

Nichtenzymatische Synthese von Penicillinen und Hippursäure mit S-Acylderivaten der Thioglykolsäure*

Von

R. Brunner, M. Röhr, W. Hampel und M. Zinner

Aus dem Institut für Biochemische Technologie und Mikrobiologie
der Technischen Hochschule Wien

(Eingegangen am 25. Mai 1968)

Es wurde gefunden, daß die Synthese von Penicillinen und von Hippursäure aus den entsprechenden S-Acylthioglykolaten und den Aminoverbindungen 6-Aminopenicillansäure bzw. Glycin auch ohne Anwesenheit eines Enzyms, also auf rein chemischem Weg, erfolgt. Hierbei verläuft die Penicillinsynthese im pH-Bereich von 5 bis 8 relativ rasch und unabhängig vom pH, während die Hippursäuresynthese im pH-Bereich von 6 bis 10 zwar langsam abläuft, aber um so mehr beschleunigt wird, je mehr man sich dem pH-Wert 10 nähert. Eine Erklärung für diese Befunde wird angeführt. Versuche, durch Zugabe eines Enzyms, welches die hydrolytische Spaltung von Hippursäure veranlaßt, die Synthese von Hippursäure zu beschleunigen, zeigten, daß die aus der Reaktion von S-Benzoylthioglykolat und Glycin entstandene Hippursäure stets schneller enzymatisch gespalten als chemisch gebildet wird.

Non enzymatic synthesis of penicillins and of hippuric acid is demonstrated by reacting 6-aminopenicillanic acid and glycine, resp., with the appropriate S-acylthioglycolates. In the pH range of 5 to 8 the formation of penicillins is relatively fast and independent of pH. The rate of synthesis of hippuric acid in the pH range of 6 to 10 is slow compared with the rate of penicillin formation but increases as the pH approaches 10. An explanation of these results is given. Attempts to increase the rate of hippuric acid synthesis by the addition of a hippurate-splitting enzyme at different pH values always resulted in lower yields evidently caused by a much faster enzymatic hydrolysis than chemical formation of hippuric acid.

* Herrn Prof. Dr. L. Schmid zum 70. Geburtstag in Verehrung gewidmet.

Im Zusammenhang mit Untersuchungen zur Spaltung von Penicillinen durch das Enzym Penicillinamidase (EC 3.5.1.11)¹ wurde von einigen Autoren² auch die Frage der Reversibilität dieser Enzymwirkung studiert und die mögliche Bedeutung dieses Enzyms für die biologische Synthese diskutiert³. Es konnte gezeigt werden, daß unter bestimmten Bedingungen — Erniedrigung des pH-Wertes, Erhöhung der Konzentration der Ausgangsstoffe — eine Synthese von Penicillinen aus 6-Aminopenicillansäure (6-APA) und Seitenkettensäuren in Gegenwart von Penicillinamidase möglich ist. Kaufmann, Bauer und Offe⁴ berichteten über eine erhebliche Steigerung der Syntheserate, wenn bei Verwendung von Zellsuspensionen von *Escherichia coli*, die eine aktive Penicillinamidase enthalten, die Seitenkettensäuren in Form aktivierter Verbindungen, insbesondere als S-Acylderivate der Thioglykolsäure, eingesetzt wurden.

In einer vorangegangenen Arbeit wurde in unserem Laboratorium die Existenz eines Biosyntheseweges von Penicillin in *Penicillium chrysogenum* aufgezeigt, der eine Aktivierung der Seitenkettensäuren durch Coenzym A und ATP sowie die Übertragung der Acyl-Coenzym-A-Verbindungen auf 6-APA durch eine N-Acyltransferase umfaßt⁵. Bei den Versuchen zum Studium der N-Acylierung durch Acyl-Coenzym-A-Verbindung wurde festgestellt, daß eine nichtenzymatische Acylierung von 6-APA unter den angewandten Versuchsbedingungen praktisch nicht nachweisbar war. Da in *Penicillium chrysogenum* unter gewissen Bedingungen eine Penicillinamidase gebildet wird⁶, wurde auch die Möglichkeit einer Bildung von Penicillinen aus 6-APA und Seitenkettensäuren in Gegenwart von Enzympräparationen aus *Penicillium chrysogenum* unter variierten Bedingungen untersucht, wobei jedoch keine nennenswerte Synthesewirkung nachweisbar war. Wurden die Seitenkettensäuren durch ihre Thioglykolsäurederivate ersetzt, so konnte

¹ Enzyme Nomenclature, Recommendations 1964 of the International Union of Biochemistry, Elsevier, Amsterdam-London-New York 1965.

