

Die Biosynthese der Orsellinsäure und Penicillinsäure (1)

KLAUS MOSBACH

Biochemisches Institut der Universität Lund, Lund, Schweden

Die in Gegenwart von $\text{CH}_3^{14}\text{COONa}$ aus *Chaetomium cochliodes* gebildete Orsellinsäure wurde isoliert und ihre ^{14}C -Verteilung bestimmt. Es wurde gezeigt, dass das Orsellinsäuremolekül entsprechend der Acetattheorie aufgebaut wird. Das Vorkommen von Orsellinsäure in *Penicillium barnense* wurde festgestellt. Spezifisch markierte Orsellinsäure wurde als Substrat zu *Penicillium barnense* gegeben und die gebildete Penicillinsäure isoliert. Das radioaktive Markierungsmuster der Penicillinsäure entsprach dem der zugesetzten Orsellinsäure, womit gezeigt wurde, dass Orsellinsäure Precursor der Penicillinsäure ist.

Der klassische Metabolit in Schimmelpilzen, Penicillinsäure, wurde unter anderem auch in *Penicillium barnense* gefunden.¹ Es lagen auch Beweise für das Vorkommen einer aromatischen Substanz von phenolischem Charakter im Kulturmedium desselben Pilzes vor. Es wurde nun gezeigt, mit den schon einmal beschriebenen Analysemethoden², dass es sich bei dieser Verbindung um Orsellinsäure handelt. Nach etwa 10 Tagen wurde der Anteil der Orsellinsäure im Kulturmedium immer geringer, wobei sich gleichzeitig der Anteil der Penicillinsäure erhöhte.

Das gemeinsame Vorkommen dieser beiden Metaboliten in derselben Spezies, ihre wechselweisen quantitativen Beziehungen zueinander sowie die strukturelle Ähnlichkeit der Orsellinsäure und Penicillinsäure lassen auf einen metabolischen Zusammenhang schliessen. Man könnte sich dabei die Penicillinsäure durch eine Ringspaltung der Orsellinsäure entstanden denken. Dieser Gedanke war schon vor einigen Jahren von Ehrensvärd³ ausgesprochen worden und unabhängig von ihm von Birch³.

Eine Parallele zu dieser Ringspaltung wäre der Übergang biosynthetischer ^{14}C -markierter 6-Methylsalicylsäure zu Patulin.^{4,5}

Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde spezifisch markierte Orsellinsäure, (2- ^{14}C - und karboxyl- ^{14}C -markiert), zum Medium von *Penicillium barnense* gegeben und die Penicillinsäure isoliert. Jedoch musste zunächst einmal festgestellt werden, inwieweit die von Birch⁶ gezeigte head-to-tail-Kupplung von Acetateinheiten bei 6-Methylsalicylsäure auch für Orsellinsäure Gültigkeit hat. Dabei hat sich gezeigt, dass auch für Orsellinsäure

die Acetattheorie in vollem Umfang gilt, und dies ist somit neben der von Gatenbeck⁷ gezeigten Acetatkupplung bei der 3-Hydroxyphthalsäure ein weiterer Beweis für deren Richtigkeit.

Auch der von Gatenbeck und dem Verfasser⁸ gezeigte Einbau des Sauerstoffisotopen ¹⁸O aus CH₃¹⁴CO¹⁸ONa in die Karboxyl- und die beiden Hydroxylgruppen der Orsellinsäure kann als ein weiterer Beweis für die Acetattheorie gelten.

