Orzin verarbeitet. Es konnten diesmal nur 0.08 g Orzin gewonnen werden. Damit war ein weiterer Beweis dafür erbracht, daß die Gyrophorsäure zu Orzin abgebaut wird.

Die Filtration unserer wässerigen Flechtenauszüge schien uns nun noch nicht vollends Gewähr dafür zu geben, daß nicht doch virulente Zellen das Filter passieren könnten und durch ihre Lebenstätigkeit diesen Abbau hervorriefen. Wir sind deshalb daran gegangen, das verwendete Flechtenpulver zu sterilisieren.

20 g des Flechtenpulvers wurden mit Äther durchtränkt, eine Stunde in einem verschlossenen Gefäß mit dem Äther in Berührung gelassen und nun nach dem Abdunsten des Äthers wie üblich auf Enzymlösung verarbeitet. Der wässrige Auszug spaltete Gyrophorsäure noch immer glatt. Ferner wurde die Flechte durch fünf Tage mit Äther extrahiert. Auch dieses Flechtenmaterial erwies sich geeignet, wirksame Lösungen gewinnen zu lassen, obwohl die Einwirkung des Ätherdampfes das Flechtenpulver auf eine Temperatur von ungefähr 30° brachte. Es ist nun schwer anzunehmen, daß lebende Zellen eine derartige Vorbehandlung ohne Schädigung überdauern könnten. Ein exakter Nachweis, daß in unseren Lösungen auch Orzin selbst zu aliphatischen Stoffen abgebaut wird, ist bisher von uns nicht durchgeführt worden. Es ist demnach die Annahme, daß unsere wässerigen Auszüge ein Depsidbindungen hydrolysierendes Ferment enthalten, nicht von der Hand zu weisen.

Es wurden nun eine Reihe Versuche angestellt, um zu untersuchen, wie weit die Enzyme unserer Lösungen in ihrer Wirksamkeit durch die Konstitution des zu spaltenden Depsids beeinflußt werden. Bei diesen Versuchen wurden jeweils Flechtenauszüge aus 20 g unseres Flechtenpulvers auf 0.1 g der betreffenden Flechtensäure einwirken gelassen. Glatt gespalten wurden Gyrophorsäure, Lekanorsäure, Evernsäure, und zwar wurden Orzin und Orzinhalbäther nachgewiesen. Nicht hydrolysiert wurde Atranorin, bezüglich der Umbilikarsäure können wir noch nichts

Bestimmtes angeben, doch wird die Säure bestimmt nicht bis zu den phenolischen Kernen abgebaut.

Fernerhin haben wir untersucht, ob die vorhandene Karboxylase nur auf Orsellinsäure eingestellt ist.

Es wurde bei dieser Versuchsreihe so verfahren wie vorher, nur wurde nicht das Phenol, sondern die nicht angegriffene Säure gewichtsmäßig festgestellt. So wurde 0.1 g reiner Orsellinsäure in eine Enzymlösung, welche aus 20 g Flechte bereitet war, eingetragen, nach 12 Stunden mit Natriumbikarbonat versetzt, die vorhandenen Phenole mit Äther aufgenommen, mit Salzsäure angesäuert und vorhandene Karbonsäuren mit Äther aufgenommen. Orsellinsäure war nicht nachzuweisen. Nicht angegriffen wurden Paraorsellinsäure, *b*-Resorzylsäure, Hydrochinonkarbonsäure usw. Die entkarboxylierenden Fermente sind deshalb, soweit es sich bisher erkennen läßt, auf die Orsellinsäuregruppierung spezifisch eingestellt.

Alkoholyse der Umbilikarsäure.