² W. Kaufmann und K. Bauer, *Naturwissensch.* **47**, 474 (1960); F. R. Batchelor, E. B. Chain, M. Richards und G. N. Rolinson, *Proc. Roy. Soc. [London] Ser. B*, **154**, 522 (1961).

³ M. Cole, *Appl. Microbiol.* **14**, 98 (1966); A. Szentirmai, *Acta microbiol. Acad. Sci. hung.* **12**, 395 (1965/66); R. C. Erickson und L. D. Dean, *Appl. Microbiol.* **14**, 1047 (1966).

⁴ W. Kaufmann, K. Bauer und H. A. Offe, *Antimicrobial Agents Annual 1960*, 1.

⁵ R. Brunner, M. Röhr und M. Zinner, *Z. physiol. Chem.* **349**, 95 (1968).

⁶ K. Sakaguchi und S. Murao, *J. Agric. Chem. Soc. Japan* **23**, 411 (1950); S. Murao und Y. Kishida, *l. c.* **35**, 607 (1961); R. C. Erickson und R. E. Bennett, *Bacteriol. Proc.* **65** (1961); *Appl. Microbiol.* **13**, 738 (1965); C. A. Claridge, J. R. Luttinger und J. Lein, *Proc. Soc. Exper. Med.* **113**, 1008 (1963); R. Brunner, M. Röhr und M. Zinner, *Mh. Chem.* **97**, 952 (1966).

jedoch eine nichtenzymatische Synthese in erheblichem Ausmaße beobachtet werden, worauf bereits kurz hingewiesen wurde⁵. Ähnliche Befunde wurden auch am Modell der Synthese von Hippursäure aus Glycin und S-Benzoylthioglykolat erhalten. Über diese Untersuchungen wird in der vorliegenden Mitteilung berichtet.

A. Synthese von Penicillinen

In den nachfolgend beschriebenen Versuchen wurde die Bildung von Phenoxymethyl- und Phenoxyäthylpenicillin aus 6-APA und den entsprechenden S-Acylthioglykolsäurederivaten (vgl.⁷) unter Variation der pH-Werte sowie der Konzentrationen der Ausgangsstoffe untersucht.

Zu diesem Zweck wurden Versuchsansätze von 10 ml mit den in Tab. 2 und 3 angegebenen Mengen 6-APA und S-Acylthioglykolat in 0,15*m*-Phosphatpuffer (pH-Werte s. Tab. 2 und 3) bei 37° C inkubiert, nach den in den Tabellen angegebenen Zeiten jeweils zwei Parallelproben von 10 µl entnommen und auf Chromatographiepapier (S & S 2043 b) aufgetragen. Nach Entwicklung der Chromatogramme im Fließmittel 1-Propanol + Wasser (2:1, Laufstrecke 10 cm, Laufzeit 2,5 bis 3 Stdn.) wurde jeweils in einer Probe die Position des Penicillins am Papier durch qualitativen Nachweis nach Röhr⁸ ermittelt; die *R_f*-Werte der getrennten Substanzen sind in Tab. 1 zusammengestellt. In der Parallelprobe wurde an der so bestimmten Position des Penicillins ein quadratisches Papierplättchen von etwa 2 cm² herausgeschnitten und das Penicillin mit einer gemessenen Menge sterilen Phosphatpuffers pH 7,2 eluiert. Die quantitative Ermittlung des Penicillingehaltes in den Eluatn erfolgte durch Agardiffusionstest mit *Staphylococcus aureus* SG 511 als Testorganismus. Die Aufnahme von Standardkurven mit bekannten Penicillinkonzentrationen wurde in analoger Weise durchgeführt.

Die Ergebnisse der Versuche sind in den Tab. 2 und 3 zusammengestellt.