EXPERIMENTELLER TEIL

1). Degradation der Orsellinsäure

Kulturbedingungen: Vier Fernbachkolben mit je 500 ml Czapek-Dox-Lösung (5 % Dextrose) wurde mit Perithezien von *Chaetomium cochliodes* Pall. okuliert. Nach 12 Tagen wurde in die Kolben eine Lösung von CH₃¹⁴COONa (insgesamt 0.5 mC) pipettiert. Nach weiteren 7 Tagen wurde das Myzelium durch Filtrieren vom Medium getrennt und die Orsellinsäure in der schon beschriebenen Weise isoliert². Ein kleiner Teil des Mediums wurde mit Äthyläther extrahiert und der Extrakt chromatographiert. (System: Wasser-Äthyl-Methylketon-Diäthylamin.)⁹ Das Messen der Radioaktivität entlang des Papierchromatogrammes ergab nur zwei Aktivitätsspitzen, deren *R_F*-Werte jeweils denen der Orsellinsäure bzw. des Orcinols entsprachen. (Orsellinsäure *R_F* = 30; Orcinol *R_F* = 90.)

Oxydation der Orsellinsäure nach van Slyke-Folch: 270 mg nicht radioaktiver Orsellinsäure wurde zu 72 mg der isolierten radioaktiven Säure gegeben. Durch wiederholtes Lösen und Eindunsten in Äthyläther wurde eine homogene Mischung erhalten.

5 mg der Substanz wurden nun nach der Methode von van Slyke-Folch¹⁰ oxydiert und das dabei gebildete Kohlendioxyd in karbonatfreiem Bariumhydroxyd aufgefangen. Das Bariumkarbonat wurde isoliert und dessen Radioaktivität gemessen. Bei allen radioaktiven Messungen wurden jeweils 15 mg/cm² Bariumkarbonat verwendet.

Dekarboxylierung der Orsellinsäure: 131 mg Orsellinsäure wurden in 12 ml Glycerin durch Erwärmen im Ölbad gelöst. Das dabei gebildete Kohlendioxyd wurde durch einen durch das System geleiteten Strom von kohlendioxydfreiem Stickstoff in eine Bariumhydroxydlösung gebracht und als Bariumkarbonat isoliert.

Kuhn-Roth-Oxydation der Orsellinsäure: Die Kuhn-Roth-Oxydation von 100 mg Orsellinsäure ergab Essigsäure, die durch Wasserdampfdestillation isoliert wurde. Das während der Reaktion gebildete Kohlendioxyd wurde in Bariumhydroxid aufgefangen. Die Essigsäure wurde durch eine Schmidt-Reaktion dekarboxyliert und das Kohlendioxyd als Bariumkarbonat isoliert. Das dabei gebildete Methylamin wurde dann durch eine alkalische Permanganatlösung zu Kohlendioxyd oxydiert. Nach Ansäuern derselben wurde das dadurch freigemachte Kohlendioxyd in Baryt aufgefangen.

2,4,6-Trinitroorcinol: 75 mg Orsellinsäure wurden in 0,350 ml konz. Schwefelsäure gelöst und bei 0°C eine kalte Mischung von 0,135 ml konz. Salpetersäure und 0,27 ml konz. Schwefelsäure zugegeben. Nach einem weiteren Zusatz von 0,220 ml konz. Salpetersäure und einer halben Stunde Stehen bei Zimmertemperatur wurde die Mischung in Eiswasser gebracht. Das dabei ausgefallene 2,4,6-Trinitroorcinol wurde abfiltriert und aus Wasser umkristallisiert. (Schmelzp. 171°C.)¹¹

Hypobromit-Oxydation von 2,4,6-Trinitroorcinol: Zu 33 mg Trinitroorcinol in 5 ml heissem Wasser wurden 7 ml einer gesättigten Bariumhydroxydlösung gegeben. Die auf 0°C gekühlte Suspension wurde mit einer eiskalten Bariumhypobromitlösung (0,2 ml Br₂, 1,6 g Ba(OH)₂, 30 ml H₂O) versetzt. Nach 5 Stunden Umrühren in einem verschlossenen Erlenmeyerkolben bei Zimmertemperatur wurde das gebildete Brompikrin mit Wasserdampf überdestilliert. Das Destillat wurde in einem vorgekühlten Zentrifugenrohr aufgefangen und abzentrifugiert. Nach Waschen mit angesäuertem destilliertem Wasser wurde das Brompikrin erneut zentrifugiert und nach van Slyke-Folch zu Kohlendioxyd oxydiert. Das während der Hypobromitreaktion gebildete Bariumkarbonat wurde filtriert und mit kochendem destilliertem Wasser gewaschen. Durch Ansäuern mit Perchlorsäure wurde das Kohlendioxyd freigemacht und noch einmal als Bariumkarbonat isoliert.