1 g Umbilikarsäure wurde mit 34 cm³ absolutem Methylalkohol im Rohr zwei Stunden auf 140° erhitzt. Der braune Bombeninhalt wurde im Vakuum vom Methylalkohol befreit, der sirupöse, langsam kristallisierende Rückstand in Äther gelöst und diese Lösung wiederholt, um eventuell vorhandene Karbonsäuren zu entfernen, mit einer Lösung von Natriumbikarbonat ausgeschüttelt. Im Äther verblieben 0.98 nicht saurer Bestandteile, welche in ein Kugelrohr gespült und der fraktionierten Sublimation im Hochvakuum unterworfen wurden. Bei ungefähr 90° 0.15 mm destillierte ein gelbliches Öl, dem sich beim Erhitzen, ansteigend bis 140°, teilweise farblose Kristalle anschlossen. Dieses Gemengsel wurde in möglichst wenig kochendem Wasser gelöst und kristallisieren gelassen. Die farblosen Kristalle wurden von der süßschmeckenden Mutterlauge, in der reichlich Orzin nachzuweisen war, abgesaugt und neuerlich im Hochvakuum sublimiert. Die Verbindung geht bei derselben Temperatur über wie der Orsellinsäuremethylester (ungefähr 100° 0.15 mm). Der Schmelzpunkt liegt bei 138—139°, mit Orsellinsäuremethylester (Schmp. 139°) gemengt, ergab sich keine Depression.

Bei der ersten Sublimation der indifferenten oder phenolischen Anteile nach der Alkoholyse war in der Kugel eine auch

bei 150° 0·15 mm noch nicht übergehende amorphe Substanz zurückgeblieben, welche beim Auflösen in lauem Alkohol zu kristallisieren begann. Durch wiederholtes Lösen in Alkohol oder Azeton und Fällern mit lauem Wasser wurde der Stoff auf einen Schmp. 163—165° gebracht. Der Stoff neigt sehr dazu, milchige Lösungen zu geben, aus welchen er erst nach langem Stehen sich kristallinisch abscheidet. Um die Einheitlichkeit des Stoffes nachzuweisen, haben wir ihn in zwei Fraktionen geteilt; beide Fraktionen schmolzen jedoch gleich und gaben gleiche Analysenwerte. Die Analyse stimmte auf ein Isomeres des Everssäuremethylesters.

4·798 mg Substanz gaben (nach PREGL) 10·977 mg CO₂ und 2·368 mg H₂O
0·0617 g „ „ (nach ZEISEL) 0·0817 g AgJ.

C₁₈H₁₈O₇. Ber. C 62·4, H 5·2, OCH₃ (2) 17·03%.

Gef. C 62·39, H 5·52, OCH₃ 17·48%.

Alkoholyse der Verbindung C₁₈H₁₈O₇.

0·5 g der bei 163° schmelzenden Verbindung wurde mit 20 cm³ absolutem Äthylalkohol vier Stunden auf 160° erhitzt. Der braune Rohrinhalt wurde analog dem obigen Versuche aufgearbeitet. Es konnte auf Grund seiner bekannten Sublimationstemperatur der bei 139° schmelzende Orsellinsäuremethylester gefaßt werden.

Energetische Alkoholyse der Umbilikarsäure mit Methylalkohol.

Es kam uns bei diesem Versuch hauptsächlich darauf an, Isoeverninsäuremethylester zu fassen.

0·5 g Umbilikarsäure wurden mit 15 cm³ absolutem Methylalkohol vier Stunden im Rohr auf 140° erhitzt. Es wurde ebenso wie bei den obigen Alkoholysen gearbeitet. Die nicht sauren Stoffe, welche von 90—140° destillierten (0·15 mm), wogen 0·23 g. Das mit Kristallen behaftete Öl wurde mit wenig warmem Wasser behandelt und nach dem Erkalten das Kristallinat von der Orzinsäurelösung getrennt. Um den erwarteten Isoeverninsäuremethylester von dem vorhandenen Orsellinsäuremethylester zu trennen, unterwarfen wir das Gemisch der Ester einer wiederholten fraktionierten Sublimation im Hochvakuum. Durch Herausholen des bei 100° (0·15 mm) ziemlich rasch sublimierenden Orsellinsäuremethylesters konnte ein öliger Rückstand gewonnen werden, welcher durch

Umlösen aus Wasser und neuerliche Sublimation — die Verbindung ging wie Isoeverninsäuremethylester erst bei 130° ($0\cdot15\text{ mm}$) rascher über — auf einen Schmelzpunkt 113° gebracht werden konnte.

Der Mischschmelzpunkt mit Isoeverninsäuremethylester lag bei der gleichen Temperatur. Es liegt demnach zweifellos Isoeverninsäuremethylester vor.

$0\cdot0539\text{ g}$ Substanz gaben (nach ZEISEL) $0\cdot1291\text{ g}$ AgJ.

$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_4$. Ber. OCH_3 $31\cdot64\%$.

Gef. $31\cdot62\%$.