Tabelle 1. *R_f*-Werte im Fließmittel 1-Propanol + Wasser (2:1)

Substanz	<i>R_f</i>
Phenoxymethylpenicillin	0,72
Phenoxyäthylpenicillin	0,72
6-Aminopenicillinsäure	0,30
Phenoxyacetylthioglykolsäure	0,31
Phenoxypropionylthioglykolsäure	0,31

Wie aus den Ergebnissen ersichtlich, erfolgt die Synthese von Penicillinen im untersuchten pH-Bereich (5 bis 8) relativ unabhängig vom pH-Wert, und es ist besonders mit einer Steigerung der Konzentration von Phenoxyacetyl- bzw. Phenoxypropionylthioglykolat ein annähernd

⁷ H. Offe, K. Bauer und W. Kaufmann, DP-Auslegungsschrift 1 151 803 (4. Dezember 1959).

⁸ M. Röhr, Mikrochim. Acta [Wien] **1965**, 705.

Tabelle 2. Synthese von Phenoxymethylpenicillin aus 6-Aminopenicillansäure und S-Phenoxyacetylthioglykolat

pH	6-APA μMol/ml	Phenoxyacetyl- thioglykolat μMol/ml	Versuchs- dauer Min.	Phenoxymethyl- penicillin μMol/ml	%
5	25	75	0	0	27,6
			60	3,3	
			180	6,9	
			360	6,9	
6	25	75	0	0	25,2
			60	4,7	
			180	6,3	
			360	1,5	
7	25	75	0	0	27,3
			60	2,7	
			180	4,7	
			360	6,9	
8	25	75	0	0	21,6
			60	4,7	
			180	5,4	
			360	1,9	
5	75	25	0	0	21,2
			60	3,3	
			180	5,3	
			360	2,7	
6	75	25	0	0	13,2
			60	3,3	
			180	3,0	
			360	2,0	
7	75	25	0	0	27,2
			60	2,7	
			180	6,9	
			360	2,9	
8	75	25	0	0	12,0
			60	1,5	
			180	3,0	
			360	1,0	
6	12,5	12,5	0	0	12,8
			5	0,9	
			30	1,6	
			60	0,8	
			120	0,4	
			180	0,4	

Fortsetzung (Tabelle 2)

pH	6-APA μMol/ml	Phenoxyacetyl- thioglykolat μMol/ml	Versuchs- dauer Min.	Phenoxy-methyl- penicillin μMol/ml	%
6	25	25	0	0	9,6
			5	1,2	
			30	2,4	
			60	2,4	
			120	0,9	
			180	0,6	
6	50	50	0	0	11,2
			5	1,8	
			30	5,6	
			60	3,6	
			120	2,0	
			180	2,0	
6	25	50	0	0	31,2
			5	5,9	
			60	7,8	
			180	7,7	
6	25	75	0	0	40,0
			5	7,7	
			60	9,0	
			180	10,0	
6	25	100	0	0	72,0
			5	13,0	
			60	18,0	

linearer Anstieg der Syntheseraten verbunden. Bei der höchsten angewandten Konzentration von Phenoxyacetylthioglykolat erreichte die Ausbeute an Phenoxy-methylpenicillin, bezogen auf die limitierende APA-Konzentration, einen Wert von 72% in 60 Minuten.

B. Synthese von Hippursäure

Die Versuche wurden in analoger Weise wie die zur Synthese von Penicillinen durchgeführt:

Versuchsansätze (10 ml) wurden mit den in Tab. 4 angegebenen Mengen Glycin und S-Benzoylthioglykolat in 0,15 *m*-Phosphatpuffer (pH-Werte s. Tab. 4) bei 37° C inkubiert, nach den in Tab. 4 angegebenen Zeiten jeweils zwei Parallelproben von 10 μl entnommen und auf Chromatographiepapier (Schleicher & Schüll 2043 b) aufgetragen. Zur Trennung von den Ausgangsprodukten wurde jeweils eine Parallelprobe im Fließmittel Isopropylalkohol + Methanol + Ameisensäure + Wasser/60 + 20 + 8 + 20 entwickelt. Die Identifizierung der Hippursäure ($R_f = 0,96$) erfolgte nach der Methode von