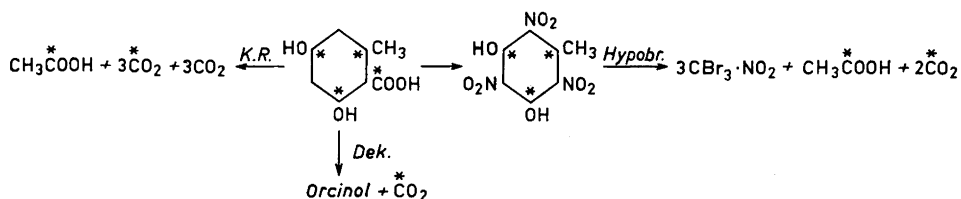


Abb. 1. Degradationsschema der Orsellinsäure.

 2). Synthese von 2-¹⁴C- und karboxyl-¹⁴C-markierter Orsellinsäure

Äthylacetoacetat: (CH₃¹⁴COCH₂¹⁴COOH): 250 mg ¹⁴C-markiertes Bariumkarbonat wurde mit Perchlorsäure versetzt und das dabei gebildete radioaktive Kohlendioxyd in eine Ätherlösung von Magnesiumjodmethyl eingeleitet und die durch Hydrolyse mit

 Tabelle 1. ¹⁴C-Verteilung in biosynthetischer Orsellinsäure.

Material (1)	Anzahl C-Atome von der Orsellin- säure (2)	Totale Radioakti- vität des Materiales in Imp./Min (3)	Anzahl der COOH- Gruppen ent- sprechend der Acetattheorie	
			Gef. (4)	Theor. (5)
Alle Kohlenatome der Orsellinsäure Oxydation nach van Slyke-Folch	8	1 370	4.03	4
Dekarboxylierung	1	346	1.01	1
Kohlenatom 6 der Orsellinsäure K-R- Oxydation (Essig- säure) *	1	340	1	1
Methylgruppe der Orsellinsäure K-R-Oxydation (Essigsäure)	1	0	0	0
Kohlenatome 1, 2, 3, 4, 5 und Karboxylgruppe der Orsellinsäure K-R-Oxydation	6	1 032	3.03	3
Kohlenatome 2 und 4 der Orsellinsäure Hypobromitoxydation von Trinitroorcinol	2	598	1.76	2
Kohlenatome 1, 3 und 5 der Orsellinsäure Brompikrin	3	0	0	0

* Die Radioaktivität der Karboxylgruppe der durch Kuhn-Roth-Oxydation erhaltenen Essigsäure ist als Basis für die Ausrechnung der theoretischen Aktivität der einzelnen Proben verwendet worden, da sie durch direktes Messen erhalten worden ist.

Wasser gebildete karboxylmarkierte Essigsäure isoliert. Das Natriumsalz der gebildeten Essigsäure wurde dann mit nicht radioaktivem Natriumacetat vermischt und durch Erwärmen mit Diäthylsulfat bei 180°C verestert. Das sich bildende Äthylacetat wurde sukzessiv abdestilliert. 25 g des gebildeten Äthylacetates wurde dann mit Natrium versetzt, um eine Kondensation zu Äthylacetoacetat zu ermöglichen¹². Das Äthylacetoacetat wurde vom Reaktionsgemisch getrennt und schliesslich durch Destillation im Vakuum gereinigt. (Ausbeute: 6 g Äthylacetoacetat.) Dass gerade dieser Weg für die Synthese gewählt wurde, lag daran, dass die sich gleichzeitig bildende Dehydracetsäure für andere Versuche gebraucht wurde.

Dihydroorsellinsäureester: 0,69 g Natrium wurden in 10 ml abs. Äthylalkohol gelöst und 4,2 g des markierten Acetessigesters sowie 3,4 g Krotonsäureäthylester hinzugegeben¹³. Nach Erhitzen auf dem Wasserbad wurde das sich gebildete Natriumsalz des Dihydroorsellinsäureesters mit verdünnter Schwefelsäure zersetzt und der freie Ester isoliert.

Dibromorsellinsäureäthylester: 3,3 g Dihydroorsellinsäureester ergab nach Bromieren mit 8 g Br₂ Dibromorsellinsäureäthylester¹⁴, der sich als kristalliner Brei abscheidete.

Orsellinsäureäthylester: 1,5 g markierter Dibromorsellinsäureäthylester wurde in 25 ml 2 N Natronlauge gelöst und nach Zusatz von 2 g nach Busch und Stöve bereitetem Katalysator (Palladium auf Calciumkarbonat) hydriert. Der gebildete Orsellinsäureäthylester wurde dann nach Filtrieren des Katalysators durch Ansäuern der Lösung ausgefällt und isoliert.

Orsellinsäure: Ein Teil des Esters der Orsellinsäure wurde in 10 %-iger NaOH-Lösung bei Zimmertemperatur verseift und zwar während 10 Tagen. (Ausbeute: 250 mg markierte Orsellinsäure.)

Lokalisieren der Markierung in der synthetisierten Orsellinsäure: Bei der Kondensation des Krotonsäureäthylesters mit dem markierten Acetessigesters zu Dihydroorsellinsäureäthylester ist ausser dem in der Literatur beschriebenen Weg der Kondensation theoretisch ein weiterer möglich. Um diese Möglichkeiten zu untersuchen, wurde ein Teil der synthetischen Orsellinsäure nach van Slyke-Folch oxydiert und ein anderer zu Orcinol dekarboxyliert.

Tabelle 2. ¹⁴C-Verteilung in der synthetisierten Orsellinsäure.

Material (1)	Anzahl der Kohlenatome von der (2) Orsellinsäure	Totale Radioaktivität des Materiales in Imp./Min. (3)
Orsellinsäure Oxydation nach van Slyke-Folch	8	138 480
Dekarboxylierung	1	66 900

Aus den erhaltenen Werten geht hervor, dass sich genau die Hälfte der Radioaktivität in der Karboxylgruppe befindet, welches somit die Alternative (1) der Kondensation zu Dihydroorsellinsäureäthylester bestätigt.

3). Zugabe der Orsellinsäure

Zu zwei Fernbachkolben mit 14 Tagen alten Kulturen von *Penicillium barnense* (in jedem Kolben 500 ml Czapek-Dox-Lösung) wurden je 100 mg markierte Orsellinsäure gegeben. Von einem Kolben wurde zuerst das alte Medium aufgesaugt und dann die Orsellinsäure, in 500 ml frischer Czapek-Dox-Lösung gelöst, vorsichtig unter den Myzelienteppich hineinpipetiert. Der pH-Wert der SCD-Lösung war vorher mit Natronlauge auf den Wert des alten Mediums (pH = 7,5) gebracht worden. Ausserdem wurde 1 ml abs.

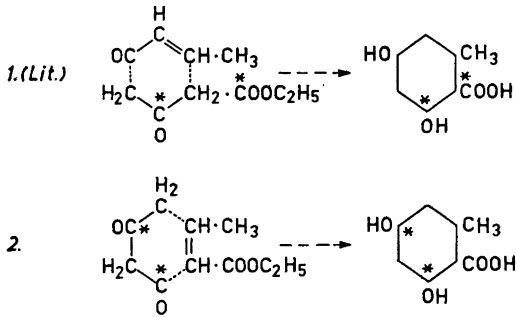


Abb. 2. Die zwei theoretisch möglichen Wege der Kondensation von Krotonensäure-äthylester mit Acetessigester.