Tabelle 3. Synthese von Phenoxyäthylpenicillin aus 6-Aminopenicillansäure und S-Phenoxypropionylthioglykolat

pH	6-APA μMol/ml	Phenoxypropionyl- thioglykolat μMol/ml	Versuchs- dauer, Min.	Phenoxyäthyl- penicillin μMol/ml	%
6	12,5	12,5	0	0	10,4
			5	1,3	
			60	1,1	
6	25	25	0	0	22,8
			5	3,3	
			30	4,7	
			60	5,7	
			180	3,7	
6	50	50	0	0	15,2
			5	7,5	
			60	7,6	
6	25	50	0	0	30,8
			5	7,5	
			60	7,7	
6	25	75	0	0	44,0
			5	8,4	
			30	9,8	
			60	11,0	
			180	6,7	
6	25	100	0	0	48,0
			5	12,0	
			60	10,0	

Gaffney et al.⁹ in leicht modifizierter Form¹⁰ durch Besprühen mit einer 4proz. Lösung von p-Dimethylaminobenzaldehyd in Ac_2O mit Zusatz einiger Kristalle Natriumacetat und Erhitzen durch 2 Min. zwischen auf 140° C aufgeheizte Glasplatten. Zur quantitativen Bestimmung der Hippursäure wurden die getrennten Flecken bzw. die ohne chromatographische Trennung auf Papier aufgetragenen Proben nach Reaktion mit dem angegebenen Reagens mit je 5 ml Methanol extrahiert und sofort die Extinktion bei 470 nm im Spektralphotometer (Zeiss PMQ II) gemessen. Die Aufnahme von Standardkurven erfolgte in analoger Weise.

Die Ergebnisse der Versuche, bei denen wieder sowohl die quantitative Zusammensetzung der Versuchsansätze als auch deren pH-Werte variiert wurden, sind in Tab. 4 zusammengestellt.

⁹ G. W. Gaffney, K. Schreier, N. Di Ferrante und K. J. Altmann, J. Biol. Chem. **206**, 695 (1954).

¹⁰ M. Röhr und W. Hampel, Mh. Chem. **97**, 1787 (1966).

Tabelle 4. Synthese von Hippursäure aus Glycin und S-Benzoylthioglykolat

pH	Glycin μMol/ml	S-Benzoyl- thioglykolat μMol/ml	Versuchs- dauer, Std.	Hippursäure μMol/ml	%
7,5	200	50	2	1	
			4	1,5	3,0
			6	2,2	4,4
	400	100	2	1,3	1,3
			4	2,7	2,7
			6	5,4	5,4
	2000	500	2	9,2	1,8
			4	17,8	3,6
			6	25,9	5,2
	4000	1000	2	18,2	1,8
			4	36,7	3,7
			6	53,9	5,4
7,5	100	100	3	0,8	0,8
			6	1,6	1,6
			20	5,4	5,4
	400	100	3	2,0	2,0
			6	5,4	5,4
			20	13,8	13,8
	1000	100	3	5,1	5,1
			6	9,8	9,8
			20	29,9	29,9
6,0	100	100	3	0	0
			6	0	0
			20	1	1
6,5			3	0	0
			6	1	1
			20	1,1	1,1
7,0			3	1	1
			6	1,1	1,1
			20	2,7	2,7
7,5			3	1	1
			6	1,6	1,6
			20	5,4	5,4
8,0			3	1,1	1,1
			6	2,7	2,7
			20	8,6	8,6
8,5			3	1,6	1,6
			6	3,2	3,2
			20	11,8	11,8
9,0			3	2,2	2,2
			6	4,3	4,3
			20	16,2	16,2
9,5			3	2,7	2,7
			6	6,5	6,5
			20	21,6	21,6

Fortsetzung (Tabelle 4)

pH	Glycin μMol/ml	S-Benzoyl- thioglykolat μMol/ml	Versuchs- dauer, Std.	Hippursäure μMol/ml	%
10,0			3	3,2	3,2
			6	7,5	7,5
			20	25,9	25,9

Im Gegensatz zur Penicillinsynthese wurde bei der Hippursäurebildung eine deutliche Abhängigkeit vom pH-Wert festgestellt; wie ersichtlich, waren mit steigenden pH-Werten der Versuchsansätze entsprechend steigende Syntheseraten zu beobachten. Gegenüber der Synthese von Penicillinen verlief die Synthese der Hippursäure relativ langsam.