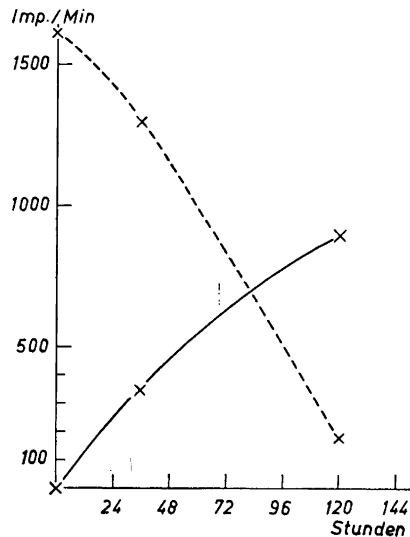


Abb. 3. Veränderung der Menge radioaktiver Orsellinsäure im Verhältnis zur Menge radioaktiver Penicillinsäure mit der Zeit. Da die zugesetzte Orsellinsäure im Gegensatz zur isolierten Penicillinsäure eine doppelte Markierung hat, sind die erhaltenen radioaktiven Werte der Orsellinsäure um die Hälfte reduziert worden, um eine direkte Vergleichsmöglichkeit zu haben.

Alkohol hinzugegeben, um die Orsellinsäure in Lösung zu bringen. In dem anderen Kolben wurde die auch hier in 1 ml abs. Alkohol gelöste Säure direkt in das alte Medium pipettiert. Es zeigte sich allerdings später im wesentlichen kein Unterschied im Produktionsbild der beiden Kulturen, weshalb in der Fortsetzung hierauf nicht mehr eingegangen wird. In einem Vorversuch war zunächst einmal gezeigt worden, dass die zugesetzte Orsellinsäure vom Organismus metabolisiert wurde. Weiterhin hatte sich ergeben, dass 6 Tage nach dem Zusatz in der Fettfraktion des Myzeliums fast keine Radioaktivität zu finden war, also keine schnelle Degradierung der Säure zu C₃-Einheiten. Um nun das eventuelle Auftreten radioaktiver Penicillinsäure zu verfolgen, wurden in gewissen Zeitabständen 25 ml-Fractionen aus dem Medium genommen, angesäuert, mit Äther extrahiert und chromatographiert. (Lösungsmittelsystem: Benzol-Ameisensäure⁹. R_F: Orsellinsäure 0,02. R_F: Penicillinsäure 0,40.) Die Radioaktivität wurde direkt auf dem chromatographierten Papierstreifen (Whatman 3 MM) gemessen.

4). Isolierung und Degradation der Penicillinsäure.

6 Tage nach Zusatz der Orsellinsäure wurde aus dem Medium durch Ansäuern mit Salzsäure die Penicillinsäure mit Äthyläther extrahiert. Nach Zugabe von nicht radioaktiver Penicillinsäure konnte aus dem braunen Extrakt nach mehrfachem Umkristallisieren aus Benzol 550 mg chromatographisch reine Penicillinsäure von konstanter Aktivität isoliert werden.

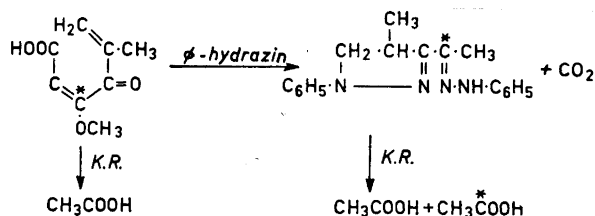


Abb. 4. Vereinfachtes Degradationsschema der isolierten Penicillinsäure.

Van Slyke-Folch-Oxydation der Penicillinsäure: 5 mg der reinen Penicillinsäure wurde nach der Methode von van Slyke-Folch oxydiert und das dabei gebildete Kohlendioxyd in eine karbonatfreie Bariumhydroxydlösung gebracht.