Es wurde nun untersucht, ob die Geschwindigkeit der Einstellung des Reaktionsgleichgewichtes durch die Wirkung eines Enzyms beschleunigt werden kann, welches zur hydrolytischen Spaltung von Hippursäure befähigt ist. Ein solches Enzym ist in verschiedenen Mikroorganismen^{10, 11} durch Züchtung in Gegenwart von Hippurat oder Benzoat spezifisch induzierbar. Bei dem aus *Fusarium semitectum* isolierten und eingehender studierten Enzym liegt das pH-Optimum bei 7,5.

Versuchsansätze mit 0,1 *m* S-Benzoylthioglykolat und 0,4 *m*-Glycin unter Zusatz von Phosphatpuffer (pH 7,5) wurden mit Myceltrockenpräparationen von *Fusarium semitectum* (200 mg/5 ml) versetzt, die durch Züchtung in Gegenwart gestufter Induktorkonzentrationen gewonnen worden waren und dementsprechend gestufte Mengen des Hippurat spaltenden Enzyms enthielten.

Die nach Versuchszeiten von 6 und 24 Std. erhaltenen Resultate im Vergleich zu denen eines Parallelversuches ohne Enzymzusatz sind in Tab. 5 zusammengestellt.

Wie aus den Ergebnissen zu ersehen, wurde in keinem Fall die Syntheserate des Versuchsansatzes ohne Enzymzusatz erreicht. Vielmehr zeigen die Versuchsdaten, denen zufolge mit steigenden Enzymkonzentrationen entsprechend erniedrigte Ausbeuten an Hippursäure verbunden waren, daß die aus der Reaktion von Benzoylthioglykolat und Glycin entstandene Hippursäure stets schneller enzymatisch gespalten als chemisch gebildet wird.

Wurden analoge Versuchsansätze bei pH 4,5 angestellt, so konnte in keinem Falle eine Hippursäuresynthese beobachtet werden.

Daß bei diesen Versuchen keine enzymatische Hydrolyse der eingesetzten S-Benzoylthioglykolsäure eintritt, die zu einem Verlust des energie-

¹¹ M. Röhr, *Allgem. u. Prakt. Chemie* **18**, 6 (1967).

reichen Reaktanten führen würde, wurde in parallelen Versuchen sichergestellt.

Tabelle 5. Synthese von Hippursäure aus S-Benzoylthioglykolat und Glycin in Gegenwart von Enzympräparationen

Versuchsdauer (Std.n.)	6	24
Enzymgehalt des Acetontrockenmycels in Einheiten/g*	Gebildete Menge in $\mu\text{Mol/ml}$ (= %)	Hippursäure
0,5	5,5	9,6
1,0	3,6	5,1
2,0	0,6	1,8
6,9	0,2	1,2
21,5	0,1	0,8
41,0	0,1	0,6
44,0	0,1	0,4
Kontrolle ohne Enzym	5,8	12,8

* 1 Einheit spaltet 1 $\mu\text{Mol/Min.}$ Hippurat bei pH 7,5 und 38° C.

Die Wirkung des Enzyms in Richtung einer Spaltung der chemisch gebildeten Hippursäure wurde besonders deutlich durch einen Versuch gezeigt, bei dem in einem Vergleichsansatz die Spaltaktivität durch Zusatz des Hemmstoffes Parachlormercuribenzoat (pCMB) beobachtet wurde. In diesem Fall konnte auch in Gegenwart des Enzyms annähernd die gleiche Syntheserate erzielt werden wie in einem Versuchsansatz ohne Enzymzusatz, während bei Zusatz des Enzyms ohne Hemmstoff keine Hippursäurebildung nachweisbar war. Die Ergebnisse dieser Versuche sind aus Tab. 6 ersichtlich. Es wurde ein durch Züchtung unter Zusatz einer sehr hohen Induktorkonzentration von 60 mMol/l Hippurat gewonnenes Trockenenzympräparat aus *Fusarium semitectum* (100 mg/5 ml Versuchsansatz) bei Konzentrationen von 0,1 *m*-S-Benzoylthioglykolat und 0,4 *m*-Glycin sowie einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-3}$ Mol/l pCMB eingesetzt.