Kuhn-Roth-Oxydation der Penicillinsäure: 33 mg Penicillinsäure wurden oxydiert und das dabei gleichzeitig gebildete Kohlendioxyd als Bariumkarbonat isoliert. Die erhaltene Essigsäure wurde nach van Slyke-Folch totalverbrannt.

Darstellung und Degradation von 3-Acetyl-4:5-dihydro-4-methyl-1-phenylpyrazol Phenylhydrazon: 500 mg Penicillinsäure wurden zusammen mit 500 mg wasserfreiem

Tabelle 3. ^{14}C -Verteilung in der Penicillinsäure.

Material (1)	Anzahl C-Atome (2)	Radioaktivität in Imp/Min (3)	Totale Radioakti- vität des Materiales in Imp/Min (4)
van Slyke-Folch-Oxy- dation der Penicillin- säure	8	221	1 768
van Slyke-Folch-Oxy- dation der durch Kuhn- Roth-Oxydation von Penicillinsäure erhalte- nen Essigsäure	2	42	84
van Slyke-Folch Oxy- dation des Phenyl- hydrazones	18	95	1 710
Das bei der Phenylhyd. behandlung frei- gemachte CO_2	1	72	72
Kuhn-Roth-Oxydation des Phenylhydrazones, Karbonylgruppe der Essigsäure *	2	857	1 714
Kuhn-Roth-Oxydation des Phenylhydrazones, Methylgruppe der Essigsäure	2	0	0

* Da die durch Kuhn-Roth-Oxydation des Phenylhydrazones erhaltene Essigsäure zur Hälfte aus nicht radioaktiver Essigsäure (siehe Kuhn-Roth-Oxydation der Penicillinsäure) besteht, muss der erhaltene Wert von 857 Imp/Min für die totale Radioaktivität verdoppelt werden = 1 714 Imp/Min.

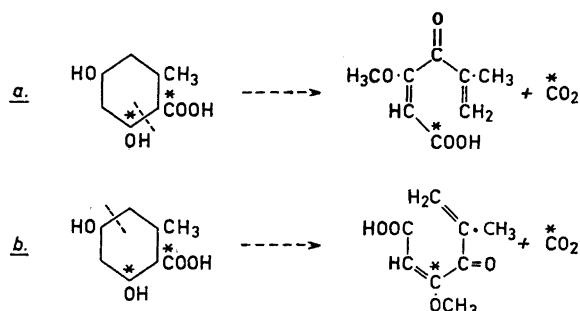


Abb. 5. Die zwei theoretisch möglichen Wege einer Ringspaltung der Orsellinsäure zu Penicillinsäure.

Natriumacetat in 3 ml Wasser durch Erwärmen gelöst. 0,41 ml Eisessig und 0,69 ml Phenylhydrazin wurden zugesetzt und das sich dabei bildende Kohlendioxyd in Baryt aufgefangen. Nach etwa einer Stunde wurde die wässrige Lösung abdekantiert und die zurückbleibende gelbe Masse aus abs. Äthylalkohol umkristallisiert. (Ausbeute: 100 mg Phenylhydrazon. Schmelzp. 176°C.)

5 mg des gebildeten Phenylhydrazones wurden nach van Slyke-Folch oxydiert und als Bariumkarbonat isoliert.

85 mg des Phenylhydrazones wurden oxydiert (Kuhn-Roth) und die Essigsäure isoliert.

Die erhaltene Essigsäure wurde dann nach Schmidt decarboxyliert und die Karboxylgruppe als Bariumkarbonat isoliert. Das sich dabei gleichzeitig gebildete Methylamin wurde mit Stickstoff in eine 0,1 N Salzsäurelösung gebracht, eingedunstet und nach van Slyke-Folch oxidiert.