Tabelle 6. Synthese von Hippursäure aus S-Benzoylthioglykolat und Glycin in Gegenwart von Enzympräparationen unter Zusatz von pCMB

Versuchsdauer, Std.n.	Gebildete Hippursäure in $\mu\text{Mol/ml}$ (= %)		
	ohne pCMB	mit pCMB	Kontrolle ohne Enzymzusatz
0	0	0	0
3	0	1,6	2,0
6	< 0,1	4,2	5,4
20	< 0,1	9,8	13,8

Diskussion

Bei den hier untersuchten N-Acylierungsreaktionen wird durch den Einsatz der energiereichen S-Acylthioglykolate die Entstehung der Syntheseendprodukte stark begünstigt. Die Synthese der Hippursäure verläuft relativ langsam und wird um so mehr beschleunigt, je höher im untersuchten pH-Bereich (6—10) der pH-Wert liegt, während die Geschwindigkeit der analogen Penicillinsynthese im pH-Bereich 5—8 ziemlich unabhängig vom pH-Wert ist. Dies könnte etwa wie folgt erklärt werden:

Die Umsetzung des reaktionsfähigen Acylthioglykolats ist eine von Protonen beschleunigte Reaktion, da die Protonierung der Carbonylgruppe ($\text{>C}^{\oplus}\text{—}\bar{\text{O}}\text{—H}$) den nukleophilen Angriff durch den nukleophilen Partner (6-APA bzw. Glycin) begünstigt. Andererseits wird das Proton um so mehr vom nukleophilen Partner, der Base, beansprucht, also die reaktionsfähige NH_2 -Gruppe blockiert, je stärker die Base ist. Im allgemeinen wird daher eine optimale Geschwindigkeit bei jenem pH-Wert liegen, der in der Nähe des $\text{p}K_2$ -Wertes (die Base als Säure betrachtet) des nukleophilen Partners liegt.

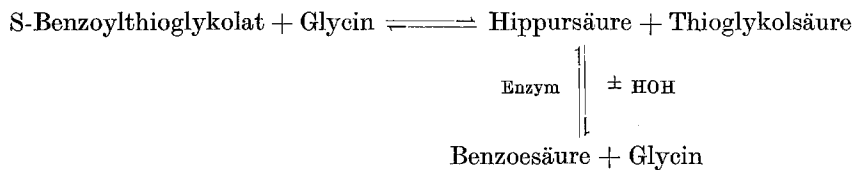
Das $\text{p}K_2$ der 6-APA liegt um 6, daher ist im pH-Gebiet 5—8 keine große Änderung der Reaktionsgeschwindigkeit zu erwarten, während beim Glycin mit seinem $\text{p}K_2$ -Wert von etwa 10 die Reaktionsgeschwindigkeit um so größer ist, je mehr man sich von unten diesem pH-Wert nähert.

Vielleicht steht hiermit, unabhängig von etwaigen sterischen Behinderungen, auch in Zusammenhang, daß die Penicillinsynthese aus der aktivierten Acylverbindung relativ rasch, die der Hippursäure aber langsamer verläuft.

Bei Erhöhung des pH-Wertes über das $\text{p}K_2$ hinaus wird zwar die Base wieder aus der $\text{RNH}_3^{\oplus}$ -Form in die reaktionsfähigere RNH_2 -Verbindung übergeführt, andererseits aber das Acylthioglykolat reaktionsträger, so daß der nukleophile Angriff erschwert wird; es kann also hierbei die Reaktionsgeschwindigkeit wieder vermindert werden, unter Umständen aber auch ziemlich konstant bleiben.

Orientierende Versuche bei der Hippursäuresynthese, die oberhalb pH 10 angestellt wurden, deuten in Richtung eines leichten Absinkens der Reaktionsgeschwindigkeit.

Der Versuch, die Reaktion von S-Benzoylthioglykolat mit Glycin durch ein Enzym, welches die hydrolytische Spaltung von Hippursäure zu katalysieren vermag, in unspezifischer Weise zu beschleunigen (vgl. Schema), führte zu keinem Erfolg; in seinem Stabilitäts- und Aktivitätsbereich von pH 6 bis 8 bewirkte vielmehr das Enzym, daß die Hippursäure stets schneller enzymatisch gespalten als aus der Synthesereaktion mit S-Benzoylthioglykolat nachgebildet wurde.



Im Falle der Penicillinsynthese verlief im untersuchten Bereich von pH 5—8, der aus Gründen der Stabilität des Penicillins weder über- noch unterschritten wurde, die Reaktion so rasch, daß eine unspezifische Beeinflussung der Syntheserate durch eine Penicillinamidase nicht zu erwarten war.