RESULTATE UND DISKUSSION

Tabelle 1 zeigt, dass die Biosynthese der Orsellinsäure *via* einer head-to-tail-Kupplung von Acetat vorsichgeht. Dies war schon vor Beginn der Versuche mit $\text{CH}_3^{14}\text{CO}^{18}\text{ONa}$ gezeigt worden.⁸ Aus den erhaltenen Werten in Tabelle 3 geht hervor, dass die aromatische Verbindung Orsellinsäure Precursor der heterocyclischen Verbindung Penicillinsäure ist. Ausserdem ist gezeigt worden, dass von den beiden theoretisch möglichen Wegen einer Ringspaltung, der letztere Gültigkeit hat. [b.]

Die Ringspaltung der Orsellinsäure scheint durch einen hydrolytischen Vorgang vorsichzugehen. Ähnliches lässt sich auch für den Übergang 6-Methylsalicylsäure-Patulin vermuten. Versuche in Gegenwart von H_2^{18}O könnten hierüber Auskunft geben. Auch die Präparation zellfreier Enzymextrakte kann Aufschluss über die einzelnen Schritte bei der Umwandlung der Orsellinsäure zu Penicillinsäure geben. Versuche in dieser Richtung sind im Gang.

Aus Tabelle 3 ist auch ersichtlich, dass sich in zwei weiteren Kohlenatomen der Penicillinsäure eine, allerdings schwache (knapp 5 % der totalen), Radioaktivität befindet. Diese Kohlenatome entsprechen genau denen, die bei der Biosynthese der Penicillinsäure in Gegenwart von $\text{CH}_3^{14}\text{COONa}$ markiert werden.³ Der Gedanke liegt somit nahe, dass hier ein geringer Teil der zuge-

setzten spezifisch markierten Orsellinsäure zu C₂-Einheiten degradiert worden ist, die dann als markierte Essigsäure auf dem normalen Wege zur Bildung der Penicillinsäure beigetragen hat.

Aus Abbildung 4 geht hervor, wir in einem Zeitraum von 120 Stunden die Menge der radioaktiven Orsellinsäure allmählich zugunsten der Menge der radioaktiven Penicillinsäure abnimmt.

Ich möchte Herrn Prof. Gösta Ehrensvärd, der diese Arbeit angeregt hat, für sein gezeigtes Interesse herzlich danken. Auch Herrn Dr. Sten Gatenbeck danke ich vielmals für wertvolle Diskussionen, sowie Herrn Dr. Martin Tveit.

REFERENZEN

1. Saluste, E. *persönliche Mitteilung*.
2. Mosbach, K. *Z. Naturforsch.* **14b** (1959) 69.
3. Birch, A. J., Blance, G. E. und Smith, H. J. *J. Chem. Soc.* **1958** 4582.
4. Tanenbaum, St. W. und Bassett, E. W. *J. Biol. Chem.* **234** (1959) 1861.
5. Bu'Lock, J. D. und Ryan, A. J. *Proc. Chem. Soc. London* **1958** 222.
6. Birch, A. J. *et al. Austral. J. Chem.* **8** (1955) 539.
7. Gatenbeck, S. *Acta Chem. Scand.* **12** (1958) 1211.
8. Gatenbeck, S. und Mosbach, K. *Acta Chem. Scand.* **13** (1959) 1561.
9. Reio, L. *J. Chromatography* **1** (1958) 366.
10. Cf. Calvin, Heidelberger, Reid, Tolbert und Yankwich, *Isotopic carbon* Wiley, New York 1949, S. 92.
11. Birch, A. J. *et al. J. Chem. Soc.* **1958** 360.
12. Gattermann-Wieland *Die Praxis des organischen Chemikers*, W. de Gruyter & Co, Berlin 1939, S. 250.
13. von Schilling, R. und Vorländer, D. *Ann.* **308** (1899) 195.
14. Sonn, A. *Ber.* **61** (1928) 926.
15. Birkinshaw, J. H. *Biochem. J.* **30** (1936) 394.

Eingegangen am 24. Oktober 1959.